



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4819—2017

裸鼠过度角化症检疫技术规范

Quarantine protocol for hyperkeratosis in athymic nude mice

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、福建医科大学附属第一医院。

本标准主要起草人：王武军、白泉阳、张强、高丽钦、张体银、郑腾、于师宇、张志灯、熊炜、林素洁。

裸鼠过度角化症检疫技术规范

1 范围

本标准规定了裸鼠过度角化症的临床诊断、病原分离与鉴定、组织切片和聚合酶链式反应检测方法。

本标准适用于裸鼠过度角化症的临床诊断、病原鉴定与检疫。

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/T 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 临床诊断

受感染动物全身出现鳞片样黄白色皮屑,粘附于皮肤表面。消瘦,群体发病率达80%,但死亡率为1%。临床上可根据感染动物全身出现鳞片样黄白色皮屑粘附于皮肤表面的典型症状作初步诊断(参见附录A)。

4 实验室诊断

4.1 设备、材料和试剂

4.1.1 主要设备

4.1.1.1 天平:读数精度0.1 g。

4.1.1.2 冰箱。

4.1.1.3 二氧化碳培养箱。

4.1.1.4 恒温水浴锅。

4.1.1.5 生物显微镜。

4.1.1.6 切片机。

4.1.1.7 II级生物安全柜。

4.1.1.8 红外加热器。

4.1.1.9 台式冷冻高速离心机。

4.1.1.10 PCR仪。

4.1.1.11 电泳仪。

4.1.1.12 凝胶成像仪。

4.1.1.13 灭菌试管。

4.1.1.14 灭菌吸管。

4.1.1.15 单道可调微量移液器(2 μL ~20 μL , 20 μL ~200 μL , 100 μL ~1 000 μL)及其配套吸头。

4.1.2 材料和试剂

4.1.2.1 水:符合 GB/T 6682 中三级水的规格要求。

4.1.2.2 除另有规定,所用试剂均为分析纯。

4.1.2.3 普通琼脂绵羊血平板培养基、脑心浸液(BHI)培养基及其琼脂培养基的制备方法参见附录 B。

4.1.2.4 革兰染色液。

4.1.2.5 过氧化氢酶试剂。

4.1.2.6 细菌生化鉴定管或商品化生化鉴定试剂盒。

4.1.2.7 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

4.1.2.8 商品化 DNA 扩增试剂盒:—20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,不要反复冻融。

4.1.2.9 扩增牛棒状杆菌 16SrRNA 基因的 1 391 bp 片断的引物序列如下:

C.bovis 16S-F: 5'-GATCCTGGCTCAGGACGAAC-3',

C.bovis 16S-R: 5'-GTTACCAACTTTCATGACGTGAC-3'。

4.1.2.10 扩增 *rpoB* 基因的 1 167 bp 片断的引物序列如下:

rpoB-F: 5'-AAGTTCGAGCGCACCAACCA-3',

rpoB-R: 5'-TGGCCCACACCTCCATCT-3'。

4.1.2.11 其他试剂:无水乙醇、琼脂糖(电泳纯)、分子量标准(100 bp~1 500 bp)。

4.1.2.12 电泳缓冲液、电泳加样缓冲液、溴化乙锭(EB)染色液,配制方法参见附录 B。

4.1.2.13 牛棒状杆菌标准菌株,由相关菌种保藏机构提供。

4.2 样品采集

4.2.1 用于细菌分离用样品的采集

皮肤表面样品采集时,灭菌棉签于灭菌磷酸盐缓冲液中浸泡后拧干,在裸鼠背部皮肤涂擦后按 4.3.1.1 接种。粪便样品采集时,固定颈部皮肤和小鼠尾部,使小鼠竖直,直接将粪便接入灭菌 1.5 mL 离心管中,加入适量灭菌磷酸盐缓冲液后,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 保存和运送。采样数量、包装和运输参照 GB/T 18088。

