

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3677—2020

家蚕微孢子虫荧光定量PCR 检测方法

Real time PCR method for detection of *Nosema bombycis*

行业标准信息服务平台

2020-08-26 发布

2021-01-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部种植业管理司提出。

本标准由全国桑蚕业标准化技术委员会(SAC/TC 437)归口。

本标准起草单位：江苏科技大学、中国农业科学院蚕业研究所、苏州大学、西南大学、农业农村部蚕桑产业产品质量监督检验测试中心(镇江)。

本标准主要起草人：吴萍、沈中元、郭锡杰、张少伦、贡成良、潘敏慧、陈涛、商琪。

行业标准信息服务平台

家蚕微孢子虫荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)的实时荧光定量 PCR 检测方法。
本标准适用于家蚕蚕卵及家蚕幼虫组织中微孢子虫的检测。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

3.1

LUS rRNA 基因 *LUS rRNA gene*

家蚕微孢子虫的大亚基核糖体 rRNA(Large subunit ribosomal, LUS)基因。

3.2

Ct 值 *cycle threshold*

每个管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.3

FTA 卡滤膜片 *Flinders technology associates card*

弗林德斯技术联合卡滤膜片,一种特制的滤纸,可结合核酸,维持样品中 DNA 的完整性。

4 原理

根据家蚕微孢子虫的 LUS rRNA 基因的保守序列设计特异性引物进行 PCR 扩增反应。利用荧光信号伴随目的 PCR 产物的增加而增强的原理,收集 PCR 扩增过程的荧光信号值,根据 Ct 值判断供试样品是否含有家蚕微孢子虫。

5 试剂与材料

除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

5.1 Tris-HCl(1 mol/L, pH 8.0):称取 12.10 g Tris 碱至烧杯中,加入 90 mL 超纯水溶解,加入适量浓 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 100 mL,高压灭菌,室温保存。

5.2 EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0):称取 18.61 g EDTA 溶于 90 mL 超纯水中,加入适量 NaOH 调节 pH 至 8.0,定容至 100 mL,高温灭菌后保存。

5.3 TE 缓冲液:分别量取 5.1 溶液 5.0 mL、5.2 溶液 1.0 mL 于烧杯中,加入 400 mL 超纯水均匀混合后,定容至 500 mL,高压灭菌,室温保存。

5.4 TE-1 缓冲液:分别量取 5.1 溶液 5.0 mL、5.2 溶液 0.1 mL 于烧杯中,加入 400 mL 超纯水均匀混合后,定容至 500 mL,高压灭菌,室温保存。

5.5 30%KOH 溶液:称取 30.00 g KOH 至烧杯中,缓慢加入超纯水搅拌溶解后,定容至 100 mL,高压灭菌,室温保存。

5.6 玻璃珠(直径 1.0 mm)。