ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 363—2026

血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌检测技术

Detection technology for serotype 4h *Listeria monocytogenes*

中国兽医协会 CVMA
全国团体标准信息平台

2026－3－4 发布　　2026－3－4 实施

中国兽医协会　　发布

全国兽医兽药学会
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。

本文件由扬州大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：扬州大学、国家食品安全风险评估中心、中国动物疫病预防控制中心、安徽省动物疫病预防与控制中心、江苏立华食品集团股份有限公司。

本文件主要起草人：焦新安、殷月兰、郭云昌、李薇薇、孙雨、陈静、姚浩、孙佳善、胡亚辰。

中国兽医协会 CVMA 全国团体标准信息平台

引　言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到条目 9.8 和附录 D 相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：扬州大学（殷月兰、宁海波、徐国晨、杜洪香、姚浩）。

地址：江苏省扬州市文汇东路 48 号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

中国兽医协会 CVMA 全国团体标准

血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌检测技术

1 范围

本文件规定了动物源样品中血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌的设备和材料、培养基和试剂、样品采集、保存与运输、分离培养、生化鉴定、协同溶血反应、多重 PCR 及荧光 PCR 鉴定方法。

本文件适用于动物源样品中血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌的分离及定性与定量检验。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样本采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌 serotype 4h *Listeria moncytogenes*

指细菌菌体抗原（O 抗原）为 4；鞭毛抗原（H 抗原）为 AB 的特征。该血清型菌株的序列分型为 ST626，不能利用鼠李糖进行代谢。在羊血琼脂平板上，与马红球菌共培养时可观察到协同溶血现象。在灌胃感染模型中，该菌株在小鼠脏器中的定植能力是现有强毒力李斯特菌的 200 至 400 倍。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（base pair）

CFU：菌落形成单位（Colony forming units）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylene diamine tetraacetic acid)

