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。

本标准中附录A为资料性附录。

本文件由广东省动物学会归口。

本文件起草单位：华南农业大学。

本文件主要起草人：余文兰、刘忠华、黄钦鹏、吴思莉、陈嘉、马晓莉、杨兴旭

产酸克雷伯杆菌 PCR 检测方法（征求意见稿）

1 范围

本文件规定了实验动物大小鼠产酸克雷伯杆菌的 PCR 检测方法。

本文件适用于实验动物大小鼠产酸克雷伯杆菌核酸定性检测。

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,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/T 14926 实验动物微生物检测方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品 检测实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）

体外酶催化合成特异 DNA 片段的方法，模板 DNA 先经高温变性成为单链，在DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下，根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合，接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种 dNTP 为底物，使引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

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

EDTA：乙二胺四乙酸 （ethylenediamine tetraacetic acid）

TAE： 三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液（tris-acetate-EDTA）

NTC：模板对照（No Template Control）

5 原理

用合适的方法提取样本中的 DNA，分别针对病原菌 16s RNA 或其他保守的基因设计特异的引物，通过 PCR 对模板进行扩增，根据 PCR 反应结果分析该样品中是否含有某种病原菌。

6 仪器设备

6.1 PCR 仪。

6.2 电泳仪。

6.3 凝胶成像分析系统。

6.4 普通离心机。

6.5 恒温孵育器。

6.6 漩涡振荡仪。

6.7 组织匀浆器。

6.8 生物安全柜。

6.9 超净工作台。

6.10 冰箱（-20℃）。

6.11 冰箱（-80℃）。

6.12 微量移液器：0.1 μL～2.5 μL，1 μL～10 μL，10 μL～100 μL，20 μL～200 μL，100 μL～1000 μL。

6.13 采样工具：剪刀、镊和灭菌棉拭子等。

7 试剂和材料

7.1 引物

上游引物：5′-CAGACCTTTGACGGCAATAACGC-3′

下游引物：5′-GCTACCGTCATGCCRTCAATCAG-3′

7.2 试剂

7.2.1 以下所用的试剂除特别注明者外均为分析纯，所用的水为双蒸水或去离子水，应符合GB/T 6682所规定一级水的要求。所有涉及分子生物学操作的水均为无DNA酶、无RNA酶水。

7.2.2 灭菌离心管（1.5 mL、2 mL、15 mL），灭菌吸头（10 μL，200 μL，1 mL），灭菌PCR扩增反应管（0.2 mL，八连管或96孔板）

7.2.3 灭菌PBS，配制方法见附录A。

7.2.4 DNA抽提试剂：DNA纯化试剂盒或其他类似产品。

注：DNA提取试剂盒是杭州新景生物试剂开发有限公司。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。亦可使用其他类似的DNA提取试剂盒进行。

7.2.5 无水乙醇。

7.2.6 PCR试剂：2 × Rapid Taq Master Mix 或其他类似产品。

7.2.7 DNA相对分子质量标准：100 bp～1000 bp。

7.2.8 50×TAE电泳缓冲液，配制方法见附录A。

7.2.9 溴化乙锭替代物或其他类似产品。

7.2.10 1.5%琼脂糖凝胶，配制方法见附录A。

8 方法

8.1 生物安全措施

对于可能潜在人兽共患病的样本，应在生物安全二级及以上实验室进行操作，采样应在生物安全柜中进行。实验操作及处理按照GB 19489的规定，由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

8.2 采样及样本的处理

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样本前处理过程中须戴一次性手套。采样及样本处理过程操作人员应做好个人防护。

8.2.1 组织样品

剖检，无菌采集动物支气管，剪取待检样本0.1 g～0.5 g，加入5倍体积灭菌PBS，使用匀浆器充分匀浆1 min～2 min，然后将组织悬液在4 ℃，8000 g离心10 min，取上清液转入另一无菌2 mL离心管中，编号备用。

8.2.2 肠内容物或粪便

无菌采集动物盲肠内容物或新鲜粪便，取待检样本0.2 g～1.0 g，加入5倍体积灭菌PBS，使用匀浆器充分匀浆1 min～2 min，8000 g离心5 min，取上清液取离心上清液转入另一无菌离心管中，编号备用。

