

# DB 15

## 内蒙古自治区地方标准

DB15/T 1852—2020

### 动物毛尾线虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for trichuriasis in animals

地方标准信息服务平台

2020-02-25 发布

2020-03-25 实施

内蒙古自治区市场监督管理局 发布



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国呼和浩特海关提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国呼和浩特海关、鄂尔多斯市动物疫病预防控制中心、内蒙古自治区农牧业科学院。

本标准主要起草人：赵治国、于志超、张晓东、陈林军、延涵、崔强、王海艳、敖威华、李军燕、罗晓平。

地方标准信息服务平台



# 动物毛尾线虫病检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了动物毛尾线虫病病原的形态学鉴定法、普通 PCR 检测法和实时荧光 PCR 检测法。本标准适用于动物毛尾线虫病病原及虫卵的形态学鉴定和分子生物学诊断。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T19495.2 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

#### 毛尾线虫 *Trichuris*

危害多种动物的重要的寄生虫之一,又称毛首线虫、鞭虫,属线形动物门(Nematomorpha)、线虫纲(Nematode)、毛尾目(Trichurata)、毛尾科(Trichuridae)、毛尾属(*Trichuris*)。

注:虫体主要寄生于猪、牛、羊、骆驼等多种哺乳动物。由毛尾线虫引起的毛尾线虫病主要通过动物粪便中的毛尾线虫卵污染食物和饮水而传播,亦可感染人。

### 3.2

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

用于扩增位于已知序列之间脱氧核糖核酸(deoxyribonucleosidea acid, DNA)的方法。

注:模板DNA经过高温变性成单链,在DNA聚合酶和适宜的温度下,两条互不互补的寡核苷酸片段即引物分别于模板DNA两条链上的一段互补序列发生退火,接着在DNA聚合酶的催化下以4种脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)为底物,使退火引物得以延伸,如此反复变性、退火和DNA合成这一循环,使位于两段已知序列之间的DNA片段呈几何倍数扩增,经25~30个扩增循环,扩增倍数达到 $10^6$ 。

### 3.3

#### 实时荧光聚合酶链式反应 real-time polymerase chain reaction(real-time PCR)

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,并通过标准曲线对位置模板进行定量分析的方法。

注:荧光信号的强弱直接反映模板数量。

### 3.4

#### Ct 值 cycle threshold (Ct)

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对 base pair

DNA: 脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid

FAM: 6-羧基荧光素 6-carboxyfluorescein

TAMRA: 6-羧基四甲基罗丹明 6-carboxytetramethylrhodamine

## 5 试剂和材料

5.1 除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。

5.2 丙酮。

5.3 蛋白酶 K 溶液：用双蒸水溶解为 10 mg/mL 的溶液，分装后于 -20 °C 保存。

5.4 2% CTAB 裂解液：称取 2 g CTAB，10 mL 1 M 的 Tris-HCl (pH=8.0)，4 mL 0.5 M 的 EDTA (pH=8.0)，25 mL 5 M NaCl，加双蒸水定容至 100 mL，高压蒸汽灭菌后，室温下放置待用。

5.5 0.5% SDS：称取 0.5 g SDS 溶于 100 mL 双蒸水中加热搅拌至完全溶解，室温下保存待用。

5.6 酚：氯仿：异戊醇 (25: 24: 1)：量取 250 mL 苯酚平衡液，240 mL 氯仿，10 mL 异戊醇，充分混匀后，置于棕色瓶中，-4 °C 避光保存待用。

5.7 10% 醋酸钠：称取 1 g 醋酸钠，溶于 100 mL 去离子水中，充分混匀后，室温下保存待用。

5.8 饱和盐水：称取 400 g NaCl 加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中，冷却待用。

5.9 无水乙醇。

5.10 TE 缓冲液。

5.11 PCR buffer。

5.12 dNTPs: dATP (deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸)、dTTP (deoxythymidine triphosphate, 脱氧胸腺三磷酸)、dCTP (deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸)、dGTP (deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸)，2.5 mmol/L。