FB：Fraser肉汤增菌液（Fraser borth）

Lm：单核细胞增生李斯特菌（Listeria monocytogenes）

OA：李斯特菌显色培养基（Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti）

OD：光密度（Optical density）

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

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

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

5.1.2 缓冲蛋白胨水：按附录 A 中 A.1 制备。

5.1.3 含 0.6 %酵母膏粉的胰酪胨大豆琼脂（TSA-YE）：按 A.2 制备。

5.1.4 Fraser 增菌肉汤（FB1、FB2）：按 A.3 制备。

5.1.5 OA 李斯特菌显色培养基：按 A.4 制备。

5.1.6 5 %～8 %羊血琼脂：按 A.5 制备。

5.1.7 糖发酵管：按 A.6 制备。

5.1.8 50× TAE 缓冲液：按 A.7 制备。

5.1.9 1.2 %琼脂糖凝胶：按 A.8 制备。

5.1.10 2× Taq PCR Mix。

5.1.11 无核酸酶水。

5.1.12 绿如蓝核酸染料。

5.1.13 DNA 分子 Marker。

5.1.14 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

5.2 耗材

5.2.1 锥形瓶：250 mL、500 mL。

5.2.2 无菌吸管：5 mL（具 0.1 mL 刻度）。

5.2.3 无菌培养皿：直径 90 mm。

5.2.4 无菌摇菌管：12 mL。

5.2.5 无菌接种环：1 μL、10 μL。

5.2.6 无菌枪头：10 μL、200 μL、1000 μL。

5.2.7 灭菌器械：解剖刀、剪刀、镊子、注射器及针头。

5.2.8 容器：带螺帽容器、灭菌自封口塑料袋。

5.2.9 个人防护用具：防护服、防护镜、防护帽、防护靴、医用防护口罩、医用一次性乳胶手套。

中国兽医协会 CVMA

5.2.10　采样记录用品：采样单、记号笔、防水标签等。

5.2.11　其他：无菌棉拭子、医用棉签、医用纱布、封口膜、冰袋等。

6　仪器设备

6.1　冰箱：2 ℃～8 ℃。

6.2　恒温培养箱：30 ℃±1 ℃、36 ℃±1 ℃。

6.3　高压灭菌锅：灭菌温度为121 ℃，工作压力为0.1 MPa。

6.4　恒温震荡培养箱。

6.5　电子天平：感量0.01 g。

6.6　均质器。

6.7　干式恒温金属浴。

6.8　离心机。

6.9　基因扩增仪。

6.10　凝胶成像仪。

6.11　生物安全柜。

6.12　荧光定量PCR扩增仪。

7　菌株

7.1　血清型4h单核细胞增生李斯特菌XYSN或其他等效菌株。

7.2　单核细胞增生李斯特菌EGD-e或其他等效菌株。

7.3　伊氏李斯特菌（*Listeria ivanovii*）ATCC 19119或其他等效菌株。

7.4　马红球菌（*Rhodococcus equi*）ATCC 6939或其他等效菌株。

8　生物安全要求

样品处理和核酸提取以及废弃物处理按照GB 19489规定，在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。

9　检验流程

血清型4h单核细胞增生李斯特菌检验流程按附录B。

10　操作程序

10.1 采集、运输与保存

10.1.1 样品采集与处理

10.1.1.1 一般要求

样品采集和处理应按照NY/T 541有关规定进行，可采集粪便、肛拭子、肠道内容物、动物胴体、肉组织样品等。

10.1.1.2 粪便样品

采集新鲜粪便 25 g 以上，不足 25 g 的称取相应质量，使用带螺帽容器或灭菌自封口塑料袋，于 2 ℃～8 ℃条件下运送至实验室。

10.1.1.3 肛拭子样品

应取无菌棉拭子插入肛门或泄殖腔中，旋转 2～3 圈，刮取直肠黏液或粪便，放入装有保护液的灭菌离心管中送检。

10.1.1.4 肠道内容物样品

应在肠壁表面，用一次性注射器扎穿肠壁，从肠腔内吸取内容物放入装有平衡盐溶液的带螺帽容器中送检；或将带有粪便的肠管两端结扎，从两端剪断装入灭菌自封口塑料袋后送检。

10.1.1.5 动物胴体样品

依照屠宰生产流程，用无菌蛋白胨水浸润的棉球在动物体表擦拭，擦拭面积约为 50 cm^2～100 cm^2（视动物体型而定），然后将棉球置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。对不同样品每次更换无菌一次性乳胶手套。

10.1.1.6 肉组织样品

使用无菌采样袋采集肉组织样 25 g 以上，密封保存并做好标记。

10.1.2 样品运输与保存

样品采集后应在 2 ℃～8 ℃条件下运输，并于 24 h 内送达实验室。在 2 ℃～8 ℃条件下保存不应超过 24 h，如超过 24 h 需-20 ℃冷冻保存。

10.2 一次增菌

样品的增菌和分离培养参照 GB 19489 规定，在相应等级的生物安全柜中进行操作。

将采集到的样品装入无菌采样袋中，向装有样品的采样袋中添加 225 mL FB1 增菌液，经均质仪充分混匀后，30 ℃ ± 1 ℃静置培养 24 h。不足 25 g 的样本（粪便、肠道内容物和肛拭子样本），称取相应样本质量，加入样品重量 9 倍体积的 FB_1 培养基后用均质仪混匀。

10.3 二次增菌

取出完成一次增菌后的采样袋，打开并从中吸取 100 μL 的培养液加入到提前装好 10 mL FB_2 增菌液的摇菌管中，再次放入培养箱中，36 ℃ ± 1 ℃静置培养 24 h，完成二次增菌。

10.4 分离培养

取 10 μL 培养液在 OA 李斯特菌显色培养基上进行三区划线，然后在 36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h，形成蓝绿色菌落，周围有不透明晕环，随后将其在 TSA-YE 平板上进一步三区划线纯化，并放入培养箱中 36 ℃ ± 1 ℃培养 12 h 直至长出灰白色、半透明、边缘整齐的露滴状单菌落。

10.5 生化鉴定

选取疑似菌落，测定细菌发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、鼠李糖和木糖及水解七叶苷的能力。也可利用全自动微生物生化鉴定系统鉴定。单核细胞增生李斯特菌的生化特征见表 1。

表 1 李斯特菌的生化特征

菌种	葡萄糖	麦芽糖	甘露醇	鼠李糖	木糖	七叶苷
单核细胞增生李斯特菌	+	+	-	+	-	+
血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌	+	+	-	-	-	+
伊氏李斯特菌	+	+	-	-	-	+

