

第二十章 T/CALAS 20—2017《实验动物 牛棒状杆菌检测方法》实施指南

第一节 工 作 简 况

中国实验动物学会作为团体标准改革的试点单位，结合实际需求，提出了该标准的研究和撰写，由中国食品药品检定研究院完成。

第二节 工 作 过 程

2015年12月编写组提出框架，2016年上半年完成标准草案的编写。2016年10月10日在广西召开的第十二届中国实验动物学会学术年会上征求与会专家意见，经修改成为征求意见稿。

2016年12月，收到专家的意见反馈，针对书写规范、试剂配制等方面问题进行了相应修改，形成送审稿。

2017年2月21日经过标准审查会议讨论，与会专家针对该标准提出了生物安全要求标准和荧光PCR名称规范等问题，均做了修改，形成标准报批稿。

2017年5月，本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过，批准发布，于2017年5月19日起正式实施。

第三节 编 写 背 景

牛棒状杆菌（*Corynebacterium bovis*）是一种革兰氏阳性短杆菌，常引起裸鼠过度角质化症（Hyperkeratosis），致裸鼠发生过度角质化皮炎和棘皮症。该病在美国、日本及欧洲部分国家均有暴发。随着医学科学的进步，转基因动物作为疾病研究的主要工具，已经逐渐成为实验动物研究的重要内容。其中裸鼠作为一种免疫缺陷动物，已成为医学、生物学研究领域不可缺少的实验动物模型。在肿瘤学、免疫学、药品和生物制品的安全性评价及药物筛选等方面具有特殊的应用价值。随着国内生物制药和医学研究的快速发展，裸鼠的使用不断增加，裸鼠的进口数量也越来越多，对国内裸鼠的生产和饲养单位提出了更高的要求。

在这种情况下，加强对裸鼠的检测显得尤为重要。作为一种裸鼠的主要病原菌，我国仍没有牛棒状杆菌检测的国家标准出台。《实验动物 牛棒状杆菌检测方法》的建立和制定填补了此项空白，为裸鼠的质量和相关研究的顺利进行提供保障。

第四节 编制原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则：

- (1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2000 的规定；
- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理，具有适用性和可操作性；
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

第五节 内容解读

分离培养是细菌检测的经典方法，能够直接分离获得病原菌并进行鉴定，结果准确。牛棒状杆菌属需氧菌，可在血琼脂上生长，形成白色奶油状、直径 1~2mm 的菌落。目前国际上主要有三种牛棒状杆菌菌株：发病菌株（HAC），无症状菌株（NHAC）和标准菌株（ATCC 7715）。三种菌株的生化特征存在诸多区别，无法建立一种稳定统一的鉴定规程，不利于检测方法的建立。

实时荧光定量 PCR（real-time polymerase chain reaction, qPCR）技术以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。qPCR 是一种高通量的荧光分析技术，是在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量，并据此推断目的基因的初始量，可推算出组织中病原核酸的含量。Taqman MGB 探针的应用提高了保守区内搜寻特异探针的成功率，其经过了化学修饰，提高了 T_m 值，可以设计得更短，使反应的结果更精确、分辨率更高。

根据以上特点，制定实验动物牛棒状杆菌分离培养和 qPCR 检测方法。

一、引物探针的设计

引物和探针的设计参照 GenBank 收录的牛棒状杆菌 ATCC 7715 的 16S rRNA 序列（GenBank: D38575.1），采用 ABI PrimerExpress 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件，设计合成 TaqMan MGB 探针及引物。探针的荧光标记选择 FAM（5' 端）作为报告发光基团，NFQ（3' 端）为淬灭基团。序列如表 1 所示。

表 1 牛棒状杆菌 qPCR 的引物及探针

引物	引物序列（5' → 3'）	序列位置（ATCC 7715 的 16S rRNA 序列）	扩增子大小 （bp）
上游引物 Cb-F	CGGCAGGGACGAAGCTT	3591~3615	60
下游引物 Cb-R	CACGTAGTTAGCCGGTGCTTCT	3687~3665	
TaqMan MGB 探针	FAM-TGTGACGGTACCTGCAT-MGBNFQ	3634~3658	/

