

基于 *plo* 基因的山羊化脓隐秘杆菌 PCR 检测方法

2022 - 06 - 01 发布

2022 - 09 - 01 实施



目 次

前言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 缩略语..... 1

5 原理..... 1

6 试剂材料、仪器设备..... 2

7 方法步骤..... 2

8 结果判定..... 4

9 废弃物处理..... 1

附录 A （资料性） 靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置..... 2

附录 B （规范性） 试剂的配制..... 3

附录 C （规范性） 化脓隐秘杆菌 plo 基因 PCR 产物电泳判定图..... 4

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。

本文件由重庆市畜牧科学院提出。

本文件由重庆市农业农村委员会归口并组织实施。

本文件起草单位：重庆市畜牧科学院。

本文件主要起草人：张素辉、沈克飞、许国洋、付利芝、徐登峰、朱燕、蒋雨、周俊、陈朝洪、龙小飞、冯刚、邓小龙、刘博。



基于 *plo* 基因的山羊化脓隐秘杆菌 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了基于 *plo* 基因的山羊化脓隐秘杆菌PCR检测方法的缩略语、原理、试剂材料、仪器设备、方法步骤、结果判定、废弃物处理等要求。

本文件适用于山羊化脓隐秘杆菌病的 PCR 诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489 实验室生物安全通用要求
NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
SN/T 3223 动物传染病PCR检测技术确认规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA 脱氧核糖核酸 (Deoxyribo Nucleic Acid)
PCR 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)
PLO 溶血素 (Pyolysin)
TSA 胰酪大豆胨琼脂培养基 (Tryptic Soy Agar soybean-casein digest agar)
TSB 胰酪大豆胨液体培养基 (Tryptic Soy Broth soybean-casein digest medium)

5 原理

5.1 本文件针对山羊化脓隐秘杆菌的 *plo* 基因，设计合成特异引物，提取细菌DNA作为模板，在DNA聚合酶的作用下，经高温变性、低温退火和中温延伸的多次循环，使特异DNA片段的拷贝数放大数百万倍。将扩增的DNA片段经琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶成像仪观察，可见阳性条带。

5.2 该检测方法，只能从化脓隐秘杆菌基因组DNA中扩增出特异条带。

6 试剂材料、仪器设备

6.1 试剂材料

实验用水均符合 GB/T 6682 二级水规定。除另有规定外，所用试剂均为分析纯及以下的试剂：

- a) 化脓隐秘杆菌标准菌株，编号 ATCC 49698。
- b) 细菌基因组 DNA 提取试剂盒：商品化试剂盒。
- c) 无水乙醇。
- d) 2×Taq PCR MasterMix。
- e) 核酸染料。
- f) DNA 上样缓冲液。
- g) 琼脂糖。
- h) DNA 分子量标记：DNA Marker 2 000。
- i) 特异性引物：plo-F：TTGATAACGGTCCACCACGG；plo-R：CACTGCCACGACCTACAAGT。靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置见附录 A。
- j) 离心管、透明薄壁 PCR 管（0.2 mL）、医用棉签、解剖器械（手术刀、剪刀、镊子）、样品袋。
- k) TSA 固体培养基、TSB 液体培养基、TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 B。

6.2 仪器设备

根据实验需要，仪器设备应符合以下要求：

- a) 电子天平（感量 0.001 g）。
- l) 高压灭菌锅（温度范围：105 ℃~135 ℃，工作压力：≤0.35 MPa）。
- m) 高速离心机（可控温至 4℃、离心速度可达 12 000r/min 以上）。
- n) 电热恒温鼓风干燥箱（温控范围：10 ℃~300 ℃，恒温波动度≤±1 ℃）。
- o) 二级生物安全柜。
- p) 恒温培养箱（温度范围：5 ℃~50 ℃，温度均匀度：≤±1 ℃）。
- q) 纯水仪。
- r) 组织研磨仪。
- s) 制冰机。
- t) 恒温水浴锅（温度范围：5 ℃~50 ℃，温度均匀度：≤±1 ℃）。
- u) 4℃冰箱（温控范围：2 ℃~8 ℃）；-20℃冰箱。
- v) PCR 仪。
- w) 电泳仪（电压 90 V~120 V）。
- x) 凝胶成像仪。
- y) 微量移液器（2 μL，20 μL，200 μL，1000 μL）及配套吸头。

