SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1686—2005

新城疫病毒中强毒株检测方法
荧光 RT-PCR 法

Detection of mesogenic and velogenic strains of newcastle disease virus—Method of the real-time RT-PCR

2005-09-30 发布　　2006-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张鹤晓、刘环、高志强、张利峰、谷强、王甲正。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

新城疫病毒中强毒株检测方法
荧光 RT-PCR 法

1 范围

本标准规定了新城疫病毒中强毒株 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于禽类及其产品新城疫病毒中强毒株的检测。

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/T 19438.1—2004　禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1　荧光 RT-PCR　荧光反转录-聚合酶链反应。

3.2　Ct 值　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圈数。

3.3　RNA　核糖核酸。

3.4　*Taq* 酶　*Taq* DNA 聚合酶。

3.5　PBS　磷酸盐缓冲生理盐水。

3.6　DEPC　焦碳酸乙二酯。

4 原理

采用 TaqMan 方法，在比对新城疫病毒 F 基因序列的基础上，设计针对 F 基因的特异性引物和特异性的荧光双标记探针进行配对。探针 5'端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示)，3'端标记 TAMPA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示)，它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。PCR 反应进入退火阶段时，引物和探针同时与目的基因片段结合，此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收，仪器检测不到荧光信号；而反应进行到延伸阶段时，*Taq* 酶的 5'→3'的外切核酸酶功能将探针降解。这样探针上的 R 基团游离出来，所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测仪所接收。随着 PCR 反应的循环进行，PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

5 检测实验室的设置与管理

中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 检测实验室的标准化设置与管理见 GB/T 19438.1—2004 附录 C。

6 试剂和仪器

6.1 试剂

除另有说明，所用试剂均为分析纯；所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.1.1 三氯甲烷。

6.1.2 异丙醇：－20℃预冷。

6.1.3 75%乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水（符合 GB 6682 要求）配制，－20℃预冷。

6.1.4 0.01 mol/L(pH 7.2)的 PBS：配方见附录 A。(121±2)℃，15 min 高压灭菌冷却后，无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL。

6.1.5 中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒[1)]：试剂盒的组成、说明及使用注意事项参见附录 B。

6.2 仪器设备

6.2.1 高速台式冷冻离心机：最大离心力 12 000 r/min 以上。

6.2.2 荧光 PCR 检测仪、计算机。

6.2.3 2℃～8℃冰箱和－20℃冰箱。

6.2.4 微量移液器：0.5 μL～10 μL，5 μL～20 μL，20 μL～200 μL，200 μL～1 000 μL。

6.2.5 组织匀浆器。

6.2.6 混匀器。

7 样品的采集与前处理

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

7.1 取样工具

7.1.1 棉拭子、剪刀、镊子、研钵、Eppendorf 管。

7.1.2 所有上述取样工具必须经(121±2)℃，15 min 高压灭菌并烘干或经 160℃干烤 2 h。

7.2 采样方法

7.2.1 活禽样品

7.2.1.1 咽喉拭子采样，采样时要将拭子深入喉头及上腭裂来回刮 3 次～5 次，取咽喉分泌液。

7.2.1.2 泄殖腔拭子采样，将拭子深入泄殖腔转一圈沾取粪便。

7.2.1.3 将采样后的咽喉拭子和泄殖腔拭子一起放入盛有 1.0 mL PBS 的 Eppendorf 管中，编号备用。

7.2.2 内脏或肌肉样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于研钵中充分研磨，再加 10 mL PBS 混匀，或置于组织匀浆器中，加入 10 mL PBS 匀浆，然后将组织悬液转入无菌 Eppendorf 管中 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液转入另一无菌 Eppendorf 管中，编号备用。

7.2.3 血清或血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌 Eppendorf 管中，编号备用。

7.3 存放与运送

采集或处理的样本在 2℃～8℃条件下保存应不超过 24 h；若需长期保存，须放置－70℃冰箱，但应避免反复冻融（最多冻融 3 次）。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，尽快运送到实验室。

8 操作方法

8.1 样本核酸的提取

在样本处理区进行。

1) 由指定单位提供，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

8.1.1 取 n 个 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。

8.1.2 每管加入 600 μL 裂解液，然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照各 200 μL，一份样本换用一个吸头；再加入 200 μL 三氯甲烷，混匀器上震荡混匀 5 s。于 4℃条件下，12 000 r/min 离心 15 min。

