

团 体 标 准

T/CVMA 352—2026

毕氏肠微孢子虫 PCR 检测方法

PCR method for detection of *Enterocytozoon bieneusi*

2026-3-4 发布

2026-3-4 实施

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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。

本文件由河南农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：河南农业大学、塔里木大学、西北农林科技大学、信阳市畜牧兽医技术服务中心。

本文件主要起草人：李俊强、王荣军、张龙现、齐萌、赵光辉、胡建新、卢基忠、马超锋、赵金凤、菅复春、张素梅、朱星宇、魏一卓、李晓迎、毋亚运、余复昌、李森阳、杜海利、许会艳。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

毕氏肠微孢子虫 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了毕氏肠微孢子虫PCR检测方法的材料、操作步骤和结果判定。
本文件适用于动物粪便样品中毕氏肠微孢子虫核酸的检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27401 实验室质量控制规范 兽医学检测

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。

BSL：生物安全防护实验室（biosafety laboratory）

bp：碱基对（base pair）

ddH₂O：双蒸水（double-distilled H₂O）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

dNTP：脱氧核糖核苷三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphate）

ITS：内转录间隔区（internal transcribed spacer）

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液（tris acetate-EDTA buffer）

rTaq酶：rTaq DNA聚合酶（rTaq DNA polymerase）

5 主要仪器与设备

5.1 PCR 扩增仪。

5.2 漩涡振荡器。

- 5.3 台式离心机。
- 5.4 微量可调移液器及配套吸头（1 μL ~ 2.5 μL ，0.5 μL ~ 10 μL ，10 μL ~ 100 μL ，100 μL ~ 1000 μL ）。
- 5.5 核酸电泳仪。
- 5.6 核酸电泳槽。
- 5.7 凝胶成像分析系统。
- 5.8 高压蒸汽灭菌器。
- 5.9 生物安全柜或超净台。

6 试剂与耗材

- 6.1 一次性密封袋。
- 6.2 EP 离心管（1.5 mL）。
- 6.3 2.5%重铬酸钾溶液，按照附录 A 中 A.1 规定的方法配制。
- 6.4 粪便基因组 DNA 提取试剂盒（市售产品，可选择同类产品替代）。
- 6.5 PCR 管（200 μL ）。
- 6.6 PCR 扩增试剂盒（市售产品，可选择同类产品替代）。
- 6.7 1 \times TAE 缓冲液，按照附录 A.2 和附录 A.3 规定的方法配制。
- 6.8 安全无毒核酸染料。
- 6.9 配置试剂用水采用蒸馏水或去离子水，PCR 用水按照 GB/T 6682 中一级水的规定执行。
- 6.10 巢式 PCR 引物。参照毕氏肠微孢子虫 rRNA 基因 ITS 位点参考序列（见附录 B），设计巢式 PCR 扩增特异性引物序列，见附录 C 中表 C.1。
- 6.11 DNA 标准分子质量。
- 6.12 1%琼脂糖凝胶，按照附录 A.4 规定的方法配制。
- 6.13 阳性对照：已经鉴定的毕氏肠微孢子虫 DNA 样品。
- 6.14 阴性对照：灭菌双蒸水。

7 样品的采集、保存及运送

7.1 样品的采集

应按照 GB/T 27401 的相关要求进行采样。具有掌握相关专业知识和操作技能的工作人员操作，在采集畜禽动物新鲜粪便样本时，对于禽类，可采用棉拭子从其泄殖腔取样；对于哺乳动物，可从直肠进行取样约 10 g 的新鲜粪便于一次性封口袋中。整个采样期间，应佩戴一次性口罩与手套，样本彼此独立，避免交叉污染。每份样本应标记编号、动物种类、年龄、品种、采样时间、采集地点等信息。

7.2 样本的保存与运输

采集的新鲜粪便样品，在2℃~8℃的条件下保存应不超过24 h，长期保存需置于2.5%重铬酸钾溶液中。

长距离运输的样品应先置于密封不透水、防泄漏容器内，再将容器放入具有防压、不透水及防泄漏功能的辅助包装中，最后在周围放置医用冰袋或冷冻制剂，以确保样本维持低温状态。样本应尽快送达检测实验室，最迟不超过72 h。