10.6 协同溶血反应

在羊血琼脂平板上平行划线接种马红球菌，挑取纯培养的单个可疑血清型 4h 李斯特菌菌落垂直划线接种于平行线之间，垂直线两端不要触及平行线，距离 2 mm 左右，同时分别接种单核细胞增生李斯特菌、伊氏李斯特菌，于 36 ℃ ± 1 ℃培养 24 h。血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌和伊李斯特菌在靠近马红球菌处出现铲型溶血现象，其他血清型单核细胞增生李斯特菌不出现协同溶血反应见表 2。

表 2 李斯特菌协同马红球菌溶血反应

菌种	铲型协同溶血反应
血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌	+
其他血清型单核细胞增生李斯特菌	-
伊氏李斯特菌	+

10.7 多重 PCR 反应

10.7.1 细菌 DNA 提取

取9.2中处理的样品，12 000 r/min离心2 min获取细菌沉淀，加入180 μL浓度为50 mg/mL的溶菌酶36 ℃±1 ℃静置处理1 h后，按照细菌DNA提取方法或使用商品化的细菌基因组DNA提取试剂盒提取DNA，获得DNA模板。阳性对照和阴性对照的制备参照附录C。

10.7.2 引物

多重PCR反应引物序列见附录D中D.1。

10.7.3 多重 PCR 反应体系

多重PCR反应体系见D.2。

10.7.4 多重 PCR 反应程序

多重PCR反应程序见D.3。

10.7.5 结果判定

取10 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，并以marker DNA 2000为参照，设置130 V，作用时间35 min。血清型4h菌株作为阳性对照，可同时扩增出在429 bp和211 bp两条带，其他种李斯特菌作为阴性对照，无法扩增出条带。在阴性对照和阳性对照成立的前提下，若扩增出针对*LMxysn_1693*和*lmo1210*基因大小分别为429 bp和211 bp的条带，则分离菌株为血清型4h单核细胞增生李斯特菌。仅扩增出211 bp大小条带，为其他血清型单核细胞增生李斯特菌。所用参考菌株和具体结果见D.4和D.5。

10.8 荧光 PCR 检测方法

10.8.1 引物及荧光探针

为鉴定单核细胞增生李斯特菌和伊氏李斯特菌种，分别选择单核增生李斯特菌特有的 *plcB* 目的基因片段以及血清型 4h 单核增生李斯特菌和伊氏李斯特菌共有的 *i-inlE* 目的基因片段，*plcB* 引物（plcB-F 和 plcB-R）及其探针组成的单重荧光定量 PCR 反应体系可以检测单核细胞增生李斯特菌，*i-inlE* 的引物（i-inlE-F 和 i-inlE-R）及其探针组成的单重荧光定量 PCR 反应体系可以检测伊氏李斯特菌和血清型 4h 的单核细胞增生李斯特菌；而 2 种引物（plcB-F 和 plcB-R）和（i-inlE-F 和 i-inlE-R）及各自探针共同组成的多重荧光定量 PCR 反应体系进行单核细胞增生李斯特菌和伊氏李斯特菌种的鉴定以及血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌鉴定。具体引物及探针序列见附录 E 中 E.1。

10.8.2 荧光 PCR 反应体系

荧光PCR反应体系见E.2。

10.8.3 荧光 PCR 反应程序

荧光PCR反应程序见E.3。

10.8.4 结果判定

试验成立条件：阳性对照有特异性扩增曲线且Ct值<30，阴性对照无Ct值或阴性对照Ct值>30且无特异性扩增曲线，试验结果有效；否则应重新进行试验。

被检样品有特异性扩增曲线，而且Ct值≤30，可判定为相应型的*Listeria monocytogenes*和*Listeria ivanovii*核酸阳性。

被检样品无Ct值或Ct值>30，且无特异性扩增曲线，判定为*Listeria monocytogenes*和*Listeria ivanovii*核酸阴性。

在实验结果有效前提下，若单独出现FAM对应荧光信号判定为单核细胞增生李斯特菌，单独出现VIC对应荧光信号判定为伊氏李斯特菌；若共同出现两种荧光信号则判定为血清型4h单核细胞增生李斯特菌核酸。

