

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1468—2007

丝状支原体山羊亚种检测方法

Methods for Detecting *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

世界动物卫生组织 [World Organization for Animal Health (英), Office International des Epizootic (法), OIE] 编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(第五版, 2004) 中, 山羊接触传染性胸膜肺炎的病原为山羊支原体山羊肺炎亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *caripneumoniae*, Mccp)。在本标准中, 山羊接触传染性胸膜肺炎的病原是丝状支原体山羊亚种 (PG₃)。虽然病原不同, 但其诊断技术标准同步。

本标准附录 A、附录 B、附录 D 和附录 I 均为资料性附录; 附录 C、附录 E、附录 F、附录 G 和附录 H 均为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人: 逯忠新、储岳峰、赵萍、高鹏程。

丝状支原体山羊亚种检测方法

1 范围

本标准规定了丝状支原体山羊亚种病原学和血清学诊断方法要求。

本标准适用于由丝状支原体山羊亚种引起的山羊接触传染性胸膜肺炎的诊断。

2 病原学检查

2.1 材料准备

2.1.1 培养基

20%马血清马丁肉汤；20%马血清马丁琼脂；葡萄糖醇解培养基；精氨酸水解培养基；磷酸酶培养基（BPh）；凝固血清消化培养基（Sd）；菌膜、菌斑形成试验培养基。制备方法均参见附录 A（A.1~A.7）。

2.1.2 试剂

NET 缓冲液（参见附录 B.1）、TAE 电泳缓冲液（参见附录 B.2）；十二烷基硫酸钠（SDS）、RNase A、蛋白酶 K、酚-氯仿-异戊醇（25:24:1）、无水乙醇、Taq DNA 聚合酶、10×PCR buffer（含 Mg^{2+} ）、脱氧三磷酸核苷酸混合液（dNTPs）、ØX174-HaeIII digest DNA 分子质量标准、琼脂糖、溴化乙锭、灭菌双蒸水。

2.1.3 引物

Pc1 5'-TAT ATG GAG TAA AAA GAC-3'

Pc2 5'-AAT GCA TCA TAA ATA ATT G-3'

Pc3 5'-TTA ATA AGT GTG TAT ATG AAT-3'

Pc4 5'-ACT GAG CAA TTC CTC TT-3'

引物在使用时用灭菌双蒸水稀释为 25 $\mu\text{mol/L}$ ~50 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.4 其他材料

2.1.4.1 兔抗支原体血清（ra-m）、健康兔血清（NRS），制备方法见附录 C。

2.1.4.2 抗兔免疫球蛋白荧光抗体（a-r Ig-FITC）。

2.1.4.3 灭菌器械（剪刀、镊子、吸管、青霉素瓶等）。

2.2 病料采集

2.2.1 活体病料采集：将棉拭子伸入待检山羊鼻腔内采集分泌物，放入无菌试管中立即送往实验室供分离。

2.2.2 剖检病料采集：采集肺病变部、特别是硬变部位和非硬变部位的交界处的样品以及胸水和纵隔淋巴结。

2.2.3 样品运送：采集的样品，应在 4℃ 条件下 24 h 内送到实验室。如果不能立即进行微生物学检查，可将样品或整个肺置 -20℃ 冷冻保存 1 个~2 个月。

2.3 病原分离

样品拭子悬浮于 2 mL~3 mL 20% 马血清马丁肉汤中。组织样品用剪刀剪碎，每 1 g 加 20% 马血清马丁肉汤 9 mL，强烈震荡；或在培养基内捣碎。胸水、组织悬液或拭子均需用 20% 马血清马丁肉汤做 3 个 10 倍系列稀释，稀释到 10^{-4} 。将样品的各稀释液分别接种于 20% 马血清马丁肉汤和琼脂培养基，培养皿用胶布封口，置 37℃ 培养 5 d~7 d，每天观察一次。如未见生长，可按上述方法连传 3

