



中华人民共和国国家标准

GB/T 34750—2017

副猪嗜血杆菌检测方法

Detection methods for haemophilus parasuis

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：河南省动物疫病预防控制中心、河南省农业科学院畜牧兽医研究所、河北农业大学动物科技学院、山东省农业科学院畜牧兽医研究所。

本标准起草人：吴志明、闫若潜、张健、赵明军、赵雪丽、宋勤叶、徐引弟、王东方、王淑娟、安春霞、刘梅芬、张盼盼、谢彩华、高凤山、方先珍、吴家强、拜廷阳、王一、刘淑敏。



副猪嗜血杆菌检测方法

1 范围

本标准规定了副猪嗜血杆菌的分离与鉴定、巢式 PCR 检测和实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于对猪的肺脏、心脏、脑等组织，胸腔、腹腔、心包积液或关节液，抗凝血，细菌培养物等样品中副猪嗜血杆菌的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对 (Base Pair)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs: 脱氧核糖核苷三磷酸 (Deoxyribonucleoside Triphosphates)

MGB: 小沟结合 (Minor Groove Binder)

NAD: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

Taq 酶: *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA Polymerase)

TE: Tris-EDTA 缓冲液 (Tris-EDTA Buffer)

TSA: 胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptic Soy Agar)

TSB: 胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth)

3 仪器

- 3.1 生物安全柜。
- 3.2 恒温培养箱。
- 3.3 光学显微镜。
- 3.4 全自动微生物鉴定仪。
- 3.5 PCR 扩增仪。
- 3.6 高速冷冻离心机 (12 000×*g* 以上)。
- 3.7 核酸电泳仪和水平电泳槽。
- 3.8 恒温水浴锅。
- 3.9 单道微量移液器 (0.5 μL~10 μL; 2 μL~20 μL; 20 μL~200 μL; 100 μL~1 000 μL)。
- 3.10 组织匀浆器或研钵。
- 3.11 凝胶成像系统 (或紫外投射仪)。
- 3.12 实时荧光定量 PCR 仪。

4 耗材

- 4.1 1.5 mL 无菌离心管。

4.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

5 试剂

5.1 TSA 培养基和 TSB 培养基(见附录 A)。

5.2 NAD 贮存液(见附录 A), 2℃~8℃条件下保存。

5.3 革兰氏染色试剂:含草酸铵结晶紫染液、卢戈氏(Lugol)碘液、95%乙醇和沙黄(蕃红)染液,常温条件下保存。

5.4 葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、木糖等微量生化鉴定管, 2℃~8℃条件下保存。

5.5 3%过氧化氢、0.8%磺胺冰醋酸溶液、0.5% α-萘胺乙醇溶液、0.1%盐酸二甲基对苯二胺(见附录 A),常温条件下保存。

5.6 消化液 I 和 TE 缓冲液(见附录 B),常温条件下保存。

5.7 1×TAE 核酸电泳缓冲液、酚-氯仿-异戊醇混合液(25+24+1)、0.01 mol/L(pH 7.2)的 PBS、阿氏液等试剂(见附录 B), 6×电泳上样缓冲液, 75%乙醇, 以上试剂 2℃~8℃条件下保存。

5.8 组织悬液、消化液 II(见附录 B), 异丙醇, DNA 标准分子量, 置-20℃保存。

5.9 阳性对照、阴性对照(见附录 B)。

5.10 巢式 PCR 扩增用上、下游引物序列(见附录 C)。

5.11 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 检测反应体系(见附录 D)。

5.12 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物及探针序列(见附录 C)。

5.13 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测反应体系(参见附录 E)。

6 细菌分离与鉴定

6.1 样品的采集

无菌采集疑似副猪嗜血杆菌感染病死猪的肺脏、心脏、脑等新鲜组织,胸腔、腹腔、心包积液或关节液,抗凝血等样品。采集或处理的样品在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,运送到实验室。

