



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.4—2005

猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法

Method of detecting *Streptococcus suis* type 2 by triple-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 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。人可通过伤口感染该菌,并导致死亡。为了区别正常猪所携带的猪链球菌 2 型无毒菌株与发病猪分离的致病菌株,特制定本标准。本标准是采用现代分子生物学诊断技术制定的。

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、姚火春、范红结、何孔旺。

猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型荚膜基因(*cps2*)、溶菌酶释放蛋白基因(*mrp*)和 *orf2* 这三个毒力基因的三重 PCR 检测技术。

本标准适用于由猪链球菌 2 型致病基因和致病菌株的检测。

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 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,来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 *cps2*、*mrp* 和 *orf2* 的上下游引物,按合成说明书使用。

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 阳性对照猪链球菌 2 型 HA9801 株基因组 DNA 模板,阴性对照马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 株和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株基因组 DNA 模板。

4.2.11 猪链球菌 2 型三重 PCR 反应混合物。

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 μ L、20 μ L、100 μ L、1 000 μ L。

4.3.6 紫外线透射仪或凝胶成像系统。

4.3.7 恒温水浴锅。

4.4 PCR 操作步骤

4.4.1 阳性对照和阴性对照 DNA 模板的提取

分别将猪链球菌 2 型 HA9801、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 株和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株接种于 5% 犊牛血清 Todd-Hewitt 肉汤培养基,37℃ 振荡培养 18 h,用革兰氏阳性细菌柱离心式基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取 DNA 模板,−20℃ 保存备用。

4.4.2 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 型三重 PCR 反应混合物的 PCR 管中,混匀,加入 *Taq* 酶(2 U/ μ L) 0.7 μ L,2000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增;同时设去离子水的空白对照、猪链球菌 2 型 HA9801 株基因组 DNA 模板的阳性对照、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株基因组 DNA 模板的阴性对照。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,30 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。

4.4.3 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 μ L 酶切产物加入 2 μ L 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。

5 结果及判断

5.1 试验结果成立条件

阳性对照 HA9801 株经 PCR 扩增出现约 858 bp、387 bp 和 316 bp 三条条带,去离子水的空白对照、马链球菌兽疫亚种 ATCC 35246 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 株基因组 DNA 模板的阴性对照 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

琼脂糖凝胶电泳后,在紫外线投射下检测,在空白和阴、阳性对照成立的情况下,待检样品只出现 387 bp 一条条带,可判定为猪链球菌 2 型;待检样品出现约 387 bp、316 bp 和 858 bp 三条条带,或出现 387 bp 和 858 bp 两条条带,可判定为猪链球菌 2 型致病菌株;待检样品只出现 858 bp 一条条带,可判定为非猪链球菌 2 型的致病菌;待检样品不出现条带,结果为阴性。

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。