

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4030—2021

动物土拉杆菌病诊断技术

Diagnostic techniques for animal tularemia

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 临床诊断	1
4.1 流行特点	1
4.2 临床症状	1
4.3 病理变化	1
4.4 结果判定	1
5 革兰氏染色检查	2
5.1 材料准备	2
5.2 操作方法	2
5.3 结果判定	2
6 细菌分离	2
6.1 材料准备	2
6.2 样品准备	2
6.3 接种培养	3
6.4 生长特性	3
6.5 生化特性	3
6.6 结果判定	3
7 多重 PCR	3
7.1 材料准备	3
7.2 样品前处理	4
7.3 模板 DNA 制备	4
7.4 操作方法	4
7.5 结果判定	4
8 实时荧光 PCR	4
8.1 材料准备	4
8.2 样品前处理	5
8.3 模板 DNA 制备	5
8.4 操作方法	5
8.5 结果判定	5
9 ELISA	5
9.1 器材	5
9.2 试剂	5
9.3 操作方法	6
9.4 结果判定	6
10 综合判定	6
附录 A(资料性) 土拉杆菌病诊断方法的适用性	7
附录 B(资料性) 土拉杆菌病简介	8

附录 C(资料性) 试剂的配制	9
附录 D(资料性) PCR 扩增产物的参考序列	11

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：中国动物卫生与流行病学中心、河南农业大学、吉林农业大学。

本文件主要起草人：张喜悦、孙翔翔、孙明军、王君玮、曲志娜、刘俊辉、王娟、魏荣、魏战勇、高云航、马宏伟、赵永攀。



动物土拉杆菌病诊断技术

1 范围

本文件规定了土拉杆菌病临床诊断、革兰氏染色检查、细菌分离、多重 PCR、实时荧光 PCR 和 ELISA 等诊断技术的要求。

本文件适用于家兔、野兔、小型啮齿类动物、绵羊、牛、猪、狗、驼鹿和鸟类等动物土拉杆菌病的诊断。各种诊断方法的适用性见附录 A。

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）适用本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

土拉杆菌病 tularemia

由土拉杆菌 (*Francisella tularensis*) 引起的一种人兽共患病，土拉杆菌病的实验室检测工作应符合 GB 19489 的规定。土拉杆菌病的简介见附录 B。

4 临床诊断

4.1 流行特点

4.1.1 易感动物为兔（家兔和野兔）和啮齿类动物，尤其是田鼠、香鼠、松鼠和海狸鼠等小型啮齿动物最易感。A 型土拉杆菌对人和家兔具有极强的致病性，B 型土拉杆菌对人和家兔的致病性相对较小。多种哺乳动物、鸟类、两栖动物和无脊椎动物均可感染本病，但易感性相对较低。

4.1.2 呈零星散发或地方性流行，一年四季均能发病，但多见于春末夏初，即吸血昆虫活跃且非高温季节。

4.1.3 人类发病前多有接触野兔、食用兔肉等经历，或生活在自然疫源区（野生动物、家养动物和蜚、蝇、虱子和蚊子等吸血昆虫和节肢动物较多的地区）。

4.2 临床症状

动物感染土拉杆菌后主要表现为发热、沉郁等症状，通常会引发败血症。

4.3 病理变化

4.3.1 易感动物（如家兔、野兔及小型啮齿类动物）

常见急性死亡，剖检可见以肝、骨髓和脾发生不规则分布的灰白色坏死灶为特征的败血症。脾脏通常肿大，坏死灶大小不一，在有些病例中肉眼很难发现。肺脏通常充血、水肿，且可见器质性病变和纤维索性肺炎或胸膜炎。淋巴结可见干酪样坏死，腹腔、胸腔和四肢的淋巴结最常见。

