

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3631—2013

出口贝类中肠道病毒 EV71 的检验方法 实时荧光 RT-PCR 方法

Detection of Enterovirus 71 in shellfish for export—
Real-time fluorescence RT-PCR

2013-08-30 发布

2014-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、深圳太太基因工程有限公司。

本标准主要起草人：曾宪东、陈建军、徐家文、肖性龙、郭明星、赵晖、冯汉利、王振华。

出口贝类中肠道病毒 EV71 的检验方法 实时荧光 RT-PCR 方法

1 范围

本标准规定了贝类中 EV71 病毒的荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于贝类中 EV71 病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肠道病毒 EV71 Enterovirus 71

肠道病毒 EV71,即肠道病毒 71 型(简称 EV71),属于微小 RNA 病毒科、肠道病毒属, EV71 及 Cox A16 型是手足口病最为常见的致病病毒。肠道病毒属包括脊髓灰质炎病毒(Poliiovirus),柯萨奇病毒(Coxsackie virus)A 组 16、4、5、7、9、10 型和 B 组 2、5、13 型,埃可病毒(ECHO viruses)以及肠道病毒 68、69、70、71、72 等血清型。

3.2

荧光 RT-PCR real-time fluorescence RT-PCR

实时荧光定量 RT-PCR 方法是在常规 RT-PCR 的基础上,加入了一条特异性的荧光探针。该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发出的信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时, Taq 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。

3.3

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 方法概要

在甘氨酸缓冲液中通过高速匀浆的物理方式对食品样品进行均质,经过温育促进病毒颗粒的释放,再利用 PEG8000 沉降病毒粒子。然后采用 Trizol-reagent 或其他等效裂解液提取沉淀物的总 RNA,并进一步使用包被了 Oligo(dT)₂₅ 的磁珠与 EV71 病毒 RNA 3' 端的 Poly(A) 尾巴特异性结合,纯化病毒