

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 23—2017

实验动物 布鲁杆菌 PCR 检测方法

Laboratory animal - PCR for examination of Brucellosis

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：冯育芳、邢进、岳秉飞。

实验动物 布鲁杆菌 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物布鲁杆菌的 PCR 诊断方法。

本标准适用于牛种、猪种、犬种、羊种、绵羊种和沙林鼠种布鲁杆菌感染的动物检测。

2 规范性引用文件

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用系列标准最新版本的可能性。

GB/T 14926.42 《实验动物 细菌学检测 标本采集》

GB/T 14926.43 《实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂》

GB/T 14926.45 《实验动物 布鲁杆菌检测方法》

GB/T 18646 《动物布鲁氏菌病诊断技术》

SN/T 1088 《布氏杆菌检疫技术规范》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

3 原理

布鲁杆菌可以引起人和动物的布鲁氏菌病。细菌主要通过生殖道分泌物、流产胎儿、胎盘、精液和尿液等途径传播；动物感染后，大多呈隐性感染，少数可表现临床症状。布鲁杆菌的诊断方法包括病原鉴定和血清学试验。病原鉴定有显微镜检查、细菌分离、聚合酶链反应（PCR）等检测方法。由于布鲁杆菌的分离需要在生物安全 3 级实验室操作，所以推荐使用 PCR 方法进行病原鉴定。

4 主要设备和材料

4.1 主要设备

4.1.1 生物安全柜

4.1.2 高速冷冻离心机

4.1.3 PCR 仪

4.1.4 移液器（200 μ L、10 μ L、1mL）

4.1.5 PCR 管

4.2 试剂

4.2.1 布鲁杆菌抗原：包括犬种、牛种、羊种和猪种布鲁杆菌抗原。

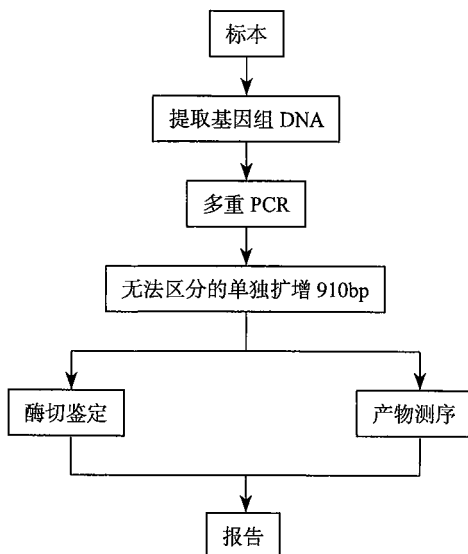
4.2.2 细菌基因组 DNA 提取：商品化基因组 DNA 提取试剂盒。

4.2.3 引物

引物名称	引物序列 (5' -3')	扩增子大小 (bp)
2ab	ACTGACGGATCCGCGCTCAGGCGGCCGACGCAA	
2ab200	ACTGACTTCGAAACCAGCCATTGCGGTTCGGTAC	220bp
2ab600	ACTGAAGCTTAGCCGTCGATGTGGTAGT	650bp
2ab900	ACTGACTTCGAATTGCCITTTTCGGGGCAATGA	910bp

4.2.4 试剂：PCR 试剂包括 *Taq* 酶、dNTP、ddH₂O 和 10 × buffer；限制性内切酶包括 *Kpn*I 和 *Eco*RI。

5 检测程序



6 操作步骤

6.1 采样 采取 EDTA 抗凝血、流产胎盘、胎膜、精液、奶、关节液和水囊瘤液等。

6.2 DNA 提取 菌液可直接提取，样本需进行研磨处理，具体提取步骤参照试剂盒使用说明。

6.3 PCR 反应体系

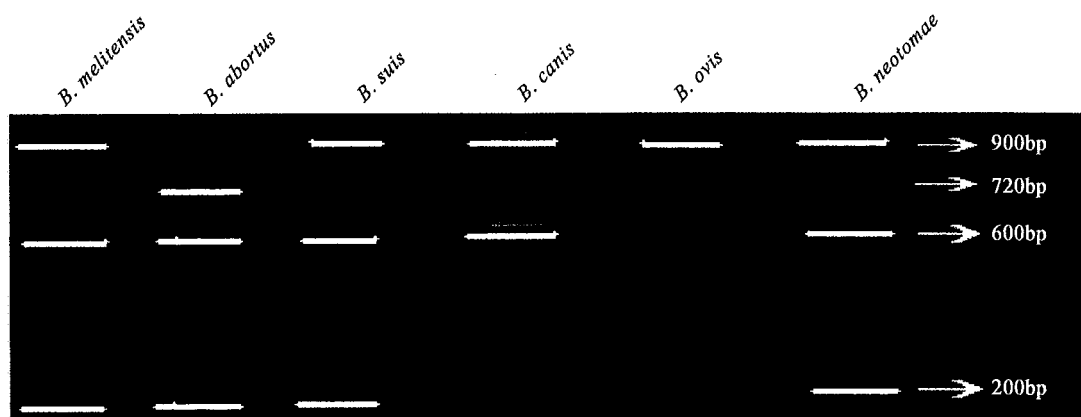
试剂名称	浓度	50μL 内体积 (1 ×)
Buffer (含 Mg ²⁺)	10 ×	5μL
dNTP	各 2.5mmol/L	4μL
2ab	10μmol/L	2.5μL
2ab200	10μmol/L	2.5μL

续表

试剂名称	浓度	50 μ L 内体积 (1 \times)
2ab600	10 μ mol/L	2.5 μ L
2ab900	10 μ mol/L	2.5 μ L
Taq HS DNA 聚合酶	5U/ μ L	2.5 μ L
Nuclease-Free Water	/	23.5 μ L
模板 DNA	0.3pg/ μ L~300ng/ μ L	5 μ L

6.4 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 68 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 重复 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min。

6.5 多重 PCR 产物示意图



6.6 酶切鉴定

如果多重 PCR 扩增结果相同, 则用限制性内切酶对 910bp 片段进行组合酶切, 酶切反应体系及条件参照限制性内切酶说明书, *Kpn*I 只能切开沙林鼠种 (690) 和羊种 (712), 在猪型上没有酶切位点; *Eco*RI 在沙林鼠种上的酶切位点是 458, 在另两型上有两个酶切位点, 分别是猪种 (450, 652), 羊种 (243, 455); 利用组合酶切的方式可以区分沙林鼠种、猪种和羊种。

6.7 PCR 产物测序 将 PCR 产物送公司进行测序, 并进行序列比对。

6.8 涉及生物安全的操作, 按 GB 19489 规定执行。

7 结果报告

当 7.1 和 7.2 成立时, 检测结果有效, 对结果进行判读。

7.1 阳性对照相对应目的条带;

7.2 阴性空白对照无条带;

7.3 待检样品出现相应条带时, 如果难以区分是哪个种的布氏, 需进行酶切鉴定;

7.4 可疑样品 PCR 产物需送公司进行测序;

7.5 当测序结果和 PCR 结果都确定为布鲁杆菌时, 判定为布鲁杆菌阳性结果。