

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4741—2025

牛曼氏杆菌病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine mannheimiosis

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



目 次

前言 III

引言 IV

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 临床诊断 1

 5.1 流行病学 1

 5.2 临床症状 1

 5.3 病理变化 2

 5.4 结果判定 2

6 样品采集和保存 2

 6.1 试剂材料 2

 6.2 样品采集 2

 6.3 样品保存 2

7 细菌分离培养与鉴定 2

 7.1 仪器设备 2

 7.2 试剂材料 2

 7.3 分离培养与纯化 3

 7.4 菌落特征 3

 7.5 染色镜检 3

 7.6 生化鉴定 3

 7.7 结果判定 4

8 实时荧光定量 PCR 法 4

 8.1 仪器设备 4

 8.2 试剂材料 4

 8.3 样品处理 4

 8.4 试验方法 4

 8.5 结果判定 5

9 A1、A2、A6 血清型分型鉴定(多重 PCR 法) 5

 9.1 仪器设备 5

 9.2 试剂材料 5

 9.3 样品处理 6

 9.4 试验方法 6

 9.5 结果判定 6

10 综合判定 6

附录 A(规范性) 溶液和培养基的配制方法 7

附录 B(资料性) 菌落特征与染色镜检 8

附录 C(资料性) 实时荧光定量 PCR 阳性对照及引物和探针序列 10

附录 D(资料性) 实时荧光定量 PCR 检测判定图例 11

附录 E(资料性) 多重 PCR 分型检测阳性对照和引物序列 12

附录 F(资料性) 多重 PCR 分型检测判定电泳图例 14

参考文献 15

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：金宇保灵生物药品有限公司、中国兽医药品监察所、内蒙古农业大学、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心、内蒙古大学、内蒙古自治区质量和标准化研究院。

本文件主要起草人：韩四娥、金鹰、吴华伟、徐丽媛、朱良全、陈晓春、李化生、赵丽霞、杨波、徐晓静、郭宇、刘丹、孔冬妮、黄小洁、特木尔巴根、马立峰、牧仁、阿荣、王炜、张铎、刘月、宋鑫、云涛。



引 言

牛曼氏杆菌病(bovine mannheimiosis)是由溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)引起牛的一种呼吸道传染病,又称为“船运热”(shipping fever, SF),该病呈全球分布。溶血性曼氏杆菌为引起牛呼吸道疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)的主要细菌性病原,作为牛上呼吸道常在菌,在动物机体免疫力下降,受风寒、过度疲劳、饥饿、运输、断奶等应激条件下侵入下呼吸道引起发病,出现严重的纤维素性肺炎和化脓性肺炎。

根据荚膜抗原分型,溶血性曼氏杆菌分为 12 种血清型(A1、A2、A5、A6、A7、A8、A9、A12、A13、A14、A16 和 A17),其中流行较多的是 A1 型、A2 型、A6 型,A1 型和 A6 型常分离于患病牛的肺部,A2 型多分离于健康牛。本病可依据流行病学、临床症状、病理变化和组织样品瑞氏染色镜检结果作出初步诊断,通过细菌分离鉴定与实时荧光定量 PCR 进行确诊,进一步可应用多重 PCR 进行 A1、A2、A6 血清型的鉴定。

牛曼氏杆菌病诊断技术

1 范围

本文件描述了牛曼氏杆菌病的临床诊断和实验室诊断方法,包含样品采集、保存和处理,细菌分离培养与鉴定,实时荧光定量 PCR,以及溶血性曼氏杆菌 A1 型、A2 型、A6 型多重 PCR 分型检测技术。

本文件适用于牛曼氏杆菌病的诊断、监测和流行病学调查。

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 14926.43 实验动物细菌学检测染色法、培养基和试剂

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

本文件没有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。

BRDC:牛呼吸道疾病综合征(bovine respiratory disease complex)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

Mh:溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

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

SF:船运热(shipping fever)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(tris-acetic acid-EDTA buffer)

TSA:胰酪大豆胨琼脂培养基(tryptose soya agar)

