

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4035—2021

鸡滑液囊支原体感染诊断技术

Diagnostic techniques for Mycoplasma synoviae infection

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 临床诊断	1
5 实验室诊断	2
6 综合判定	6
附录 A(资料性) 鸡滑液囊支原体分离鉴定溶液的配制	7
附录 B(资料性) 鸡滑液囊支原体的分离鉴定	8
附录 C(资料性) qPCR 的特异性扩增序列(119 bp)	9
附录 D(资料性) 实时荧光定量 PCR 阳性质粒的制备及标准曲线的建立	10
附录 E(资料性) 鸡滑液囊支原体 MSBP 蛋白抗原的制备	11
附录 F(资料性) 鸡滑液囊支原体阳性对照血清的制备	13
附录 G(资料性) 鸡滑液囊支原体阴性对照血清的制备	14
附录 H(资料性) 间接 ELISA 实验溶液的配制	15

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所。

本文件主要起草人：宫晓炜、郑福英、陈启伟、刘永生。

引 言

鸡滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)感染是由鸡滑液囊支原体引起的鸡、火鸡和珍珠鸡的传染病,又称鸡传染性滑膜炎(avian infectious synovitis)。MS 可通过直接或间接接触水平传播,也可经种蛋垂直传播,以 4 周龄~12 周龄的鸡和 10 周龄~12 周龄的火鸡多发,成年鸡和幼龄鸡也可发生。病鸡临床上主要表现为精神沉郁,采食减少,喜卧,跗关节和趾关节明显肿胀、变形,跛行,胸部囊肿和蛋壳尖端畸形。特征性病变为关节积液,滑液囊和肌腱发炎,实质器官肿大,部分病例出现气囊炎。当合并感染新城疫病毒、传染性支气管炎病毒或大肠杆菌等病原时,会引起鸡的免疫抑制,从而使病情加重甚至死亡。

本文件规定了鸡滑液囊支原体感染的临床诊断和实验室诊断(鸡滑液囊支原体的分离鉴定、实时荧光定量 PCR 核酸检测方法和间接 ELISA 抗体检测方法)的技术要求,可对鸡滑液囊支原体感染进行综合诊断。

鸡滑液囊支原体感染诊断技术

1 范围

本文件规定了鸡滑液囊支原体感染的临床诊断,病原的分离鉴定、实时荧光定量 PCR 核酸检测和间接 ELISA 抗体检测的技术要求。

本文件适用于鸡滑液囊支原体感染的临床诊断和实验室检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

SP4 培养基 SP4 medium

用于培养鸡滑液囊支原体的改良培养基。

3.2

实时荧光定量 PCR real-time fluorescent quantitative PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过荧光信号对未知模板进行定性分析或通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

3.3

间接 ELISA indirect enzyme-linked immunosorbent assay

将抗原连接到固相载体上,样品中待测抗体与抗原结合形成复合物,再用酶标二抗与复合物中的抗体结合,最后加入底物,用分光光度计测定加底物后的显色程度,确定待测抗体的方法。

3.4

Ct cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定的荧光阈值时所经历的循环数。

4 临床诊断

4.1 流行特点

4.1.1 鸡、火鸡和珍珠鸡易感,鸭、鹅、鸽、鹌鹑也可感染,以 4 周龄~12 周龄的鸡和 10 周龄~12 周龄的火鸡多发,成年鸡和幼龄鸡也可发生。

4.1.2 主要经直接或间接接触水平传播,也可经种蛋垂直传播。

4.1.3 潜伏期为 8 d~10 d。

4.1.4 本病的急性感染期持续时间短,而慢性感染持续时间长,可终身带菌。

4.1.5 生物安全体系不完善,饲养环境不良,如密度过大、空气不流通、潮湿、过冷,以及与其他致病因子混合感染,均可加重本病的感染程度。

4.2 临床症状

4.2.1 病鸡表现为精神沉郁,鸡冠苍白、萎缩,不食或少食,排绿色稀便,消瘦,最后衰竭死亡。

4.2.2 病鸡表现为关节肿胀,跛行,喜卧。

4.2.3 蛋鸡产蛋率下降,部分蛋壳尖端畸形。

4.3 剖检病变

4.3.1 关节滑液囊和肌腱发炎。

4.3.2 跗关节和趾关节积液。

4.3.3 呼吸系统感染出现气囊炎。

4.4 结果判定

符合 4.1 中描述的某些流行特点,病鸡出现 4.2 中的部分临床症状和 4.3 中的部分眼观病变,可判断为疑似鸡滑液囊支原体感染。

5 实验室诊断

5.1 样品采集、保存与运输

5.1.1 样品采集和处理

5.1.1.1 每个发病鸡群选择 10 只以上病鸡采集样品。

5.1.1.2 采集血清样品时,选择具有临床症状的活鸡,颈静脉、翅静脉或心脏无菌采集血液 1 mL~2 mL,3 500 r/min~4 000 r/min 室温离心 5 min 分离血清。

