

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 22917—2008

GB/T 22917—2008

猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of fluorogenic RT-PCR for swine vesicular disease virus

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法
GB/T 22917—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 12 千字
2009年4月第一版 2009年4月第一次印刷

*
书号: 155066·1-36449 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



GB/T 22917-2008

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 发布
中国国家标准化管理委员会

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 磷酸盐缓冲盐水(PBS)的配制

A.1.1 A液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至1 000 mL。

A.1.2 B液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液:磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)53.6 g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g,或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g),加蒸馏水溶解,最后稀释至1 000 mL。

A.1.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲盐水(PBS)的配制

取A液14 mL, B液36 mL,加氯化钠(NaCl)8.5 g,用蒸馏水稀释至1 000 mL。经 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 15 min 高压灭菌,冷却后,无菌条件下按每毫升加入1 000 IU 青霉素、1 000 μg 链霉素。

A.2 裂解液

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 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存;可直接购买商品化的Trizol试剂。

A.3 反转录和PCR缓冲液(5 \times)配制

A.3.1 Tris-HCl:250 mmol/L,pH8.3。

A.3.2 氯化钾:250 mmol/L。

A.3.3 氯化镁:50 mmol/L。

A.3.4 DTT:50 mmol/L。

A.3.5 TritonX-100:1%。

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为规范性附录。

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。

本标准主要起草人:花群义、卢体康、吕建强、阮周曦、杨云庆、周晓黎、杨素、董俊、陈书琨。

6.2.7 以 4 000 r/min 离心 10 s(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置),将管壁上的残余液体甩到管底部,小心倒去上清液,用微量加样器将其吸干,一份样本换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,室温干燥 3 min,不能过于干燥,以免 RNA 不溶。

6.2.8 各管加入 11 μ L DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,以 2 000 r/min 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增;若需长期保存应放置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱内。

6.3 检测

6.3.1 荧光 RT-PCR 反应液的配制

在反应混合物配制区进行。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 $n(n=u+2+1)$,其中 u 为被检样品数、2 为阳性对照数、1 为阴性对照数,按表 1 配制反应体系混合液。配制在冰盒中进行。

表 1 反应体系混合液配制

序号	组 分	每管用量/ μ L	n 管总用量/ μ L
1	AMV 反转录酶(5 U/ μ L)	1	$n \times 1$
2	dNTPs(每种均为 10 mmol/L)	5	$n \times 5$
3	RNasin(40 U/ μ L)	1	$n \times 1$
4	Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5	$n \times 0.5$
5	反转录和 PCR 缓冲液(5 \times)	10	$n \times 10$
6	氯化镁(25 mmol/L)	6	$n \times 6$
7	上游引物(15 μ mol/L)	1	$n \times 1$
8	下游引物(15 μ mol/L)	1	$n \times 1$
9	探针(10 μ mol/L)	1	$n \times 1$
10	DEPC 水	13.5	$n \times 13.5$

6.3.2 荧光 RT-PCR 反应液分装

将 6.3.1 中配制的荧光 RT-PCR 反应液充分混合均匀,按每管 40 μ L 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管,将 PCR 管放于 96 孔板上,一定要按顺序记录好被检样品管、阳性对照管、阴性对照管。转移至样本处理区。

6.3.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 6.2.8 中制备的 RNA 溶液 10 μ L,盖紧管盖,以 500 r/min 离心 30 s。转移至检测区。

6.3.4 荧光 RT-PCR 检测

6.3.4.1 在检测区进行。将 7.3.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,在 96 孔板内(表内)记录或填写被检样品(Unknown)、阳性对照(PC)、阴性对照(NTC)。设置探针:5' 为 FAM,3' 为 TAMAR。

6.3.4.2 循环条件设置:

——第一阶段,反转录 42 $^{\circ}$ C/30 min;

——第二阶段,预变性 94 $^{\circ}$ C/3 min;

——第三阶段,94 $^{\circ}$ C/20 s,60 $^{\circ}$ C/30 s,40 个循环。

试验检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

7 结果判定

7.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴

猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。

本标准适用于动物及其产品中猪水泡病病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

2.1 荧光 RT-PCR

荧光反转录-聚合酶链反应。

2.2 C_t 值

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

2.3 RNA

核糖核酸。

2.4 DEPC

焦碳酸磷酸酯。

2.5 PBS

磷酸盐缓冲盐水,配方见附录 A。

2.6 Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

2.7 SVDV

猪水泡病病毒。

3 原理

根据猪水泡病病毒的基因特定序列,合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。引物和探针通过严格的设计和筛选,涵盖已报道的所有猪水泡病病毒的毒株。荧光探针的 5' 端标记 FAM 荧光素,3' 端标记 TAMRA 荧光素,它在近距离内能吸收 5' 端报告荧光基团发出的荧光信号。扩增时,由于 Taq 酶的 5' \rightarrow 3' 的外切活性,在延伸到荧光探针时,将其切断,两基团分离,淬灭作用消失,荧光信号产生。因此,可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

4.1.1 荧光 RT-PCR 检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

4.1.3 台式离心机或手掌式离心机(离心速度 3 000 r/min)。

4.1.4 混匀器。

4.1.5 冰箱(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 和-20 $^{\circ}$ C 两种)。

4.1.6 微量可调移液器(5 μ L,10 μ L,100 μ L,1 000 μ L)及配套带滤芯吸头。

4.1.7 1.5 mL、0.5 mL 硅化 Eppendorf 管:将 Eppendorf 管和滴头浸泡于含有 0.1% DEPC 的三蒸水中过夜,121 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min,40 $^{\circ}$ C 烘干备用。市售 Eppendorf 管和滴头已经硅化,可直接