TSB:胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 易感动物

主要易感动物是牛。不同品种、性别的牛均可感染,犊牛更易感。

5.1.2 流行特点

多呈地方流行或散发,通常没有明显的季节性。在长途运输、气温突变、断奶、更换饲料等诱因或应激因素存在时更易发病。

5.2 临床症状

5.2.1 病牛体温升高,可达 42℃,精神沉郁,采食量下降,流泪,口鼻有黏脓性分泌物,常伴随咳嗽。

5.2.2 发病初期呼吸频率加快,后期出现严重的呼吸困难,表现为张口呼吸。听诊有干性或湿性啰音,有时可听到摩擦音。

5.3 病理变化

5.3.1 剖检病理变化

可见出血性坏死性纤维素性肺炎、大叶性肺炎和胸膜肺炎。严重时,肺脏呈深红色、灰棕色,小叶间隔凝胶状增厚,出现广泛出血、化脓和坏死灶。

5.3.2 组织病理变化

肺小叶间质增宽,肺泡腔内有浆液、纤维素和中性粒细胞等。

5.4 结果判定

当牛出现 5.2 和 5.3 中部分或全部临床症状和病理变化时,可初步判定为牛曼氏杆菌病疑似病例。疑似病例应进一步按照 NY/T 541 的规定采集样品进行实验室检测。

6 样品采集和保存

6.1 试剂材料

6.1.1 PBS,按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

6.1.2 30%甘油磷酸盐缓冲液,按照 A.2 的规定配制。

6.1.3 无菌棉拭子。

6.1.4 无菌剪刀。

6.1.5 无菌镊子。

6.1.6 真空采血器(5 mL、10 mL,含 EDTA 抗凝剂)。

6.1.7 75%酒精棉球。

6.2 样品采集

6.2.1 鼻拭子样品采集

用无菌棉拭子在疑似病牛鼻腔内转动至少 3 圈,采集鼻腔分泌物,然后将棉拭子置于含有 1 mL PBS 或 30%甘油磷酸盐缓冲液的灭菌管中。

6.2.2 血液样品采集

使用 5 mL 或 10 mL 真空采血器(含 EDTA 抗凝剂),从病牛颈静脉或尾静脉采集血液 2 mL~5 mL。

6.2.3 组织样品采集

无菌采集病死牛组织样品,优先采集肺脏,其次采集肺门淋巴结、扁桃体、气管、脾脏等组织样品。用 75%酒精棉球擦拭消毒组织脏器表面,用无菌剪刀剪取病变明显组织,置于无菌密封容器中。

6.3 样品保存

采集的样品应密封保存,细菌分离样品于 2℃~8℃保存不超过 24 h。PCR 检测样品于-15℃以下保存不超过 2 个月,若需长期保存,应置于-80℃冰箱,但应避免反复冻融。

7 细菌分离培养与鉴定

7.1 仪器设备

7.1.1 二级生物安全柜。

7.1.2 台式低温高速离心机。

7.1.3 恒温培养箱(37℃)。

7.1.4 恒温振荡培养箱(37℃)。

7.1.5 普通光学显微镜。

7.1.6 微量可调移液器(20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL、1 000 μL~5 000 μL)。

7.2 试剂材料

7.2.1 10%绵羊脱纤血 TSA 平板培养基,按照 A.3 的规定配制。

- 7.2.2 4%血清 TSA 平板培养基,按照 A.4 的规定配制。
- 7.2.3 含 0.1%裂解绵羊血球全血 TSB 培养基,按照 A.5 的规定配制。
- 7.2.4 商品化革兰氏染色液和瑞氏染色液。
- 7.2.5 商品化微量生化鉴定管(乳糖、木糖、海藻糖、吲哚和脲酶)。
- 7.2.6 无菌试管。
- 7.2.7 细菌培养皿。
- 7.2.8 无菌注射器(1 mL、2 mL、5 mL)。
- 7.2.9 接种环。
- 7.2.10 涂布棒。
- 7.2.11 吸头。
- 7.2.12 75%酒精棉球。

7.3 分离培养与纯化

- 7.3.1 在生物安全柜内,用 75%酒精棉球擦拭病变组织表面,然后用接种环插入组织内取样,划线接种于 10%绵羊脱纤血 TSA 平板培养基,在 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 16 h~24 h。
- 7.3.2 挑取 7.3.1 平板上呈圆形并有溶血现象的单个菌落,划线接种于 10%绵羊脱纤血 TSA 平板培养基进行纯培养。
- 7.3.3 挑取 7.3.2 平板纯培养菌落,用于 7.4、7.5、7.6 鉴定。

7.4 菌落特征

- 7.4.1 挑取纯化的单个菌落,划线接种 10%绵羊脱纤血 TSA 平板培养基,在 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 16 h~24 h,呈现 β 溶血(见附录 B 中的 B.1)。
- 7.4.2 挑取纯化的单个菌落,接种 4%血清 TSA 平板培养基,在 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 16 h~24 h,眼观菌落呈圆形、灰白色、半透明、光滑型。菌落具有荧光性,将培养平板置于低倍显微镜 45°折光观察,可见菌落结构粗细不等,呈橘黄色,边缘有狭窄的红绿虹彩(见 B.2)。

