

团 体 标 准

T/CVMA 159—2024

猪链球菌通用型与 2 型双重 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测方法

Detection method of duplex the *TaqMan* real-time PCR assay for
Streptococcus suis General and Serotype 2

2024-5-8 发布

2024-5-8 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CLVMA

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：中国兽医药品监察所、华中农业大学。

本文件起草人：辛凌翔、朱良全、王豪杰、刘燕、李建、姚文生、李锦铨、王秀丽、刘元杰、胡云皓、王琦。

中国兽医协会
CLVMA

猪链球菌通用型与 2 型双重 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪链球菌通用型与2型双重*TaqMan*实时荧光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。

本文件适用于检测猪链球菌通用型和2型的核酸。

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 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 实时荧光PCR：实时荧光聚合酶链式反应（Real-time 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（Violet Invader）
- BHQ：无荧光淬灭基团（Black hole quencher）
- DEPC：焦碳酸二乙酯（Diethyl pyrocarbonate）
- ddH₂O：双蒸水（Distillation-Distillation H₂O）
- gdh*：谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase）
- cps2J*：荚膜多糖（capsular polysaccharide 2J）
- CVCC：中国兽医微生物菌种保藏中心（China Veterinary Culture Collection Center）

5 试剂和耗材

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或其他等效核酸提取试剂。
- 5.1.3 消化液 I 按照附录 C1 配制。
- 5.1.4 消化液 II 按照附录 C.2 配制。
- 5.1.5 酚/氯仿/异戊醇混合液按照附录 C.3 配制。
- 5.1.6 TE Buffer (pH 8.0) 按照附录 C.4 配制。
- 5.1.7 PBS 缓冲液按照附录 C.5 配制。
- 5.1.8 异丙醇和 75%乙醇。
- 5.1.9 PCR 试剂及 DNA 凝胶回收试剂盒。
- 5.1.10 多重荧光定量 PCR 试剂。

5.2 阳性对照

含有猪链球菌通用型*gdh*基因片段（参考序列见附录A.1）、猪链球菌2型*cps2J*基因片段（参考序列见附录A.2）的重组质粒按照附录A.3制备。

5.3 阴性对照

灭菌生理盐水，按照附录A.4制备。

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、紫外分光光度计、微量移液器（量程：10 μL、20 μL、200 μL和1 000 μL）、冰箱（2 °C~8 °C和-20 °C以下）、组织匀浆器、混匀器。

7 样品的采集和处理

样品采集和处理应符合NY/T 541-2016的要求。所采集的样品包括猪鼻/口拭子、疑似阳性猪组织病料样品（唾液、关节液、扁桃体、肺脏等）及环境样品。

8 细菌核酸的提取

8.1 血液样品 DNA 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。

8.2 猪鼻/口拭子、唾液、关节液及环境样品 DNA 提取

在0.5 mL~1 mL PBS中反复搅拌，使样品充分混匀，12000 r/min离心5 min，沉淀用50 μ L无菌ddH₂O重悬，水浴锅沸水中煮10 min，冰浴5 min，12000 r/min离心1 min，取上清作为PCR扩增模板。

8.3 临床组织样品（扁桃体、肺脏等）DNA 提取

8.3.1 用无菌剪刀和镊子剪取典型病变组织 0.5 g~1.0 g，加入 0.5 mL~1 mL PBS，于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨，将组织悬液转入无菌离心管中备用。

8.3.2 分别取上述处理后样品 100 μ L，加入 1.5 mL 无菌离心管，每管中加 500 μ L 消化液 I 和 10 μ L 消化液 II，反复吹吸混匀，置 55 $^{\circ}$ C，水浴 30 min~60 min。

8.3.3 分别加入 500 μ L 酚/氯仿/异戊醇混合液（配制见 C.3），混匀，在 4 $^{\circ}$ C 下 12000 r/min 离心 10 min，将上清液转至新的 1.5 mL 无菌离心管中。

