

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 20—2017

实验动物 牛棒状杆菌检测方法

Laboratory animal - Method for examination of *Corynebacterium bovis*

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准附录为资料性附录。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：邢进、冯育芳、岳秉飞。

实验动物 牛棒状杆菌检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物牛棒状杆菌的检测方法。

本标准适用于小鼠和大鼠中牛棒状杆菌的检测。

2 规范性引用文件

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用系列标准最新版本的可能性。

GB/T 14926.42 《实验动物 细菌学检测 标本采集》

GB/T 14926.43 《实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

3 基本原理

牛棒状杆菌为革兰氏阳性小杆菌，主要感染免疫缺陷小鼠的皮肤，可寄居于感染小鼠的口腔和消化道。牛棒状杆菌在营养琼脂和血琼脂上均可生长，可形成灰白色的特征性菌落。利用其与其他棒状杆菌的生化反应区别，可以进行鉴定。与牛棒状杆菌免疫血清能够形成特异性凝集。

细菌的 16SrRNA V3 区具有高度的差异性，根据此段序列可以区分不同的菌株。据此片段设计实时荧光 PCR (qPCR) 引物和探针，可对皮肤、口腔、肠内容物或粪便进行 qPCR 检测。

qPCR 方法通过两条标记荧光发射基团和荧光淬灭基团的引物对牛棒状杆菌 16SrDNA 的 V3 区进行扩增，当完整的探针与目标序列配对时，荧光基团发射的荧光因与 3'端的淬灭剂接近而被淬灭。但在进行延伸反应时，聚合酶的 5'外切酶活性将探针进行酶切，使得荧光基团与淬灭剂分离。所发出的荧光信号可以被荧光定量 PCR 仪所记录捕捉。随着扩增循环数的增加，释放出来的荧光基团不断积累，荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。

4 主要设备和材料

4.1 生物安全柜

4.2 高速冷冻离心机

4.3 荧光定量 PCR 仪

4.4 移液器 (200 μ L、10 μ L)

4.5 100 μ L 荧光定量 PCR 管

5 培养基和试剂

5.1 血琼脂

5.2 生化试剂：葡萄糖、硝酸盐、尿素、七叶苷、麦芽糖、甘露糖、蔗糖、木糖、环磷酸腺苷、氧化酶、吡嗪酰胺酶、碱性磷酸酶。

5.3 牛棒状杆菌 DNA

5.4 细菌基因组 DNA 提取试剂：裂解缓冲液，Tris 饱和酚，异丙醇、无水乙醇、氯仿、异戊醇（分析纯），醋酸钠（3mol/L）、TE 缓冲液。

5.5 牛棒状杆菌质粒标准品序列

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTT
CGGCAGGGACGAAGCTTTTGTGACGGTACCTGCATAAGAAGCACCGGCTAA-
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

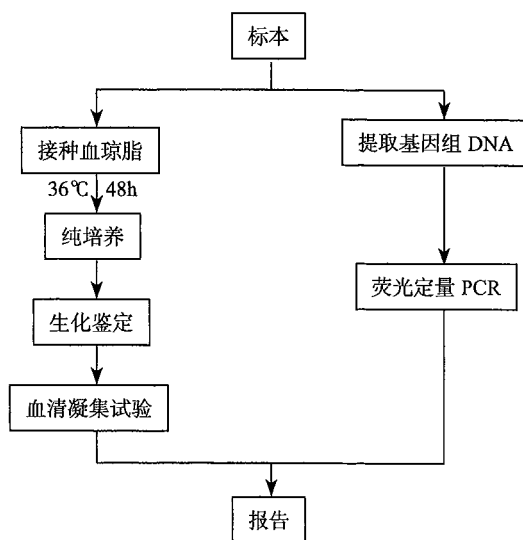
根据以上序列人工合成标准品，制成 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ copies/ μ L 的 6 个系列稀释浓度备用。

5.6 引物和探针

引物	引物序列 (5'-3')	序列位置 (ATCC 7715 的 16SrRNA 序列)	扩增子大小 (bp)
上游引物 Cb-F	CGGCAGGGACGAAGCTT (序列表中 SEQ ID NO: 1)	3591~3615	60
下游引物 Cb-R	CACGTAGTTAGCCGGTGCTTCT (序列表中 SEQ ID NO: 2)	3687~3665	
TaqMan MGB 探针	FAM- TGTGACGGTACCTGCAT -MGBNFQ (序列表中 SEQ ID NO: 3)	3634~3658	

5.7 qPCR 反应液：TaqMan Mix (TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016)

6 检测程序



7 操作步骤

7.1 采样

采取皮肤、呼吸道分泌物、肠内容物、粪便或病灶分泌物。

7.2 分离培养法

7.2.1 无菌操作,用接种针取呼吸道分泌物,棉拭子蘸取皮屑,分别画线接种哥伦比亚血琼脂平皿,36℃培养48h;牛棒状杆菌在血琼脂上形成1mm左右、白色、凸起、无光泽、涂片不易乳化、不溶血的菌落。