二、标准品检测

将 pCR2.1-Cb-V3 质粒 DNA 作为模板进行牛棒状杆菌探针法 qPCR 检测，建立标准曲线。具体操作如下：将质粒 DNA 进行 10 倍系列稀释成 1 系列稀将 pCR2.1-Cb-V3 质粒 DNA 作为模板进行牛棒状杆菌探针法 qPCR 检测，建立标准曲线。具体操作如下：将质粒 DNA 进行 10 倍系列稀释成 1×10^9 copies/ μ L、 1×10^8 copies/ μ L、 1×10^7 copies/ μ L、 1×10^6 copies/ μ L、 1×10^5 copies/ μ L 共 5 个稀释度。每个稀释度重复平行试验 3 次。

标准品检测反应体系为 20 μ L，依次加入下列成分：上游引物 0.5 μ L（10 μ mol/L），下游引物 0.5 μ L（10 μ mol/L），TaqMan MGB 探针 0.25 μ L（10 μ mol/L），质粒 DNA 1 μ L，无 DNA、RNA 酶水 7.75 μ L，Taqman Mix（TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016）10 μ L。

标准品检测反应条件为：先 50 $^{\circ}$ C 2min；然后 95 $^{\circ}$ C 10min；最后 95 $^{\circ}$ C 15s，60 $^{\circ}$ C 1min，共 40 个循环，在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

标准品 qPCR 扩增曲线如图 1 所示。

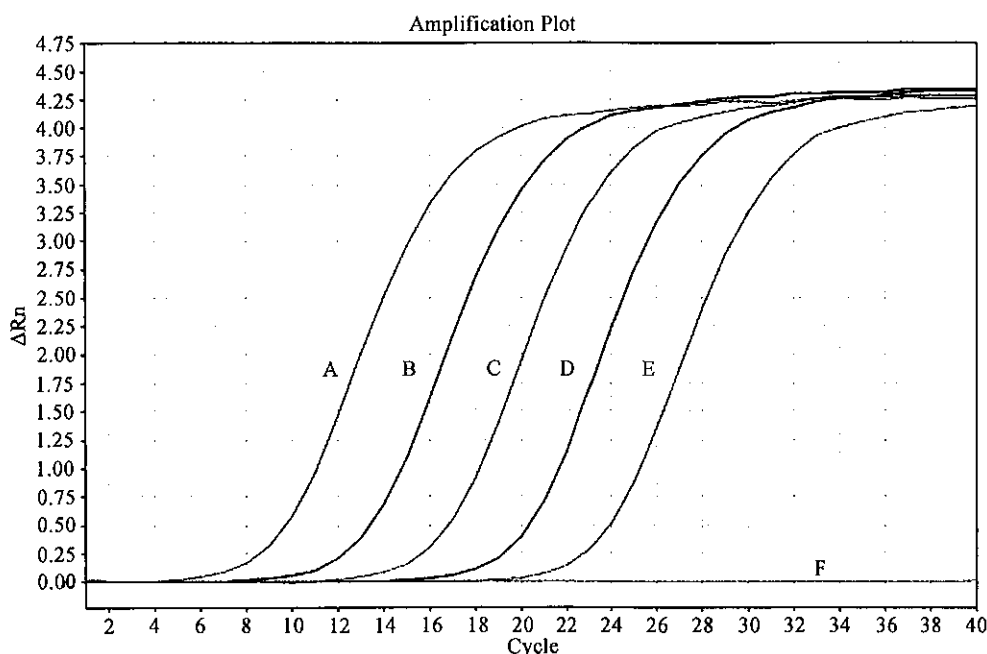


图 1 10 倍系列稀释质粒标准品的荧光扩增曲线

A~E 依次为质粒标准品拷贝数 1×10^9 ~ 1×10^5 copies / ml 的荧光曲线；F 阴性对照

三、标准曲线的绘制

根据所得 CT 值与其对应的标准品的对数值绘制标准曲线，见图 2。标准曲线方程为 $Y = -3.494X + 40.686$ ，可信度 $R^2 = 1$ ，qPCR 反应的扩增效率为 93.306%。标准曲线显示：本发明建立的牛棒状杆菌 qPCR 检测方法有 9 个数量级的线性检测范围，进一步说明该检测方法具有非常高的灵敏度。

