



中华人民共和国国家标准

GB/T 35904—2018

旋毛虫实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of *Trichinella spiralis*

2018-02-06 发布

2018-09-01 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: 0100191211052076 防伪编号: 2019-1211-0426-1552-3977 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:东北农业大学、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:宋铭忻、张子群、李雅丽、韩彩霞、王海燕、李巍、李晓云、路义鑫。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052076 防伪编号: 2019-1211-0426-1552-3977 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

旋毛虫实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了旋毛虫实时荧光 PCR 检测的操作方法。
本标准适用于家猪、野猪和犬等动物的旋毛虫核酸检测。

2 规范应引用文件

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

3 仪器

- 3.1 荧光 PCR 仪。
- 3.2 高速冷冻离心机。
- 3.3 生物安全柜。
- 3.4 高压灭菌锅。
- 3.5 天平:精密度达 0.01 g 以上。
- 3.6 组织匀浆机。
- 3.7 冰箱。
- 3.8 涡旋混合器。
- 3.9 研钵。
- 3.10 无菌离心管。
- 3.11 微量移液器。

4 试剂

- 4.1 10×PCR Buffer 缓冲液(无 Mg^{2+})、rTaq 酶、dNTP、 Mg^{2+} 等,所有试剂均为生物试剂公司生产。
- 4.2 本方法试验用水符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5 对照样品

5.1 阳性对照样品

含有 5 条/g 以上的国际标准种 *Trichinella spiralis* (T1)或 *Trichinella nativa* (T2)旋毛虫的大鼠肉样。

5.2 阴性对照样品

经检测不含有旋毛虫的大鼠肉样。

6 操作区域

样品处理区要有相应的生物安全设施；配液区要求高度清洁；样品处理、加样和检测区应在不同区域进行，不同区域配备不同的加样工具和用具。

7 样品采集和处理

7.1 采样部位

7.1.1 家猪

横膈膜肌脚部、肋间肌、腰肌、咬肌、舌肌。

7.1.2 野猪

前肢肌、膈肌。

7.1.3 犬

咬肌、舌肌、腓肠肌。

7.2 样品采集

根据不同种类动物胴体的具体情况，从采样部位各采样一块，记为一份肉样，总质量不少于 50 g~100 g，与胴体编成相同号码。

7.3 样品处理

在样品处理区内进行，将肉样去除脂肪、肌膜或腱膜，用剪刀顺肌纤维方向，按随机采样的要求，自肉上剪取约 0.5 g 肉样 10 粒，合并成一个小样，并编号。将小样放入组织匀浆机内以 3 000 r/min，捣碎 45 s~60 s，使其彻底匀浆，然后放入含有液氮的研钵中充分研磨，继续进行核酸提取，或置 -20 ℃ 贮存备用。

8 荧光 PCR 操作程序

8.1 DNA 提取

可使用经验证的商品化组织 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

8.2 荧光 PCR 检测

8.2.1 引物和探针

旋毛虫实时荧光 PCR 试剂：采用无 DNA 酶、无 RNA 酶的水将每条引物和探针配成 100 μmol/L 储存液，置 -20 ℃ 或更低温度冻存；使用时取适量配置成 10 μmol/L 工作液，避免多次冻融。

上游引物：5'-TGCACTCTTAAAGAGAATCCAACCT-3'；下游引物：5'-CAAGTTTCGTCTGT-TCGACGATA-3'；TaqMan MGB 探针：5'-FAM-TTGCACGTTTAAA3'-NFQ-MGB。

8.2.2 荧光 PCR 反应体系

25 μL 荧光 PCR 反应体系包括：

10×PCR 反应缓冲液	2.5 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	1.5 μL
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	2.4 μL
上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
下游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
探针(10 μmol/L)	0.3 μL
rTaq 酶(5 U/μL)	0.3 μL
DNA 模板	5.0 μL
PCR 用水	12.0 μL

每次试验应设标准阳性、阴性和空白对照。标准阳性用阳性对照 DNA 做模板,标准阴性用阴性对照 DNA 做模板,空白对照用 PCR 用水做模板。

8.2.3 上机检测

8.2.3.1 荧光通道设置

荧光素设定:报告荧光(report dye)设定为 FAM,淬灭荧光(quench dye)设定为 None,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

8.2.3.2 循环条件设置与检测

第一阶段,预变性 95 °C/2 min;

第二阶段,变性 95 °C/10 s,退火、延伸、荧光采集 60 °C/30 s,共 40 个循环。

检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

9 结果判定

9.1 质量控制


读取每个样品 C_t 值。标准阳性对照有特异性扩增曲线而且 C_t 值 \leq 30,标准阴性对照和空白对照无特异性扩增曲线,说明质控合格。以上要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

9.2 结果描述及判定

9.2.1 被检样品有特异性扩增曲线,而且 C_t 值 \leq 30,判定为旋毛虫核酸阳性。

9.2.2 被检样品无特异性扩增曲线,判定为旋毛虫核酸阴性。

9.2.3 被检样品 C_t 值在 30~40 之间,而且出现特异性扩增曲线需要重复取样检测,如重复检测的试验结果 C_t 值 $<$ 40,而且出现特异性扩增曲线,判定为旋毛虫核酸阳性;否则,判定为旋毛虫核酸阴性。

 **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 35904-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052076
防伪号: 2019-1211-0426-1552-3977
时 间: 2019-12-11
定 价: 19元



GB/T 35904-2018

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
旋毛虫实时荧光 PCR 检测方法
GB/T 35904—2018

*

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

2018年2月第一版

*

书号: 155066·1-59461

版权专有 侵权必究