代。

2.4 病原鉴定

2.4.1 培养特征

2.4.1.1 培养性状和菌落形态

阳性样品在 20% 马血清马丁肉汤中培养 4 d~5 d 后，呈轻度混浊带乳光样纤细菌丝生长，无菌膜，无沉淀，无颗粒悬浮。在马丁琼脂斜面或平板上生长迟缓，生长的菌落与微小的水滴相似（露滴状透明菌落），用放大镜仔细观察，可见大小悬殊且不很圆整的圆形或椭圆形菌落，中央乳头状突起明显（煎蛋状）。菌落直径 0.3 mm~0.5 mm。

2.4.1.2 染色镜检

以细菌培养物抹片，用姬姆萨氏染色法（参见附录 D）染色、镜检。呈淡紫色细小的球状、双球状、弧状等多形态。直径 125 nm~250 nm。

2.4.2 生化特性

2.4.2.1 糖酵解试验：从琼脂斜面上挑取少量待检菌培养物，接种于糖发酵管（参见附录 A.3）培养液内，置 37℃ 温箱内培养 5 d~7 d。水解葡萄糖产酸时，颜色变黄。

2.4.2.2 精氨酸水解试验：将待检菌培养物接种于精氨酸水解培养基（参见附录 A.4），于 37℃ 温箱内培养 5 d~7 d。水解精氨酸时，颜色变红。

2.4.2.3 磷酸酯酶活性测定：将待检菌培养物接种于磷酸酶平板培养基（参见附录 A.5），在琼脂表面滚动，当接种液体吸收后，于 37℃ 温箱内培养 7 d。接种平皿和对照平皿用 5 mol/L NaOH 淹没琼脂表面，半分钟后在接种面中间和周围出现红色者为阳性反应。

2.4.2.4 凝固马血清液化试验：将待检菌培养物用同一铂金环接种两支凝固血清消化培养基（参见附录 A.6）小管，一支用未稀释培养物，一支用 10^{-3} 稀释的培养物，于 37℃ 温箱培养。在 14 d 内隔日观察，生长旺盛时表面液化成一个浅的下降面，凹部呈液状；生长更扩展时，可见有一个小洞；严重液化时，液体积累在斜面 and 管壁的角落里。

2.4.2.5 菌膜、菌斑形成试验：在琼脂培养基上进行（参见附录 A.7）。取 1 滴待检菌培养物在琼脂表面滚动，当接种液体吸收后，于 37℃ 温箱培养。在 14 d 内隔日观察，阳性反应者在琼脂表面由于含钙、镁的皂类和类脂质沉积形成一层闪光的有显著皱纹的薄膜；同时，在陈旧菌落周边形成黑色斑点。

2.4.2.6 毛地黄皂甙的敏感性测定：在 20% 马血清马丁琼脂培养基上进行（参见附录 A.2）。取 1 滴待检菌培养物在琼脂表面滚动；当接种液体吸收后，把毛地黄皂甙圆纸片（制备方法参见附录 E）放在接种面中心，于 37℃ 湿环境下培养，菌落出现后观察结果，在低倍镜下计量纸片边缘到抑制带外缘的距离。达到 2 mm 或 2 mm 以上时判为阳性反应。

2.4.2.7 被检菌生化特性测定：凡能水解葡萄糖，不水解精氨酸，磷酸酶活性测定阴性，血清液化试验和毛地黄皂甙敏感性测定阳性，菌膜、菌斑形成试验阴性者，即可初步判为丝状支原体山羊亚种。

2.4.3 表面荧光抗体试验（间接法）

2.4.3.1 将兔抗支原体血清或健康兔血清（对照用），用生理盐水或 pH 7.2 磷酸盐缓冲盐水（PBS）适当稀释，取 1 滴覆盖于菌落未固定的琼脂块（制备方法参见附录 F）的整个表面。兔抗支原体血清的稀释度，是根据兔抗支原体血清与异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗兔免疫球蛋白（a-r Ig-FITC）作棋盘式滴定来确定。

2.4.3.2 将带琼脂小块的载玻片放入湿盒，置室温（20℃）下孵育 30 min。

2.4.3.3 分别将每块载玻片上全部琼脂块移入含约 7 mL PBS 的 10 mL 试管中。

2.4.3.4 试管加塞以 18 r/min~30 r/min 旋转震荡 10 min, 弃去 PBS, 加入新鲜 PBS, 再离心 10 min。

2.4.3.5 弃去 PBS, 分别把琼脂小块菌落面朝上, 放在载玻片上, 吸去多余水分。

2.4.3.6 取 1 滴适当稀释的 a-r Ig-FITC 将琼脂块覆盖。a-r Ig-FITC 的工作稀释度根据与兔血清反应的棋盘式滴定来确定, 取荧光最强、背景最暗的最高稀释度作为最适稀释度。

