

ICS 65.020.30

CCS B 44

DB44

广东省地方标准

DB44/T 2337—2021

实验动物 病原菌 PCR 定性分析

Laboratory animals Qualitative analysis of pathogenic bacteria with polymerase chain reaction method

地方标准信息服务平台

2021 - 10 - 18 发布

2022 - 01 - 18 实施

广东省市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 原理	2
6 主要设备和材料	2
7 试剂	2
8 方法	3
9 结果	6
10 防止交叉污染的措施	7
附录 A（规范性） 溶液的配制	8
附录 B（规范性） 引物及探针序列	10
参考文献	13

地方标准信息服务平台

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省科学技术厅提出并组织实施。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会（GD/TC 93）归口。

本文件起草单位：广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：闵凡贵、潘金春、黄树武、王静、袁文、何丽芳、陈梅玲、张钰、黄韧。

地方标准信息服务平台

实验动物 病原菌 PCR 定性分析

1 范围

本文件规定了实验动物病原菌的PCR定性分析方法。
本文件适用于实验动物病原菌核酸定性分析。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 14926 实验动物 微生物检测方法
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 19495.2 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

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

体外酶催化合成特异DNA片段的方法，模板DNA先经高温变性成为单链，在DNA聚合酶作用和适宜的反应条件下，根据模板序列设计的两条引物分别与模板DNA两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合，接着在DNA聚合酶的作用下以四种dNTP为底物，使引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

3.2

实时荧光聚合酶链式反应 real-time PCR, 实时荧光 PCR

实时荧光PCR方法是在普通PCR的基础上，在反应体系中加入特异性荧光探针，利用荧光信号积累实时报告整个PCR进程，通过读取每次循环反应中的荧光发射信号，间接反映了PCR扩增的目标基因的量，最后通过扩增曲线对未知模板进行定性或定量分析。

3.3

Ct 值 cycle threshold

实时荧光PCR反应中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。

DNA 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
EDTA 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid)

- PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)
RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)
TAE 三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液 (tris-acetate-EDTA)

5 原理

用合适的方法提取样本中的DNA，分别针对病原菌16s RNA或其他保守的基因设计特异的引物探针序列，通过PCR对模板进行扩增，根据PCR反应结果分析该样品中是否含有某种病原菌。

6 主要设备和材料

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 实时荧光 PCR 仪。
- 6.3 电泳仪。
- 6.4 凝胶成像分析系统。
- 6.5 高速冷冻离心机。
- 6.6 普通离心机。
- 6.7 恒温孵育器。
- 6.8 漩涡振荡器。
- 6.9 组织匀浆器。
- 6.10 微量核酸定量仪。
- 6.11 生物安全柜。
- 6.12 PCR 超净工作台。
- 6.13 冰箱 (-20 °C)。
- 6.14 微量移液器：0.1 μL~2 μL，1 μL~10 μL，10 μL~100 μL，100 μL~1000 μL。
- 6.15 灭菌离心管 (1.5 mL、2 mL、5 mL、15 mL)，灭菌吸头 (10 μL，200 μL，1 mL)，灭菌 PCR 扩增反应管 (0.2 mL，八连管或 96 孔板)。
- 6.16 聚乙烯薄膜袋：90 mm×150 mm 自封袋，使用前紫外灭菌 20 min。
- 6.17 采样工具：剪刀、镊子和灭菌棉拭子等。

7 试剂

7.1 以下所用的试剂除特别注明者外均为分析纯，所用的水为双蒸水或去离子水，应符合 GB/T 6682 所规定一级水的要求。所有涉及分子生物学操作的水均为无 DNA 酶、无 RNA 酶水。

7.2 灭菌 PBS。配制方法见附录 A。

7.3 DNA 抽提试剂：基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit 或其他类似产品。

注：DNA 提取试剂盒是由 Qiagen 公司提供的 DNeasy Blood & Tissue Kit。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。亦可使用其他类似的 DNA 提取试剂盒进行。

