

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1521—2005

SN/T 1521—2005

输入性蚊类虫媒病毒检测规程

Detecting codes for imported ceratopogonidae arbovirus

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
输入性蚊类虫媒病毒检测规程
SN/T 1521—2005

*

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.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 23 千字

2005年5月第一版 2005年5月第一次印刷

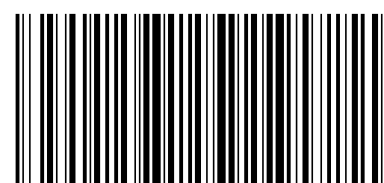
*

书号:155066·2-16224 定价 12.00 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



SN/T 1521—2005

2005-02-17 发布

2005-07-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 为资料性附录。
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：中华人民共和国河北出入境检验检疫局。
本标准主要起草人：王海军、高洪喜、李俊成、李德新、聂维忠。
本标准为首次发布的出入境检验检疫行业标准。

D.3 操作步骤

D.3.1 总 RNA 提取 (TRIZOL 法)

D.3.1.1 取 100 μL 冻存病毒抗原于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。

D.3.1.2 加 0.7 mL Trizol 液,轻轻震荡混匀。室温静止 15 min。

D.3.1.3 加入 0.2 mL 三氯甲烷,室温静止 10 min。 4°C 10 000 r/min 离心 15 min。

D.3.1.4 弃取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min。 4°C 10 000 r/min 离心 10 min。

D.3.1.5 弃取上清,加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤液, 4°C 7 500 r/min 离心 5 min,弃取上清,室温干燥。

D.3.2 制备病毒 cDNA

D.3.2.1 取病毒 RNA 5 μL 加入 Eppendorf 管中,加 4 μL oligo dT_{12~18},分成两个管(10 $\mu\text{mol/L}$)充分混匀, 70°C 变性 5 min 后水浴 5 min。

D.3.2.2 加入下列各组分:5 \times 缓冲液 4 μL ,氯化镁(25 mmol/L)2 μL ,DTT(0.1 mol/L)1 μL ,dNTP(10 mmol/L)1 μL ,反转录酶(SuperScript II RT)1 μL ,RNA 酶抑制剂(RNAase H)1 μL ,充分混匀于 42°C 反应 45 min(具体方法可按照试剂盒操作)。

D.3.3 PCR 扩增

D.3.3.1 取 cDNA 1 μL 作为模板于 200 μL PCR 反应管中。

D.3.3.2 依次加入下列各组分;dNTP(2.5 mmol/L)2 μL ,10 \times 缓冲液 2 μL ,上游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)2 μL ,下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)2 μL ,EX-Taq 酶 1 μL ,去离子水 17 μL 混匀后进行 PCR 扩增。

D.3.4 扩增产物回收分析

D.3.4.1 制备 1% 琼脂糖电泳胶。

D.3.4.2 取 3 μL PCR 产物,在 100 V 电压条件下电泳,紫外灯下检查条带,切下目的条带置于 Eppendorf 管中。

D.3.4.3 加入 200 μL 胶溶剂(Gel solubilizer), 65°C 水浴 5 min 至胶融化。

D.3.4.4 加入 Sephaglas BP5 μL ,轻混,置室温 5 min,离心 30 s,弃上清液,再离心 30 s,弃上清液。

D.3.4.5 用 80 μL 洗液(Wash Buffer)洗 3 次,弃上清后干燥至少 10 min。

D.3.4.6 加入 36 μL Elution Buffer,置室温 5 min,离心 1 min,取上清至另一洁净的 Eppendorf 管。

D.3.4.7 取 PCR 纯化产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将纯化产物于 -20°C 冰箱保存。

D.3.5 PCR 产物的连接与转化

D.3.5.1 感受态宿主菌的制备

a) 挑取单个 DH5 α 菌落,接种于 LB 培养基(不含氨苄青霉素)中, 37°C 活化过夜。

b) 取上述菌液按 1:100 接种于 50 mL LB 中, 37°C 震荡培养 2 h。

c) 菌液 OD 值=0.5 时, 4°C 5 000 r/min 离心 8 min。

d) 弃上清,沉淀用 0.1 mol/L 氯化钙悬浮,置水浴内 30 min,5 000 r/min 离心 8 min。

e) 弃上清,沉淀用 0.1 mol/L 氯化钙重悬,分装后置水浴备用或 -70°C 保存。

D.3.5.2 连接目的片段

可用 Promega 公司的 T 载体试剂盒。参加反应的组分和条件:2 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 5 μL ,取回收产物 3 μL ,PGEM-T 载体 1 μL ,T4 DNA 连接酶 1 μL , 4°C 连接过夜。

D.3.5.3 转化

连接产物 5 μL 加入 100 μL D.3.5.1 制备的感受态细胞内,置水浴 30 min 后, 42°C 热休克 90 s,再置水浴 2 min,加 LB 0.8 mL,置 37°C 水浴 1 h,取 200 μL 菌液加入 40 μL 20 mg/mL 5-溴-4 氯-3 吡啶-D-半乳糖苷(X-gal)和 4 μL 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG 0.1 mol/L),混匀后涂含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)平皿, 30°C 培养 12 h~16 h,挑取白色菌落。

输入性蠓类虫媒病毒检测规程

1 范围

本标准规定了输入性蠓类虫媒病毒实验室的生物安全防护、检验流程、常用病毒学检验技术和结果报告原则。

本标准适用于检验检疫行业对输入性蠓类虫媒病毒的检测,也适用于对蚊、蛉、蝉等吸血节肢动物虫媒病毒的检测。

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。

SN/T 1294 国境口岸蠓类监测规程

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

虫媒病毒 arbovirus

一些通过吸血的节肢动物叮咬敏感的脊椎动物而传播疾病的一群病毒。

3.2

输入性蠓类 imported ceratopogonidae

由交通工具、货物、集装箱、行李、邮包等携带进入我国国境的吸血蠓类。

4 实验室生物安全防护

蠓类虫媒病毒实验室应符合 WS 233 中规定的三级以上生物安全实验室的要求。

5 检测项目

包括在国际虫媒病毒中心登记的蠓类携带的可致人或人畜共患疾病的病毒种类(例如:乙型脑炎病毒、东方马脑炎病毒、裂骨热病毒、克里米亚-刚果出血热病毒等)。

6 标本的采集、运输和保存

6.1 标本采集用挥网法和灯诱法(方法见 SN/T 1294)。

6.2 入境船舶输入性蠓类在锚地采集;入境航空器、列车及其他交通工具在入境后及时采集。

6.3 采集的吸血蠓种按交通工具始发港、地,进行分类登记,分装小管、贴好标签。

6.4 采集的标本置于液氮罐中保存或运输,也可置于 -80°C 冰箱中保存。