6.2 分离培养

6.2.1 在生物安全柜中用接种环无菌蘸取样品划线接种于 TSA 固体培养基上, 37℃培养 24 h~48 h, 使之形成菌落,以供鉴定用。

6.2.2 取 6.2.1 中培养的针尖大小(直径约 1 mm~2 mm)、圆形、隆起、光滑湿润、无色透明、边缘整齐的小菌落,在 TSA 固体培养基上进行划线接种纯培养, 37℃培养 24 h~48 h 后,出现上述小菌落。

6.3 涂片染色镜检

6.3.1 涂片 在载玻片上滴加 1~2 滴灭菌蒸馏水后,挑取纯培养的小菌落与灭菌蒸馏水混匀并涂成薄菌膜。

6.3.2 干燥 将涂片于空气中自然晾干。

6.3.3 固定 将已干燥的载玻片涂面朝上,在酒精灯火焰上通过 5 次~6 次进行固定。

6.3.4 染色 采用革兰氏染色法进行染色,具体操作按照革兰氏染色试剂盒说明书进行,置 1 000 倍(10×100)光学显微镜下观察。

6.3.5 镜检 副猪嗜血杆菌为革兰氏染色阴性短杆状或球杆状小杆菌,菌体大小不等,约 0.5 μm×(1.5 μm~2.0 μm),以纤细杆状居多、无鞭毛,不形成芽孢。

6.4 “卫星生长现象”试验

在生物安全柜中无菌挑取纯化培养后的单个菌落,平行划线于无 NAD 的绵羊鲜血平板上,再挑取金黄色葡萄球菌垂直于水平线划线,37 °C 条件下培养 24 h~48 h 后,观察菌落生长情况,副猪嗜血杆菌无溶血,并具有“卫星生长现象”(金黄色葡萄球菌周围的副猪嗜血杆菌菌落较大,而远离葡萄球菌的副猪嗜血杆菌菌落较小)。

6.5 增殖培养

在生物安全柜中无菌挑取具有“卫星生长现象”且不溶血的单菌落在 TSA 固体培养基上进行再次纯培养后,挑取单个菌落接种于 5 mL TSB 液体培养基中,37 °C 培养 24 h~48 h 后,液体变混浊,判为增殖培养成功。

6.6 生化鉴定

6.6.1 糖类发酵试验

在生物安全柜中无菌将生化鉴定管打开,每管按 10 µg/mL 终浓度加入 NAD,用接种针无菌挑取 6.5 中增殖培养的菌液分别接种于葡萄糖、乳糖、半乳糖、甘露醇、木糖等微量生化鉴定管中,37 °C 培养 24 h,观察结果,发酵葡萄糖、半乳糖,不发酵乳糖、甘露醇、木糖者为阳性,否则为阴性。

6.6.2 触酶试验

吸取 6.5 中增殖培养的菌液 1 滴于洁净玻片上,然后滴加 1 滴 3% 过氧化氢混匀,30 s 内观察反应结果,立即出现大量气泡者判为阳性,无气泡者判为阴性。

6.6.3 硝酸盐还原试验

将 0.8% 磺胺冰醋酸溶液和 0.5% α-萘胺乙醇溶液各 0.2 mL 混合,取混合试剂 0.1 mL 加至 6.5 中增殖培养菌液中,立即观察结果,呈现红色者为阳性,无红色出现者为阴性。

6.6.4 尿素酶试验

吸取 6.5 中增殖培养的菌液 100 µL 接种于尿素酶试验液体培养管中,摇匀,于 37 °C 培养 10 min, 60 min 和 120 min 后分别观察结果,粉红色者判为阳性,不变色者判为阴性。

6.6.5 氧化酶试验

吸取 6.5 中增殖培养菌液 1 滴于洁净载玻片上,加盐酸二甲基对苯二胺溶液 1 滴,2 min 内观察结果,呈现鲜蓝色者判为阳性,2 min 内不变色者判为阴性。

