



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2839—2015

致仔猪黄痢大肠杆菌分离鉴定技术

Isolation and Identification of *Escherichia coli* Causing Piglet's
Yellow Dysentery

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国动物卫生与流行病学中心、扬州大学、青岛易邦生物工程有限公司。

本标准主要起草人:陈义平、郭玉广、南文龙、高崧、成大荣、杜元钊、高清清、马爽、程增青。

引 言

仔猪黄痢是由致病性大肠杆菌引起的以初生仔猪下痢为特征的传染病。该病主要引起 7 日龄以内的仔猪发病,特征是排出黄色水样粪便以及渐进性死亡,病死率达 30%以上,甚至全窝死亡,是影响仔猪成活率的主要疾病之一。根据仔猪的发病日龄和临床症状可以初步做出诊断,但是确诊则需要对致病菌株进行分离鉴定。因此,进行致仔猪黄痢大肠杆菌的分离鉴定,对仔猪黄痢的防治具有重要意义。

本标准制定了致仔猪黄痢大肠杆菌的病料采集、病原菌分离及鉴定方法。

致仔猪黄痢大肠杆菌分离鉴定技术

1 范围

本标准规定了致仔猪黄痢大肠杆菌分离鉴定的操作程序和判定标准。

本标准适用于致仔猪黄痢大肠杆菌的分离鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 4789.38—2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠埃希氏菌计数

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

SN/T 0169—2010 进出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检测方法

中华人民共和国农业部公告〔2003〕第302号 兽医实验室生物安全技术管理规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件:

V-P:乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer reaction

PCR:聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction

PBS:磷酸盐缓冲液 Phosphate buffer saline

SPF:无特定病原微生物 Specefic pathogen free

DMEM:培养基 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium

PEG:聚乙二醇 Polyethyleneglycol

HAT:含黄嘌呤(hypoxantin)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidin)的 DMEM

HT:含黄嘌呤(hypoxantin)和胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidin)的 DMEM

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸 deoxyribonucleoside triphosphates

bp:碱基对 base pair

TBE:Tris-硼酸电泳缓冲液

r/min:转/分钟 rotations per minute

min:分钟 minute

h:小时 hour

4 试剂

4.1 麦康凯、大豆胨琼脂、Minca、Slanetz 等培养基:制备参见附录 A。

4.2 葡萄糖发酵、吡啶、甲基红、V-P、枸橼酸盐利用等生化试验管:制备参见附录 B。

4.3 兔抗 K88、K99、987P、F41 菌毛阳性血清及阴性对照兔血清:制备参见附录 C。

4.4 K88、K99、987P、F41 菌毛特异性单克隆抗体及阴性对照鼠血清:制备参见附录 D。

5 器材

超净工作台、恒温培养箱、酒精灯、接种环、手术刀、玻璃板或载玻片、微量移液器(10 μ L、20 μ L、

200 μL 、1 000 μL)。

6 病料样品的处理

6.1 病料样品采集:仔猪黄痢多发于7日龄以内仔猪,发病仔猪不愿吃奶,拉黄痢,多呈黄色水样,内含凝乳小片,后肢常被粪液。发病严重的仔猪很快消瘦,最后衰竭死亡。胃肠呈卡他性炎症,病变主要表现为胃黏膜红肿,肠黏膜肿胀、充血或出血,肠系膜淋巴结肿大。

采集疑似病例的肛拭子或肠道(十二指肠、空肠、回肠)作为细菌分离用病料。

6.2 病料样品的存放与运送:病料样品置2℃~8℃条件下保存,并在3 d内进行细菌分离。如果超过3 d,应置含10%甘油的0.01 mol/L pH7.4 PBS中,-15℃以下暂时保存,并尽快进行细菌分离。运输时确保低温运送,并及时送达,以防样品腐败。按照中华人民共和国农业部公告〔2003〕第302号的规定进行样品的生物安全标识。