5.1.1.3 棉拭子和组织样品

5.1.1.3.1 活鸡可用无菌棉拭子从喉头进行取样,根据用途不同,进行以下不同处理:

- a) 用于分离培养样品,放入含 4.5 mL SP4 液体培养基(见附录 A 中的 A.2)的无菌离心管中;
- b) 用于提取 DNA 的样品,放入含 1 mL HI buffer(见 A.4)的无菌离心管中。

5.1.1.3.2 死亡鸡可用无菌棉拭子沾取肿胀足垫、关节黏液或气囊干酪物取样:

- a) 用于分离培养的,放入含 4.5 mL SP4 培养基(见 A.2)的无菌离心管中;
- b) 用于提取 DNA 的,放入含 1 mL HI buffer(见 A.4)的无菌离心管中。

5.1.2 样品的运输与保存

5.1.2.1 用于鸡滑液囊支原体分离培养的棉拭子和组织样品,采集后立即放入 4.5 mL SP4 液体培养基中,然后置于冰上冷链运输,24 h 内送往实验室。

5.1.2.2 用于 DNA 提取的棉拭子和组织样品置于冰上冷链运输,到达实验室后-20℃以下冻存。

5.1.2.3 血清置于冰上冷链运输,到达实验室后-20℃以下冻存。

5.2 病原的分离鉴定

5.2.1 仪器

5.2.1.1 电子天平。

5.2.1.2 光学显微镜。

5.2.1.3 恒温培养箱。

5.2.2 耗材

5.2.2.1 微量可调移液器(0.5 μL~10 μL、100 μL~1 000 μL)及配套吸头。

5.2.2.2 10 mL 无菌离心管。

5.2.2.3 涂布棒。

5.2.2.4 0.45 μm 滤器。

5.2.2.5 一次性培养皿。

5.2.3 试剂

5.2.3.1 酵母浸出液,见 A.1。

5.2.3.2 SP4 液体培养基,见 A.2。

5.2.3.3 SP4 固体平板,见 A.3。

5.2.3.4 HI buffer,见 A.4。

5.2.4 病原的分离

5.2.4.1 将放入 4.5 mL SP4 液体培养基中的棉拭子用力搅拌挤压后弃之,离心管放入 5% CO₂ 培养箱中,37 °C 培养。

5.2.4.2 培养 24 h 后,将 SP4 液体培养物按 1:10 的比例转接新的液体培养基中培养,直至培养基 pH 下降,颜色由红色变为黄色(若培养基变混浊,用 0.45 μm 滤器过滤除菌),用接种环蘸取培养物划线于 SP4 固体平板。

5.2.4.3 上述 SP4 固体平板放置于湿盒中 37 °C 培养 5 d~7 d,低倍镜下观察菌落的生长情况,用接种环挑取平板上的疑似鸡滑液囊支原体菌落接种到 SP4 液体培养基中培养,直至培养基 pH 下降,颜色由红色变为黄色,再将变黄的培养物划线接种到 SP4 固体平板上。重复该步骤,直至得到鸡滑液囊支原体特征性菌落。

5.2.4.4 将特征菌落接种到 SP4 液体培养基中培养,培养基颜色变黄后,用 0.45 μm 滤器过滤液体培养物;转接 200 μL 滤液到 1.8 mL 液体培养基中进行 10 倍梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-4});将 SP4 固体平板划为 8 等份,依次取 5 μL 原液和不同浓度的稀释液分别涂布到 SP4 固体平板上。

5.2.4.5 上述 SP4 固体平板在 37 °C 培养箱中培养 5 d~7 d 后,可在低倍显微镜下观察到分布均匀的菌落,选取单个菌落接种于液体培养基中培养,直至培养基由红色变为黄色,再涂布 SP4 固体平板。如此重复 3 次,即可得到纯化的菌株,加甘油于 -80 °C 保存。

5.2.5 病原的形态观察

5.2.5.1 菌落特征

用低倍显微镜观察,菌体边缘整齐,中间较厚,呈圆形和圆屋顶状,反复传代可呈周边透明的“油煎蛋”样菌落(见附录 B 中的 B.1)。

5.2.5.2 染色镜检

用吉姆萨染色,呈淡紫色,菌体呈丝状、杆状或球形,多形性球状体或球杆状,直径约 0.2 μm,长约 0.4 μm(见 B.2)。

5.2.6 病原的生化鉴定

5.2.6.1 葡萄糖发酵实验

将 5.2.4.5 纯化的菌株接种于含 0.5% 葡萄糖的支原体培养基中,培养基颜色由红色变为黄色,表明纯化的菌株发酵葡萄糖,培养基产酸。

5.2.6.2 精氨酸水解实验

将 5.2.4.5 纯化的菌株接种于含 0.2% 精氨酸的支原体培养基中,培养基颜色没有从黄色变为红色,表明纯化的菌株不水解精氨酸,培养基不产碱。

5.2.6.3 尿素实验

将 5.2.4.5 纯化的菌株接种于不含葡萄糖和精氨酸、而是加入含 0.1% 尿素的 pH 5.5~6.0 的支原体培养基中,培养基颜色没有从黄色变为红色,表明纯化的菌株不水解尿素。

