



中华人民共和国国家标准

GB/T 27981—2011

GB/T 27981—2011

牛传染性鼻气管炎病毒实时 荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of
infectious bovine rhinotracheitis virus

中华人民共和国
国家标准
牛传染性鼻气管炎病毒实时
荧光 PCR 检测方法
GB/T 27981—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

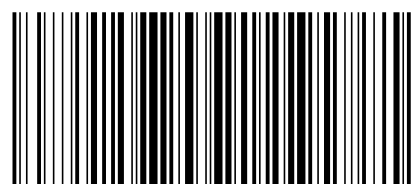
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2012 年 3 月第一版 2012 年 3 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44357 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)68510107



GB/T 27981—2011

2011-12-30 发布

2012-06-01 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 B
(规范性附录)

检测过程防止交叉污染的措施

- B.1** 采样及样品处理过程,应防止不同样品之间通过器具、手套等的交叉污染。采样及样品处理工具应经过高压灭菌或高温烘烤处理,一套工具仅限一个样品使用。存放样品的容器应清洗、高压灭菌或高温烘烤处理,或使用一次性灭菌容器。
- B.2** 实验过程,应穿工作服和戴一次性手套,勤换手套,工作服应经常清洗。
- B.3** 使用带滤芯吸嘴。吸嘴、离心管、PCR 管等应经过高压灭菌处理,一次性使用,不得回收清洗后重复使用。
- B.4** 样品处理与 PCR 加样应在不同的区域进行,不同区域配备独立的加样工具和用具。该区域可以是独立的空间间隔、有紫外消毒设施的独立的设备如核酸提取工作站、PCR 加样工作站、可密闭进行紫外消毒的超净工作台、生物安全柜等。若在敞开的空间进行核酸提取或 PCR 加样,该空间应安装紫外灯或配备具有等同降解核酸功能的设备如移动紫外灯、带紫外消毒功能的空气消毒净化器等。上述区域在每次使用后应及时清洁处理,并在使用前后照射紫外 30 min 以上。每个区域应有专门的废弃物容器,该容器应能耐受煮沸、10%次氯酸钠溶液消毒处理。每次实验结束,应在紫外消毒前,及时清理废弃物及消毒容器,并将该废弃物容器放回工作区进行紫外消毒。
- B.5** PCR 反应液等试剂应按检测需求分装贮存,避免同一管试剂多次开启使用。
- B.6** 装有核酸模板、样品或试剂的离心管在打开之前,应短暂离心,避免离心管用力崩开,所有操作尽量避免产生气溶胶。
- B.7** 上机运行前,应检查并盖紧各 PCR 管,以防荧光物质或模板泄漏而污染机器。
- B.8** 应遵循基因检测实验室其他技术要求。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了 OIE 发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2008 版)关于牛传染性鼻气管炎/牛传染性化脓性外阴阴道炎(Chapter 2.4.13)的内容。

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、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:陈茹、刘中勇、林志雄、罗琼、曾碧健、许如苏、姜焱、吴晓薇。

质粒 DNA 添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

7.1.3 阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

7.1.4 空白对照:在扩增反应阶段设置。以无 DNA 酶、无 RNA 酶水作为模板设置空白对照。

7.2 实时荧光 PCR 检测

7.2.1 加样

反应体系采用 25 μL 反应体积,其中,含 $2\times$ 定量 PCR-UDG 预混液 12.5 μL ,上、下游引物各 200 nmol/L,探针 100 nmol/L,模板 5 μL (100 pg~1 μg),补加适量无 DNA 酶、无 RNA 酶水使反应总体积达 25 μL 。加完样后,盖紧管盖,混匀,低速瞬时离心,使反应液集中管底。

7.2.2 扩增反应

反应参数设置:

——50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;

——95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;

——95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,45 个循环,荧光收集设置在每次循环的退火延伸时进行。

荧光素或检测通道设置:采用 FAM 通道或将报告荧光(report dye)设定为 FAM,采用其他报告荧光应按仪器说明对应设定通道;淬灭荧光(quench dye)设定为 None,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

7.2.3 结果判定

7.2.3.1 结果分析条件设定

综合分析仪器给出的各项结果,基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考,阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准,具体还需根据仪器噪声情况进行调整,选择反应所设定的荧光基团对应的通道进行分析。

7.2.3.2 质控

阴性对照和空白对照应无 Ct 值,阳性对照的 Ct 值应 ≤ 30 且出现典型的扩增曲线。

如对照不满足以上条件,此次实验视为无效。

7.2.3.3 荧光 PCR 反应结果判定

在质控有效的条件下进行结果判定。

阴性反应结果判定,检测结果呈现无 Ct 值的反应判为阴性反应。

阳性反应结果判定,检测结果呈现 Ct 值 ≤ 35 且扩增曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。

对于 $35 < \text{Ct 值} < 45$ 的样品,应进行重复试验。如果重复试验的 Ct 值 < 45 ,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。否则判为阴性反应。

必要时,对初次检测呈阳性反应的样品进行重复检测。

8 注意事项

检测过程防止交叉污染应注意的事项见附录 B。

牛传染性鼻气管炎病毒实时 荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了牛传染性鼻气管炎病毒(牛疱疹病毒 I 型,BoHV-1)实时荧光 PCR 检测方法的技术要求。

本标准适用于快速检测牛血样、拭子、精液、动物组织(粘膜、肝、脾、肾、淋巴结、胎盘组织等)和细胞培养物等样品中 BoHV-1 病毒感染。

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 分析实验室用水规格和试验方法

世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2008 版) 关于检测牛冷冻精液中 BoHV-1 病毒的实时荧光 PCR 方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BoHV-1:bovine herpesvirus type 1,牛疱疹病毒 I 型。

Ct 值:荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。

DTT:DL-dithiothreitol,二硫苏糖醇。

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

IBR:bovine infectious rhinotracheitis,牛传染性鼻气管炎。

PBS:phosphate buffer solution,磷酸盐缓冲生理盐水。

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

SDS:sodium dodecyl sulfate,十二烷基磺酸钠。

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

4 设备和器材

4.1 荧光 PCR 仪。

4.2 台式冷冻离心机。

4.3 可调微量移液器:规格 10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 mL。

4.4 带滤芯微量吸头:规格 10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 mL。

4.5 PCR 光学反应管。

4.6 微量离心管。

4.7 涡旋混匀器。

4.8 恒温培养箱。

4.9 冰箱:规格 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$,-20 $^{\circ}\text{C}$,-80 $^{\circ}\text{C}$ 。