7.4 无水乙醇。

7.5 PCR 试剂：Premix Taq™ (Version 2.0 plus dye)、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 或其他类似产品。

注：以上PCR试剂是由Takara公司提供的商品试剂盒，是本文件适合的市售产品的使用实例，给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。亦可使用其他类似的PCR试剂。

7.6 DNA 相对分子质量标准：100 bp~2 000 bp。

7.7 50×TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 A。

7.8 溴化乙锭：10 mg/mL，配制方法见附录 A，或其他类似产品。

7.9 1.5%琼脂糖凝胶，配制方法见附录 A。

7.10 引物和探针：根据附录 B 中表 B.1 和表 B.2 的序列合成引物和探针，引物和探针加入无 DNA 酶、无 RNA 酶水配制成 10 μmol/L 储备液，置于-20 °C 保存，使用的工作液应当置于 4 °C 存放，避免引物或探针由于反复冻融出现降解。

8 方法

8.1 生物安全措施

对于可能潜在人兽共患病的样本，应在生物安全二级及以上实验室进行操作，采样应在生物安全柜中进行。实验操作及处理按照 GB 19489 的规定，由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

8.2 采样及样本的处理

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样本前处理过程中须戴一次性手套。采样及样本处理过程操作人员应做好个人防护。

8.2.1 脏器组织

剖检，无菌采集动物脏器，剪取待检样本 0.5 g~2 g，加入 5 倍体积灭菌 PBS，使用匀浆器充分匀浆 1 min~2 min，然后将组织悬液在 4 °C，8 000 g 离心 10 min，取上清液转入另一无菌 5 mL 离心管中，编号备用。

8.2.2 细菌培养物

参照国标 GB/T 14926 对临床样本进行细菌分离培养，获得可疑阳性培养物，刮取约 1 mm²~3 mm² 菌苔，加入 500 μL 无菌水混匀，煮沸后，8 000 g 离心 1 min，取上清液直接进行 PCR。

8.2.3 盲肠内容物或粪便

无菌采集动物盲肠内容物或粪便，取待检样本 0.5 g~2.0 g，加入 5 倍体积灭菌 PBS，使用匀浆器充分匀浆 1 min~2 min，8 000 g 离心 5 min，取上清液取离心上清液转入另一无菌离心管中，编号备用。

8.2.4 血液样本

无菌采集动物血液 0.2 mL~0.5 mL，加入柠檬酸钠或 EDTA 抗凝管中，轻轻颠倒混匀 3 次~5 次，编号备用。

8.2.5 拭子取样

对活体动物取样可采集肛拭子、咽喉拭子、泄殖腔拭子、鼻拭子、皮肤拭子等，浸泡于 3 mL 无菌 PBS 中 5 min~10 min，充分混匀后，4 °C，8 000 g 离心 5 min，取上清液转入另一无菌 5 mL 离心管中，编号备用。

8.2.6 饲料、垫料和饮水

饲料、垫料：取约5 g~10 g饲料和垫料置于50 mL无菌离心管中，加入3倍体积灭菌PBS（饲料和垫料需全部浸泡于液体中）。密封后浸泡5 min~10 min，充分混匀，将混悬液转移至15 mL无菌离心管，4 ℃，8 000 g离心5 min，取上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

饮水：取200 μL~1000 μL实验动物饮水直接转移到无菌1.5 mL离心管中，编号备用。

8.2.7 设施设备

用灭菌棉拭子拭取实验动物设施设备出风口初效滤膜表面约5 cm²沉积物，将拭子置入灭菌15 mL离心管，加入3 mL灭菌PBS，浸泡5 min~10 min，充分混匀，取出棉拭子，将离心管于4 ℃，8 000 g离心5 min，取上清液转入另一无菌离心管中，编号备用。

