

团 体 标 准

T/CVMA 274—2025

实验动物 鼠棒状杆菌荧光 PCR 检测方法

Laboratory animal-qPCR for detection of *Corynebacterium kutscheri*

2025-7-17 发布

2025-7-17 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提出。

本文件由中国兽医药学会归口。

本文件起草单位：江苏集萃药康生物科技股份有限公司、上海实验动物研究中心、苏州大学苏州医学院实验动物中心、苏州西山生物技术有限公司、广东省医学实验动物中心、广东药康生物科技有限公司。

本文件主要起草人：赵静、魏晓峰、周正宇、王晨娟、陈伟柱、王韬、杨慧欣、李灵恩、蔡利东、田苗苗、于灵芝、盛雅洁、王立刚、郑佳琳。

中国兽医协会
CVMA

实验动物 鼠棒状杆菌荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了实验动物鼠棒状杆菌的荧光PCR检测方法。
本文件适用于实验大鼠、小鼠的鼠棒状杆菌定性检测。

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 14926.42 实验动物 细菌学检测 标本采集
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件无需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHQ: 无荧光淬灭基团 (Black hole quencher)
DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)
EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid)
FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)
gyrB: 促旋酶 B 亚单位蛋白 (Gyrase subunit B)
PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline)
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

针对鼠棒状杆菌(*Corynebacterium kutscheri*, *C. kutscheri*)的 *gyrB* 保守基因靶点基因设计特异性引物和探针序列, 探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时, 报告基因发射的荧光信号被淬灭基团吸收, 不发荧光; PCR 扩增时, *Taq* 酶的 5'→3'外切酶将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭基团分离, 淬灭作用消失, 荧光信号产生并被检测仪器捕捉。随着 PCR 反应的循环进行, PCR 产物与荧光信号的增强呈对应关系。因此, 可以通过测定荧光信号强度分析样品中是否

含有鼠棒状杆菌核酸，以判断鼠棒状杆菌感染情况。

6 实验材料

6.1 试剂

6.1.1 除特殊说明外，本文件所用试剂均为分析纯；所用水应符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

6.1.2 DNA 提取试剂：细菌 DNA 提取试剂盒或其他等效产品。

6.1.3 实时荧光 PCR 试剂：商品化实时荧光 PCR 试剂盒或其他类似及等效产品。

6.1.4 无磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.02 mol/L , $\text{pH } 7.2$)，配制方法按附录 A。

6.2 引物与探针

针对鼠棒状杆菌的特异性靶点基因序列（按附录 B）设计特异性引物、探针，引物、探针序列见附录 C。

6.3 主要设备和耗材

6.3.1 电动匀浆仪。

6.3.2 0.5 mm 无菌氧化锆珠。

6.3.3 高速台式离心机（离心转速可达 13000 r/min ）。

6.3.4 涡旋振荡仪。

6.3.5 分析天平。

6.3.6 微量分光光度计。

6.3.7 高压蒸汽灭菌器。

6.3.8 冰箱 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

6.3.9 生物安全柜。

6.3.10 超净工作台。

6.3.11 实时荧光定量 PCR 仪。

6.3.12 微量移液器 ($100\text{ }\mu\text{L}$ ~ $1000\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{L}$ ~ $200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{L}$ ~ $20\text{ }\mu\text{L}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ~ $10\text{ }\mu\text{L}$)。

6.3.13 无核酸酶的离心管 (1.5 mL 、 2 mL 、 5 mL 、 15 mL)，无核酸酶的枪头 ($10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $200\text{ }\mu\text{L}$ 、 1 mL)，无核酸酶的 PCR 扩增反应管 (0.2 mL ，八连排或 96 孔板)。

6.3.14 采样工具：剪刀、镊子和无菌棉拭子等。

7 实验步骤

7.1 通则

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行；实验室生物安全要求按照 GB 19489 的规定执行。

7.2 样品的采集

按照 GB/T 14926.42 的方法，无菌采集实验动物呼吸道分泌物、肺脏组织，装入无菌容器中，编号备用。采样过程中避免样品间交叉污染。

7.3 DNA 提取

7.3.1 样品预处理

将采集的呼吸道分泌物棉拭子浸泡于 2 mL 无菌 PBS 溶液，静置 5 min ~ 10 min；涡旋振荡仪充分振荡混匀，编号备用。

取 0.2 g 左右的待检肺脏组织置于无菌研磨管中，加入 5 倍体积的无菌 PBS 溶液和 2 颗 ~ 3 颗无菌氧化锆珠，电动匀浆仪研磨 1 min ~ 2 min；吸取 200 μ L 左右的肺脏组织匀浆加入 1.5 mL 无菌离心管中，用于 DNA 提取或置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

