

ICS 07.100.30
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.8—2005

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

中华人民共和国
国家标准
猪链球菌 2 型毒力因子荧光 PCR
检测方法
GB/T 19915.8—2005

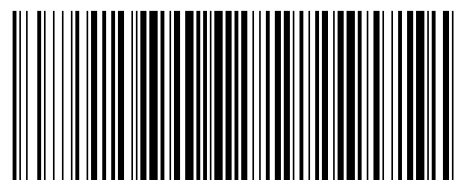
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 6 千字
2005 年 12 月第一版 2005 年 12 月第一次印刷

*
书号: 155066·1-26772 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 19915.8—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

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。

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管理委员会归口。

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。