

ICS 11.220
CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA 272—2025

实验动物 鞭毛虫 PCR 检测方法

Laboratory animal—PCR for detection of flagellates

2025 - 7 - 17 发布

2025 - 7 - 17 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

前 言

本文件按照 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。

本文件由江苏奥萃药康生物科技股份有限公司提出。

本文件由中国兽医药学会归口。

本文件起草单位：江苏奥萃药康生物科技股份有限公司、上海实验动物研究中心、苏州大学苏州医学院实验动物中心、苏州西山生物技术有限公司、北京药康生物技术有限公司。

本文件主要起草人：赵静、魏晓峰、周正宇、王晨娟、史培良、杨慧欣、王韬、李灵恩、蔡利东、李乃馨、于灵芝、盛雅洁、王立鹏。

中国兽医协会
CVMA
全国团体标准

实验动物 鞭毛虫 PCR 检测方法

1 范围

本文件描述了实验动物鞭毛虫的PCR检测方法。
本文件适用于实验小鼠、大鼠的鞭毛虫定性检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 18448.10 实验动物 肠道鞭毛虫和纤毛虫检测方法
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)
EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid)
PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline)
PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)
RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)
SSU rRNA: 核糖体小亚基 RNA (Small subunit ribosomal RNA)
TAE: 三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液 (Tris-acetate-EDTA)
16S rRNA: 16S 核糖体 RNA (16S ribosomal RNA)
23S rRNA: 23S 核糖体 RNA (23S ribosomal RNA)

5 原理

用合适的方法提取样本中的鞭毛虫 DNA，针对鞭毛虫 23S rRNA、SSU rRNA 等特异性靶点基因设计引物序列，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鞭毛虫的核酸成分，以判断鞭毛虫感染情况。

6 实验材料

6.1 试剂

6.1.1 除非另有说明,所用试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

6.1.2 商品化粪便 DNA 提取试剂盒或其他等效产品。

6.1.3 PCR 反应酶:商品化 DNA 聚合酶或其他等效产品。

6.1.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.02 mol/L, pH 7.2), 配制方法按附录 A。

6.1.5 琼脂糖。

6.1.6 50×TAE 电泳缓冲液, 配制方法按附录 A。

6.1.7 DNA 相对分子质量标准: 100 ~ 2000 bp (DL2000 DNA Marker)。

6.1.8 溴化乙锭 (EB): 10 mg/mL, 配制方法按附录 A, 或其他等效产品。

6.1.9 1.5 % 琼脂糖凝胶, 配方按附录 A。

6.2 引物

针对鼠六丝鞭毛虫 (*Spironucleus muris*)、鼠三毛滴虫 (*Tritrichomonas muris*) 的特异性靶点基因序列 (见附录 B) 设计特异性引物, 引物序列见附录 C。

6.3 主要仪器设备和耗材

6.3.1 电动匀浆器。

6.3.2 0.5 mm 无菌氧化锆珠子。

6.3.3 恒温水浴锅。

6.3.4 高速台式离心机 (离心速度可达 13000 r/min)。

6.3.5 涡旋振荡仪器。

6.3.6 分析天平。

6.3.7 高压蒸汽灭菌器。

6.3.8 冰箱 (-20 °C、-80 °C)。

6.3.9 生物安全柜。

6.3.10 超净工作台。

6.3.11 PCR 仪。

6.3.12 凝胶电泳仪。

6.3.13 微量移液器 (0.5 μL ~ 10 μL 、2 μL ~ 20 μL 、20 μL ~ 200 μL 、100 μL ~ 1000 μL)。

6.3.14 无核酸酶的离心管 (1.5 mL、2 mL、5 mL、15 mL)，无核酸酶的枪头 (10 μL 、200 μL 、1 mL)，无核酸酶的 PCR 扩增反应管 (0.2 mL 八连排或 96 孔板)。

6.3.15 采样工具：剪刀、镊子和无菌棉拭子等。

7 实验步骤

7.1 通则

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行；实验室生物安全要求按照 GB 19489 的规定执行。

7.2 样品采集

参考 GB/T 18448.10 的方法，无菌采集实验动物盲肠内容物、粪便，每份 40 mg ~ 60 mg，装入无菌容器中。采样过程中避免样品间交叉污染。采集完成后，编号备用。

7.3 废弃物处理

采样结束后，动物尸体、未使用完的盲肠内容物、粪便样品应使用生物安全垃圾袋包装完整，高压灭菌后交由医疗垃圾处理单位处理；采样器材应使用消毒液浸泡或高压灭菌消毒，并做好实验台面及采样时的消毒。

