



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 22333—2008

---

## 日本乙型脑炎病毒 反转录聚合酶链反应试验方法

Reverse transcription polymerase chain reaction for  
Japanese B encephalitis virus

2008-08-22 发布

2008-12-01 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

本标准的附录 A 为规范性附录。

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：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊、田克恭。

# 日本乙型脑炎病毒 反转录聚合酶链反应试验方法

## 1 范围

本标准规定了日本乙型脑炎病毒核酸的反转录聚合酶链反应试验的技术要求。  
本标准适用于动物脑组织中日本乙型脑炎病毒核酸的检测。

## 2 试剂

- 2.1 变性液(见第 A.1 章)。
- 2.2 2 mol/L 乙酸钠溶液(pH4.0)。
- 2.3 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(见第 A.2 章)。
- 2.4 2.5 mmol/L dNTP。
- 2.5 8 mmol/L 上下游引物混合液(引物序列见第 A.3 章)。
- 2.6 10 倍 PCR 缓冲液。
- 2.7 1% 溴化乙锭(EB)溶液。
- 2.8 TAE 电泳缓冲液。
- 2.9 1% 琼脂糖凝胶。
- 2.10 上样缓冲液(见第 A.4 章)。
- 2.11 其他试剂:10 U/ $\mu$ L AMV 反转录酶、100bp DNA 分子质量标准物、50 U/ $\mu$ L RNA 酶抑制剂、5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶、异丙醇、75% 乙醇溶液、25 mmol/L 氯化镁溶液、DEPC 处理过的无菌双蒸水。

## 3 实验室条件

### 3.1 实验室级别要求

实验室必须为生物安全 III 级(BSL-3 级)实验室。

### 3.2 实验室分区

RT-PCR 试验区域分反应液配制区(配液区)、核酸提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→核酸提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。

### 3.3 实验室应配备的仪器及耗材

3.3.1 仪器:分析天平、高速离心机、真空干燥器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、液氮罐或-70℃冰箱、微波炉、组织研磨器、-20℃冰箱、水浴锅、可调移液器(最大量程分别为 2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。

3.3.2 耗材:眼科剪、眼科镊、称量纸、10 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头(10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、灭菌双蒸水。

## 4 操作程序

### 4.1 样品的采集及处理

4.1.1 样品的采集:濒死动物、扑杀动物或流产胎儿取脑组织。

4.1.2 样品的处理:每份样品分别处理。