

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2022—2007

---

### 牛温氏附红细胞体聚合酶链式反应 操作规程

Protocol of polymerase chain reaction (PCR) for  
*Eperythrozoon wenyonii*

2007-12-24 发布

2008-07-01 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、华中农业大学。

本标准主要起草人：李树清、胡永强、赵俊龙、王巧全、陈志飞、杜凯、王贵强、刘焕章。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

# 牛温氏附红细胞体聚合酶链式反应 操作规程

## 1 范围

本标准规定了温氏附红细胞体聚合酶链式反应方法。  
本标准适用于温氏附红细胞体的鉴定和检测。

## 2 概述

温氏附红细胞体(*Eperythrozoon wenyonii*, *E. wenyonii*)是附着于牛的红细胞或游离于胞浆的一种立克次氏体,可通过吸血昆虫、螨虫、母体胎盘、血液等传播。牛感染 *E. wenyonii* 一般不表现临床症状,严重感染引起发热、消瘦和黄疸。本标准根据 *E. wenyonii* 16S rRNA 的保守序列,设计了一对特异引物 mwF/mwR3,通过 PCR 反应可扩增出 738 bp 的片段,用于温氏附红细胞体的鉴定和检测。

## 3 设备和材料

### 3.1 仪器设备

- 3.1.1 PCR 扩增仪。
- 3.1.2 电泳仪。
- 3.1.3 凝胶成像系统。
- 3.1.4 微波炉。
- 3.1.5 可调移液器(2  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 000  $\mu$ L)。
- 3.1.6 离心机。
- 3.1.7 天平(0.000 1 g)。
- 3.1.8 水浴锅。

### 3.2 耗材

- 3.2.1 PCR 反应管。
- 3.2.2 1.5 mL 离心管。
- 3.2.3 移液器滴头。

### 3.3 试剂

- 3.3.1 三蒸水 0.103 MPa 灭菌 15 min。
- 3.3.2 琼脂糖。
- 3.3.3 溴化乙锭。
- 3.3.4 *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L)。
- 3.3.5 10 $\times$ PCR 反应缓冲液。
- 3.3.6 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)25 mmol/L。
- 3.3.7 1 mmol/L dNTP。
- 3.3.8 苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25 : 24 : 1)。
- 3.3.9 分子量指示物:100 bp~2 000 bp DNA Marker。
- 3.3.10 50 mg/mL 溶菌酶、10%SDS、10 mg/mL 蛋白酶 K、5 mol/L 氯化钠(NaCl)、5%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、2 mol/L 乙酸钠(NaAc)、70%乙醇、10 mg/mL 溴化乙锭(EB)、Tris-乙酸电泳缓冲

液(TAE)、1.5%琼脂糖凝胶、6×加样缓冲液、3.8%柠檬酸钠、1.5%乙二胺四乙酸二钠(EDTA 二钠)的配制见附录 A。除另有规定,所用化学试剂均为分析纯。

### 3.4 引物

引物序列见表 1。引物用灭菌三蒸水配成 100 μmol/L 母液, -20℃ 冻存。使用时用灭菌三蒸水配成 5 μmol/L 的工作液。

表 1 试验所用引物序列

引物	核苷酸序列	引物浓度/(μmol/L)	引物位置	产物大小/bp
mwF <sup>a</sup>	5'-gtaatacatatttaactacttttacg-3'	5	106-132,27bp (AY946266)	738
mwR3 <sup>b</sup>	5'-agcactcgactagatgtc-3'	5	826-843,18bp (AY946266)	
<sup>a</sup> 上游引物 forward primer。 <sup>b</sup> 下游引物 reverse primer。				

## 4 操作步骤

### 4.1 样品采集

无菌采牛血,用 3.8%柠檬酸钠或 1.5%EDTA 二钠抗凝作为临床检测样品。

### 4.2 样品处理

400 μL 抗凝血加 10 μL 溶菌酶(50 mg/mL)涡旋混匀,37℃ 下温育 1 h;加入 70 μL 10% SDS,6 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL),65℃ 下温育 10 min;加入 100 μL 5 mol/L 氯化钠,160 μL CTAB,65℃ 下温育 10 min;加入等体积的苯酚-三氯甲烷-异戊醇抽提,常温下 12 000×g 离心 10 min;取上清液,再次加入等体积的苯酚-三氯甲烷-异戊醇抽提,常温下 12 000×g 离心 10 min;取上清液,加入两倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 2 mol/L 的乙酸钠,-20℃ 沉淀 30 min,13 000×g 4℃ 离心 10 min;弃上清液,沉淀用冷 70%乙醇洗一次,自然干燥;用 20 μL 的三蒸水溶解,-20℃ 保存备用。

### 4.3 PCR

#### 4.3.1 对照设立

- 阳性对照用 *E. wenyoni* 16S rRNA 部分序列连接在 PMD18-T 载体上构建的重组质粒;
- 阴性对照用健康牛抗凝血提取的 DNA 作为对照;
- 空白对照用灭菌三蒸水。

#### 4.3.2 PCR 反应体系

总体积 30 μL,10×PCR 反应缓冲液 3 μL;氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)3 μL;dNTP3 μL;引物 mwF 和 mwR3 各 1 μL;阳性对照(10 ng~20 ngDNA)或样品 1 μL;0.2 μL TaqDNA 聚合酶,18 μL 三蒸水。