8.2.8 样本的存放

采集或处理的样本在2 ℃~8 ℃条件下保存应不超过24 h，若需长期保存，须放置于-80 ℃冰箱，但应避免反复冻融。

8.2.9 采样废弃物处理

采样结束，动物尸体应使用生物安全垃圾袋包装完整，高压灭菌后交由医疗垃圾处理单位进行处理，采样器材应使用消毒液浸泡或高压灭菌消毒，并做好实验台面及采样室的消毒。

8.3 核酸提取

8.3.1 取50 μL~100 μL的样本至1.5 mL或2 mL离心管中，加20 μL蛋白酶K，用PBS补加至220 μL。

8.3.2 加入200 μL缓冲液AL，涡旋震荡充分混匀，56 ℃孵育10 min。

8.3.3 加入200 μL的无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

8.3.4 移取第8.3.3条制备的混合液至离心柱上，离心柱放在2 mL收集管上，≥6 000 g离心1 min。弃收集管/液。

8.3.5 离心柱放至新的2 mL收集管上，加500 μL缓冲液AW1，≥6 000 g离心1 min。弃收集管/液。

8.3.6 离心柱放至新的2 mL收集管上，加500 μL缓冲液AW2，20 000 g离心3 min。弃收集管/液。

8.3.7 将离心柱放在一个新的1.5 mL离心管上，吸200 μL的缓冲液AE在吸附膜上，室温孵育1 min，≥6 000 g离心1 min。收获提取DNA液。

8.3.8 取2 μL提取的DNA样本使用微量核酸定量仪测定提取DNA浓度。

8.3.9 制备好的DNA应尽快进行下一步PCR反应，若暂时不能进行PCR反应，应于-20 ℃冰箱保存备用。

注：该DNA提取方法是针对DNA提取试剂盒DNeasy Blood & Tissue Kit给出的应用实例，可使用其他类似的DNA提取试剂盒进行，提取方法可做相应调整。

8.4 普通PCR

8.4.1 PCR反应体系

PCR反应体系见表1。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有阳性病原菌的组织或培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含

有阳性病原菌的样本核酸（可以是正常动物组织或正常培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模板对照（No Template Control, NTC），即在反应中用水来代替模板。

表1 PCR 反应体系配制表

反应组份	用量/ μL	终浓度
2 \times Premix Taq Mix (plus dye)	10	1 \times
Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	2	< 250 ng
PCR 用水	6.4	/
总体积	20	/
注1：可使用其他类似的PCR试剂进行，反应体系和反应参数可做相应调整。		
注2：反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。		

8.4.2 PCR 反应参数

PCR反应参数见表2。

表2 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	30
退火	50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min/kb	
注：各引物退火温度及扩增条参照附录B可作相应调整。			

8.4.3 PCR 产物电泳分析

将适量50 \times TAE稀释成1 \times TAE溶液，配制含核酸染料溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶。PCR反应结束后，取10 μL PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，以DNA分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在3 V/cm~5 V/cm，当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

8.5 实时荧光 PCR

8.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表3。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有阳性病原菌的组织或细胞培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病原菌的样本核酸（可以是正常动物组织或正常细胞培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模板对照（No Template Control, NTC），即在反应中用水来代替模板。

表3 实时荧光 PCR 反应体系配制表

反应组份	用量/ μL	终浓度
2×Premix Ex Taq Mix	10	1×
Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Probe (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Rox (50×)	0.2	/
DNA 模板	2	≤ 100 ng
PCR 用水	6.2	/
总体积	20	/

注1: 试剂Rox只在具有Rox荧光校正通道的实时荧光PCR仪上进行扩增时添加, 否则用水补齐。

注2: 可使用其他类似的实时荧光PCR试剂盒进行, 反应体系和反应参数可做相应调整。

注3: 反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。

8.5.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光PCR反应参数见表4。反应结束后, 根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

表4 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	采集荧光信号	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s	否	1
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 s		40
退火, 延伸	60 $^{\circ}\text{C}$	34 s	是	

