



中华人民共和国国家标准

GB/T 35909—2018

猪肺炎支原体 PCR 检测方法

Detection of mycoplasma hyopneumoniae using PCR method

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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：江苏省农业科学院。

本标准起草人：邵国青、冯志新、熊祺琰、刘茂军、张磊、王海燕、武昱孜、韦艳娜、刘蓓蓓、甘源、华利忠、王佳、王丽。



猪肺炎支原体 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪肺炎支原体 PCR 检测的操作方法。

本标准适用于实验室对猪临床样品(猪鼻拭子、肺组织和支气管肺泡灌洗液)、细菌培养物和动物产品中猪肺炎支原体核酸的快速检测。

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 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

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

病死及病害动物无害化处理技术规范 农医发[2017]25 号

兽医实验室生物安全管理规范(中华人民共和国农业部公告第 302 号)

3 术语和定义及缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

猪肺炎支原体 *Mycoplasma hyopneumoniae*; MHP

支原体科支原体属(*Mycoplasma*)成员,是猪支原体肺炎(MPS)的主要病原体。

注:猪支原体肺炎又称猪气喘病,是一种经呼吸道感染的慢性病,对养猪业造成严重危害。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

PBS 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline buffer)

TAE TAE 电泳缓冲液(tris-acetate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

TBE TBE 电泳缓冲液(tris-borate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

Taq 酶 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

dNTPs 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

CCU 颜色变化单位(color change unit)

MPS 猪支原体肺炎(mycoplasmal pneumonia of swine)

4 仪器设备

- 4.1 高速冷冻离心机。
- 4.2 核酸电泳仪。
- 4.3 恒温水浴锅。
- 4.4 凝胶成像系统。
- 4.5 PCR 扩增仪。
- 4.6 水平电泳槽。
- 4.7 微量移液器(量程:0.5 μL ~10 μL ;2 μL ~20 μL ;20 μL ~200 μL ;100 μL ~1 000 μL)。
- 4.8 组织匀浆器。

5 试剂和材料

5.1 引物

上游引物:5'-GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA-3'

下游引物:5'-TGTGTTAGTGACTTTTGCCACC-3'



5.2 猪肺炎支原体阳性对照样品及阴性对照样品

以灭活前浓度为 1×10^5 CCU/mL~ 1×10^8 CCU/mL 的猪肺炎支原体菌液培养物(由指定单位提供),经 PCR 检测不含猪絮状支原体、猪滑液支原体和猪鼻支原体后作为阳性对照样品,以无菌双蒸水作为阴性对照样品。

5.3 试剂

- 5.3.1 除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 的要求。
- 5.3.2 *Taq* 酶。
- 5.3.3 PCR 反应缓冲液(与 *Taq* 酶匹配)。
- 5.3.4 氯化镁(MgCl_2 ,25 mmol/L)。
- 5.3.5 dNTPs(dATP,dCTP,dGTP,dTTP,各 2.5 mmol/L)。
- 5.3.6 酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比 25 : 24 : 1)。
- 5.3.7 三氯甲烷。
- 5.3.8 异丙醇($-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷)。
- 5.3.9 琼脂糖。
- 5.3.10 DNA 相对分子质量标准 Marker DL 2000。
- 5.3.11 0.01 mol/L PBS 液(pH 7.2 ~ pH 7.4)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.12 DNA 提取液(配制方法见附录 A)。
- 5.3.13 75%乙醇(配制方法见附录 A)。
- 5.3.14 TE 溶液(pH 8.0)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.15 电泳缓冲液($1 \times \text{TBE}$ 或 $1 \times \text{TAE}$)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.16 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.17 上样缓冲液(配制方法见附录 A)。