4.2.2 组织学样品的采集

使用 CO_2 窒息法迫杀裸鼠后,眼科手术剪迅速剪下完整的裸鼠背部皮肤(如有血污可在灭菌 PBS 中漂洗),大小约 1.5 cm \times 1.5 cm,将其贴在硬纸片上,放入新鲜配制的饱和 Bouin 氏液中固定 24 h。

4.3 细菌分离、培养和鉴定

4.3.1 细菌分离、培养和初步鉴定

4.3.1.1 细菌分离

凡是涉及生物安全的操作和处理均应符合 GB 19489 的相关规定,本病原应在二级生物安全柜内操作。皮肤表面擦拭样品直接划线接种普通琼脂绵羊血平板;粪便样品用一次性接种环或经红外加热器灭菌并冷却的接种环蘸取样品后划线接种于普通琼脂绵羊血平板(参见附录 B),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 48 h,如菌落生长缓慢,可延长至 72 h 后观察,使之形成单个菌落,以供后续鉴定用。

4.3.1.2 增菌培养

挑取在普通琼脂绵羊血平板上生长的单个可疑菌落分别接种脑心浸液(BHI)培养液和 BHI 琼脂斜面(参见附录 B), 37 °C 5% CO₂ 培养 48 h。

4.3.1.3 初步鉴定

4.3.1.3.1 培养特性: 在 37 °C 5% CO₂ 培养 48 h 后, 牛棒状杆菌在普通琼脂绵羊血平板上形成针尖大小、圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、周围无溶血环的菌落。在脑心浸液(BHI)培养基中, 培养液上部清亮, 底部有丝状沉淀。

4.3.1.3.2 革兰染色: 取可疑菌落做革兰染色(按 GB/T 4789.28 的方法进行染色), 牛棒状杆菌为革兰阳性。形态不规则, 菌体细长, 直或微弯, 一端常膨大呈棒状, 有时呈球杆状, 常成排或成簇排列。细胞着色不均, 可见节段染色或异染颗粒。

4.3.1.3.3 初步判断: 菌落生长特征、革兰染色、菌体形态与上述描述相符合的菌株, 可初步确定为牛棒状杆菌。

4.3.2 生化鉴定

4.3.2.1 经 4.3.1.3 初步确定为牛棒状杆菌的菌株, 进行如下生化鉴定试验: 溶血实验、水解实验[七叶苷、明胶(25 °C)]、硝酸盐还原、脲酶、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、木糖试验。或应用商品化的细菌生化鉴定系统进行生化鉴定。

4.3.2.2 牛棒状杆菌上述生化鉴定试验结果参见附录 C, 为便于同该属其他菌鉴别诊断, 同时列出库氏棒状杆菌和伪结核棒状杆菌的主要生化反应特性。

4.4 组织切片检查

4.4.1 组织切片的制备

取出在 Bouin 氏固定液中固定的样本, 用刀片将样本修切成约 1 cm×1 cm×0.5 cm 大小, 酒精梯度(50%、70%、80%、95%、100%和 100%)脱水, 每级 2 h; 二甲苯透明 40 min~45 min; 于 56 °C~58 °C 温箱中浸蜡 4 h; 石蜡包埋后切片, 厚度 5 μm; 苏木素-伊红(HE)染色后, 镜检。

4.4.2 结果观察

显微镜下, 正常的裸鼠皮肤角质层完整, 紧附于活性表皮(表皮基底层、棘层、颗粒层和透明层的合称)之上, 角质层经 HE 染色后呈嗜酸性, 沿活性表皮呈带状均匀分布。表皮脊隆起, 活性表皮细胞排列较为紧密。患病裸鼠皮肤切片中, 角质层增厚, 表皮棘细胞层和基底层也出现明显增厚, 真皮层出现单核细胞浸润。

4.5 PCR 检测

4.5.1 DNA 提取

4.5.1.1 DNA 提取可选用等效的商品化试剂盒或等效的提取方法, 下面以 TIANGEN¹⁾ 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)进行 DNA 提取。

1) 使用 TIANGEN 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)只是为了叙述方便, 并不代表推荐 TIANGEN 公司的产品, 标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

