

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2531—2010

贝类和水样中札如病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法

Determination of Sapovirus in shellfish and water—
Conventional RT-PCR and real-time RT-PCR

2010-03-02 发布

2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:潘良文、卢钟山、邓恬宁、吕蓉、张舒亚、李想、刘月明、高琴。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

贝类和水样中札如病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法

1 范围

本标准规定了贝类和水样中札如病毒普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法。
本标准适用于贝类和水样中札如病毒的定性检测。

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。

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

3.2

质粒标准分子 plasmid reference molecule

一种包含病毒特异性 cDNA 片段的重组质粒分子,可作为病毒 PCR 检测中的阳性对照。

4 方法提要

用合适的裂解液(如 Tri-reagent)提取贝类样品中病毒 RNA,并根据札如病毒 RNA 3'末端含有 Poly(A)的结构,用连接 Oligo(dT)₂₅ 的磁珠特异性吸附札如病毒 RNA 进行纯化。对水样中的病毒进行富集后,采用合适的方法提取和纯化病毒 RNA。利用普通 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 方法进行检测。本研究通过构建质粒标准分子(每个质粒分子包含 1 拷贝扩增片段),确定札如病毒普通 RT-PCR 体系检测下限为 100 拷贝,实时荧光 RT-PCR 体系检测下限均为 10 拷贝。

5 试剂

所有实验用试剂均为分析纯;除特别说明外,实验用水为蒸馏水或去离子水。

5.1 阳性标本:札如病毒, -80 °C 冰箱保存;或含札如病毒检测目的片段的质粒标准分子, -20 °C 冰箱保存。

5.2 甘氨酸缓冲液:见附录 A.1.1。

5.3 PEG 8 000 溶液:见附录 A.1.2。

5.4 裂解液:Tri-reagent 或其他等效裂解液(如:TRIzol)。

5.5 Oligo(dT)₂₅ 磁珠:Dynabeads-oligo(dT)₂₅ 或等效品。

5.6 超纯水(无 RNase 和 DNase 污染):见附录 A.2.3。

5.7 75%乙醇:见附录 A.2.4。