11 综合判定

分离的李斯特菌在OA李斯特菌显色平板上形成蓝绿色菌落，周围有不透明晕环，不利用鼠李糖，协同溶血反应阳性，多重PCR鉴定结果中同时出现429 bp和211 bp大小的两条带，或荧光定量PCR结果中同时出现FAM和VIC对应荧光信号，确定为血清型4h单核细胞增生李斯特菌核酸阳性。

附　录　A
（规范性）
培养基和试剂

A.1　蛋白胨水缓冲液

A.1.1　成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
无水磷酸氢二钠	3.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2　制法

取缓冲蛋白胨 20 g 于 1 L 蒸馏水中，加热搅拌至完全溶解，121℃高压灭菌 15 min，备用。

A.2　含 0.6 %酵母膏粉的胰酪胨大豆琼脂（TSA-YE）

A.2.1　成分

胰蛋白胨	17.0 g
多价胨	3.0 g
酵母膏粉	6.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2　制法

加热溶解上述各组分，调节 pH 至 7.2 ± 0.2，121 ℃高压灭菌 15 min，冷到 50 ℃左右，无菌操作倾注平板，备用。

A.3　Fraser增菌肉汤（FB_1、FB_2）

A.3.1　基础培养基

A.3.1.1　成分

胰蛋白胨	5.0 g

牛肉膏粉	5.0 g
酵母膏粉	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.35 g
磷酸氢二钠	12.0 g
氯化锂	3.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.1.2　制法

加热溶解上述各组分，调节pH至7.2 ± 0.2，121℃高压灭菌15 min，备用。

A.3.2　添加剂

A.3.2.1　1 %萘啶酮酸溶液

将0.5 g萘啶酮酸钠盐溶于50 mL 0.05 mol/L氢氧化钠中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A.3.2.2　0.25 %盐酸吖啶黄溶液

将0.25 g盐酸吖啶黄溶于100 mL蒸馏水中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A.3.2.3　5 %柠檬酸铁铵溶液

将5 g柠檬酸铁铵溶于100 mL蒸馏水中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A.3.3　完全培养基

A.3.3.1　FB_1增菌肉汤

基础培养基（A. 3. 1)	984 mL
1 %萘啶酮酸溶液（A. 3. 2. 1）	1 mL
0.25 %盐酸吖啶黄溶液（A. 3. 2. 2）	5 mL
5 %柠檬酸铁铵溶液（A. 3. 2. 3）	10 mL

A.3.3.2　FB_2增菌肉汤

基础培养基（A. 3. 1)	978 mL
1 %萘啶酮酸溶液（A. 3. 2. 1）	2 mL

0.25 %盐酸吖啶黄溶液（A. 3. 2. 2　　10 mL

5 %柠檬酸铁铵溶液（A. 3. 2. 3）　　10 mL

A. 4　OA李斯特菌显色培养基

A. 4. 1　基础培养基

A. 4. 1. 1　成分

蛋白胨	18.0 g
胰蛋白胨	6.0 g
酵母膏粉	10.0 g
丙酮酸钠	2.0 g
葡萄糖	2.0 g
甘油磷酸镁	1.0 g
硫酸镁（无水）	0.5 g
氯化钠	5.0 g
氯化锂	10.0 g
磷酸氢二钠（无水）	2.5 g
溴-4-氯-3-吲哚-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.05 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 4. 1. 2　制法

加热溶解上述各组分，调节 pH 至 7.2 ± 0.2，121℃高压灭菌 15 min，备用。

A. 4. 2　添加剂

A. 4. 2. 1　0. 4 %萘啶酮酸溶液

将0.02 g萘啶酮酸钠盐溶于5 mL氢氧化钠中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A. 4. 2. 2　0. 4 %头孢他啶溶液

将0.02 g头孢他啶溶于5 mL蒸馏水中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A. 4. 2. 3　多粘菌素 B 溶液

将76 700 IU硫酸多粘菌素B溶于5 mL蒸馏水中，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A. 4. 2. 4　2 %环己酰亚胺溶液