7.5 染色镜检

7.5.1 组织样品染色镜检

7.5.1.1 瑞氏染色

将组织样品涂片(触片)后,滴加瑞氏染色 A 液 2 滴~3 滴,固定 1 min;再滴加瑞氏染色 B 液 2 滴~3 滴,将两液混合均匀,静置 3 min~5 min;水洗、待干燥后镜检,可见两极浓染的短杆菌或球杆菌(见 B.3)。

7.5.1.2 革兰氏染色

将组织样品涂片(触片)后,按 GB/T 14926.43 的规定进行涂片、染色和镜检,可见红色的革兰氏阴性短杆菌或球杆菌。

7.5.2 培养物染色镜检

7.5.2.1 瑞氏染色

取纯化的单个菌落,按 7.5.1.1 中瑞氏染色方法进行染色镜检,可见两极浓染的短杆菌或球杆菌。

7.5.2.2 革兰氏染色

取纯化的单个菌落,按 GB/T 14926.43 的规定进行涂片、染色和镜检,可见红色的革兰氏阴性短杆菌或球杆菌(见 B.4)。

7.6 生化鉴定

- 7.6.1 将纯化的 3 个~5 个菌落接种 10 mL~20 mL 的含 0.1%裂解绵羊血球全血 TSB 培养基,在 37℃ 恒温振荡培养箱中,120 r/min 振荡培养 8 h~16 h,取 50 μ L 菌液(培养菌液菌量达 1×10^8 CFU/mL 以上)接种微量生化鉴定管内,置于 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h~72 h,观察结果。
- 7.6.2 一般发酵乳糖,发酵木糖,不发酵海藻糖,靛基质和脲酶试验阴性,判为 Mh 生化鉴定阳性,否则判

为阴性。具体判定结果见表 1。

表 1 溶血性曼氏杆菌生化鉴定判定结果

生化试剂	乳糖	木糖	海藻糖	靛基质(吲哚)	脲酶
结果	±	+	—	—	—
注：“±”表示多数菌株阳性反应，少数菌株阴性反应；“+”表示阳性反应；“—”表示阴性反应。					

7.7 结果判定

- 7.7.1 病死牛组织样品瑞氏染色,可见两极浓染的短杆菌或球杆菌,判定为牛曼氏杆菌病疑似病例。
- 7.7.2 分离培养细菌符合 Mh 菌落特征、Mh 瑞氏染色或革兰氏染色特性,以及生化鉴定为阳性的,判定为 Mh 分离鉴定阳性,否则判定为阴性。

8 实时荧光定量 PCR 法

8.1 仪器设备

- 8.1.1 二级生物安全柜。
- 8.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.1.3 组织研磨仪或研钵。
- 8.1.4 涡旋混匀器。
- 8.1.5 实时荧光定量 PCR 仪。
- 8.1.6 微量可调移液器(1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

8.2 试剂材料

- 8.2.1 PBS。
- 8.2.2 无酶无菌带滤芯吸头。
- 8.2.3 PCR 扩增管。
- 8.2.4 商品化实时荧光定量 PCR 预混液。
- 8.2.5 商品化细菌 DNA 提取试剂盒。
- 8.2.6 阴性对照;DEPC 水。
- 8.2.7 阳性对照;灭活的 Mh 培养物提取 DNA 或含溶血性曼氏杆菌白细胞毒素基因(*lktA*)的质粒 DNA,质粒 DNA 制备方法与基因序列见附录 C 中的 C.1 和 C.2。
- 8.2.8 引物序列和探针见 C.3,加 DEPC 水配制成 100 μmol/L 的储存浓度和 10 μmol/L 工作浓度。

8.3 样品处理

8.3.1 鼻拭子样品

在 1 mL PBS 中反复挤压鼻拭子样品,使用涡旋混匀器充分涡旋振荡后,备用。

8.3.2 血液样品

直接使用。

8.3.3 组织样品

无菌剪取典型病变组织约 1 g,加入 5 mL PBS,于组织研磨仪或研钵中充分研磨成组织悬液,备用。

8.3.4 细菌培养物

- 8.3.4.1 取 7.6.1 培养菌液直接使用。
- 8.3.4.2 挑取 7.3.2 培养的单个菌落,加入 200 μL PBS 中,于涡旋混匀器中振荡混匀后使用。