5.13 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq*, *Thermus aquaticus*, 水生栖热菌)：-20 °C 保存，避免反复冻融或温度剧烈变化。

5.14 DNA 分子量标准 (DNA Marker)：50 bp~500 bp。

5.15 琼脂糖：电泳纯。

5.16 电泳缓冲液：Tris 54 g，硼酸 27.5 g，0.5 mol/L TE 缓冲液 (pH 8.0) 20 mL，加蒸馏水至 1000 mL；使用时 10 倍稀释。

5.17 EB 替代染料。

5.18 实时荧光 PCR 预混液。

5.19 引物及探针见表 1。

表1 毛尾线虫检测引物及探针

检测方法	引物/探针	序列 (5' -3' )	扩增片段
普通PCR法	Tri F	5' -AACGGCGGATCACTTGGC-3'	132 bp
	Tri R	5' -GTAGCGCCGACATGTTTGATC-3'	
实时荧光PCR法	Tri F	5' -AACGGCGGATCACTTGGC-3'	132 bp
	Tri R	5' -GTAGCGCCGACATGTTTGATC-3'	
	探针	FAM-ACCTTGAACGCACATTGCAGCGTCGATC-TAMRA	

## 6 仪器设备

- 6.1 PCR 扩增仪。
- 6.2 实时荧光 PCR 仪。
- 6.3 恒温水浴锅。
- 6.4 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.5 高速台式冷冻离心机（最高转速 12000 rpm 以上）。
- 6.6 冰箱（2 ℃~8 ℃和 -20 ℃）。
- 6.7 微量加样器：1 μL~10 μL，100 μL，200 μL，1000 μL。
- 6.8 pH 计。
- 6.9 天平。
- 6.10 显微镜。

## 7 样品采集

### 7.1 虫体样品

剖检病死畜盲肠发现的疑似毛尾线虫虫体，保存于70 %酒精待用。

### 7.2 粪便样品

直肠采集或从环境中收集待检动物粪便，将粪便装入一次性封口袋中，为了避免操作过程不同样品的交叉污染，对于每一个样品，操作者需要更换乳胶手套和一次性用品。

## 8 检测方法

### 8.1 形态学鉴定法

#### 8.1.1 粪便虫卵检查法

取新鲜粪便样品2 g放在小烧杯中，用镊子或玻璃棒压碎，加入10倍量的饱和食盐水，搅拌混合，用粪筛或纱布过滤到安培瓶中，使管内粪汁平于管口并稍隆起，但不要溢出。静置30 min后，用载玻片蘸取小瓶表面液体反转后进行虫卵镜检。

毛尾线虫虫卵呈橄榄状或腰鼓状，两端各有一个透明的栓塞状物，颜色由淡黄到褐黄，且卵内具有分裂的卵细胞或幼胚，虫卵大小在50~54 μm×22~23 μm，虫卵形态参见附录C中图C.1。

### 8.1.2 成虫检查法

按照常规的动物尸体剖检操作步骤对死亡（或捕杀）动物进行尸体剖检，检查盲肠黏膜及内容物，成虫呈乳白色，明显的区分出前后两部分，前部细长线状，为食道部。其食道腺体部由一连串单细胞构成，约占虫体的2/3或更长。后部较粗，内为肠道及生殖器官，虫体外观极似一条鞭子。雄虫：体长在20 mm~80 mm范围内。尾部卷曲，有一根交合刺被包围在交合刺鞘内，鞘上密布有小刺，无导刺带。雌虫：体长在35 mm~70 mm范围内，尾部较直。阴门开口于虫体粗细交界处，根据种类不同，开口处可能有小刺或结节。肛门位于虫体最后端，虫体形态参见附录C中图C.2。

