



中华人民共和国国家标准

GB/T 27521—2011

GB/T 27521—2011

猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法

RT-PCR assay for swine influenza virus nucleic acid

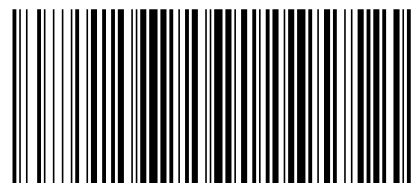
中华人民共和国
国家标准
猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法
GB/T 27521—2011

*
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 15 千字
2012 年 1 月第一版 2012 年 1 月第一次印刷

*
书号: 155066·1-44047 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 27521-2011

2011-11-21 发布

2012-03-01 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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g,溶于灭菌双蒸水中,定容至1 000 mL。

A.5.2 B液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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),溶于灭菌双蒸水中,定容至1 000 mL。

A.5.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲液的配制

0.2 mol/L A液 14 mL

0.2 mol/L B液 36 mL

NaCl 8.5 g

加灭菌双蒸水定容至1 000 mL。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,中国检验检疫科学研究院,中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:乔传玲、韩雪清、杨焕良、刘业兵、陈艳、吴绍强、陈化兰、林祥梅、辛晓光、朱中武、王慧煜、刘建、李建、梅琳、王伊琴、徐彪、阮周曦、宁宜宝、薄清如、秦智锋、林志雄。

7.3.2.2 冰浴 2 min,继续加入:

5×反转录反应缓冲液	4 μL
0.1 mol/L DTT	2 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
M-MLV 反转录酶	0.5 μL
RNA 酶抑制剂	0.5 μL
DEPC 水	5 μL

7.3.2.3 37 °C 水浴 1 h,合成 cDNA。取出直接进行 PCR 或置 -20 °C 保存。

7.3.2.4 根据扩增目的片段不同,选择相应的上/下游引物进行扩增。

PCR 体系包括:

双蒸灭菌水	37.5 μL
反转录产物	4 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
10×PCR Buffer	5 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
Taq 酶	0.5 μL

首先加入双蒸灭菌水,然后再按照顺序逐一加入上述成分,每一次要加入到液面下。全部加完后,混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。

7.3.2.5 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,循环 30 次;72 °C 延伸 6 min。

8 扩增产物的电泳检测

制备 1.2% 琼脂糖凝胶板,见附录 A 中 A.1。在电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取 3 μL~5 μL 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合后,加到凝胶孔。加入分子量标准。恒压 (110 V) 下电泳 30 min~40 min,将电泳好的凝胶放到凝胶成像系统上观察结果。

9 试验成立的条件

阳性对照的扩增产物经电泳检测,在预期大小的条带位置均出现特异性条带,阴性对照的扩增产物经电泳检测均没有预期大小的目的条带。阴、阳性对照同时成立则表明试验有效,否则试验无效。

10 结果判定

10.1 阳性判定

应用引物 M-684U/M-684L、H1-668U/H1-668L、甲-428U/甲-428L、H3-668U/H3-668L、N1-615U/N1-615L、N2-246U/N2-246L,按照各基因检测体系对样品进行检测,扩增产物如果在 684 bp、668 bp、428 bp、668 bp、615 bp、246 bp 位置出现特异性条带,则判定为猪流感病毒或相应亚型病毒核酸阳性。

10.2 阴性判定

如果在所用引物预期扩增片段的位置均未出现特异性条带,则判定为猪流感病毒核酸阴性。

猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法的技术要求。

本标准规定的 RT-PCR 检测方法适用于检测猪肺脏组织、鼻腔及气管分泌物和这些采集样品培养物中的猪流感病毒核酸。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC: 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

dNTP: 脱氧核苷酸三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EB: 溴化乙锭(ethidium bromide)

M-MLV RT: 莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

RNAase inhibitor: RNA 酶抑制剂

RT-PCR: 反转录-聚合酶链式反应(reverse-transcription polymerase chain reaction)

SPF: 无特定病原体(specific pathogen free)

Taq DNA polymerase: Taq DNA 聚合酶

3 仪器

3.1 PCR 仪。

3.2 台式低温高速离心机。

3.3 电泳仪。

3.4 电泳槽。

3.5 冰箱。

3.6 凝胶成像系统。

3.7 微量移液器。

3.8 水浴锅。

4 试剂

4.1 LS TRIzol RNA 提取试剂或其他商品化的 RNA 提取试剂。

4.2 氯仿、异丙醇、无水乙醇。

4.3 1.2% 琼脂糖凝胶,见附录 A 中 A.1。

4.4 50×TAE 缓冲液,见附录 A 中 A.2。