8.4 试验方法

8.4.1 样品 DNA 提取

采用细菌 DNA 提取试剂盒或用自动化核酸提取仪,提取各类样品(鼻拭子、血液、组织、细菌培养物

等)中的细菌 DNA。

8.4.2 反应体系配制

按照表 2 配制实时荧光定量 PCR 反应体系,瞬时离心后,放入实时荧光定量 PCR 仪中进行实时荧光定量 PCR 反应,同时设阴性对照和阳性对照。

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系

组分	体积,μL
2×Universal TaqMan qPCR mix	12.5
上游引物(10 μmol/L)	0.5
下游引物(10 μmol/L)	0.5
探针(10 μmol/L)	0.75
模板 DNA	5
加 DEPC 水至	25

8.4.3 反应程序

95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火/延伸 30 s,共 45 个循环。每个循环的 60 ℃退火/延伸时收集荧光信号。

8.5 结果判定

8.5.1 试验成立条件

阴性对照无 C_t 值或 C_t 值>40 且未出现特异性扩增曲线,阳性对照 C_t 值≤35 且出现特异性扩增曲线(见附录 D),判为试验成立;否则,本次试验无效。

8.5.2 判定标准

被检样品 C_t 值≤38 且出现特异性扩增曲线,判定为 Mh 核酸阳性;被检样品无 C_t 值或 C_t 值>40,判定为 Mh 核酸阴性;被检样品 $38<C_t$ 值≤40 且出现特异性扩增曲线,判定为可疑,对可疑样品需重新提取基因组 DNA 复检。如复检结果为阳性或可疑,则判定为 Mh 核酸阳性;否则判定为阴性。

9 A1、A2、A6 血清型分型鉴定(多重 PCR 法)

9.1 仪器设备

- 9.1.1 二级生物安全柜。
- 9.1.2 台式低温高速离心机。
- 9.1.3 PCR 扩增仪。
- 9.1.4 涡旋混匀器。
- 9.1.5 电泳仪。
- 9.1.6 凝胶成像分析系统。
- 9.1.7 微量可调移液器(1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

9.2 试剂材料

- 9.2.1 无酶无菌带滤芯吸头。
- 9.2.2 PCR 扩增管。
- 9.2.3 商品化 PCR 预混液。
- 9.2.4 商品化细菌 DNA 提取试剂盒。
- 9.2.5 阴性对照:DEPC 水。
- 9.2.6 阳性对照:A1 型、A2 型、A6 型 Mh 阳性对照分别为带目的片段的重组质粒,制备方法与基因序列见附录 E 中的 E.1、E.2。
- 9.2.7 DNA 相对分子量标准物 DL 500 DNA Marker。
- 9.2.8 1×TAE 电泳缓冲液。

9.2.9 低熔点琼脂糖。

9.2.10 多重 PCR 分型引物见 E.3,加 DEPC 水配制成 100 μmol/L 的储存浓度和 10 μmol/L 工作浓度。

9.3 样品处理

同 8.3。

9.4 试验方法

9.4.1 样品 DNA 提取

同 8.4.1。

9.4.2 反应体系配制

按照表 3 配制多重 PCR 反应体系。

表 3 多重 PCR 反应体系

组分	体积,μL
Premix Taq™	25
A1-F(10 μmol/L)	1
A1-R(10 μmol/L)	1
A2-F(10 μmol/L)	1
A2-R(10 μmol/L)	1
A6-F(10 μmol/L)	1
A6-R(10 μmol/L)	1
模板 DNA	2
加 DEPC 水至	50

9.4.3 反应程序

95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃终延伸 5 min。

9.4.4 琼脂糖凝胶电泳

9.4.4.1 称取 2 g 琼脂糖,加入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液,加热溶解后,加入核酸染料,制备 2%的琼脂糖凝胶,室温下自然凝固。放入电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液,直至电泳液没过胶面。

9.4.4.2 将待检样品、阴性对照、阳性对照的 PCR 扩增产物各取 10 μL 点样于琼脂糖凝胶孔中进行电泳,同时设 DNA 分子量标准物 DL 500 DNA Marker。

9.4.4.3 按 120 V 电压电泳 40 min~50 min,通过凝胶成像分析系统观察结果,并做好记录,拍照保存。

9.5 结果判定

9.5.1 试验成立条件

若阴性对照没有出现扩增条带,A1 型、A2 型和 A6 型 Mh 阳性对照分别出现 305 bp、159 bp、77 bp 的扩增条带(见附录 F),则本次试验成立。

9.5.2 判定标准

被检样品出现 305 bp 的特异性扩增条带,判定为 A1 型 Mh 核酸阳性;被检样品出现 159 bp 的特异性扩增条带,判定为 A2 型 Mh 核酸阳性;被检样品出现 77 bp 的特异性扩增条带,判定为 A6 型 Mh 核酸阳性;被检样品未出现 305 bp、159 bp、77 bp 的特异性扩增条带,判定为 A1 型、A2 型和 A6 型 Mh 核酸阴性。