6 操作程序

6.1 样品采集、运输、处理和检测的生物安全要求

有关生物安全和防止交叉污染的措施见附录 B。

6.2 样品采集和运输

6.2.1 新鲜肺组织样品采集和运输

剖检未腐败病死猪或发病猪,采集具有特征病变与正常组织连接处的肺组织 0.5 g~1.0 g,置于无菌密封袋或密封容器中,于 2℃~8℃下 24 h 内完成运送工作。如样品不能被及时送到实验室,应置于-20℃以下保存。

6.2.2 支气管肺泡灌洗液采集和运输

采集新鲜解剖的未破损的猪肺脏,气管注入 50 mL~100 mL 灭菌的 0.01 mol/L PBS(pH 7.2~pH 7.4)溶液,轻揉肺脏 3 min~5 min,转移 5 mL~10 mL 灌洗液至无菌容器中,运输与保存方法同 6.2.1。

6.2.3 鼻拭子采集和运输

采样人员将猪保定后,用棉拭子轻轻插入鼻腔,稍作拐弯,绕过骨状瓣膜,与鼻中隔平行方向插入约 2 cm~5 cm,轻轻旋转棉拭子,当猪出现喷嚏反射后,轻轻抽出棉拭子,将鼻拭子样品端置于含有 1 mL PBS 溶液的灭菌离心管中,运输与保存方法同 6.2.1。

6.3 样品处理与 DNA 提取

6.3.1 肺组织的处理与 DNA 提取

取 0.5 g~1.0 g 肺组织样品,加入 5 mL 0.01 mol/L PBS 溶液后,充分匀浆,制成 0.1 g/mL~0.2 g/mL 的悬液。取该悬液 200 μ L,加入 750 μ L DNA 提取液,65℃温浴 30 min,加酚/三氯甲烷/异戊醇 500 μ L,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液加入等体积的三氯甲烷,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,吸取 500 μ L 上清液与 400 μ L 的异丙醇充分混合,12 000 r/min 离心 5 min,75%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀干燥后溶于 30 μ L TE 溶液中,即可用于检测或保存于-20℃。

也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按其使用说明书操作。

6.3.2 支气管肺泡灌洗液的处理与 DNA 提取

取 5 mL~10 mL 支气管肺泡灌洗液,12 000 r/min 离心 20 min,弃去上清,沉淀用 200 μ L 0.01 mol/L PBS 溶液重悬后,加入 750 μ L DNA 提取液提取 DNA,方法同 6.3.1。

也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照其使用说明操作。

6.3.3 鼻拭子样品的处理与 DNA 提取

采用水煮法提取待检猪鼻拭子样品 DNA。将浸有鼻拭子的离心管振荡 5 s,2℃~8℃放置 2 h,用无菌镊子取出棉拭子,12 000 r/min 离心 20 min,弃去上清。沉淀用 50 μ L 灭菌水重悬,于 100℃水浴 10 min 后立即放置到冰浴中冷却 10 min,于-20℃以下保存作为 DNA 模板。

6.3.4 培养物和阳性对照样品的处理与 DNA 提取

采用水煮法提取待检培养物样品和阳性对照样品 DNA。取 1 mL 培养菌液,12 000 r/min 离心 20 min,弃去上清。其 DNA 提取的操作方法同 6.3.3。

6.4 PCR 反应

6.4.1 PCR 反应体系

10×PCR 反应缓冲液 2.5 μ L、dNTPs(10 mmol/L)2 μ L、氯化镁(25 mmol/L)2 μ L、引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L、模板 DNA 2 μ L~5 μ L,用灭菌的双蒸水补足反应体积至 25 μ L。

也可使用等效商品化 PCR 反应预混液。

6.4.2 PCR 反应程序

95 $^{\circ}$ C 预变性 12 min 后进入 PCR 循环;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min;2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

6.4.3 PCR 产物电泳

PCR 扩增产物与上样缓冲液按 5:1 比例混合,加样于已制备好的 1% 琼脂糖凝胶中(见附录 A),同时分别加 Marker DL2000(0 bp~2 000 bp)、阴性对照和阳性对照,100 V~120 V 恒压电泳 20 min~40 min,凝胶成像系统观察并记录结果。

