

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

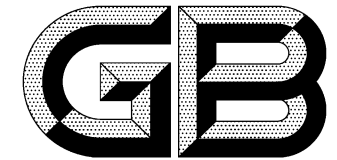
A.2.1 实验前后,要把超净工作台的紫外灯打开,以破坏可能残留的 DNA。

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。



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



GB/T 19915.5—2005

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-26804

定价: 8.00 元

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

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。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪链球菌2型多重PCR检测方法
GB/T 19915.5—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.bzcs.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 7 千字

2005年12月第一版 2005年12月第一次印刷

*

书号:155066·1-26804 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

(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

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。