8.3.4 加等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇，混匀，室温静置 15 min，4 $^{\circ}$ C 下 12000 r/min 离心 15 min，倒去上清液，倒置吸水纸上，吸干液体。

8.3.5 加入 700 μ L 75% 乙醇，混匀；4 $^{\circ}$ C 下 12000 r/min 离心 30 s，倒去上清液，将管壁上的残余液体离心，用微量加样器尽量将其吸干，不要碰触沉淀，置室温干燥 10 min。

8.3.6 加 10 μ L ddH₂O，轻轻混匀，溶解 DNA，置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

9 双重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应

9.1 反应体系

双重TaqMan实时荧光定量PCR反应体系见D.1。

9.2 反应程序

双重TaqMan实时荧光定量PCR反应程序见D.2。

9.3 结果判定

9.3.1 质控标准

当所有阳性对照的FAM和VIC检测通道均有典型的S型扩增曲线，阴性对照的FAM和VIC检测通道均无扩增曲线且Ct \geq 40或者无值时，试验成立；否则试验无效。

9.3.2 结果判定

- 9.3.2.1 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，表示样品中含有猪链球菌通用型核酸，但不含有猪链球菌 2 型核酸。
- 9.3.2.2 若 FAM 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 ；VIC 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 ，表示样品中含有猪链球菌 2 型核酸。
- 9.3.2.3 $35 < \text{Ct 值} < 40$ ，判定可疑，建议倍量复检，若复检 Ct 值 < 35 ，则判定阳性，否则为阴性。
- 9.3.2.4 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通用型和猪链球菌 2 型核酸。

上述结果描述及判定可参见D.3。

附录 A

(资料性)

阳性对照和阴性对照的制备

A.1 猪链球菌*gdh*基因片段参考序列 (GenBank Accession No.AM946016.1)

5'-ATCAAATGCCAAAGCTTACATCCAAGCTTCTTTTGAAGCAGTCAAAGCCCGCAACCCAC
 ATGAAACAGAATTCTTCCAAGCTGTAGAAGAGCTCTTCTCTACACTTGAGCCTGTTTTTGAAGCA
 CACCCAGAATACATCGAAGAAAACATCTTGGCTCGTATCGTTGAGCCTGAGCGTATCATCAGCTT
CCGTGTTCCA**TGGACAGATAAAGATGGAAATGTTCAAGTCAACCGTGGCTACCGTGTTCAGTT**
CAACTCAGCTGTAGGTCCTTATAAAGGCGGTCTTCGCTTCCACCCA**ACTGTAAACCAATCCATC**
 TTGAAGTTCTCGGTTTTGAGCAAATCTTCAAAAACGTCTTGACTGGTCTTCCAATCGGCGGTGGT
 AAAGGTGGTTCAGACTTTGATCCTAAAGGAAAAACTGATGCTGAAATCATGCGCTTCTGCCAAAG
 CTTTCATGACTGAATTGCAAAAACACATCGGACCTTCACTTGACGTCCTGCTGGTGACATCGGTG
 TCGGTGGTTCGTGAGATCGGTTACATGTACGGTCAATACAAACGCCTCCGCCAGTTTGATGCAGGT
 GTCTTGACTGGTAAACCTCTTGGCTTCGGTGGTTCATTGATCCGCCCAGAAGCAACTGGTTACGG
 TTTGGTTTACTTCACTGATAACATGTTGGCAGCAAACGGTAAATCCTTCAAAGACCAAACCTGTCC
 TTATCTCAGGTTCTGGTAAACGTTGCCAATATGCTGTTCAAAAAGCGACTGAACTTGGTGCAAAA
 GTTATTTCTGTTTCAGACTCAAATGGTTACATCATTGACGAAACTGGTATCGACTTCGACCTCTTG
 GTGGACATCAAAGAAAAACGCCGCGCTCGTTTGACAGAATACGCTGCAGAAAAATCAACTGCTA
 AGTACTTCAAAGGTTCTGTATGGAACACTACGATGGCAAGGCTGATATTGCCCTTCCATGTGCGACT
 CAAAATGAGATCAACGGCAAACAAGCTGCTGCCCTTGTAATAAATGGCGTGTACTGTGTGGCTG
 AAGGTGCCAACATGCCATCTGACCTTGATGCCATCAAAGTCTACAAGGAAAATGGCGTTCTCTAC
 GGACTCGCAAAAGCTGCCAACGCTGGTGGTGTAGCTGTATCTGCCCTTGAAATGAGTCAAAAACA
 GCCTTCGCTTGTTCATGGACTCGTGAAGAAGTAGACGGCCGTCTTAAAGACATCATGGCCAACATC
 TTCAACACAGCCAAAGAACTGCTGAAAAATACGACCTTGGTACAGACTACCTTGCAGGTGCTA
 ACATCGCAGCCTTTGAACAAATTGCGGATAGCATGATTGCCCAAGGTTTGGTATAA-3'