5.2.7 病原的鉴定

符合菌落特征和生化特征的菌株,按照 5.3 做实时荧光定量 PCR 检测。

5.2.8 结果判定

菌落特征明显,符合生化反应特性,参照 5.3 鉴定结果阳性,判定为鸡滑液囊支原体分离阳性;否则,判定为未检出鸡滑液囊支原体。

5.3 实时荧光定量 PCR 方法

5.3.1 仪器

5.3.1.1 实时荧光定量 PCR 仪及配套 PCR 反应管。

5.3.1.2 离心机。

5.3.2 耗材

5.3.2.1 实时荧光定量 PCR 反应管。

5.3.2.2 微量可调移液器(0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL 和 100 μL~1 000 μL 各 1 支)及配套吸头。

5.3.3 试剂

5.3.3.1 灭菌双蒸水或去离子水。

5.3.3.2 商品化细菌 DNA 提取试剂盒。

5.3.3.3 商品化实时荧光定量 PCR 预混液。

5.3.3.4 实时荧光定量 PCR 正向引物、反向引物以及探针,详见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测鸡滑液囊支原体的引物及探针

引物	序列(5'→3')	产物大小
实时荧光定量 PCR 正向引物	CTA AAT ACA ATA GCC CAA GGC AA	119 bp(见附录 C)
实时荧光定量 PCR 反向引物	CCT CCT TTC TTA CGG AGT ACA	
实时荧光定量 PCR 探针	5'-FAM-AGC GAT ACA CAA CCG CTT TTA GAAT-BHQ1-3'	

5.3.3.5 HI buffer。

5.3.3.6 阳性质粒(见附录 D,用于建立标准曲线)。

5.3.4 样品处理

5.3.4.1 用于 DNA 提取的棉拭子或喉头组织样品,在 4 °C 条件下放置 2 h~4 h 后充分振荡混匀,弃去棉拭子和喉头组织,收集 HI buffer 悬液,用于提取核酸。纯培养物可直接用于提取核酸。

5.3.4.2 用商品化细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA。取 200 μL~1 mL HI buffer 悬液或纯培养物作为样品,若试剂盒提取步骤中需要将样品预先离心取沉淀,则以 12 000 r/min 将样品离心 15 min,弃上清液,得到的沉淀用于提取 DNA。提取步骤按照说明书进行,提取的 DNA 冻存于-20 °C,作为模板备用。

5.3.5 实时荧光定量 PCR 反应

5.3.5.1 对照设置

每次进行实时荧光定量 PCR 反应时均设置阳性对照和阴性对照。以鸡滑液囊支原体 wvu1853 株纯培养物作为阳性对照,以培养基或 HI buffer 作为阴性对照。

5.3.5.2 反应体系

在超净工作台中按照表 2 剂量要求在实时荧光定量 PCR 反应管中,依次加入试剂。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系

试剂	用量,μL
灭菌去离子水	3.5
实时荧光定量 PCR 预混液	12
实时荧光定量 PCR 探针(1 μmol/L)	2.5
实时荧光定量 PCR 正向引物(12.5 μmol/L)	1
实时荧光定量 PCR 反向引物(12.5 μmol/L)	1
模板 DNA(10 ng/μL~20 ng/μL)	5
总量	25

5.3.5.3 扩增程序

95 °C 预变性 3 min,95 °C 3 s,60 °C 30 s,40 个循环。

5.3.6 结果判定

阳性对照有明显对数扩增曲线,且 Ct 值≤25,阴性对照无扩增曲线或 Ct 值>35,则实验成立。

被检样品 Ct 值≤29.5,判为实时荧光定量 PCR 结果阳性,表述为鸡滑液囊支原体核酸检测阳性;被检样品 Ct 值>31.5 或无 Ct 值,判为实时荧光定量 PCR 结果阴性,表述为鸡滑液囊支原体核酸检测阴

性;被检样品 $29.5 < Ct \text{ 值} \leq 31.5$ 时为可疑,需重新对样品进行检测,若重复检测该样品为阳性或仍为可疑,判为实时荧光定量 PCR 结果阳性,若重复检测 $Ct \text{ 值} > 31.5$,判为实时荧光定量 PCR 结果阴性。

