



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

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

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。



猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型的 PCR 的定型方法。

本标准适用于由猪链球菌 2 型引致的病死猪分离菌的检测和定型。

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 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

猪链球菌 2 型 *Streptococcus suis* type 2

猪链球菌是属于链球菌属的一种细菌,根据其荚膜多糖抗原的差异,可分为 1~34 及 1/2 共 35 个血清型。猪链球菌 2 型是猪链球菌的一个血清型,不仅对猪致病性很强,而且可以感染特定的人群,是一种重要的人畜共患病病原菌。

4 测定方法

4.1 方法提要

挑取可疑细菌培养物菌落加入 PCR 反应管中,进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,与标准分子量标记比较,确定扩增产物的大小。

4.2 试剂和材料

除另有规定,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682—1992 的灭菌双蒸水。

4.2.1 猪链球菌 2 型定型 PCR 反应混合物和猪链球菌 2 型定型套式 PCR 反应混合物。

4.2.2 *Taq* DNA 聚合酶。

4.2.3 琼脂糖:电泳级。

4.2.4 溴化乙锭。

4.2.5 分子量标记:DL-2000。

4.2.6 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

4.2.7 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L (NH₄)₂SO₄,20 mmol/L MgSO₄,200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),1% TritonX-100,1 mg/mL BSA。

4.2.8 电泳缓冲液:242 g Tris 碱,57.1 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),加蒸馏水至 1 000 mL,使用时 10 倍稀释。

4.2.9 加样缓冲液:0.25% 溴酚蓝,40% 蔗糖。

4.2.10 荚膜基因 PCR 引物和荚膜基因套式 PCR 引物。

4.2.11 阳性对照和阴性对照。

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℃预变性 3 min;95℃20 s,55℃30 s,72℃40 s,30 个循环;72℃延伸 7 min,4℃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℃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

Hind II 1.0 μL

10×buffer 1.0 μL

混匀,37℃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×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℃预变性 3 min;95℃40 s,55℃30 s,72℃40 s,30 个循环;72℃延伸 7 min,4℃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

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。

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。

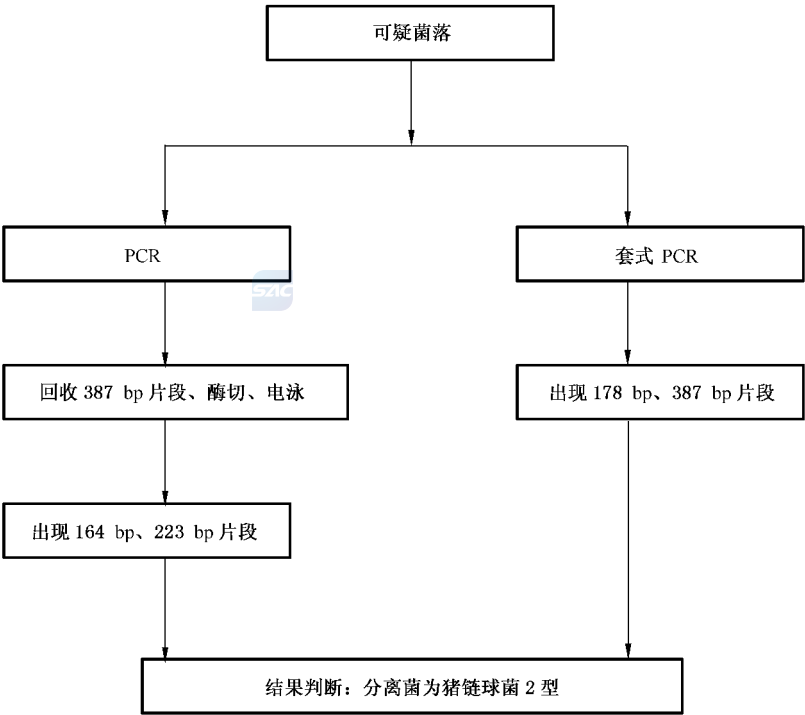


图 A. 1 猪链球菌 2 型快速检测程序