7 致仔猪黄痢大肠杆菌的分离鉴定方法

7.1 细菌分离与纯化:将肠道病料置超净工作台中,固定,手术刀片火焰灼烧后,烙烫肠道浆膜层消毒,无菌打开肠腔,接种环灼烧消毒,冷却后伸入肠道,刮取病变部位肠道黏膜,划线接种于麦康凯培养基。或取肛拭子直接接种于麦康凯培养基。37℃培养18 h~24 h,挑取疑似菌落(菌落呈鲜红色或粉红色,极少数呈无色,中等大小,1.0 mm~2.5 mm,圆形,边缘整齐,表面光滑),纯化后进行以下试验。

7.2 生化特性鉴定:取纯化菌落分别接种葡萄糖发酵、吡啶、甲基红、V-P、枸橼酸盐利用生化试验管,参见附录B进行,观察并记录结果。

7.3 菌毛型鉴定:以下两种方法可任选其一。

7.3.1 玻板凝集试验:取菌落分别接种于大豆胨琼脂、Minca培养基、Slanetz培养基,37℃培养18 h~24 h,取各培养基上菌苔与适量生理盐水制成均匀混悬液(浊度与麦氏比浊管第三管相当)。参见附录E方法,将菌苔混悬液分别与不同的单克隆抗体或阳性血清进行玻板凝集试验:

- 大豆胨琼脂培养基上生长的菌苔制成的混悬液,与大肠杆菌K88菌毛特异性单克隆抗体或阳性血清进行玻板凝集试验,3 min~5 min后观察结果;
- Minca培养基上生长的菌苔制成的混悬液,分别与大肠杆菌K99、F41菌毛特异性单克隆抗体或阳性血清进行玻板凝集试验,3 min~5 min后观察结果;
- Slanetz培养基上生长的菌苔制成的混悬液,与大肠杆菌987P菌毛特异性单克隆抗体或阳性血清进行玻板凝集试验,3 min~5 min后观察结果;
- 同时取菌苔混悬液与生理盐水以及相应的阴性对照血清分别进行玻板凝集试验,作为阴性对照,3 min~5 min后观察结果。

如果菌苔混悬液与生理盐水以及相应的阴性对照血清均不发生凝集,则试验成立。观察菌苔混悬液与特异性单克隆抗体或阳性血清的凝集情况,出现凝集,结果判为相应菌毛型阳性;如无凝集,则传代后重新检测,传代三次仍然未出现凝集,则判为相应菌毛型阴性。

7.3.2 菌毛型的PCR鉴定:挑取单个疑似菌落,重悬于100 μL 灭菌去离子水中,煮沸5 min,作为样品DNA模板。分别用K88、K99、987P、F41菌毛型特异性引物进行PCR扩增,同时设立相应的阴、阳性对照。具体试验方案及操作程序参见附录F。

如作为阳性对照的大肠杆菌K88、K99、987P、F41菌毛型菌株的DNA模板经PCR扩增后,分别出现841 bp、543 bp、463 bp、682 bp大小的扩增条带,且阴性对照未出现扩增条带时,试验成立。被检样品经PCR扩增后,若出现相应的特异性条带,即判为该菌毛型阳性,否则判为该菌毛型阴性。

8 结果判定

如果完全符合下述3个条件,结果判定为致仔猪黄痢大肠杆菌阳性;如果其中任何一项不符合,结

果判定为致仔猪黄痢大肠杆菌阴性：

- 可在麦康凯培养基上生长，菌落颜色为红色(极少数为无色菌落)；
- 可发酵葡萄糖，吲哚、甲基红试验均呈阳性反应，V - P 试验、枸橼酸盐利用试验均呈阴性反应；
- 能和大肠杆菌 K88、K99、987P、F41 特异性单克隆抗体或阳性血清中的至少一种发生凝集反应；或者大肠杆菌 K88、K99、987P、F41 菌毛型 PCR 鉴定时，至少一种为阳性。