2.4.3.7 把琼脂小块放入湿盒中, 置室温 (20℃) 孵育 30 min, 移到含有新鲜 PBS 试管中, 如前离洗 2 次。

2.4.3.8 重新把琼脂小块菌落面向上, 分别放到载玻片上, 用免疫荧光显微镜观察特异性荧光强度。一般可用“+”表示: (—) 无荧光; (±) 极弱的可疑荧光; (+) 荧光明亮; (++)~++++ 荧光闪亮。待检菌特异性荧光强度达“+”以上, 而各种对照显示为 (±) 或 (—), 即可判定为阳性。

2.4.4 聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)

2.4.4.1 样品 DNA 的提取

2.4.4.1.1 样品处理

- 1) 鼻腔分泌物: 将鼻拭子浸入 1 mL NET 缓冲液中 30 min, 反复挤压, 将浸出液经 13 000 r/min 离心 20 min 后, 弃上清液, 收集沉淀。
- 2) 组织: 将病变肺组织和纵隔淋巴结剪成小块, 按 1 g 加入 0.9 mL NET 缓冲液研磨后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。13 000 r/min 离心 20 min 后, 弃上清液, 收集沉淀。
- 3) 胸水: 取 500 μ L 胸水加入 500 μ L NET 缓冲液, 混匀后, 13 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 收集沉淀。

2.4.4.1.2 DNA 的提取方法

向 2.4.4.1.1 收集的沉淀中加入 600 μ L NET 缓冲液。

加入 100 μ L 10% 的 SDS 溶液 (终浓度 1.5%), 混匀。在 95℃~100℃孵育 10 min 后, 迅速放置于冰上冷却 10 min~15 min。

在样品中加入 RNase A 至终浓度为 40 μ g/mL, 50℃作用 30 min。然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 200 μ g/mL, 50℃作用 30 min。

加入等体积的酚—氯仿—异戊醇 (25:24:1), 手颠倒摇匀 2 次~3 次, 4℃7 000 r/min 离心 10 min。

转移上清液于另一离心管中。

重复一次 (4)、(5) 的操作过程, 加入 2.5 倍体积的 4℃下预冷无水乙醇, -20℃沉淀 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。

用 1 mL 70% 乙醇漂洗, 重复 2 次~3 次, 12 000 r/min 离心 2 min。

真空或室温干燥, DNA 沉淀用 25 μ L 无菌双蒸水溶解作为模板, -20℃保存备用。

2.4.4.2 PCR 反应体系

第一次扩增: 10×PCR buffer (含 Mg^{2+})	5 μ L
d NTPs	4 μ L
Pc1	1 μ L
Pc2	1 μ L
模板 (被检样品总 DNA)	5 μ L
灭菌双蒸水	33.5 μ L
Taq DNA 聚合酶	0.5 μ L
第二次扩增: 10×PCR buffer (含 Mg^{2+})	5 μ L
d NTPs	4 μ L

Pc3	1 μ L
Pc4	1 μ L
模板 (一扩产物 1 : 100 稀释)	5 μ L
灭菌双蒸水	33.5 μ L
Taq DNA 聚合酶	0.5 μ L

样品检测时,同时要设阳性对照和空白对照。阳性对照模板为丝状支原体山羊亚种 Pc1 - Pc2 基因片断重组质粒,空白对照为灭菌双蒸水。

2.4.4.3 PCR 反应程序

第一次扩增: 95℃变性 5 min, 然后 30 个循环, 分别为: 94℃变性 50 s; 46℃退火 50 s; 72℃延伸 50 s。最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

第二次扩增: 95℃变性 2 min, 然后 30 个循环, 分别为: 94℃变性 30 s; 46℃退火 30 s; 72℃延伸 30 s。最后 72℃延伸 6 min, 4℃保存。

