

第十二章 T/CALAS 40—2017《实验动物 肺支原体 PCR 检测方法》实施指南

第一节 工作简况

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会下达的 2017 年团体标准制(修)订计划,由广东省实验动物监测所负责团体标准《实验动物 肺支原体 PCR 检测方法》起草工作。该项目由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281)技术审查,由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作是按照中华人民共和国国家标准 GB/T1.1—2009《标准化工作导则》第 1 部分“标准的结构和编写规则”的要求进行编写的。本标准是在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”(项目编号 2013BAK11B01)和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”(项目编号 2011B040200010)课题基础上制定而成的。在制定过程中参考了国内外相关文献,对方法的敏感性、特异性、重复性等进行了研究,并对所建立的标准方法进行了应用研究,建立了可行、稳定、特异的肺支原体普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。

第二节 工作过程

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出,广东省实验动物监测所按照团体标准研制要求和编写工作的程序组成了由本单位专家和专业技术人员参加的编写小组,制定了编写方案,并就编写工作进行了任务分工。编制小组根据任务分工进行了资料收集和调查研究工作,在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”(项目编号 2013BAK11B01)和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”(项目编号 2011B040200010)课题研究基础上,组织编写实验动物肺支原体 PCR 检测方法技术资料。通过起草组成员的努力,经多次修改、补充和完善,形成了标准和编制说明初稿。

2017 年 3 月,标准草案首先征求中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的意见,专家对标准稿提出了系列修订建议和意见。根据提出的意见,编制组对《实验动物 肺支原体 PCR 检测方法》标准草案进行修改,形成本标准征求意见稿和编制说明。

2017 年 4~6 月,标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见,共收集意见或建议 3 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 2 条,未采纳 1 条。对《实验动物 肺支原体 PCR 检测方法》团体标准整理修改后,形成标准送审稿、标准送审稿编制说明和征求意见汇总处理表。

2017年8月30日,全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿专家审查会。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组,认真讨论了标准送审稿编制说明、征求意见汇总处理表,提出了修改意见和建议。与会专家认为本标准填补了肺支原体分子检测方法空白,是国标的有力补充,一致同意通过审查。会后,编制组根据与会专家提出的修改意见,对《实验动物 肺支原体 PCR 检测方法》团体标准修改完善后,形成标准报批稿、标准报批稿编制说明和征求意见处理汇总表。

2017年10月10日,编写组就8月30日的专家意见进行了讨论修改,形成了报批稿。

2017年12月29日,中国实验动物学会第七届理事会常务理事会第一次会议批准发布包括本标准在内的《实验动物 教学用动物使用指南》等23项团体标准,并于2018年1月1日起正式实施。

第三节 编写背景

支原体是一种简单的原核生物,其大小介于细菌和病毒之间,多数呈球形,没有细胞壁。肺支原体是啮齿类动物呼吸道疾病的主要病原体,肺支原体感染引起鼠的急、慢性呼吸道疾病,如鼻炎、中耳炎、气管炎和肺炎。肺支原体多为隐性感染,且感染率较高,还可与细菌、病毒等引起合并感染,对呼吸道的损害更为严重。肺支原体是国内外实验动物健康监测的一个必检项目,快速、准确地检测肺支原体是有效控制该病原的前提。在肺支原体检测方法研究方面,分离培养法因其可靠、直接的优点而成为肺支原体检测的首选方法,但由于该法同时具有烦琐、检出率不高等缺点,阻碍了该检测方法的应用。血清学检测方法如酶联免疫吸附试验(ELISA)也应用于支原体检测,但是抗体检测方法中不能应用于免疫功能低下或免疫缺陷小鼠如 SCID 小鼠和裸小鼠等的检测,因为它们不能产生正常的抗体反应。此外,抗体检测有一定局限性,一般只有活体动物才能采集血清用于检测,对病死动物和一些动物源性的生物制品(如动物细胞及其他生物材料)检测造成限制。

随着分子生物学的迅速发展,以 PCR 技术为基础的各种分子生物学诊断技术成为病原微生物检测的重要手段。PCR 病原检测方法具有特异性强、敏感度高、诊断快速等传统诊断方法所无法比拟的优点。美国和欧盟许多实验动物质量检测实验室都推荐采用 PCR 技术作为实验动物病原的检测方法。国内一些实验动物检测机构也开展了实验动物病原 PCR 检测技术研究,增加实验动物病原分子生物学检测技术方法除了应用于实验动物质量检测之外,还可以应用于实验动物产品、实验动物接种物和污染环境评价等,具有快速、高效的特点。本项目在现有国家标准的基础上,增加了普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法,这些方法适用于肺支原体的快速诊断。本标准的制定,对实验大小鼠的肺支原体日常监测、流行病学调查及临床诊断都具有重要的实用意义。

第四节 编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则。

(1) 科学性原则。在尊重科学、亲身实践、调查研究的基础上,制定本标准。

(2) 可操作性原则。本标准无论是从样品采集、处理到检测,都具有可操作性和实用性。

(3) 协调性原则。以切实提高我国实验动物病原微生物检测技术水平为核心,符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

第五节 内 容 解 读

本标准内容组成:范围;规范性引用文件;术语、定义和缩略语;检测方法原理;主要设备和材料;试剂;检测方法;结果判定;检测过程中防止交叉污染的措施;附录,共10章。现将《实验动物肺支原体 PCR 检测方法》征求意见稿主要技术内容确定说明如下。