4.3.2 易感性较低动物（如绵羊、牛、猪、狗、驼鹿或鸟类）

肺脏、心包膜、肾脏、脾脏和肝脏中可见结核样肉芽肿，病变中心多见单灶性或多灶性坏死，肉芽肿中多为巨噬细胞，偶尔见淋巴细胞、中性粒细胞、多核巨细胞和成纤维细胞。

4.4 结果判定

当动物符合 4.1 流行特点、出现 4.2 临床症状且具有 4.3 病理变化时，可判为临床诊断阳性。

5 革兰氏染色检查

5.1 材料准备

5.1.1 器材

5.1.1.1 显微镜。

5.1.1.2 酒精灯。

5.1.1.3 载玻片。

5.1.1.4 盖玻片。

5.1.2 试剂

5.1.2.1 3%盐酸酒精,配制方法见附录 C 中的 C.1。

5.1.2.2 结晶紫染色液,配制方法见 C.2。

5.1.2.3 革兰氏碘液,配制方法见 C.3。

5.1.2.4 沙黄复染液,配制方法见 C.4。

5.2 操作方法

5.2.1 涂片制备

肝、脾、骨髓、肾、肺等组织样品压片,渗出液、血液等液体样品直接涂片,细菌培养物直接涂片。

5.2.2 革兰氏染色

涂片自然干燥后用 3%盐酸酒精固定 5 min,水洗、干燥后作革兰氏染色镜检。滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。滴加 95%乙醇脱色 15 s~30 s,直至染液被洗掉。不要过分脱色。水洗。滴加沙黄复染液,复染 1 min,水洗。风干,镜检。

5.3 结果判定

5.3.1 阳性

发现革兰氏染色阴性,无芽孢、无鞭毛,大小为 $(0.7\sim 1)\mu\text{m}\times(0.2\sim 0.5)\mu\text{m}$,以椭圆形为主的多形态球杆菌,可判为土拉杆菌革兰氏染色检查阳性。

5.3.2 阴性

未出现 5.3.1 结果则判为土拉杆菌革兰氏染色检查阴性。

6 细菌分离

6.1 材料准备

6.1.1 器材

6.1.1.1 显微镜。

6.1.1.2 接种针。

6.1.1.3 普通培养箱(或二氧化碳培养箱)。

6.1.2 试剂

6.1.2.1 弗朗西斯培养基,配制方法见 C.5。

6.1.2.2 麦康凯和查平氏(McCoy Chapin)培养基,配制方法见 C.6。

6.1.2.3 改良 Thayer-Marin 琼脂,配制方法见 C.7。

6.1.2.4 胱氨酸牛心琼脂选择培养基,配制方法见 C.8。

6.2 样品准备

无菌采集患病动物的心血、肝、脾和骨髓,或者肺、心包膜、肾、肝、脾等处的土拉杆菌肉芽肿样品进行培养,以濒死动物的样品为最佳。

6.3 接种培养

无菌采集的样品接种于弗朗西斯培养基、麦康凯和查平氏(McCoy Chapin)培养基、改良 Thayer-Marin 琼脂,置于普通培养箱或二氧化碳培养箱(5%二氧化碳)37℃培养。污染样品可采用胱氨酸牛心琼脂选择培养基。

6.4 生长特性

土拉杆菌在弗朗西斯培养基和改良 Thayer-Martin 琼脂上生长良好,形成黏稠、乳白色、融合的菌落,在 McCoy Chapin 培养基上形成细小、凸起、圆形的透明菌落。土拉杆菌在普通培养基上不生长,但可在加入胱氨酸、半胱氨酸血液或卵黄的培养基中生长。样品培养 48 h 后取出,观察菌落形态,并作革兰氏染色。该菌不运动,无芽孢,两极着色,培养 24 h 后菌体形态均匀一致,老龄培养菌则具多形性。

6.5 生化特性

过氧化物酶试验阴性,过氧化氢酶试验弱阳性,生长需要半胱氨酸,可与土拉杆菌高免血清发生显著凝集反应。

6.6 结果判定

分离培养物最多培养 3 周,对疑似菌落进行鉴定。革兰氏染色阳性、细菌形态与土拉杆菌相似,且符合 6.4 和 6.5 的,判定为土拉杆菌细菌分离阳性;否则,判定为土拉杆菌细菌分离阴性。

