

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1474—2004

SN/T 1474—2004

传染性造血器官坏死病毒逆转录聚合酶链式反应操作规程

Protocol of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
for infectious haematopoietic necrosis virus

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
传染性造血器官坏死病毒逆转录聚合酶链
式反应操作规程
SN/T 1474—2004

*

中国标准出版社出版发行
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 10 千字
2005年2月第一版 2005年2月第一次印刷

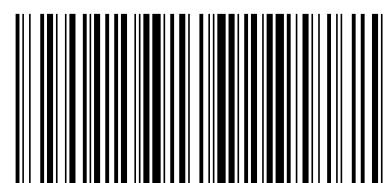
*

书号: 155066·2-16073 定价 8.00 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)68533533



SN/T 1474-2004

2004-11-17 发布

2005-04-01 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:高隆英、刘荻、史秀杰、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 配 制

A.1 CTAB 溶液

CTAB 溶液:按 CTAB 2%,氯化钠 1.4 mol/L,EDTA 20 mmol/L,Tris-HCl 20 mmol/L pH=7.5 配制。用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

A.2 抽提液 I

将三氯甲烷-异戊醇按 24:1 的比例混合,密闭避光保存。

A.3 抽提液 II

1 mol/L Tris 水溶液饱和的酚:三氯甲烷:异戊醇=25:24:1 混合,密闭避光保存。

A.4 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.922 g
水	1 000 mL

用 5 mol/L 的盐酸调到 pH8.0。

A.5 AMV 逆转录酶的 5 倍浓缩缓冲液

Tris-HCl	250 mmol/L, pH 8.3
氯化钾(KCl)	250 mmol/L
氯化镁(MgCl ₂)	50 mmol/L
DTT	50 mmol/L

A.6 氯化镁(MgCl₂)

25 mmol/L。

A.7 Taq 酶用 10 倍浓缩缓冲液

Tris-HCl	500 mmol/L pH 8.8
氯化钾(KCl)	500 mmol/L
TritonX-100	1%

A.8 EB(Ethidium Bromide,核酸染色剂)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液。

A.9 电泳样品缓冲液

每 100 mL 水溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40.00 g。

传染性造血器官坏死病毒逆转录聚合酶链式反应操作规程

1 范围

本标准规定了用逆转录聚合酶链式反应技术检测传染性造血器官坏死病毒的方法。
本标准适用于鱼类传染性造血器官坏死病的检测。

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。

GB 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

3 试剂和材料

- 3.1 IHNV 标准毒株:由 OIE 参考实验室或国家质量监督检验检疫局、农业部等有关部门指定提供。
- 3.2 水:试剂配制(见附录 A)用水应符合 GB 6682 中一级水的规格,并要用 DEPC 处理,除去 RNA 酶。
- 3.3 Taq 酶:—20℃保存,避免温度剧烈变化。
- 3.4 AMV 逆转录酶:—20℃保存,避免温度剧烈变化。
- 3.5 RNA 酶抑制剂:—20℃保存,避免温度剧烈变化。
- 3.6 dNTP(含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L)。
- 3.7 引物:所选取的基因为 IHNV 的 N 基因(参见附录 B)中的片段,两对引物,浓度为 40 μmol/L, F1 和 R1 扩增该基因中的 786 bp 片断,而 F2 和 R2 则从 786 bp 片断中再扩增 323 bp 片断。
上游引物 R1:5'-TCA-AGG-GGG-GAG-TCC-TCG-A-3',
下游引物 F1:5'-CAC-CGT-ACT-TTG-CTG-CTA-C-3',
上游引物 R2 5'-TTC-GCA-GAT-CCC-AAC-AAC-AA-3',
下游引物 F2 5'-GCG-CAC-AGT-GCC-TTG-GCT-3'。
- 3.8 无水乙醇:分析纯,使用前预冷到—20℃。

4 仪器和设备

PCR 扩增仪、电泳仪、紫外透射仪、普通冰箱、低温冰箱、台式离心机、电子天平、高速冷冻离心机、微量移液器及吸头、恒温培养箱、电动匀浆器、剪刀、镊子、离心管和 PCR 管。

5 操作方法

5.1 采样

对鱼的解剖取样,如果是体长小于 4 cm 的鱼苗取整条鱼,4 cm~6 cm 的鱼苗取内脏(包括肾);体长大于 6 cm 的鱼则取脑、肝、肾、脾。成熟雌鱼还需取卵巢液。而鱼的采样数量见 GB/T 18088。

5.2 RNA 抽提

将取得的组织放入 1.5 mL 的离心管中,用眼科剪刀先将样品剪碎,然后加入 150 μLCTAB 溶液(见第 A.1 章)用匀浆器将样品匀浆成糊状,再将 CTAB 溶液补加至 900 μL,混匀,25℃作用 2.5 h。