

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1447.2—2005

SN/T 1447.2—2005

### 猪胸膜肺炎放线杆菌聚合酶链式反应 操作规程

Protocol of polymerase chain reaction(PCR) for *Actinobacillus pleuropneumoniae*

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
猪胸膜肺炎放线杆菌聚合酶链式反应  
操作规程

SN/T 1447.2—2005

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字

2005年5月第一版 2005年5月第一次印刷

\*

书号: 155066·2-16200 定价 8.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



SN/T 1447.2-2005

2005-02-17 发布

2005-07-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

**附 录 C**  
(资料性附录)  
**DNA 的提取**

**C.1 DNA 提取液的配制****C.1.1 pH7.6 TE(Tris-EDTA)缓冲液的配制****C.1.1.1 1 mol/L Tris·Cl(pH7.6)**

Tris 碱	121.1 g
蒸馏水	800 mL

加浓盐酸 60 mL,溶液冷至室温后调 pH7.6,加蒸馏水定容至 1 000 mL。

**C.1.1.2 0.5 mol/L pH8.0 乙二胺四乙酸二钠(EDTA 二钠)**

EDTA 二钠	186.1 g
蒸馏水	800 mL

磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调节 pH 至 8.0(约 20 g 氢氧化钠颗粒),加蒸馏水定容至 1 000 mL。

0.103 MPa 灭菌 15 min 备用。

**C.1.1.3 pH7.6 10×TE 缓冲液的配制**

1 mol/L Tris·Cl(pH7.6)	10 mL
0.5 mol/L EDTA 二钠(pH8.0)	2 mL
加蒸馏水至	100 mL,

0.103 MPa 灭菌 15 min 备用。

**C.1.1.4 pH7.6 1×TE 缓冲液的配制**

10×TE 缓冲液(pH7.6)	10 mL
加蒸馏水	90 mL,

0.103 MPa 灭菌 15 min,4℃ 保存备用。

**C.1.2 10%十二烷基硫酸钠(SDS)的配制**

SDS	10 g
加蒸馏水	90 mL,

68℃ 加热助溶,用浓盐酸调 pH 至 7.2,蒸馏水定容至 100 mL。

**C.1.3 10 mg/mL 蛋白酶 K 的配制**

蛋白酶 K	100 mg
加蒸馏水	10 mL

溶解分装后,-20℃ 保存备用。

**C.1.4 5 mol/L 氯化钠(NaCl)的配制**

氯化钠(NaCl)	29.2 g
加蒸馏水	80 mL

加热,搅拌溶解后定容至 100 mL,0.103 MPa 灭菌 15 min 备用。

**C.1.5 CTAB/氯化钠的配制**

氯化钠	4.1 g
CTAB	10 g

用蒸馏水 80 mL 溶解氯化钠,缓慢加入 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),同时加热并搅拌,溶解后

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李树清、胡永强、李健、王巧全、陈志飞。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

附录 A  
(规范性附录)  
试剂配制

A.1 pH 7.2 0.01 mol/L PBS 的配制

0.2 mol/L 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )的配制:

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71.64 g  
加蒸馏水至 1 000 mL

0.2 mol/L 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )的配制:

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 31.21 g  
加蒸馏水至 1 000 mL

生理盐水的配制:

氯化钠( $\text{NaCl}$ ) 8.5 g  
加蒸馏水至 1 000 mL

pH 7.2 0.01 mol/L PBS 的配制:

0.2 mol/L 磷酸氢二钠 72 mL

0.2 mol/L 磷酸二氢钠 28 mL

生理盐水 1 900 mL

0.103 MPa 灭菌 15 min, 置 4℃ 保存备用。

A.2 Tris-乙酸电泳缓冲液(TAE)的配制

A.2.1 50×TAE 的配制

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris 碱) 242 g

冰乙酸 57.1 mL

0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 100 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL, 混匀 4℃ 保存备用。临用前作 50 倍稀释。

A.2.2 1×TAE 使用液的配制

50×TAE 20 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL, 混匀备用。

A.3 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)的配制

EB 1 g

加蒸馏水定容至 100 mL, 磁力搅拌至完全溶解, 室温避光保存。

A.4 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖 1.5 g

加 1×TAE 定容至 100 mL, 完全融化后, 溶液冷却至 60℃, 加 10 mg/mL EB5 μL(终浓度 0.5 μg/mL), 轻轻混匀后, 倒板。

A.5 6×加样缓冲液的配制

溴酚蓝 0.25 g

猪胸膜肺炎放线杆菌聚合酶链式反应  
操作规程

1 范围

本标准规定了猪胸膜肺炎放线杆菌聚合酶链式反应方法。

本标准适用于猪胸膜肺炎放线杆菌的鉴定和检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

APP *Actinobacillus pleuropneumoniae* 胸膜肺炎放线杆菌

PCR polymerase chain reaction 聚合酶链式反应

3 原理

APP 有 2 个生物型 15 个血清型, 所有血清型都在体内表达 ApxIVA 毒素。针对 *apxIVA* 毒素基因的保守序列, 设计特异的 PCR 引物可以扩增所有血清型的 APP。根据 APP 的 *apxIVA* 毒素基因设计的特异引物 P1/P4 和放线杆菌 16SrRNA 的序列设计的通用引物 S7/S10, 组成的复合 PCR 可扩增出 363bp 和 692bp 的片段, 用于猪胸膜肺炎放线杆菌的检测。为提高检测的敏感性, 又在 P1/P4 的两侧内部设计了特异引物 P6/P8, 组成套式 PCR, 可扩增出 223bp 的片段。

4 设备和材料

4.1 仪器设备

4.1.1 PCR 扩增仪。

4.1.2 电泳仪。

4.1.3 凝胶成像系统。

4.1.4 微波炉。

4.1.5 可调移液器。

4.1.6 离心机。

4.1.7 匀浆器。

4.1.8 天平。

4.2 耗材

4.2.1 PCR 反应管。

4.2.2 1.5 mL 离心管。

4.2.3 移液器滴头。

4.3 试剂

4.3.1 三蒸水 0.103 MPa 灭菌 15 min。

4.3.2 吐温-20(Tween-20)0.103 MPa 灭菌 15 min。

4.3.3 琼脂糖。

4.3.4 溴化乙锭。

4.3.5 *Taq* 酶。