



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2728—2010

枯苜蓿杆菌检测鉴定方法

www.kinghunt.cn
凯恒生物

www.kinghunt.cn
凯恒生物

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

枯草芽孢杆菌检测鉴定方法

1 范围

本标准规定了枯草芽孢杆菌的形态学鉴定、生化鉴定以及 PCR、荧光 PCR 检测鉴定方法。
本标准适用于枯草芽孢杆菌检测鉴定。

2 规范性引用文件

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,仅注日期的版本使用于本文件。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 19489 实验室 生物安全通用要求
WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*

6 主要仪器和设备

- 6.1 天平:精度为 0.1 g。
- 6.2 恒温培养箱: $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.3 恒温水浴锅。
- 6.4 离心机:转数 12 000 r/min 以上。
- 6.5 PCR 仪。
- 6.6 基因分析仪。

- 6.7 微量移液器和灭菌吸头:10 μL 、20 μL 、200 μL 、1 000 μL 。

7 样品制备 培养

表 1 (续)

鉴 定 项 目	枯草芽孢杆菌
木糖	+
L-阿拉伯糖	+
甘露醇	+
利用葡萄糖产气	—
利用柠檬酸盐	+
硝酸盐还原	+

下游引物:5'-AACCTCGCGGGCTTTCTCGCCAA-3'

9.2.2 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

空白对照设为PL水代替DNA模板

www.kinghunt.cn
凯恒生物

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品的 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 : $10\times\text{PCR}$ 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

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
柱苜蓿菌丝菌丝检测鉴定方法

SN/T 2728—2010

*

中国标准出版社出版