

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1467—2007

奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术

PCR for diagnosis of brucellosis in dairy cattle

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

目前,我国家畜布鲁氏菌病的诊断主要方法包括虎红平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验、乳牛全乳环状试验等血清学方法(GB/T 18646 - 2002),没有列入病原诊断的内容。对牛布鲁氏菌病的诊断,OIE 推荐或指定的血清学诊断方法包括血清凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)、酶联免疫吸附试验(ELISA);病原诊断采用常规病原分离鉴定技术,并认为 PCR 方法的建立为该病的诊断提供了新的检测手段,可标准化后推广使用。

本标准的附录 A 为资料性附录,附录 B 为规范性附录,附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所

本标准主要起草人:邱昌庆、曹小安、周继章。

奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术

1 范围

本标准规定了检测牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)套式聚合酶链反应诊断方法要求。

本标准适用于奶牛布鲁氏菌病的病原诊断、奶牛场检疫、疫情监测和流行病学调查。其他偶蹄动物布鲁氏菌病 PCR 诊断可参照本标准。

2 材料准备

2.1 器材:PCR 扩增仪、1.5 mL 离心管、2.0 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、水浴箱、台式高速温控离心机、电泳仪、移液器、移液器吸管、紫外凝胶成像仪、冰箱。

2.2 试剂:NET 缓冲液,自配,配方见附录 A;Rnase A 酶、蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、dNTPs、DL 2000 DNA 分子质量标准、无水乙醇、酚—氯仿—异戊醇(25:24:1)、Tris、琼脂糖、EDTA、冰乙酸、氯化钠、溴酚蓝、二甲基苯青 FF、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙酸钠、盐酸、聚蔗糖。

2.3 引物:

Bp1 5'-CGT GCC GCA ATT ACC CTC-3'

Bp2 5'-CCG TCA GCT TGG CTT CGA-3'

Bp3 5'-GAT GCT GCC CGC CCG ATAA-3'

Bp4 5'-GCA CCG AGC GAG CCT TGA AA-3'

引物在使用时用灭菌双蒸水稀释为 50 pmol/L。

2.4 被检材料:奶牛新鲜原乳、流产母牛乳汁、流产母牛阴道分泌物、血液(血清)、流产胎儿胃液、种公牛精液。布鲁氏菌病疑似病例病料采集和运输注意事项见附录 B。

2.5 布鲁氏菌总 DNA 的提取。

2.5.1 原乳乳样中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法。

2.5.1.1 在室温下溶解冻存乳样(乳样长期保存应置于 -20°C ,当日检测可置于 4°C),取 500 μL 奶样于 2 mL 离心管中,加入 100 μL NET 缓冲液。

2.5.1.2 加入 100 μL 20% 的 SDS(终浓度 3.4%),混匀。在 $95^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,迅速放置于冰上冷却 10 min~15 min。

2.5.1.3 在样品中加入 Rnase A 酶至终浓度为 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50°C 作用 2 h。然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 325 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50°C 作用 2 h。

2.5.1.4 在消化液中加入等体积的酚—氯仿—异戊醇(25:24:1),颠倒 2 次~3 次,摇匀, 4°C 下 7 000 r/min 离心 10 min。

2.5.1.5 移上清液于另一离心管中。

2.5.1.6 重复 2.5.1.4、2.5.1.5 操作过程,加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, -20°C 沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去所有液相。

2.5.1.7 用 1 mL 70% 乙醇漂洗,12 000 r/min 离心 2 min,重复 2 次~3 次。

2.5.1.8 真空或室温干燥,DNA 沉淀物用 25 μL 无菌双蒸水溶解作为模板,保存在 -20°C 备用。

2.5.2 血液中布鲁氏菌总 DNA 的提取。

2.5.2.1 血液分离血清。