2.4.4.4 电泳

PCR 反应结束,取第二次扩增产物各 5 μ L (包括被检样品、阳性对照、空白对照)、 Φ X174 - HaeIII digest DNA 分子质量标准 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶 (制备方法参见附录 B.3) 电泳,并用凝胶成像仪观察、拍照,记录试验结果。

2.4.4.5 结果判定

在同一块凝胶板上电泳后, Φ X174 - HaeIII digest DNA 分子质量标准 (Marker) 电泳道,从上到下依次出现 1 353 bp、1 078 bp、872 bp、603 bp、310 bp、281 bp、271 bp、234 bp、194 bp、118 bp、72 bp 共 12 条清晰的带。

阳性对照电泳道出现一条 195 bp 清晰的带。

空白对照电泳道不出现任何带。

被检样品电泳道出现一条 195 bp 的带,判为阳性 (+)。

被检样品电泳道没有出现大小为 195 bp 的带,判为阴性 (-)。

3 血清学试验

3.1 间接血凝试验 (Indirect hemagglutination, IHA)

3.1.1 材料准备

3.1.1.1 器材: 96 孔 (8×12) V 型 (110°) 聚苯乙烯滴定板, 5 μ L~50 μ L 多通道微量可调移液器或稀释棒, 微型振荡器, 水浴箱等。

3.1.1.2 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 和含 1% 灭活健康兔血清的 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液 (配制方法见附录 G)。

3.1.1.3 PG₃ 纯化灭活抗原 (制备方法见附录 C.1)。

3.1.1.4 抗原敏化红细胞 (制备方法见附录 H)。

3.1.1.5 对照血清 (制备方法见附录 C.4.1): 标准阳性血清的血凝效价为 1 : 512~1 : 1 024, 标准阴性血清的血凝效价 $\leq$ 1 : 4。

3.1.1.6 被检血清: 应无溶血、无腐败,必要时可加入 0.01% 硫柳汞防腐。试验前灭活。

3.1.2 操作方法

3.1.2.1 稀释被检血清: 每份被检血清用 8 孔, 从第 1 孔开始, 至第 8 孔, 每孔滴加稀释液 25 μ L, 用微量移液器或稀释棒吸 (蘸) 取被检血清 25 μ L 加入第 1 孔, 充分混匀后吸 (蘸) 取 25 μ L 加入第 2 孔依次做倍比连续稀释至第 8 孔 (1 : 2、1 : 4、1 : 8……1 : 256), 混匀后从第 8 孔弃去 25 μ L。

3.1.2.2 加敏化红细胞 (抗原): 从第 1 孔开始, 至第 8 孔, 每孔滴加 1% 敏化红细胞 25 μ L。

3.1.2.3 设对照：在每块 V 型滴定板上做试验，要同时设立对照，即敏化红细胞空白对照 1 孔，阳性血清（1:64）加敏化红细胞对照 1 孔，阴性血清加敏化红细胞对照 1 孔。

3.1.2.4 震荡：加敏化红细胞后将 V 型滴定板放在微型震荡器上震荡 1 min，置 37℃ 温箱孵育 2 h，判定结果。操作程序见表 1。

表 1 间接血凝试验程序及判定结果举例

单位：μL

成 分	被检血清稀释度								各项对照		
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	敏化 红细胞	阳性 血清	阴性 血清
										1:64	1:4
稀释液	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
被检 血清	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25	25	25
敏化 红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
微型震荡器上震荡 1 min，置 37℃ 温箱 2 h											
判定 结果	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	—	++++	—

