

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1635—2005

贝类中诺沃克病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法

Detection of norovirus in shellfish—
Conventional RT-PCR and real-time RT-PCR



060608000096

2005-08-18 发布

2006-02-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

2005年8月18日

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：中华人民共和国广西出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘军义、潘良文、张舒亚、李晓虹、韦梅良、罗兆飞。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

贝类中诺沃克病毒检测方法 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诺沃克病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于贝类中诺沃克病毒的检测。

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 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

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,加入了一条特异性的荧光探针。该探针为一寡核苷酸,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。

3.2

C_t 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 方法提要

用 Tri-reagent 或其他等效裂解液提取病毒 RNA,并根据诺沃克病毒 RNA 3' 末端含有一个 Poly(A) 的结构,用含有 Poly(dT) 的磁珠吸附诺沃克病毒 RNA 进行进一步纯化。利用普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 进行检测,对可疑的 PCR 产物进行测序分析确证。

5 试剂

所有实验用试剂均为分析纯;除特别说明外,实验用水为蒸馏水或去离子水。

5.1 诺沃克病毒阳性标本:由国家质量监督检验检疫总局指定单位提供。-80℃ 低温冰箱保存。

5.2 甘氨酸缓冲液:见附录 A.1.1。

5.3 PEG 8 000 溶液:见附录 A.1.2。

5.4 裂解液:Tri-reagent 或其他等效裂解液。

5.5 Poly(dT)磁珠:Dynabeads-oligo(dT)₂₅ 或等效品。

5.6 无 RNase 超纯水:见附录 A.2.3。