

猪链球菌 9 型 PCR 检测技术规程

Technical regulation for PCR detecting *Streptococcus suis* Serotype 9

2019-12-04 发布

2019-12-25 实施

江苏省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：倪艳秀、何孔旺、周俊明、祝昊丹、吕立新、俞正玉、王丹丹、张雪寒、温立斌、李彬。

猪链球菌 9 型 PCR 检测技术规程

1 范围

本标准规定了猪链球菌9型PCR检测技术所用的仪器设备和主要试剂、引物、方法步骤、结果判定、废弃物处理和防止污染的措施等要求。

本标准适用于猪链球菌 9 型的 PCR 检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

《病死及病害动物无害化处理技术规范》(农医发〔2017〕25号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪链球菌9型 *Streptococcus suis* serotype 9

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1-31、33及1/2共33个血清型。猪链球菌9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,是一种人兽共患病病原菌。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

高速离心机、水浴锅、PCR仪、核酸电泳仪、凝胶成像系统。

4.2 主要试剂

生理盐水、超纯水、蛋白酶K、2×PCR Mix、琼脂糖(电泳级)、DNA分子量标准(DL 2000 Marker)。

5 引物

5.1 上游引物: 5'- GGCTACATATAATGGAAGCCC- 3'。

5.2 下游引物: 5'- CCGAAGTATCTGGGCTACTG- 3'。

6 方法步骤

6.1 样品处理

6.1.1 病料样品处理

采用差速离心法，取约 5 g 病料（肝或肺或脑组织），剪碎研磨，用 5 mL 生理盐水混悬，先 2 000 r/min 离心 2 min，去除大组织块，取上清液，后 10 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，沉淀以 200 μ L 超纯水重悬，备用。

6.1.2 待检培养物样品处理

取待检液体培养物（纯培养物或混合培养物）1 mL 10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀以 200 μ L 超纯水重悬，备用。阴性对照：THB 培养基。阳性对照：猪链球菌 9 型标准菌株（22083）的 THB 培养物。阴性、阳性对照也同样处理，对每个样品进行编号标记。

6.2 DNA提取

取 6.1 获得的样品及对照，每 200 μ L 加入 3 μ L 蛋白酶 K（20 mg/mL），42 $^{\circ}$ C 作用 1 h，煮沸 5 min，10 000 r/min 离心 5 min，上清作为模板 DNA。

6.3 PCR扩增

6.3.1 反应条件

按 25 μ L 体系进行，2 \times PCR Mix 12.5 μ L，上游引物（10 pmol/ μ L）1.0 μ L，下游引物（10 pmol/ μ L）1.0 μ L，模板 DNA 2.0 μ L，超纯水 8.5 μ L。按如下条件进行 PCR 反应。95 $^{\circ}$ C 5 min，然后进入循环 94 $^{\circ}$ C 30 sec，55 $^{\circ}$ C 30 sec，72 $^{\circ}$ C 30 sec，35 个循环，于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存。

6.3.2 电泳

将 PCR 反应产物于 1.2 % 琼脂糖凝胶进行电泳，电压为 120 V，时间 30 min。

6.3.3 结果观察

用凝胶成像系统观察结果，并进行拍照。

7 结果判定

7.1 检测结果成立条件

阳性对照的PCR产物电泳后在389 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（见附录A），检测结果成立；否则，结果不成立。

7.2 结果判定

7.2.1 在检测结果成立的前提下，如果检测样品中PCR产物电泳后在389 bp的位置上出现一条特异性条带，判为阳性，即该样品为猪链球菌9型核酸阳性。

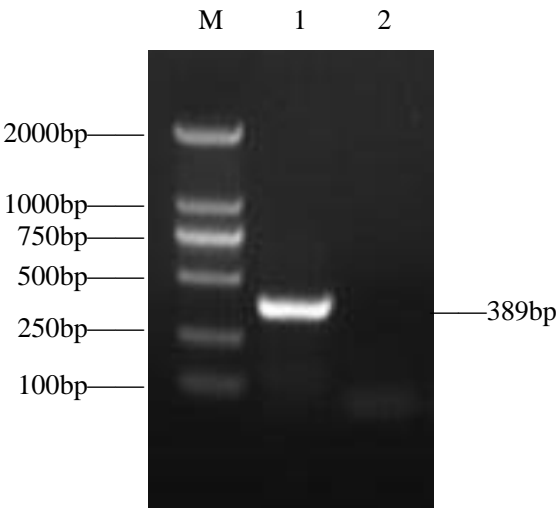
7.2.2 在检测结果成立的前提下，如果检测样品中PCR产物电泳后在389 bp的位置上未出现一条特异性条带，判为阴性，即该样品为猪链球菌9型核酸阴性。

7.2.3 如果阳性对照无相应的目的条带，可能是存在操作失误，该检测需要重复进行；如果阴性对照有相应的目的条带，可能是阴性对照存在污染或是操作失误，该检测需要重复进行。

8 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物，应做好无害化处理。检测过程中防止交叉污染的措施见附录 B。

附 录 A
(资料性附录)
猪链球菌9型PCR产物电泳图



M——DNA分子量标准（DL 2000 Marker）；
1——阳性对照；
2——阴性对照。

图A.1 猪链球菌9型PCR产物电泳图

附 录 B
(规范性附录)
检测过程中防止交叉污染的措施

B.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。

B.2 检测过程

B.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。

B.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。

B.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。

B.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超纯水。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。

B.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。

B.2.6 前PCR区中，在PCR操作箱中加入PCR反应各组分。

B.2.7 实验前后，实验室用紫外线消毒以破坏残留的DNA。