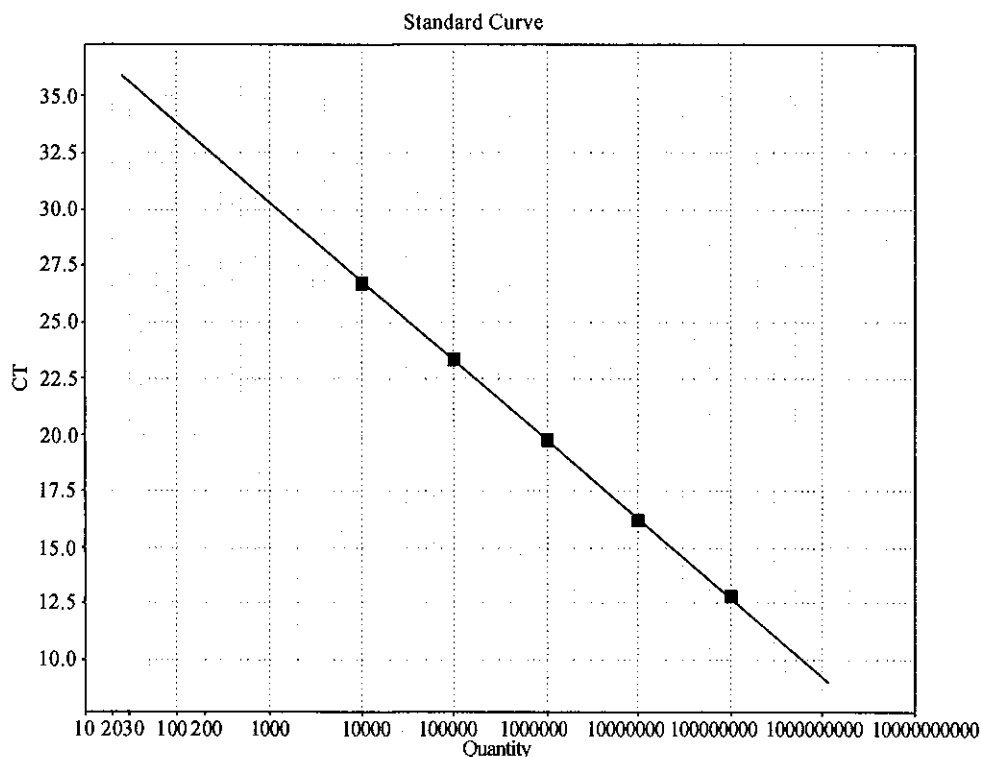


图2 标准曲线

标准曲线方程: $Y = -3.494X + 40.686$; 相关系数 $R^2 = 1$, Eff% = 93.306

四、牛棒状杆菌 Taqman MGB 探针法 qPCR 检测方法的特异性

设定水空白对照,以鼠棒状杆菌(ATCC65013)、沙门氏菌(ATCC47001、50041、50047、50071、50093、50094、50115、CVCC533)、宋内氏志贺菌(CMCC51082)、痢疾志贺氏菌(CMCC51252)、假结核耶尔森氏菌(CMCC53501)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(CMCC52301)、大肠杆菌(CMCC44711、CMCC44110)、枸橼酸杆菌(ATCC BAA352)、肺炎克雷伯杆菌(CMCC46108)、绿脓杆菌(ATCC27853、ATCC47085)、粪链球菌(CMCC32218)、变形杆菌(CMCC49101)、粪产碱杆菌(ATCC8750)、金黄色葡萄球菌(CMCC26001)、多杀巴斯德杆菌(ATCC43137)、嗜肺巴斯德杆菌(ATCC 12555、ATCC35149)、流感嗜血杆菌(ATCC33391)、小鼠放线杆菌(ATCC49577)、支气管鲍特杆菌(CMCC58401、ATCC19395)、念珠状链杆菌(ATCC14647)、空肠弯曲菌(ATCC33560)、幽门螺旋杆菌(NCTC11637)、肺炎链球菌(CMCC36001)、乙型溶血性链球菌(CMCC31210、CMCC32210)、单核增生性李斯特杆菌(CMCC54004)、白色念珠菌(ATCC10231)、枯草芽孢杆菌(ATCC9372)、蜡样芽孢杆菌(CMCC63301)、泰泽病原体(RJ株)、支原体(ATCC15531、ATCC23714)、石膏样小孢子菌(ATCC13994)、石膏样毛癣菌(ATCC20010)、犬小孢子菌(ATCC201851)、猴类毛癣菌(ATCC16447)等47株参考菌株的DNA作为模板进行实时荧光定量PCR检测,评价反应系统的特异性。反应体系及反应条件与实施例2相同。每份样本重复平行试验3次。