5.4 间接 ELISA 方法

5.4.1 仪器

5.4.1.1 恒温培养箱。

5.4.1.2 酶标仪(含 450 nm 波长滤光片)。

5.4.2 耗材

5.4.2.1 96 孔血清稀释板。

5.4.2.2 1 000 mL 量筒(配制洗涤液用)。

5.4.2.3 微量可调移液器($0.5 \mu\text{L} \sim 10 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L} \sim 100 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ 和 $100 \mu\text{L} \sim 1\,000 \mu\text{L}$ 各 1 支)及配套吸头。

5.4.2.4 一次性封板膜。

5.4.2.5 酶标板。

5.4.3 试剂

5.4.3.1 鸡滑液囊支原体重组 MSPB 蛋白抗原(见附录 E),可从中国农业科学院兰州兽医研究所获取。

5.4.3.2 阳性对照血清(见附录 F)。

5.4.3.3 阴性对照血清(见附录 G)。

5.4.3.4 商品化辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鸡 IgG 抗体。

5.4.3.5 商品化 TMB 底物溶液。

5.4.3.6 包被缓冲液、洗涤液、封闭液、血清稀释液、酶标抗体稀释液和终止液(见附录 H)。

5.4.4 操作步骤

5.4.4.1 抗原包被

用包被缓冲液将鸡滑液囊支原体重组 MSPB 蛋白抗原稀释至 $0.57 \mu\text{g}/\text{mL}$, $100 \mu\text{L}$ /孔包被酶标板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 吸附 1 h,转入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 吸附 12 h~16 h。翌日甩掉孔内液体,每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,洗涤 3 次,每次 1 min,拍干板上残余液体。

5.4.4.2 封闭酶标板

每孔加入封闭液 $100 \mu\text{L}$,用封口膜封口, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。取下封口膜,甩干孔内液体,每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,洗涤 3 次,每次 1 min,拍干板上残余液体。

5.4.4.3 加入血清

在检测前用样品稀释液将阳性对照血清、阴性对照血清和待检血清作 50 倍稀释($3 \mu\text{L}$ 样品加 $147 \mu\text{L}$ 血清稀释液,混匀)。每孔加入稀释好的血清 $50 \mu\text{L}$,每份血清做 2 个重复。用封口膜封口, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。取下封口膜,甩干孔内液体,每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,洗涤 3 次,每次 1 min,拍干板上残余液体。

5.4.4.4 加入 HRP 标记兔抗鸡 IgG 抗体

用酶标抗体稀释液将 HRP 标记兔抗鸡 IgG 稀释至 $0.22 \mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加入 $100 \mu\text{L}$,用封口膜封口, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。取下封口膜,甩干孔内液体,每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,洗涤 3 次,每次 1 min,拍干板上残余液体。

5.4.4.5 加入底物溶液

每孔加入 TMB 底物溶液 $100 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 10 min。

5.4.4.6 加入终止液

每孔加入终止液 $50 \mu\text{L}$,立即在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

5.4.5 结果判定

$0.8 \leq \text{阳性对照 } \text{OD}_{450} \text{ 平均值} (\text{PC}\bar{X}) \leq 1.2$, $\text{阴性对照 } \text{OD}_{450} \text{ 平均值} (\text{NC}\bar{X}) < 0.3$,实验成立。其中,

$(PC\bar{X} = [PC1A(450) + PC2A(450)]/2, NC\bar{X} = [NC1A(450) + NC2A(450)]/2)$ 。

计算 $S/P: S/P = (\text{样品值} - NC\bar{X}) / (PC\bar{X} - NC\bar{X})$ 。 $S/P \geq 0.3$, 判为鸡滑液囊支原体抗体血清学阳性, 表明鸡感染了鸡滑液囊支原体; $S/P < 0.3$, 判为鸡滑液囊支原体抗体血清学阴性, 表明鸡未感染鸡滑液囊支原体。

6 综合判定

未免疫鸡滑液囊支原体疫苗的鸡, 符合 4.4 疑似病例, 且经 5.2 病原的分离鉴定、5.3 实时荧光定量 PCR 检测或 5.4 间接 ELISA 检测任何一项阳性者, 可诊断为鸡滑液囊支原体感染。免疫了鸡滑液囊支原体疫苗的鸡, 若感染呼肠孤病毒造成关节炎, 可能误诊断为鸡滑液囊支原体感染。

附录 A

(资料性)

鸡滑液囊支原体分离鉴定溶液的配制

A.1 酵母浸出液

称取酵母粉200 g,加入800 mL~1 200 mL去离子水,在28℃~32℃下磁力搅拌1 h~1.5 h,使细粉充分分散、混匀、发酵;然后逐渐增加温度到40℃,此过程需要10 min~15 min;之后每分钟增加5℃,不断搅拌,防止酵母烧糊致使营养成分破坏;加热至沸点维持5 min,总时间控制在2 h左右,减少污染杂菌的概率;冷却至室温,3 500 r/min离心20 min,取上清液,先用滤纸过滤,然后依次用0.8 μm、0.45 μm、0.22 μm的滤器过滤,将滤液按每份50 mL分装后冻存于-20℃备用,半年内使用。