9 废弃物与病料处理方法

废弃物处理参照中华人民共和国农业部〔2003〕第 302 号的规定进行。

10 注意事项

- 10.1 所有操作应严格遵守生物安全规定。
- 10.2 玻板凝集试验可以在玻璃板上进行，样品较少时也可以在载玻片上进行。
- 10.3 试验时，若采用商品化的培养基、生化试验鉴定管、特异性抗体等试剂，可根据说明书进行操作及结果判定。

附 录 A

(资料性附录)

培养基的配制

A.1 大豆胨琼脂培养基

胰蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
NaCl(分析纯)	5.0 g
KH ₂ PO ₄ (分析纯)	2.5 g
葡萄糖(分析纯)	2.5 g
琼脂粉	12.0 g

先称取除琼脂粉以外的其他试剂,加入约 800 mL 双蒸水,溶解后调 pH 至 7.4。再加入琼脂粉并加热溶解,定容至 1 000 mL,115℃ 高压灭菌 15 min,制成平板,置 2℃~8℃ 备用。

A.2 Minca 培养基

A.2.1 微量盐溶液

MgSO ₄ · 7H ₂ O(分析纯)	10.0 g
MnCl ₂ · 2H ₂ O(分析纯)	1.0 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O(分析纯)	0.135 g
CaCl ₂ (分析纯)	0.4 g

加双蒸水至 1 000 mL,115℃ 高压灭菌 15 min,置 2℃~8℃ 备用。

A.2.2 Minca 培养基

KH ₂ PO ₄ (分析纯)	1.36 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O(分析纯)	20.3 g
酪蛋白氨基酸	1.0 g
葡萄糖(分析纯)	1.0 g
微量盐溶液	1 mL
琼脂粉	12.0 g

先称取除琼脂粉以外的其他试剂,加入约 800 mL 双蒸水,溶解后调 pH 至 7.5。再加入琼脂粉并加热溶解,定容至 1 000 mL,115℃ 高压灭菌 15 min,制成平板,置 2℃~8℃ 备用。

A.3 Slanetz 培养基

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖(分析纯)	1.0 g
NaCl(分析纯)	9.0 g
琼脂粉	12.0 g

先称取除琼脂粉以外的其他试剂,加入约 800 mL 双蒸水,溶解后调 pH 至 7.6。再加入琼脂粉并加热溶解,定容至 1 000 mL,115℃ 高压灭菌 15 min,制成平板,置 2℃~8℃ 备用。

A.4 麦康凯培养基

胰蛋白胨	27.0 g
多价蛋白胨	3.0 g
乳糖(分析纯)	10.0 g
纯化胆盐(分析纯)	1.5 g
NaCl(分析纯)	5.0 g
琼脂粉	12.0 g

先称取除琼脂粉以外的其他试剂,加入约 800 mL 双蒸水,溶解后调 pH 至 7.1。然后加入琼脂粉并加热溶解,再加入 0.1%结晶紫水溶液 1 mL、1%中性红水溶液 5 mL,混匀,定容至 1 000 mL,115℃高压灭菌 15 min,制成平板,置 2℃~8℃备用。

附录 B

(资料性附录)

生化试验培养基的制备及生化试验方法

B.1 葡萄糖发酵试验

B.1.1 培养基

胰蛋白胨	2.0 g
葡萄糖(分析纯)	10.0 g
NaCl(分析纯)	5.0 g
KH ₂ PO ₄ (分析纯)	0.3 g

加入约 800 mL 双蒸水,调 pH 至 7.2。再加入 1% 溴麝香草酚蓝水溶液 3 mL,定容至 1 000 mL,按 2 mL/管分装试管,115℃ 高压灭菌 15 min,置 2℃~8℃ 备用。

B.1.2 试验方法

取少量幼龄纯培养物,每个菌株接种 2 管培养基,接种后其中 1 管液面上滴加一层(高度约 10 mm)灭菌的液体石蜡。37℃ 恒温培养 24 h~48 h,每天观察并记录结果。

B.1.3 结果判定

若 2 支试验管培养基均由蓝紫色变为黄色,则判定该菌株为发酵葡萄糖阳性;若仅不滴加液体石蜡的试验管培养基由蓝紫色变为黄色,或者 2 支试验管培养基均依然为蓝紫色,则判定该菌株为发酵葡萄糖阴性。

