

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 22333—2008

GB/T 22333—2008

日本乙型脑炎病毒 反转录聚合酶链反应试验方法

Reverse transcription polymerase chain reaction for
Japanese B encephalitis virus

中华人民共和国
国家标准
日本乙型脑炎病毒
反转录聚合酶链反应试验方法
GB/T 22333—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 0.5 字数 7 千字
2008年11月第一版 2008年11月第一次印刷

*
书号: 155066·1-34535 定价 10.00 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 22333-2008

2008-08-22 发布

2008-12-01 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

4.1.2.1 组织样品处理:取待检脑组织病料约 0.05 g 置研磨器中剪碎并研磨,加入 400 μL 变性液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 200 μL ,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 200 μL 变性液,混匀。

4.1.2.2 阳性对照处理:取日本乙型脑炎病毒弱毒疫苗 200 μL ,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 200 μL 变性液,混匀。

4.1.2.3 阴性对照处理:取健康猪血清 200 μL ,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 200 μL 变性液,混匀。

4.2 病毒 RNA 的提取

4.2.1 取已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品,每管依次加入乙酸钠溶液 30 μL 、酚-三氯甲烷-异戊醇混合液 300 μL ,颠倒 10 次混匀,冰浴 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000g 离心 15 min。

4.2.2 取上清 300 μL 置于新的经 DEPC 水处理过的 1.5 mL 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,置液氮中 3 min 或 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 30 min。取出样品管,室温融化,将离心管开口侧朝离心机转轴方向放入离心机内,4 $^{\circ}\text{C}$ 20 000g 离心 20 min。

4.2.3 弃上清,沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75%乙醇 1 mL,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣于吸水纸上 1 min,真空抽干 15 min。

4.2.4 用 10 μL 无 RNA 酶的灭菌双蒸水和 1 μL RNA 酶抑制剂沿离心管开口侧相反方向溶解沉淀。-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

4.3 RT-PCR 反应液组成(总体积 25 μL)

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| DEPC 水 | 13.8 μL |
| 2.5 mmol/L dNTP | 2.5 μL |
| 8 mmol/L 上下游引物混合液 | 1.5 μL |
| 25 mmol/L 氯化镁溶液 | 1.2 μL |
| 10 倍 PCR 缓冲液 | 2.5 μL |
| AMV 反转录酶 | 0.2 μL |
| RNA 酶抑制剂 | 0.3 μL |
| 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 | 1 μL |
| 提取的 RNA | 2 μL |

4.4 RT-PCR 反应程序

42 $^{\circ}\text{C}$ 45 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 3min;扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,35 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

4.5 电泳

将 PCR 扩增产物 15 μL 与 3 μL 上样缓冲液混合,加样于 1%琼脂糖凝胶孔中,琼脂糖凝胶板一侧点样孔加入 100bp DNA 分子质量标准物,以 5 V/cm 电压电泳 40 min,用紫外凝胶成像仪观察结果。

5 结果判定

当阳性对照出现 375bp 扩增带,阴性对照未出现目的带时,实验结果成立。被检样品出现 375bp 扩增带为日本乙型脑炎病毒阳性,未出现相应扩增带的样品判为阴性。

前 言

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:农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人:王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊、田克恭。