一、本标准范围的确定

本标准适用于实验动物及其产品、分离培养物、细胞培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中肺支原体的检测。现行的实验动物国家标准抗体检测的适用范围存在一定局限,而本标准规定的 PCR 检测方法适用范围广泛,可以适用于实验动物及产品、实验动物接种物和环境等样本的检测。

二、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。凡是注明日期的引用文件,仅所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 14926.8—2001 《实验动物 支原体检测方法》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB/T 19495.2 《转基因产品检测 实验室技术要求》

三、术语、定义和缩略语

为方便标准的使用,本标准规定了以下术语、定义和缩略语:

Ct 值 荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数 cycle threshold

DNA 脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

PCR 聚合酶链反应 polymerase chain reaction

实时荧光 PCR 实时荧光聚合酶链反应 real-time PCR

四、检测方法原理

用合适的方法提取样本中的肺支原体 DNA,针对支原体核酸 16S RNA 基因设计特异的引物序列,通过 PCR 对模板 DNA 进行扩增,根据 PCR 检测结果判定该样品中是否含有肺支原体核酸成分。

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上,加入了一条特异性的荧光探针,探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信

号被淬灭基团吸收; PCR 扩增时, *Taq* 酶的 5' → 3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 淬灭作用消失, 荧光信号产生并被检测仪器接受。随着 PCR 反应的循环进行, PCR 产物与荧光信号的增长呈对应关系, 因此, 可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

五、主要设备和材料

规定了检测方法所需要的设备和材料。

六、试剂

规定了检测方法所需要的试剂。

(1) 灭菌 PBS。配制方法在标准附录中给出。

(2) DNA 抽提试剂: 基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 公司, Cat.No.69504), 或其他等效产品。DNA 抽提试剂给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

(3) 无水乙醇。

(4) PCR 试剂: Premix Taq™ (Version 2.0 plus dye) (TaKaRa 公司, Cat.No.RR901A), 或其他等效产品。PCR 试剂均给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

(5) 实时荧光 PCR 试剂: Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), (TaKaRa 公司, Cat.No.DRR390S), 或其他等效产品。实时荧光 PCR 试剂均给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

(6) DNA 分子质量标准: 100~2000 bp。

(7) 50×TAE 电泳缓冲液, 配制方法在标准附录中给出。

(8) 溴化乙锭: 10 mg/mL, 配制方法在标准附录中给出; 或其他等效产品。

(9) 1.5%琼脂糖凝胶, 配制方法在标准附录中给出。

(10) 引物和探针: 根据表 1、表 2 的序列合成引物和探针, 引物和探针加无灭菌去离子水配制成 10 μmol/L 储备液, -20℃保存。

普通 PCR 引物设计参照文献 (van Kuppeveld, 1993), 引物位于肺支原体 16S RNA 基因序列 (GenBank 登录号 NC001510), 并使用 GenBank 的 Blast 软件与数据库其他微生物序列进行比较, 保证引物和探针序列的通用性和特异性 (表 1)。

表 1 普通 PCR 检测引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	检测基因	产物大小/bp
正向引物	AGCGTTTGCTTCACTTTGAA	16S RNA	266
反向引物	GGGCATTTCCTCCCTAAGCT		

引物和探针设计同样根据肺支原体 16S RNA 基因序列 (GenBank 登录号 NC001510) 为模板, 利用 Primer Express3.0 软件 (Applied Biosystems 公司) 设计一套荧光定量 PCR 引物和探针 (表 2)。

表 2 实时荧光 PCR 扩增引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列 (5' → 3')	产物大小/bp
正向引物	GGAAATGCCCTAAGTATGACGG	94
反向引物	CGGATAACGCTTGCACCCTA	
探针	FAM-CCTTGTCTAGAAAGCACCGGCTAACTATGTG-BHQ-1	

注: 探针也可选用具有与 FAM 和 BHQ-1 荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

七、检测方法的确定

(一) 采样及样本的处理

标准规定了以下方面: 动物脏器组织, 细菌分离培养物, 细胞培养物, 实验动物饲料、垫料和饮水, 实验动物设施设备样本的采集及处理方法。

(二) 样本 DNA 提取

对两种不同核酸提取方法进行比较, 采用市售的“组织基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Tissue DNA Kit (天根公司)”和“DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 公司)”对 20 份肺组织物样本按各自说明书进行核酸抽提。采用 NanoDrop2000c 仪器对抽提的核酸进行浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280}) 检测。将两种方法提取的 DNA 模板, 采用肺支原体 PCR 分别进行检测, 统计检测结果, 比较两种提取方法用于 PCR 扩增的检出率。结果表明, 两种方法的提取效果相当, OD_{260}/OD_{280} 均为 1.8~2.0, 满足 DNA 模板的纯度要求 (表 3)。将上述提取的 DNA 模板进行肺支原体检测, 结果两种提取方法用于 PCR 扩增的检出率一致 (表 4)。因此, 两种核酸提取方法均适合用于该检测方法。

表 3 提取 DNA 模板的浓度、纯度比较结果

样本编号	TIANamp Tissue DNA Kit		DNeasy Blood & Tissue Kit	
	OD_{260}/OD_{280}	浓度/ (ng/μL)	OD_{260}/OD_{280}	浓度/ (ng/μL)
1	1.87	89.2	1.95	90.1
2	1.91	92.6	1.99	93.3
3	1.85	74.5	1.97	75.0
4	1.96	102.3	1.98	105.5
5	1.93	86.5	1.96	86.7
6	1.88	79.1	1.93	80.6
7	1.87	88.6	1.96	89.5
8	1.95	96.8	1.99	96.3
9	1.93	89.9	1.97	90.6
10	1.82	77.3	1.87	77.8