B.2 吲哚生化试验

B.2.1 培养基

胰蛋白胨	20.0 g
NaCl(分析纯)	5.0 g

加入约 800 mL 双蒸水溶解上述培养基组分,调 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL。按 2 mL/管分装试管,115℃ 高压灭菌 15 min,置 2℃~8℃ 备用。

B.2.2 柯凡克氏试剂

对二甲氨基苯甲醛(分析纯)	5.0 g
戊醇(分析纯)	75 mL
浓盐酸(37%)	25 mL

先将对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中,再慢慢加入浓盐酸,混匀后置 2℃~8℃ 备用。

B.2.3 试验方法与结果判定

取少量幼龄纯培养物,接种 2 mL 培养基,37℃ 培养 24 h~48 h(必要时可培养至 120 h)。然后加入 0.2 mL 乙醚,摇动试管以提取和浓缩吲哚,待其浮于培养基表面后,再沿管壁徐徐加入柯凡克氏试剂数滴。立即在接触面呈现红色者为阳性反应,无红色反应者为阴性反应。

B.3 甲基红生化试验

B.3.1 培养基

KH ₂ PO ₄ (分析纯)	5.0 g
多价蛋白胨	7.0 g
葡萄糖(分析纯)	5.0 g

加双蒸水至 1 000 mL,调 pH 至 7.0,按 2 mL/管分装试管,115℃ 高压灭菌 15 min,置 2℃~8℃ 备用。

B.3.2 甲基红指示剂

甲基红(分析纯)	0.1 g
95%酒精	300 mL
蒸馏水	200 mL

先将甲基红用酒精溶解后,再加入蒸馏水,置 2℃~8℃ 备用。

B.3.3 试验方法与结果判定

取少量幼龄纯培养物,接种 3 管培养基,置 37℃ 培养 24 h。取 1 管培养物加入甲基红指示剂 2 滴~4 滴,立即观察结果,呈鲜红色的判为阳性反应,呈橘红色判为弱阳性,呈黄色或橙色判为阴性。若为阴性,则将其余 2 管继续培养,分别于 48 h 和 120 h 再次进行测试,120 h 培养物仍为阴性则判为阴性反应。

B.4 V-P 生化试验

B.4.1 培养基

与甲基红生化试验所用培养基相同。

B.4.2 试剂(贝立脱氏法)

甲液为 5% α-萘酚酒精溶液;乙液为 40% 的 KOH 水溶液。

B.4.3 试验方法与结果判定

取少量幼龄纯培养物,接种 2 mL 培养基,37℃ 培养 48 h~96 h。然后,加入甲液 0.6 mL,再加乙液 0.2 mL,充分混匀,阳性反应菌即刻或在 5 min 内呈现红色,若无红色出现,可静置于室温或 37℃ 下 2 h 内观察结果,仍不出现红色者为阴性。

B.5 枸橼酸盐利用生化试验

B.5.1 培养基

NaCl(分析纯)	5.0 g
MgSO ₄ (分析纯)	0.2 g
K ₂ HPO ₄ (分析纯)	1.0 g
NH ₄ H ₂ PO ₄ (分析纯)	1.0 g
枸橼酸钠(分析纯)	2.0 g
琼脂粉	12.0 g

先称取除琼脂粉以外的其他试剂,加入约 800 mL 双蒸水,溶解后调 pH 至 6.8。然后加入琼脂粉并加热溶解,再加入 0.2% 溴麝香草酚蓝溶液 40 mL,定容至 1 000 mL,混匀后按 5 mL/管分装试管,115℃ 高压灭菌 15 min,制成斜面,置 2℃~8℃ 备用。

B.5.2 试验方法与结果判定

将少量幼龄纯培养物,用接种环涂布于琼脂斜面上,37℃ 培养 96 h~168 h。其间,每天观察 1 次,在斜面上有菌苔生长,培养基由绿色变为蓝色,则结果判为阳性反应,否则判为阴性反应。