注：表中所示被检血清的血凝效价为 1:128。

3.1.3 结果判定

3.1.3.1 凝集程度的判定标准：

“++++” 红细胞全部凝集，形成一层均匀膜，布满整个孔底。

“+++” 红细胞在孔底形成一层薄膜，面积比前者稍小。

“++” 红细胞在孔底形成薄膜凝集，边缘松散或呈锯齿状。

“+” 红细胞在孔底呈稀薄、散在、少量凝集，孔底有小圆点。

“±” 红细胞沉于孔底，但周围不光滑或中心有空斑。

“—” 红细胞完全沉于孔底，呈光滑的圆点。

3.1.3.2 加敏化红细胞后所设各项对照均成立，否则应重做。正确对照的结果是：

- 抗原敏化红细胞应无自凝（—）；
- 阳性血清对照应 100% 凝集（++++）；
- 阴性血清对照应无凝集（—）。

3.1.3.3 结果判定标准：

血凝效价 $\geq 1:16$ （++）判为阳性；

血凝效价 $\leq 1:4$ （++）判为阴性；

血凝效价介于两者之间判为可疑。

3.2 间接酶联免疫吸附试验（Indirect enzyme linked immunosorbent assay, I - ELISA）

3.2.1 材料准备

3.2.1.1 PG₃ 纯化灭活抗原（见附录 C.1）、兔抗羊 IgG 辣根过氧化物（HRP）标记物（HRP - IgG），标准阴、阳性血清（见附录 C），被检血清。

3.2.1.2 试验溶液：配制方法见附录 I。

3.2.2 操作方法

3.2.2.1 抗原包被：用抗原包被液（见附录 I.1），将 PG₃ 抗原稀释成一个单位（1.1 μg/mL），用微量移液器将稀释好的抗原加入到酶标板各孔内，每孔 50 μL，然后将酶标板置湿盒中于 37℃ 吸附 2 h，再转入 4℃ 冰箱放置 18 h~20 h。

3.2.2.2 洗涤：甩掉酶标板孔内的抗原包被液，加入冲洗液（见附录 I.2），室温下浸泡 2 min，甩掉冲洗液，用吸水纸吸干并驱除孔内气泡。再重新加入冲洗液，按同法洗涤 4 次。

3.2.2.3 封闭：每空加 50 μL 封闭液（见附录 I.3），置湿盒中放 37℃ 吸附 1 h。

3.2.2.4 取出酶标板，将其甩干，用冲洗液洗涤 4 次。洗涤方法同 3.2.2.2。

3.2.2.5 加入被检血清：被检血清先用血清稀释液（见附录 I.4）做 1:60 倍稀释，每份血清加两孔，每孔 50 μL。

3.2.2.6 对照：每块酶标板均设标准阴、阳性血清和空白孔对照。标准阴、阳性血清做 1:60 倍稀释，每份血清加两孔，每孔 50 μL。空白对照加血清稀释液 50 μL。

3.2.2.7 加样完毕后，置湿盒中 37℃ 温箱内孵育 1 h。

3.2.2.8 取出酶标板，将其甩干，用冲洗液洗涤 4 次。洗涤方法同 3.2.2.2。

3.2.2.9 加 HRP - IgG 标记物：HRP - IgG 标记物按标签上标记的效价稀释后使用，每孔加入 50 μL。置 37℃ 温箱内孵育 1 h。

3.2.2.10 取出酶标板，将其甩干，用冲洗液洗涤 4 次。洗涤方法同 3.2.2.2。

3.2.2.11 加底物溶液：每孔加入新配制的底物溶液（见附录 I.5）50 μL，置 37℃ 避光反应 10 min~15 min。

3.2.2.12 终止反应：每孔加入终止液（见附录 I.6）50 μL。

3.2.3 判定

在酶标仪 490 nm 波长处，测定酶标板的每孔光吸收值，求出每份被检血清 2 孔的平均光吸收值 (S)，除以同板标准阴性血清 2 孔的平均光吸收值 (N)，则得出每份被检血清的 S/N 值。

判定标准：每份血清 1:60 倍稀释的 S/N 值 ≥ 3 为阳性，S/N 值 ≤ 2.5 为阴性，S/N 值介于 2.5~3 之间者为可疑。

附 录 A
(资料性附录)
培养基制备

A.1 20%马血清马丁肉汤**A.1.1 成分**

马丁肉汤	800 mL
健康马血清	200 mL
25%鲜酵母浸出液	20 mL
25%葡萄糖溶液	3 mL
1/80 醋酸铊	10 mL
青霉素	200 IU/mL

A.1.2 制法 以上各种成分分别经灭菌或除菌后混合，在无菌条件下，用灭菌过的氢氧化钠溶液调整 pH 至 7.8~8.0。将制备的马丁肉汤分装于灭菌试管内，每管 5 mL。置 4℃ 冰箱保存备用。