4.5.1.2 取分离菌的肉汤培养物 1 mL 于 1.5 mL 灭菌离心管中,10 000 r/min 离心 1 min,沉淀菌体,吸弃上清。

4.5.1.3 向菌体沉淀中加入溶菌酶进行破壁处理,具体方法为:加入 180 μ L 缓冲液(20 mM Tris,pH 8.0;2 mM Na₂-EDTA;1.2% Triton;终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶),37 $^{\circ}$ C 处理 30 min。

4.5.1.4 向管中加入 20 μ L Proteinase K 溶液,混匀。

4.5.1.5 加入 220 μ L 缓冲液 GB,振荡 15 s,70 $^{\circ}$ C 放置 10 min,溶液应变清亮,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

4.5.1.6 加 220 μ L 无水乙醇,充分振荡混匀 15 s,此时可能会出现絮状沉淀,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

4.5.1.7 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中(吸附柱放入收集管中),12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

4.5.1.8 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L 缓冲液 GD,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

4.5.1.9 向吸附柱 CB3 中加入 600 μ L 漂洗液 PW,12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,吸附柱 CB3 放入收集管中。

4.5.1.10 重复操作步骤 4.5.1.9。

4.5.1.11 将吸附柱 CB3 放回收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

4.5.1.12 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μ L 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2 min~5 min,12 000 r/min 离心 2 min,将溶液收集到离心管中。可重复洗脱一次。

4.5.1.13 将 DNA 提取液进行 PCR 检测,或于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.5.2 PCR 扩增

4.5.2.1 反应体系

扩增 DNA 按照 TIANGEN²⁾ 公司的 DNA 扩增试剂盒(2 \times Taq PCR MasterMix)进行。25 μ L 反应体系内含 2 \times Taq PCR MasterMix 反应液 12.5 μ L(含 Taq 酶 1.25U),10 μ mol/L *C. bovis* 16S-F、*C. bovis* 16S-R 引物对各 1.0 μ L(或 10 μ mol/L *rpoB*-F、*rpoB*-R 引物对各 1.0 μ L),灭菌双蒸水 8.5 μ L,样品或对照模板 DNA 2 μ L。

同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照。以阳性标准菌株提取的 DNA 或人工合成的含目的片段的质粒为阳性对照、以培养基为阴性对照、以灭菌双蒸水作为空白对照。

4.5.2.2 反应条件

C. bovis 16S-F、*C. bovis* 16S-R 引物对反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,93 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,返回第 2 步,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

rpoB-F、*rpoB*-R 引物对反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 min,5 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),5 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),35 个循环(95 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s),72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

2) 使用 TIANGEN 公司的 2 \times Taq PCR MasterMix DNA 扩增试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 TIANGEN 公司的产品,标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

4.5.3 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液(配制方法参见附录 B)配制 1% 的琼脂糖,加热完全溶解后,制成凝胶平板。待冷却后,将凝胶平板放入水平电泳槽,加入电泳缓冲液至充分没过凝胶面,取下梳子。将 5 μ L PCR 产物和 1 μ L 电泳加样缓冲液(配制方法参见附录 B)混匀后加入凝胶孔中进行电泳。在电泳时设立 DNA 标准分子量 Marker 作对照。5 V/cm 电泳约 50 min,当溴酚蓝到达凝胶块底部时停止电泳。

4.5.4 凝胶成像分析和测序

将电泳完毕的凝胶放入含 0.5 μ g/mL EB(配制方法参见附录 B)溶液中染色 10 min~30 min 后,在水中漂洗凝胶,凝胶成像仪观察和记录。

被检样品如在 1 391 bp 处或 1 167 bp 处有特异性扩增条带的,应切胶回收 DNA 片段进行测序,参考序列见附录 D。

4.5.5 结果判定

阴性对照和空白对照无条带,阳性对照分别在 1 391 bp(16SrRNA 基因)处或 1 167 bp 处(*rpoB* 基因)有特异性扩增条带时,实验成立。

被检样品在 1 391 bp 处有特异性扩增条带并经测序验证者,为牛棒状杆菌阳性。

被检样品在 1 167 bp 处有特异性扩增条带并经测序验证者,为牛棒状杆菌阳性。

被检样品无条带或条带的大小不是 1 391 bp 或 1 167 bp 的,为牛棒状杆菌阴性。

5 综合判断

5.1 满足以下条件可判定为裸鼠过度角化症可疑:

- a) 分离到的病原菌菌落培养特性、染色形态与 4.3.1 中描述相符。
- b) 组织学检查出现典型的棘细胞层增厚。

5.2 满足以下任何一条均可判定为裸鼠过度角化症阳性:

- a) 临床症状和病理变化符合第 3 章中的描述:革兰染色为阳性杆菌,呈棒状或球杆状,成排或成簇排列;主要生化特性符合 4.3.2 中的描述。
- b) 牛棒状杆菌 16SrRNA 基因或 *rpoB* 基因 PCR 检测结果为牛棒状杆菌阳性。
- c) 组织切片检查结果疑似裸鼠过度角化症的,且同时满足上述判定条件之一者,可判定为裸鼠过度角化症阳性。

6 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)
裸鼠过度角化症简介

裸鼠过度角化症(Hyperkeratosis)是由牛棒状杆菌(*Corynebacterium bovis*)引起裸鼠的过度角化性皮炎和棘皮症。感染动物典型的临床症状为全身出现鳞片样黄白色皮屑,粘附于皮肤表面,俗称“鳞皮病”。该病曾经在日本、美国、意大利的实验动物中暴发,是国外实验动物机构对裸鼠的重点监控疫病之一,我国2010年有从进口实验动物中分离到该病原的报道。该病对裸鼠等特定免疫状态的实验动物具有重要危害,且一旦感染,饲养环境很难彻底清除该病原。

牛棒状杆菌(*Corynebacterium bovis*),属棒状杆菌属,为一种形态不规则的革兰阳性杆菌或球杆菌,形态不规则,常成排或成簇排列。在含1%吐温80的营养琼脂上形成白色至乳白色菌落。为非抗酸性杆菌,菌体细长,直或微弯,一段常膨大呈棒状。细胞着色不均,可见节段染色或异染颗粒。无鞭毛,不运动,也不形成荚膜和芽孢。对干燥具有较强抵抗力。培养基中加入血液可促进其生长。免疫功能正常的大小鼠一般不会(长期)携带该病病原,但该菌对于无毛鼠和免疫缺陷鼠致病,一旦感染,几乎是终身性携带该菌。发病率可达到80%,但死亡率较低。通常,“鳞屑”的暴发提示该病发生,皮肤组织暴学检查可见弥漫性表皮棘细胞层明显增厚,裸鼠于感染后7 d~10 d出现上述“鳞屑”症状,该症状会在14 d~20 d后消失,但发病裸鼠会作为病原细菌的携带者,继续感染其他裸鼠,至少要坚持30 d。对实验动物的影响表现为体重减轻、摄水量增加、异种移植物生长缓慢、对化疗的敏感性增加、新生鼠死亡率增加等。一旦感染,则非常难以消除。除了对环境彻底消毒外,动物种群本身至少需要剖腹产净化,或其他类似胚胎移植等手段。其垂直传播情况尚未见研究报道。美国相关研究提及牛棒状杆菌可能会污染肿瘤组织。携带该病病原但无临床症状的裸鼠,是该病重要的传染源。加强对进境实验动物的动物检疫和监管,将裸鼠过度角化症列入进境实验动物疫病检疫项目中,是防止该病病原通过进口实验动物传入我国的最为直接和有效的预防措施。

裸鼠过度角化症可根据全身出现鳞片样白色皮屑黏附于皮肤表面、表皮棘细胞层增厚的典型症状作初步诊断。确诊需从病灶分离细菌,进行细菌培养特性、革兰染色、生化试验判定,必要时,可进行皮肤组织病理学观察,及对16S rRNA、*rpoB*等特异性目的基因进行PCR扩增、测序、序列比对等进一步鉴定。