10 综合判定

发病或病死牛经 5.4 或 7.7.1 判定为疑似病例,经第 7 章细菌分离培养与鉴定、第 8 章实时荧光定量 PCR 任意一项鉴定为阳性的可判定为牛曼氏杆菌病确诊病例。确诊病例可按照第 9 章进行溶血性曼氏杆菌的 A1、A2、A6 血清型分型鉴定。

附 录 A

(规范性)

溶液和培养基的配制方法

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、0.24 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.65 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),加入 800 mL 纯化水中溶解,调节溶液的 pH 至 7.2~7.4,加纯化水定容至 1 000 mL。分装后,121 °C 灭菌 15 min~20 min,或过滤除菌,室温保存。

A.2 30%甘油磷酸盐缓冲液(pH 7.6)

取 30 mL 甘油、4.2 g 氯化钠(NaCl)、1.0 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.1 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、0.02%酚红 1.5 mL,加纯化水定容至 100 mL。溶解后,调节溶液的 pH 至 7.6,121 °C 高压灭菌 15 min,2 °C~8 °C 保存备用。

A.3 10%绵羊脱纤血 TSA 平板培养基

17.0 g 胰酪蛋白胨、3.0 g 大豆粉木瓜蛋白酶消化物(大豆胨)、15.0 g 琼脂粉、2.5 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、5.0 g 氯化钠(NaCl)、2.5 g 葡萄糖,加纯化水至 1 000 mL,充分混合,微热溶解,将培养基放至室温,调 pH 至 7.1~7.5,分装,121 °C 高压灭菌 30 min,冷却至 45 °C~50 °C 时,按照培养基体积 10% (V/V)加入绵羊脱纤血,充分混匀后倾倒平板备用。

A.4 4%血清 TSA 平板培养基

17.0 g 胰酪蛋白胨、3.0 g 大豆粉木瓜蛋白酶消化物(大豆胨)、15.0 g 琼脂粉、2.5 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、5.0 g 氯化钠(NaCl)、2.5 g 葡萄糖,加纯化水至 1 000 mL,充分混合,微热溶解,将培养基放至室温,调 pH 至 7.1~7.5,分装,121 °C 高压灭菌 30 min,冷却至 45 °C~50 °C 时,加入培养基体积 0.1% (V/V)裂解绵羊血球全血和 4% (V/V)新生牛血清,充分混匀后倾倒平板备用。

A.5 含 0.1%裂解绵羊血球全血 TSB 培养基

17.0 g 胰酪蛋白胨、3.0 g 大豆粉木瓜蛋白酶消化物(大豆胨)、2.5 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、5.0 g 氯化钠(NaCl)、2.5 g 葡萄糖,加纯化水至 1 000 mL,充分混合,微热溶解,将培养基放至室温,调 pH 至 7.1~7.5,分装,121 °C 高压灭菌 30 min,冷却至 45 °C~50 °C 时,加入培养基体积 0.1% (V/V)裂解绵羊血球全血。

