



中华人民共和国国家标准

GB/T 22916—2008

水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of fluorogenic RT-PCR for vesicular stomatitis virus

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(第5版)。

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、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:花群义、周晓黎、曾少灵、曹琛福、詹爱军、张彩虹、林庆燕、陈兵、杨云庆、孙洁。

水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于动物及其产品中水泡性口炎病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

2.1 荧光 RT-PCR

荧光反转录-聚合酶链反应。

2.2 Ct 值

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

2.3 RNA

核糖核酸。

2.4 DEPC

焦碳酸磷酯。

2.5 PBS

磷酸盐缓冲盐水(配方见附录 A)。

2.6 Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

2.7 VSV

水泡性口炎病毒。

3 原理

水泡性口炎病毒属 RNA 病毒,根据水泡性口炎病毒两型共有基因特定的序列,合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。通过严格设计和筛选的引物和探针,涵盖水泡性口炎病毒的两个型和突变株,为水泡性口炎病毒的特异性通用引物和探针。探针的 5'端标记 FAM 荧光素,它发出的荧光能够被检测仪器接收,称为报告荧光基团;3'端标记 TAMRA 荧光素,它在近距离内能吸收 5'端报告荧光基团发出的荧光信号,称为淬灭荧光基团。在扩增时,Taq 酶发挥它的 5'→3'端外切核酸酶的功能,将探针水解成单核苷酸,消除阻碍,标记在探针两端的报告荧光基团和淬灭荧光基团均游离于溶液中,仪器检测到发出的荧光信号。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

4.1.1 荧光 RT-PCR 检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

4.1.3 台式离心机(离心速度 3 000 r/min)。

4.1.4 混匀器。

4.1.5 冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)。

4.1.6 微量可调移液器(5 μL,10 μL,100 μL,1 000 μL)及配套带滤芯吸头。