

## C.3 各工作区域功能及注意事项

## C.3.1 样本制备区(要求在负压实验室或具有三级生物安全实验室内进行操作)

样本制备区的功能及注意事项如下:

- 标本的保存,核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管,在样本制备区进行。
- 避免在本区内不必要的走动。可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。为避免样本间的交叉污染,加入待测核酸后,应立即盖紧含反应混合液的反应管。
- 用过的加样器吸头应放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁,实验材料(原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等)如出现外溅,应作清洁处理并作记录。
- 对实验台适当的紫外照射(波长 254 nm,与工作台面近距离)有助于灭活去污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

## C.3.2 反应混合物配制区

反应混合物配制区功能及注意事项如下:

- 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。
- 用于标本制备的试剂应直接运送至反应混合物配制区,不能经过检测区,在打开含有反应混合液的离心管或试管前,应将其快速离心数秒。
- 在整个本区的实验操作过程中,操作者应戴手套,并经常更换。工作结束后应立即对工作区进行清洁。本工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等化学物质的消毒清洁作用。
- 实验台表面用可移动紫外灯(波长 254 nm)进行照射。

## C.3.3 检测区

检测区功能及注意事项如下:

- 基因片段(病毒 RNA 或 cDNA)的扩增及扩增片段的分析在本区内进行。
- 本区注意避免通过本区的物品及工作服将扩增产物带出。为避免气溶胶所致的污染,应尽量减少在本区内的走动。
- 完成操作及每天工作后都应对实验室台面进行清洁和消毒,紫外照射方法与前面区域相同。如有溶液溅出,应处理并作记录。本区的清洁消毒和紫外照射方法同前面区域。

## C.3.4 使用时的注意事项

- 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。
- 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。



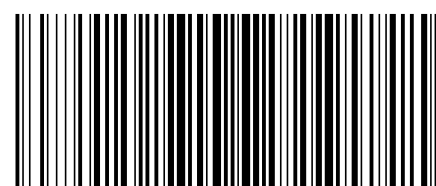
## 中华人民共和国国家标准

GB/T 22915—2008

## 口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of universal fluorogenic RT-PCR for foot and mouth disease virus

GB/T 22915—2008



GB/T 22915—2008

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-36447

定价: 14.00 元

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

附录 C  
(规范性附录)

口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法的实验室规范

C.1 实验室设置要求

- C.1.1 实验室分为三个相对独立的工作区域:样本制备区、反应混合物配制区和检测区。
- C.1.2 工作区域应有明确标记,避免不同工作区域内的设备、物品混用。
- C.1.3 每一区域应有专用的仪器设备。
- C.1.4 整个实验过程中均应使用无 RNA 酶的一次性耗材,用到的玻璃器皿使用前应 250 °C 干烤 4 h 以上,以彻底去除 RNA 酶。
- C.1.5 各区域的仪器设备应有明确标记,以避免设备物品从各自的区域内移出,造成不同的工作区域间设备物品发生混淆。
- C.1.6 进入各个工作区域严格遵循单一方向顺序,即只能从样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区。
- C.1.7 在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服,以便于鉴别;离开工作区时,不得将各区特定的工作服带出。
- C.1.8 实验室清洁时应按样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区的顺序进行。
- C.1.9 不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

C.2 工作区域仪器设备配置

C.2.1 样本制备区(要求在负压实验室或具有三级生物安全实验室内进行操作,BSL-3)

样本制备区需配置以下仪器设备:

- 2 °C~8 °C 冰箱;
- 20 °C 冰箱;
- 高速台式冷冻离心机(4 °C,12 000 r/min);
- 混匀器;
- 常量加样器(0.5 μL,2 μL,5 μL,10 μL,20 μL,50 μL,100 μL,300 μL,1 000 μL);
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.2 反应混合物配制区

反应混合物配制区需配置以下仪器设备:

- 2 °C~8 °C 冰箱;
- 20 °C 冰箱;
- 手掌式离心机(3 000 r/min);
- 混匀器;
- 微量加样器(0.5 μL,2 μL,5 μL,10 μL,20 μL,50 μL,100 μL,300 μL,1 000 μL);
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.3 检测区

检测区需配置以下仪器设备:

- 荧光 PCR 仪(配计算机);
- 移动紫外灯;
- 打印机。

中华人民共和国  
国家标准  
口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法  
GB/T 22915—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 0.75 字数 16 千字  
2009 年 4 月第一版 2009 年 4 月第一次印刷

\*  
书号: 155066·1-36447 定价 14.00 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

**附录 B**  
(资料性附录)  
**试剂盒的组成**

**B.1 试剂盒组成**

每个试剂盒可做 48 个检测,包括以下成分:

裂解液	30 mL×1 盒
DEPC 水	2 mL×1 管
RT-PCR 反应液(内含口蹄疫病毒的引物、探针)	750 μL×1 管
RT-PCR 酶	2 颗粒×12 管
<i>Taq</i> 酶	12 μL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
阳性对照(非感染性体外转录 RNA)	2 mL×1 管
ROX 参考染料(ROX reference dye)	0.1 mL×1 管

**B.2 说明**

**B.2.1** 裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,外观为红色液体,于 4 °C 保存。

**B.2.2** DEPC 水,是用 1%DEPC 处理后的去离子水,用于溶解 RNA 和稀释标准品。

**B.2.3** RT-PCR 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

**B.3 功能**

试剂盒可用于动物组织样品(包括水泡皮、水泡液、组织、脏器、分泌物、血液、血清或血浆等)中口蹄疫病毒的检测。

**B.4 使用时的注意事项**

**B.4.1** 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

**B.4.2** 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

**B.4.3** RT-PCR 酶颗粒极易吸潮失活,应在室温条件下置于干燥器内保存,使用时取出所需数量,剩余部分立即放回干燥器中。

## 前 言

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(第 5 版)。

本标准的附录 A、附录 C 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:花群义、杨云庆、秦智锋、周晓黎、卢体康、董俊、陶虹、阮周曦、叶弈优、林祥梅、吴绍强。