



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.6—2005

猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法

Method of the real-time PCR for the detection of *Streptococcus suis*

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

前 言

本标准的附录 A 是规范性附录,附录 B 是资料性附录。

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。

本标准起草单位:中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:张鹤晓、宋立、高志强、宁宜宝、周琦、乔彩霞、杨承槐、吴丹、谷强。

本标准系首次发布的国家标准。



猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法。
本标准适用于增菌培养物、疑似病料及生猪拭子、猪组织样品中猪源链球菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 19438.1—2004 禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

3 缩略语

本标准采用下列缩略语:

荧光 PCR	荧光聚合酶链式反应
Ct 值	每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环圈数
DNA	脱氧核糖核酸
Taq 酶	Taq DNA 聚合酶
PBS	磷酸盐缓冲生理盐水

4 原理

采用 TaqMan 方法,在比对猪源链球菌 16S rDNA 基因序列的基础上,设计针对该基因的特异性引物和特异性的荧光双标记探针进行配对。探针 5'端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示),3'端标记 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示),它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。PCR 反应进入退火阶段时,引物和探针同时与目的基因片段结合,此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收,仪器检测不到荧光信号;而反应进行到延伸阶段时,Taq 酶的 5'→3'的外切核酸酶功能将探针降解。这样探针上的 R 基团游离出来,所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测仪所接收。随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

5 猪源链球菌通用荧光 PCR 检测实验室的标准化设置与管理

猪源链球菌通用荧光 PCR 检测实验室的标准化设置与管理见 GB/T 19438.1—2004 中附录 C。

6 试剂和材料

6.1 试剂

除另有说明,所用试剂均为分析纯。

- 6.1.1 无水乙醇: -20℃ 预冷。
- 6.1.2 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和无 DNA 酶的灭菌纯化水配制, -20℃ 预冷。
- 6.1.3 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS:配方见附录 A, (121±2)℃、15 min 高压灭菌冷却。

6.1.4 猪源链球菌通用荧光 PCR 检测试剂盒¹⁾:试剂盒的组成、说明及使用注意事项参见附录 B。

6.2 仪器设备

6.2.1 高速台式冷冻离心机:最大转速 13 000 r/min 以上。

6.2.2 荧光 PCR 检测仪、计算机。

6.2.3 2℃~8℃冰箱和-20℃冰箱。

6.2.4 微量移液器:0.5 μL~10 μL, 5 μL~20 μL, 20 μL~200 μL, 200 μL~1 000 μL。

6.2.5 组织匀浆器。

6.2.6 混匀器。



7 样品的采集与前处理

采样过程中样本不得交叉污染,采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

7.1 取样工具

7.1.1 棉拭子、剪刀、镊子、研钵、Eppendorf 管。

7.1.2 所有上述取样工具应经(121±2)℃、15 min 高压灭菌并烘干或经 160℃干烤 2 h。

7.2 采样方法

7.2.1 生猪拭子样品

咽喉拭子采样,采样时要将拭子深入喉头及上腭来回刮 3 次~5 次,取咽喉分泌液。

7.2.2 扁桃体、内脏或肌肉样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 1.0 g 于研钵中充分研磨,再加 5.0 mL PBS 混匀,然后将组织悬液转入无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

7.2.3 血清或血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

7.3 存放与运送

采集或处理的样本在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,须放置-70℃冰箱,但应避免反复冻融(最多冻融 3 次)。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。

8 操作方法

8.1 样本核酸的提取

在样本处理区进行。

8.1.1 提取方法 1

8.1.1.1 取 n 个 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管,其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和,对每个管进行编号标记。

8.1.1.2 每管加入 1.0 mL 裂解液,然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照各 100 μL,一份样本换一个吸头,混匀器上震荡混匀 5 s,于 4℃~25℃条件下,10 000 r/min 离心 10 min。

8.1.1.3 取与 8.1.1.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管,加入 500 μL 无水乙醇(-20℃预冷),对每个管进行编号。吸取 8.1.1.2 离心后各管中的上清液转移至相应的管中,上清液要充分吸取,不要吸出底部沉淀,颠倒混匀。

8.1.1.4 于 4℃~25℃条件下,5 000 r/min 离心 5 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清,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 1.0 mL

1) 由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

75%乙醇,颠倒洗涤。

8.1.1.5 于4℃~25℃条件下,5 000 r/min离心10 min(Eppendorf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。

