



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

订单号: 0100191216052488 防伪编号: 2019-1216-0949-4490-2153 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052488 防伪编号: 2019-1216-0949-4490-2153 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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 °C~8 °C 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 °C~8 °C 条件下保存。

5.5 3%过氧化氢、0.8%磺胺酸冰醋酸溶液、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 °C~8 °C 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 °C 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 °C~8 °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。

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 °C 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 °C 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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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基管中,摇匀,于 37 ℃ 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影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 μ 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 $^{\circ}$ C/5 min;第二阶段,94 $^{\circ}$ C/30 s,60 $^{\circ}$ C/30 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

$29.0 < C_t$ 值 ≤ 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 940 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。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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'-AGGGTGGTGTTTTAATAGAGCAC-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'-CCTTTACGCCAGTCATTCC-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 μL /管)
PCR 反应体系 II	20 管(23 μL /管)
阳性对照	300 μL
阴性对照	300 μL
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
50 倍 TAE 电泳缓冲液	20 mL
核酸染色剂	50 μL
上样缓冲液	50 μL

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 μL ;2.5 mmol/L dNTPs,2 μL ;P1,0.5 μL ; P2,0.5 μL ;Ex *Taq* DNA 聚合酶,0.25 μL (5 U);灭菌双蒸水,17.25 μL ;总体积为 23 μL 。

D.2.2 PCR 反应体系 II 成分:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}),2.5 μL ;2.5 mmol/L dNTPs,2 μL ;P3,0.5 μL ; P4,0.5 μL ;Ex *Taq* DNA 聚合酶,0.25 μL (5 U);灭菌双蒸水,17.25 μL ;总体积为 23 μL 。

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。

全国动物卫生标准化技术委员会

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 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
荧光 PCR 反应液	360 μ L
Ex <i>Taq</i> 酶	6 μ L
阴性对照	300 μ L
阳性对照	300 μ L

E.2 说明

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

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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 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。

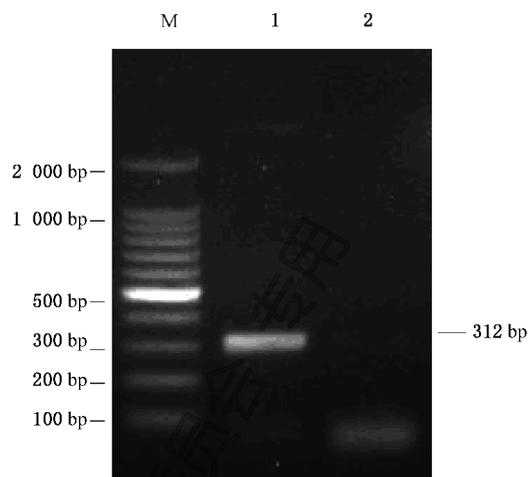
E.3.4 反应液分装时应尽量避免产生气泡, 上机前注意检查各反应管是否盖紧, 以免荧光物质泄漏污染仪器。

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。

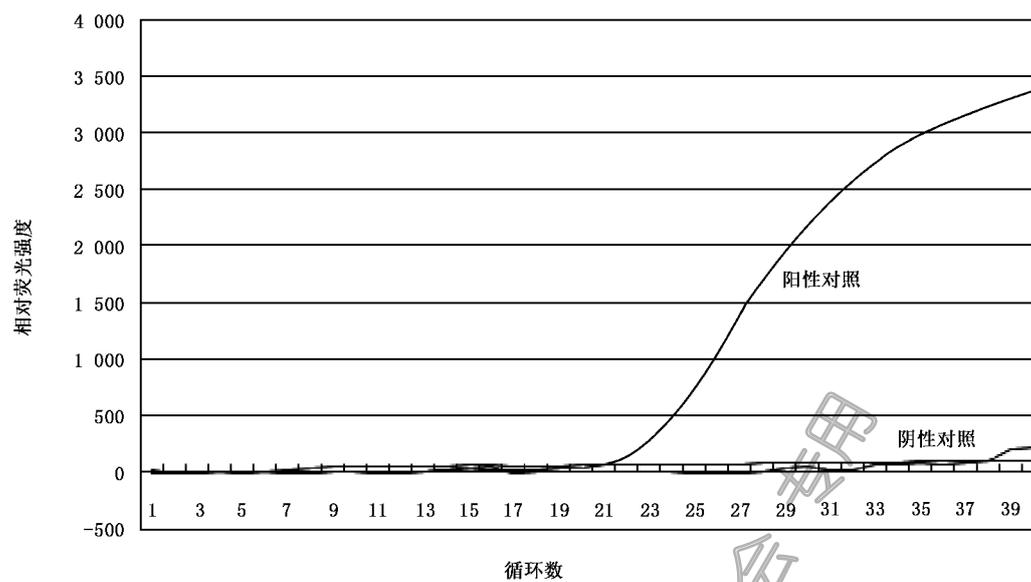


图 F.2 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 扩增曲线图

全国动物卫生标准化技术委员会

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 34750-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052488
防伪号: 2019-1216-0949-4490-2153
时 间: 2019-12-16
定 价: 28元



GB/T 34750-2017

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

副猪嗜血杆菌检测方法

GB/T 34750—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-57904

版权专有 侵权必究