

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1674—2005

SN/T 1674—2005

锦鲤疱疹病毒分离和聚合酶链反应 试验操作规程

Protocol of viral isolation and polymerase chain reaction
for koi herpesvirus

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
锦鲤疱疹病毒分离和聚合酶链反应
试验操作规程
SN/T 1674—2005

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2006年1月第一版 2006年1月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-16598 定价 8.00 元



SN/T 1674-2005

2005-09-30 发布

2006-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

附 录 B
(资料性附录)

KHV 扩增产物的参考序列

1	gacgacgccg	gagaccttgt	gatagacgtg	ctcgccgagc	agaggaagcg	caaaaagaac
61	aaggacaaaa	ataagaacct	gaggggactg	ctcgcttaa	accttttctt	tattgttgtt
121	gtataataat	taaaaaatg	taatcacaag	aagcattggt	gtgcgttgat	gttctctcac
181	atagcttgac	ggcactcgtc	gagccgtagc	cctgtatgcc	cgagagtgcc	tgtgagggcg
241	acgcagacgc	cgttgcctgt	agcatagaag	atccgtgcgg	cggcgggccg	gtgggtttct
301	gcttcttggg	tttgggaggc	ccgccgccct	cgccgtcttc	tccgggcacg	gactgcactc
361	ctccgatgga	gtgaaactgg	aactgtctga	tgagcgtggg	gtcaaagttg	cacatgggca
421	gtccgctggc	ctcggagagc	atgacggcga	tggagtggg	gttgaggaac	agactgaact
481	tgtg					

前 言

本标准的附录 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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。
 本标准主要起草人:刘荭、高隆英、史秀杰、何俊强、杨锦舜、江育林。
 本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

附录 A
(规范性附录)
试剂及其配制

A.1 胰酶—EDTA 混合消化液

氯化钠(NaCl,分析纯)	0.8 g
氯化钾(KCl,分析纯)	0.02 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄ ,分析纯)	0.02 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ,分析纯)	0.115 g
乙二胺四乙酸(EDTA,分析纯)	0.02 g
胰酶(分析纯)	0.1
双蒸水	100 mL

过滤除菌后分装备用。

A.2 培养液

Eagle's 基础培养基(MEM)。按说明书的要求配制,然后加入 10% 的胎牛血清,抽滤除菌,4℃ 保存。开放系统使用时,加入过滤除菌的 HEPES,使其在培养液中的终浓度为 0.02 mol/L。

A.3 CTAB 溶液

按 2% CTAB,1.4 mol/L NaCl,20.0 mmol/L EDTA,20.0 mol/L Tris-HCl pH7.5 配制。用前加巯基乙醇到终浓度为 0.25%。

A.4 抽提液 1

酚-三氯甲烷-异戊醇(用 1.0 mol/L pH 7.9±0.2 Tris 饱和过的重蒸酚:三氯甲烷:异戊醇按 25:24:1 的比例混合,密闭避光保存)。

A.5 抽提液 2

三氯甲烷-异戊醇(将三氯甲烷和异戊醇按 24:1 的比例混合,密闭避光保存)。

A.6 MgCl₂

25.0 mmol/L。

A.7 Taq 酶用 10 倍浓缩缓冲液(10×buffer)

Tris-HCl	500.0 mmol/L pH 8.8
氯化钾(KCl)	500.0 mmol/L
TritonX-100	1%

A.8 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g

锦鲤疱疹病毒分离和聚合酶链反应 试验操作规程

1 范围

本标准规定了锦鲤疱疹病毒(KHV)分离和聚合酶链反应(PCR)检测方法。
本标准适用于锦鲤疱疹病毒病的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

GB/T 18088—2000 出入境动物检疫采样

3 试剂和材料

3.1 水:符合 GB/T 6682—1992 中一级水的规格。

3.2 KHV 病毒参考株:由国家质量监督检验检疫总局指定的实验室提供。

3.3 锦鲤鳍条细胞(KF):用 Eagle's 培养液(见第 A.9 章)培养于 25℃。

3.4 Taq 酶:—20℃ 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

3.5 dNTP:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。

3.6 引物:浓度为 40 μmol/L。其序列如下:

KHV9/5F:5'-GAC GAC GCC GGA GAC CTT GTG-3'

KHV9/5R:5'-CAC AAG TTC AGT CTG TTC CTC AA-3'

3.7 异丙醇:分析纯,使用前预冷到—20℃。

3.8 矿物油:要求无 DNA 酶和 RNA 酶,用于无热盖的 PCR 扩增仪。

3.9 分子量标准:推荐使用 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II),各片段大小依次为 501、404、331、242、190、147 bp。

3.10 HEPES。

4 器材和设备

4.1 96 孔细胞培养板。

4.2 倒置显微镜。

4.3 恒温培养箱。

4.4 普通冰箱和超低温冰箱。

4.5 组织研磨器。

4.6 离心机和离心管。

4.7 PCR 扩增仪。

4.8 水平电泳仪。

4.9 微量移液器及吸头。