6.5 结果判定

6.5.1 试验成立判定

若阳性对照样品出现 649 bp 的目标扩增条带,同时阴性对照样品无目标扩增条带,则试验成立(参见 C.1)。否则试验不成立。

6.5.2 检测结果判定

符合 6.5.1 的条件,被检样品扩增产物出现 649 bp 目的条带,则判定为猪肺炎支原体核酸阳性;被检样品未出现 649 bp 目的条带,则判定为猪肺炎支原体核酸阴性;

若进一步验证,可对 PCR 扩增产物进行测序,其目标序列参见 C.2。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS 溶液(pH 7.2~pH 7.4)

准确称量下面各试剂,加入到 800 mL 蒸馏水中溶解,调节溶液的 pH 至 7.2~7.4,加水定容至 1 L。分装后在 121 ℃灭菌 15 min~20 min,或过滤除菌,保存于室温。

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.24 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	3.65 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

A.1 电泳缓冲液的配制(1×TAE 或 1×TBE)

A.1.1 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)的配制

称取 Na₂EDTA · 2H₂O 18.61 g,用 80 mL 蒸馏水充分搅拌,用 NaOH 颗粒调 pH 值至 8.0,再用蒸馏水定容至 100 mL。

EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将 pH 调至接近 8.0 时,才会溶解。

A.1.2 TAE 的配制

分别准确称取 Tris 碱 242.0 g,冰乙酸 57.1 mL,加入配制好的 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 100 mL 溶解并调 pH 至 8.0,用蒸馏水补足至 1 000 mL,充分混匀后即为 50×TAE,4 ℃保存备用;使用前用蒸馏水将其作 50 倍稀释即为 1×TAE,现用现配。

A.1.3 TBE 的配制

分别准确称取 Tris 碱 54.0 g,硼酸 27.5 g,加入配制好的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL,加蒸馏水 800 mL 溶解并调 pH 至 8.0,用蒸馏水补足至 1 000 mL,充分混匀后即为 5×TBE,2 ℃~8 ℃保存备用;使用前用蒸馏水将其作 5 倍稀释即为 1×TBE,现用现配。

A.2 DNA 提取液

配制终浓度分别为:100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),25 mmol/L EDTA (pH 8.0),500 mmol/L NaCl,1% SDS 的混合溶液,混匀后 4 ℃保存备用。具体配法如下:

母液配制:

溶液 1:500 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)。称取 15.14 g Tris,加入 150 mL 蒸馏水,加入 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 2:100 mmol/L EDTA(pH 8.0)。称取 8.46 g Na₂ EDTA · 2H₂O,加入 200 mL 蒸馏水,调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 3:5 mol/L NaCl。称取 29.22 g NaCl,加入蒸馏水溶解,并定容至 100 mL。

溶液 4:10% SDS。称取 10 g SDS,加入蒸馏水溶解,并定容至 100 mL。

配制 1 000 mL DNA 提取液:加入 200 mL 溶液 1,250 mL 溶液 2,100 mL 溶液 3,100 mL 溶液 4,用蒸馏水补足至 1 000 mL。

也可使用经验证的等效的商品化 DNA 提取试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书进行。

A.3 上样缓冲液(6×)

配制终浓度分别为:0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯青 FF,40%蔗糖的混合溶液,混匀后 2℃~8℃保存备用。

也可使用商品化的核酸凝胶电泳上样缓冲液,具体制备参照说明书要求进行操作。

A.4 TE 溶液(pH 8.0)

配制终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)的混合溶液,高压灭菌后,2℃~8℃保存备用。具体配法如下:

母液配制:

溶液 1:1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)。称取 Tris 碱 12.12 g,加蒸馏水 80 mL 溶解,滴加浓 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 100 mL。