9 结果

9.1 普通 PCR

9.1.1 质控标准

在阳性、阴性、空白对照成立的条件下, 即阳性对照的扩增产物经电泳分析可见到目的扩增条带(条带大小参见附录A), 阴性对照及空白对照的扩增产物无任何条带, 可进行结果判定。

9.1.2 结果判定

9.1.2.1 样本经琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪上观察到特定大小的目的扩增条带, 判定为该病原菌核酸阳性;

9.1.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪上未观察到特定大小的目的扩增条带, 判定为该病原菌核酸阴性。

9.2 实时荧光 PCR

9.2.1 结果分析和条件设定

直接读取仪器结果，基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。

9.2.2 质控标准

9.2.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值小于 40。

9.2.2.2 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值小于 40。

9.2.2.3 各病原菌阳性对照 Ct 值 \leq 35，并且有明显的荧光扩增曲线，则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

9.2.3 结果判定

9.2.3.1 若待检样本无荧光扩增曲线，则判定该病原菌核酸阴性。

9.2.3.2 若待检样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值 \leq 35 时，则判断该病原菌核酸阳性。

9.2.3.3 若待检样本 Ct 值介于 35 和 40 之间时，应重新进行实时荧光 PCR。重新试验后，若 Ct 值 \geq 40 时，则判定该病原菌核酸阴性。重新试验后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定该病原菌核酸可疑阳性，需进一步进行序列测定。

9.3 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的参考菌株基因序列进行比对，序列同源性在 99% 以上，可确诊待检样本某种病原菌核酸阳性，否则判定某种病原菌核酸阴性。

10 防止交叉污染的措施

按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

附 录 A
(规范性)
溶液的配制

A.1 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制

A.1.1 A液

0.2 mol/L磷酸二氢钠溶液: 称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g, 先加适量去离子水溶解, 最后定容至1 000 mL, 混匀。

A.1.2 B液

0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液: 称取磷酸氢二钠 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g), 先加适量去离子水溶解, 最后定容至1 000 mL, 混匀。

A.1.3 0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制

取A液14 mL, B液36 mL, 加氯化钠 (NaCl) 8.5 g, 加800 mL无离子水溶解稀释, 用HCl调pH至7.2, 最后定容至1 000 mL, 经121 °C高压灭菌15 min, 冷却备用。

A.2 50×TAE 电泳缓冲液

A.2.1 0.5 mol/L乙二铵四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 (pH8.0)

乙二铵四乙酸二钠 ($\text{EDTA-Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	18.61 g
灭菌去离子水	80 mL
5 mol/L氢氧化钠溶液	调pH至8.0
灭菌去离子加至100 mL, 121 °C, 15 min灭菌备用。	

A.2.2 50×TAE电泳缓冲液配制

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA溶液, pH8.0	100 mL
灭菌去离子加至1 000 mL, 121 °C, 15 min灭菌备用。	
用时用灭菌去离子水稀释至1×使用。	

A.3 溴化乙锭 (EB) 溶液 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

溴化乙锭	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

A.4 含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
1×TAE电泳缓冲液	加至100 mL

混合后加热至完全融化,待冷至50℃~55℃时,加溴化乙锭(EB)溶液5 μL,轻轻晃动摇匀,避免产生气泡,将梳子置入电泳槽中,然后将琼脂糖溶液倒入电泳板上,凝胶适宜厚度为3 mm~5 mm,需确认在梳齿下或梳齿间没有气泡,待凝固后取下梳子备用。