附 录 B
(资料性)
菌落特征与染色镜检

B.1 Mh 溶血现象

见图 B.1。

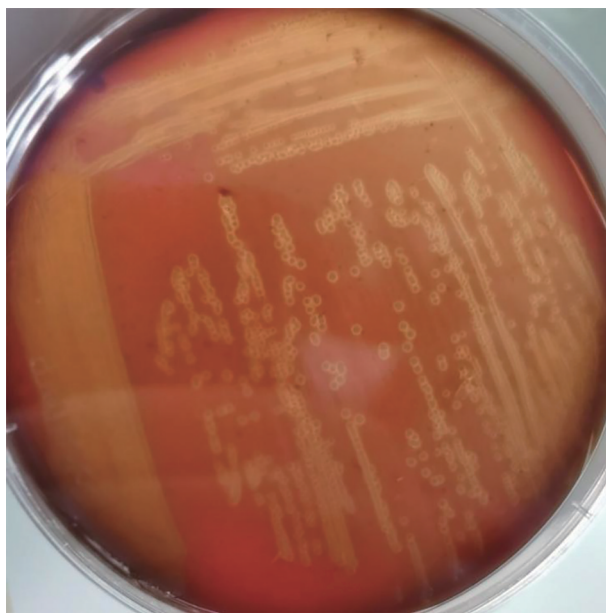


图 B.1 Mh 在 10% 绵羊脱纤血 TSA 平板培养 24 h 的 β 溶血现象

B.2 Mh 菌落荧光现象

见图 B.2。

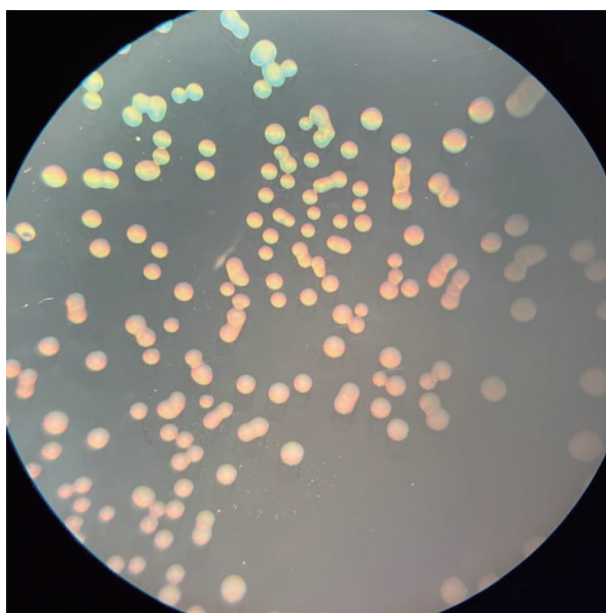


图 B.2 Mh 在 4% 血清 TSA 平板培养 24 h 于 45° 折光观察菌落荧光现象

B.3 Mh 瑞氏染色镜检形态

见图 B.3。

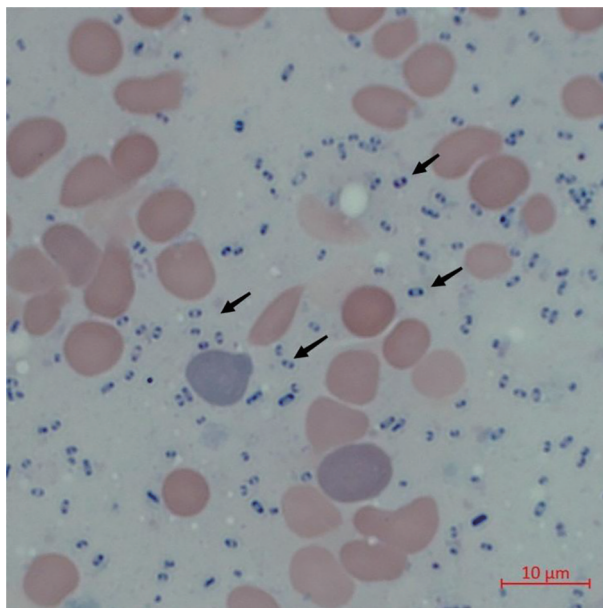


图 B.3 脾脏组织触片 Mh 瑞氏染色镜检形态图(箭头标注)

B.4 Mh 革兰氏染色镜检形态

见图 B.4。

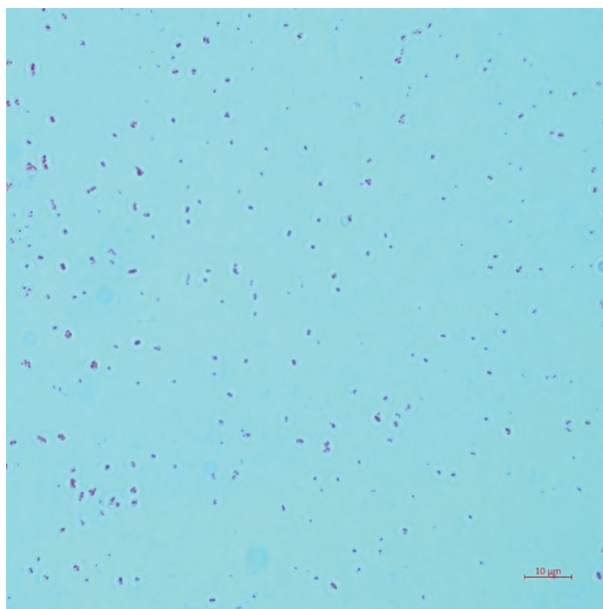


图 B.4 Mh 革兰氏染色镜检形态图

附 录 C

(资料性)

实时荧光定量 PCR 阳性对照及引物和探针序列

C.1 实时荧光定量 PCR 检测阳性对照的制备

将溶血性曼氏杆菌白细胞毒素基因(*lktA*)164 bp 目的片段连接 pMD19T 载体,再转化到 JM109 感受态细胞中,制备成重组大肠杆菌菌株,克隆培养后提取重组质粒。取适量质粒,使用超微量核酸蛋白仪测定浓度,按公式“ $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23} \text{ copies/mol} \times \text{浓度 ng}/\mu\text{L}) / (\text{DNA 碱基数} \times 6.60 \times 10^{11} \text{ ng/mol})$ ”计算质粒的拷贝数(copies),用 TE 缓冲液连续梯度稀释至 $1 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$,作为阳性对照,检验后定量分装。

