

ICS 67.100
X 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 22287—2008

GB/T 22287—2008

贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT—PCR 方法和 实时荧光 RT—PCR 方法

Detection of hepatitis a virus in shellfish—
Contentional RT—PCR and real-time fluorescence RT—PCR

中华人民共和国
国家标准
贝类中甲型肝炎病毒检测方法
普通 RT—PCR 方法和
实时荧光 RT—PCR 方法
GB/T 22287—2008

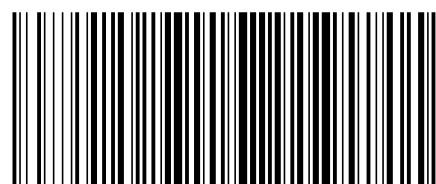
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

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
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2008 年 10 月第一版 2008 年 10 月第一次印刷

*
书号: 155066·1-34130 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)68533533



GB/T 22287—2008

2008-08-12 发布

2008-12-01 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

参 考 文 献

- [1] Costa—Mattioli, M., et al. (2002). Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT—PCR. *J. Viral Hepatitis*, 9:101-106.
- [2] Loisy, F., et al. (2005). Real-time RT—PCR for norovirus screening in shellfish. *J. Virological Methods*, 123: 1-7.
- [3] Cristina Ribao, et al. (2004). Assesment of different commercial RNA-exrraction and RT—PCR kits for detection of hepatitis A Virus in mussel tissues. *J. Virological Methods*, 115: 177-182.
- [4] Narayanan Jothikumar, et al. (2005). Rapid and sensitive detection of Noroviruses by using TaqMan-based One—Step Reverse Transcription—PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol. Apr*: 1870-1875.
- [5] Y.—S. Carol shieh, et al. (1999) A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 4709-4714.
- [6] Alissa B. Dix, Lee-ann Jaykus. (1998). Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *J. Food Protection*, 4:458-465.
-

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈广全、饶红、段洪安、冯骞、付溥博、张惠媛、汪琦、曾静、张睿、李金华。

二甲苯青 0.1 g

A.2 RNase 的去除和无 RNase 溶液的配制

配置溶液用的酒精、异丙醇、Tris、EDTA、LiCl、NaOH 等应采用未开封的新品。配制溶液所用的去离子水、玻璃容器、微量加样器吸头、药勺等塑料用具应无 RNase。操作过程中应自始至终戴一次性橡胶或乳胶手套,并经常更换,以避免将皮肤上的细菌和真菌以及人体自身分泌的 RNA 酶污染用具或带入溶液。

A.2.1 玻璃容器应在 240 °C 烘烤 4 h 以去除 RNase。

A.2.2 离心管、微量加样器吸头、药勺等塑料用具应用 0.1% 的 DEPC (焦碳酸二乙酯)水室温浸泡过夜,然后灭菌,烘干;或直接购买无 RNase 的相应规格离心管、微量加样器吸头。

A.2.3 无 RNase 去离子水

去离子水	100 mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	50 μ L

室温过夜,121 °C,15 min 灭菌,或直接购买无 RNase 去离子水。

A.2.4 75%乙醇

无水乙醇	7.5 mL
无 RNase 去离子水	2.5 mL

现用现配。

A.2.5 1×RNA 吸附缓冲液(Tris,LiCl,EDTA-Na₂·H₂O 为优级纯)

A.2.5.1 1 mol/L Tris-HCl pH7.5

Tris	1.21 g
无 RNase 去离子水	6 mL
36.5%盐酸	0.75 mL
1 mol/L 盐酸	调 pH 至 7.5

加无 RNase 去离子水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20 °C 保存。

A.2.5.2 0.5 mol/L EDTA-Na₂(乙二胺四乙酸二钠),pH7.5

EDTA-Na ₂ ·H ₂ O	1.86 g
无 RNase 去离子水	6 mL
10 mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 7.5

加无 RNase 去离子水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20 °C 保存。

A.2.5.3 5 mol/L LiCl

LiCl	2.12 g
无 RNase 去离子水	8 mL

加无 RNase 去离子水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20 °C 保存。

A.2.5.4 1×RNA 吸附缓冲液:含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),1.0 mol/L LiCl,2 mmol/L EDTA-Na₂,pH 7.5

1 mol/L Tris-HCl	200 μ L
5 mol/L LiCl	2 000 μ L
0.5 mol/L EDTA-Na ₂ (pH 7.5)	40 μ L
无 RNase 去离子水	7 760 μ L
总体积	10 mL

现配现用。

A.2.6 2×RNA 吸附缓冲液(Tris,LiCl,EDTA-Na₂·H₂O 为优级纯):含 40 mmol/L Tris-HCl

贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT—PCR 方法和 实时荧光 RT—PCR 方法

1 范围

本标准规定了贝类中甲型肝炎病毒的普通 RT—PCR 和荧光 RT—PCR 检测方法。

本标准适用于贝类中甲型肝炎病毒核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB 19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 1193 基因分析检测实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

DNA 模板先经高温变性为单链,在适宜的温度下和缓冲液中,两条引物分别与模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火,接着在 DNA 聚合酶的催化下以四种 dNTP 为底物,使退火引物得以延伸,如此反复变性、退火和延伸,使位于两段引物序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增。

3.2

反转录-聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT—PCR

RNA 在逆转录酶的作用下,适宜反应条件下,被逆转录成 cDNA,以 cDNA 作为模板进行 PCR。

3.3

实时荧光 RT—PCR real-time fluorescence RT—PCR

实时荧光 RT—PCR 方法是在常规 RT—PCR 的基础上,加入一条特异性的荧光探针。该探针为一段寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可以接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.4

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。