附录 B
(资料性附录)
培养基和试剂的配置

B.1 普通琼脂绵羊血平板

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
脱纤维无菌绵羊血	50 mL

除无菌绵羊血外,其他各成分混匀,加热溶解,调至 pH 7.6 后分装入锥形瓶,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却至 45 ℃ 时,加入 5% 无菌脱纤维绵羊血,混匀后倾注灭菌平板或一次性使用平板。4 ℃ 保存备用。

B.2 脑心浸液(BHI)培养基

蛋白胨	10.0 g
牛脑浸粉	12.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

将以上各成分混匀,加热煮沸至完全溶解,冷却至室温,调至 pH 7.4 后分装试管,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却至室温,4 ℃ 保存备用。

B.3 脑心浸液(BHI)琼脂培养基

在 B.2 脑心浸液(BHI)培养基中加入 15.0 g 琼脂,各成分混匀,加热煮沸至完全溶解,冷却至室温,调至 pH 7.4 后分装试管,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却制成试管斜面,4 ℃ 保存备用。

B.4 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
蒸馏水	1 000.0 mL

用 5.0 mol/L 的盐酸调 pH 到 8.0,室温储存。使用时,用蒸馏水 10 倍稀释至工作浓度。

B.5 6×电泳加样缓冲液

称取溴酚蓝 200 mg,加水 10 mL,室温下过夜溶解;再称取蔗糖 50.0 g,加水溶解后与溴酚蓝溶液混合均匀;加水定容至 100 mL,再加入 1 mol/L NaOH 1~2 滴,调至蓝色。

B.6 EB 染色液

戴手套小心称量 200 mg EB,转移到棕色广口瓶中,加入 20 mL 水或者 TE,搅拌至完全溶解,配制成 10 mg/mL 的浓缩液,于 4 °C 储存。使用时每 20 mL 水或者 TE 溶液中加入 1 μL 浓缩液,配制成 0.5 μg/mL 的 EB 染色液。

附 录 C
(资料性附录)

牛棒状杆菌主要生化反应特性

牛棒状杆菌、库氏棒状杆菌和伪结核棒状杆菌的主要生化反应特性比较,见表 C.1。

表 C.1 牛棒状杆菌、库氏棒状杆菌和伪结核棒状杆菌的主要生化反应特性

项目	牛棒状杆菌 (<i>C.bovis</i>)	库氏棒状杆菌 (<i>C.kutscheri</i>)	伪结核棒状杆菌 (<i>C.pseudotuberculosis</i>)
β -溶血	—	V	+
七叶苷	—	+	+
明胶(25℃)	—	—	—
还原硝酸盐	—	+	V
脲酶	—	+	—
葡萄糖	+	+	+
麦芽糖	—	+	+
蔗糖	—	+	—
木糖	—	—	—
注 1: +, 阳性反应; —, 阴性反应; V, 变化不定。			
注 2: 此表中增列库棒状杆菌、伪结核棒状杆菌的主要生化反应特性, 以便于同牛棒状杆菌鉴别。			