6.6.6 全自动微生物鉴定仪鉴定

按照全自动微生物鉴定仪使用说明书将 6.5 中增殖培养的细菌进行微生物鉴定。

6.6.7 结果判定

糖类发酵试验结果为发酵葡萄糖、半乳糖,不发酵乳糖、甘露醇、木糖;触酶、硝酸盐还原试验结果均为阳性;尿素酶、氧化酶试验结果均为阴性的判定为副猪嗜血杆菌阳性;或全自动微生物鉴定仪鉴定结果为副猪嗜血杆菌阳性的,判定为副猪嗜血杆菌阳性。

7 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 检测

7.1 样品的采集、处理、存放和运送

7.1.1 样品的采集和处理

7.1.1.1 组织样品

采取有明显病变的肺脏、心脏、脑等新鲜组织样品。用无菌剪刀和镊子剪取待检样品 0.5 g 左右于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,加入 0.3 mL~0.5 mL PBS 混匀,将组织悬液转入无菌离心管中,编号备用。

7.1.1.2 积液

用无菌注射器采集胸腔、腹腔积液或关节液 2 mL~3 mL,转至无菌离心管中,编号备用。

7.1.1.3 抗凝血

用无菌注射器先吸入抗凝剂(阿氏液)2 mL~3 mL,自耳静脉或前腔静脉采集等量血液,快速混匀后转入无菌离心管中,编号备用。

7.1.1.4 增菌培养物

用无菌滴头吸取增菌培养物 500 μ L 于无菌离心管中,编号备用。

7.1.2 存放和运送

采集或处理的样品在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 条件下保存应不超过 24 h。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,运送到实验室。

7.2 样品 DNA 的制备

警示:酚-氯仿-异戊醇具有毒性,小心操作!

7.2.1 取 1.5 mL 无菌离心管,于各管中分别加入待测样品、阴性对照、阳性对照各 100 μ L,再加入 500 μ L 消化液 I 和 10 μ L 消化液 II,吸头反复吸打混匀(一份样品换用一个吸头);置 55 $^{\circ}$ C 水浴 30 min~1 h。

7.2.2 分别加入 500 μ L 酚-氯仿-异戊醇混合液,混匀,于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min。

7.2.3 分别吸取离心后的上清液转移至新的 1.5 mL 无菌离心管中(注意不要碰到中间层),加入等体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇,混匀,室温放置 15 min。

7.2.4 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。加入 700 μ L 75%乙醇,轻轻混匀。

7.2.5 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

7.2.6 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 30 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量加样器尽量将其吸干,一份样品换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,真空抽干 3 min~5 min 或室温干燥 10 min。

7.2.7 加入 10 μ L TE 缓冲液,轻轻混匀,溶解 DNA,2 000 r/min 离心 5 s,置 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

7.2.8 样品 DNA 的制备可采用上述提取方法也可采用商品化的试剂盒提取。

7.3 巢式 PCR 扩增

7.3.1 第一轮 PCR 扩增

7.3.1.1 配制 PCR 反应体系 I (见附录 D), 室温融化后, 瞬时离心使液体全部聚集在管底部, 向每管中加入 7.2.7 中相应 DNA 2 μL , 经充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底。

7.3.1.2 PCR 扩增条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后取出置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

7.3.2 第二轮 PCR 扩增

7.3.2.1 配制 PCR 反应体系 II 室温融化后, 瞬时离心使液体全部聚集在管底部, 向每管中加入 7.3.1.2 中相应的 PCR 产物 2 μL , 经充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底。