结果如图 3 所示：用牛棒状杆菌 TaqMan MGB 探针法 qPCR 检测水及 47 株参考菌株 DNA，均无荧光信号产生，为阴性。结果说明：本发明用于对牛棒状杆菌进行 qPCR 检测的引物和 TaqMan MGB 探针的特异性良好，定量反应体系特异性良好。

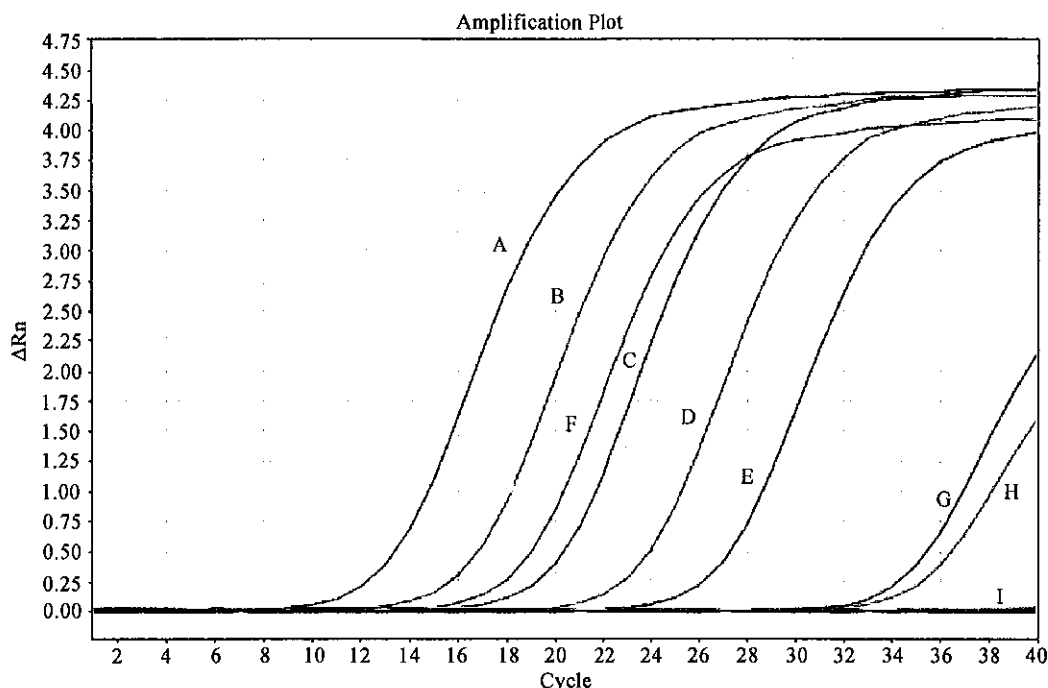


图 3 牛棒状杆菌 qPCR 的特异性试验及检测应用结果

A-E 依次为质粒标准品 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^1$ copies/ml 的荧光曲线；F 牛棒状杆菌阳性对照扩增荧光曲线；G, H 小鼠 MGBFQ-PCR 阳性扩增荧光曲线；I 阴性对照及 47 株参考菌株