将0.05 g环己酰亚胺溶于2.5 mL无水乙醇中，然后加蒸馏水2.5 mL，并通过0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A.4.2.5　0.1 %两性霉素 B 溶液（作为环己酰亚胺溶液的替代品）

将2.5 mL盐酸（1 mol/L）和7.5 mL二甲基甲酰胺（DMF）混合成HCl/DMF溶液，加0.01 g两性霉素溶解后，用0.45 μm的无菌滤膜过滤除菌。

A.4.2.6　L-α-磷脂酰肌醇溶液

将2 g的L-α-磷脂酰肌醇溶于50 mL蒸馏水中（可以使用2 g含有9 %～15 %的未分级磷脂酰肌醇的大豆卵磷脂代替L-α-磷脂酰肌醇），搅拌30 min直至获得均匀的悬浮液。121 ℃高压灭菌15 min，备用。

A.4.3　完全培养基

基础培养基（A. 4. 1)	930 mL
0.4 %萘啶酮酸溶液（A. 4. 2. 1）	5 mL
0.4 %头孢他啶溶液（A. 4. 2. 2）	5 mL
多粘菌素 B 溶液（A. 4. 2. 3）	5 mL
2 %环己酰亚胺溶液（A. 4. 2. 4）	5 mL
或 0.1 %两性霉素 B 溶液（A. 4. 2. 5）	10 mL
α-磷脂酰肌醇溶液（A. 4. 2. 6）	50 mL

在基础培养基（A. 4. 1) 冷却至50 ℃左右，依次加入萘啶酮酸、头孢他啶、多粘菌素B、环己酰亚胺或两性霉素B、L-α-磷脂酰肌醇溶液。每次添加均需立即充分混匀。完全培养基的pH在25 ℃下应为7.2±0.2，介质应均匀呈轻微乳白色。混合后倾倒在无菌平皿中，每块平皿倒入15～20 mL，凝固后备用。

A.5　血琼脂

A.5.1　成分

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	1.5 g
蒸馏水	100 mL
脱纤维羊血	5 mL

A.5.2 制法

除新鲜脱纤维羊血外，加热溶解上述各组分，121 ℃高压灭菌15 min，冷到50 ℃左右后，,以无菌操作加入5 mL新鲜脱纤维羊血，摇匀，倾注平板，备用。

A.6 糖发酵管

A.6.1 糖发酵基础肉汤

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	3.0 g
十二水磷酸氢二钠	2.0 g
0.2 %溴麝香草酚蓝溶液	12.0 mL
蒸馏水	100 mL

A.6.2 制法

A.6.2.1 将上述各组分加热搅拌溶解，必要时调节 pH，分装每瓶 100 mL，121 ℃高压灭菌 15 min，备用。糖发酵基础肉汤灭菌后 25 ℃的 pH 应为 7.4±0.2。

A.6.2.2 葡萄糖发酵管：用蒸馏水将葡萄糖配制成 10 %溶液，121 ℃高压灭菌 15 min。无菌吸取 5 mL 葡萄糖溶液加入按 A.6.2.1 配制成的 100 mL 糖发酵基础肉汤内，混匀后，以无菌操作分装于小试管中，备用。糖发酵管 25 ℃的 pH 应为 7.4±0.2。

A.6.2.3 其他各种糖发酵管：按 A.6.2.2 葡萄糖发酵管的配制方法制备其他糖发酵管。

A.7 50× TAE电泳缓冲液

A.7.1 成分

三羟甲基氨基甲烷	24.2 g
冰乙酸	10 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠	10 mL
蒸馏水	100 mL

A.7.2 制法

将上述制剂完全溶解于100 mL蒸馏水中，室温保存。使用时用去离子水稀释为1×TAE。

A.8 1.2 %琼脂糖凝胶

A.8.1 成分

琼脂糖	1.2 g

1× TAE 电泳缓冲液　　100 mL

A.8.2　制法

称取 1.2 g 琼脂糖于 100 mL 1× TAE 缓冲液中，加热融化后充分摇匀，待冷至 50 ℃ ~ 60 ℃时，加入 5 μL 绿如蓝染料。摇匀，倒入插好梳子的电泳板上，凝固后取下梳子，备用。

