

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猪链球菌通用型与猪链球菌 II 型双重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法

Development of Duplex the TaqMan Real-time PCR Assay for *Streptococcus suis*
and *S.suis* Serotype II

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国兽医药品监察所提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
征求意见稿

猪链球菌通用型与猪链球菌 II 型双重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪链球菌通用型与猪链球菌II型双重TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的试剂材料、仪器设备、样品的采集与处理、操作方法和结果判定等。

本文件适用于猪鼻/口拭子、细菌培养物、疑似猪组织病料样品（关节液、扁桃体、肺脏等）及养殖场环境中猪链球菌通用型和猪链球菌II型的核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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
- GB 19489 实验室生物安全通用要求
- NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

Ct值: 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数 (cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核苷酸 (deoxyribonucleic acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

VIC: 荧光发光基团

BHQ: 无荧光淬灭基团 (black hole quencher)

5 试剂与材料

5.1 试剂

- 5.1.1 除非另有说明，所有试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求。
- 5.1.2 细菌总核酸提取试剂 TIANamp Bacteria DNA Kit 或其他等效核酸提取试剂。
- 5.1.3 Animal Detection U⁺ Probe qPCR Super PreMix 或其他等效多重荧光定量 PCR 试剂。

5.2 阳性对照

猪链球菌*gdh*基因片段、猪链球菌II型*cps2J*基因片段重组质粒、片段序列见附录A。

5.3 阴性对照

猪链球菌阴性样品、猪链球菌II型阴性样品。

5.4 引物和探针序列

引物和探针序列见附录B。

6 仪器设备

荧光定量PCR检测仪、高速冷冻离心机、振荡器、微量移液器（量程：0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL）、冰箱（2 °C~8 °C和-20 °C以下）、组织匀浆器、混匀器。

7 病料采集和处理

病料采集和处理，遵照NY/T 541《动物疫病实验室检验采样方法》有关规定进行操作。

8 细菌核酸的提取

采用商品化的鼻/口拭子、组织、血液等基因组DNA提取试剂盒，或采用自动核酸提取仪，按照相应说明书进行核酸的提取。

9 荧光定量 PCR 反应

9.1 双重荧光定量 PCR 反应体系

双重荧光定量PCR反应体系的配制见表1。

表1 双重荧光定量PCR反应体系（25 μL）

混合液组分	体积 μL	终浓度（μM）
Animal Detection U ⁺ Probe qPCR Super PreMix	12.5	1×
引物Gdh-F	0.6	0.24
引物Gdh-R	0.6	0.24
引物Cps2J-F	0.6	0.24
引物Cps2J-R	0.6	0.24
<i>S suis</i> 探针（FAM标记）	0.4	0.16
<i>S.suis</i> Serotype II探针（VIC标记）	0.4	0.16
50×ROX Reference Dye2	0.5	1×
细菌总核酸	5	
DEPC水补齐至总体积	25	

注：1.此反应体积以Animal Detection U⁺ Probe qPCR Super PreMix为例，如果使用其他等效试剂，请遵照试剂说明书配制。
2.本实验使用的是ABI 7500Fast Real-Time PCR System需使用50×ROX Reference Dye 2用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用ABI 7900HT/7300 Real-Time PCR System和StepOnePlus时使用50×ROX Reference Dye1；ABI 7500 Real-Time PCR System,Stratagene Mx3000P使用50×ROX Reference Dye2；Roche, Bio-Rad的Real Time PCR仪不必使用ROX。3.将混合液充分混合后，最后加入模板，短暂离心，按照下列反应程序进行荧光RT-PCR反应。

9.2 荧光定量 PCR 反应程序

荧光定量PCR反应程序见表2

表 2 荧光定量PCR反应程序

37 °C	2 min	40个循环
95 °C	30 sec	
95 °C	10 sec	
60 °C	30 sec	

9.3 结果描述及判定

9.3.1 质控标准

当所有阳性对照（FAM和VIC）均有典型的S型扩增曲线，阴性对照（FAM和VIC）均无扩增曲线且Ct ≥40或者无值时，试验成立；否则试验无效

9.3.2 结果判断和鉴别

若仅FAM检测通道出现典型的S型扩增曲线，且Ct值≤35；而VIC检测通道Ct值>35或无Ct值，无典型的S型扩增曲线，表示样品中存在猪链球菌核酸，但不含有猪链球菌II型核酸。

若仅FAM检测通道出现典型的S型扩增曲线，且Ct值≤35；而VIC检测通道出现典型的S型扩增曲线，且Ct值≤35，表示样品中存在猪链球菌II型核酸，但不含有猪链球菌核酸。

Ct值>35，且出现典型的S型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判相应检测通道的细菌核酸为阳性，否则判为阴性。

两个检测通道Ct值>35或无Ct值，无典型的S型扩增曲线，表示样品中无猪链球菌和猪链球菌II型核酸。

上述结果描述及判定可参见表3。

表3 结果描述与判定

FAM检测通道	VIC检测通道	结果描述判定
阳性	阴性	存在猪链球菌核酸
阳性	阳性	存在猪链球菌II型核酸
阴性	阴性	无猪链球菌和II型核酸

10 生物安全要求

样品处理和核酸提取以及废弃物处理按照GB 19489《实验室生物安全通用要求》规定，在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。