续表

样本编号	TIANamp Tissue DNA Kit		DNeasy Blood & Tissue Kit	
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度/ (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度/ (ng/μL)
11	1.89	73.6	1.96	74.1
12	1.84	85.2	1.88	85.6
13	1.96	93.6	1.93	94.2
14	1.86	65.3	1.92	65.7
15	1.87	88.6	1.89	89.7
16	1.80	91.5	1.86	91.9
17	1.90	92.3	1.93	95.4
18	1.86	84.8	1.95	85.4
19	1.89	87.5	1.92	89.4
20	1.81	66.4	1.85	66.3

表 4 检出率比较结果

试剂	检出率	参考值
TIANamp Tissue Kit	18/20	18/20
DNeasy Blood & Tissue Kit	18/20	

(三) 普通 PCR

1. PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 5。反应液的配制在冰上操作, 每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照。其中, 以含有肺支原体的组织或培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板; 以不含有肺支原体 DNA 样本 (可以是正常动物组织或正常培养物) 作为阴性对照模板; 空白对照即为不加模板对照 (no template control, NTC), 即在反应中用水来代替模板。

表 5 PCR 反应体系

反应组分	用量/μL	终浓度
2×Premix Taq Mix (plus dye)	25	1×
正向引物 (10 μmol/L)	2	400 nmol/L
反向引物 (10 μmol/L)	2	400 nmol/L
DNA 模板	10	
灭菌去离子水	11	
总体积	50	

2. PCR 反应参数

PCR 反应参数见表 6。

表 6 PCR 反应参数

步骤	温度/℃	时间/min	循环数
预变性	95	5	1
变性	94	1	
退火	55	1	35
延伸	72	2	
延伸	72	10	1

3. PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

将适量 50×TAE 稀释成 1×TAE 溶液，配制含核酸染料溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶。PCR 反应结束后，取 10 μL PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测，以 DNA 分子质量作为参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在 3~5 V/cm，当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

(四) 实时荧光 PCR

规定了实时荧光 PCR 反应体系和反应参数。反应体系和反应参数的确定依据以下优化试验。

1. 方法优化

实时荧光 PCR 反应选用的试剂盒为 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (TaKaRa 公司, Cat.No.DRR390S), 扩增和检测在全自动荧光定量仪 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems 上进行。

(1) 扩增程序的确定。根据引物、探针的具体特性，仪器上的反应程序在退火延伸条件选择上试验了 3 种温度和 3 种时间：95℃ 30 s, 95℃ 5 s→(58/60/62)℃ (34/45/60) s, 40 次循环，在退火延伸阶段采集荧光信号。各种试剂的加样量分别为每个反应管中含 2×Premix Ex Taq 25 μL、正向引物 (10 μmol/L) 1 μL、反向引物 (10 μmol/L) 1 μL、探针 (10 μmol/L) 2 μL、Rox 1 μL、模板 DNA 10 μL，用去离子水补足到反应总体积 50 μL。结果均可见阳性扩增曲线，但考虑到使引物扩增有更好的特异性和缩短反应时间，最后确定扩增程序为：95℃ 30 s, 95℃ 5 s→60℃ 34 s, 40 次循环。

(2) 最佳引物浓度的确定。应用以上扩增程序，先固定探针终浓度为 200 nmol/L，肺支原体上下游引物浓度在 100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L、600 nmol/L、800 nmol/L、1000 nmol/L 中选择，通过比较 Ct 值和荧光强度增加值（绝对荧光强度与背景荧光强度的差值，ΔRn）来判断优化结果。最佳引物浓度的确定以 Ct 值最小，扩增曲线荧光强度增加值最大所对应的引物浓度为最佳浓度（表 7，图 1）。最终确定肺支原体、上下游引物终浓度为 200 nmol/L。

表 7 肺支原体引物优化结果

	<i>M. pulmonis</i> 引物终浓度					
	100 nmol/L	200 nmol/L	400 nmol/L	600 nmol/L	800 nmol/L	1000 nmol/L
Ct 值	23.80/23.67	22.76/22.77	23.13/23.01	22.89/23.12	23.06/23.30	23.57/23.46