中国兽医协会 CVMA 全国团体标准信息平台

附　录　B
（资料性）
血清学 4h 单核细胞增生李斯特菌检验流程

血清学 4h 单核细胞增生李斯特菌检验流程按图 1。

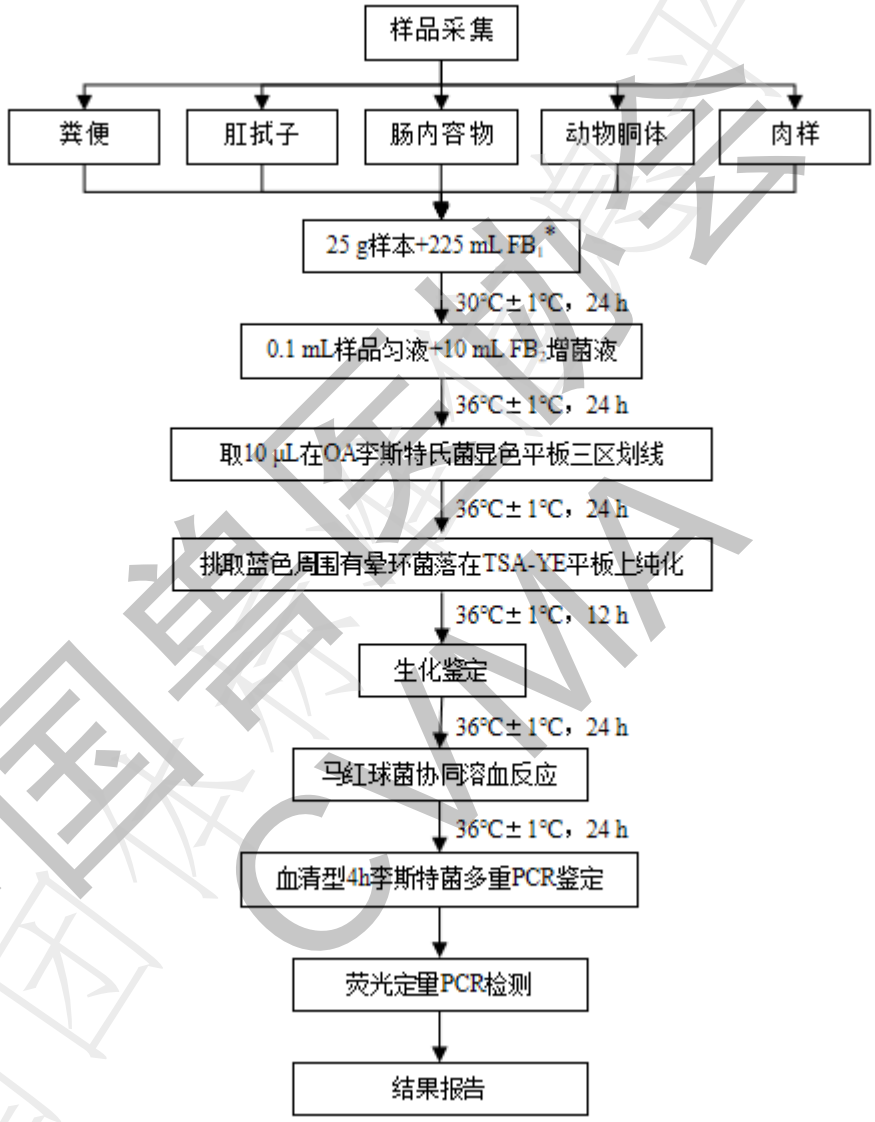

图1. 动物源样本中血清型4h单核细胞增生李斯特菌检验流程图

（*注：若样品不足25 g，加样品重量9倍体积的FB_1培养基）

中国兽医协会 CVMA 全国团体标准信息平台

附　录　C
（资料性）
血清学 4h 单核细胞增生李斯特菌阳性和阴性对照制备

C.1　LMxysn_*1693* 阳性对照序列（XYSN，GenBank Accession No.CP007583.1）

5′-ATGAAGAAAGACATAAAAAAGAGATACATTAGTTTAATAGTAATTGGGGCATTG**ATGGTGGGTATGACCTTTCCTT**ATGGTACTACCGTACATGCAGACAGTGTTCAAAGTGATAACTTATATCCAAGTGATCAAGTGAATACTGATAATCAGTTTATTGTCTTGGATGATTACACTATAACGGATGAGGAAGGTAATATAGTTAATGAGGAGCAGAATAAAAATTCACATCTTCTTAAGTCAGCTACAGGGTTCCACTACAAAACATTGTCTCAGTCAATGAAAAAAGGTAGCAGAACTTATTTGGGAAAAAAGAAATATAAAAAAGGCTTTGATTTTAGTGTGAAAGTAATCGTAAAAGGTGTATATGTTAACTTGGGAGGATATGCATCAAAAACTGGATATTATAAAGAGTATAAACAAAATGTAAAGATAACTGTTAAAGTTAAAAAATATGAAAA**TGGATCAGGAAAGTATGTTGGA**ACCTACACCTATACATCTAATACTTCATATGTAGATAGAATTCCAGTATAA-3′

注：下划线部分为连入pMD-19T载体中的包含4h单核细胞增生李斯特菌LMxysn_*1693*目标检测片段部分，粗体为引物序列。

C.2　*lmo1210* 阳性对照序列（EGD-e，GenBank Accession No.AL591824.1）