7 多重 PCR

7.1 材料准备

7.1.1 器材

- 7.1.1.1 PCR 扩增仪。
- 7.1.1.2 生物安全柜(Ⅱ级或Ⅲ级)。
- 7.1.1.3 凝胶成像系统。
- 7.1.1.4 消毒灭菌锅。
- 7.1.1.5 制冰机。
- 7.1.1.6 核酸蛋白分析仪。
- 7.1.1.7 高速冷冻离心机。
- 7.1.1.8 台式小型离心机。
- 7.1.1.9 PCR 反应管。
- 7.1.1.10 灭菌采样器。
- 7.1.1.11 微量加样器。

7.1.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 7.1.2.1 实验用水(应符合 GB/T 6682 中一级水的规定)。
- 7.1.2.2 DNA 提取试剂盒。
- 7.1.2.3 PCR 反应预混合液(2×Buffer,含 *Taq* 酶、dNTPs 及氯化镁)。
- 7.1.2.4 DNA 相对分子量标准物 Marker DL2 000 bp ladder。
- 7.1.2.5 电泳试剂
 - 7.1.2.5.1 电泳缓冲液,配制方法见 C.9。
 - 7.1.2.5.2 上样缓冲液,配制方法见 C.10。
 - 7.1.2.5.3 溴化乙锭,应用方法见 C.11。
- 7.1.2.6 土拉杆菌标准菌株或其 DNA。
- 7.1.2.7 PCR 引物。商业合成的引物。

TUL4-435:5'-GCT GTA TCA TCA TTT AAT AAA CTG CTG-3';

TUL4-863:5'-TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT-3';

FtC1:5'-TCC GGT TGG ATA GGT FTT GGA TT-3';

FtC4:5'-GCG CGG ATA ATT TAA ATT TCT CAT A-3'。

合成的引物使用分析实验室用水配成 20 $\mu\text{mol/L}$ 。分析实验室用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

7.2 样品前处理

7.2.1 组织等固体状样品加入少量生理盐水后,充分匀浆,制成 10%~20%(质量浓度)的悬浮液备用。

7.2.2 液体样品充分混匀后直接取用。

7.2.3 样品的细菌分离培养液充分混匀后,取 1 mL 加到 1.5 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,加入 200 μL 生理盐水,充分悬浮后备用。

7.3 模板 DNA 制备

7.3.1 样品模板 DNA 的制备

可使用商品化细菌 DNA 提取试剂盒,按照其使用说明操作。

7.3.2 细菌模板 DNA 的制备

用一次性器具从分离平板上挑取 5 个菌落,转入盛有 30 μL 灭菌超纯水的离心管中,煮沸 5 min,冰浴 5 min,13 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液备用。

7.3.3 对照设立

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照与空白对照。阳性对照为土拉杆菌标准菌株 DNA,阴性对照为没有交叉反应的非阳性菌株,空白对照为无菌水。

7.4 操作方法

7.4.1 反应体系

50 μL 反应量,分别为 2 \times Buffer 25 μL 、引物 TUL4-435、TUL4-863、FtC1 和 FtC4(20 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、水 19 μL 和样品 2 μL 。

7.4.2 程序

经 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 的初变性,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 的 40 个循环,经 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 延伸。

7.4.3 电泳分析

称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 电泳缓冲液加热溶解,加入溴化乙锭浓溶液至终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ (或采用其他等效核酸染料),制胶,PCR 扩增产物与适量加样缓冲液混合,点样,同时加 Marker、阴性对照和阳性对照,5 V/cm 电压电泳 30 min~40 min,凝胶成像系统观察并记录结果。

7.5 结果判定

7.5.1 所有对照均成立(阳性对照扩增适合片段,阴性对照和空白对照无扩增),可判定结果。

7.5.2 所有 408 bp 扩增者,判为土拉杆菌核酸阳性;既有 408 bp 扩增,又有 181 bp 扩增,判为 A 型土拉杆菌核酸阳性;既有 408 bp 扩增,又有 151 bp 扩增,判为 B 型土拉杆菌核酸阳性。扩增片段的序列见附录 D。