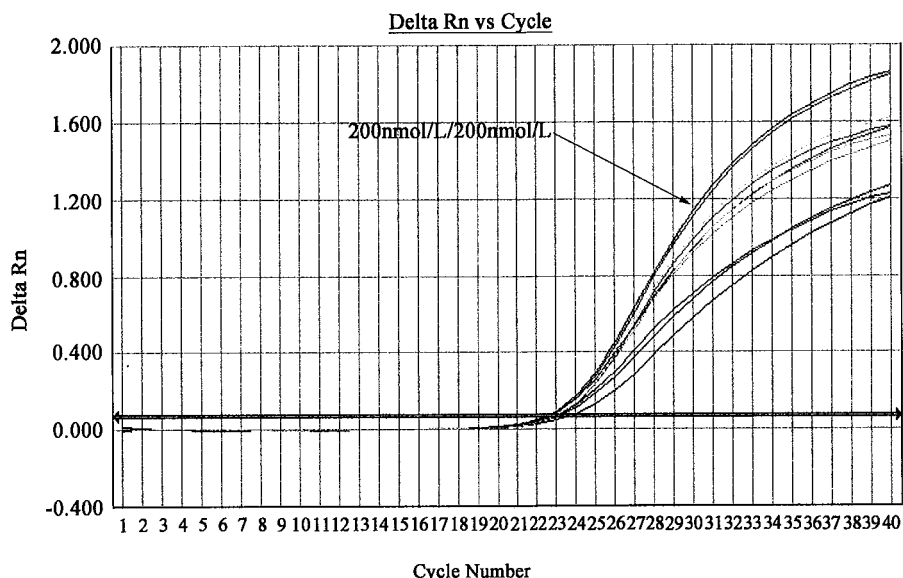


图1 肺支原体引物优化扩增曲线

(3) 最佳探针浓度的确定。根据选择好的最佳肺支原体上、下游引物终浓度 400 nmol/L, 进一步进行 TaqMan 探针浓度的确定, 在 100 nmol/L、200 nmol/L、300 nmol/L、400 nmol/L、500 nmol/L、600 nmol/L、700 nmol/L 中选择。以 Ct 值最小、扩增曲线荧光强度增加值最大所对应的探针浓度为最佳浓度 (表 8, 图 2)。考虑探针成本, 最终确定 TMEV 探针终浓度 400 nmol/L。

表 8 肺支原体探针优化结果

	<i>M. pulmonis</i> -P 终浓度						
	100 nmol/L	200 nmol/L	300 nmol/L	400 nmol/L	500 nmol/L	600 nmol/L	700 nmol/L
Ct 值	23.09/23.19	23.71/23.54	23.21/23.28	22.70/22.61	22.98/23.00	23.31/23.26	23.15/23.21

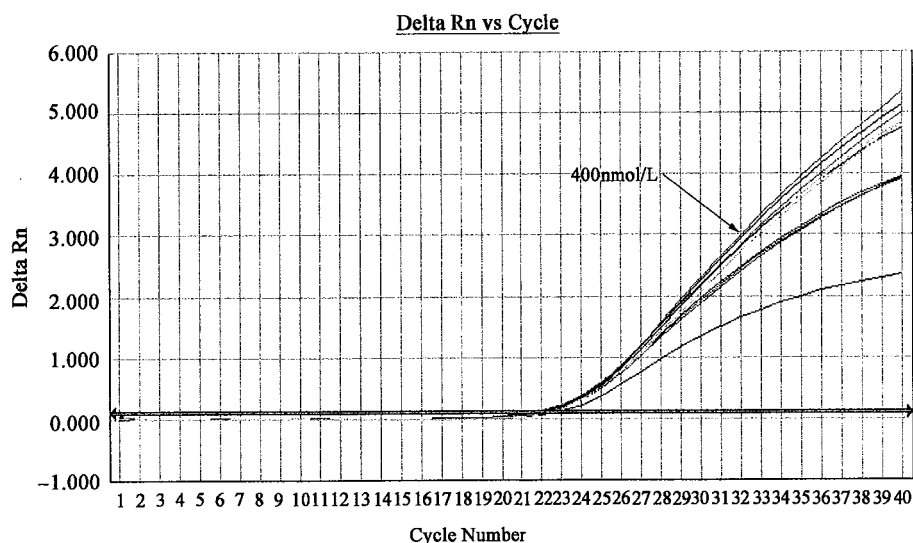


图2 肺支原体探针扩增曲线

2. 不同试剂的测试

本标准方法主要采用 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (TaKaRa 公司, Cat.No.DRR390S)。除此以外,还选用了多种试剂,按优化好的引物和探针浓度进行了测试,即按上、下游引物终浓度 400 nmol/L、探针终浓度 200 nmol/L、反应总体积为 50 μ L 的情况下,模板 DNA 量为 10 μ L。不同试剂选用不同的 *Taq* 酶激活条件及 PCR 条件,40 次循环。结果所有试剂均可得到很好的扩增结果。这些试剂包括: TaqMan® Universal PCR Master Mix (美国 Applied Biosystems 公司产品, Cat #4304437), GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega 产品, 货号 A6101)。

八、结果判定

(一) 普通 PCR

1. 质控标准

在阴性、阳性对照成立的条件下,即阳性对照的扩增产物经电泳检测可见到 266 bp 扩增条带、阴性对照的扩增产物无任何条带,可进行结果判定。

2. 结果判定

(1) 样本经琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上观察到 266 bp 扩增条带,判为肺支原体核酸阳性。

(2) 样本经琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上未观察到 266 bp 扩增条带,判为肺支原体核酸阴性。

(二) 实时荧光 PCR

1. 结果分析和条件设定

直接读取检测结果,基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

2. 质控标准

(1) 空白对照无 Ct 值,并且无荧光扩增曲线,一直为水平线。

(2) 阴性对照无 Ct 值,并且无荧光扩增曲线,一直为水平线。

(3) 阳性对照 Ct 值 ≤ 35 ,并且有明显的荧光扩增曲线,则表明反应体系运行正常;否则此次试验无效,需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

3. 结果判定

(1) 若待检测样品无荧光扩增曲线,则判定肺支原体核酸阴性。

(2) 若待检测样品有荧光扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 35 ,则判断肺支原体核酸阳性。

(3) 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间,应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后,若 Ct 值 ≥ 40 ,则判定肺支原体核酸阴性;重新检测后,若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,则判定肺支原体核酸阳性。

(三) 序列测定

必要时,可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定。序列结果与已公开发表的肺支原体特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90%以上,可确诊待检样本肺支原体核酸阳性,否则判定肺支原体核酸阴性。