7.2.2 革兰氏染色阳性,成棒槌状或微弯曲,排列不规则,可散在或成对或成“V”形或呈栅栏状排列小杆菌。

7.2.3 生化鉴定

代谢类型为发酵型,酯酶阳性,硝酸盐还原试验阳性,尿素酶阴性,七叶苷阴性,吡嗪酰胺酶阴性,碱性磷酸酶阳性,分解葡萄糖,麦芽糖、甘露醇、蔗糖、木糖阴性,CAMP反应阴性。

7.2.4 血清玻片凝集试验阳性。

7.3 实时荧光PCR法

DNA提取:①直接提取样品DNA时,取7.1所述样品适量,约10~200mg;②对样品分离培养,获得菌落时,将待检菌制成约 10^4 个菌/mL浓度的菌液;

加入500 μ L裂解缓冲液,60℃水浴30min;加入等体积(500 μ L)Tris饱和酚,充分震荡;12 000r/min离心5min;吸上清加入等体积(500 μ L)氯仿/异戊醇(24:1);12 000r/min离心5min;吸上清加入0.1倍体积3mol/L醋酸钠和0.6倍体积异丙醇,轻柔颠倒混匀;12 000r/min离心10min;弃上清,加入70%乙醇1mL,轻柔颠倒2~3次;12 000r/min离心10min;弃上清,干燥15min;用50 μ L灭菌TE或去离子水溶解,-20℃冻存待检。如采用商品化试剂盒则根据试剂盒操作说明进行。

7.4 检测反应体系

7.4.1 20 μ L,依次加入下列成分:无DNA、RNA酶水7.75 μ L,2 $\times$ TaqMan Mix 10 μ L,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),样本DNA1 μ L。各试剂体积根据总样本量进行相应倍数的增加。设置牛棒状杆菌阳性DNA对照,和空白阴性对照各1管。

7.4.2 反应条件:50℃2min;95℃10min;95℃15s,60℃1min,40个循环。

7.5 涉及生物安全的操作,按GB19489规定执行。

8 结果报告

8.1 分离培养法 如有可疑牛棒状杆菌生长,且生化反应符合牛棒状杆菌特征,判为牛棒状杆菌阳性,否则判为阴性。

8.2 荧光定量PCR方法

8.2.1 在阴性对照Ct值 ≥ 32 ,阳性对照Ct值 ≤ 30 时,判定结果。

8.2.2 待检样品Ct值 ≤ 30 时,判为阳性。

8.2.3 待检样品 $30 < \text{Ct值} \leq 32$ 时,判为牛棒状杆菌可疑结果,进行重试。

8.2.4 重试结果 Ct 值仍 ≤ 32 时, 判为牛棒状杆菌阳性。如 Ct 值 > 32 时, 判为阴性。

8.3 8.1 和 8.2 结果有一项为阳性时即判为牛棒状杆菌阳性。

8.4 凡符合上述各项检测结果这做出阳性报告, 不符合者做出阴性报告。

附录 A

(资料性附录)

实验试剂的配置

A.1 1mol/L Tris-Cl (pH7.4 和 pH8.0)

分别 121.1g Tris 溶解于 800mL 去离子水, 浓 HCl 调节 pH 至 7.4 和 8.0, 分别加水定容至 1000ml, 高压灭菌备用。

A.2 0.5mol/L EDTA (pH8.0)

186.1g EDTA 溶解于 800ml 去离子水, NaOH 调节 pH 至 8.0, 加水定容至 1000mL, 高压灭菌备用。

A.3 氯化钠 (5mol/L)

称取 29.22g 氯化钠溶于去离子水中, 定容至 100mL, 高压灭菌备用。

A.4 10%SDS

100mL 灭菌去离子水溶解 10g 十二烷基磺酸钠。

A.5 蛋白酶 K (20mg/mL)

100mg 蛋白酶 K 粉末用 5mL 保存液溶解, 分装小管 -20°C 冻存。

蛋白酶 K 保存液: 50mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 1.5mmol/L 醋酸钙, 50% 甘油。

50mmol/L Tris-Cl (pH8.0): 1mol/L Tris-Cl (pH8.0) 2mL 加入 98mL 灭菌去离子水。

1.5mmol/L 醋酸钙: 用 100mL 去离子水溶解 23.7g 醋酸钙。

50% 甘油: 50mL 甘油与 50mL 去离子水混合。

A.6 裂解缓冲液

1mol/L Tris-Cl (pH8.0) 10ml, 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 5mL, 5mol/L 氯化钠 10mL, 10%SDS 10mL, 20mg/mL 1mL 蛋白酶 K, 加灭菌去离子水至 100mL。所需量增大, 各组分比例相应增加。

A.7 醋酸钠 (3mol/L)

40.8g 醋酸钠溶解于灭菌去离子水中, 定容至 100mL, 高压灭菌备用。

A.8 TE 缓冲液 (pH7.4)

1mol/L Tris-Cl (pH7.4) 1mL, 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 0.2mL, 加灭菌去离子水至 100mL。