附录 C

(资料性附录)

兔抗 K88、K99、987P、F41 菌毛阳性血清及其阴性对照血清的制备

C.1 材料和试剂

C.1.1 实验动物

体重 1.5 kg~3.0 kg 的 SPF 兔。

C.1.2 菌株

大肠杆菌 E68 株(产 K88ab 菌毛)、大肠杆菌 C83912 株(产 K99 菌毛)、大肠杆菌 C83710 株(产 987P 菌毛)、大肠杆菌 C83919 株(产 F41 菌毛)。

C.1.3 培养基

大豆胨琼脂、Minca、Slanetz 等培养基。

C.2 方法

C.2.1 兔抗 K88、K99、987P、F41 菌毛阳性血清的制备

C.2.1.1 免疫原的制备

C.2.1.1.1 菌毛化菌体的制备

将大肠杆菌 E68 株接种大豆胨琼脂培养基、大肠杆菌 C83912 株接种 Minca 培养基、大肠杆菌 C83710 株接种 Slanetz 培养基、大肠杆菌 C83919 株接种 Minca 培养基,37℃培养 18 h~24 h,用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 洗下菌苔。4℃ 5 000 r/min 离心 5 min 洗涤 1 次,置 2℃~8℃保存。

C.2.1.1.2 菌毛纯化

将上述菌液置 60℃水浴 30 min,每隔 5 min 轻轻振摇 1 次。4℃ 10 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。加入饱和硫酸铵至 60%饱和度,2℃~8℃放置过夜。4℃ 10 000 r/min 离心 30 min,沉淀用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 悬浮。再经层析或密度梯度离心获得纯化的菌毛抗原,以此作为免疫原。小量分装后-20℃保存。

C.2.1.2 实验兔免疫和采血

将纯化的菌毛抗原用等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,背部多点皮内注射免疫试验兔,抗原免疫量为 1 mg/只。首免 2 周后,取免疫原用等体积的弗氏不完全佐剂进行乳化,背部多点皮内注射免疫试验兔,抗原免疫量为 1 mg/只。免疫后兔血清与相应的菌毛型抗原的凝集效价不低于 1:512 时,心脏采血,分离血清,-20℃保存。阳性血清仅与相应的菌毛型抗原发生凝集反应,不与其他菌毛型抗原出现凝集反应。

C.2.2 阴性对照兔血清的制备

C.2.2.1 实验兔的选择

体重 1.5 kg~3.0 kg 的 SPF 兔。

C.2.2.2 采血和保存

心脏采血,分离血清,-20℃保存。作为阴性对照的兔血清应不与任何菌毛型抗原发生凝集反应。

附录 D (资料性附录)

K88、K99、987P、F41 菌毛特异性单克隆抗体及其阴性对照血清的制备

D.1 材料和试剂

D.1.1 实验动物

适龄 BALB/c 小鼠。

D.1.2 菌株

大肠杆菌 E68 株(产 K88ab 菌毛)、大肠杆菌 C83912 株(产 K99 菌毛)、大肠杆菌 C83710 株(产 987P 菌毛)、大肠杆菌 C83919 株(产 F41 菌毛)。

D.1.3 SP2/0 细胞

D.1.4 试剂

大豆胨琼脂培养基、Minca 培养基、Slanetz 培养基、DMEM、HAT、HT、PEG。

D.2 器材

CO₂ 培养箱、倒置显微镜、离心机、超净工作台、微量移液器(20 μL~200 μL; 100 μL~1 000 μL)。

D.3 方法

D.3.1 单克隆抗体的制备

D.3.1.1 免疫原的制备

分别用纯化的 K88、K99、987P、F41 菌毛作为免疫原,制备方法同 C.2.1 项。

D.3.1.2 BALB/c 小鼠免疫

将免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化,皮下注射免疫 6 周龄~8 周龄的 BALB/c 小鼠,抗原免疫量为 0.5 mg/只。首免 2 周后,经尾静脉注射免疫原,抗原免疫量为 0.5 mg/只,3d 后进行细胞融合。

