

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T 1763—2024

四种致兔腹泻病原菌检测 多重 PCR 法

地方标准信息服务平台

2024 - 12 - 17 发布

2025 - 03 - 17 实施

重庆市市场监督管理局 发布

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：杨柳、许国洋、牟豪、余远迪、戴玉娇、付利芝、李星、王永康、白运川。

地方标准信息服务平台

四种致兔腹泻病原菌检测 多重 PCR 法

1 范围

本文件规定了四种致兔腹泻病原菌检测多重 PCR 法的检测原理、仪器设备、试剂耗材、试剂配制、方法步骤、结果描述及判定和生物安全要求。

本文件适用于兔粪便或肠容物中铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌和肠致病性大肠埃希菌的检测。

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，所注日期的引用文件，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 分析实验用水规格和实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

多重聚合酶链式反应(多重 PCR) Multiple polymerase chain reaction

多重聚合酶链式反应指通过一次 PCR 反应同时对多个靶标进行扩增，结合一定的检测手段对扩增产物进行检测，从而实现对多个靶标进行诊断的技术。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

TAE: 三羟甲基氨基甲烷醋酸盐 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane acetate salt)

eta: 外毒素 A (Exotoxin A)

nuc: 耐热核酸酶 (Thermostable nuclease)

cae: 大肠埃希菌紧密素 (*E. coli* attaching and effacing)

5 检测原理

用多重 PCR 法，对四种致兔腹泻病原菌的特异基因进行扩增，用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

6 仪器设备

- 包括以下仪器设备：
- a) PCR仪；
 - b) 全自动凝胶成像仪；
 - c) 电泳仪器；
 - d) 超净工作台；
 - e) A2生物安全柜；
 - f) 高速冷冻离心机；
 - g) 电子天平：感量0.01 g。

7 试剂耗材

- 包括以下试剂耗材：
- a) 商品化的2×Taq PCR MasterMix；
 - b) 商品化的2×Taq PCR MasterMix；
 - c) 琼脂糖；
 - d) 商品化的DNA回收试剂盒；
 - e) 商品化的50×TAE缓冲液；
 - f) 阳性质控菌株：铜绿假单胞菌 CVCC3796、产气荚膜梭菌 CVCC1128、金黄色葡萄球菌CVCC1882、肠致病性大肠埃希菌 CVCC1450；
 - g) 阴性质控：水；
 - h) 引物：见表1。

注：除特别说明外，所有试剂为分析纯或生化试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

表 1 致免腹泻的铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌和肠致病性大肠埃希菌检测引物

病原菌名称	目标基因	引物序列	产物大小 (bp)
铜绿假单胞菌	<i>eta</i> 基因	上游引物：5′ -AGTTGGTCGCTGAACTGGC-3′ 下游引物：5′ -TGCATCTCGTTGCTCTCGTG-3′	200
产气荚膜梭菌	<i>α</i> 毒素基因	上游引物：5′ -AGAGAACATGCATGAGCTTCAA-3′ 下游引物：5′ -TGCGCTATCAACGGCAGTAA-3′	313
金黄色葡萄球菌	<i>nuc</i> 基因	上游引物：5′ -TGGCATATGTATGGCAATTGTTTCA-3′ 下游引物：5′ -GCTTGTGCTTCACCTTTTCTTAAA-3′	609
肠致病性大肠埃希氏菌	<i>eae</i> 基因	上游引物：5′ -CTCCGATTCCTCTGGTGACG-3′ 下游引物：5′ -TGGCCTTGCCAGGAGTATTG-3′	1 053

8 试剂配制

8.1 1×TAE 缓冲液（1 L）

取50×TAE 缓冲液20 mL，加水950 mL充分混匀，用水定容至 1 L，作好标记备用。

8.2 1.0% 琼脂糖凝胶（100 mL）

称量琼脂糖 1.0 g，加 1×TAE 缓冲液 100 mL 充分混匀，放入微波炉中融化，冷却至 60 ℃ 左右后加入 10 μL GoldView I 核酸染料，轻轻摇匀后倒胶（避免产生气泡），待胶完全凝固后备用。

9 方法步骤

9.1 样品采集

采集粪便或肠容物等作为待测样品，置于无菌采样袋内或拭子管中。

9.2 运输与保存

4 ℃ 冷藏保存，24 h 内送实验室检测。

9.3 DNA 提取

按试剂盒说明书提取 DNA 作为模版，-80 ℃ 保存，备用。

9.4 检测

9.4.1 反应体系组成

检测反应体系配制见表 2。

表 2 反应体系配制表

体系组分	用量（μL）
2×Taq PCR Master Mix（含染料）	12.50
铜绿假单胞菌上游引物（10 μmol/L）	0.25
铜绿假单胞菌下游引物（10 μmol/L）	0.25
产气荚膜梭菌上游引物（10 μmol/L）	0.25
产气荚膜梭菌下游引物（10 μmol/L）	0.25
金黄色葡萄球菌上游引物（10 μmol/L）	0.25
金黄色葡萄球菌下游引物（10 μmol/L）	0.25
肠致病性大肠埃希菌上游引物（10 μmol/L）	0.25
肠致病性大肠埃希菌下游引物（10 μmol/L）	0.25
DNA 模板	8.00
水	2.50
总体积	25.00

9.4.2 反应参数和程序

反应参数和程序如下：

- a) 95 °C 预变性 5 min;
- b) 95 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环;
- c) 72 °C 终延伸 10 min。

9.4.3 电泳检测

将适量 PCR 产物加入到 1.0% 琼脂糖凝胶加样孔中, 同时加入 GoldBand DL2 000 Marker 作参考, 并设阴性对照、阳性对照。

注: 电泳条件: 电压 10 V/cm ~ 20 V/cm, 时间 25 min ~ 30 min。

9.4.4 拍照分析

用全自动凝胶成像仪对电泳胶拍照; 参照 DNA 分子量标准, 判断 PCR 产物片段大小。

10 结果描述及判定

10.1 试验成立的条件

阳性对照在 200 bp、313 bp、609 bp 和 1 053 bp 处有特异性条带; 阴性对照无对应扩增条带, 否则试验不成立。

10.2 结果描述

10.2.1 阴性判定

在试验成立的前提下, 检测样品无目标条带, 则判定该样品中铜绿假单胞菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌、肠致病性大肠埃希菌为阴性。

10.2.2 阳性判定

在试验成立的前提下, 检测样品中有 200 bp 的条带则判定铜绿假单胞菌阳性; 有 313 bp 的条带则判定产气荚膜梭菌阳性; 有 609 bp 的条带则判定金黄色葡萄球菌阳性; 有 1 053 bp 的条带则判定肠致病性大肠埃希菌阳性。

11 生物安全要求

人员防护、实验废弃物处置等按照 GB 19489 的规定执行。