

团 体 标 准

T/CVMA X2—2020

猫巴尔通体 PCR 检测方法

PCR Method for examination of *Bartonella henselae*

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

2018- 10-24 发布

2018 - 10 -24 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、西南大学动物科学学院、上海睿太莫斯生物科技有限公司。

本标准起草人：王艳、杨晓伟、赵光伟、吴晓卿、黄忠荣、张强、熊炜。

中国兽医协会
CVMA

猫巴尔通体 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猫的巴尔通体 (*Bartonella henselae*) 的试剂和材料、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理。

本标准适用于猫的巴尔通体的PCR检测。

2 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。凡是注明日期的引用文件，仅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。

GB19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 试剂和材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

3.1 水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

3.2 *Taq* DNA聚合酶：5U/μL。-20℃保存，避免反复冻融或温度剧烈变化。

3.3 dNTP：含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10mmol/L，-20℃保存。

3.4 引物：浓度为 10 μmol/L，-20℃保存。

Bar 正向引物 (BarF)：5'-GGTAATAAATGGACAATGAAATAAG-3'

Bar 反向引物 (BarR)：5'-AGGCTTCTGTTGCCAGGTG-3'

3.5 无水乙醇：使用前预冷到-20℃。

3.6 琼脂糖：电泳纯。

3.7 DNA 分子量标准：推荐使用 DNA ladder100，各片段大小依次为：1500 bp，1000 bp，900 bp，800 bp，700 bp，600 bp，400 bp，300 bp，200 bp，100 bp。也可使用其他合适的 DNA 分子量标准。

3.8 核酸凝胶染色剂：溴化乙啶（EB）或其他 EB 替代品。

4 仪器与设备

4.1 生物安全柜。

4.2 普通 PCR 仪。

4.3 离心机及离心管。

4.4 超低温冰箱及普通冰箱。

5 试验步骤

5.1 样品的采集、保存和运送

采用专用的剃毛器将猫前肢的毛剃去，用75%酒精棉消毒皮肤，经前肢静脉采取抗凝血2 ml。样品的运送过程宜在0℃以下进行。

5.2 DNA提取

5.2.1 取100 μL待测样品与300 μL CTAB溶液（A.1）研磨匀浆，置于1.5 mL离心管内，加入450 μL CTAV溶液并混匀，25℃放置2 h。

5.2.2 加入600 μL酚-三氯甲烷-异戊醇（A.2）至样品离心管中，用力混合至少30 s，12000 r/min离心5 min，小心取上层水相（约800 μL）置于新的1.5 mL离心管中。

5.2.3 加入700 μL三氯甲烷-异戊醇（A.3），用力混合至少30 s，12000 r/min离心5 min，小心取上层水相（约600 μL）置于新的1.5 mL离心管中。

5.2.4 加入-20℃预冷的1.5倍体积的无水乙醇（约900 μL），倒转数次混匀后，置-20℃沉淀8 h以上。

5.2.5 12000 r/min离心30 min，小心弃上清，倒置于吸水纸上吸干水分；37℃干燥20 min或抽真空干燥。

5.2.6 加10 μL无菌双蒸水溶解，作为DNA模板。

DNA抽提也可选用商品化DNA抽提试剂盒，按相应说明书提供的方法予以抽提。

5.3 PCR扩增方法

5.3.1 对照设置

在进行PCR反应时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。已含有巴尔通体的DNA作为阳性对照；以未感染巴尔通体的动物血样作为阴性对照；以灭菌水作为空白对照。

5.3.2 PCR反应体系组成

PCR反应的配制为10×PCR缓冲液（含Mg²⁺）2.5 μL，dNTP（2.5 mol/L）1.0 μL，正向和反向引物各1.0 μL，模板2.0 μL，*Taq* DNA聚合酶0.5 U，加水至总体积为25 μL。瞬时离心，将反应管置于PCR仪。

5.3.3 PCR反应条件

95℃预变性3min，95℃30s，55℃30s，72℃20s，35个循环，72℃再延伸10min，最后4℃保温。

反应结束后，取5 μLPCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶上行电泳检测。

5.3.4 琼脂糖电泳

用1×电泳缓冲液（见A.5）配制1.5%的琼脂糖凝胶（含0.5 μg/mL EB，或其他等效商品化试剂）。将5 μL样品和1 μL6×上样缓冲液（见A.6）混匀后加入样品孔，在电泳时设立DNA标准分子量作对照。5 V/cm电泳约0.5 h，当溴酚蓝到达底部时停止，将凝胶置于凝胶成像仪上观察。

5.3.5 测序

取PCR产物进行基因序列测定，将测序结果与DNA序列数据库（GenBank）中参考序列（参见附录

B) 进行同源性比对。

6 结果判定

当阳性对照出现 298 bp 的特异性条带，阴性对照和空白对照均没有该条带。待测样品扩增出 298 bp 的条带，且测序结果正确，可判定待测样品 PCR 检测结果为阳性；未扩增出条带或条带大小不是 298 bp 均判定为 PCR 检测结果阴性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A
(规范性附录)
试剂及其配制

A.1 CTAB 溶液

先将 8.19g 氯化钠、EDTA0.744g、Tris 1.21 g、水 60mL 充分混匀后，用浓 HCl (约 0.25mL~ 0.3 mL)调节 pH 值至 7.5~8.0，加入 2g CTAB，完全溶解后定容至 100mL。使用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

A.2 酚-三氯甲烷-异戊醇

1 mol/L Tris 饱和酚：三氯甲烷：异戊醇=25： 24 ： 1 混合，密闭避光保存。

A.3 三氯甲烷-异戊醇

将三氯甲烷和异戊醇按 24 : 1 的比例混合，密闭避光保存。

A.4 电泳缓冲液 (50×浓缩液)

Tris 242g、Na₂EDTA·2H₂O 37.2g，再加入 800mL 水，充分搅拌溶解，接着加入冰乙酸 57.1mL，加水定容至 1000mL，室温贮存。

A.5 1×电泳缓冲液

加入 50×电泳缓冲液 20mL 并加水定容至 1000mL 室温贮存。

A.6 6×上样缓冲液

取蔗糖 40g，加水溶解，定容至 100mL，再加入溴酚蓝 0.25g 溶解后，4℃ 保存。

附录 B

(资料性附录)

基因序列

BarF/R 引物 PCR 扩增的序列 (片段大小 298bp, 参照 GenBank Accession HG969191.1) 如下, 下划线处为引物。

GGTAATAAATGGACAATGAAATAAGCTTATTGGACCCGGGGCGGTACCCGGCGCCTCCACCAAAATATAATTTGTTTTTATATTTT
AGTGGGGCGAAACAGGATCGACAAAAGTGTAAGATTGCTCTTTTACTCGGTATAGTACCACCGTTATCGGACTAAATGAGTAGTTGC
AAATGACAACACTATGCGGAAGCACGTCTCGCTGCCTGAGGTGGTGTGAATGCTTCAAACCTAAAGTCTTAAACCGTTCGAGGTTTAAGCGGG
GTTTCAAGGCACCTGGCAACAGAAGCCT