D.3.1.3 细胞融合

无菌摘取免疫小鼠脾脏,收集小鼠脾细胞,用无血清 DMEM 重悬,进行细胞计数。将制备的脾细胞和 SP2/0 细胞按照(5~8):1 的比例混合,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。缓慢加入 1 mL 50% PEG 1 000,再滴加 25 mL 无血清 DMEM。1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入 30 mL HAT 重悬,分装到 96 孔细胞培养板中,置 CO₂ 培养箱内 5% CO₂ 37℃ 培养。

D.3.1.4 抗体检测及筛选

细胞融合 7 d~10 d 后,从有克隆生长的细胞孔中吸取培养上清,用玻板凝集试验进行抗体检测,能与相应菌毛型抗原发生特异性凝集的克隆为阳性克隆。

D.3.1.5 亚克隆

用 HT 培养基按有限稀释法进行亚克隆。用玻板凝集试验进行抗体检测,能与相应菌毛型抗原发生特异性凝集的克隆为阳性克隆。

D.3.1.6 腹水制备

扩大培养杂交瘤细胞,将细胞浓度为(1~2)×10⁶ 细胞/mL 的杂交瘤细胞经腹腔接种 10 周龄 BALB/c 小鼠(小鼠在接种杂交瘤细胞前 1 周预注液体石蜡),每只接种 0.5 mL。待腹水形成后,用注

射器抽取。收集的腹水经 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 与相应菌毛型抗原的凝集效价应不低于 1 : 512, -20℃ 保存。4 种菌毛型的特异性单克隆抗体仅与相应的菌毛型抗原发生特异性凝集反应, 与其他菌毛型及肠杆菌科其他种属的细菌均应无交叉反应。

D. 3. 2—— 阴性对照鼠血清的制备

D. 3. 2. 1 实验鼠的选择

10 周龄的 BALB/c 小鼠。

D. 3. 2. 2 采血和保存

采血, 分离血清, -20℃ 保存。阴性血清应不与任何菌毛型抗原发生凝集反应。

附 录 E
(资料性附录)
玻板凝集试验

E.1 试剂

K88、K99、987P、F41 菌毛特异性单克隆抗体及阴性对照鼠血清,或抗 K88、K99、987P、F41 菌毛阳性兔血清及阴性对照兔血清,生理盐水。

E.2 器材

玻璃板、微量移液器(100 μL)。

E.3 方法

E.3.1 待检菌苔混悬液制备

将待检菌苔刮下,用生理盐水稀释至麦氏比浊管第3管浊度。

E.3.2 玻板凝集

取一块洁净玻板,在玻板的不同位置分别用微量移液器滴加3滴待检菌苔混悬液,每滴20 μL 。如果选用单克隆抗体作为凝集抗体,则分别向3滴待检菌苔混悬液中滴加相应的单克隆抗体、阴性对照鼠血清、生理盐水各20 μL ;如果选用阳性兔血清作为凝集抗体,则分别向3滴待检菌苔混悬液中滴加相应的阳性兔血清、阴性对照兔血清、生理盐水各20 μL 。用移液器吸头(或牙签)将血清与抗原混匀,轻柔摇动玻板3 min~5 min,判定结果。

E.4 结果判定

++++:出现大的凝集块,液体完全清亮透明,即100%凝集。

+++ :有明显的凝集片,液体几乎完全透明,即75%凝集。

++ :有可见的凝集片,液体不甚透明,即50%凝集。

+:液体混浊,有小的颗粒状物,即25%的凝集。

- :液体均匀混浊,即不凝集。

以出现“+”以上凝集判为凝集反应阳性,以出现“-”凝集判为凝集反应阴性。

附 录 F (资料性附录)

致仔猪黄痢大肠杆菌菌毛型的 PCR 方法鉴定

F.1 材料和试剂

F.1.1 菌株

大肠杆菌 E68 株(产 K88ab 菌毛)、大肠杆菌 C83912 株(产 K99 菌毛)、大肠杆菌 C83710 株(产 987P 菌毛)、大肠杆菌 C83919 株(产 F41 菌毛)。