7.4 样品 DNA 提取

7.4.1 样品预处理

取待检实验动物的新鲜粪便 40 mg 置于无菌研磨管中，加入 400 μL 无菌 PBS 溶液和 3 ~ 5 颗无菌氧化锆珠子，放入电动匀浆仪中匀浆。取匀浆后的粪便样本 100 mg ~ 300 mg 至 1.5 mL 无菌离心管中用于 DNA 提取或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.4.2 核酸提取

利用商品化粪便寄生虫 DNA 提取试剂盒或核酸自动提取仪进行样本 DNA 的提取，提取方法按照选用试剂盒配套的说明书进行。

7.5 PCR 检测操作程序

7.5.1 PCR 扩增反应体系

PCR 扩增反应体系见表 1。每次反应需同时设置阳性对照和阴性对照，其中以鞭毛虫 DNA 或标准质粒 DNA 作为阳性对照、以不含有鞭毛虫的其它寄生虫 DNA 作为阴性对照。

表1 PCR扩增反应体系

组分	1 个检测反应的加入量 (μL)	终浓度
2 × Rapid Tag Master Mix	15.0	1×
上游引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.3	100 nmol/L
下游引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.3	100 nmol/L

模板 DNA	2	/
去离子水	12.4	/
总体积	30	/

7.5.2 反应程序

PCR 扩增反应程序见表 1。

表 2 PCR 扩增反应程序

反应温度 (°C)	反应时间	循环数
95	5min	1
95	30 s	35
62	30 s	
72	30 s	
72	5min	1

注：鼠六丝鞭毛虫、鼠三毛滴虫特异性引物的退火温度 T_a 值 62°C，延伸时间 30 s。

7.5.3 电泳观察

使用 1×TAE 溶液，配制含有溴化乙锭的 1.5 % 琼脂糖凝胶。用移液器取 8 μL ~ 10 μL 的 PCR 扩增产物加入 1.5 % 琼脂糖凝胶的梳孔中，其它孔中分别加入等量的阴性对照、阳性对照的 PCR 产物，并以 DL2000 DNA Marker 作为参照进行电泳检测。电压根据实际电泳槽长度确定，一般控制在 3 V/cm ~ 5 V/cm，当看到指示染料移动到凝胶边缘时关闭电源结束电泳。将凝胶放入凝胶成像系统进行拍照记录电泳结果。

7.6 结果判定

7.6.1 试验成立条件

阳性对照出现相应大小（各引物的扩增产物大小见附录 C）的目的扩增条带，阴性对照未出现条带，试验结果有效；否则应重新进行试验。

7.6.2 结果判定

7.6.2.1 鼠六丝鞭毛虫特异性引物检测被检样本出现 586 bp 条带时，判定为鼠六丝鞭毛虫核酸阳性，否则为鼠六丝鞭毛虫核酸阴性。

7.6.2.2 鼠三毛滴虫特异性引物检测被检样本出现 274 bp 条带时，判定为鼠三毛滴虫核酸阳性，否则为鼠三毛滴虫核酸阴性。

7.6.2.3 序列测定

必要时，可取待检样品扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的鞭毛虫（包括鼠六丝鞭毛虫、鼠三毛滴虫）特异性片段序列进行比对。序列同源性在 95 % 以上，可判定待检样品鞭毛虫核酸阳性；否则判定鞭毛虫核酸阴性。

附录 A (规范性) 试剂配置

A.1 pH7.2, 0.02 mol/L PBS的配制

A.1.1 A 液的配制

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液：称量磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g，加入适量去离子水溶解，最后定容至 1000 mL，混匀。

A.1.2 B 液的配制

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液：称量磷酸氢二钠 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)，先加入适量去离子水溶解，最后定容至 1000 mL。

A.1.3 pH7.2, 0.02 mol/L PBS 的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加氯化钠 (NaCl) 8.5 g，加 800 mL 无菌去离子水溶解稀释，用 HCl 调节 pH 至 7.2，最后定容至 1000 mL，经 121°C 高压灭菌 15 min，冷却备用。

A.2 50×TAE 电泳缓冲液的配制

A.2.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 (pH8.0)

取乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 18.61 g，用 80 mL 无菌去离子水进行溶解，再用 5 mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 调至为 8.0，最后用无菌去离子水定容至 100 mL，经 121°C 高压灭菌 15 min，冷却备用。