九、检测过程中防止交叉污染的措施

给出了检测过程中如何防止交叉污染的措施,具体按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

十、附录 A

本标准附录为规范性附录,给出了试剂配制方法。

第六节 分析报告

一、材料与方法

(一) 细菌、菌株、载体和临床样本

肺炎原体(ATCC 23115)、嗜肺巴斯德杆菌(ATCC 35149)、鼠放线杆菌(ATCC 49577)、仙台病毒(SV, ATCC VR-105)、小鼠肺炎病毒(PVM, ATCC VR-25)购自美国典型微生物菌种保藏中心,肺炎克雷伯菌(CMCC 46117)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、鼠伤寒沙门氏菌(CMCC 50115)、小肠结肠炎耶尔森菌(CMCC 2207)、假结核耶尔森菌(CMCC 53504)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)购自广东省微生物研究所,大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 和克隆载体 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa 公司)。临床样本包括: 2010~2014 年本实验室收到的广东、湖北、北京、四川、云南和上海等各地送检的 SPF 级活体大鼠或大鼠肺脏 50 份; 2014 年本实验室收到的广东省送检的 SD 大鼠,背景调查表明该 SD 大鼠曾饲养于普通环境,共 50 份;捕获于广州市某实验动物养殖场附近的野鼠 59 份,野鼠为褐家鼠,无菌采集活体大鼠的肺脏, -40℃ 保存;临床样本共计 159 份。

(二) 引物及探针的设计合成

引物和探针序列见表 1 和表 2,引物和探针由 Invitrogen(广州)公司合成。

(三) 细菌和样品核酸提取

纯化的细菌的核酸抽提直接按组织基因组提取试剂盒(Qiagen 公司)操作说明书进行;在提取革兰氏阳性菌 DNA 之前,细菌经过溶菌酶 37℃ 处理 30 min,然后再用组织基因组提取试剂盒进行核酸提取。

(四) 肺炎原体质粒标准品的制备

以提取的肺炎原体 DNA 为模板,用 Premix Ex Taq(TaKaRa 公司)进行 PCR,反应体系为: 2×Premix Ex Taq 25 μ L,上游引物肺炎原体-F(10 μ mol/L) 2.5 μ L,下游引物肺炎原体-R(10 μ mol/L) 2.5 μ L, DNA 5 μ L,加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件: 94℃ 2 min,一个循环; 94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。反应得到目的大小片段后,用胶回收试剂盒回收目的片段,将回收的目的片段连接至 pMD-19T 载体,并转化至 DH5 α 感受态细胞中。用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆,用 PCR 鉴定阳性克隆菌,并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒(Omega 公司)提取质粒,微量紫外分光光度计测定浓度与纯度,根据下面的公式计算拷贝数: 拷贝数

(copies/ μL) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ DNA 浓度 (g/ μL) / 质量 MW (g/mol)。其中, MW = DNA 碱基数 (bp) $\times$ 660 daltons/bp, DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

(五) 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法对肺支原体、嗜肺巴斯德杆菌、鼠放线杆菌、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、鼠伤寒沙门氏菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、铜绿假单胞菌的 DNA 进行检测, 验证该方法的特异性。

(六) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。利用表 5 中优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值, 以 Ct 值为纵坐标、以起始模板浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线。

(七) 重复性试验

对 5 份 10 倍系列稀释的肺支原体质粒标准品 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μL) 在同一次反应中进行 5 次重复测定, 对各稀释度的 Ct 值进行统计, 计算每个样品各反应管之间的批内变异系数 (CV%); 对上述样品分别进行 5 次测定, 计算同一样品每次测定结果之间的批间变异系数 (CV%)。

(八) 临床样本的检测

利用肺支原体荧光定量 PCR 方法对 159 份临床样本进行检测, 每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。同时采用普通 PCR 方法进行检测, 比较两种方法的阳性检出率。

二、结果

(一) 肺支原体质粒标准品制备

用 PCR 扩增肺支原体得到大小约 94bp 的特异片段, 与预期目的片段大小相符 (图 3)。与 pMD19-T 载体连接构建重组阳性质粒, 对重组质粒进行 PCR 鉴定, 条带大小与预期结果相符。重组质粒的测序结果与目的基因序列同源性为 100%, 表明质粒标准品制备成功。

(二) 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法对肺支原体、嗜肺巴斯德杆菌、鼠放线杆菌、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、鼠伤寒沙门氏菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、铜绿假单胞菌的 DNA 进行检测, 结果除肺支原体为阳性外, 其他病原微生物均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 4)。