C.2 实时荧光定量 PCR 扩增特异性片段基因序列

参考牛溶血性曼氏杆菌 PMM1007Ga-Greece2012 菌株(NCBI Reference Sequence: JQ423931) *lktA* 基因序列,设计荧光 PCR 引物探针,可扩增 164 bp 的目的片段,基因序列如下:

CCAAAGCCGTTTCTTCTTACATTTTAGCCCAACGTGTTGCAGCAGGTTTATCTTCAACCGGGC
CTGTGGCTGCTTTAATTGCTTCTACTGTTTCTCTTGCGATTAGCCCATTAGCATTTGCCGGTA
TTGCCGATAAATTTAATCATGCAAAAAGTTTAGAGAGC

C.3 实时荧光定量 PCR 引物和探针

C.3.1 Mh-上游引物:5'-CCA AAG CCG TTT CTT CTT ACA T-3';

C.3.2 Mh-下游引物:5'-GCT CTC TAA ACT TTT TGC ATG AT-3';

C.3.3 Mh-荧光探针:5'-(FAM)CCC AAC GTG TTG CAG CAG GTT TAT CTT C(BHQ1)-3'。

附 录 D
(资料性)
实时荧光定量 PCR 检测判定图例

图 D.1 为实时荧光定量 PCR 检测判定图例。

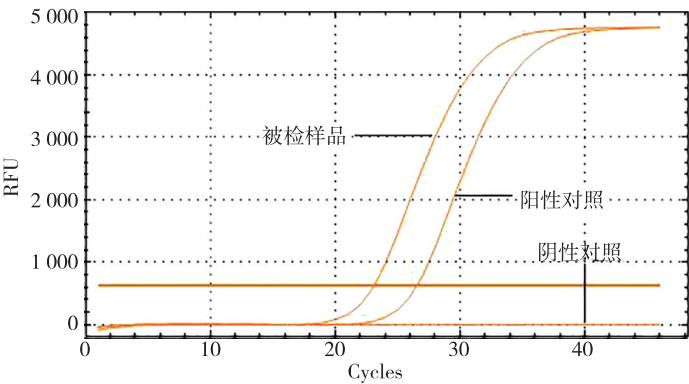


图 D.1 实时荧光定量 PCR 检测判定图例

附录 E

(资料性)

多重 PCR 分型检测阳性对照和引物序列

E.1 多重 PCR 分型检测阳性对照的制备

在血清 A1 型溶血性曼氏杆菌 USDA-ARS-USMARC-183 菌株 (NCBI Reference Sequence: NC_020833.1) *Hyp* 基因序列、血清 A2 型溶血性曼氏杆菌 D171 菌株 (NCBI Reference Sequence: NC_021738.1) *Core2* 基因序列、血清 A6 型溶血性曼氏杆菌 USDA-ARS-USMARC-185 菌株 (NCBI Reference Sequence: NC_020834.1) *TupA* 基因序列中,分别选取包含 A1 型、A2 型和 A6 型目的基因片段附近 420 个碱基进行基因合成。将合成的 A1 型、A2 型和 A6 型基因片段分别连接 pUC57 载体,转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,分别构建带 A1 型、A2 型和 A6 型目的基因的重组大肠杆菌,克隆培养后提取重组质粒。使用超微量核酸蛋白仪测定重组质粒浓度,按公式“copies/ μL = $(6.02 \times 10^{23} \text{ copies/mol} \times \text{浓度 ng}/\mu\text{L}) / (\text{DNA 碱基数} \times 6.60 \times 10^{11} \text{ ng/mol})$ ”计算质粒的拷贝数,再用 TE 缓冲液稀释至 1×10^7 copies/ μL ,作为 A1 型、A2 型和 A6 型 Mh 阳性对照,定量分装, -15°C 以下保存。

E.2 多重 PCR 分型检测阳性对照的基因序列

E.2.1 合成 A1 型 Mh 阳性对照 *Hyp* 基因序列

ATCAGATACCAAATAAAACAGCATT TTTAGCTAGCTATCAGTTGATCAACAGCGGATAATAT
CTCGGGAATCATTTTCCTTAGGTTTCAGCTGCATGACCTGATTTCATGAGAATACAAAATAA CTT
TTACATCTTTGCTCTGTTGTTCTCTCCAATGGGTCTTTTCTATTTCCGATAGATCTATCCCCCT
TTAACTCTAGGAATGGGAGGAAATGCCATTTATGATGAAATTCATCCTGAGTATTTTGAAT
ATACAAAATCTTTGATGTATTTTTCCTTAAGTAATACTAAAGCATTA AATTTCTCTTGATTA
GAAAGACTATCGTACTCTTCCGCATTAAAGTCAAAGCAAGCGTTTAAAAAGGCATTACGAT
GACTTGGTACATATTTTCATGATGTTGGTTTGTGGATTAATACAAACGGTAA