注：下划线部分为连入pMD-18T载体中的包含猪链球菌*gdh*目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

A.2 猪链球菌 2 型*cps2J*基因片段参考序列 (GenBank Accession No.FM252032.1)

5' -ATGGAAAAAGTCAGCATTATTGTACCTATTTTTAATACGGAAAAGTACTTAAGAGAGTGT
 TTAGATAGCATTATT**TCCCAATCGTATACTAATCTAGAGATTCTTTTGATAGATGACGGTTCTT**
CAGATTCATCAACGGATATATGTTTGGAAATACGCAGAGCAAGATGGTAGAATAAACTTTTCC
GGTTACCAAATGGTGGTGTTC**CAAACGCAAGGAATTACGGTATCAAAAATAGCACAGCAAATTA**
 TATTATGTTTGTAGATTCTGATGATATTGTTGACGGCAACATTGTTGAGTCCTTATACACCTGTTT
 AAAAGAGAATGATAGTGAATTTGTCGGGAGGGTACTTGCTACTTTTGATGGAAATTATCAAGAAT
 CTGAGCTGCAAAAGTGTCAAATTGATTTGGAAGAGATAAAAGAGGTGCGAGACTTAGGAAATGA
 AAATTTTCAAATCATTATATGAGCGGTATCTTTAATAGCCCTTGTTGCAAACCTTTATAAGAATAT
 ATATATAAACAAAGGTTTTGACACTGAACAGTGGTTAGGAGAGGACTTATTATTTAATCTAAATT
 ATTTAAAGAATATAAAAAAAGTCAGCTATGTAACAGAAATCTTTATTTTGCTAGAAGAGGTATA
 CAAAGTACTACAAATACGTTTTAAAAAAGATGTTTTTATTCAATTAGAAAATTTAGAAGAAAAAC

TTTTGATTTGTTTGTAAAATATTTGGTGGACAATATGAATTTTCTGTTTTTAAAGAGACGCTACA
GTGGCATATTATTATTATAGCTTATTAATGTTCAAAAATGGAGATGAATCGCTTCCAAAGAAAT
TGCATATATTTAAGTATTTATACAATAGGCATTCTTTAGATACTCTAAGTATTAACGAACGTCCT
CTGTTTTTAAAGAATATGTAAATTAATTGTTGCTAATAATTTGTTTAAAATTTTTTAAATACTTT
AATTAGGGAAGAAAAATAATGATTAA-3'

注：下划线部分为连入pMD-18T载体中的包含猪链球菌cps2J目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