7.5.3 没有 408 bp 扩增者,判为土拉杆菌核酸阴性。

8 实时荧光 PCR

8.1 材料准备

8.1.1 器材

8.1.1.1 荧光 PCR 检测仪。

8.1.1.2 生物安全柜(Ⅱ级或Ⅲ级)。

8.1.1.3 消毒灭菌锅。

- 8.1.1.4 制冰机。
- 8.1.1.5 高速冷冻离心机。
- 8.1.1.6 台式小型离心机。
- 8.1.1.7 1.5 mL 离心管。
- 8.1.1.8 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。
- 8.1.1.9 灭菌采样器。
- 8.1.1.10 微量加样器。

8.1.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

8.1.2.1 实验用水

应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

8.1.2.2 PCR 反应预混合液

2×Buffer,含 *Taq* 酶、dNTPs 及氯化镁。

8.1.2.3 DNA 提取试剂盒

8.1.2.4 土拉杆菌标准菌株或其 DNA

8.1.2.5 PCR 引物。商业合成的引物及探针。

Ft 上游引物:5'-ATT ACA ATG GCA GGC TCC AGA-3';

Ft 下游引物:5'-TGC CCA AGT TTT ATC GTT CTT CT-3';

Ft 探针:5'-FAM-TTC TAA GTG CCA TGA TAC AAG CTT CCC AAT TAC TAA G-BHQ -3'。

8.2 样品前处理

同 7.2。

8.3 模板 DNA 制备

同 7.3。

8.4 操作方法

8.4.1 反应体系

20 μL 反应体系,分别为:2×Buffer 10 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL、探针(10 μmol/L) 0.8 μL、水 6.2 μL 和样品 1 μL。

8.4.2 反应程序

反应程序为:经 50 °C 2 min 的去污染、95 °C 2 min 的初变性,经 95 °C 15 s、60 °C 30 s 的 45 个循环。

8.5 结果判定

8.5.1 质量控制:读取每个样品 C_t 值。标准阳性对照有特异性扩增曲线且 C_t 值 \leq 30,标准阴性对照和空白对照无特异性扩增曲线,说明质控合格;否则,本次实验无效,需重新进行。

8.5.2 被检样品有特异性扩增曲线,而且 C_t 值 \leq 35,判定为土拉杆菌核酸阳性;35 $<$ C_t 值 \leq 40,判为可疑,可疑结果需重新进行实验,仍为可疑的判为阳性。

8.5.3 被检样品无特异性扩增曲线,或 C_t 值 $>$ 40,判定为土拉杆菌核酸阴性。

9 ELISA

9.1 器材

- 9.1.1 酶标仪。
- 9.1.2 恒温箱。
- 9.1.3 加样器。

9.2 试剂

9.2.1 抗原包被板。

9.2.2 酶标抗原。

9.2.3 阳性对照血清。

9.2.4 阴性对照血清。

9.2.5 样品稀释液。

9.2.6 洗涤液。

9.2.7 底物溶液 A。

9.2.8 底物溶液 B。

9.2.9 终止液。

注:上述试剂应于 2℃~8℃ 保存,使用前恢复至室温(18℃~26℃),也可采用商品化 ELISA 试剂盒,按照试剂盒说明书进行操作并判定结果。

9.3 操作方法

9.3.1 将抗原包被板平衡至室温,每孔加入 40 μL 样品稀释液,再加入待测血清 10 μL,混匀后 37℃ 作用 30 min,用洗涤液洗涤 5 遍。

9.3.2 加入酶标抗原 50 μL,37℃ 作用 30 min,再次洗涤 5 遍。

9.3.3 加入显色剂 A 50 μL 和显色液 B 50 μL,37℃ 避光显色 15 min。

9.3.4 加入终止液 50 μL,用 450 nm 波长测量各孔的吸光度值(OD 值)。

9.4 结果判定

9.4.1 在对照成立的情况下(阳性对照 OD₄₅₀ 值 ≥ 1.0,阴性对照 OD₄₅₀ 值 ≤ 0.2),样品 OD₄₅₀ 值 ≥ (阴性对照 OD₄₅₀ 值 + 0.15) 时判为阳性。