A.2.2 50×TAE 电泳缓冲液的配制

取羟甲基氨基甲烷 (Tris) 242 g，冰乙酸 57.1 mL，0.5 mol/L pH8.0 的 EDTA 溶液 100 mL 混合，用无菌去离子水定容至 1000 mL，经 121°C 高压灭菌 15 min，冷却备用。用时要先用无菌去离子水稀释至 1×再进行使用。

A.3 溴化乙锭 (EB) 溶液 (10 mg/mL)

取溴化乙锭 0.2 g，溶解于 20 mL 无菌去离子水中。

A.4 1.5 %琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭) 的配制

取琼脂糖 1.5 g，加入到 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中，混合后加热至琼脂糖完全溶解，待溶液冷却至 50°C ~ 55°C 时，加入溴化乙锭溶液 5 μL，轻轻晃动混匀，避免产生气泡，先将梳子置入电泳槽中，然后将琼脂糖溶液倒入电泳板上，待凝固后取下梳子备用。

附录 B
(资料性)
阳性对照质粒制备

B.1 鼠六丝鞭毛虫 *SSU rRNA* 基因片段参考序列 (GenBank Accession No.EU043230.1)

AGGCAGCAGCGCGGAAATTGCCCAATGCGCTCTGGCGCGAGGCAGCGACGATCAATCCT
GAAAGACTTTGTCTTACGGGCTGAGCCGGGAGTAAAGCCCCCGCGGACGCGATTAGTGAAAA
GCATGGTGCCAGCACCCGCGTAATCCATCACTGAGAGCTTCCCTTACGTTGCTGCAGTTAAAA
CGCTCGTAGCCGCCGAGTCATGCGCCCTCCGAGGAAATGGGACGGTTCATGCGAATCGCACAG
GCCAGCGGAGTAGGGCAGGGCGACGCGCGGGTACATGGCGGCACGGGGCCGTTCCGATTGACTG
GGGATGGGTGAAATAAGATGATCCAGTCAGGACGCGCGACAGCGGAGGCAGACGGCAAGTGCCG
GCCAGTTGGTCAAGGGGCGAAAGCGCGAGGATGGACGACGATTAGAGACCGTTCTACTTCGCGCC
CTAAACGGTGCCGCCGCGAAGGGGGCGCGCTCCCCCCCCAGGGAACCGTCAGGCTACGGGC
TCTGGGGGAGTATGGTTGCAAGACTGAAACTTGAAGGTATTGACGGAATGGATACCACAAGACG
TGGAGTTTTCGGTTCAATCCGACTCAAAACACAGTAACCTTACCAGGCC

注：下划线部分为鼠六丝鞭毛虫特异性引物目标检测片段；黑体为鼠六丝鞭毛虫特异性引物序列。

B.2 鼠六丝鞭毛虫 16S-like ribosomal RNA 基因片段参考序列 (GenBank Accession No.AY886846.1)

ACGGAAGGGCACACCAGGGTGGAGCTTGTGGCTTAATTTGAATCAACACGGGGAAACTTA
CCAGGACCAGATGTTTTTATGACTGACAGGCTTTAGGTCTTTCAGGATATGATTTTTGGTGGTGCA
TGGCCGTTGGTGGTGCGTGGGTTGACCTGTCATGCGTTGATTGAGATAACGAGCGAGATTATCGCC
AATTAAATACCAGGTTCTGCTTTCAGATCTATGGTTCTAATTGGGACTCCCTGCGTTTCAAGCAGGA
GGAAGAGGGTAGCAATAACAGGTCCGTGATGTCCTTAGATGCTCTGGGCTGCACGCGCGCTAC
AATGTTAGGATCAATGGGATTCTG

注：下划线部分为鼠三毛滴虫特异性引物目标检测片段；黑体为鼠三毛滴虫特异性引物序列。

附录 C
(资料性)
PCR扩增引物序列

PCR扩增引物名称与序列见表 C.1。

表 C.1 PCR 扩增引物名称与序列

项目	引物	序列 (5'→3')	片段大小
黑六丝棘毛虫 <i>Spirotrichomonas muris</i>	S-F	GCGCGGAAATTGCCCAATG	586 bp
	S-R	ATTGAACCGCAAACCTCCACGTC	
黑三毛滴虫 <i>Tritrichomonas muris</i>	T-F	ATCAACACGGGGAACTTACCAGG	274 bp
	T-R	GTGCAGCCCAGAGCATCTAAAGG	