

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 1005—2025

鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体鉴别检测 二重 TaqMan 实时荧光 PCR 法

Differential detection of mycoplasma gallisepticum and mycoplasma
synoviae—Duplex TaqMan real-time fluorescent PCR

2025 - 06 - 06 发布

2025 - 06 - 12 实施

广西标准化协会 发 布

前 言

本文件参照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。

本文件由广西兽医协会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、田东县动物疫病预防控制中心、广西悦牧生物科技有限公司、广西大学、广西富凤农牧集团有限公司、广西金陵农牧集团有限公司、忻城县动物疫病预防控制中心、柳州市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：郑敏、梁素联、张江涛、闭璟珊、韦正吉、辛佳亮、张红云、雷磊、丁嘉烽、唐燕飞、黄超、黄小武、吴琦琳、吴健皓、杨蓉、麻永三、黄宝学、黄丽娟、牟静、梁兆斌、粟永春、沈前程、邹联斌、苏姣秀、吕思明、韦芳、钟华训、林斌、田明炳。

鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体鉴别检测 二重 TaqMan 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件界定了采用二重TaqMan实时荧光PCR法对鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体进行鉴别检测所涉及的术语和定义，规定了试剂和材料，仪器设备，样品采集、保存与运输，检测方法，结果判定等技术要求。

本文件适用于对临床样品及分离培养物中鸡毒支原体、鸡滑液囊支原体的鉴别检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡毒支原体 *Mycoplasma gallisepticum*, MG

临床上引起鸡毒支原体病的柔膜体纲支原体目支原体科支原体属成员。

3.2

鸡滑液囊支原体 *Mycoplasma syoviae*, MS

临床上引起鸡、火鸡滑液囊支原体病的柔膜体纲支原体目支原体科滑液囊支原体属成员。

3.3

二重 TaqMan 实时荧光 PCR duplex TaqMan real-time PCR

在同一TaqMan实时荧光PCR反应体系中加入两对引物和两条荧光探针，同时扩增并检测两条目的基因的检测方法。

3.4

Ct cycle threshold

检测到目的基因的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHQ1: 黑洞荧光猝灭基团1 (Black Hole Quencher 1)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

VIC: VIC亚磷酰胺 (VIC Phosphoramidite)

5 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.1 细菌核酸提取试剂和实时荧光 PCR 扩增试剂

宜采用商品化的细菌核酸提取试剂和实时荧光PCR预混液。

5.2 引物和探针

引物和探针序列见表1。

表 1 引物和探针序列

引物和探针名称	序列(5' -3')
MG上游引物	GGTGTCTTCACGTTCTTGGATC
MG下游引物MG	GAAGGTGAACTAAYTCCGTGGT
MG荧光探针	VIC-CGATCGGAATCCCAATCCCTAAACC-BHQ1
MS上游引物	TTRCTATTAGCAGCTAGTGCAGTGGC
MS下游引物	AGGATTATYAGTATTGGGTTCCAG
MG荧光探针	FAM-AGCAATTTCATGTGGTGATMAAACTCCA-BHQ1
注：Y=(CT)； R=(AG)； M=(AC)。	

5.3 灭菌 PBS (pH7.2)

将氯化钠8 g、氯化钾0.2 g、磷酸氢二钠1.44 g、磷酸二氢钾0.24 g在800 mL双蒸水中溶解，用1 mol/L盐酸调节溶液的pH至7.2，加双蒸水定容至1 000 mL， 1.034×10^5 Pa高压灭菌25 min。室温保存。

5.4 灭菌生理盐水

宜选用商品化的灭菌生理盐水。

6 仪器设备

- 6.1 II级生物安全柜。
- 6.2 荧光 PCR 仪及配套反应管。
- 6.3 小型台式高速离心机：离心力 12 000 g 及以上。
- 6.4 水浴锅。
- 6.5 漩涡振荡器。
- 6.6 组织研磨器。
- 6.7 微量移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL 和 1 000 μL）及配套吸头与 1.5 mL、2 mL 离心管。
- 6.8 冰箱：2℃~8℃和-20℃及以下。
- 6.9 核酸自动提取仪。

