ICS 11.220

B 41

|  |
| --- |
|  |

DB34

安徽省地方标准

DB 34/ XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型三重PCR定型检测技术

Triplex PCR detection technology of Actinobacillus pleuropneumoniae type 2, 7, 12

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |
| --- |
| （征求意见稿） |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

安徽省市场监督管理局   发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽农业大学提出。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽农业大学，农业农村部猪肉质量安全控制重点实验室，安徽省动物疫病预防与控制中心，安徽华杰农牧科技有限公司，和县农业农村局，望江县畜牧兽医局，望江申江养殖有限公司。

本标准主要起草人：孙裴，高亚飞，占松鹤，王军，陈祥国，赵家喜，王杰，王希春，李杰，刘江，王勇，徐前明

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型三重PCR定型检测技术

1. 范围

本标准规定了猪胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型三重PCR定型检测的设备和材料、分型程序、操作步骤、结果判定。

本标准适用于猪胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型三重PCR定型检测。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

DB34/T 2997-2017 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌检验操作规程

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

GB 19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 2025 动物检疫实验室生物安全操作规范

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。



猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型 Actinobacillus pleuropneumoniae types 2, 7, 12

猪胸膜肺炎放线杆菌属于放线杆菌属的一种细菌，根据脂多糖和荚膜多糖的抗原特异性可分为15个血清型，根据生长是否需要 V 因子又可把15个血清型分为生物 Ⅰ 型和生物 Ⅱ 型，生物Ⅰ型通常毒力更强。猪胸膜肺炎放线杆菌 2、7、12 型属于生物 Ⅰ 型，毒力强，危害大。

1. 试剂和材料

除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯；实验用水符合 GB/T 6682 规定中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

* 1. 2 × Taq PCR Master Mix：Taq DNA聚合酶、dNTPs、MgCl2、反应缓冲液等。
  2. 引物：扩增引物和测序引物序列见附录 A 表 A.1。
  3. 10 × PCR 缓冲液：200 mmoI/L Tris-HCl（pH 8.4），200 mmol/L 氯化钾，15 mmol/L 氯化镁。
  4. 琼脂糖凝胶。
  5. 10 mg/mL溴化乙锭（EB）。
  6. 相对分子质量：2000 bp DNA marker。
  7. 5 × TBE 电泳缓冲液：445 mmoI/L Tris，445 mmol/L 硼酸，10 mmol/L EDTA(pH 8.0）。使用时稀释为 0.5 × TBE 电泳缓冲液。

1. 仪器和设备
   1. 电热压力蒸汽灭菌器。
   2. 电子天平：感量 0.1 g。
   3. 恒温震荡培养箱。
   4. 冰箱：2℃～5℃，-20℃。
   5. 高速冷冻离心机：最大转速14000 r/min以上。
   6. 天平：量程 2 kg，感量 0.1 g。
   7. pH计。
   8. 涡旋振荡器。
   9. PCR 扩增仪。
   10. 电泳仪。
   11. 凝胶成像系统。
   12. 超净工作台。
   13. 微量移液器：0.5 µL～10 µL、5 µL～50 µL、20 µL～200 µL、100 µL～1 000 µL。
2. 样品的采集、运输和保存
   1. 采样要求

应符合 SN/T 1447的相关规定。

* 1. 采样工具

棉拭子、试管、剪刀、镊子、注射器，经160℃干热灭菌2h。

* 1. 样品的采集
     1. 活体样品采集

用无菌棉拭子伸入鼻腔采集分泌物，放入无菌试管中立即送往实验室供分离。

* + 1. 组织样品的采集

根据临床症状的不同采集典型病料。用剪刀、镊子无菌采集肺脏、肺门淋巴结、扁桃体等器官和鼻腔分泌物，并在死亡2h内完成。

* + 1. 血样的采集制备

用注射器无菌操作采集动物血，每头不少于10mL。无菌分离血清，分装，加盖密封后4～8℃保存。

* 1. 样品的运输与保存

采集的样品应置于低温、密封的容器内运输。待检样品在2℃～8℃条件下保存不应超过24h；若

不能在规定时间内送检的，可保存于饱和氯化钠溶液或30％甘油缓冲盐水溶液中，但保存不应超过72

h。

1. 操作步骤
   1. 细菌分离、培养及鉴定

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌分离、培养及鉴定按照 DB34/T 2997—2017的规定执行。

* 1. 细菌基因组DNA提取

样品采用煮沸法。即：

1) 取 1 mL过夜培养菌液加入 1.5 mL离心管中，以 12000 r/min离心 5 min；

2) 弃上清液，加入 50 µL 超纯水混匀；

3) 置沸水中煮沸 10 min，再冰浴 5 min；

4) 重复步骤 ③；

5) 再以 12000 r/min离心 5 min，取上清液即为 DNA 模板。

* 1. 合成PCR扩增引物

按附录 A表 A.1 中的序列，合成猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2、7、12型扩增引物。引物在使用前按照引物合成时的既定浓度稀释到 10 µmol/L，-20℃保存备用。

* 1. PCR扩增

PCR反应体系：总体积为 50 µL，其中含有 12.5 µL 的 2×Taq PCR Master Mix，上、 下游引物（10 μmol/L）各 1 µL，DNA 模板 5 µL，去离子水补齐至 50 µL。

PCR扩增参数：95℃预变性 5 min；95℃变性 50 s，63℃退火 50 s，72℃延伸 1 min，共35个循环；最后 72℃再延伸 10 min。

* 1. PCR扩增产物电泳检测

用 100 mL 1×TAE 缓冲液制备 1.0％琼脂糖凝胶，加入 5 µL 10 mg/mL EB。

在 1×TAE 缓冲液中，取 7 μL PCR 扩增产物加入点样孔进行电泳，电压 100 V，电流 100 A，电泳约 30 min。用凝胶成像仪观察分析，并记录、保存电泳结果。

* 1. 结果判定

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2、7、12型的目的片段大小分别为500、396、559 bp。

被检样品孔如发现出现扩增条带，且目的条带大小与2、7、12型其中一个相符，则判定为相应血清型猪传染性胸膜肺炎放线杆菌。被检样品孔如未发现有扩增条带，则不属于猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型。猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型 PCR 分型检测结果电泳图见附录 A 图 A.1；

1. 生物安全及防污染措施

生物安全措施和防污染措施应按照 GB 19489、GB/T 27401和SN/T 2025的有关规定执行。

附 录 A

（规范性附录）

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型引物序列及PCR检测结果电泳图

表A.1 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清型2、7、12引物序列

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 血清型 | 引物名称 | 片段大小/bp | 引物序列（5’→3’） |
| 2型 | Ap2F | 500 | ACT ATG GCA ATC AGT CGA TTC AT |
| Ap2R | CCT AAT CGG AAA CGC CAT TCT G |
| 7型 | Ap7F | 396 | GGT GAC TGG CGT ACG CCA AA |
| Ap7R | GGG CTG CAG ACT GAC GTA A |
| 12型 | Ap12F | 559 | GGT TCT CCA GAT GAC TCT GAA A |
| Ap12R | GCT ATT GGA TGA AGA TGA CTC AT |

M 1 2 3 4 －

7.1-1

2000

1000

750

500

250

100

图中：

M：DNA Marker 2000；

－：阴性对照；

1：猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 2 型；

2：猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 7 型；

3：猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 12 型；

4：猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 2、7、12 型；

图A.1 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌2、7、12型 PCR检测结果电泳图

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_