地方标准信息服务平台

附录 B
(规范性)
引物及探针序列

针对实验动物常见病原菌16sRNA或其他保守基因序列设计特异引物进行PCR扩增；普通PCR引物序列见表B.1，实时荧光PCR引物和探针序列见表B.2。

表B.1 普通 PCR 引物

病原菌	引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)	退火温 度(℃)
肺支原体 (<i>Mycoplasma pulmonis</i>)	Mpul-F	AGCGTTTGCTTCACTTTGAA	266	55
	Mpul-R	GGGCATTTCTCCCTAAGCT		
螺杆菌属 (<i>Helicobacter genus</i>)	H-F	CTATGACGGGTATCCGGC	780	55
	H-R	CTCAGACACGAGCTGAC		
肝螺杆菌 (<i>Helicobacter hepaticus</i>)	Hh-F	ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	705	55
	Hh-R	CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC		
胆汁螺杆菌 (<i>Helicobacter bilis</i>)	Hb-F	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	435	55
	Hb-R	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT		
啮齿类螺杆菌 (<i>Helicobacter rodentium</i>)	Hr-F	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	191	55
	Hr-R	TAGCCAGTTTGGCATTCC		
小家鼠螺杆菌 (<i>Helicobacter muridarum</i>)	Hm-F	ATGACAAAAAATATCTTTTCACAAAACATTCATTGGT	807	55
	Hm-R	TTTATTTTAGATTCCATTTAACTGCTAAATCATCAATAGT		
盲肠螺杆菌 (<i>Helicobacter typhlonius</i>)	Ht-F	AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGAGT	122	55
	Ht-R	ATTCATCGTGTGTAATGCGTCAA		
巴斯德杆菌属 (<i>Pasteurella genus</i>)	PastF	ATGGGAGTGGGTTGTACCA	165~170	58
	PastR	CAATCTGTGTGRACACTTRC		
Hey1 型嗜肺巴斯德杆菌 (<i>Pasteurella pneumotropica Hey1</i>)	PastF	ATGGGAGTGGGTTGTACCA	326	58
	Hey1R	TTGAGATACTTGCCCTTAC		
Jawetz 型嗜肺巴斯德杆菌 (<i>Pasteurella pneumotropica Jawetz</i>)	PastF	ATGGGAGTGGGTTGTACCA	451	58
	JawR	GGCATCCTAAAATACCCATCC		

表B.1 普通 PCR 引物 (续)

病原菌	引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
鼠放线杆菌 (<i>Actinobacillus muris</i>)	A. m-F	AAGCGGTCGGTTTTAGCTGT	255	58
	A. m-R	AAGCAGTTGGTT TTGGCTGT		
肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	SP-F	GGCTTAGAGGCTGTTCGT	701	58
	SP-R	ATCTCACCGTCTGTATAGA		
牛棒状杆菌 (<i>Corynebacterium bovis</i>)	CB-F	GGTGTGGGGATCTCCACGAT	223	55
	CB-R	ACCACCTGTGAACAAGCCCA		
鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	ST-F	TCGCACCGTCAAAGGAACCGTAAAGC	331	58
	ST-R	GCATTATCGATCAGTACCAGCCGTCT		
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Sau-F	GGATGGCTATCAGTAATGTTTCG	247	58
	Sau-R	TTAACCGTATCACCATCAATCG		
鼠棒状杆菌 (<i>Corynebacterium kutscheri</i>)	CK-F	GCAACGCGAAGAACCTTACC	200	58
	CK-R	CCC GG CAGCTCTCATGAGT		
绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Pseu-F	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	397	60
	Pseu-R	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT		
肺炎克雷伯杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	KP-F	TGGCCCGCGCCAGGGTTCGAAA	368	55
	KP-R	GATGTCGTCATCGTTGATGCCCAG		
肠出血性大肠埃希氏菌 0157: H7 (<i>Escherichia coli</i> 0157:H7)	0157-F	ATTGCGCTGAAGCCTTTG	499	55
	0157-R	CGAGTACATTGGCATCGTG		
伪欣氏鲍特杆菌 (<i>Bordetella pseudohinzii</i>)	Hinz-F	CGTTCGGTTGCCAGAAG	318	62
	Hinz-R	GCCTTCGGCGGTCTTGTGGTC		
支气管鲍特杆菌 (<i>Bordetella bronchiseptica</i>)	Fla-F	AGGCTCCAAGAGAGAAAGGCTT	237	58
	Fla-R	TGGCGCTGCCCTATC		
志贺氏菌 (<i>Shigella</i> spp.)	ipaH-F	CCTTGACCGCCTTTCGATAC	611	58
	ipaH-R	CAGCCACCCTCTGAGAGTACT		

