



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.8—2005

猪链球菌 2 型毒力因子荧光 PCR 检测方法

Protocol of real-time PCR assay for virulence factors of
Streptococcus suis type 2

2005-09-27 发布

2005-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家标准化委员会提出。

本标准由全国动物防疫标准化委员会归口。

本标准由中国检验检疫科学研究院和江苏出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人：林祥梅、吴绍强、韩雪清、贾广乐、刘建、梅琳、陈国强、张敬友、姜焱、唐泰山。

本标准首次发布。

猪链球菌 2 型毒力因子荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型毒力因子 MRP 和 EF 检测的荧光 PCR 操作方法。

本标准适用于检测生猪拭子、增菌培养物、疑似病料及猪组织样品中猪链球菌 2 型菌株的致病力。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

毒力因子 virulence factor

猪链球菌 2 型菌株的致病力与其毒力因子直接相关。猪链球菌 2 型的毒力因子有溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、溶血素、荚膜多糖以及 44 kDa 蛋白、IgG 结合蛋白、纤毛粘着素等。其中,溶菌酶释放蛋白(MRP)和胞外因子(EF)是最主要的两个毒力因子,可作为判定菌株毒力的指标。一般认为表型 MRP + EF + 为强致病株,MRP + EF - 为弱致病株,MRP - EF - 为非致病株,未发现 MRP - EF + 表型。

3 缩略语

本标准采用下列缩略语:

荧光 PCR	荧光聚合酶链反应
MRP	溶菌酶释放蛋白
EF	胞外因子
C_t 值	荧光信号到达设定的阈值所经历的循环数
FAM	6-羧基荧光素
TAMRA	四甲基罗丹明

4 实验材料与仪器

4.1 实验试剂

实验试剂包括:

- 猪链球菌 2 型毒力因子荧光 PCR 检测引物、探针、阳性对照及常规 PCR 反应试剂;
- 商品化的组织基因组 DNA 提取试剂盒,具体提取操作参照说明书进行。

4.2 仪器

所用仪器包括:

- 荧光 PCR 仪;
- 高速冷冻离心机;
- 台式离心机;
- 旋涡混合器;
- 冰箱(2℃~8℃和-20℃两种);
- 微量可调移液器(0.1 μL~2 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL 等规格)和相应配套的吸头。

5 操作方法

5.1 方法概要

荧光 PCR 方法是一种快速、灵敏、特异的检测病原体的方法。本研究选择猪链球菌 2 型的 MRP 和 EF 两个毒力因子基因设计引物进行 PCR, 同时在扩增序列中间设计了荧光探针, 进行多重荧光 PCR 检测。反应结束即可根据扩增曲线判定有无目的基因, 从而确定待检菌是否含有猪链球菌 2 型 MRP 和 EF 毒力因子基因, 并据此判定其致病力。

5.2 操作步骤

5.2.1 实时荧光 PCR 扩增体系

取 1 μL 培养菌液或从组织中提取的基因组 DNA 作为模板, 加入按照表 1 配制的 PCR 反应液中。

表 1 荧光 PCR 反应液配制

试 剂	体积/ μL
10 \times PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})	2.5
25 mmol/L MgCl_2	3.0
2.5 mmol/L dNTP	2
MRP 引物及探针	1.5
EF 引物及探针	1.5
5 U/ μL Taq DNA 聚合酶	0.5
灭菌双蒸水	至总体积 25 μL

进行待检样品扩增反应的同时, 应设立标准阴、阳性菌株或 DNA 对照。操作时注意的问题见附录 A。

5.2.2 PCR 扩增条件

将样品管放入荧光 PCR 仪后, 设置如下条件进行反应:

——94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;

——然后采用二步法进行反应: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环, 每个循环结束后采集数据。

6 结果判定

6.1 判定方法

反应结束后, 阈值的设定可根据仪器噪声人工调整, 以阈值线刚好超过阴性样品扩增曲线的最高点为准。仪器将自动给出每个样品的 C_t 值。记录 C_t 值, 分析检测结果。

6.2 阳性判定

如果 MRP 的 PCR 扩增曲线 $C_t \leq 30$, 则表明为阳性, 即待检菌株为猪链球菌 2 型致病株; 对于 MRP 阳性菌株, 以有无 EF 基因作为标准来判定其致病力。MRP+EF+ 为强致病株, MRP+EF- 为弱致病株(目前未有 MRP-EF+ 毒型的报道), MRP-EF- 为非致病株。

6.3 阴性判定

如果反应曲线 $C_t \geq 40$, 则为阴性。

6.4 可疑判定

如果 $30 < C_t < 40$, 判为可疑, 可以加大模板量再重复扩增, 如果重复试验的 $C_t < 40$, 则判为阳性, 否则为阴性。

6.5 无效扩增

如果阳性对照没有扩增曲线, 或者阴性对照有 $C_t < 30$ 的扩增曲线, 判定本次试验无效, 需要分析试验失败原因, 并重新试验。

附 录 A
(规范性附录)

检测过程中生物安全和防止交叉污染的措施

- A.1 样品处理过程中必须戴一次性手套,并经常更换。PCR 反应液配制过程中应在超净工作台等洁净环境中进行。
- A.2 抽样和制样工具必须清洁干净,且用于试验的器皿和离心管、PCR 管等必须经过 121℃、15 min 高压灭菌后才可使用。
- A.3 引物、探针等溶液应按照实际工作浓度一次性溶解好,并分装后使用,防止试验过程中污染。
- A.4 试验前后,要把超净工作台的紫外灯打开,以破坏可能残留的 DNA。
- A.5 上机运行前应检查各 PCR 管盖是否盖紧,以防荧光物质泄露而污染机器。
-