7.3 样本处理的生物安全要求

应按照GB 19489的相关要求，在生物安全2级（BSL-2）实验室中进行检测工作，检测后的样品的处理应按照GB/T 27401中有关规定进行处理。

8 操作方法

8.1 DNA 制备

8.1.1 使用商品化粪便DNA提取试剂盒，从粪便样品中提取病原DNA，按照试剂盒说明书进行操作，确保提取DNA的质量与纯度。

8.1.2 提取的DNA样品，应立即进行PCR扩增。若当前无法进行试验，可存放至-20℃条件下保存。

8.2 PCR 检测

8.2.1 巢氏PCR反应体系与扩增程序

8.2.1.1 第一轮PCR反应体系与扩增程序

以提取的DNA为模板，将所有试剂、引物加入PCR反应管，反应体系的配置见附录D中表D.1。第一轮PCR扩增反应的反应程序见附录D.2。

8.2.1.2 第二轮PCR反应体系与扩增程序

以第一轮扩增产物为模板，将所有试剂、引物加入PCR反应管，反应体系的配置见附录D中表D.3。配置完反应液后应充分震荡混匀并离心之后，进行第二轮扩增。

第二轮PCR扩增反应的反应程序见附录D.4。

8.3 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳及成像

使用1×TAE缓冲溶液配制1.0%琼脂糖凝胶，取第二轮PCR扩增产物5 μL~10 μL，置于1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳，120 V电压电泳约30 min，经凝胶成像分析系统成像并观察结果。

9 结果判定

9.1 试验成立条件判定

毕氏肠微孢子虫阳性对照在392 bp处，出现相应的特异性条带，阴性对照无扩增条带（见附录E中图E.1），判定为试验成立。

9.2 结果描述及判定

9.2.1 阳性

试验成立条件下，被检样品在 392 bp 处出现特异性条带，判定为毕氏肠微孢子虫核酸阳性。如果需要进一步鉴定其序列或基因型，可对 PCR 扩增产物进行测序。

9.2.2 阴性

试验成立条件下，被检样品在 392 bp 处无特异性扩增条带，判定为毕氏肠微孢子虫核酸阴性。

附录 A
(规范性)
试剂配制方法

A.1 2.5 % 重铬酸钾溶液

称取2.5 g 重铬酸钾，加灭菌蒸馏水溶解，定容至100 mL，保存于室温。

A.2 50× TAE缓冲液

Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 g
冰醋酸	57.1 mL
Tris-Base	242.0 g

用800 mL灭菌去离子水溶解，充分混匀后用灭菌去离子水补齐至1000 mL，常温保存备用。

A.3 1× TAE使用液

50× TAE贮存液	10 mL
去离子水	490 mL

混匀，常温保存备用。

A.4 1.0 %的琼脂糖凝胶

称取1.0 g琼脂糖粉，放入干净的三角瓶中。加入100 mL的1×TAE缓冲液。摇匀后，将三角瓶放入微波炉中高火加热，使琼脂糖粉完全溶解。加热过程中需要间断取出摇匀，以防溶液暴沸。溶液冷却至60 °C左右（不烫手但仍温热）时，按体积比1:10,000加入安全无毒核酸染料之后，将其倒入已放置好梳子的制胶模具中。待凝胶完全凝固（约30 min ~ 60 min）后，将梳子轻轻拔出，即可放入电泳槽中使用。

附 录 B

(资料性)

毕氏肠微孢子虫 ITSrRNA 基因 ITS 位点片段基因序列

B.1 毕氏肠微孢子虫rRNA基因ITS位点片段参考序列 (GenBank Accession No. PP158573.1)

5'-TAGGGATGAAGAGCTTCGGCTCTGAATATCTATGGCTAGATAAAAGTACAAGTCGTAAC
AAGGTTTCAGTTGGAGAACCAGCTGAAGGATCATTTCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATG
TATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCCGAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGT
ATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATGTGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCCATG
TGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATGGGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAA
TCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGGCAGTAGGGTGCCATCAAGAGGTGTATTTGAAATATCCCTAA
TACAGGATCACTA-3'

注：粗体为引物序列。

附录 C

(资料性)