8.1.3 取与 8.1.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇(−20℃预冷)，对每个管进行编号。吸取 8.1.2 离心后各管中的上清液转移至相应的管中，上清液至少吸取 500 μL，注意不要吸出中间层，颠倒混匀。

8.1.4 于 4℃条件下，12 000 r/min 离心 15 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，吸干液体，不同样品应在吸水纸不同地方吸干。加入 600 μL 75%乙醇，颠倒洗涤。

8.1.5 于 4℃条件下，12 000 r/min 离心 10 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液，倒置于吸水纸上，吸干液体，不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

8.1.6 4 000 r/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量加样器尽量将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min。不宜过于干燥，以免 RNA 不溶。

8.1.7 加入 11 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于−70℃冰箱，将核酸转移至反应混合物配制区。

8.2 扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行。

从试剂盒中取出中强毒株 NDV RT-PCR 反应液、*Taq* 酶，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需 PCR 数为 n，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和。每个测试反应体系需使用 15 μL RT-PCR 反应液及 0.25 μL *Taq* 酶。计算各试剂的使用量，加入一适当体积试管中，向其中加入 0.25×n 颗 RT-PCR 酶颗粒，充分混合均匀，向每个 PCR 管中各分装 15 μL，转移至样本处理区。

8.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 7.2.7 中制备的 RNA 溶液 10 μL，使总体积达 25 μL。盖紧管盖后，500 r/min 离心 30 s。

8.4 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。将 7.4 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

反应参数设置：

——第一阶段，反转录 42℃/30 min；

——第二阶段，预变性 92℃/3 min；

——第三阶段，92℃/10 s，45℃/30 s，72℃/1 min，5 个循环；

——第四阶段，92℃/10 s，60℃/30 s，40 个循环，荧光收集设置在第四阶段每次循环的退火延伸时进行。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 质控标准

9.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

9.2.2 阳性对照的 Ct 值应≤30.0，并出现特定的扩增曲线。

9.2.3 如阴性对照和阳性条件不满足以上条件，此次实验视为无效。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线，表明样品中无中强毒株新城疫病毒。

9.3.2 阳性

Ct 值≤30.0，且出现特定的扩增曲线，表示样本中存在中强毒株新城疫病毒。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附　录　A
（规范性附录）
磷酸盐缓冲生理盐水配方

所用试剂均为分析纯以上。

A.1　A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后稀释至 1 000 mL。

A.2　B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6 g，（或 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.6g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6 g）加蒸馏水溶解，最后稀释至 1 000 mL。

A.3　0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲生理盐水的配制

0.2 mol/L A 液 14 mL

0.2 mol/L B 液 36 mL

加氯化钠 18.5 g

用蒸馏水稀释至 1 000 mL

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附　录　B
（资料性附录）
中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 试剂盒组成、说明及使用时的注意事项

B.1　试剂盒的组成

试剂盒的组成见表 B.1。

表 B.1　试剂盒组成

组成(48 tests/盒)	数　　量
裂解液	30 mL×1 盒
中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 反应液	750 μL×1 管
RT-PCR 酶颗粒(带盖 PCR 反应管装)	1 颗/管×12 管
Taq 酶/(5 U/μL)	12 μL×1 管
DEPC 水	1 mL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
阳性对照(非感染体外转录 RNA)	1 mL×1 管

B.2　说明

B.2.1　裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚，为 RNA 提取试剂，外观为红色，于 4℃保存。

B.2.2　DEPC 水，是用 1%DEPC 处理后的去离子水，用于溶解 RNA。

B.2.3　RT-PCR 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

B.3　使用时的注意事项

B.3.1　由于阳性样品中模板浓度相对较高，检测过程中不得交叉污染。

B.3.2　反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

B.3.3　RT-PCR 酶颗粒极易吸潮失活，RT-PCR 酶在室温条件下必须置于干燥器内保存，使用时取出所需数量，剩余部分立即放回干燥器中。

B.3.4　除裂解液外，其他试剂－20℃保存。有效期为 6 个月。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

SN/T 1686—2005

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
新城疫病毒中强毒株检测方法
荧光 RT-PCR 法
SN/T 1686—2005
*
中 国 标 准 出 版 社 出 版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045
网址 www.bzcbs.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 12 千字
2006 年 1 月第一版 2006 年 1 月第一次印刷
印数 1—2 000
*
书号:155066·2-16610 定价 8.00 元

SN/T 1686-2005

食品伙伴网http://www.foodmate.net