附 录 D
(规范性附录)
扩增产物的参考序列

D.1 牛棒状杆菌 *16SrRNA* 基因扩增产物的 1 391 bp 片段的参考序列(9 bp~1 399 bp)

```

1  gatcctggct caggacgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacggaaagn
61  cccagcttn ctggggact cgagtggcga acgggtgagt aacacgtggg tgatctgccc
121 tgcactctgg gataagcctg ggaaactggg tctaataccg gataggaccg tgctttagtg
181 tgtgcggtgg aaagtttttc ggtgcaggat gageccgcgg cctatcagct tgttggtggg
241 gtaatggcct accaaggcgg cgacgggtag ccggcctgag aggggtgtacg gccacattgg
301 gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg cacaatgggc
361 gcaagcctga tgcagcgacg ccgcgtgggg gatgacggcc ttcgggttgt aaacccttt
421 cggcagggac gaagcttttg tgacggtacc tgcataagaa gcaccggcta actacgtgcc
481 agcagccgcg gtaatacgtg ggggtgcgagc gttgtccgga attactgggc gtaaagagct
541 cgtaggttgt ttgtcgctc gtctgtgaaa tcccggggct taactccggg cgtgcaggcg
601 atacgggcat aacttgagtg ctgtagggga gactggaatt cctggtgtag cggtgaaatg
661 cgcagatata aggaggaaca ccgatggcga aggcaggctc ctgggcagta actgacgctg
721 aggagcgaaa gcatgggtag cgaacaggat tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg
781 gtgggcgcta ggtgtgggga tttccacga tttccgtgcc gtagctaacg cattaagcgc
841 cccgcctggg gactacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca
901 agcggcggag catgtggatt aatcgatgc aacgcgaaga acctacctg ggcttgacat
961 gggcaggacc ggcgtaggag cactcttcc cttttgggct tgttcacagg tgggtgcatgg
1021 ttgtcgtag ctcgtgtcgt gagatgttgg gtttaagtcg gcaacgagcg caaccctgt
1081 cttgtgttgc cagcacgtaa tggtagggac tcgcgagaga ctgccggggg taactcggag
1141 gaaggtgggg atgaagtcga atcatcatgc cccttatgtc cagggttca ccatgctac
1201 aatggctcgt acagtgggtt gcgatgccgc gaggtcagc taatccetta aagccggtct
1261 cagttcggat tggagtctgc aactcgacte catgaagtcg gagtcgctag taatcgaga
1321 tcagcaacgc tgcggtgaat acgttccgg gcctgtaca caccgccgt cacgtcatga
1381 aagttggtaa c

```

D.2 牛棒状杆菌 *rpoB* 基因扩增产物的 1 167 bp 片段的参考序列(1 959 bp~3 125 bp)

```

1  aagttcgagc gcaccaacca gggcacctgc tacaaccaga agcccctcgt cgacgagggt
61  gaccgcgtcg aggccggcca ggccatcgcc gacggccccg gcaccgacaa cggtagatg
121 gcgctgggca agaacctgct cgtegccttc atgccgtggg agggccacaa ctacgaggac
181 gcgatcatcc tcaaccagcg catggtggag gaggacgtgc tcacctgat ccacatcgag
241 gagcacgaga tcgacgcccg cgacacgaag ctccggccccg aggagatcac ccgggacatc
301 ccgaacgtcg gcgaggacgt cctcgcggac ctgcagcacc gcggcatcgt gcgcacggc
361 gccgacgtcc gcgacggcga catcctcgtc ggcaaggtea cgccgaaggg cgagaccgag
421 ctgaccccgg aggagcgctt gctccgtgcg atcttcggcg agaaggcccc tgaggtccgc

```


481	gacacgtcga	tgaaggtecc	qcacggcgag	tccggcaagg	tcatcggtgt	ccgggtgttc
541	tcgagggagt	acgacgacga	qctcgceccc	ggtgtcaacg	agatgggtccg	ggtgtacgtc
601	gcccagaagc	gcaagatcca	ggacgggtgac	aagctcgcg	gccgccacgg	caacaagggt
661	gtcgtcggcc	gcatcctccc	cgcggaggac	atgccgttcc	tcccggacgg	caccccggtc
721	gacatcattc	tcaacaccca	cggtgtgccc	cgctgtatga	acatcggcca	ggtgctggag
781	atccacctcg	gctggctggc	gaaggccggc	tggtccgtag	acacgaactc	cgacgacccg
841	aagatcaagg	ccatgctcga	gcagctcccc	gaggagctgt	acgacgtgcc	ggccgactcg
901	ctcaccgcga	cgccgggtgtt	cgacggcgcc	tcgaacgagg	agctgtccgg	cctgctccgg
961	tcctcccgcc	cgaaccgcga	cggcatccgc	ctcgtcgacg	actacggcaa	ggccgagctc
1021	atcgacggcc	ggtccggcga	gcccttccc	taccgggtgt	ccgtgggcta	catgtacatg
1081	ctcaagctgc	accacctcgt	ggacgagaag	atccacgcgc	gggccacggg	cccgtactcc
1141	atgatcacc	agcagccgct	cggtggt			