7 方法步骤

7.1 样品采集与保存

采样原则，按照 NY/T 541 的规定执行。

7.1.1 样品采集

根据临床情况，可以采集以下样品：

- a) 组织样：无菌采集肺脏、淋巴结病变部位，将其放入密闭的样品袋内，并应做好样品标识。
- b) 胸腔积液：若有胸腔积液，在完全暴露胸腔前，用 2 mL 或 5 mL 注射器无菌吸取 1 mL~2 mL 胸腔积液，分装于 1.5 mL 离心管中，并应做好样品标识。
- c) 脓液：若有肩前或股前淋巴结肿大、化脓，在脓肿部位表面常规碘酊消毒，灭菌手术刀在脓肿下部划开小于 1 cm 创口，挤出脓液，用去掉针头的 5 mL 注射器吸取脓液，分装于 1.5 mL 离心管中，并应做好标识。

7.1.2 样品保存

应将采集的样品于 4 ℃ 条件下保存，立即送到实验室。

7.2 样品处理

7.2.1 实验环境

实验操作应符合 GB 19489 要求，在二级生物安全实验室进行。

7.2.2 组织样处理

肺脏、淋巴结等组织样处理方法如下：

- a) 取 4g~5 g 组织样，剪碎、研磨，用 5 mL 灭菌超纯水混悬；
- b) 2 000r/min 离心 2 min，取上清液；
- c) 10 000r/min 离心 10 min，弃上清液；
- d) 沉淀以 200 μ L 超纯水重悬，备用。

7.2.3 胸腔积液、脓液处理

胸腔积液、脓液等样品处理方法如下：

- a) 无菌吸取 500 μ L 胸腔积液或脓液至 1.5 mL 灭菌离心管中，加入 500 μ L 超纯水，震荡混匀；
- b) 10000r/min 离心 10min，弃上清，收集沉淀；
- c) 沉淀以 200 μ L 超纯水重悬，备用。

7.2.4 可疑培养物样品处理

取待检液体培养物（纯培养物或混合培养物）1 mL 10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀以 200 μ L 超纯水重悬，备用。

7.2.5 阳性对照

化脓隐秘杆菌标准菌株经 TSA 复苏，纯化培养后转接 TSB 培养，作为阳性对照，处理应同 7.2.4。

7.2.6 阴性对照

灭菌超纯水，处理应同 7.2.4。

7.3 DNA 提取

取第 7.2 获得样品，采用同等商品化试剂盒进行DNA提取。

7.4 PCR 扩增

7.4.1 基本要求

PCR检测过程中的敏感性、特异性、重复性等应符合 SN/T 3223 要求。

7.4.2 PCR 反应体系组成

将提取的DNA模板进行 PCR 扩增，阴性对照为超纯水，PCR 反应体系 20 μ L，反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系

组份	体积/ μ L
2 $\times$ Taq MasterPCR Mix	10 μ L
<i>pI</i> o-F (10 μ mol/L)	0.5 μ L
<i>pI</i> o-R (10 μ mol/L)	0.5 μ L
DNA 模板	1 μ L
超纯水	8 μ L
总体积	20 μ L

7.4.3 PCR 反应程序

94 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 15s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 3min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

7.4.4 PCR 产物检测

取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，方法操作如下：

- a) 参照附录 B制备 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液，稀释为 1 $\times$ TAE 使用；
- b) 配制含核酸染料的 1.2%琼脂糖凝胶；
- c) 取 5 μ L PCR扩增产物与 6 $\times$ DNA上样缓冲液按体积比 5:1 混合后加入加样孔；
- d) 用 1 $\times$ TAE缓冲液作为电泳液，在恒压 120 V下进行电泳；
- e) 电泳 30 min后将凝胶取出，置于凝胶成像仪中，观察PCR结果。

8 结果判定

8.1 检测结果成立条件

阳性对照PCR产物经电泳后在 264 bp 出现目的条带，阴性对照 PCR 产物电泳后没有条带；检测结果成立。判定图见附录 C。

8.2 结果描述及判定

8.2.1 在检测结果成立的前提下，如果检测样品中 PCR 产物经电泳后在 264 bp 的位置上出现一条特异性条带，判为阳性，即该样品为化脓隐秘杆菌核酸阳性。

8.2.2 在检测结果成立的前提下，如果检测样品中 PCR 产物经电泳后在 264 bp 的位置上未出现一条特异性条带，判为阴性，即该样品为化脓隐秘杆菌核酸阴性。

