

附录 A
(规范性附录)

猪链球菌 2 型快速检测程序

猪链球菌 2 型快速检测程序见图 A.1。

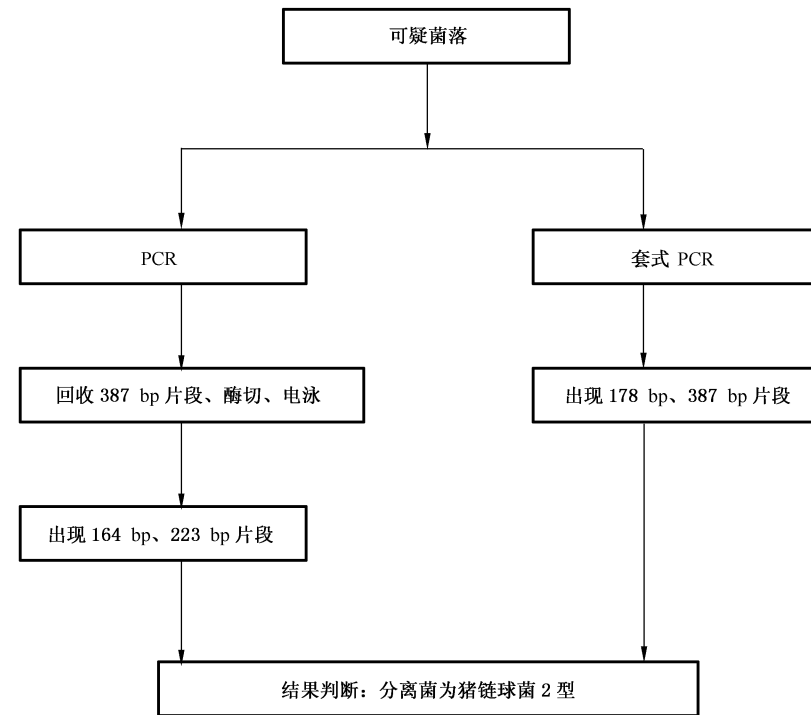
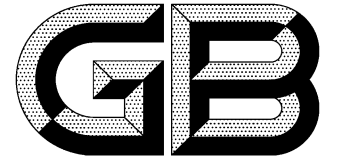


图 A.1 猪链球菌 2 型快速检测程序



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.3—2005

猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术

Method for detection *Streptococcus suis* type 2 by PCR



GB/T 19915.3—2005

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-26802

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

PCR 出现 178 bp 及 387 bp 两条条带,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

在试验结果成立的前提下,如果样品中荚膜基因 PCR 产物酶切后出现 164 bp 和 223 bp 两条条带,或套式 PCR 出现 178 bp 及 387 bp 两条条带,表明猪链球菌 2 型荚膜基因阳性,再结合液体培养出现短链的特性,可确诊为猪链球菌 2 型。

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。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术
GB/T 19915.3—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 8 千字

2005 年 12 月第一版 2005 年 12 月第一次印刷

*

书号:155066·1-26802 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

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 μL 、20 μL 、100 μL 、1 000 μL 。
- 4.3.6 紫外线透射仪或凝胶成像系统。

4.4 荚膜基因 PCR 操作步骤

4.4.1 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 型定型 PCR 反应混合物的 PCR 管中,混匀,加入 *Taq* 酶(5 U/ μL) 0.5 μL ,2000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增,同时设阳性对照和阴性对照。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.4.2 PCR 产物回收

按 Sangong PCR 产物回收试剂盒说明书进行。

- 4.4.2.1 在 25 μL PCR 产物中加入 100 μL 结合缓冲液 II (binding buffer II),混匀。
- 4.4.2.2 将混合物转移到 2 mL 收集管内的 UNIQ-10 柱中,室温放置 2 min,12 000 g 室温离心 1 min。
- 4.4.2.3 倒掉收集管中废液,将 UNIQ-10 柱放置同一个收集管中,加入 250 μL 洗液(wash solution),12 000 g 室温离心 1 min。
- 4.4.2.4 倒掉收集管中废液,重复步骤 4.4.2.3 一次。
- 4.4.2.5 取下 UNIQ-10 柱,倒掉收集管中的废液,将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中,12 000 g 室温离心 1 min。
- 4.4.2.6 将 UNIQ-10 柱放入一根新的 1.5 mL 微量离心管中,在柱子膜中央加 12 μL 洗脱缓冲液(elution buffer),37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 min。
- 4.4.2.7 12 000 g 室温离心 1 min,收集回收液。

4.4.3 酶切

0.5 mL Ependoff 管中依次加入:

| | |
|--------------------|-------------------|
| DNA(PCR 回收产物) | 8.0 μL |
| <i>Hind</i> II | 1.0 μL |
| 10 \times buffer | 1.0 μL |

混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h。

4.4.4 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 μL 酶切产物加入 2 μL 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。

4.4.5 检测猪链球菌 2 型荚膜基因的套式 PCR

用铂金耳钩取血平板上的可疑单菌落至含有猪链球菌 2 型定型套式 PCR 反应混合物的 PCR 管中,混匀,加入 *Taq* 酶(5 U/ μL) 1.0 μL ,2000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5 结果及判断

5.1 试验结果成立条件

阳性对照经荚膜基因 PCR 扩增产物酶切后出现 164 bp 和 223 bp 两条条带后,阳性对照经套式

前 言

猪链球菌病是链球菌属中猪源链球菌引致的猪链球菌病的总称,其病原主要有猪链球菌 2 型和马链球菌兽疫亚种。猪链球菌 2 型可引起猪败血症、脑膜炎等。人可通过伤口感染该菌,并导致死亡。为控制和预防该菌引致的猪链球菌病,建立快速、特异、敏感的检测方法是当务之急。本标准是采用公认的细菌学诊断的现代分子生物学技术制定的。

本标准的附录 A 是规范性附录。

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、范红结、姚火春、何孔旺。