五、牛棒状杆菌 Taqman MGB 探针法 qPCR 检测方法的敏感性

将牛棒状杆菌质粒标准品 10 倍系列稀释成 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10、1 共 10 个稀释度，以无菌水为阴性对照，将质粒作为模板进行探针法 qPCR 检测，评价本发明反应系统的敏感性。

探针法 qPCR 检测敏感性扩增曲线如图 4 所示：质粒标准品 $1 \times 10^9 \sim 1$ 稀释度，10copies/mL 浓度的标准品仍能扩增，产生荧光信号。结果说明：本发明用于对牛棒状杆菌进行 qPCR 检测的引物和 TaqMan MGB 探针的敏感性良好，定量反应体系敏感性良好。

六、牛棒状杆菌 Taqman MGB 探针法 qPCR 检测方法的稳定性

对标准品 1×10^7 copies、 1×10^6 copies、 1×10^5 copies、 1×10^4 copies、 1×10^3 copies、 1×10^2 copies、10copies 等 7 个稀释度同时重复 3 次 qPCR，所得 Ct 值计算变异系数 (CV%)，具体分析结果见表 2。组内变异系数 CV% 为 0.08~1.72，组间为 1.08~5.06，稳定性良好。

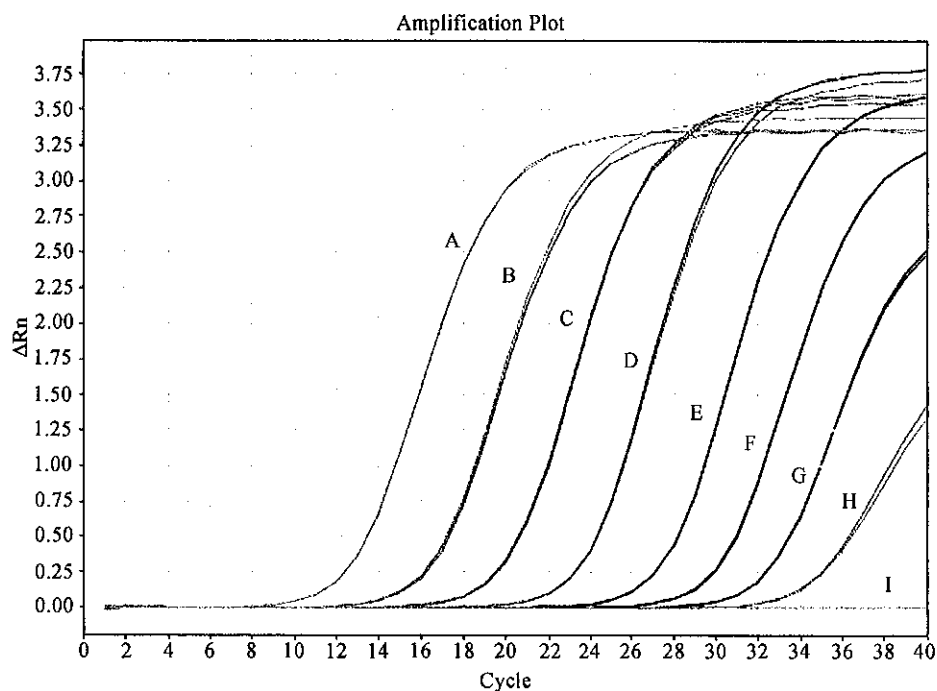


图 4 qPCR 敏感性检测结果

A-H 为质粒标准品拷贝数 1.0 标准品拷 ~10 copies 定量荧光扩增曲线；I 阴性对照

表 2 牛棒状杆菌 qPCR 检测方法的稳定性

稳定性	质粒拷贝数		CT 值		Mean	SD	CV%
组内	10 ⁷	16.81	16.80	16.81	16.81	0.01	0.08
	10 ⁶	20.30	20.27	20.26	20.25	0.05	0.27
	10 ⁵	23.35	23.39	23.31	23.36	0.04	0.18
	10 ⁴	26.79	26.81	26.82	26.79	0.02	0.09
	10 ³	30.27	30.24	30.20	30.19	0.10	0.33
	10 ²	32.95	33.17	32.73	33.13	0.40	1.22
	10	36.12	36.97	36.38	36.24	0.62	1.72
	10 ⁸	10.55	9.80	9.59	9.98	0.51	5.06
组间	10 ⁷	13.26	13.08	12.98	13.11	0.14	1.08
	10 ⁶	17.85	18.36	18.53	18.25	0.35	1.94
	10 ⁵	20.50	21.48	21.58	21.18	0.60	2.82
	10 ⁴	23.55	24.90	25.09	24.51	0.84	3.43
	10 ³	26.99	28.33	28.47	27.93	0.82	2.93
	10 ²	30.47	31.26	31.00	30.91	0.40	1.30
	10	33.25	34.76	34.65	34.22	0.84	2.46

七、牛棒状杆菌 Taqman MGB 探针法 qPCR 检测动物样品

