

T/GXAS

团 体 标 准

T/ GXAS 1004—2025

丝状支原体丝状亚种和牛支原体鉴别检测 二重 TaqMan 实时荧光 PCR 法

Differential detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and
Mycoplasma bovis — 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、宣贯并归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广西大学、皇氏赛尔生物科技（广西）有限公司、广西悦牧生物科技有限公司、南宁市动物疫病预防控制中心、钦州市动物疫病预防控制中心、防城港市动物疫病预防控制中心、忻城县动物疫病预防控制中心、田东县动物疫病预防控制中心、象州县动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：郑敏、闭璟珊、赵钟毅、胡丽萍、韦正吉、辛佳亮、丁嘉烽、滕翠金、熊锦萍、张红云、杨铭芬、张华智、莫模双、吴健皓、吴琦琳、梁素联、胡颖康、梁晟、杨荣、许瑞胜、杨蓉、苏姣秀、甘海霞、张步娴、吕思明、韦芳、钟华训、梁园明、林斌、蒋大平、麻永三、黄丽娟、黄稳妃、龚慧超。

丝状支原体丝状亚种和牛支原体鉴别检测

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法对丝状支原体丝状亚种和牛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丝状支原体丝状亚种和牛支原体的鉴别检测。

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

丝状支原体丝状亚种 *mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, Mmm

临床上引起牛传染性胸膜肺炎（contagious bovine pleuropneumonia, CBPP）的柔膜体纲支原体目支原体科支原体属成员。

3.2

牛支原体 *mycoplasma bovis*, M bovis

临床上引起传染性牛支原体肺炎的柔膜体纲支原体目支原体科支原体属成员。

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, Ct

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)

BHQ3: 黑洞荧光猝灭基团3 (Black Hole Quencher 3)

CY5: 花氰染料5 (Cyanine 5)

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)

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')
Mmm上游引物	ATCCCATATTTTAGAATAAGAGT
Mmm下游引物	CAAAATATGAACTAACAAAGATG
Mmm荧光探针	CY5-ACTAGATATGGGGTTTCGTAATTTCT-BHQ3
M bovis上游引物	ATCGCTATGGAATATTAATCA
M bovis下游引物	GTTTAAAAGTTCTTCCTGTAC
M bovis荧光探针	FAM-ATTCCACTAGGTTTAAGTGTGATG-BHQ1

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

无菌采集鼻腔拭子，将其放入盛有1.2 mL灭菌PBS的2 mL离心管中，编号并填写相应采样单。

7.2.2 组织样品

无菌采集肺脏、关节病变组织等组织样品，各组织样品分别装入无菌容器，编号并填写相应采样单。

7.2.3 关节液、胸腔积液样品

无菌采集牛的关节液、胸腔积液，每头约1 mL，放入2 mL离心管中，编号并填写相应采样单。

7.3 样品运输和保存

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，应在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。

8.1.3 关节液、胸腔积液和分离培养物样品

取关节液、胸腔积液和分离培养物1 mL，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。
反应体系配制

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
实时荧光 PCR 预混液 (5.1)	10 μL
Mmm 上游引物和 Mmm 下游引物 (5.2)	各 0.7 μL
Mmm 荧光探针 (5.2)	0.5 μL
M bovis 上游引物和 M bovis 下游引物 (5.2)	各 0.8 μL
M bovis 荧光探针 (5.2)	0.9 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CY5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 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

采用含有Mmm和M bovis目的基因片段（基因序列见附录A.1）的阳性质控品，或灭活的Mmm和M bovis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 CY5 通道和 FAM 通道均出现特异性扩增曲线，且 Ct 值均应 ≤ 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CY5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Mmm或M bovis核酸。

9.3.2 阳性判定

样品孔的CY5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Mmm和/或M bovis核酸。

附 录 A
(资料性)
阳性质控品基因序列

阳性质控品基因序列为:

GGATCCctgattatgatgacagtgggtcatattctaaatctttaatTTTTATTAGAagaacataaaatatattgagtttattgtaa
taagatattcttaaaaaattttcttatttttaatttttaaatcccatattttagaataagagtactagatatggggttttcgtaatttct
taattattttattcAgatctaaaatatcatctttgttagttcatattttgattttttctttattaatgtattctataagattaaatcata
ttactagaacagaagtatGTCGACtaatttttgctacagttttgttctatcgctatggaatattaatcaacaaggTTAATTtaacaatt
ccactaggtttaagtgttgatgaatTcacttagagttttctttgaacaattctatgaggataaaatactgccagataatttaattgtac
aggaagaacttttaactttgatctaaacctatcaagtgaatataaaAAGCTT

注：该阳性质控品基因序列由Mmm（第7-281位，对应Sequence ID:BX293980.2443115-443389nt）和M bovis（第288-488位，对应Sequence ID:CP022589.1757922-758121nt）基因序列，以及BamH I、Sal I 和HindIII酶切位点序列组合而成。



中华人民共和国团体标准
丝状支原体丝状亚种和牛支原体鉴
别检测二重TaqMan实时荧光PCR法
T/GXAS 1004—2025
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究