

附录 B
(规范性附录)

检测过程防止交叉污染的措施

- B.1** 采样及样品处理过程,应防止不同样品之间通过器具、手套等的交叉污染。采样及样品处理工具应经过高压灭菌或高温烘烤处理,一套工具仅限一个样品使用。存放样品的容器应清洗、高压灭菌或高温烘烤处理,或使用一次性灭菌容器。
- B.2** 实验过程,应穿工作服和戴一次性手套,勤换手套,工作服应经常清洗。
- B.3** 使用带滤芯吸嘴。吸嘴、离心管、PCR 管等应一次性使用,不得回收清洗后重复使用。
- B.4** 样品处理与 PCR 加样应在不同的区域进行,不同区域配备独立的加样工具和用具。该区域可以是独立的空间间隔、有紫外消毒设施的独立的设备如核酸提取工作站、PCR 加样工作站、可密闭进行紫外消毒的超净工作台、生物安全柜等。若在敞开的空间进行核酸提取或 PCR 加样,该空间应安装紫外灯或配备具有等同降解核酸功能的设备如移动紫外灯、带紫外消毒功能的空气消毒净化器等。上述区域在每次使用后应及时清洁处理,并在使用前后照射紫外 30 min 以上。每个区域应有专门的废弃物容器,该容器应能耐受煮沸、10%次氯酸钠溶液消毒处理。每次实验结束,应在紫外消毒前,及时清理废弃物及消毒容器,并将该废弃物容器放回工作区进行紫外消毒。
- B.5** PCR 反应试剂应按检测需求分装贮存,避免同一管试剂多次开启使用。
- B.6** 装有核酸模板、样品或试剂的离心管在打开之前,应短暂离心,避免离心管崩开,所有操作尽量避免产生气溶胶。
- B.7** 上机运行前,应检查并盖紧各 PCR 管,以防荧光物质或模板泄漏而污染机器。
- B.8** 应遵循基因检测实验室其他技术要求。



中华人民共和国国家标准

GB/T 27637—2011

副结核分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*



GB/T 27637—2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44345

定价: 16.00 元

2011-12-30 发布

2012-04-01 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

A.6 4%硫酸溶液

量取 20 mL 浓硫酸,加入 500 mL 双蒸水中,混匀。室温贮存。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
副结核分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法
GB/T 27637—2011

*

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(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2012 年 3 月第一版 2012 年 3 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44345 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 0.01 mol/L pH7.6 PBS

先配制 A 液、B 液。

A 液(0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

B 液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

称取 17 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 13 mL A 液和 87 mL B 液,混合,用蒸馏水定容至 2 L。采用(121±2)℃/0.1 MPa,15 min 高压灭菌后贮存于 4℃。

A.2 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	5.3 g
柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	15 g
葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.2 g

称取上述试剂,溶解于蒸馏水,定容至 1 L,混匀。采用 121℃±2℃/0.1 MPa,15 min 高压灭菌后贮存于 4℃。

A.3 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)

称取 186.1 g EDTA,加入 800 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器上剧烈搅拌,用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,定容至 1 L,分装,采用(121±2)℃/0.1 MPa,15 min 高压灭菌后贮存于室温。

A.4 柠檬酸钠-磷酸缓冲液

先配制 pH6.8 磷酸缓冲液。

A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液):称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)15.61 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)35.82 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

分别量取 51 mL A 液、49 mL B 液,混合即成 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液。

称取 2.84 g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加入 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液中,充分溶解。采用(121±2)℃/0.1 MPa,15 min 高压灭菌后贮存于 4℃。

A.5 4%氢氧化钠溶液

称取 8 g 氢氧化钠,加入 200 mL 双蒸水中,充分溶解。室温贮存。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、吉林农业大学、北京盈九思科技发展有限公司。

本标准主要起草人:刘中勇、陈茹、杨国海、高云航、曾碧健、朱道中、吴晓薇、高小博。