F.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖、核酸染料、DNA 分子量标准(DL 2 000 DNA Marker)、上样缓冲液、TBE 电泳缓冲液均为商品化试剂。

F.2 仪器

高速冷冻离心机、PCR 扩增仪、核酸电泳仪和水平电泳槽、凝胶成像系统(或紫外透射仪)、微量移液器(10 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

F.3 引物

大肠杆菌菌毛型 PCR 鉴定用引物见表 F.1。

表 F.1 大肠杆菌菌毛型 PCR 鉴定用引物

引物名称	引物序列	片段长度, bp
上游引物 K88F	5'- GATGAA AAAGAC TCTGAT TGC A - 3'	841
下游引物 K88R	5'- GAT TGC TACGTT CAG CGG AGCG - 3'	
上游引物 K99F	5'- CTGAAAAAACA CTGCTAGCTATT - 3'	543
下游引物 K99R	5'- CATATAAGTGACTAAGAAGGATGC - 3'	
上游引物 987PF	5'- GTTACTGCCAGTCTATGCCAAGTG - 3'	463
下游引物 987PR	5'- TCGGTGTACCTGCTGAACGAATAG - 3'	
上游引物 F41F	5'- GATGAAAAAGACTCTGATTGCA - 3'	682
下游引物 F41R	5'- TCTGAGGTCATCCCAATTGTGG - 3'	

F.4 操作程序

F.4.1 DNA 模板制备

挑取单个疑似菌落,重悬于 100 μ L 灭菌去离子水中,煮沸 5min,作为样品 DNA 模板;按相同方法分别制备大肠杆菌 E68 株(产 K88ab 菌毛)、C83912 株(产 K99 菌毛)、C83710 株(产 987P 菌毛)、C83919 株(产 F41 菌毛)的 DNA 模板,作为大肠杆菌 K88、K99、987P、F41 菌毛型菌株的阳性对照模板。

F.4.2 PCR

分别用 K88F/K88R、K99F/K99R、987PF/987PR、F41F/F41R 4 对引物,扩增样品 DNA 模板。同时,用 K88F/K88R 引物扩增 K88 阳性对照 DNA 模板、用 K99F/K99R 引物扩增 K99 阳性对照 DNA 模板、用 987PF/987PR 引物扩增 987P 阳性对照 DNA 模板、用 F41F/F41R 扩增 F41 阳性对照 DNA

模板,作为阳性对照。用上述 4 对引物,分别对去离子水进行扩增,作为阴性对照。PCR 反应体系及反应程序如下。

F.4.2.1 PCR 反应体系

MgCl ₂ (25 mmol/L)	1.5 μL
样品模板	1.0 μL
10×TaqDNA 聚合酶反应缓冲液	2.5 μL
dNTPs (10 mmol/L)	0.5 μL
上游引物 (50 pmol/μL)	0.5 μL
下游引物 (50 pmol/μL)	0.5 μL
TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL)	0.5 μL
灭菌去离子水	18.0 μL
总体积 (Total)	25.0 μL

F.4.2.2 PCR 反应程序

94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 结束反应。

F.4.3 扩增产物的电泳检测

用 TBE 电泳缓冲液配制 1.0% 琼脂糖凝胶, 加热融化后, 添加工作浓度的核酸染料, 凝固备用。将 PCR 产物与上样缓冲液混合后, 加入加样孔, 同时加 DNA Marker 作为分子量参考。5 V/cm 恒压下电泳 30 min, 紫外凝胶成像系统下观察 PCR 扩增条带及其大小。

F.5 结果判定

如果作为阳性对照的大肠杆菌 K88、K99、987P、F41 菌毛型菌株的 DNA 模板经 PCR 扩增后, 分别出现 841 bp、543 bp、463 bp、682 bp 大小的扩增条带, 且阴性对照未出现扩增条带时, 试验成立。

被检样品经 PCR 扩增后, 若出现相应的特异性条带, 即判为该菌毛型阳性, 否则判为该菌毛型阴性。