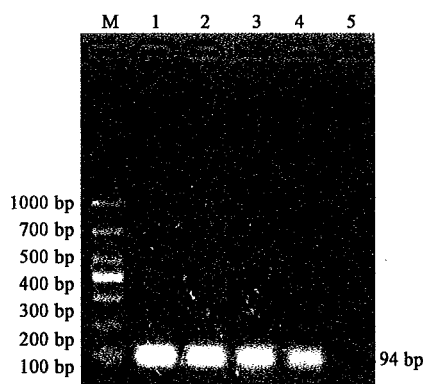


图 3 肺支原体 PCR 电泳图

M, DNA Marker DL2000; 1~4, 肺支原体; 5, 阴性对照

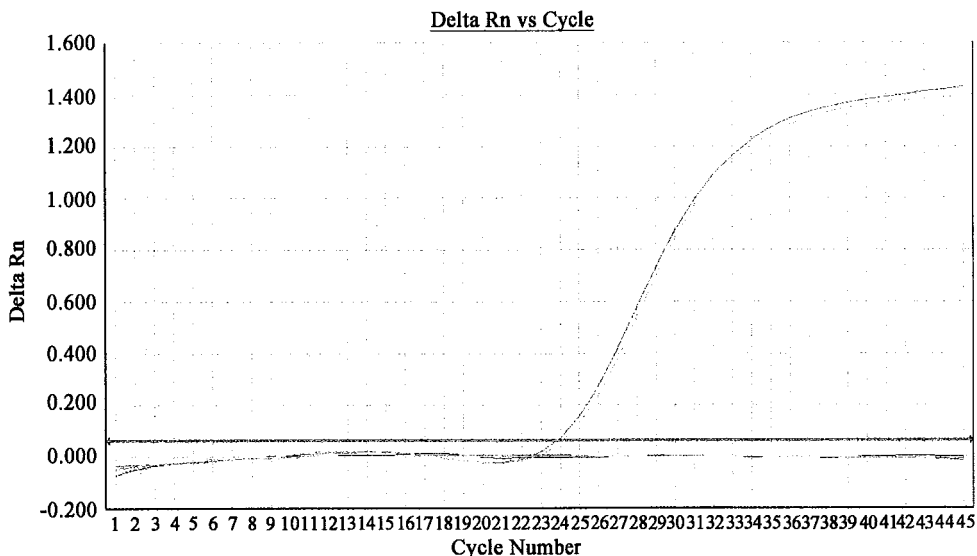


图4 肺支原体实时荧光 PCR 特异性检测结果

(三) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。利用优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值, 以 Ct 值为纵坐标、以起始模板浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 5。由图 5 可见各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等, 无模板对照 (no template control, NTC) 没有荧光扩增曲线为阴性结果, 该方法的最低检测限为 100 copies/ μL 。以标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标、以临界环数 (threshold cycle, Ct) 为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线, 标准质粒在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 具有良好的线性关系, 结果见图 6。其线性回归方程为 $\text{Ct} = -3.28 \times \lg(\text{拷贝数}) + 39.80$, 标准曲线斜率为 -3.28, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.28} - 1 = 0.942$, 即扩增效率为 94.2%, 相关系数 $R^2 = 0.9978$, 说明 PCR 扩增该标准品的效率较高, 线性关系良好。标准质粒在 1×10^0 copies/ μL 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为 10 个拷贝。

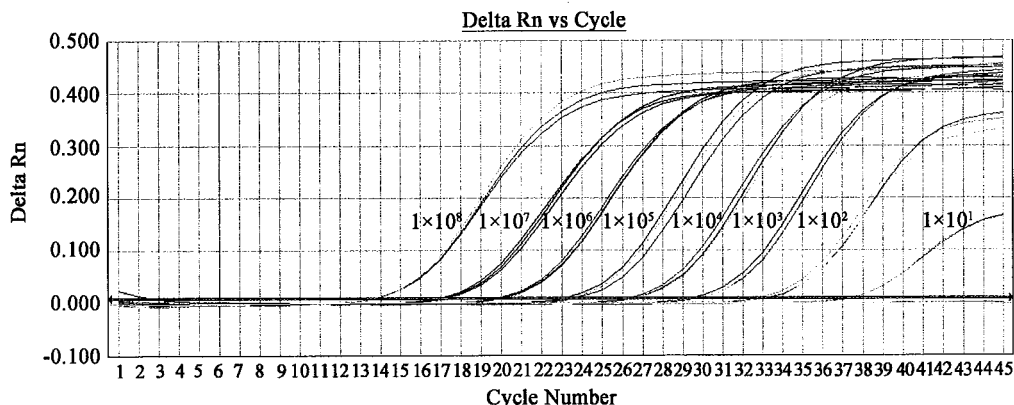


图5 10倍系列稀释质粒标准品的荧光定量扩增曲线

1~7, $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μL 质粒标准品; 8, 1×10^1 copies/ μL 、 1×10^0 copies/ μL 质粒和无模板对照

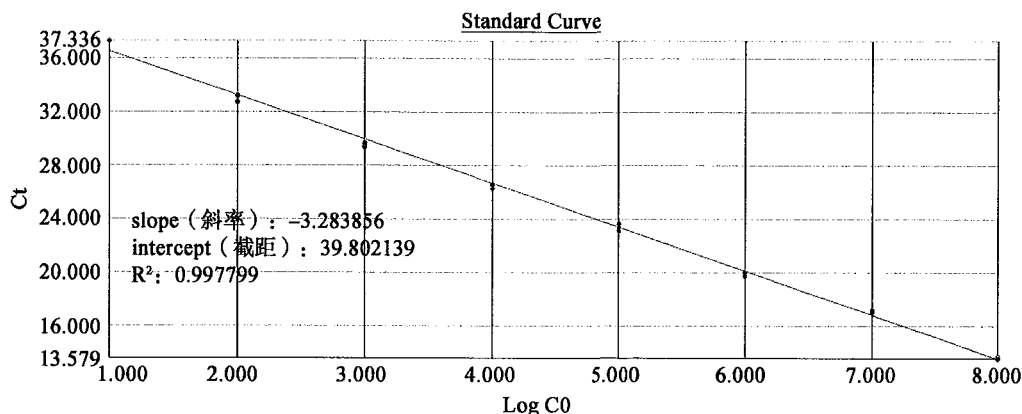


图 6 10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

(四) 重复性试验结果

通过对 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μ L 5 个稀释度质粒标准品样本进行重复性检测, 批内及批间重复性试验的变异系数均小于 4 % (表 9), 表明建立荧光定量 PCR 方法重复性好, 方法稳定可靠。