7.3.2.2 PCR 扩增条件同 7.3.1.2。

7.4 PCR 扩增产物的电泳检测

称取 1.2 g 琼脂糖加入 100 mL 核酸电泳缓冲液中加热至沸腾, 充分溶化后放凉至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 加入核酸染色剂 10 μL , 混匀, 倒入胶槽制备凝胶板。在电泳槽中加入 1 $\times$ TAE 核酸电泳缓冲液, 使液面刚刚没过凝胶。分别取样品 PCR 扩增产物、阴/阳性对照扩增产物 10 μL 和 2 μL 6 $\times$ 电泳上样缓冲液混合后, 分别加样到各凝胶孔中, 取 5 μL DNA 分子量标准加到一凝胶孔中。5 V/cm 恒压下电泳 30 min 左右, 将电泳好的凝胶置紫外投射仪或凝胶成像系统中观察结果, 进行判定并做好试验记录。

7.5 结果判定

7.5.1 试验结果成立条件

副猪嗜血杆菌阳性对照的巢式 PCR 扩增产物电泳后在 312 bp 位置出现特异性条带, 同时阴性对照的 PCR 扩增产物电泳后没有任何条带 (参见附录 F), 则试验结果成立; 否则结果不成立。

7.5.2 阳性判定

在试验结果成立的前提下, 如果样品的 PCR 产物电泳后在 312 bp 位置上出现特异性条带, 判定为副猪嗜血杆菌核酸检测阳性。

7.5.3 阴性判定

在试验结果成立的前提下, 如果样品在 312 bp 位置未出现特异性条带, 判定为副猪嗜血杆菌核酸检测阴性。



8 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测

8.1 样品的采集、处理、存放及运送

样品的采集、处理、存放及运送应符合 7.1 的规定。

8.2 样品 DNA 的制备

样品 DNA 的制备应符合 7.2 的规定。

8.3 实时荧光 PCR 扩增

8.3.1 在检测区配制与 8.2 中相同数量的实时荧光 PCR 反应体系,向每管中加入 8.2 中相应 DNA $2\ \mu\text{L}$,充分混匀后并使液体全部聚集于管底,按照要加样品的顺序摆放好实时荧光 PCR 反应管。

8.3.2 将 8.3.1 中加样后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光定量 PCR 仪内并记录样本摆放顺序。

8.3.3 反应参数设置:第一阶段,预变性 $94\ ^\circ\text{C}/5\ \text{min}$;第二阶段, $94\ ^\circ\text{C}/30\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}/30\ \text{s}$,40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号收集,荧光模式设为 FAM/NONE 双标记模式。

8.4 结果判定

8.4.1 结果分析条件设定

读取检测结果,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

8.4.2 质控标准

阴性对照的检测结果显示应无特定的扩增曲线,且 C_t 值 >32.0 或无;阳性对照的 C_t 值应 ≤ 29.0 ,且出现特定的扩增曲线(参见附录 F);如阴性对照和阳性对照结果不满足以上条件,此次实验视为无效。

8.4.3 结果描述及判定

8.4.3.1 阳性

C_t 值 ≤ 29.0 ,而且出现特定的扩增曲线,则判定为阳性。

8.4.3.2 阴性

C_t 值 >32.0 或无,并且无特定的扩增曲线,则判定为阴性。

8.4.3.3 可疑

$29.0 < C_t \text{ 值} \leq 32.0$ 且有特定的扩增曲线的样品应重做,结果为阳性者判定为阳性,否则判定为阴性。

8.4.3.4 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 值 <32.0 的扩增曲线,判定本次实验无效,需要分析试验失败原因,并重新试验。

附录 A

(规范性附录)

副猪嗜血杆菌分离培养和生化鉴定试剂的配制

A.1 TSA 固体培养基的配制

A.1.1 称取 TSA 40 g, 加入 940 mL 蒸馏水, 充分摇匀后加热至充分溶解, 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.1.2 冷却至 45 °C 左右, 加入 50 mL 过滤除菌的小牛血清、10 mL 过滤除菌的 1% NAD, 充分摇匀后制备固体培养平板, 2 °C~8 °C 条件下保存。

