

附录 A
(规范性附录)

检测过程中防止交叉污染的措施

A.1 抽样和制样过程

抽样和制样工具,应清洗干净,121℃、15 min~20 min 灭菌,一套清洁工具限于一个样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、灭菌,或为一次性灭菌容器。

A.2 检测过程

A.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区、后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“净区”到“脏区”单方向进行。

A.2.2 实验过程中,应穿实验服和戴手套,手套要经常更换。各区要有专用实验服,经常清洗。

A.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用,不得带出该区。

A.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要 121℃、15 min~20 min 灭菌,避免核酸和(或)核酸酶污染。每种溶液应使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。在 20℃~25℃ 贮存的试剂中,可加 0.025% 的叠氮钠。所有试剂应该以大体积配制,然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

A.2.5 装有 DNA 模板或引物的离心管打开之前,要简短离心,离心管不能用力崩开,以免产生气溶胶。

A.2.6 前 PCR 区中,最好能在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

A.2.7 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA。

A.2.8 可使用 UDG 和 dUTP 系统控制污染。



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.9—2005

猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 检测方法

Detection method of the hemolysin gene for
Streptococcus suis type 2 by PCR



GB/T 19915.9—2005

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-26848

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

放入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭染色缓冲液中染色 15 min~20 min,在紫外线透射仪或凝胶成像系统上观察结果,并做好试验记录和样品位置。

6 结果及判断

6.1 试验结果成立条件

阳性对照的 PCR 产物电泳后在 495 bp 的位置上出现一条特异性条带,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。

6.2 结果判断

6.2.1 在试验结果成立的前提下,如果样品中 PCR 产物电泳后在 495 bp 的位置上出现一条特异性条带,判为该菌株含有猪链球菌 2 型溶血素基因。

6.2.2 在试验结果成立的前提下,如果样品中 PCR 产物电泳后在 495 bp 的位置上未出现一条特异性条带,判为该菌株不含有猪链球菌 2 型溶血素基因。

7 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。

检测过程中防止交叉污染的措施见附录 A。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR
检 测 方 法

GB/T 19915.9—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 9 千字

2005 年 12 月第一版 2005 年 12 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-26848 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

- 5.2.3 琼脂糖:电泳级。
- 5.2.4 溴化乙锭。
- 5.2.5 酚:Tris 饱和。
- 5.2.6 三氯甲烷。
- 5.2.7 异戊醇。
- 5.2.8 异丙醇。
- 5.2.9 70%乙醇。
- 5.2.10 分子量标记:DL-2000。
- 5.2.11 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取液:0.1 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),10 mmol/L EDTA (pH 7.5),2% CTAB,0.7 mmol/L NaCl,1% β -巯基乙醇。
- 5.2.12 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。
- 5.2.13 10 × PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,20 mmol/L MgSO_4 ,200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),1% TritonX-100,1 mg/mL BSA。
- 5.2.14 电泳缓冲液:242g Tris,57.1 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0),加蒸馏水至 1 000 mL;使用时 10 倍稀释。
- 5.2.15 加样缓冲液:0.25%溴酚蓝,40%蔗糖。

5.3 仪器和设备

- 5.3.1 离心机。
- 5.3.2 DNA 热循环仪。
- 5.3.3 核酸电泳仪。
- 5.3.4 pH 计。
- 5.3.5 移液器:10 μL 、20 μL 、100 μL 、1 000 μL 。
- 5.3.6 紫外线透射仪或凝胶成像系统。
- 5.3.7 恒温水浴锅。

5.4 操作步骤

5.4.1 样品处理和基因组 DNA 的提取

取可疑细菌的培养物 1.0 mL,10 000 r/min 离心 1 min,沉淀用 560 μL TE 缓冲液悬浮,或挑取可疑细菌菌落,用 560 μL TE 缓冲液悬浮,加入 30 μL 10%十二烷基硫酸钠(SDS)和 3 μL 20 g/L 蛋白酶 K,37℃水浴 60 min 后,再加入 100 μL 5 mol/L NaCl 和 80 μL CTAB/NaCl,65℃水浴 10 min,加入体积比为 25 : 24 : 1 的酚+三氯甲烷+异戊醇混合液 770 μL ,混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取 400 μL 上清液;加入体积比 24 : 1 的三氯甲烷+异戊醇混合液 400 μL ,混匀,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取 200 μL 上清液加入等体积的异丙醇沉淀;4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50 μL 双蒸水溶解沉淀。

也可用等效的 DNA 提取试剂盒提取 DNA 模板。

5.4.2 PCR 扩增

取比待检菌株数多两只的猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 反应混合物的 PCR 管,2 000 r/min 离心 10 s 后各加入 *Taq* 酶(2.5U/ μL) 0.3 μL ,分别加入待检菌株 DNA 提取物和阴性、阳性核酸对照 5.0 μL 到 PCR 管中,2 000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增。扩增条件为:95℃预变性 5 min;94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。

5.4.3 PCR 扩增产物电泳检测

取 1.5 g 琼脂糖,于 100 mL 电泳缓冲液中加热,充分溶化,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取 20 μL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合后加样,进行电泳。电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3 V/cm~5 V/cm,电泳时间为 30 min~35 min。将电泳好的凝胶

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。近年来,随着我国养猪业的发展,该病流行日趋严重,给养猪业带来巨大损失。人可通过伤口感染该菌,并导致死亡。溶血素是猪链球菌 2 型一种重要毒力因子。通过检测猪及其产品中分离菌株是否含有猪链球菌 2 型溶血素基因,可以作为区分猪链球菌 2 型无毒菌株与致病菌株的一个指标,特制定本标准。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家标准化管理委员会提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位:中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:陈国强、唐泰山、张敬友、姜焱、王凯民、张常印、林祥梅、吴绍强、刘建、韩雪清、贾广乐、梅琳。