

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 27639—2011

GB/T 27639—2011

结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of tuberculosis pathogenic organisms

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法
GB/T 27639—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 1 字数 18 千字
2012 年 3 月第一版 2012 年 3 月第一次印刷

*
书号: 155066·1-44343 定价 18.00 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



GB/T 27639-2011

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

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、华中农业大学、中国检验检疫科学研究院、北京盈九思科技发展有限公司。

本标准主要起草人:陈茹、刘中勇、杨国海、郭爱珍、曾碧健、韩雪清、高小博、林祥梅、吴晓薇。

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。

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。

结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于快速检测细菌培养物、血样、奶样、痰液、组织器官、粪便等临床样品中结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值:荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸。

DMSO:dimethyl sulfoxide,二甲基亚砷。

EDTA:ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸。

PBS:phosphate buffer solution,磷酸盐缓冲液。

PCR:polymerase chain reaction,聚合酶链式反应。

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶。

UDG 酶:uracil DNA glycosylase,尿嘧啶 DNA 糖基化酶。

4 原理

本标准方法采用了 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术原理。反应体系中包括一对用于扩增 DNA 的引物,和一条能与 PCR 产物特异杂交的荧光标记探针。探针的 5'端标记了被称为报告基团的荧光素,3'端标记了淬灭基团。在进行 PCR 延伸反应时,Taq 酶的 5'外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来,使其与淬灭基团分离,从而仪器能检测到 5'端荧光基团所发出的荧光信号,一分子 PCR 扩增产物的生成伴随一分子荧光信号的产生。随着扩增循环次数的增加,仪器检测到的荧光信号的累积反应了扩增产物量的变化。

本标准提供特异检测结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌和牛分枝杆菌共四套实时荧光 PCR 检测方法(见表 1)。其中,结核分枝杆菌复合群特异的实时荧光 PCR 方法分别以 IS6110、IS1081 插入基因序列为模板设计特异扩增引物与探针;结核分枝杆菌、牛分枝杆菌特异的实时荧光 PCR 方法分别以菌种特异的基因组序列为模板设计特异扩增引物与探针。