



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3987—2014

牛海绵状脑病特殊风险物质实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection of specified risk materials of bovine spongiform encephalopathy
(BSE) by real-time fluorescent RT-PCR method

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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、北京市兽药监察所、中国合格评定国家认可委员会。

本标准主要起草人：史喜菊、李冰玲、郭志红、马贵平、苏志明、李炎鑫、刘全国。

牛海绵状脑病特殊风险物质实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了牛海绵状脑病特殊风险物质实时荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于牛肉中牛海绵状脑病特殊风险物质的定性检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

实时荧光 PCR real time fluorescent PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.1.2

Ct 值 cycle threshold

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次数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

GFAP: 胶原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

MGB: 探针标记荧光集团 (minor groove binder)

SRM: 牛海绵状脑病特殊风险物质 (specified risk material)

4 主要仪器

4.1 实时荧光 PCR 仪。

4.2 高速台式冷冻离心机 (最高离心力 12 000 g 以上)。

4.3 漩涡振荡器。

4.4 冰箱 (2 ℃~8 ℃冰箱、-20 ℃冰箱、-80 ℃冰箱)。

4.5 微量移液器及各种配套带滤芯吸头 (10 μL、200 μL、1 000 μL)。

4.6 一次性棉签和研磨用具。

5 主要试剂

5.1 总 RNA 提取试剂盒。

5.2 Ready-To-Go™ RT-PCR Beads。

5.3 Taq™ PCR 试剂盒。

5.4 引物和探针序列：

上游引物序列：5'ACC TGC GAC CTG GAG TCC T 3'

下游引物序列：5'CTC GCG CAT CTG CCG 3'

探针序列：5'6-FAM-ACT CGT TCG TGC CGC GC-MGB 3'

也可以使用试剂盒中的引物、探针预混液。

5.5 阳性对照

阳性对照为健康牛的脑或脊髓，也可以使用试剂盒中的阳性 RNA 对照品。

5.6 阴性对照

阴性对照的模板是 DEPC 处理水。

6 方法原理

牛海绵状脑病 99% 的感染性分布在中枢神经组织，主要集中于脑和脊髓。因此，牛海绵状脑病特殊风险物质 (SRM) 的检测主要是检测中枢神经组织，而中枢神经组织的检测是通过检测其标记物——胶原纤维酸性蛋白 (GFAP) 来实现的。本标准以 GFAP mRNA 为检测靶目标，通过实时荧光 RT-PCR 技术检测牛海绵状脑病特殊风险物质。

7 检测步骤

7.1 样品采集与制备

7.1.1 可供检测的样品包括鲜牛肉、冷冻牛肉及其制品。如果样品是组织匀浆，取 100 μL 匀浆液；如果样品是固体，选择表面不同区域，用一次性消毒棉签刮取组织表面，每个样品大约 25 mg。

7.1.2 每个样品加入 600 μL 裂解液（如果使用棉签刮取，加入裂解液后要用力挤压，将棉签内的液体充分挤出）。

7.1.3 加入裂解液的样品可以立即使用，4℃ 条件下保存不超过 48 h；若需长期保存应置 -80℃ 冰箱，但应避免反复冻融。

7.2 核酸提取

7.2.1 取阳性对照 100 μL，加入裂解液 600 μL，与加了裂解液的样品一起进行如下处理。

7.2.2 15℃~30℃ 温育 5 min；加入 0.2 mL 三氯甲烷，剧烈摇动 15 s，15℃~30℃ 温育 2 min~3 min。不超过 12 000 r/min，2℃~8℃ 离心 15 min。

7.2.3 取上层水相，加入 0.5 mL 异丙醇（-20℃ 预冷），15℃~30℃ 温育 10 min，不超过 12 000 r/min，2℃~8℃ 离心 10 min。

7.2.4 弃去上清液，加入 75% 乙醇（-20℃ 预冷）1 mL 洗涤，以不超过 12 000 r/min，2℃~8℃ 离心

5 min。

7.2.5 重复 7.2.4 步骤一次,可获得更多的 RNA。

7.2.6 弃去上清液,4 000 r/min 离心 5 s,将液体吸干,快速干燥 RNA 但不要完全干燥(空气中干燥 5 min~10 min),以免 RNA 不溶。

7.2.7 加入 20 μ L DEPC 水,溶解 RNA,4 000 r/min 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增,若需长期保存需要放置在-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

7.3 实时荧光 RT-PCR 检测

7.3.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 1。

表 1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

试剂	用量
上游引物(10 pmol/ μ L)	0.5 μ L
下游引物(10 pmol/ μ L)	0.5 μ L
探针(10 pmol/ μ L)	0.25 μ L
10 \times PCR Buffer(无 Mg^{2+})	1.25 μ L
dNTP Mix(各 10 mmol/L)	1.25 μ L
Mg^{2+} (25 mmol/L)	3 μ L
Taq DNA 酶	0.25 μ L
反转录磁珠 Bead	1 bead/5 个反应
RNA 模板	3 μ L
DEPC 处理水	15 μ L
总体积	25 μ L

7.3.2 实时荧光 RT-PCR 反应条件

将加入反应液的 PCR 管 5 000 r/min 离心 30 s,按下列条件进行检测。RT-PCR 反应条件设置:

- a) 第一阶段:反转录,42 $^{\circ}$ C,30 min;
 - b) 第二阶段:预变性 94 $^{\circ}$ C,3 min;
 - c) 第三阶段:94 $^{\circ}$ C,10 s;
45 $^{\circ}$ C,30 s;
72 $^{\circ}$ C,1 min,5 个循环;
 - d) 第四阶段:94 $^{\circ}$ C,10 s;
60 $^{\circ}$ C,30 s(收集荧光),40 个循环;
 - e) 第五阶段:40 $^{\circ}$ C,1 min 降温;
- 试验结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

SN/T 3987—2014

8 结果判定

8.1 阈值设定

阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准,根据仪器噪声情况进行调整。

8.2 质控标准

8.2.1 一般要求

检测结果中的阴、阳性对照均应符合以下情况,如果对照不成立,此次试验视为无效。

8.2.2 阴性对照

阴性对照无扩增曲线,或 C_t 值大于 35。

8.2.3 阳性对照

阳性对照出现典型的扩增曲线,且 C_t 值应小于或等于 30.0。

8.3 结果判断和报告

8.3.1 阴性判定

在对照成立的情况下,如果检测样品没有出现扩增曲线,且 C_t 值大于 35,则判断没有检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。

8.3.2 阳性判定

在对照成立的情况下,如果检测样品出现典型的扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,则判断检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。

8.3.3 不确定结果

在对照成立的情况下,如果检测样品的扩增曲线不典型,且 C_t 值大于 30 小于或等于 35,结果不确定,建议重复。重复结果 C_t 值小于或等于 35,则判断检测出牛海绵状脑病特殊风险物质;重复结果 C_t 值大于 35,则判断没有检测出牛海绵状脑病特殊风险物质。
