



中华人民共和国国家标准

GB/T 36875—2018

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

Method of RT-nPCR for detection of classical swine fever virus

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪 瘟 病 毒 RT-nPCR 检 测 方 法

GB/T 36875—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年9月第一版

*

书号: 155066 · 1-61269

版权专有 侵权必究

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:军事医学科学院军事兽医研究所、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:郭焕成、王琴、徐璐、冯焯、张乾义、赵启祖、邹兴启、朱元源、涂长春。

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒特异的反转录-套式聚合酶链反应(RT-nPCR)方法的技术要求。

本标准适用于可能感染猪瘟病毒的猪脏器、血液、粪便和细胞培养物中猪瘟病毒核酸的检测,可用于猪瘟的诊断和监测。

本标准的猪瘟病毒 RT-nPCR 方法不能区分感染的猪瘟病毒野毒株和免疫的疫苗株。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

EDTA-2Na:乙二胺四乙酸二钠(ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-nPCR:反转录-套式聚合酶链反应(reverse transcription and nested polymerase chain reaction)

3 实验前准备

3.1 实验室条件

3.1.1 实验室分区

PCR 实验室分区包括核酸提取区、PCR 反应体系配制区——配液区、扩增区、电泳区。流程顺序为核酸提取区→配液区→扩增区→电泳区。各区仪器和耗材专用。

3.1.2 实验室应配备的仪器及器材

3.1.2.1 仪器:Ⅱ级生物安全柜、台式高速冷冻离心机、普通冰箱(−20 ℃和 4 ℃)、分析天平、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、组织研磨器、扁桃体采样器、微波炉、单道可调移液器(2 μL、10 μL、200 μL、1 000 μL)。

3.1.2.2 器材:无菌注射器、眼科剪、眼科镊、称量纸、棉拭子、灭菌牙签、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、一次性无 RNA 酶吸头(10 μL、200 μL、1 000 μL)、1.5 mL 无 RNA 酶离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管。

3.2 化学药品及试剂

3.2.1 总 RNA 提取试剂 Trizol。

3.2.2 TAE 电泳缓冲液的制备,配制方法见附录 A。

3.2.3 1%琼脂糖凝胶,配制方法见附录 A。

3.2.4 其他试剂:200 U/μL M-MLV 反转录酶,5×M-MLV 缓冲液,40 U/μL RNA 酶抑制剂,DEPC-H₂O,5 U/μL ExTaq DNA 聚合酶,10×ExTaq 缓冲液(Mg²⁺ Plus),6 碱基随机引物(50 μmol/L),6×上样缓冲液,dNTPs(2.5 mmol/L/dNTP),异丙醇,三氯甲烷,75%乙醇,ddH₂O,溴化乙锭替代染