A.2 20%马血清马丁琼脂平板

A.2.1 成分 马丁肉汤（见附录 A.1）中加入琼脂，使含量达 1.3%~1.5%，即成马丁琼脂。

A.2.2 制法 除健康马血清、1/80 醋酸铊及青霉素外，其他成分经 103.4 kPa (121℃) 高压灭菌 30 min。降温至 55℃~60℃ 时，按上述比例添加马血清、1/80 醋酸铊及青霉素后，在灭菌的直径 6 cm~8 cm 培养皿内加入 8 mL，轻轻摇动混合均匀，静置凝固后即成马丁琼脂培养基。置 4℃ 冰箱保存备用。

A.3 葡萄糖醇解培养基**A.3.1 葡萄糖醇解培养基 (1)****a) 基础培养基**

心浸肉汤（经酶处理）	120 mL
PPLO 血清级份（Difco）	1 mL
DNA (0.2%溶液, W/V)	1.2 mL
0.06%酚红	5 mL
1%醋酸铊	1 mL
青霉素 20 000 IU/mL	0.25 mL
pH 调至 7.8	

b) 试验培养基

基础培养基	128 mL
50%葡萄糖溶液 (W/V)	1.6 mL
pH 调至 7.8	

A.3.2 葡萄糖醇解培养基 (2)

在 20%马血清马丁肉汤（见附录 A.1）中加入 10%葡萄糖。调 pH 至 7.8，分装 2 mL/管。

A.4 精氨酸水解培养基

A.4.1 精氨酸水解培养基 (1)

- a) 基础培养基 将葡萄糖醇解基础培养基的 pH 调至 7.3 即可。
- b) 试验培养基 向 128 mL 基础培养基中加 30% 精氨酸溶液 (W/V) 4.25 mL, 调 pH 7.3 即成。

A.4.2 精氨酸水解培养基 (2)

在 20% 马血清马丁肉汤 (见附录 A.1) 中加入 10% 精氨酸。调 pH 至 7.3, 分装 2 mL/管。

A.5 磷酸酶培养基 (BPh)

心浸肉汤琼脂 (Difco)	74 mL
马血清 (60℃ 加热 60 min)	20 mL
25% 酵母浸出液	5 mL
1% 二磷酸酚酞钠盐	1 mL
青霉素 20 000 IU/mL	0.2 mL
1% 醋酸铊	1 mL
pH 调至 7.8	

A.6 凝固血清消化培养基 (Sd)

心浸肉汤 (Difco)	8 mL
马血清	30 mL
25% 酵母浸出液	0.8 mL
无菌水	1.2 mL

试验 pH 调至 7.8, 分装 2 mL/管, 在流动蒸气中呈斜面放置, 45 min 灭菌。冷却凝固成斜面。

A.7 菌膜、菌斑形成试验培养基

在 20% 马血清马丁琼脂 (见附录 A.2) 中加入 10% 蛋黄乳剂。调 pH 至 7.3。倾倒入皿。

附 录 B
(资料性附录)
PCR 试验试剂的配方和制备

B.1 NET 缓冲液 (pH 7.6) 配方

Tris - HCl	50 mmol/L
EDTA	125 mmol/L
NaCl	50 mmol/L

B.2 TAE 电泳缓冲液 (pH 8.0) 的配方和制备

50×TAE 电泳缓冲液储存液:

Tris 碱	242 g
EDTA	37.2 g
冰乙酸	57.1 mL

加双蒸水至 1 000 mL, 应用前用双蒸水将 50×TAE 电泳缓冲液 50 倍稀释。

B.3 1%的琼脂糖电泳凝胶板的配方和制备

琼脂糖	1 g
1×TAE 电泳缓冲液	100 mL

将琼脂糖放入 TAE 电泳缓冲液中, 加热融化, 温度降至 60℃左右时加入 10 mg/mL 溴化乙锭 (EB) 3 μL~5 μL, 均匀铺板, 厚度为 3 mm~5 mm。

附录 C

(规范性附录)