E.2.2 合成 A2 型 Mh 阳性对照 *Core2* 基因序列

CTATCATTTGCTATCTGGTGTTGATTTACCTCTAGTCAGCCAAGATACTATCCACCAATTCT
TTGATAAACATCAAGGTAAAGAATTCCTGACTATAGTTTCGAAAGAATCATTTGAAAGAAA
TAAAATTTATGATCGAGTCAGAATCCACTATTGGGCACCACATATTAGTGAACGAACTTTT
AGTAATAAGTTGATTGGTAAATTTTTTCAAAAATTTATCCGATCTTCAGAATTGTATATGA
AAAGAATATGTAGTGCAGATAAATTTAAACTTTTCGGTACGGCTTTAGGATATGCCTCACA
GTGGGTTAGCATTACAGATGAGCTAGTTACTATCCTGCTCGATGAAGAATTATGGATTAGA
GATGTTTTTTCTCATTCACTATTTTGTGATGAATTATTTATTCCTACAATTAT

E.2.3 合成 A6 型 Mh 阳性对照 *TupA* 基因序列

TCAAAAGAACTTTCTAATCATACTTGGCAAGTTGATGATAATTTCTTCACTAATAAAGGTG
TTTTTGTGGCGAAGAATTAGCTAAAGACATTACAAAATTATAGGAAACAAAGATGATAA
ATATAAATACAATTAAATACTCTGAAATTTTTTAATTTACGTTTAAAAAGAAAAGAAAAA
ATGTACCTTGGCATATCGTACCAAAAGATGGAACAAAGGCATTTTGTAAACAAATTGGTG C
TAGTGCTGTGCAAATTCTCAGGGAATTTCCAACCTTTATCTGACATAAATCTGAATAATCTGC
CAGATAGTTTTGTATTAAACCTGAAAATGGCCATT CAGATGGCGGGGTAATGCTTTTAA
GAAAATTGAGGATAACCTCTACTCTGAAGGGTTTACTAGAAAAGAATATAACTTC

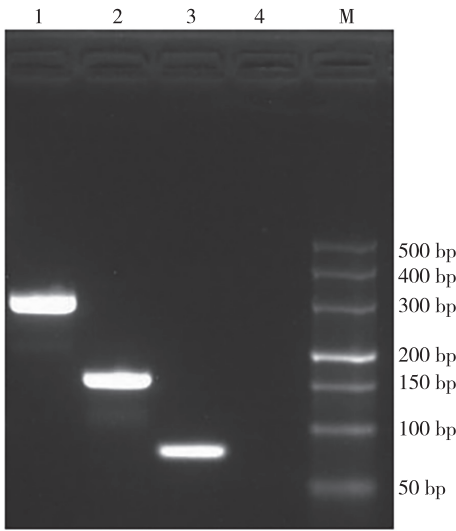
注: E.2.1~E.2.3 加粗位置为 PCR 扩增片段基因。

E.3 多重 PCR 分型检测引物

- E.3.1 A1-F:5'-CAT TTC CTT AGG TTC AGC-3';
- E.3.2 A1-R:5'-CAA GTC ATC GTA ATG CCT-3';
- E.3.3 A2-F:5'-GGC ATA TCC TAA AGC CGT-3';
- E.3.4 A2-R:5'-AGA ATC CAC TAT TGG GCA CC-3';
- E.3.5 A6-F:5'-TGA GAA TTT CGA CAG CAC T-3';
- E.3.6 A6-R:5'-ACC TTG GCA TAT CGT ACC-3'。

附 录 F
(资料性)
多重 PCR 分型检测判定电泳图例

图 F.1 为多重 PCR 分型检测判定电泳图例。



标引序号说明：
M——DL 500 DNA Marker；
1——A1 型 Mh 阳性对照，PCR 扩增片段为 305 bp；
2——A2 型 Mh 阳性对照，PCR 扩增片段为 159 bp；
3——A6 型 Mh 阳性对照，PCR 扩增片段为 77 bp；
4——阴性对照。

图 F.1 多重 PCR 分型检测判定电泳图例

参 考 文 献

- [1] Klima C L, Zaheer R, Briggs R E, et al. A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6[J]. Journal of Microbiological Methods. ,2017 (139):155-160
-