A.2 SP4 液体培养基

PPLO 肉汤	3.50 g
10%醋酸铊溶液	5 mL
胰蛋白胨	10.00 g
蛋白胨	5.00 g
葡萄糖	5.00 g

加150 mL蒸馏水溶解,用NaOH调pH至 7.6 ± 0.2 ,121℃、15 min高压灭菌。取出后室温冷却至45℃~50℃,无菌条件下每1 000 mL培养液加CMRL-1066 500 mL,酵母浸出液30 mL,1%的酚红2.5 mL,胎牛血清150 mL,青霉素80万单位/L~100万单位/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.1 g/L,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸0.1 g/L,轻轻摇匀,置4℃保存,一个月内使用。

A.3 SP4 固体平板

PPLO 肉汤	3.50 g
10%醋酸铊溶液	5 mL
胰蛋白胨	10.00 g
蛋白胨	5.00 g
葡萄糖	5.00 g
琼脂粉	4.00 g

加680 mL蒸馏水溶解,用NaOH调pH至 7.6 ± 0.2 ,121℃、15 min高压灭菌。取出后室温冷却至45℃~50℃,无菌条件下每1 000 mL培养液加胎牛血清150 mL,青霉素80万单位/L~100万单位/L,L-半胱氨酸盐酸盐0.1 g/L,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸0.1 g/L,轻轻摇匀,立即倾倒入直径90 mm的一次性培养皿内,每个培养皿倒入15 mL~20 mL,待其凝固并冷却至室温后,用封口膜封边,倒置4℃保存,2周内使用。

A.4 HI buffer

NaCl	8.50 g
KH ₂ PO ₄	0.162 5 g
Na ₂ HPO ₄	0.54 g

加入去离子水800 mL,待固体试剂全部溶解后,定容至1 000 mL,用HCl或NaOH调节pH至7.2,121℃、15 min高压灭菌,4℃保存。

附录 B

(资料性)

鸡滑液囊支原体的分离鉴定

B.1 鸡滑液囊支原体特征性菌落(10×)

见图 B.1。

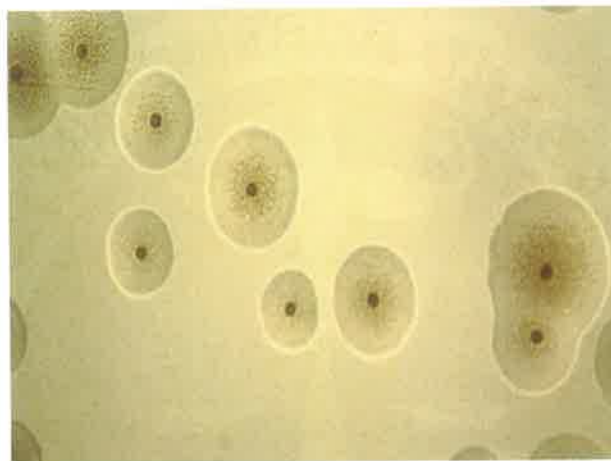


图 B.1 鸡滑液囊支原体特征性菌落(10×)

B.2 鸡滑液囊支原体吉姆萨染色(100×)

见图 B.2。

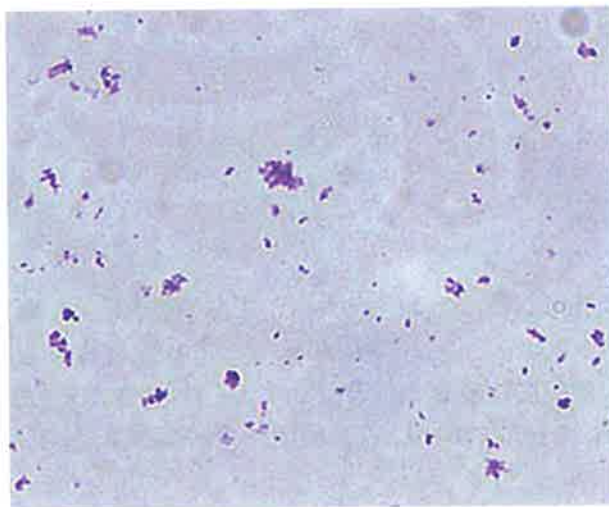


图 B.2 鸡滑液囊支原体吉姆萨染色(100×)

附录 C

(资料性)

qPCR 的特异性扩增序列(119 bp)

CTAAATACAATAGCCCAAGGCAAAAAAGCGATACACAACCGCTTTTAGAAAAATCTAAA
GCTTTCAGTTAATAAAAAATGCCTTTTGTAATAATAATGTACTCCGTAAGAAAGGAGG

附录 D

(资料性)