A.2 TSB 液体培养基的配制

A.2.1 称取 TSB 30 g, 加入 949 mL 蒸馏水, 加热至充分溶解后摇匀, 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min, 2 °C~8 °C 条件下保存。

A.2.2 使用前, 加入 50 mL 过滤除菌的小牛血清、1 mL 过滤除菌的 1% NAD。

A.3 NAD 贮备液的配制

称取 1 g NAD 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 充分摇匀溶解后, 用 0.22 μm 的细菌滤器过滤, 分装于无菌离心管中, 置 -20 °C 保存备用。

A.4 硝酸盐还原试验试剂的配制

称取磺胺酸 0.8 g, 加入 100 mL 冰醋酸配制成 0.8% 磺胺酸冰醋酸溶液; 称取 0.5 g α-萘胺, 加入 100 mL 乙醇, 配制成 0.5% α-萘胺乙醇溶液。

A.5 0.1% 二盐酸二甲基对苯二胺溶液的配制

称取二盐酸二甲基对苯二胺 0.1 g, 加入 10 mL 蒸馏水, 即可配制成 0.1% 二盐酸二甲基对苯二胺溶液。

附 录 B

(规范性附录)

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 和实时荧光 PCR 检测试剂的配制

B.1 消化液 I 的配制

Tris-HCl(pH 8.0)终浓度 10 mmol/L; EDTA (pH 8.0)终浓度 25 mmol/L; SDS 终浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; NaCl 终浓度 100 mmol/L。

B.2 TE 缓冲液的配制

Tris-HCl (pH 8.0)终浓度为 10 mol/L, EDTA (pH 8.0)终浓度为 1 mol/L。

B.3 1×TAE 核酸电泳缓冲液的配制

Tris 碱, 24.2 g; 冰乙酸, 5.71 mL; 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 10 mL; 加蒸馏水至 100 mL, 使用时用蒸馏水作 50 倍稀释, 即为 1×TAE 核酸电泳缓冲液。

B.4 酚-氯仿-异戊醇溶液的配制

Tris 饱和酚-氯仿-异戊醇按 25 : 24 : 1 的比例混合。

B.5 0.01 mol/L(pH 7.2)的磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

B.5.1 A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g, 用适量蒸馏水溶解, 定容至 1 000 mL。

B.5.2 B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g, 用适量蒸馏水溶解, 定容至 1 000 mL。

B.5.3 0.01 mol/L PBS 的配制: A 液 14 mL, B 液 36 mL, 加 NaCl 8.5 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL; 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

B.6 阿氏液的配制

葡萄糖 2.05 g, 柠檬酸钠 0.8 g, 柠檬酸 0.055 g, 氯化钠 0.42 g, 加蒸馏水定容至 100 mL, 溶解后调 pH 至 6.1, 69 kPa, 15 min 高压灭菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

B.7 组织悬液的配制



在 0.01 mol/L PBS 液中添加青霉素(2 000 IU/mL), 链霉素(2 mg/mL)、庆大霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和制霉菌素(1 000 IU/mL), 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

B.8 消化液Ⅱ的配制

称取 100 mg 蛋白酶 K 溶解于 5 mL 灭菌水中。

B.9 阳性对照

灭活的副猪嗜血杆菌标准菌株。

B.10 阴性对照

灭菌的 TSB 培养基。



附 录 C

(规范性附录)

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法所用引物序列

C.1 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 扩增用上、下游引物序列

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 扩增用上、下游引物序列见表 C.1。

表 C.1 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 扩增用上、下游引物序列

引物名称	浓度/($\mu\text{mol/L}$)	引物序列	扩增片段大小
第一轮 PCR 扩增上游引物 P1	20	5'-TCGGTGATGAGGAAGGGTGA-3'	P1/P2 引物对 扩增片段 820 bp;
第一轮 PCR 扩增下游引物 P2	20	5'-TCGTCACCCTCTGTATGCAC-3'	
第二轮 PCR 扩增上游引物 P3	20	5'-AGGGTGGTGTTTAAATAGAGCAC-3'	P3/P4 引物对 扩增片段 312 bp
第二轮 PCR 扩增下游引物 P4	20	5'-CACATGAGCGTCAGTATTTTCC-3'	

