



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.5—2005

猪链球菌 2 型多重 PCR 检测方法

Protocol of multiplex PCR identification 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管理委员会提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准由中国检验检疫科学研究院负责起草。

本标准主要起草人：韩雪清、林祥梅、吴绍强、刘建、贾广乐、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 型多重 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型多重 PCR 检测的操作方法。

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(猪淋巴结、扁桃腺、肉品等)中的猪源链球菌及猪链球菌 2 型。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

猪链球菌 2 型 *Streptococcus suis* type 2

猪链球菌是属于链球菌属的一种细菌,根据其荚膜多糖抗原的差异,可分为 1~34 及 1/2 共 35 个血清型。猪链球菌 2 型是猪链球菌的一个血清型,不仅对猪致病性很强,而且可以感染特定的人群,是一种重要的人畜共患病原菌。

3.2

多重聚合酶链式反应(多重 PCR) multiplex polymerase chain reaction

多重 PCR 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,它是在同一 PCR 反应体系中加上两对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。

4 缩略语

本标准采用下列缩略语:

PCR	聚合酶链式反应
DNA	脱氧核糖核酸
dNTP	脱氧核糖三磷酸
bp	碱基对

5 试剂和材料

除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682—1992 的灭菌双蒸水或超纯水。

5.1 猪链球菌 2 型多重 PCR 反应混合物

PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}), 2 μ L; dNTP, 1.6 μ L; 引物 1, 0.6 μ L; 引物 2, 0.6 μ L; 引物 3, 0.6 μ L; 引物 4, 0.6 μ L; 菌液 1.5 μ L; 酶 0.2 μ L; 水 12.3 μ L; 总体积 20 μ L。

5.2 Taq DNA 聚合酶

5.3 $10\times$ PCR 缓冲液

100 mmol/L KCl, 160 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 20 mmol/L $MgSO_4$, 200 mmol/L Tris-HCl

(pH8.8), 1% Triton X-100, 1mg/mL BSA。

5.4 dNTP 混合液(各 2.5mmol/L)

5.5 琼脂糖;电泳级

5.6 溴化乙锭

5.7 DNA 分子量标准

5.8 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA。

5.9 核酸电泳缓冲液

Tris 碱 242 g, 冰乙酸 57.1 mL, 0.5 mol/L EDTA 100 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, 使用时 10 倍稀释。

5.10 电泳加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖。

5.11 样品对照

猪链球菌 2 型菌 DNA 提取物分别作为阳性对照, 马链球菌兽疫亚种 DNA 提取物为阴性对照。

6 仪器和设备

6.1 台式冷冻高速离心机(>13 000 r/min)。

6.2 DNA 热循环仪。

6.3 核酸电泳仪和水平电泳槽。

6.4 凝胶成像系统(或紫外透射仪)。

6.5 可调移液器一套: 10 μ L、20 μ L、200 μ L 和 1 000 μ L。

6.6 恒温水浴箱。

7 操作方法

7.1 方法概要

取培养菌液或从组织中提取的基因组 DNA 作为模板, 加入到扩增猪链球菌和猪链球菌 2 型的 PCR 反应混合液中, 进行 PCR 扩增; 或直接将待检细菌培养进行 PCR 扩增。最后通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 与 DNA 标准分子量进行比较, 来确定扩增产物的大小, 在此基础上判定样品的检测结果。

7.2 样品采集

在实验室生物安全柜中操作, 将采集的组织样本剔除包膜和其他结缔组织, 选取内部实质部分, 冻存于 -20℃ 备用。

7.3 组织样本 DNA 的制备

采用商品化的组织基因组 DNA 提取试剂盒, 按说明书进行操作。

7.4 多重 PCR 扩增

将培养的细菌纯培养物样品(不经过离心) 1.2 μ L、或者将制备的各样品 DNA 以及阳性和阴性对照 DNA 各 1.5 μ L 分别加入到含有猪链球菌 2 型菌的 PCR 反应混合液的相应 PCR 反应管中[缓冲液(含 Mg^{2+}), 2 μ L; dNTP, 1.6 μ L; 引物 1, 0.6 μ L; 引物 2, 0.6 μ L; 引物 3, 0.6 μ L; 引物 4, 0.6 μ L; 酶 0.2 μ L; 加水至总体积 20 μ L], 2 000 r/min 离心 10 s, 加入 Taq 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 2 000 r/min 离心 10 s, 采用 DNA 热循环仪立即进行 PCR 扩增。

PCR 扩增条件: 94℃ 7 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 10 min。扩增反应结

束后,取出放置于4℃。

7.5 多重PCR扩增产物的电泳检测

称取2.0 g 琼脂糖加入100 mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化后加入适量的溴化乙锭(0.5 µg/mL),然后制成凝胶板。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取5 µL~10 µL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合后,分别加样到凝胶孔。9 V/cm 恒压下电泳30 min~35 min。将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察结果,进行判定并做好试验记录。

8 结果判定

8.1 试验结果成立条件

猪链球菌2型阳性对照的PCR产物,经电泳后在305 bp和460 bp位置同时出现特异性条带,同时阴性对照PCR产物电泳后没有任何条带,则检测试验结果成立,否则结果不成立。

8.2 阳性判定

在试验结果成立的前提下,如果样品中PCR产物电泳后在305 bp和460 bp的位置上同时出现特异性条带,判定为猪链球菌2型检测阳性;若305 bp位置出现特异条带而460 bp位置无特异条带,判定为猪源链球菌阳性,但不是2型菌。

8.3 阴性判定

如果在305 bp和460 bp的位置上均未出现特异性条带,判定为猪链球菌检测阴性。

附 录 A
(规范性附录)

检测过程中防止交叉污染的措施

A.1 样品处理和 DNA 制备

样品处理过程中,应防止不同样本之间的交叉污染,特别避免通过器具、手套、移液器等的污染。

A.2 PCR 检测过程

A.2.1 实验前后,要把超净工作台的紫外灯打开,以破坏可能残留的 DNA。

A.2.2 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.2.3 PCR 反应液配制、模板 DNA 提取、PCR 扩增、电泳和结果观察等应分区或分室进行,实验室运作应从洁净区到污染区单方向进行。

A.2.4 实验过程中,必须穿实验服,戴一次性手套,而且要及时更换。

A.2.5 所有的试剂、器材、仪器都应专用,不得交叉使用。