实时荧光定量 PCR 阳性质粒的制备及标准曲线的建立

D.1 仪器

恒温摇床、制冰机、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、实时荧光定量 PCR 仪。

D.2 试剂

引物 MS ZL-F/MS ZL-R(25 pmol/ μ L), 等效商品化胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、pMD-19T 质粒、感受态大肠杆菌 JM109、10 mg/mL 氨苄青霉素和 LB 培养基。

D.3 引物序列

上游引物 MS ZL-F: 5'-TGCCCGAAGTCGGTTTGTTA-3';

下游引物 MS ZL-R: 5'-TCAACGAGCCTTATCGCAGG-3'。

D.4 阳性质粒的构建和鉴定

D.4.1 扩增、回收 PCR 产物

以 MS ZL-F 和 MS ZL-R 为引物, 以提取到的鸡滑液囊支原体 DNA 为模板, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环(95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min); 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温 5 min。取 5 μ L PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 以确定扩增得到大小为 506 bp 的目的基因片段。

D.4.2 质粒构建及鉴定

用商品化胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 得到的纯化 DNA 片段与 pMD-19T 克隆载体连接, 转化进大肠杆菌感受态细胞 JM109, 涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h~16 h。挑取单一的白色菌落至含有氨苄青霉素的液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值 1.0~1.2, 取菌液 2 mL~5 mL, 利用质粒提取试剂盒提取质粒, 测序。将序列测定为阳性的质粒命名为 pMD-19T-506, 并将质粒和含有重组子的阳性菌分别保存于 -20 $^{\circ}$ C 和 -70 $^{\circ}$ C。

D.5 标准曲线的建立

D.5.1 用分光光度计测定 pMD-19T-506 阳性质粒的浓度, 用双蒸水以 10 倍倍比稀释至 1:10¹⁰, 每个梯度重复 3 次进行实时荧光定量 PCR。

D.5.2 根据扩增结果从中选取 5 个~6 个点制作符合要求的标准曲线。

附录 E

(资料性)

鸡滑液囊支原体 MSBP 蛋白抗原的制备

E.1 仪器

超声波细胞破碎仪、恒温摇床、制冰机、紫外可见分光光度计。

E.2 试剂

一次性针头滤器(孔径 0.45 μm),等效商品化 T4 DNA Ligase、*Bam*H I 限制性内切酶、*Xho* I 限制性内切酶、DNA Marker(DL2000)、*Ex Taq*、质粒快速提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、pET-30a 质粒、感受态大肠杆菌 BL21(DE3)、50 mg/mL 卡那霉素、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、His 标签蛋白纯化试剂盒和 LB 培养基。

E.3 基因合成

选取鸡滑液囊支原体 MSPB 全长基因中的 N 端部分作为目的基因,基因片段中的密码子 TGA 编码色氨酸,将该密码子改为大肠杆菌中的色氨酸密码子 TGG,并分别在 5' 末端和 3' 末端添加 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,共 1 095 bp,送相关生物公司合成,合成的目的基因与 pET-30a 质粒连接,得到重组表达载体 pET-30a-MSPB-N。合成的序列如下:

GGATCCATGTCATGTGGTGATCAAACCTCCAGCACCTGCTCCAACACCTGGAAACCCAAAT
ACTAATAATCCTCAAAACCCAAATCCAGGAAACCCAGAAAACCCAGGTACTGATAATACTCA
AAACTCAAATCCAGGAAACCCAGGGGGTGGTACAGTTGACCCTGTAGAGGCTGCTAAAACAG
AAGCTAAAACCTGCTATTGATGCTGCAGCAGAATTATCAGATTCAGTTAAAGAAGCATTAAA
AAGACAAGTTGAAGCAACTACAACAGAATCTGCAGCCAGAGATTTAAAAGCTAAAGCAGAA
GCTCTTGTTCAGCTGTAAAAGCATTAAAGCGGATCGGTTACTGCTGCTAAAGCAGTTAAAGA
TGATACTGAATACTCAAAAGTAACAGATACTCTTAGAACTGATTTAGAAGCAAAATTAACA
GCAGCAACAGCATTACTAGAAGATGGAACAAAACCTAAAAATCTAGATGCTTCAAGTAATT
TAGACACAACAAAAGCTTCATTAGAATCTGCAAAAACAGCTCTTGATGCAGCAGTTGCAGCA
GTTAAACCAAATCTTGACTTCCAAAAACAAAACCTAGCGCTGCAGCTAAAGTTACAGAACT
TGAATCTCTTGTAATACAGCTTTAAAAGATGAATTACAAAGACTAGTTACAGCTTTAGAT
AAAGATCATGCAACTGAAGCTACAACAATGTTAGTTAACCTAACATCGTTAAAAGAATCAC
TAGAATCTCTTCAAACCTTAGTATCAGATGGTCTAAAAATGCAAGTGGATTATCCACAAAA
ATACTACGATGCTGACAATAAAGAAGCATTTCGATGCAGCGCTGCTTAAAGCTTCATCAGTAT
TTTCAGCATTCAAATGGACGAATGAATCAATTATGGTTCCTGCTCCAGAAGGAGACGCGCTT
CCAAACCTAGAGCTTGGACCAAAGCTAGAGACAAATCAGAATTCAAACCTACAAAACCTTCTT
AATGGCTCCAACCTCAAGCAGCTACTCCAACAACAGTGCAAACCTTCACCTAGCGCGGCAGCATC
AGCTACAGTTAGAGTTGTAATGTCAGAAGAAGCTGCAGCAGAACTCGAG