### 8.1.3 结果判定与表述

若在粪便中检出典型虫卵或在剖检时检到成虫，即可判定阳性，报告为检出毛尾线虫；若在粪便中未检出典型虫卵，且在剖检时未检到成虫，即可判定阴性，报告为未检出毛尾线虫。

## 8.2 普通 PCR 法

### 8.2.1 样品的总 DNA 提取

采用 CTAB 提取法或相关商品化试剂盒提取法，见附录A。

### 8.2.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5  $\mu\text{L}$  DNA 溶液用双蒸水稀释至 1  $\mu\text{L}$ ，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ 。DNA 的浓度按式（1）计算：

$$C = A \times N \times 50/1000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C ——DNA 浓度，单位为微克每微升（ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）；

$A_{260}$  和  $A_{280}$  ——260 nm 和 280 nm 处的吸光值；

N ——核酸稀释倍数。

当  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7~1.9 之间时，适宜于 PCR 扩增。

### 8.2.3 普通 PCR 扩增

8.2.3.1 反应体系体积为 25  $\mu\text{L}$ ，体系组成见表 2。

表2 普通 PCR 扩增反应体系组成

试剂名称	贮备液浓度	加入反应体系的体积 $\mu\text{L}$
10×Buffer(含 $\text{Mg}^{2+}$ )	—	5
Taq 酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.25
dNTP	2.5 mmol/L	5
Por F 引物	10 pmol/L	2
Por R 引物	10 pmol/L	2
探针	10 pmol/L	0.8
模板	—	5
ddH <sub>2</sub> O	—	补足至 25

8.2.3.2 PCR反应条件为94℃预变性5 min; 94℃变性30 sec, 58℃退火30 sec, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min; 4℃保存。检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

#### 8.2.4 普通PCR扩增产物电泳检测

用TAE电泳缓冲液配制成1.5%琼脂凝胶。将琼脂凝胶放入电泳槽中,加入1×TAE电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将5 μL~8 μL PCR扩增产物分别和适量加样缓冲液混合点样。9 V/cm恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。利用凝胶成像系统观察电泳结果并记录。

#### 8.2.5 结果报告

##### 8.2.5.1 对照结果

对照结果为:

阳性对照: 出现132 bp的PCR扩增产物。

阴性对照: 不出现132 bp的PCR扩增产物。

空白对照: 不出现132 bp的PCR扩增产物。

阳性对照、阴性对照和空白对照均正常时结果有效,否则应重新试验。

##### 8.2.5.2 结果判定与表述

各对照正常的情况下,若被检样品出现132 bp条带,普通PCR扩增产物为阳性,应进一步测序确认,目的基因序列参见附录B;若被检样品不出现132 bp条带,普通PCR扩增产物为阴性。普通PCR扩增产物为阳性者,经测序确认后,表述为普通PCR检测毛尾线虫病为阳性。PCR产物为阴性者,表述为普通PCR检测毛尾线虫病为阴性。

#### 8.3 实时荧光PCR法

##### 8.3.1 样品的总DNA提取

同8.2.1操作。

##### 8.3.2 DNA浓度和纯度的测定

同8.2.2操作。

##### 8.3.3 实时荧光PCR检测

8.3.3.1 反应体系体积为25 μL,体系组成见表3。

表3 实时荧光 PCR 扩增反应体系组成

试剂名称	贮备液浓度 pmol/L	加入反应体系的体积 μL
2×预混液	—	10
Por F 引物	10	1
Por R 引物	10	1
探针	10	0.8
模板	—	5
ddH <sub>2</sub> O	—	补足至 25

8.3.3.2 反应条件为 94 °C 预变性 30 sec; 94 °C 变性 5 sec, 59 °C 退火 30 sec, 40 个循环。在每次循环退火时收集荧光信号。检测结束后, 根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

#### 8.3.4 结果报告

##### 8.3.4.1 对照结果

对照结果为:

阳性对照: 检测结果  $Ct \leq 35.0$ 。

阴性对照: 检测结果  $Ct \geq 40.0$ 。

空白对照: 检测结果  $Ct \geq 40.0$ 。

阳性对照、阴性对照和空白对照均正常时结果有效, 否则应重新试验。

##### 8.3.4.2 结果判定与表述

8.3.4.2.1 各试验对照正常的情况下, 样品 2 个平行样检测结果  $Ct \geq 40.0$ , 可以判断样品结果为阴性, 表述为实时荧光 PCR 检测毛尾线虫病为阴性。