C.2 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测方法所用上、下游引物及探针序列

副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测方法所用上、下游引物及探针序列见表 C.2。

表 C.2 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物及探针序列

引物名称	浓度/($\mu\text{mol/L}$)	引物序列	扩增片段大小
实时荧光 PCR 扩增上游引物 FQ-P1	20	5'-AGCAGCCGCGGTAATACG-3'	P1/P2 引物对扩 增片段 58 bp
实时荧光 PCR 扩增下游引物 FQ-P2	20	5'-CCTTTACGCCCAGTCATTCC-3'	
实时荧光 PCR 扩增 MGB 探针	10	FAM-5'-AGGGTGCGAGCGT-3'-MGB	



附 录 D
(规范性附录)

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 反应体系组成、说明及使用注意事项

D.1 检测反应体系组成

检测反应体系组成见表 D.1。

表 D.1 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 检测反应体系组成

组成成分	数 量
PCR 反应体系 I	20 管(23 μ L/管)
PCR 反应体系 II	20 管(23 μ L/管)
阳性对照	300 μ L
阴性对照	300 μ L
消化液 I	12 mL
消化液 II	240 μ L
酚-氯仿-异戊醇	12 mL
异丙醇	15 mL
75%乙醇	20 mL
TE 缓冲液	600 μ L
50 倍 TAE 电泳缓冲液	20 mL
核酸染色剂	50 μ L
上样缓冲液	50 μ L

D.2 说明

- D.2.1 PCR 反应体系 I 成分:10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}),2.5 μ L;2.5 mmol/L dNTPs,2 μ L;P1,0.5 μ L; P2,0.5 μ L;Ex *Taq* DNA 聚合酶,0.25 μ L(5 U);灭菌双蒸水,17.25 μ L;总体积为 23 μ L。
- D.2.2 PCR 反应体系 II 成分:10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}),2.5 μ L;2.5 mmol/L dNTPs,2 μ L;P3,0.5 μ L; P4,0.5 μ L;Ex *Taq* DNA 聚合酶,0.25 μ L(5 U);灭菌双蒸水,17.25 μ L;总体积为 23 μ L。
- D.2.3 PCR 反应体系中含副猪嗜血杆菌标准株特异性引物对、Ex *Taq* 酶及各种离子。

D.3 使用时的注意事项

D.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高,注意检测过程中不得交叉污染。

D.3.2 注意防止试剂组分污染,不同检测体系之间的成分勿混用。

D.3.3 请按照说明书要求分别在 4℃、-20℃保存不同的试剂,试剂盒有效期为 6 个月。使用时在室温下融化,暂放置冰上,使用后立即放回。

D.3.4 PCR 反应体系应避免反复冻融,在使用前应瞬时离心,以保证反应液集中在管底。

附 录 E
(资料性附录)

副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测反应体系组成、说明及使用注意事项

E.1 检测反应体系组成

检测反应体系组成见表 E.1。

表 E.1 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 检测反应体系组成

组成	数量
消化液 I	12 mL
消化液 II	240 μL
酚-氯仿-异戊醇	12 mL
异丙醇	15 mL
75%乙醇	20 mL
TE 缓冲液	600 μL
荧光 PCR 反应液	360 μL
Ex Taq 酶	6 μL
阴性对照	300 μL
阳性对照	300 μL

E.2 说明

荧光 PCR 反应液成分：10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})，2.5 μL；2.5 mmol/L dNTPs，2 μL；Ex Taq DNA 聚合酶，0.25 μL(5 U)；FQ-P1，0.5 μL；FQ-P2，0.5 μL；探针，1 μL；灭菌双蒸水，16.25 μL；总体积为 23 μL。