E.4 重组表达载体的鉴定

E.4.1 PCR 鉴定

以 pET-30a-MSPB-N 质粒为模板,用 PCR 进行扩增鉴定。上游引物:5'-ATGTCATGTGGTGAT-CAAACCTCC-3',下游引物:5'-TTCTGCTGCAGCTTCTTCTGAC-3'。具体扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性

5 min;95 °C变性 30 s,58 °C退火 45 s,72 °C延伸 90 s,共 35 个循环;72 °C延伸 10 min。PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定,以确定扩增得到大小为 1 083 bp 的 DNA 片段。

E.4.2 双酶切鉴定

将 pET-30a-MSPB-N 质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞,涂布到含卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板上,37 °C 培养 12 h~15 h,挑取平板上大小均一的白色单菌落,分别接种在 5 mL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素的 LB 液体培养基中,200 r/min,37 °C 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值 1.0~1.2。从菌液中提取质粒,进行 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定。

E.4.3 阳性菌株的鉴定

将 E.4.2 中的阳性菌液送相关公司测序,测序结果正确,判定为阳性菌株。

E.5 目的蛋白的表达和纯化

E.5.1 取 E.4.3 中的阳性菌株的菌液,以 1:100 的比例转接到含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素的 500 mL LB 培养基中,于 37 °C,200 r/min 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值 0.6~0.8,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,诱导培养 5 h。

E.5.2 将以上菌液分装到 250 mL 容量的离心管中,在 4 °C,6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。

E.5.3 用 10 mL pH 7.4 PBS 重悬沉淀,充分吹散混匀,转移到 50 mL 容量的离心管中,在 4 °C,6 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。

E.5.4 用 15 mL pH 7.4 PBS 重悬沉淀,充分吹散混匀,将离心管置于碎冰中,再放到超声波细胞破碎仪中,以超声 5 s,间隔 1 s 的程序,超声破碎 30 min,然后冻融 1 次,再超声破碎 1 次。

E.5.5 将破碎裂解物在 4 °C,10 000 r/min 离心 30 min,取上清液。

E.5.6 用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化 E.5.5 上清中的可溶性目的蛋白,纯化步骤按照试剂盒说明书操作。

E.5.7 纯化后的蛋白溶液,用 0.45 μm 一次性针头过滤器过滤除菌。

E.5.8 取纯化的蛋白溶液,进行 SDS PAGE 电泳,用灰度扫描法检测蛋白纯度,达到 90% 以上符合要求。

E.5.9 用紫外可见分光光度计测定蛋白的浓度,蛋白浓度达到 0.6 mg/mL 以上符合要求。

附录 F

(资料性)

鸡滑液囊支原体阳性对照血清的制备

F.1 实验用鸡的选择

选取 10 日龄~30 日龄 SPF 鸡或未免疫鸡滑液囊支原体疫苗的健康鸡。若用未免疫鸡滑液囊支原体疫苗的健康鸡,免疫前采集其喉头棉拭子和血清样品,按照 5.3 实时荧光定量 PCR 方法检测鸡滑液囊支原体核酸,应为阴性;按照 5.4 间接 ELISA 方法检测鸡滑液囊支原体血清抗体,应为阴性。

F.2 鸡滑液囊支原体接种实验

F.2.1 取 0.5 mL 冻存的鸡滑液囊支原体菌种,以 1:10 接到 4.5 mL SP4 液体培养基中,培养至培养基颜色变为橘黄色。

F.2.2 将上述 5 mL 菌液转移至 45 mL SP4 液体培养基中继续培养,当培养基颜色变为橘黄色,将 50 mL 菌液转接到 450 mL 培养基中(1:10 比例)扩大培养。

F.2.3 收获按上述方法培养的 1 L 菌液,12 000 r/min 离心 40 min,沉淀用灭菌的 0.1 mol/L PBS 重悬,12 000 r/min 离心 40 min 进行洗涤,重复 2 次以去除杂质,最后用 100 mL 0.1 mol/L PBS 重悬菌体(菌体 10 倍浓缩)。在浓缩的菌体中加入 4 mL 0.1 mol/L 的环化的二乙烯亚胺(BEI),放入 37 °C 温箱中灭活 24 h;待灭活完成后,加入 0.1 mol/L 的硫代硫酸钠,37 °C 24 h 终止灭活;最后加入 1 mL 浓度为 1% 的硫柳汞作为防腐剂。ISA 71 RVG 佐剂与灭活菌液按质量分数比 7:3 的比例,高剪切匀浆混合制备免疫原。

