



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.6—2005

猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法

Method of the real-time PCR for the detection of *Streptococcus suis*

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

本标准的附录 A 是规范性附录,附录 B 是资料性附录。

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。

本标准起草单位:中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:张鹤晓、宋立、高志强、宁宜宝、周琦、乔彩霞、杨承槐、吴丹、谷强。

本标准系首次发布的国家标准。

猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪源链球菌通用荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于增菌培养物、疑似病料及生猪拭子、猪组织样品中猪源链球菌的检测。

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 19438.1—2004 禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

3 缩略语

本标准采用下列缩略语:

荧光 PCR 荧光聚合酶链式反应

C_t 值 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环圈数

DNA 脱氧核糖核酸

Taq 酶 *Taq* DNA 聚合酶

PBS 磷酸盐缓冲生理盐水

4 原理

采用 TaqMan 方法,在比对猪源链球菌 16S rDNA 基因序列的基础上,设计针对该基因的特异性引物和特异性的荧光双标记探针进行配对。探针 5'端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示),3'端标记 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示),它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。PCR 反应进入退火阶段时,引物和探针同时与目的基因片段结合,此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收,仪器检测不到荧光信号;而反应进行到延伸阶段时,*Taq* 酶的 5'→3'的外切核酸酶功能将探针降解。这样探针上的 R 基团游离出来,所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测仪所接收。随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

5 猪源链球菌通用荧光 PCR 检测实验室的标准化设置与管理

猪源链球菌通用荧光 PCR 检测实验室的标准化设置与管理见 GB/T 19438.1—2004 中附录 C。

6 试剂和材料

6.1 试剂

除另有说明,所用试剂均为分析纯。

6.1.1 无水乙醇:−20℃预冷。

6.1.2 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和无 DNA 酶的灭菌纯化水配制,−20℃预冷。

6.1.3 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS:配方见附录 A,(121±2)℃、15 min 高压灭菌冷却。