E.3 使用时的注意事项

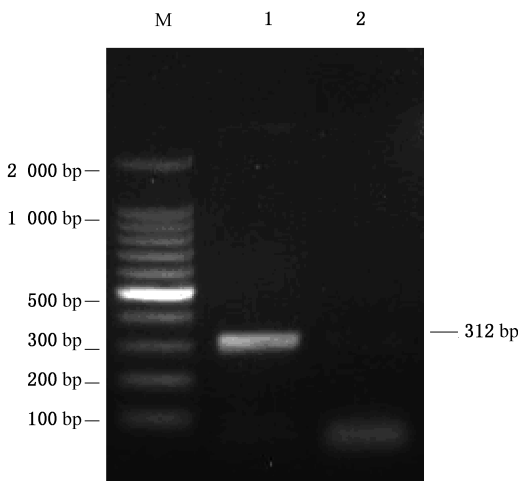
- E.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高，注意检测过程中不得交叉污染。
- E.3.2 注意防止试剂组分污染，不同检测反应体系之间的成分勿混用。
- E.3.3 按照说明书要求分别在 2℃~8℃、-20℃保存不同的试剂，试剂盒有效期为 6 个月。使用时在室温下融化，暂放置于冰上，使用后立即放回。
- E.3.4 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

附 录 F
(资料性附录)

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 产物电泳图及实时荧光 PCR 扩增曲线图

F.1 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 产物电泳图

副猪嗜血杆菌巢式 PCR 产物电泳图见图 F.1。



说明：
M ——100 bp DNA 分子量标准；
1 ——副猪嗜血杆菌阳性对照；
2 ——阴性对照。

图 F.1 副猪嗜血杆菌巢式 PCR 扩增图

F.2 猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增曲线图

副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增曲线图见图 F.2。



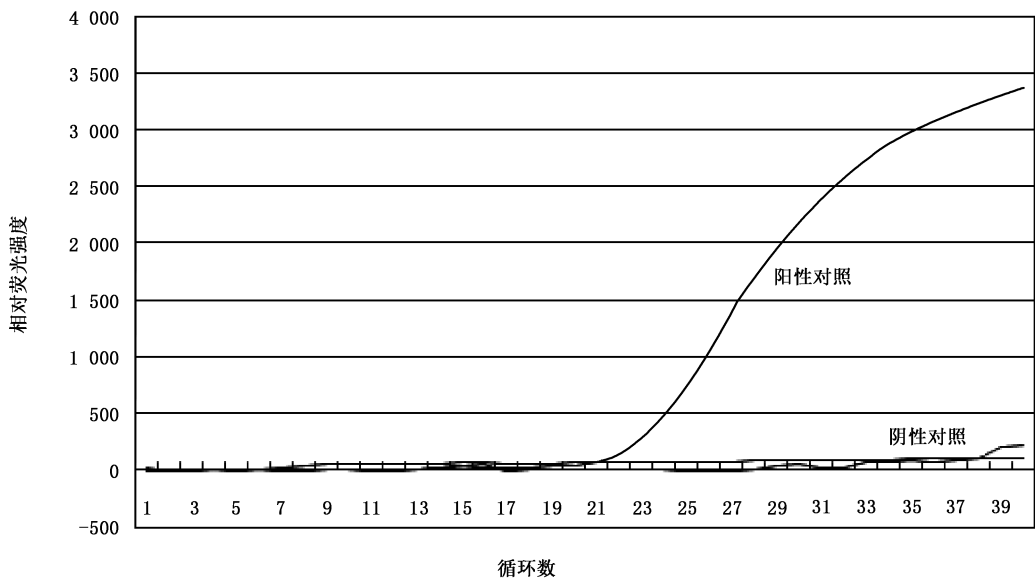


图 F.2 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增曲线图