PG₃纯化灭活抗原和阳、阴性血清制备

C.1 PG₃纯化灭活抗原的制备

取 PG₃ ($\geq 10^8$ CFU/mL) 培养物 2 L, 向菌液中加入 10% 甲醛溶液, 使其终浓度为 0.2%, 随加随摇, 使其充分混合, 置 37℃ 灭活 12 h (以瓶内温度达 37℃ 开始计时), 期间振摇 3~4 次, 进行灭活。灭活检验合格的抗原, 4℃ 8 000 r/min 离心 1 h, 沉淀物用 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 悬浮, 如上洗涤 3 次后, 配成 20 倍浓缩抗原, 在冰浴条件下用低频率超声波间歇裂解 30 min, 裂解物以 1 250 r/min 离心 30 min, 以除去沉淀, 收集上清液, 即为 PG₃ 纯化灭活抗原。

C.2 弗氏佐剂制备

C.2.1 弗氏不完全佐剂 液体石蜡油和羊毛脂按 4 : 1 (V/V) 混合均匀, 103.4 kPa (121℃) 高压灭菌 30 min, 置 4℃ 冰箱备用。使用时与抗原等量混合、乳化。

C.2.2 弗氏完全佐剂 于弗氏不完全佐剂中加入无毒、灭活的分枝杆菌终浓度 3 mg/mL。使用时与抗原等量混合、乳化。

C.3 阳性血清制备

选用体重 2 kg 左右的健康雄性家兔供免疫用。取充分乳化的弗氏完全佐剂抗原, 于每只兔两后腿足部皮下, 淋巴结处及背部皮下多点接种, 接种量为 1.5 mL, 14 d 后仍以上述抗原和剂量由背部皮下多点接种, 进行第二次免疫; 隔 11 d 后, 以弗氏不完全佐剂抗原, 由每只兔肩部肌肉 2 点, 背部皮下多点接种, 接种剂量为 3 mL, 为其第三次免疫; 11 d 后, 取制备好的不含佐剂抗原 (10 mg/mL) 由每只兔耳静脉注射 1.5 mL, 进行第四次高免, 隔 14 d 后采血分离血清。

C.4 阴性血清制备

C.4.1 选取经血清学证实为山羊接触传染性胸膜肺炎抗体阴性的健康山羊, 用常规方法采血, 无菌分离血清。

C.4.2 选取健康雄性家兔, 用常规方法采血, 无菌分离血清。

附 录 D
(资料性附录)
姬姆萨氏染色法

D.1 姬姆萨氏染色液

姬姆萨氏染料粉末	0.5 g
纯甘油	33 mL
甲醇	33 mL

将姬姆萨氏染料粉末溶于纯甘油中，55℃~60℃水浴中加温 1 h~2 h 使充分溶解，再加入甲醇混匀，静置 1 d 以上，滤过后置有色瓶中，临用时取 1 mL 加蒸馏水 10 mL 即可。

D.2 染色法

涂片、自然干燥；滴加甲醇 2 滴~3 滴固定 2 min~3 min；将固定片浸于盛姬姆萨氏染色液的缸中染 30 min 以上或过夜；水洗、干燥、镜检。

D.3 结果

支原体呈淡紫色的球状、双球状、弧状等典型的多形态。

附 录 E

(规范性附录)

毛地黄皂甙圆纸片的制备

取滤纸剪成直径 6 mm 大小的圆纸片，置平皿中，经 112 kPa (122℃) 20 min 灭菌，烘干；再将每片滤纸片在灭菌的 0.02 mL 1.5% (W/V) 甲醇毛地黄皂甙溶液浸透，置无菌平皿内，37℃干燥一夜，装于灭菌的试管中 4℃保存备用。

附 录 F

(规范性附录)

表面荧光抗体试验抗原制备

将待检菌培养物接种 20% 马血清马丁琼脂培养基，置 37℃ 湿环境下培养直到菌落明显可见为止。从平板上菌落多但不融合之处，切取几块大约 0.25 cm² 的琼脂块，菌落面向上，分别放在载玻片上。

附 录 G

(规范性附录)

0.15 mol/L pH 6.4 PBS 和含 1% 灭活健康兔血清的 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液配制方法

G.1 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 配制

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	8.68 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	6.92 g
氯化钠 (NaCl)	4.25 g
蒸馏水	加至 1 000 mL
103.41 kPa (121℃) 30 min 灭菌。	

G.2 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 配制

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	19.34 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	2.86 g
氯化钠 (NaCl)	4.25 g
蒸馏水	加至 1 000 mL
103.41 kPa (121℃) 30 min 灭菌。	