8.1.1.6 4 000 r/min离心10 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,一份样本换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,室温干燥5 s~15 s。不宜过于干燥,以免DNA不溶。

8.1.1.7 加入11 μL无DNA酶的灭菌纯化水,轻轻混匀,溶解管壁上的DNA,2 000 r/min离心5 s,冰上保存备用。

8.1.2 提取方法2

8.1.2.1 取 n 个1.5 mL灭菌Eppendorf管,其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和,对每个管进行编号标记。

8.1.2.2 每管加入100 μL DNA提取液1,然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照各100 μL,一份样本换用一个吸头,混匀器上震荡混匀5 s,于4℃~25℃条件下,13 000 r/min离心10 min。

8.1.2.3 尽可能吸弃上清且不碰沉淀,再加入10 μL DNA提取液2,混匀器上震荡混匀5 s。于4℃~25℃条件下,2 000 r/min离心10 s。

8.1.2.4 100℃干浴或沸水浴10 min;加入40 μL无DNA酶的灭菌纯化水,13 000 r/min离心10 min,上清即为提取的DNA,冰上保存备用。

8.1.3 DNA提取后的处理要求

提取的DNA须在2 h内进行PCR扩增或放置于-70℃冰箱。

8.2 扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行。

从试剂盒中取出猪源链球菌通用荧光PCR反应液、Taq酶,在室温下融化后,2 000 r/min离心5 s。设所需PCR数为 n ,其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和。每个测试反应体系需使用15 μL PCR反应液及0.3 μL Taq酶。计算各试剂的使用量,加入一适当体积试管中,向每个PCR管中各分装15 μL,转移至样本处理区。

8.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的PCR管中分别加入8.1.1.7或者8.1.2.4中制备的DNA溶液10 μL,使总体积达25 μL。盖紧管盖后,500 r/min离心30 s。

8.4 荧光PCR反应

在检测区进行。将8.3中加样后的PCR管放入荧光PCR检测仪内,记录样本摆放顺序。

反应参数设置:

——第一阶段,预变性92℃ 3 min;

——第二阶段,92℃ 5 s,60℃ 30 s,45个循环,荧光收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行。

9 结果判定

9.1 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。

9.2 质控标准

9.2.1 阴性对照无 C_t 值并且无扩增曲线。

9.2.2 阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30.0 ,并出现特定的扩增曲线。

9.2.3 如阴性对照和阳性条件不满足以上条件,此次实验视为无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性

无 C_t 值并且无扩增曲线,表明样品中无猪源链球菌。

9.3.2 阳性

C_t 值 ≤ 30.0 ,且出现特定的扩增曲线,表示样本中存在猪源链球菌。



附 录 A
(规范性附录)

磷酸盐缓冲生理盐水配方

A.1 A液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液)

一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A.2 B液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液)

七水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 53.6 g, [或十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.6 g或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 35.6 g]加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲生理盐水的配制

0.2 mol/L A液	14 mL
0.2 mol/L B液	36 mL
氯化钠	8.5 g
用蒸馏水稀释至 1 000 mL。	



附 录 B
(资料性附录)

猪源链球菌通用荧光 PCR 试剂盒组成、说明及使用时的注意事项

B.1 试剂盒的组成

试剂盒的组成见表 B.1。

表 B.1 猪源链球菌通用荧光 PCR 试剂盒的组成

组成 (48 tests/盒)	数 量
裂解液(提取方法 1)或 DNA 提取液 1(提取方法 2),DNA 提取液 2(提取方法 2)	48 mL×1 盒(裂解液)或 5 mL×1 管(DNA 提取液 1), 1.6 mL×1 管(DNA 提取液 2)
猪源链球菌通用荧光 PCR 反应液	750 μ L×1 管
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μ L)	15 μ L×1 管
无 DNA 酶的灭菌纯化水	1 mL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
阳性对照	1 mL×1 管

B.2 说明

B.2.1 裂解液外观为浅绿色,于 4℃ 保存;DNA 提取液 1,2 为无色液体,−20℃ 保存。

B.2.2 无 DNA 酶的灭菌纯化水,用于溶解提取的 DNA。

B.2.3 PCR 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

B.3 使用时的注意事项

B.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高,检测过程中不得交叉污染。

B.3.2 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。

B.3.3 除裂解液外,其他试剂−20℃ 保存,有效期为 6 个月。