9.4.2 在对照成立的情况下(阳性对照 OD₄₅₀ 值 ≥ 1.0,阴性对照 OD₄₅₀ 值 ≤ 0.2),样品 OD₄₅₀ 值 < (阴性对照 OD₄₅₀ 值 + 0.15) 时判为阴性。

10 综合判定

10.1 4.4、5.3 任一为阳性,且经 6.6 或 7.5 或 8.5 判定为阳性的,可诊断为土拉杆菌病。

10.2 4.4、5.3 任一为阳性,且经 9.4 判定为阳性的,可诊断为土拉杆菌病。

10.3 动物未见症状但急性死亡,且经 6.6 或 7.5 或 8.5 判定为阳性的,可诊断为土拉杆菌病。

附 录 A
(资料性)
土拉杆菌病诊断方法的适用性

土拉杆菌病各种诊断方法的适用性见表 A.1。

表 A.1 土拉杆菌病诊断方法的适用性

方法	土拉杆菌病 清净群的监测	调运前土拉杆菌病 阴性个体的复核	根除运动中 的监测	临床病例 的确诊	流行率的调查	免疫后个体或群体 免疫状态的监测
病原鉴定						
细菌分离	—	—	—	+++	—	n/a
抗原检测	—	—	—	+++	—	n/a
实时荧光 PCR	+++	—	—	+++	+++	n/a
免疫反应的检测						
ELISA	++	+++	++	++	+++	n/a
注：+++为推荐的方法；++为合适的方法；+为在一些情况下可以使用，但费用、可靠性和其他因素严重限制了其应用；—为不适用于该目的；n/a为不可用。虽然并非所有标注+++或++类别的试验都经过了正式的验证，但它们的常规特性和它们已经被广泛应用且没有可质疑结果的事实使这些试验被接受。						

附录 B
(资料性)
土拉杆菌病简介

土拉杆菌病是由土拉杆菌(*Francisella tularensis*)引起的一种人兽共患病。在自然条件下,该病发生于兔(家兔和野兔)和啮齿类动物,尤其是田鼠、香鼠、松鼠和海狸鼠等小型啮齿类动物,也有其他多种哺乳动物、鸟类、两栖动物和无脊椎动物感染的报道。吸血节肢动物对自然环境中土拉杆菌的生存和疾病传播起着重要作用。

土拉杆菌为革兰氏阴性球杆菌,大小为 $(0.2\sim 0.5)\mu\text{m}$,无运动力,不形成芽孢,专性需氧,最适生长温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。根据培养特性、流行病学特征和毒力,可将土拉杆菌分为土拉热型(A型)和全北区型(B型)。A型土拉杆菌与北美地区的兔类发病有关,主要通过蜱、蝇的叮咬或直接接触感染动物传播,对人和家兔具有极强的致病性,大部分分离株能发酵甘油。B型土拉杆菌主要发生于水生啮齿动物(海狸、麝鼠)、北美的野鼠及欧亚大陆的兔类(野兔)和啮齿类动物,主要通过直接接触或节肢动物(主要是虱子和蚊子)传播,也可通过呼吸道或消化道传播,对人和家兔的致病性较小,且不发酵甘油。

土拉杆菌病以发热、沉郁和通常引起败血症为特征。人感染后会在感染部位出现溃疡或脓肿(动物上则很少见),局部淋巴结肿大。死后剖检可见淋巴结有干酪样坏死,脾脏、肝脏、肺脏、心包、肾脏和其他脏器有浅灰白色坏死灶,败血症病例中脾脏明显肿大。

