

阴性对照采用非目标菌的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

阳性对照采用目标菌标准株的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

9.3.4 荧光 PCR 反应体系

反应体系体积为 25 μL :10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、探针(3 $\mu\text{mol/L}$)1 μL 、dNTP(2.5 mmol/L)2 μL 、UNG 酶(1 U/ μL)0.06 μL 、Taq 酶(5 U/ μL)0.5 μL 、模板 DNA 2 μL 、灭菌去离子水补足 25 μL 。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整,每个反应体系应设置两个平行反应。

9.3.5 荧光 PCR 反应参数

荧光 PCR 反应参数:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s 同时收集 FAM 荧光,进行 40 个循环。

注:PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

9.3.6 结果判定

9.3.6.1 质控标准

阴性对照:无扩增曲线,Ct \geq 40.0;阳性对照:出现典型的扩增曲线,Ct 值应 $<$ 30.0;否则,检测视为无效。

9.3.6.2 结果判定

Ct 值 \geq 40.0,可判定样品结果为阴性;Ct 值 \leq 35.0,可判定样品结果为荧光 PCR 结果阳性,需结合第 8 章的结果,作综合判定:Ct 值 $>$ 35.0 而 $<$ 40.0,建议重做。再次扩增后的 Ct 值仍小于 40,且曲线有明显的对数增长期,并且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定为阳性;再次扩增后 Ct 值大于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,可判定为阴性。

10 结果报告

10.1 若可疑菌落不符合第 8 章的要求,普通 PCR 结果阴性或者实时荧光 PCR 结果阴性则报告为“未检出枯草芽孢杆菌/25 g”;

10.2 若可疑菌落符合第 8 章的要求,普通 PCR 结果阳性或者实时荧光 PCR 结果阳性则报告“检出枯草芽孢杆菌/25 g”。

11 检测过程中防止交叉污染的措施

11.1 检测过程中的废弃物需经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。

11.2 检测过程中防止交叉污染的措施按照 WS/T 230 中有关的污染的预防和控制执行。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
枯草芽孢杆菌检测鉴定方法
SN/T 2728—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

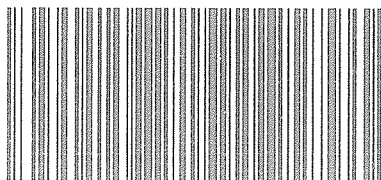
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2011年4月第一版 2011年4月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-21678 定价 16.00 元



SN/T 2728-2010