毕氏肠微孢子虫巢氏 PCR 扩增特异性引物序列

毕氏肠微孢子虫巢氏PCR的引物的名称与序列见表C.1。

表C.1 毕氏肠微孢子虫巢氏PCR引物序列

基因	引物	序列 (5' → 3')	预期片段大小/bp
rRNA基因	第一轮扩增上游引物 F1	GATGGTCATAGGGATGAAGAGCTT	410
	第一轮扩增下游引物 R1	TATGCTTAAGTCCAGGGAG	
	第二轮扩增上游引物 F2	AGGGATGAAGAGCTTCGGCTCTG	392
	第二轮扩增下游引物 R2	AGTGATCCTGTATTAGGGATATT	

注：上下游内引物和外引物工作浓度均为25 μM。

附 录 D
(资料性)
巢氏 PCR 反应

D.1 第一轮PCR反应体系

第一轮 PCR 扩增反应体系见表 D.1。

表D.1 第一轮PCR扩增反应体系 (25 μL)

组分	体积 (μL)
PCR Buffer (10 \times)	2.5 μL
dNTPs (2 mM each)	2.5 μL
Mg ²⁺ (25 mM)	1.5 μL
上游引物 F1 (25 μM)	0.5 μL
下游引物 R1 (25 μM)	0.5 μL
rTaq 酶 (5 U/ μL)	0.5 μL
灭菌 ddH ₂ O	16.0 μL
模板 (提取的 DNA)	1.0 μL
无核酸酶水补齐至总体积	25.0

D.2 第一轮PCR反应程序

第一轮 PCR 扩增反应程序见表 D.2。

表D.2 第一轮PCR扩增反应程序

温度	反应时间	循环数
94 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	35
57 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	40 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1

D.3 第二轮PCR反应体系

第二轮 PCR 扩增反应体系见表 D.3。

表D.3 第二轮PCR扩增反应体系 (25 μL)

组分	体积 (μL)
PCR Buffer (10 \times)	2.5 μL
dNTPs (2 mM each)	2.5 μL
Mg ²⁺ (25 mM)	1.5 μL
上游引物 F2 (25 μM)	0.5 μL
下游引物 R2 (25 μM)	0.5 μL

rTaq 酶 (5 U/μL)	0.5 μL
灭菌 ddH ₂ O	16.0 μL
模板 (提取的 DNA)	1.0 μL
无核酸酶水补齐至总体积	25.0

D.4 第二轮PCR反应程序

第二轮 PCR 扩增反应程序见表 D.4。

表D.4 第二轮PCR扩增反应程序

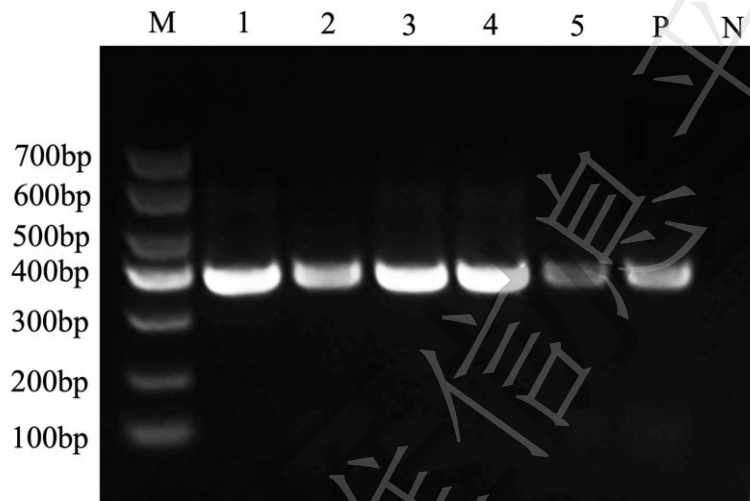
温度	反应时间	循环数
94 °C	5 min	1
94 °C	30 s	35
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	1

附录 E

(资料性)

毕氏肠微孢子虫 PCR 扩增产物电泳结果示意图

毕氏肠微孢子虫 rRNA 基因 ITS 位点 PCR 扩增产物电泳结果示意图见图 E.1。



标引序号说明：

M —— DNA Marker；

1-5 —— 被检样品；

P —— 阳性对照；

N —— 阴性对照。

图E.1 毕氏肠微孢子虫PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳示意图