附录 A
(资料性)

病原基因参考序列

A.1 猪链球菌*gdh*基因片段参考序列

atgtcaaatg ccaaagctta catccaagct tctttgaag cagtcaaagc ccgcaacca catgaaacag aattcctcca agctgtagaa gagctctct
ctacacttga gctgtttt gaagcacacc cagaatacat cgaagaaaac atcttggctc gtatcgttga gctgagcgt atcatcagct tccgtgttc
atggacagat aaagatggaa atgtcaagt caaccgtggc taccgtgttc agtcaactc agctgtaggt ccttataag gcggtcttcg ctccacca
actgtaaacc aatccatctt gaagttcctc ggtttgagc aaatcttcaa aaacgtcttg actggcttc caatcggcgg tggtaaaggt ggttcagact
ttgatcctaa aggaaaaact gatgctgaaa tcatgcgctt ctgcccgaagc ttcatgactg aattgcaaaa acatcgcgga ccttcacttg acgtccctgc
tggtagacac ggtgtcggtg gtcgtgagat cggttacatg tacggfcaat acaaacgcct ccgccagttt gatgcaggtg tctgactgg taaactctt
ggcttcggtg gttcattgat ccgcccagaa gcaactgggt acggtttggt ttacttact gataacatgt tggcagcaaa cggtaaatcc tcaagacc
aaactgtctt tatctcaggt tctgtaacg ttgcccata tgetgttcaa aaagcgactg aacttgggtc aaaagtatt tctgtttcag actcaaatgg
ttacatcatt gacgaaactg gtatcgactt cgacctcttg gtggacatca aagaaaaacg ccgcgctcgt ttgacagaat acgtgcaga aaaatcaact
gctaagtact tcaaggttc tctatggaac tacgatggca aggctgatat tggccttcca tgtgcgactc aaaatgagat caacggcaaa caagctgctg
cccttgtaaa aatggcgtg tactgtgtgg ctgaaggtgc caacatgcca tctgacctg atgcatcaa agcttacaag gaaaatggcg ttctctacgg
actcgcaaaa gctgccaacg ctggtgtgt agctgtatct gcccttgaaa tgagtcaaaa cagccttcgc ttgcatgga ctcgtgaaga agtagacggc
cgtcttaaag acatcatggc caacatctc aacacagcca aagaaactgc tgaaaaatac gaccttggta cagactacct tgcaggtgct aacatgcag
ccttgaaca aattgcggat agcatgattg cccaagggtt ggtataa

A.2 猪链球菌II型*cps2J*基因片段参考序列

atggaaaaag tcagcattat tctacattt ttaatacgg aaaagtactt aagagagtgt ttgatagca ttatttcca atcgtatact aatctagaga
ttctttgat agatgacggt tctcagatt catcaacgga tatatgttg gaatacgcag agcaagatgg tagaataaaa ctttccggt taccaaatgg
tgggtttca aacgcaagga atfacggtat caaaaatagc acagcaaat atattatgt tctagattct gatgatattg ttgacggcaa cattgttgag
tccttataca ccgtttaa agagaatgat agtgattgt cgggaggggt acttctact ttgatggaa attatcaaga atctgagctg caaaagtgc
aaattgattt ggaagagata aaagaggtgc gagacttagg aatgaaaaat ttccaaatc attatagag cggatcttt aatagccctt gttgcaact
ttataagaat atatatata acaaggttt tgacactgaa cagtggtag gagaggactt attatfaat ctaaattatt taaagaatat aaaaaagtc
agctatgtaa acagaaatct ttatttctt agaagaggta tacaagtac tacaatacgc tttaaaaaag atgttttat tcaattagaa aattagaag
aaaaaactt tgattgitt gtaaaaat ttggtggaca atatgaattt tctgtttta aagagacgct acagtggcat attattatt atagcttatt aatgtcaaa
aatggagatg aatcgttcc aaagaattg catatattta agtattata caatagcat tcttagata ctctaagtat taaacgaacg tcctctgttt
ttaaagaat atgtaaatta attgttctta ataattgtt taaaatttt taaatactt taattagga agaaaaaat aatgattaa

附录 B
(资料性)

引物和探针序列

引物和探针序列见表B.1

表B.1 引物和探针序列

病原	靶基因	引物和探针	序列
猪链球菌	<i>gdh</i>	Gdh-F	5' GATGGATTGGTTTACAGTTG 3'
		Gdh-R	5' TGGACAGATAAAGATGGAAA 3'
猪链球菌 II型	<i>cps2J</i>	Gdh-Probe	5' FAM- AAGTCAACCGTGGCTACCGT-BHQ1 3'
		<i>cps2J</i> -F	5' CGGAAAAGTTTTATTCTACC 3'
		<i>cps2J</i> -R	5' TCCCAATCGTATACTAATCTA 3'
		<i>cps2J</i> -Probe	5' VIC- ACGTTCTTCAGATTCATCAACGGATA -BHQ2 3'

中国兽医协会
征求意见稿