

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 27528—2011

GB/T 27528—2011

口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR for detection of foot and mouth disease virus

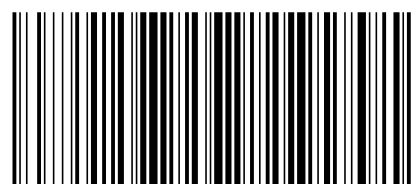
中华人民共和国
国家标准
口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法
GB/T 27528—2011

*
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 11 千字
2012年1月第一版 2012年1月第一次印刷

*
书号: 155066·1-44036 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 27528-2011

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

前 言

本标准的附录 A、附录 B 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(SAC/TC 181)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、中国检验检疫科学研究院、北京盈九思科技发展有限公司。

本标准主要起草人：秦智锋、林祥梅、吴绍强、花群义、卢体康、刘建、陈书琨、吕建强、曾少灵、詹爱军、韩雪清、孙洁、曹琛福、贾广乐、高小博、陈兵、阮周曦、梅琳、张彩虹、陶虹。

附录 A
(规范性附录)

实时荧光 RT-PCR 反应液及裂解液组成

A.1 实时荧光 RT-PCR 反应液组成

实时荧光 RT-PCR 反应液(1×):含 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP mix,上、下游引物各 200 nmol/L,探针 100 nmol/L,1U Taq 酶,100U 逆转录酶,2 mmol/L DTT,5%甘油。

A.2 裂解液组成

裂解液主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,于 4 ℃ 保存。

口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于口蹄疫病毒的检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 18088 出入境动物检疫采样
GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。
Ct 值:循环阈值(cycle threshold)。

4 试剂耗材和仪器设备

4.1 试剂耗材

4.1.1 除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯,实验室用水应符合 GB/T 6682 的要求。

4.1.2 口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 试剂:−20℃ 保存,见附录 A。

4.1.3 引物和探针序列

上游引物(FMDV-F)序列为:5'ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA 3'。

下游引物(FMDV-R)序列为:5'GCGAGTCCTGCCACGGA 3'。

TaqMan 探针(FMDV-Pb)序列为:5'TCCTTTGCACGCCGTGGGAC 3',其 5'端和 3'端分别标记 FAM 和 BHQ。

4.1.4 DEPC 处理水:见附录 B。推荐购买商品化 DEPC 处理的无 DNA 酶和 RNA 酶的水。

4.1.5 氯仿:分析纯,常温保存。

4.1.6 异丙醇:分析纯,使用前预冷至−20℃。

4.1.7 75%乙醇:用 DEPC 水和无水乙醇配制,使用前预冷至−20℃。

4.1.8 石英砂:市售化学纯,121℃,15 min 高压灭菌后备用。

4.1.9 0.01 mol/L PBS,pH7.6~7.8:见附录 B。

4.1.10 阳性对照为灭活疫苗毒或组织培养灭活毒,−20℃ 保存备用。阴性对照样品可采用健康的猪或牛的组织材料。

4.2 主要仪器设备

4.2.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4℃,离心速度可达 12 000g 以上。