土拉杆菌极易感染人,在我国卫生健康委员会制定的人间传染的病原微生物名录中属于第二类细菌,活菌操作和动物试验均需在生物安全三级实验室进行,样品检测需在生物安全二级实验室中进行,运输包装需遵守 UN 2814 中的规定。土拉杆菌病的实验室检测工作应符合 GB 19489 的规定,田间采集病料时要采取特别防护措施。

附录 C
(资料性)
试剂的配制

C.1 3% 盐酸酒精

取浓盐酸 3 mL,加入 95%乙醇 97 mL,混合均匀。

C.2 结晶紫染色液

取 1 g 结晶紫溶于 20 mL 95%乙醇中,然后与 80 mL 1%的草酸铵水溶液混合。

C.3 革兰氏碘液

将 1 g 碘与 2 g 碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

C.4 沙黄复染液

将 0.25 g 沙黄溶解于 10 mL 95%乙醇中,然后加入 90 mL 蒸馏水。

C.5 弗朗西斯培养基

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.5 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	2.0 g
蒸馏水	100.0 mL
胱氨酸(或半胱氨酸)	0.1 g
葡萄糖	1.0 g
兔、马或人的脱纤血	10.0 mL

pH 7.2~7.4

先将胱氨酸(或半胱氨酸)用少量蒸馏水溶解,并加入少量 NaOH 溶液助溶,待胱氨酸(或半胱氨酸)充分溶解后,加入以上除新鲜脱纤血以外的其他成分,加热溶化,调节 pH,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到 50 °C,以无菌操作加入新鲜脱纤血,摇匀,倾注平板。配置好的培养基可于 4 °C 保存至 8 d~10 d。

也可用商品化的蛋白胨琼脂培养基,按照说明书的要求配制后,加入 0.1%胱氨酸(或半胱氨酸)和 1%葡萄糖,加热溶化,调节 pH,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到 50 °C,以无菌操作加入新鲜脱纤兔、马或人血,摇匀,倾注平板。

C.6 McCoy Chapin 培养基

鸡蛋黄	60 g
生理盐水	40 mL

以无菌操作,采取新鲜蛋黄 60 g,加入生理盐水 40 mL,充分混匀,倾注平板或分装试管,加热至 75 °C 使其凝固(约 1 h)即可。必要时,可在使用前做无菌检测。配制好的培养基可于 4 °C 保存至 8 d~10 d。

C.7 改良 Thayer-Marin 琼脂

特殊蛋白胨	15.0 g
玉米淀粉	1.0 g

磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	10.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
胱氨酸(或半胱氨酸)	1.0 g
葡萄糖	10.0 g
血红蛋白	10.0 g
IsoVitalex 增补液	10.0 mL
pH 7.2~7.4	

先将胱氨酸(或半胱氨酸)用少量蒸馏水溶解,并加入少量 NaOH 溶液助溶,待胱氨酸(或半胱氨酸)充分溶解后,加入以上除血红蛋白和 IsoVitalex 增补液以外的其他成分,加热溶化,调节 pH,121 °C 高压灭菌 15 min(即为 GCA 培养基),冷却到 50 °C,以无菌操作加入血红蛋白和 IsoVitalex 增补液,摇匀,倾注平板。其中血红蛋白可用少量蒸馏水溶解,用无菌滤器过滤除菌后使用。配制好的培养基可于 4 °C 保存至 8 d~10 d。也可用商品化的 G₊ 基础培养基(配方中的前 7 种成分),按照说明书的要求配制后,加入 0.1% 胱氨酸(或半胱氨酸)和 1% 葡萄糖,加热溶化,调节 pH,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到 50 °C,无菌操作加入血红蛋白和 IsoVitalex 增补液,摇匀,倾注平板。

C.8 胱氨酸牛心琼脂选择培养基

牛心浸粉	10.0 g
胨蛋白胨	10.0 g
右旋葡萄糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
L-胱氨酸	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