A.3 阳性对照的制备

以猪链球菌 1 型 (CVCC608) 和猪链球菌 2 型 (CVCC3308) 基因组 DNA 为模板，利用设计的 2 对特异性引物分别进行单一 PCR 扩增，PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物，连接至 pMD18-T 载体构建重组质粒 pMD-SS、pMD-SS2，经菌液 PCR 鉴定、测序加以验证。利用紫外分光光度计检测 2 种阳性质粒浓度，并按下面公式将浓度换算成拷贝数，DNA 拷贝数/ μL = $[6.02 \times 10^{23} \times \text{DNA 浓度 (ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}] / (\text{DNA 碱基数} \times 660)$ ，经计算并将重组质粒标准品的拷贝数调为 1.0×10^{10} 拷贝/ μL 。即得到猪链球菌和猪链球菌 2 型阳性对照所需的重组质粒标准品母液。将母液 10 倍系列稀释之后，可作为猪链球菌通用型和猪链球菌 2 型双重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的阳性对照使用。

用 500 μl TE Buffer (pH 8.0) 对 pMD-SS、pMD-SS2 质粒进行溶解和 10 倍梯度稀释，按本标准建立的方法测定 FAM 通道和 VIC 通道 Ct 值。选择 FAM 通道和 VIC 通道 Ct 值在 23~28 之间的稀释倍数作为阳性对照。

A.4 阴性对照的制备

灭菌生理盐水：称取 0.9 g 氯化钠，溶解在少量蒸馏水后，定容到 100 mL，高压灭菌后作为阴性对照。

附录 B
(规范性)
引物和探针序列

引物、探针的名称与序列见表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' -TGGACAGATAAAGATGGAAA-3'
		Gdh-R	5' -GATGGATTGGTTTACAGTTG-3'
		Gdh-Probe	5' -FAM- AAGTCAACCGTGGCTACCGT-BHQ1-3'
猪链球菌2型	<i>cps2J</i>	cps2J-F	5' -TCCCAATCGTATACTAATCTA- 3'
		cps2J-R	5' -CGGAAAAGTTTTATTCTACC- 3'
		cps2J-Probe	5'- VIC- ACGGTTCTTCAGATTCATCAACGGATA -BHQ2-3'

附录 C

(资料性)

细菌核酸提取相关试剂的配制

C.1 消化液I

Tris-HCl (pH值8.0) 终浓度为10 mmol/L; EDTA (pH值8.0) 终浓度为250 mmol/L; SDS终浓度为200 ug/mL; NaCl终浓度为100 mmol/L。

C.2 消化液II

将100 mg蛋白酶K溶解于5 mL灭菌ddH₂O中。

C.3 酚/氯仿/异戊醇混合液

将Tris饱和酚-氯仿-异戊醇按25:24:1的比例混合, 4℃避光保存。

C.4 TE Buffer (pH 8.0)

量取下列溶液于 500 ml烧杯中, 1M Tris-HCl Buffer PH=8.0 5 ml, 0.5M EDTA PH=8.0 1 ml, 向烧杯中加入约 400 ml ddH₂O均匀混合; 将溶液定容到 500 ml后; 室温保存。

C.5 PBS缓冲液

称取8.0g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄溶于800mL蒸馏水中, 用HCl调节溶液至7.4, 最后加蒸馏水定容至1L。

附录 D

(资料性)

双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应

D.1 双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应体系

双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应体系见表 D.1。

表D.1 双重TaqMan实时荧光PCR反应体系 (25 μL)

混合液组分	体积 (μL)	终浓度 (μM)
2×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
S suis 探针 (FAM 标记)	0.4	0.16
S.suis Serotype 2 探针 (VIC 标记)	0.4	0.16
50×ROX Reference Dye2	0.5	1×
细菌总核酸	5.0	
ddH ₂ O 补齐至总体积	25.0	

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。

D.2 双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应程序

双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应程序见表 D.2。

表D.2 双重TaqMan实时荧光PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
37 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	1
95 °C	10 sec	40
60 °C	30 sec	

D.3 结果判定

双重 TaqMan 实时荧光 PCR 反应结果描述与判定见表 D.3。

表D.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	含有猪链球菌通用型核酸
阳性	阳性	含有猪链球菌 2 型核酸
阴性	阴性	无猪链球菌通用型和 2 型核酸