8.2.3　拭子取样

对活体动物取样可采集口腔拭子、肛拭子等，浸泡于3 mL无菌PBS中5 min～10 min，充分混匀后，4℃，8000 g离心5 min，取上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

8.2.4　细菌培养物

参照国标GB/T 14926对临床样本进行细菌分离培养，获得可疑阳性培养物，刮取约1 mm^2～3 mm^2菌苔，加入500 μL无菌水混匀，煮沸后，8000 g离心1 min，取上清液直接进行PCR。

8.2.5　样本的存放

采集或处理的样本在2℃～8℃条件下保存应不超过24 h，若需长期保存，须放置于-80℃冰箱，但应避免反复冻融。

8.2.6　采样废弃物处理

采样结束，动物尸体应使用生物安全垃圾袋包装完整，高压灭菌后交由医疗垃圾处理单位进行处理，采样器材应使用消毒液浸泡或高压灭菌消毒，并做好实验台面及采样室的消毒。

8.3　核酸提取

8.3.1　取200 μL 待测样品至灭菌的 2 mL EP 管内，加入 600 μL 的Buffer S，盖上管盖，旋涡震荡混匀。

8.3.2　加入 600 μL 的Buffer ST ，盖上管盖，混合均匀，85℃恒温孵育器孵育10 min。

8.3.3　12000 rpm 离心 1 min。

注：Buffer ST 于低温下易析出沉淀，需至于烘箱中加热溶解。

8.3.4　准备新的灭菌 2 mL EP 管并编号标记，加入 20 μL 的蛋白酶 K 储存液和 200 μL Buffer SL；

8.3.5　吸取第 8.3.4 中的上清液 200 μL 至样品对应编号的 EP 管中，旋涡震荡混匀约 15s，后将离心管置于 70℃恒温孵育器 10 min。

8.3.6　将温育后的样品进行低速离心使管盖上的溶液沉降到管底，避免开盖时液体溅出。

8.3.7　加入 200 μL 无水乙醇，温和的翻转 4～6 次混合均匀，低速离心使管盖上的溶液沉降到管底。

8.3.8　将第8.3.7 的溶液全部转移到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心30 s。

8.3.9　弃2 mL 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回2 mL 离心管中，在核酸纯化柱中加入500 μL Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心1 min。

8.3.10　弃2 mL 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回2 mL 离心管中，在核酸纯化柱中加入600 μL Buffer WB，盖上管盖，12000 rpm 离心1 min。

8.3.11　弃2 mL 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回2 mL 离心管中，12000 rpm 空离2min。

8.3.12　弃2 mL离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的2 mL离心管中，在纯化柱的膜中央加入100 μL经70℃温育的Buffer TE，盖上管盖，室温静置1分钟，12000 rpm离心30s。

8.3.13　弃纯化柱，洗脱后的DNA 可以用于各种分子生物学实验，或储存于-20℃ 备用。

注：该DNA提取方法是针对粪便DNA提取试剂盒给出的应用实例，可使用其他类似的DNA提取试剂盒进行，提取方法可做相应调整。

8.4　普通 PCR

8.4.1　PCR 反应

PCR 反应体系见表 1。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有阳性病原菌的组织或培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病原菌的样本核酸（可以是正常动物组织或正常培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加NTC，即在反应中用水来代替模板。反应条件：预变性94℃ 5 min，循环反应94℃ 15 s，60℃ 15 s, 72℃ 30s（33个循环），72℃ 5 min最后延伸，4℃ 保存。

表1 PCR 反应体系配置表

试剂	用量/ μL	终浓度
2×Rapid Taq Master Mix	12.5 μL	2×
Forward primer	0.75 μL	0.4 μmol/L～1 μmol/L
Reverse primer	0.75 μL	0.4 μmol/L～1 μmol/L
DNA 模板	2 μL	＜200 mg/L
水	6 μL	/
总体积	25 μL	/