#### 4.3.3 循环参数

PCR 反应循环参数为 94℃ 3 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃ 3 min。

#### 4.3.4 电泳

取 PCR 产物 10 μL 与 2 μL 6×加样缓冲液混合,加样于含 EB 的 1.5%琼脂糖凝胶中。

在 1×TAE 缓冲液中,3 V/cm~4 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止电泳,用凝胶成像系统分析。

阳性、阴性、空白对照和 DNA 分子量指示物同样电泳。

## 5 结果判定

### 5.1 对照

- 阳性对照出现 738 bp 的 DNA 片段；
- 阴性和空白对照不出现任何 DNA 片段；
- 对照成立才能进行判定。

### 5.2 样品判定

样品经 PCR 扩增后：

- 无核酸带或带的大小不在 738 bpDNA 位置上判为温氏附红细胞体阴性；
- 在 738 bpDNA 位置上有核酸带，判为温氏附红细胞体阳性；
- 阳性样品进行测序，将序列与 Genbank 中温氏附红细胞体 16S rRNA 序列进行比较确诊。

附 录 A  
(规范性附录)  
试 剂 配 制

A.1 50 mg/mL 溶菌酶

溶菌酶 50 mg  
加三蒸水至 1 mL,溶解分装后,−20℃保存备用。

A.2 10%十二烷基硫酸钠(SDS)的配制

SDS 10 g  
加三蒸水 90 mL  
68℃加热助溶,用浓盐酸调 pH 至 7.2,三蒸水定容至 100 mL。

A.3 10 mg/mL 蛋白酶 K 的配制

蛋白酶 K 100 mg  
加三蒸水 10 mL  
溶解分装后,−20℃保存备用。

A.4 5 mol/L 氯化钠(NaCl)的配制

氯化钠(NaCl) 29.2 g  
加三蒸水 80 mL  
加热,搅拌溶解后定容至 100 mL,0.103 MPa 灭菌 15 min 备用。

A.5 5% CTAB 的配制

氯化钠(NaCl) 2.05 g  
CTAB 5 g  
用三蒸水 80 mL 溶解 NaCl,缓慢加入 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),同时加热并搅拌,溶解后定容至 100 mL。

A.6 2 mol/L 乙酸钠(NaAc)

乙酸钠(NaAc·3H<sub>2</sub>O)272 g  
加三蒸水定容至 1 000 mL,用 3 mol/L 乙酸调 pH 至 5.2。

A.7 70%乙醇

无水乙醇 70 mL  
加三蒸水定容至 100 mL,混匀 4℃备用。

A.8 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)的配制

EB 1 g  
加三蒸水定容至 100 mL,磁力搅拌至完全溶解,室温避光保存。

**A.9 Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)的配制****A.9.1 0.5 mol/L pH8.0 乙二胺四乙酸二钠(EDTA 二钠)的配制**

EDTA 二钠 186.1 g

三蒸水 800 mL

磁力搅拌器上剧烈搅拌,用氢氧化钠(NaOH)调节 pH 至 8.0(约 20 g 氢氧化钠颗粒),加三蒸水定容至 1 000 mL。0.103 MPa 灭菌 15 min 备用。

**A.9.2 50×TAE 的配制**

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris 碱) 242 g

冰乙酸 57.1 mL

0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 100 mL

加三蒸水定容至 1 000 mL,混匀 4℃ 保存备用。临用前作 50 倍稀释。

**A.9.3 1×TAE 使用液的配制**

50× TAE 20 mL

加三蒸水定容至 1 000 mL,混匀备用。

**A.10 1.5%琼脂糖凝胶的配制**

琼脂糖 1.5 g

加 1× TAE 定容至 100 mL,完全融化后,溶液冷却至 60℃,加 10 mg/mL EB5 $\mu$ L(终浓度 0.5  $\mu$ g/mL),轻轻混匀后,倒板。

**A.11 6×加样缓冲液的配制**

溴酚蓝 0.25 g

蔗糖 40 g

加三蒸水 至 100 mL

混匀,置 4℃ 保存备用。

**A.12 3.8%柠檬酸钠(柠檬酸三钠)的配制**

柠檬酸钠 3.8 g

加三蒸水 至 100 mL

混匀,0.07 MPa 灭菌 15 min 备用。使用时与血的比例为 1:10。

**A.13 1.5%乙二胺四乙酸二钠(EDTA 二钠)的配制**

EDTA 二钠 1.5 g

加三蒸水 至 100 mL

混匀,分装 0.4 mL/瓶,100℃ 烘干后可抗凝 5 mL 血液。

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
牛温氏附红细胞体聚合酶链式反应  
操作规程

SN/T 2022—2007

\*

中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

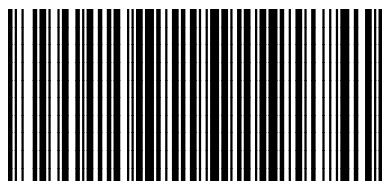
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字

2008年3月第一版 2008年3月第一次印刷

印数 1—2 000

\*

书号: 155066·2-18496 定价 8.00 元



SN/T 2022-2007