

ICS 07.100.30
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.4—2005

GB/T 19915.4—2005

猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法

Method of detecting *Streptococcus suis* type 2 by triple-PCR

中华人民共和国
国家标准
猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法
GB/T 19915.4—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.bzchs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 5 千字

2005 年 12 月第一版 2005 年 12 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-26803 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



GB/T 19915.4—2005

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

4.2.11 猪链球菌 2 型三重 PCR 反应混合物。

4.3 仪器和设备

4.3.1 离心机。

4.3.2 DNA 热循环仪。

4.3.3 核酸电泳仪。

4.3.4 pH 计。

4.3.5 移液器:10 μ L、20 μ L、100 μ L、1 000 μ L。

4.3.6 紫外线透射仪或凝胶成像系统。

4.3.7 恒温水浴锅。

4.4 PCR 操作步骤

4.4.1 阳性对照和阴性对照 DNA 模板的提取

分别将猪链球菌 2 型 HA9801、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 株和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株接种于 5% 犊牛血清 Todd-Hweitt 肉汤培养基,37℃ 振荡培养 18 h,用革兰氏阳性细菌柱离心式基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取 DNA 模板,-20℃ 保存备用。

4.4.2 PCR 扩增

用铂金耳钩取血平板上的可疑单菌落至含有猪链球菌 2 型三重 PCR 反应混合物的 PCR 管中,混匀,加入 *Taq* 酶(2 U/ μ L) 0.7 μ L,2000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增;同时设去离子水的空白对照、猪链球菌 2 型 HA9801 株基因组 DNA 模板的阳性对照、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株基因组 DNA 模板的阴性对照。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,30 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。

4.4.3 琼脂糖凝胶电泳

在电泳缓冲液中加入 1% 琼脂糖,加热融化后加入溴化乙锭制备凝胶,凝固后进行电泳。8 μ L 酶切产物加入 2 μ L 5 \times 上样缓冲液,混匀后加入上样孔,80 V 恒压电泳 20 min,紫外线透射检测。

5 结果及判断

5.1 试验结果成立条件

阳性对照 HA9801 株经 PCR 扩增出现约 858 bp、387 bp 和 316 bp 三条条带,去离子水的空白对照、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株基因组 DNA 模板的阴性对照 PCR 产物电泳后没有条带,试验结果成立,否则,结果不成立。

5.2 结果判断

琼脂糖凝胶电泳后,在紫外线投射下检测,在空白和阴、阳性对照成立的情况下,待检样品只出现 387 bp 一条条带,可判定为猪链球菌 2 型;待检样品出现约 387 bp、316 bp 和 858 bp 三条条带,或出现 387 bp 和 858 bp 两条条带,可判定为猪链球菌 2 型致病菌株;待检样品只出现 858 bp 一条条带,可判定为非猪链球菌 2 型的致病菌;待检样品不出现条带,结果为阴性。

6 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物,应收集后高压灭菌处理。

前 言

猪链球菌 2 型是链球菌属的成员,其致病菌株可致猪链球菌病,引起猪败血症、脑膜炎等。人可通过伤口感染该菌,并导致死亡。为了区别正常猪所携带的猪链球菌 2 型无毒菌株与发病猪分离的致病菌株,特制定本标准。本标准是采用现代分子生物学诊断技术制定的。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:南京农业大学。

本标准主要起草人:陆承平、姚火春、范红结、何孔旺。