将 284 份小鼠、64 份大鼠、106 份豚鼠、20 份沙鼠、20 份灰仓鼠、61 份树鼩等实验动物的气管或粪便 DNA 作为检测对象,进行牛棒状杆菌 qPCR 检测。每份样本重复平行试验 3 次。

临床样本检测体系为 20 μ L,依次加入下列成分:上游引物 0.5 μ L (10 μ mol/L),下游引物 0.5 μ L (10 μ mol/L),TaqMan MGB 探针 0.25n (10 μ mol/L),样品 DNA 1 μ L,无 DNA、RNA 酶水 7.75 μ L,Taqman Mix 10 μ L。

检测反应条件为:50 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 10min 各 1 个循环;然后 95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

结果如图 3 所示:两只小鼠的粪便 DNA 为模板出现了目的荧光扩增曲线,而以水空白为模板没有出现目的荧光扩增曲线。用之前建立的普通 PCR 方法没有检出。结果表明:qPCR 的敏感性要高于普通 PCR。证明了在实验小鼠中确实存在牛棒状杆菌的感染,但感染比例极少,细菌含量很低。

第六节 分析报告

利用牛棒状杆菌 16S rRNA V3 区的特异性的引物和探针对待检样品进行扩增,可以快速地检测动物样品中牛棒状杆菌核酸的存在。根据荧光定量 PCR 仪捕捉到的荧光信号强弱,可以对实现对样品中牛棒状杆菌核酸含量的相对定量。Ct 值的大小是决定检测结果的关键指标。当 Ct 值小于规定数值,同时阴、阳对照均成立时,可判为待检样品阳性。如果所得 Ct 值刚好位于临界点,应判为可疑反应。对阳性和可疑结果均应进行复试,Ct 值小于规定值判为阳性,大于规定值判为阴性,仍为可疑时也判为阴性。根据所得结果出具相应报告,并附扩增结果图,注明各样品编号。

第七节 国内外同类标准分析

根据文献查询可知国外已对牛棒状杆菌进行了较系统的研究,建立了分离培养和 PCR 检测方法。根据研究表明,检测效果以 qPCR 方法效果最好。目前国内对牛棒状杆菌仍然缺乏全面系统的研究,当务之急是首先建立该病原菌的快速检测方法,及时发现、及时采取措施,避免或减少其对科学研究的影响,对保障免疫学、肿瘤学等动物实验数据的准确、可靠具有极其重要的意义。

第八节 重大分歧意见的处理经过和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见(通过函寄和会议形式多次咨询和研讨),均未出现重大意见分歧的情况。

第九节 标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

由于裸鼠的先天性免疫缺陷和无毛的生理特征，使其更容易感染牛棒状杆菌，并引起角质化皮炎等特征性症状，可对使用裸鼠的科研工作造成严重的影响。因此，建议对裸鼠进行强制检测。

第十节 本标准常见知识问答

问：检测牛棒状杆菌应采哪些部位的样品？

答：牛棒状杆菌主要引起裸鼠皮肤角质化，俗称“鳞屑病”。考虑实验动物和其生活习性，采皮肤拭子和咽拭子是最佳选择。

问：是否能够检测所有的牛棒状杆菌？

答：不能确定。鉴于目前我们拥有牛棒状杆菌菌株的局限性，可能有不同目标序列的菌株存在。在实际检测中需要结合临床症状综合判断。