将 51 g 粉末加入 1 000 mL 蒸馏水中,彻底混匀。加热至煮沸、搅拌,使粉末完全溶解。121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到 50 °C,以无菌操作加入 7.5 mg 黏菌素、2.5 mg 两性霉素、0.5 mg 林可霉素、4 mg 甲氧苄氨嘧啶和 10 mg 氨基青霉素。摇匀,倾注平板。也可用商品化的胱氨酸牛心琼脂培养基,按照说明书的要求配制后,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到 50 °C,以无菌操作加入 7.5 mg 黏菌素、2.5 mg 两性霉素、0.5 mg 林可霉素、4 mg 甲氧苄氨嘧啶和 10 mg 氨基青霉素。摇匀,倾注平板。

C.9 电泳缓冲液(1×TBE 或 1×TAE)

Tris 54.0 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)20.0 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,充分溶解后即 5×TBE,4 °C 保存备用;使用前用蒸馏水做 5 倍稀释后使用(即为 1×TBE)。

Tris 242.0 g,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)100.0 mL,冰乙酸 57.1 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,充分溶解后即 50×TAE,4 °C 保存备用;使用前用蒸馏水做 50 倍稀释后使用(即为 1×TAE)。

C.10 上样缓冲液(6×)

0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲苯青 FF,40% 蔗糖;4 °C 保存备用。也可使用商品化的核酸凝胶电泳上样缓冲液,按照说明书要求进行操作。

C.11 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)

溴化乙锭 0.1 g,蒸馏水 10.0 mL,充分溶解后即 10 mg/mL 溴化乙锭溶液。也可使用商品化的溴化乙锭溶液或其他等效商品化的核酸电泳染料,按照说明书要求进行操作。

附录 D
(资料性)
PCR 扩增产物的参考序列

D.1 土拉杆菌 PCR 扩增产物参考序列

GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTGTTTATTTTATTTTAATTAATGTTATAATCGA
TTTGAGTATATGTGAATATTTAAAAATAGGAGTATCTATATGAAAAAATAATTGAGCTT
AGTCTTTTATCTTTATCAATCGCAGGTTTAGCGAGCTGTTCTACTCTAGGGTTAGGTGGCTC
TGATGATGCAAAAGCTTCAGCTAAAGATACTGCTGCTGCTCAGACAGCTACTACTGAGCAAG
CTGCTGCTGTATCTAAGCCAAGTCAAAAGTAAGTTTAAATAAACTTGGTCAGGATAAAAT
AAAAGCAACTGTATATACAACATAACAATAATAACCCACAAGGAAGTGTAAGATTACAATGG
CAGGCTCCAGAAGGTTCTAAGTGCCATGATACAAGCTTCCCAA

D.2 A 型土拉杆菌 PCR 扩增产物参考序列

TCCGTTGGATAGGTGTTGGATTTTCATATCCTAGTTTAATAACAGTATCTACAATATC
TTGATTCAGCCCAAGCTGACTAAAATCTTTTTTAGTTTCAGAATTCATTTTTGTCCGTAAAT
TTTTGTATGAGAAATTTATTAATAATTTGAAAATTATGAGAAATTTAAATTATCCGCGC

D.3 B 型土拉杆菌 PCR 扩增产物参考序列

GCGCGGATAATTTAAATTTCTCATACAAAAATTTACGGACAAAAATGAATTCTGAAAC
TAAAAAAGATTTTAGTCAGCTTGGGCTGAATCAAGATATTGTAGATACTGTTATTAACCTA
GGATATGAA AATCCAACACCTATCCAACCGGA

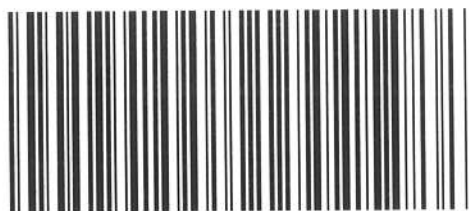
中华人民共和国
农业行业标准
动物土拉杆菌病诊断技术
NY/T 4030—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 25 千字
2022年4月第1版 2022年4月北京第1次印刷
书号: 16109·8928
定价: 40.00 元



NY/T 4030—2021

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261