8.2.3 如果阳性对照无相应的目的条带，可能是存在操作失误，该检测需要重新进行；如果阴性对照有相应的目的条带，可能是阴性对照存在污染或是操作失误，该检测需要重新进行。

9 废弃物处理

检测过程中的废弃物，应做好无害化处理，应符合 GB 19489 的要求。



附 录 A

(资料性)

靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置

化脓隐秘杆菌*plo*基因DNA片段序列及引物在靶基因中的位置见图 A.1。



图 A.1 靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置

附 录 B
(规范性)
试剂的配制

B.1 TSA 固体培养基 (1 L)

称取本品 40.0g 于 1 L 蒸馏水中, 微温溶解, 121 °C 高压灭菌 15min; 取出凉至 55°C, 无菌条件, 按 8%比例加入小牛血清, 轻摇混匀后制备平板, 37°C 培养箱中培养 24h, 观察有无菌落, 无细菌生长即可备用。

B.2 TSB 液体培养基 (1 L)

称取本品 30.0 g 于 1 L 蒸馏水中, 微温溶解, 121 °C 高压灭菌 15 min; 取出凉至 55 °C, 无菌条件, 按 8%比例加入小牛血清, 混匀后分装, 备用。

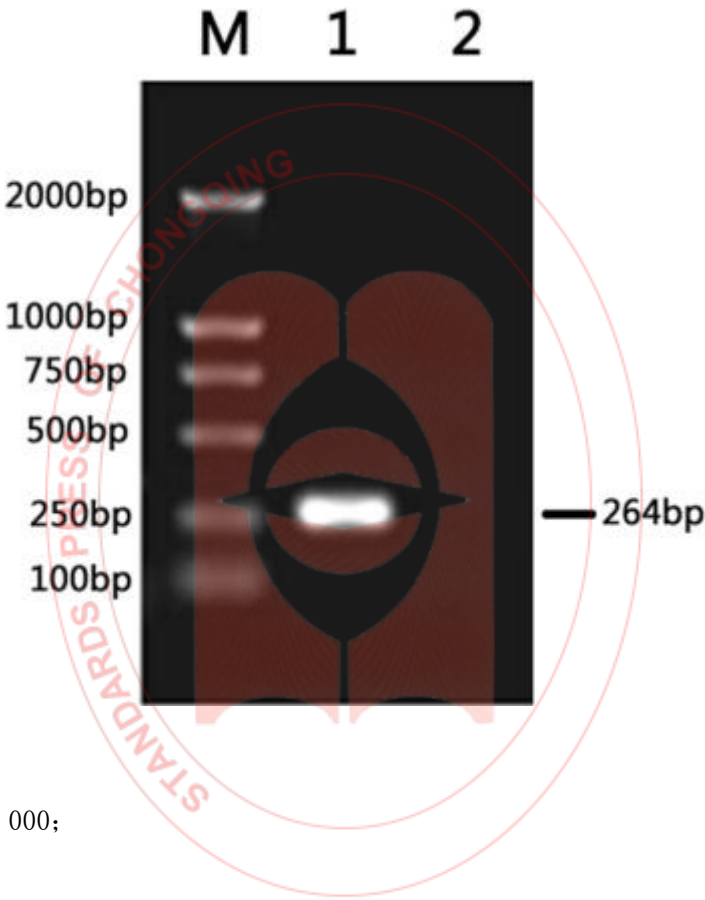
B.3 TAE 电泳缓冲液 (pH 约 8.5) 的配制

称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris 碱) 242g, 乙二胺四乙酸二钠 (Na₂EDTA) 37.2g, 加超纯水约 800mL 充分搅拌溶解后, 加入 57.1mL 醋酸充分混匀, 最后定容至 1 L。室温保存。

使用前, 用超纯水将 50×TAE 电泳缓冲储存液 50 倍稀释即可。

附 录 C
(规范性)
化脓隐秘杆菌 *plo* 基因 PCR 产物电泳判定图

化脓隐秘杆菌*plo*基因PCR扩增产物电泳图见图 C.1。



标引序号说明：
M——DNA Marker 2 000；
1——阳性；
2——阴性。

图 C.1 化脓隐秘杆菌*plo*基因PCR产物电泳判定