8.3.4.2.2 各试验对照正常的情况下, 样品至少 1 个平行样检测结果  $35.0 < Ct < 40.0$ , 并出现典型扩增曲线, 此时应适当增加 DNA 模板量后重做实时荧光 PCR 检测。若再次检测结果仍然  $Ct < 40.0$  并出现典型扩增曲线, 可以判断样品结果为阳性, 表述为实时荧光 PCR 检测毛尾线虫病为阳性; 若再次检测结果  $Ct \geq 40.0$ , 可以判断样品结果为阴性, 表述为实时荧光 PCR 检测毛尾线虫病为阴性。

8.3.4.2.3 各试验对照正常的情况下, 样品 2 个平行样检测结果  $Ct \leq 35.0$  并出现典型扩增曲线, 可以判断样品结果为阳性, 表述为实时荧光 PCR 检测毛尾线虫病为阳性。

#### 9 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

#### 10 废弃物处理

检测过程中的废弃物, 收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附 录 A  
(规范性附录)  
DNA 提取

### A.1 CTAB提取法

#### A.1.1 样品准备

从 70 %酒精中取虫体 1 条，用 PBS 缓冲液清洗 2~3 次，在离心管中研碎待用。

取适量粪便，置于灭菌离心管中，加入 1 mL 丙酮(-20℃)，充分振荡混匀后，10000 rpm 离心 3 min，倾去上清液；重复此步骤 3~6 次直至上清变为无色。向离心管中加入预冷的蒸馏水(-4℃)，充分振荡混匀后，10000 rpm 离心 3 min，弃上清；重复 3~5 次直至上清变为无色，倾去上清。

#### A.1.2 DNA提取

在样品中加入 20 μL 蛋白酶 K、800 μL 2 % CTAB 裂解液、50 μL 0.5 % SDS，充分振荡混匀后置于 55 ℃水浴锅中 2 h，每半小时取出摇匀一次。12000 rpm 离心 5 min 后，小心吸取上清移至一新的离心管中，加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25: 24: 1)，充分振荡混匀，10000 rpm 离心 10 min，吸取上清移至一新的离心管中。再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25: 24: 1)，直至管中下层有机相与上层水相之间无白色沉淀。吸取上清移至一新的离心管中，加入 0.1 倍体积 10 %的醋酸钠溶液，充分振荡混匀后，再加入 1.5 倍体积预冷无水乙醇，混匀后置于-20 ℃冰箱中 2 h。10000 rpm 离心 10 min，弃上清，加入适量的 70 %乙醇洗沉淀，10000 rpm 离心 3 min，弃上清，室温静置晾干残留的乙醇。加 30~50 μL 的 TE 洗脱，于-20 ℃条件下保存待用。

### A.2 商品化试剂盒提取法

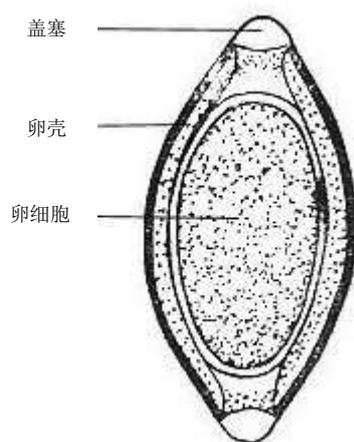
参照商品化试剂盒说明书进行。

附录 B  
(资料性附录)  
DNA 产物测序结果

AACGGCGGATCACTTGGCTCGTAGGTCGTTGAAGAACGACGTGACACTCGAGAATTGATGTGAATTGCAGACACACTG  
AACTTGAATACTTTGAACGCACATTGCAGCGTCGATCAAACATGTCGGCGCTAC

地方标准信息服务平台

附录 C  
(资料性附录)  
毛尾线虫卵及成虫的基本形态



图C.1 毛尾线虫虫卵模式图来源：(百度百科)



图C.2 毛尾线虫成虫模式图 (来源：百度百科)