溶液 2:0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)。称取 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18.61 g,用 80 mL 蒸馏水充分搅拌,用 NaOH 颗粒调 pH 值至 8.0,再用蒸馏水定容至 100 mL。EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将 pH 调至接近 8.0 时,才会溶解。

配制 100 mL TE 溶液(pH 8.0):加入 1 mL 溶液 1,0.2 mL 溶液 2,用蒸馏水补足至 100 mL。



A.5 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)

准确量取溴化乙锭 0.1 g,加蒸馏水 10.0 mL,充分溶解后即为 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。

A.6 1%琼脂糖凝胶

称取 1.0 g 琼脂糖,加入 100 mL 电泳缓冲液加热溶解,加入溴化乙锭溶液至终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,15℃~25℃冷却至固体,现用现配。

A.7 75%乙醇

无水乙醇 75 mL,加蒸馏水定容至 25 mL,充分混匀后,-20℃预冷备用。

附 录 B
(规范性附录)
操 作 规 范

B.1 检测过程中防止交叉污染的措施

B.1.1 采样和制样过程

采样和制样工具,应清洗干净,121 ℃,15 min~20 min 灭菌,一套清洁工具仅限于一个样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、灭菌,或为灭菌一次性容器。

B.1.2 检测过程

B.1.2.1 PCR 实验室应分出试剂准备区、样品制备区、产物扩增区、产物分析区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的操作流程应从“清洁区”到“污染区”单方向进行。

B.1.2.2 实验过程中,穿实验服和戴手套,手套应及时更换。各区应有专用实验服,定期清洗。

B.1.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用且不得带出该区。

B.1.2.4 所有溶液、水、耗材和器具应 121 ℃,15 min~20 min 灭菌,避免核酸和(或)核酸酶污染。在常温贮存的试剂中,可加终浓度为 0.25 g/L 的叠氮化钠;所有试剂应该以大体积配制,然后分装成足够一次使用的量进行贮存。