表 9 肺支原体荧光定量 PCR 批内和批间重复性试验检测结果

质粒/(copies/ μ L)	Ct 值					Ct 平均值	标准差 (SD)	变异系数 (CV) /%
	1	2	3	4	5			
批内重复								
1 $\times$ 10 ⁷	15.80	16.62	17.30	16.60	16.68	16.60	0.53	3.20
1 $\times$ 10 ⁶	19.07	20.28	20.22	20.18	20.25	20.00	0.52	2.61
1 $\times$ 10 ⁵	22.32	23.47	23.46	23.25	23.76	23.25	0.56	2.43
1 $\times$ 10 ⁴	25.73	27.07	26.47	26.42	26.55	26.45	0.48	1.85
1 $\times$ 10 ³	29.41	30.18	—	30.12	29.56	29.82	0.33	1.13
批间重复								
1 $\times$ 10 ⁶	19.54	19.52	19.08	19.63	19.83	19.52	0.54	2.75
1 $\times$ 10 ⁵	23.08	23.11	22.18	22.75	23.09	22.84	0.91	3.99
1 $\times$ 10 ⁴	26.52	26.41	25.95	25.75	26.67	26.26	1.03	3.92
1 $\times$ 10 ³	29.17	29.42	28.60	29.29	29.54	29.20	1.06	3.65
1 $\times$ 10 ²	32.65	32.41	32.40	32.24	33.21	32.58	1.24	3.80

(五) 荧光定量 PCR 在临床样本检测中的应用

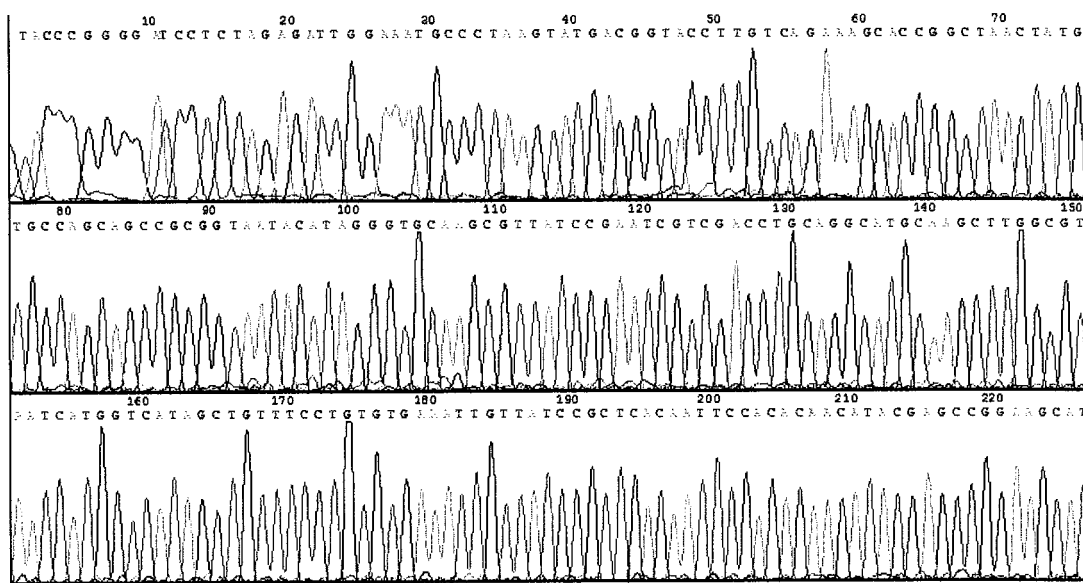
应用建立的肺支原体荧光定量 PCR 方法和普通 PCR 方法对 159 份样本进行检测, 同时采用 ELISA 方法检测动物抗体, 比较三种方法的阳性检出率 (表 10)。结果发现, 荧光定量 PCR 比普通 PCR 敏感。需要指出的是, 采用 PCR 和 ELISA 检测方法对同一只动物进行检测时, 部分动物出现不一致的结果, 这是由病原感染动物后抗原和抗体不同消长规律所造成的。但是对整个动物群体进行检测时, 两种方法具有较好的相关性, 说明在临床监测中, 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法可以作为抗体检测的有效补充手段。

表 10 肺支原体荧光定量 PCR 临床样本检测结果

临床样品	阳性数/样本数 (检出率, %)		
	肺支原体荧光 PCR 检测方法	普通 PCR 检测方法	ELISA
SPF 级大鼠	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)
普通环境下饲养的 SD 大鼠	12/50 (24%)	9/50 (18%)	50/50 (100%)
野鼠	57/59 (96.6%)	53/59 (89.8%)	16/16 (100%)

(六) 阳性样本测序验证

对其中 2 份阳性进行测序验证, 结果显示 2 个样本扩增的基因序列相同, 均为 94 bp。通过 GenBank 上的 Blast 软件进行序列比对, 阳性样本的序列与 GenBank 上的肺支原体毒株的同源性在 99%~100% (图 7), 证明样本为肺支原体阳性样本, 也验证了建立的检测方法正确有效。