G.3 健康兔血清

在 56℃ 水浴灭活 30 min。

G.4 含 1% 灭活健康兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液的配制方法

0.15 mol/L pH 7.2 PBS	99 mL
灭活健康兔血清	1 mL
两者混合, 即为含 1% 灭活健康兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液。	

附 录 H
(规范性附录)
抗原敏化红细胞的制备

H.1 5%红细胞悬液的配制

颈静脉无菌采取健康成年雄性绵羊血液于灭菌的装有玻璃珠的三角烧瓶中，均匀摇动脱去纤维蛋白，按1:1 (V/V) 加入红细胞保存液，混匀后分装于灭菌链霉素瓶中 (5 mL~10 mL)，2℃~8℃冰箱可保存2个月。使用时，将红细胞移入离心管，3 000 r/min 离心 30 min，弃上清液，沉淀物用0.15 mol/L pH 7.2 PBS 悬浮，如上洗涤4次，配成5%红细胞悬液。

H.2 红细胞保存液配方

葡萄糖 20.5 g，氯化钠 4.2 g，柠檬酸三钠 8 g，柠檬酸 0.55 g，蒸馏水加至1 000 mL，101.8 kPa 高压灭菌 20 min，备用。

H.3 戊二醛化

取5%红细胞悬液与2℃~8℃保存的2.5%戊二醛按5:1混合，置磁力搅拌器上室温搅拌醛化2 h，以3 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，沉淀用0.15 mol/L pH 7.2 PBS 悬浮，如上洗涤3次，配成5%的醛化红细胞悬液，加0.01%的硫柳汞防腐，2℃~8℃冰箱保存备用。

H.4 鞣酸化

将5%的醛化红细胞悬液与等量的新配1:20 000 鞣酸溶液混合，置37℃水浴中30 min，以3 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，沉淀物用0.15 mol/L pH 6.4 PBS 悬浮，如上洗涤3次，配成5%醛化—鞣酸化红细胞悬液。

H.5 抗原致敏

分别取1份5%醛化—鞣酸化红细胞与1份PG₃ 抗原 (制备见C.1项)，37℃水浴作用30 min，其间不断搅拌，以3 000 r/min 离心 5 min 沉积红细胞，用含1%灭活健兔血清0.15 mol/L pH 7.2 PBS 悬浮，如上洗涤3次，配成10%致敏红细胞悬液。

H.6 效价测定

用含1%灭活健兔血清0.15 mol/L pH 7.2 PBS 将抗原稀释成1%的使用液，与标准阳性、阴性血清进行间接血凝试验。在阴性血清第1孔允许存在前滞现象(+)外，其余各孔均为(-)，稀释液对照为(-)的前提下，阳性血清效价不低于1:512，为合格。

附 录 I
(资料性附录)
ELISA 试验溶液配制方法

I.1 抗原包被液

0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液, 碳酸钠 1.95 g, 碳酸氢钠 2.93 g, 加双蒸水至 1 000 mL, 4℃冰箱保存限一周内使用, 经 103.4 kPa 灭菌 15 min 后可长期使用。

I.2 冲洗液 (0.01 mol/L pH 7.4 PBS-Tween20)

磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水) 2.9 g, 磷酸二氢钾 0.2 g, 氯化钾 0.2 g, 氯化钠 8.0 g, 加双蒸水至 1 000 mL, 再加入 0.5 mL Tween-20。

I.3 封闭液

冲洗液内加入 0.1% 牛血清白蛋白即可。

I.4 血清稀释液

冲洗液内加入 0.1% 牛血清白蛋白即可。

I.5 底物溶液

0.1 mol/L 柠檬酸溶液	25 mL
0.2 mol/L 磷酸氢二钠	25 mL
双蒸水	50 mL

混合均匀即为 pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液。

取 100 mL pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 加入 40 mg 邻苯二胺 (OPD), 临用前加入 150 μ L 30% 过氧化氢 (H_2O_2)。

I.6 反应终止液 [2 mol/L 硫酸 (H_2SO_4)]

取浓硫酸 (纯度 98%) 1 mL 加双蒸水 8 mL 即可。
