



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

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。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。

猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 检测的操作方法。

本标准适用于猪及其产品中分离菌株的猪链球菌 2 型溶血素基因的检测。

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。凡是注明日期的引用文件，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。凡是不注明日期的引用文件，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 缩略语

PCR	polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应
DNA	deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate, 脱氧核苷酸三磷酸
bp	base pair, 碱基对

5 测定方法

5.1 方法提要

以可疑细菌培养物提取的核酸，作为 DNA 模板进行 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。

5.2 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。

5.2.1 猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 反应混合物：10×PCR 缓冲液 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、上下游引物各 1 μL，用双蒸水补至 20 μL。引物序列如下，其目的片段长度为 495 bp。

sls1: 5'CCC, AAG, TTC, AAG, CCG, CAT, TTA 3'(1542)

sls2: 5'GAA, GAT, TGC, GAG, CAT, TTC, CTG 3'(2036)

5.2.2 *Taq* DNA 聚合酶。

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 \times 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(pH 8.0),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 $^\circ\text{C}$ 水浴 60 min 后,再加入 100 μL 5 mol/L NaCl 和 80 μL CTAB/NaCl,65 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 1 min,56 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 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 \sim 5 V/cm,电泳时间为 30 min \sim 35 min。将电泳好的凝胶

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 $15\ \text{min}\sim 20\ \text{min}$, 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 $495\ \text{bp}$ 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 $495\ \text{bp}$ 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 $495\ \text{bp}$ 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。

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。