8.4.2 **PCR** 产物电泳分析

将适量 50×TAE 稀释成 1×TAE 溶液，配制含核酸染料溴化乙锭替代物的2%琼脂糖凝胶。PCR 反应结束后，取 10 μL PCR 产物在1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，以 DNA 分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在 3V/cm～5 V/cm，当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

9 结果

9.1 质控标准

在阳性、阴性、空白对照成立的条件下，即阳性对照的扩增产物经电泳分析可见到 521 bp 的扩增条带，阴性对照及空白对照的扩增产物无任何条带，可进行结果判定。

9.2 结果判定

9.2.1 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到 521 bp 的目的扩增条带，判定为产酸克雷伯杆菌核酸阳性；

9.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上未观察到 521 bp 的目的扩增条带，判定为产酸克雷伯杆菌核酸阴性。

9.3 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的参考菌株基因序列进行比对(参考序列见附录 B)，序列相似度在99%以上，可确诊待检样本为产酸克雷伯杆菌病原菌核酸阳性，否则判定为该病

原菌核酸阴性。

附录 A
(规范性)
溶液的配置

A.1 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

A.1.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液：称取磷酸二氢钠（NaH_2PO_4 · H2O）27.6 g，先加适量去离子水溶解，最后定容至 1 000 mL，混匀。

A.1.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液： 称取磷酸氢二钠 $NaH_2PO_4·7H_2O$ 53.6 g（或 $Na_2HPO_4·12H_2O$ 71.6 g 或$Na_2HPO_4·2H_2O$ 35.6 g），先加适量去离子水溶解，最后定容至 1 000 mL，混匀。

A.1.3 0.02 mol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

取A 液14 mL，B 液36 mL，加氯化钠（NaCl）8.5 g，加800 mL 无离子水溶解稀释，用HCl 调pH 至7.2，最后定容至1 000 mL，经121 ℃高压灭菌 15 min，冷却备用。

A.2 50 ×TA E 电泳缓冲液

A.2.1 0.5 mol/L 乙二铵四酸乙酸二钠（ EDTA ）溶液（ pH 8.0 ）

乙二铵四乙酸二钠（EDTA-Na2•H2O）	18.61 g
灭菌去离子水	80 mL
5 mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 8.0

灭菌去离子加至 100 mL， 121 ℃，15 min 灭菌备用。

A.2.2 50 ×TAE TAE 电泳缓冲液配制

三羟甲基氨基甲烷（Tris）	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA溶液，pH8.0	l00 mL

灭菌去离子加至 1 000 mL，121 ℃，15 min 灭菌备用。用时用灭菌去离子水稀释至 l×使用。

A.3 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
1×TAE 电泳缓冲液	加至 l00 mL

混合后加热至完全融化,待冷至 50 ℃～55 ℃时，加溴化乙锭替代物溶液 10 μL，轻轻晃动摇匀，避免产生气泡，将梳子置人电泳槽中，然后将琼脂糖溶液倒人电泳板上，凝胶适宜厚度为 3 mm～5 mm，需确认在梳齿下或梳齿间没有气泡，待凝固后取下梳子备用。

附录 B
(规范性)
产酸克雷伯杆菌PCR扩增产物序列

B.1 PCR扩增产物参考序列

521 bp DNA参考序列：

5′-agacctttgacggcaataacgccgacggcgtggagttcggcaatagccagaatgcgctggttttcaacaacttctttgatac cggggatgattgcgtcaatttcgccgccgggtttggtaaaggcgcggaaacttttcatcaacagccgcaaagcggggcgtggatc tttaataactatttccgtaaaggccacggcgccgtggtgaccggtagccataccggagcatggatcgaaaaagttcgcgccgagg ataacgtcatgtatatgaccgatgtcggcctgcgcatgaaaagccgcccttactacggcggtggcgtaagggatgtgctgttccgc cataatgcgatgaaagatatcgccaaagagccgttcgtttttactatcaaatacagcgccgacgtgaatgatacgacccctgccgac gagcccgctcagttccgcgacgttcaggtgcaggacgtcaccgtcgatggtacttcggctaagcacagcatcctgattgacggca tgacggtagc-3′