F.2.4 用上述抗原在鸡颈部皮下多点注射进行免疫,进行 2 次~3 次免疫,每次免疫间隔 2 周,每次免疫抗原剂量为 100 μ g/只。

F.3 血清抗体效价的检测

最后一次免疫后 7 d,经翅静脉少量采血,置 37 °C 静置 2 h 分离血清,用 5.4 间接 ELISA 方法测定血清抗体效价, $OD_{450} \geq 0.8$ 符合要求。若血清 $0.8 \leq OD_{450} \leq 1.2$,可直接作为阳性对照血清;若血清 $OD_{450} > 1.2$,需用样品稀释液(见 H.5)进行稀释,调整至其 $0.8 \leq OD_{450} \leq 1.2$ 。

F.4 阳性对照血清的收集

颈动脉放血直至鸡死亡,收集全部血液至 100 mL 容量的离心管中,旋紧盖子,室温过夜,4 000 r/min 离心 15 min,分离血清,所得的血清即为阳性对照血清;经 56 °C 水浴灭活 30 min,按血清量的 0.04% 加入 Proclin-300 防腐,经 0.22 μ m 滤器过滤除菌,无菌定量分装,-20 °C 以下保存。

附录 G

(资料性)

鸡滑液囊支原体阴性对照血清的制备

G.1 实验用鸡的选择

选取 10 日龄~30 日龄 SPF 鸡或未免疫鸡滑液囊支原体疫苗的健康鸡。若用未免疫鸡滑液囊支原体疫苗的健康鸡,免疫前采集其喉头棉拭子和血清样品,按照 5.3 实时荧光定量 PCR 方法检测鸡滑液囊支原体核酸,应为阴性;按照 5.4 间接 ELISA 方法检测鸡滑液囊支原体血清抗体,应为阴性。

G.2 阴性对照血清的收集

颈动脉放血直至鸡死亡,收集全部血液至 100 mL 容量的离心管中,旋紧盖子,室温过夜,4 000 r/min 离心 15 min,分离血清,所得的血清即为阴性对照血清;经 56 °C 水浴灭活 30 min,按血清量的 0.04% 加入 Proclin-300 防腐,经 0.22 μm 滤器过滤除菌,无菌定量分装,-20 °C 以下保存。

附录 H

(资料性)

间接 ELISA 实验溶液的配制

H.1 包被缓冲液

Na₂CO₃

0.318 g

NaHCO₃

0.588 g

加入 180 mL 无菌去离子水,充分搅拌混匀后,定容至 200 mL,过滤除菌,室温保存备用。

H.2 pH 7.4 PBS

KH₂PO₄

0.2 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O

2.9 g

NaCl

8 g

KCl

0.2 g

加入去离子水 800 mL,待固体试剂全部溶解后,定容至 1 000 mL,用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 7.4, 121 °C、30 min 高压灭菌,4 °C 保存。

H.3 PBST 洗涤液

将 0.5 mL 吐温-20 加入 1 000 mL 灭菌 pH 7.4 PBS 溶液中,充分搅拌混匀。

H.4 封闭液

BSA

10 g

ProClin-300

1 mL

加入 800 mL PBST 洗涤液,充分搅拌混匀后定容至 1 000 mL,过滤除菌,无菌定量分装,置 2 °C ~ 8 °C 保存。

H.5 样品稀释液

酪蛋白

20 g

ProClin-300

1 mL

加入 800 mL PBST 洗涤液,充分搅拌混匀后定容至 1 000 mL,过滤除菌,无菌定量分装,置 2 °C ~ 8 °C 保存。

H.6 酶标抗体稀释液

BSA

10 g

ProClin-300

1 mL

Triton X-100

1 mL

加入 800 mL 无菌 pH 7.4 PBS,充分搅拌混匀后定容至 1 000 mL,过滤除菌,无菌定量分装,置 2 °C ~ 8 °C 保存。

H.7 终止液

浓 H₂SO₄ 11.1 mL

无菌去离子水 88.9 mL

将浓 H₂SO₄ 缓慢加入去离子水中,混匀,冷却至室温。

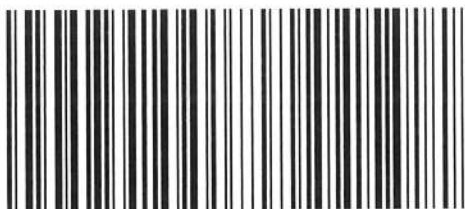
中华人民共和国
农业行业标准
鸡滑液囊支原体感染诊断技术
NY/T 4035—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京科印技术咨询服务有限公司印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.5 字数 30千字
2022年4月第1版 2022年4月北京第1次印刷
书号: 16109·8933
定价: 50.00元



NY/T 4035—2021

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261