5′-ATGACAAAAAGATCATCCAAATCATTATTACTATTTATGGCAATGGGACTTGTTTCTGGACTACTTTCCCCGATTCAAACGTCGATTAATAGCCAACTTCGGCTAACTGTCGGTTCTCCTTTTGTGGCATCATTTATTTCCTTTTTAGTTGGGACGACTTTGCTTACACTGGTTTGTTTAATCGTTGAGC**GTCGTTTGACTTTTCAACTGA**AAGGTGTCGGCCGAATTCCTTGGTGGGTTTTCACTGGCGGTGCGCTTGGAGTGCTCTTCGTAACTTCTAACATTTTACTTTTACCATTACTCGGCTCAGCAATGACGGTTGTTTTAGCGCTTTGTGGGCAAATGATTATTGCACTTATTATTGATCATTTTGGTTTTT**TCGGGGTTATTCCTCATCCAAT**TAACCGTTATCGTATGATTGGTGTTTTATTAATGCTTATTGGTGTATTTTTAATTCAACGTTTTTAA-3′

注：下划线部分为连入 pMD-19T 载体中的包含 4h 单核细胞增生李斯特菌 *lmo1210* 目标检测片段部分，粗体为引物序列。

C.3　阳性对照与阴性对照制备方法

将附录 C.1 和 C.2 中阳性序列合成基因片段，克隆至 pMD19-T 载体，再转化至 DH5α 感受态细胞，构建重组质粒。重组质粒经测序正确即为目的阳性重组质粒。利用超微量分光光度计测定阳性重组质粒浓度，将浓度稀释至 100 ng/μL，取 2 μL 作为阳性对照。

用 2 μL 的无核酸酶水替代 DNA 模板作为阴性对照。

附　录　D
（规范性）
多重 PCR 引物、反应体系和反应程序

D.1　多重PCR引物

多重PCR体系引物与序列按表D.1。

表D.1 多重PCR引物与序列

靶基因	引物序列（5’-3’）	产物大小	目的菌株
LMxysn_*1693*	F: ATGGTGGGTATGACCTTTCCTT	429 bp	血清型4h的Lm
	R: TCCAACATACTTTCCTGATCCA		
lmo1210	F: GTCGTTTGACTTTTCAACTGA	211 bp	其他血清型Lm
	R: ATTGGATGAGGAATAACCCCG		

D.2　多重PCR反应体系

多重PCR反应体系按表D.2。

表D.2 多重PCR反应体系（25 μL）

组分	体积（μL）	终浓度（μM）
2×Taq Mater Mix	12.5 μL	\
LMxysn_1693 上游（10 μmol/L）	1 μL	0.4
LMxysn_1693 下游（10 μmol/L）	1 μL	0.4
lmo1210 上游（10 μmol/L）	1 μL	0.4
lmo1210 下游（10 μmol/L）	1 μL	0.4
DNA 模板	2 μL	\
无核酸酶水	6.5 μL	\
总计	25 μL	\

