

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.1—2004

禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection of Avian Influenza Virus

2004-2-15 发布

2004-2-15 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
国家 标 准 化 管 理 委 员 会

发布

前 言

本标准是依据 GB/T1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》制定的。

本标准的附录 A、附录 C 是本标准的规范性附录，附录 B 是本标准的资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、深圳市匹基生物工程股份有限公司。

本标准主要起草人：赖平安、张鹤晓、谷强、王甲正、周琦、杨伟、赖少梅。

本标准系首次发布的国家标准。

禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测的操作方法。
本标准适用于活禽及其产品中禽流感病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准：

荧光 RT-PCR	荧光反转录-聚合酶链反应。
Ct 值	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数。
RNA	核糖核酸。
DEPC	焦碳酸乙二酯。
PBS	磷酸盐缓冲盐水（配方见附录 A）。
Taq酶	Taq DNA聚合酶。

3 原理

禽流感病毒各亚型均属 A 型流感病毒，根据 A 型流感病毒共有基因特定的序列，合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。该探针与禽流感病毒特有的共同基因特异性结合，结合部位位于引物结合区域内。探针的 5'端和 3'端分别标记不同的荧光素，如 5'端标记 FAM 荧光素，它发出的荧光能够被检测仪器接收，称为报告荧光基团（用 R 表示），3'端一般标记 TAMRA 荧光素，它在近距离内能吸收 5'端报告荧光基团发出的荧光信号，称为淬灭荧光基团（用 Q 表示）。

当PCR反应在退火阶段时，一对引物和一条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R所发出的荧光信号；当PCR反应进行到延伸阶段时，Taq酶在引物的引导下，以四种核苷酸为底物，根据碱基配对的原则，沿着模板链合成新链；当链的延伸进行到探针结合部位时，受到探针的阻碍而无法继续，此时的Taq酶发挥它的5'→3'外切核酸酶的功能，将探针水解成单核苷酸，消除阻碍，与此同时标记在探针上的R基团游离出来，R所发出的荧光不再为Q所吸收而被检测仪所接收；在Taq酶的作用下继续延伸过程合成完整的新链，R和Q基团均游离于溶液中，仪器可继续检测到R所发出的荧光信号。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

荧光RT-PCR检测仪
高速台式冷冻离心机（离心速度12 000 r/min以上）
台式离心机（离心速度3 000 r/min）
混匀器
冰箱（2 °C ~ 8 °C和-20 °C两种）
微量可调移液器（10 μL、100 μL、1 000 μL）及配套带滤芯吸头
Eppendorf管（1.5 mL）

4.2 试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，所有试剂均用无RNA酶污染的容器（用DEPC水处理后高压灭菌）分装。

氯仿；

异丙醇：-20 °C 预冷；

PBS：121 ± 2 °C，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 U/mL；

75%乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水（符合 GB 6682 - 92 要求）配制，-20 °C 预冷；

禽流感病毒通用型荧光 RT-PCR 检测试剂盒¹⁾：组成、功能及使用注意事项见附录 B

5 抽样

5.1 采样工具

下列采样工具必须经（121 ± 2） °C，15 min 高压灭菌并烘干：

棉拭子、剪刀、镊子、注射器、1.5 mL Eppendorf 管、研钵。

5.2 样品采集

5.2.1 活禽

取咽喉拭子和泄殖腔拭子，采集方法如下：

——取咽喉拭子时将拭子深入喉头口及上颚裂来回刮3次~5次取咽喉分泌液；

——取泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔转一圈并沾取少量粪便；

——将拭子一并放入盛有1.0 mL PBS的1.5 mL Eppendorf管中，加盖、编号。

5.2.2 肌肉或组织脏器

待检样品装入一次性塑料袋或其它灭菌容器，编号，送实验室。

5.2.3 血清、血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌Eppendorf管中，编号备用。

5.3 样品贮运

样品采集后，放入密闭的塑料袋内（一个采样点的样品，放一个塑料袋），于保温箱中加冰、密封，送实验室。

5.4 样品制备

5.4.1 咽喉、泄殖腔拭子

样品在混合器上充分混合后，用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出，室温放置30 min，取上清液转入无菌的1.5 mL Eppendorf管中，编号备用。

5.4.2 肌肉或组织脏器

取待检样品2.0 g于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨，加10 mL PBS混匀，4 °C，3 000 r/min离心15 min，取上清液转入无菌的1.5 mL Eppendorf管中，编号备用。

5.5 样本存放

制备的样本在2 °C ~ 8 °C条件下保存应不超过24 h，若需长期保存应置-70 °C以下，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。

6 操作方法

6.1 实验室标准化设置与管理

禽流感病毒通用荧光 RT - PCR 检测的实验室规范（见附录 C）。

6.2 样本的处理

在样本制备区进行。

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。如果其它等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

- 6.2.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和（阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出），编号。
- 6.2.2 每管加入 600 μL 裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL ，一份样本换用一个吸头，再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀）。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。
- 6.2.3 取与 6.2.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇（-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷），做标记。吸取本标准 6.2.2 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μL ，不能吸出中间层，颠倒混匀。
- 6.2.4 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μL 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 6.2.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。
- 6.2.6 4 000 r/min 离心 10 s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，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，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 6.2.7 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 PCR 扩增；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

6.3 检测

6.3.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。

从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、*Taq* 酶，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n ，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制见下表。