7 样品采集、保存和运输

7.1 生物安全要求

所有操作过程中的生物安全措施应满足GB 19489的规定。

7.2 样品采集

7.2.1 拭子样品

采集咽喉拭子时，将拭子深入喉头及上颚裂来回刮2~3次并旋转以沾取分泌物。采集渗出物棉拭子时，用拭子分别沾取鼻腔、鼻窦、眶下窦、气管、气囊、肿胀足垫及关节囊等处的渗出物。采集死胚拭子时，用拭子沾取卵黄膜或死胚表面。采集环境棉拭子时，将无菌棉拭子浸润灭菌PBS后在笼具、设备、饲槽、器皿、墙壁、地板处，来回擦拭3~5次。将采样后的拭子分别放入盛有1.2 mL灭菌PBS的2 mL离心管中，编号并填写相应采样单。发病鸡群宜随机采集30份以上的拭子样品。

7.2.2 组织样品

无菌采集鼻窦、气管、气囊、肿胀足垫、关节囊、卵黄膜、死胚等组织样品，分别装入无菌容器，编号并填写相应采样单

7.3 样品运输与保存

样品采集后用次容器（密封盒或密封袋）做二次包装，防渗漏。然后将样品置外包装保温箱中，加入预冷的冰袋，密封后运输，尽量于24 h内到达实验室。样本到达实验室后，应24 h内进行检测，或在2℃～8℃短暂保存。长期保存，应置于-20℃或以下。样品应避免反复冻融。

8 检测方法

8.1 样品处理

8.1.1 拭子样品

拭子样品先在漩涡振荡器上摇震，然后将拭子充分捻动、挤干后弃去，样品液经2 000 r/min离心5 min，取200 μL上清液备用。

8.1.2 组织样品

分别从不同部位待检组织各取样品约1 g，样品量少时可取全部组织。剪碎混匀，取其中约1 g，加10 mL灭菌PBS或灭菌生理盐水研磨成10 %组织匀浆液，移至离心管中剧烈摇震后，2 000 r/min离心5 min，取200 μL上清液备用。

8.2 待检样品核酸提取

采用细菌DNA提取试剂或核酸自动提取仪提取待检样品和对照样品的核酸。

8.3 引物和探针稀释

用灭菌双蒸水将引物和探针溶解并稀释至终浓度10 μmol/L，-20℃保存备用。

8.4 反应体系配制

反应体系配制见表2。

表2 反应体系

试剂	体积
TaqMan荧光PCR扩增酶预混液（5.1）	10 μL
MG上游引物和MG下游引物（5.2）	各0.5 μL
MG荧光探针（5.2）	0.2 μL
MS上游引物和MS下游引物（5.2）	各0.4 μL
MS荧光探针（5.2）	0.8 μL
核酸模板（8.2）	2 μL
灭菌双蒸水	补足至总体积为 20 μL

8.5 反应程序设置

加完试剂后立即离心混匀。将荧光PCR反应管置于荧光PCR仪内，选用VIC和FAM通道，设置反应参数为：95℃预变性30 s；40个循环（95℃变性15 s，60℃退火延伸30 s），在每个循环结束时收集荧光信号。

8.6 阴性及阳性对照设置

8.6.1 阴性对照

采用灭菌双蒸水作为阴性对照。

8.6.2 阳性对照

采用灭活的MG（TS-11株）和MS（MS-H株）培养物作为阳性对照。

9 结果判定

9.1 结果读取

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点为准，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 质量控制

9.2.1 阴性对照无Ct值或Ct值 >35 ，并且无特异性扩增曲线。

9.2.2 阳性对照VIC通道和FAM通道均出现特异性扩增曲线，且Ct值 ≤ 30 。

9.2.3 如阴性和阳性对照条件不满足9.2.1、9.2.2要求，此试验视为无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性判定

样品孔的VIC通道和/或FAM通道均无Ct值或者Ct值 >35 ，并且无特异性扩增曲线，表明样品中无MG或MS核酸。

9.3.2 阳性判定

样品孔VIC通道和/或FAM通道出现特异性扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，表示样品中存在MG和/或MS核酸。

中华人民共和国团体标准
鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体鉴别
检测二重TaqMan实时荧光PCR法
T/GXAS 1005—2025
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究