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ <i>Mycoplasma pulmonis</i> strain IRMT179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	174	174	100%	2e-40	100%	KP836312.1
☐ <i>Mycoplasma pulmonis</i> strain Ash (PG34) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	174	174	100%	2e-40	100%	JN935865.1
☐ <i>Mycoplasma pulmonis</i> strain NBRC 14986 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	174	174	100%	2e-40	100%	NR_113682.1
☐ <i>Mycoplasma pulmonis</i> (strain UAB CTIP) complete genome, segment 3/3	174	174	100%	2e-40	100%	AL445565.1
☐ <i>Mycoplasma pulmonis</i> strain PG34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	174	174	100%	2e-40	100%	NR_041744.1
☐ <i>M. pulmonis</i> 16S ribosomal RNA small subunit	171	171	100%	3e-39	99%	M23941.1

图 7 肺支原体 PCR 产物测序图

(七) 普通 PCR

1. 菌株、载体和临床样本

同实时荧光 PCR。

2. 肺支原体普通 PCR 检测方法

PCR 试剂采用 TaKaRa 公司的 rTaq Premix, 反应体系为 20 μL : DNA 模板 2 μL , 2 $\times$ Premix Buffer (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 补 H_2O 至 20 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完成后取 5 μL 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果表明, 肺支原体在 266 bp 位置有目的条带, 与预期结果相符 (图 8)。

3. 普通 PCR 特异性试验

采用建立的 PCR 方法对肺支原体、嗜肺巴斯德杆菌、鼠放线杆菌、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、鼠伤寒沙门氏菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、铜绿假单胞菌 DNA 进行检测, 验证该方法的特异性。结果表明, 除肺支原体为阳性外, 其他病原均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 9)。

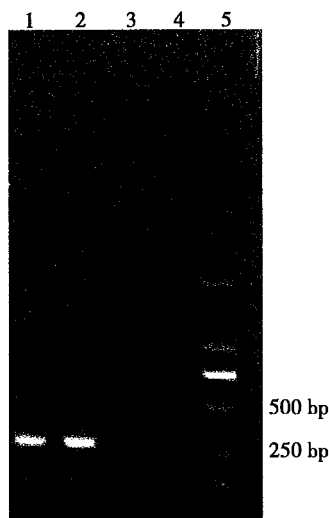


图 8 肺支原体普通 PCR 结果

M, DNA Marker DL2000; 1~2, 肺支原体;
3~4, 阴性对照; 5, 对照

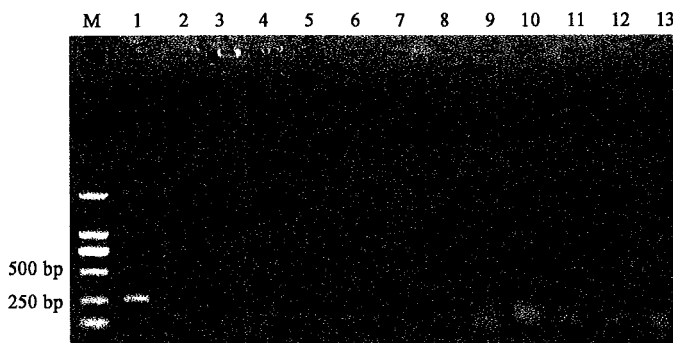


图 9 肺支原体 PCR 检测方法特异性试验结果图

M, DNA Marker DL2000; 1, 肺支原体; 2~12, 其他 11 种微生物; 13, NTC

4. 普通 PCR 敏感性试验

构建肺支原体的重组质粒, 将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 系列标准模板。按所建立的方法进行检测, 测定模板最低检出量, 结果肺支原体敏感性为 $1 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ (图 10)。

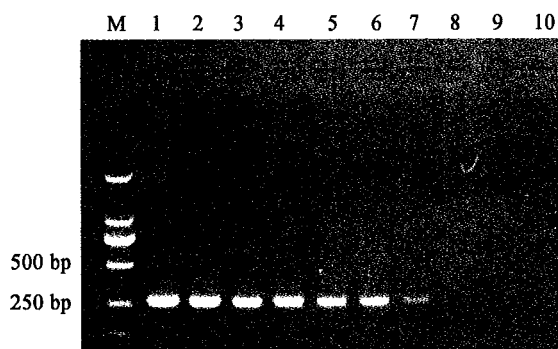


图 10 肺支原体检测方法敏感性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1~9, $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA; 10, NTC

第七节 其他说明

一、国内外同类标准分析

本标准为国内原创标准，国际上无类似标准。

二、与法律法规、标准关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写，与实验动物标准体系协调统一；本标准与《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》等国家相关法规及实验动物强制性标准的规定和要求协调一致。目前实验动物国家标准没有肺支原体 PCR 检测方法标准，本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

三、重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式，多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

四、标准实施要求和措施

本标准发布实施后，建议通过培训班、会议宣传和网络宣传等形式积极开展宣传贯彻培训活动。面向各行业开展动物实验的机构和个人，宣传贯彻标准内容。

参考文献

GB 14922.2—2011 实验动物 微生物学等级及监测.

GB 14926.28—2001 实验动物 支原体检测方法.

- Loganbill JK, Wagner AM, Besselsen DG. 1994. Detection of mycoplasma pulmonis by fluorogenic nuclease polymerase chain reaction analysis. J Virol, 68: 6476-6486.
- van Kuppeveld FJ, Melchers WJ, Willemse HF, et al. 1993. Detection of mycoplasma pulmonis in experimentally infected laboratory rats by 16S rRNA amplification. Laboratory animals, 37: 341-351.