D.3　多重PCR反应程序

多重 PCR 反应程序按表 D.3。

表D.3 多重PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
95 ℃	5 min	1
95 ℃	30 s	30
55 ℃	30 s	
72 ℃	1 min	
72 ℃	10 min	1

中国兽医协会 CVMA 全国团体标准信息平台

D.4 多重PCR检测参考菌株

多重 PCR 检测参考菌株按表 D.4。

表D.4 多重PCR检测参考菌株

序号	中文名	菌株编号	血清型
1	单核细胞增生李斯特菌	XYSN	4h
2	单核细胞增生李斯特菌	15LG	4h
3	单核细胞增生李斯特菌	16E	4h
4	单核细胞增生李斯特菌	EGD-e	1/2a
5	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ113	1/2b
6	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ114	1/2c
7	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ115	3a
8	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ116	3b
9	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ117	3c
10	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ118	4a
11	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ119	4ab
12	单核细胞增生李斯特菌	NTSN	4b
13	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ122	4c
14	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ121	4d
15	单核细胞增生李斯特菌	LmBJ123	7
16	伊氏李斯特菌	ATCC 19119	-
17	无害李斯特菌	LBJ131	-
18	塞氏李斯特菌	LBJ133	-
19	格氏李斯特菌	LBJ136	-
20	威氏李斯特菌	LBJ137	-

注：“-”为多重 PCR 结果阴性。

D.5 多重PCR检测鉴定结果示意图

血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌多重 PCR 鉴定结果，按图 D.1。

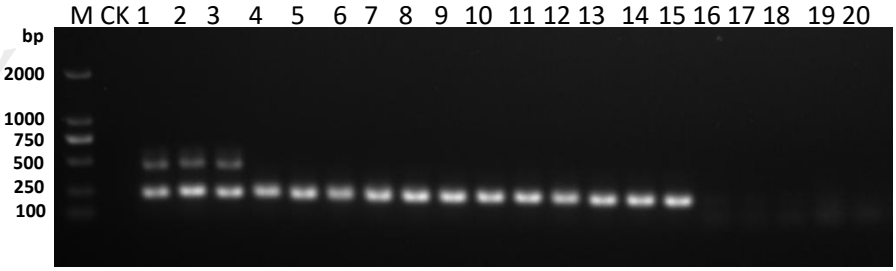

图 D.1 血清型 4h 单核细胞增生李斯特菌多重 PCR 鉴定结果示意图

附　录　E
（规范性）
荧光 PCR 引物、反应体系和反应程序

E.1　荧光PCR引物和探针

荧光PCR引物和探针序列按表E.1。

表E.1 荧光PCR引物和探针序列

扩增片段	引物序列（5’-3’）	荧光探针	产物大小
plcB	F: GCGGATCATAAAAATCCATAT	FAM-CTAATGCGAAAATAACAGGAGC-BHQ1	224 bp
	R: TGCATAGGTTGACTAATATCC		
i-inlE	F: AGTAGTAGCAATGTTAGTATTAATTG	VIC- ACTTTAGGAAAACAAAGTGTTACAGA-MGB-NFQ	222 bp
	R:　CTTTCATTACCATTTAATCCTTG		

E.2　荧光PCR反应体系

荧光 PCR 反应体系按表 E.2。

表E.2 荧光PCR反应体系（25 μL）

成分	pMD-19T-*plcB* 反应体系	pMD-19T-*i-inlE* 反应体系
Premix Ex Taq (Probe qPCR)	10 μL	10 μL
10 μmol/μL 上游引物	0.6 μL	0.8 μL
10 μmol/μL 下游引物	0.6 μL	0.8 μL
ROX Reference Dye II（50X Conc）	0.4 μL	0.4 μL
10 μmol/μL 探针	0.6 μL	0.8 μL
模板	2 μL	2 μL
无核酸酶水	3.4 μL	3.4 μL
总计	20 μL	20 μL

E.3　荧光PCR反应程序

荧光 PCR 反应程序按表 E.3。

表E.3 荧光PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
95 ℃	30 s	1
95 ℃	5 s	40
56 ℃	30 s	

中国兽医协会 CVMA 全国兽医技术服务平台