



中华人民共和国国家标准

GB/T 27540—2011

猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection of
classical swine fever virus

2011-11-21 发布

2012-03-01 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部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王琴、王泰健、徐璐、范学政、刘俊、蒋春燕、赵启祖、宁宜宝、邹兴启。

猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于猪瘟的诊断和监测,适用于猪活体及其脏器、血液、排泄物和细胞培养物中 CSFV 核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

中华人民共和国农业部公告第 302 号 兽医实验室生物安全技术管理规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSFV:猪瘟病毒(Classical swine fever virus)

Ct 值:达到阈值的循环数(cycle threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

HS Taq 酶:热启动 Taq DNA 聚合酶(HS Taq DNA polymerase)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

荧光 RT-PCR: 荧光逆转录聚合酶链式反应(real time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

4 试剂和材料

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。

- 4.1 Trizol:RNA 抽提试剂,外观为粉红色,分装至棕色瓶中,于 4℃~8℃保存。
- 4.2 氯仿:4℃预冷。
- 4.3 异丙醇:4℃预冷。
- 4.4 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,-20℃预冷。
- 4.5 DEPC 水:去离子水中加入 0.1%DEPC,37℃作用 1 h,(121±2)℃,高压灭菌 15 min。
- 4.6 RNA 酶抑制剂(30 U/μL)。
- 4.7 10×PCR buffer (10 mmol/L pH8.3 Tris-HCl,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂)。
- 4.8 dNTP(2.5 mmol/L)。
- 4.9 用于 RT-PCR 反应的引物浓度为 10 μmol/L,探针浓度为 5 μmol/L,其序列如下:
上游引物 F:5-TACAGGACAGTCGTCAGTAGTTCGA-3