7.3.2 核酸提取

使用细菌 DNA 提取试剂盒提取样本 DNA，提取方法严格按照选用试剂盒配套的说明书进行。

7.4 荧光 PCR 扩增

7.4.1 荧光 PCR 扩增反应体系

荧光 PCR 反应体系见表 1。反应液的配制需在冰上操作，每次反应需同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照以含鼠肺炎杆菌的样品所提核酸、鼠肺炎杆菌标准核酸或质粒标准品作为阳性对照模板，阴性对照以不含鼠肺炎杆菌 DNA 的核酸样品（含其他细菌 DNA）作为阴性对照模板，空白对照以无菌去离子水作为空白对照模板。

表1 荧光PCR扩增反应体系配置表

组分	剂量 (μ L)	终浓度
2 $\times$ TaqMan qPCR master mix	10.0	1 $\times$
上游引物 CK-F (10 μ mol/L)	0.8	400 nmol/L
下游引物 CK-R (10 μ mol/L)	0.8	400 nmol/L
荧光探针 CK-P (10 μ mol/L)	0.8	400 nmol/L
DNA 模板	2.0	/
去离子水	5.6	/
总体系	20.0	/

7.4.2 荧光 PCR 反应程序

荧光 PCR 扩增反应程序见表 2。

表 2 荧光 PCR 反应程序

反应温度 (°C)	反应时间	采集荧光信号	循环数
95	5 min	-	1
95	30 s	-	40
60	30 s	是	

注：可使用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判断结果。

7.5 结果判定

7.5.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果，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品扩增曲线的最高点为准。

7.5.2 质控标准

7.5.2.1 空白对照无 Ct 值，无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值 > 40。

7.5.2.2 阴性对照无 Ct 值，无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值 > 40。

7.5.2.3 阳性对照 Ct 值 ≤ 35，有标准“S”形荧光扩增曲线，则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行荧光 PCR 扩增。

7.5.3 结果判定

7.5.3.1 质控成立条件下，若待检样本无 Ct 值，无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值 > 40，则判定该样品 *C. kutscheri* 核酸阴性。

7.5.3.2 质控成立条件下，若待检样本有标准“S”形荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 时，则判断该样品 *C. kutscheri* 核酸阳性。

7.5.3.3 质控成立条件下，若待检样本 Ct 值在 35 ~ 40 之间，应重新进行荧光 PCR 检测。重新试验后，若 Ct 值 > 40，则判定该样品 *C. kutscheri* 核酸阴性；若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定该样品 *C. kutscheri* 核酸阳性。

附录 A
(规范性)
试剂配置

A.1 pH7.2, 0.02 mol/L PBS的配制

A.1.1 A 液的配制

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液: 称量磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g, 加入适量去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL, 混匀。

A.1.2 B 液的配制

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液: 称量磷酸氢二钠 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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), 先加入适量去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL。

A.1.3 pH7.2, 0.02 mol/L PBS 的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL, 加氯化钠 (NaCl) 8.5 g, 加 800 mL 无菌去离子水溶解稀释, 用 HCl 调节 pH 至 7.2, 最后定容至 1000 mL, 经 121 °C 高压灭菌 15 min, 冷却备用。

附录 B
(资料性)
阳性质粒序列

B.1 鼠棒状杆菌 *gyrB* 基因片段参考序列 (GenBank Accession No. CP011312.1)

5'-TTGCCTTTGCGCGGAAAGATCCTCAATGTGGAAAAAGCCCGCCTGGATAAGGTGCTAAAAA
ATGCCGAAGTACAGGCAATTATTACCGCGCTAGGCACGGGCATTACGATGAGTTGACATTAACA
AATTGCGCTATCACAAGATTGTGCTTATGGCCGATGCTGATGTTGACGGCCAGCACATTGCAACTTT
GTTGCTCACTTTGCTGTTAGATTATGCCGCAGTTGATTGAACAAGGCCATGTCTATTTGGCACAG
CCGCCCTATATAAGTTGAAGTGGCAGGGCAAAAATGTTGAGCCTGGCTTTGCTTATTCGGATGC
TGAACGTGATGAGCAGTTGGCGCAGGGTTTGGCTGAGGGACGCAAGATTAAACAAGACGATGGTA
TTCAGCGTTATAAGGGTCTTGGTGAATGAACGCTAGCGAGCTGTGGGAGACCACITTTGGATCC
TTCAATTCGTGTGCTACGCCGAGTTGATATGAACGATGCTCAACGTGCTGATGAGCTTTTATGATT
CTTATGGGTGATGACGTTGCGGCACGTCGTAGTTTATTACTCGTAAAGCTAAAGACGTTTCGTTTCT
TGGACGTATAA-3'

注：下划线部分为目标检测片段；加粗体为引物序列；斜体为探针序列。

附录 C
(规范性)
引物与探针序列

引物和探针名称及序列见表 C.1。

表 C.1 引物和探针的名称及序列

引物和探针名称	序列 (5'→3')	产物大小
CK-F	AGCCTGGCTTTGCTTATTCG	154 bp
CK-R	GGATCCAAAGTGGTCTCCCA	
CK-P	FAM-CCCTCAGCCAAACCCTGCGCC-BHQ-1	

注：探针也可选用具有与 FAM 和 BHQ-1 荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。