表B.1 普通 PCR 引物 (续)

病原菌	引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
泰泽病原体 (Tyzzer organism)	TY-F	GTGCTAGGTGTTGGAAG	196	55
	TY-R	TACTTTACGTAGCCTGTCAA		
鸡毒支原体 (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>)	MG-F	AATGATGCGACTAAACCAA	408	55
	MG-R	TCCACCCACATACCCAA		
鸡滑液囊支原体 (<i>Mycoplasma Synoviae</i>)	MS-F	CGGTGATAACCCAACAGA	688	55
	MS-R	ACCCCTCCTTAATACGCT		

注：简并碱基Y: T/C, R: A/G。

表B.2 实时荧光 PCR 扩增引物和探针

病原菌	引物和探针名称	引物和探针序列 (5' → 3')
肺支原体 (<i>Mycoplasma pulmonis</i>)	Forward primer	GGAAATGCCCTAAGTATGACGG
	Reverse primer	CGGATAACGCTTGCACCCTA
	Probe	FAM-CCTTGTCAGAAAGCACCGGCTAACTATGTG -BHQ-1
肝螺杆菌 (<i>Helicobacter hepaticus</i>)	Forward primer	GGCAATATTAACCTTTGATATGG
	Reverse primer	TTGGCATTAAACCTTTG
	Probe	FAM - TGCTACTCCTGATATGATGGCTCTG-BHQ-1
胆汁螺杆菌 (<i>Helicobacter bilis</i>)	Forward primer	TACCACTGGAATGTAAAAGGCA
	Reverse primer	CTTCTTTTAGCGTTACATACGGAGT
	Probe	FAM - CCACAAGTCCATGCGGCAACAGAAG-BHQ-1
小家鼠螺杆菌 (<i>Helicobacter muridarum</i>)	Forward primer	GAGATGATGTTAGGGAGGGCTTGT
	Reverse primer	CCTCTTACAAATGAGTTGCCCA
	Probe	FAM-GGAACCACAGTTTGAGGGCAGAC-BHQ-1
啮齿类螺杆菌 (<i>Helicobacter rodentium</i>)	Forward primer	TTGTGAAATGGAGCAAATCTCAAAAAC
	Reverse primer	TAGCCAGTTTGGCATTCC
	Probe	FAM-TTGTA CTACCGCCGTCACCCAT-BHQ-1
盲肠螺杆菌 (<i>Helicobacter typhlonius</i>)	Forward primer	GAGAGAAGATTATGACGGTATC
	Reverse primer	CAGGATTTACATCTGACTTAC
	Probe	FAM-CTAACTCCGTGCCAGCAGCC-BHQ-1

注：探针也可选用具有与FAM、VIC、BHQ1和MGB荧光基团类似效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

参 考 文 献

- [1] GB/T 14926 实验动物微生物检测方法
 - [2] T/CALAS 20-2017 实验动物 牛棒状杆菌检测方法
 - [3] T/CALAS 24-2017 实验动物 螺杆菌PCR检测方法
 - [4] T/CALAS 40-2017 实验动物 肺支原体PCR检测方法
 - [5] T/CALAS 43-2017 实验动物 鼠放线杆菌检测方法
-

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台

广东省地方标准
实验动物 病原菌 PCR 定性分析
DB44/T 2337—2021

*

广东省标准化研究院组织印刷
广州市海珠区南田路 563 号 1304 室
邮政编码：510220
电话：020-84250337