

GB/T 29585—2013

C.2.2.2 按照如下 PCR 反应程序进行扩增:94 ℃,4 min;94 ℃,40 s,58 ℃,40 s,72 ℃,90 s,40 个循环;72 ℃,5 min;4 ℃保存。以剪股颖颗粒线虫 rDNA-ITS 质粒克隆作为阳性对照,以灭菌的去离子水作空白对照。

C.3 电泳

制作 1.5% 的琼脂糖胶,取 PCR 反应产物 5 μ L,加入 1 μ L 溴酚蓝载样缓冲液(6 \times TAE 缓冲液,60%甘油,0.3%溴酚蓝;4 ℃保存),充分混匀后移入胶孔。样品的两侧分别加入 100 bp DNA ladder Marker,100 V 电压下电泳(10 V/cm)。

C.4 凝胶成像

将电泳后的凝胶小心地转移到 1 μ g/mL EB 溶液中染色 30 min,再将胶块小心地转移到凝胶成像系统中,观察是否有 500 bp 的目标片段,拍照保存。

GB/T 29585—2013

ICS 65.020.01
B 16



中华人民共和国国家标准

GB/T 29585—2013

剪股颖颗粒线虫检疫鉴定方法

Detection and identification of *Anguina agrostis* (Steinbuch) Filipjev



GB/T 29585—2013

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-47526

定价: 16.00 元

2013-07-19 发布

2013-12-06 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

附 录 C
(规范性附录)
分子生物学检测流程

C.1 DNA 提取

剪股颖颗粒线虫 DNA 的提取方法如下。也可以使用实验室成熟稳定的 DNA 提取方法或市售 DNA 提取试剂盒提取。

C.1.1 洗涤线虫

用挑针挑取活体粒线虫 (*Anguina*) 幼虫若干条,放入去离子水中洗涤 3 次,备用。

C.1.2 切割线虫

在洁净的载玻片上加 10 μL 去离子水,挑入 3~5 条经过洗涤的线虫,用解剖刀将每条线虫切成 2 段~3 段,连同 8 μL 去离子水吸入到 200 μL 的离心管中。

C.1.3 DNA 提取

在上述管中加入 1.0 μL 10 \times PCR-缓冲液、1.0 μL 蛋白酶 K(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后放冰箱中低温(-20 $^{\circ}\text{C}$)冷冻至少 30 min。将冷冻后的线虫取出,迅速放入 PCR 仪中,65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 1 h~2 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 10 min,即获得线虫的 DNA 模板。

C.2 常规 PCR 检测

C.2.1 引物

上游引物 AgrF:5'-CATTCTTACAGCCAATAGTCTG-3'。

下游引物 AgrR:5'-TGACTCTAGCGGAGTATCG-3'。

C.2.2 PCR 扩增

C.2.2.1 根据表 C.1 将线虫的 DNA 模板及相关试剂加入 200 μL 的 PCR 管中。

表 C.1 常规 PCR 反应体系(50 μL)

溶液用量	终浓度
5 μL 10 \times PCR-缓冲液	1 \times PCR-缓冲液
4 μL 25 mmol/L 氯化镁	2.0 mmol/L 氯化镁
2 μL 2.5 mmol/L dNTP's	0.1 mmol/L dNTP's
2 μL 10 pmol/ μL AgrF	0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AgrF
2 μL 10 pmol/ μL AgrR	0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AgrR
0.4 μL 5 U/ μL Taq-酶	2 U Taq-酶
8 μL DNA 模板	
去离子水 26.6 μL	

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
剪股颖颗粒线虫检疫鉴定方法

GB/T 29585—2013

*

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 \times 1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字
2013 年 9 月第一版 2013 年 9 月第一次印刷

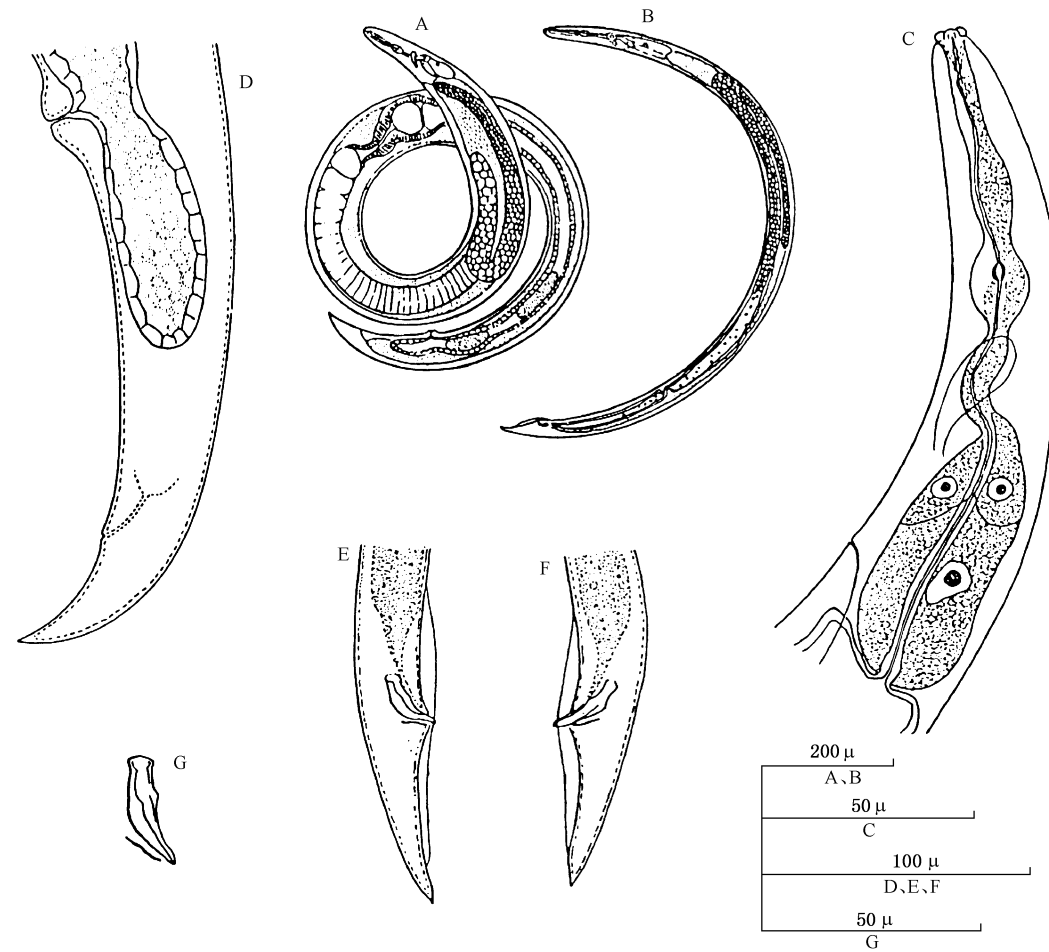
*

书号: 155066·1-47526 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 B
(资料性附录)
剪股颖颗粒线虫形态特征图

剪股颖颗粒线虫形态特征见图 B.1。



说明：
A —— 雌虫；
B —— 雄虫；
C —— 雌虫食道区；
D —— 雌虫尾；
E, F —— 雄虫尾；
G —— 交合刺和引带。

注：图 B.1 引自 T. Goodey, 1930。

图 B.1 剪股颖颗粒线虫 *Anguina agrostis*

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国青岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王金成、杨秀丽、崔铁军、张治宇、刘鹏、廖芳、张裕君、牛春敬。