B.1.2.5 样品制备区中,在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

B.1.2.6 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA 气溶胶。

B.2 样品采集、运输和处理的生物安全要求

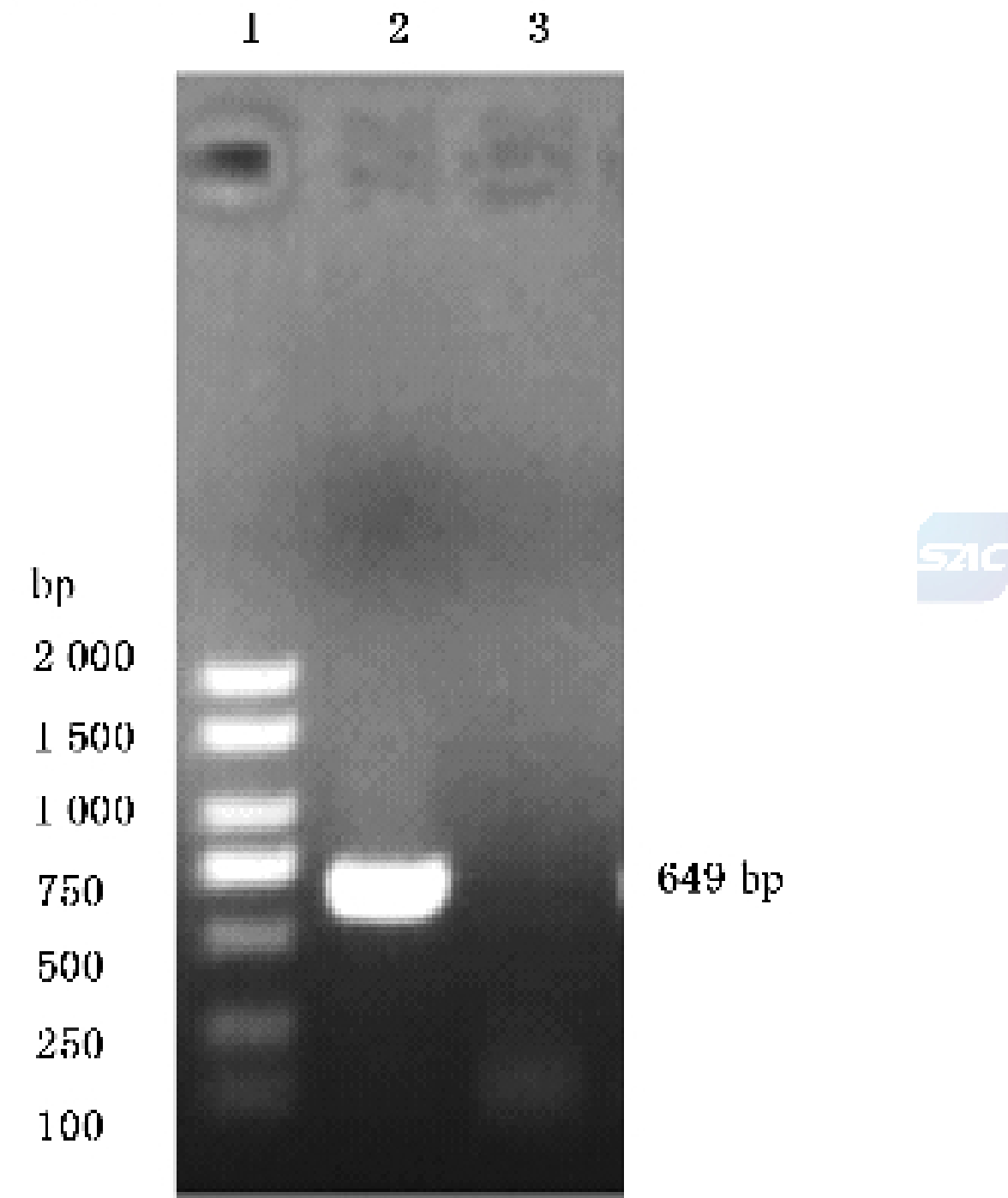
样品的采集、运输和处理的生物安全要求按照 GB 19489、GB/T 27401 和《兽医实验室生物安全管理规范》的规定。病死猪及病料按照《病死及病害动物无害化处理技术规范》处理。

附 录 C
(资料性附录)

猪肺炎支原体 PCR 检测电泳例图及产物扩增序列

C.1 猪肺炎支原体 PCR 检测电泳例图

猪肺炎支原体 PCR 检测结果电泳例图见图 C.1。



说明：
1——DL2000 Marker；
2——阳性对照；
3——阴性对照。

图 C.1 猪肺炎支原体 PCR 检测电泳图

C.2 PCR 扩增产物参考序列

649 bp DNA 参考序列：

5'-gagccttcaagcttcaccaagaaatgggggtgcgcaacattagttagttggttagggtaaaagcctaccaagacgatgatgttttagcggggc
caagaggttgtaccgccacactgggattgagatacggcccagactcctacgggaggcagcagtaaggaatatccacaataagcgaaagcttgatgg
agcgacacagcgtgcaggatgaagtcttctgggatgtaaactgctgttgtaagggaagaaaaactagataggaaatgctctagtcttgacgggtac
tattagaaagcgacggcaaactatgtgccagcagccgcggttaatacataggtcgcaagcgttatccggaattattgggcgtaaagcgtccgtaggttt
tttgtaagttaaagttaaatgctaaagctcaacttttagtccgcttttagatactggcaaaatagaattatgaagaggttagcgggaattcctagtggagt
gtggaatacgtagatattaggaagaacaccaataggcgaaggcagctaactggtcatatattgacactaagggaagcgtggggagcaaacag
gattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgatcattagttggtggcaaaagtcactaacaca-3'