表 每个样品测试反应体系配制表

试剂	用量
RT-PCR 反应液	15 μL
<i>Taq</i> 酶	0.25 μL

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积中，向其中加入 $0.25 \times n$ 颗 RT-PCR 反转录酶颗粒，充分混合均匀，向每个荧光 RT-PCR 管中各分装 15 μL ，转移至样本处理区。

6.3.2 加样

在样本处理区进行。

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入上述样本处理步骤 6.2.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μL ，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

6.3.3 荧光 RT-PCR 检测

在检测区进行。

将本标准 6.3.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：

第一阶段，反转录 42 $^{\circ}\text{C}$ / 30 min；

第二阶段，预变性 92 $^{\circ}\text{C}$ / 3 min；

第三阶段，92 $^{\circ}\text{C}$ / 10s，45 $^{\circ}\text{C}$ / 30s，72 $^{\circ}\text{C}$ / 1min，5 个循环；

第四阶段，92 $^{\circ}\text{C}$ / 10s，60 $^{\circ}\text{C}$ / 30s，40 个循环，在第四阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

7 结果判定

7.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

7.2 质控标准

7.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

7.2.2 阳性对照的 Ct 值应 <28.0 ,并出现典型的扩增曲线。

否则,此次实验视为无效。

7.3 结果描述及判定

7.3.1 阴性

无Ct值并且无扩增曲线,表示样品中无禽流感病毒。

7.3.2 阳性

Ct值 ≤ 30 ,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在禽流感病毒。

7.3.3 有效原则

Ct >30 的样本建议重做。重做结果无Ct值者为阴性,否则为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
磷酸盐缓冲盐水配方

以下所用试剂均为分析纯。

A.1 A液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g, (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 磷酸盐缓冲盐水的配制

0.2 mol/L A液14 mL

0.2 mol/L B液36 mL

加NaCl 8.5 g

用蒸馏水稀释至1 000 mL

附 录 B
(资料性附录)
试剂盒的组成

B.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做48个检测，包括以下成分：

裂解液	30 mL × 1盒
DEPC水	1 mL × 1管
RT-PCR反应液（内含禽流感病毒的引物、探针）	750 μL × 1管
RT-PCR酶	1颗/管 × 12管
<i>Taq</i> 酶	12 μL × 1管
阴性对照	1 mL × 1管
阳性对照（非感染性体外转录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，外观为红色液体，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 功能

试剂盒可用于禽类相关样品（包括肌肉组织、脏器、咽喉拭子、泄殖腔拭子、血清或血浆等）中禽流感病毒的检测。

B.4 使用时的注意事项

B.4.1 在检测过程中，必须严防不同样品间的交叉污染。

B.4.2 反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。

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

附 录 C (规范性附录)

禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法的实验室规范

C.1 实验室设置要求

实验室设置要求如下：

- 实验室分为三个相对独立的工作区域：样本制备区、反应混合物配制区和检测区；
- 工作区域须有明确标记，避免不同工作区域内的设备、物品混用；
- 每一区域须有专用的仪器设备；
- 整个实验过程中均须使用无 RNA 酶的一次性耗材，用到的玻璃器皿使用前须 250 ℃ 干烤 4 h 以上，以彻底去除 RNA 酶；
- 各区域的仪器设备须有明确标记，以避免设备物品从各自的区域内移出，造成不同的工作区域间设备物品发生混淆；
- 进入各个工作区域严格遵循单一方向顺序，即只能从样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区；
- 在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服，以便于鉴别；离开工作区时，不得将各区特定的工作服带出；
- 实验室清洁时应按样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区的顺序进行；
- 不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

C.2 工作区域仪器设备配置

C.2.1 样本制备区

样本制备区需配置如下仪器设备：

- 2 ~ 8 冰箱；
- 20 ℃ 冰箱；
- 高速台式冷冻离心机 (4 ℓ, 12 000 r/min)；
- 混匀器；
- 微量加样器 (0.5 μL ~ 10 μL, 5 μL ~ 20 μL, 20 μL ~ 200 μL, 200 μL ~ 1 000 μL)；
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.2 反应混合物配制区

样本制备区需配置如下仪器设备：

- 2 ~ 8 冰箱；
- 20 ℃ 冰箱；
- 台式离心机 (3 000 r/min)；
- 混匀器；
- 微量加样器 (0.5 μL ~ 10 μL, 5 μL ~ 20 μL, 20 μL ~ 200 μL, 200 μL ~ 1 000 μL)；
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.3 检测区

检测区需配置如下仪器设备：

- 荧光 PCR 仪 (配计算机)；
- 移动紫外灯；
- 打印机。

C.3 各工作区域功能及注意事项

C.3.1 样本制备区

样本制备区的功能及注意事项如下：

- 标本的保存，核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管在样本制备区进行；
- 避免在本区内不必要的走动。可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。为避免样本间的交叉污染，加入待测核酸后，必须立即盖严含反应混合液的反应管；
- 用过的加样器吸头必须放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁，实验材料(原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等)如出现外溅，必须作清洁处理并作出记录；
- 对实验台适当的紫外照射(254 nm 波长，与工作台面近距离)适合于灭活去污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

C.3.2 反应混合物配制区

反应混合物配制区功能及注意事项如下：

- 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行；
- 用于标本制备的试剂应直接运送至反应混合物配制区，不能经过检测区，在打开含有反应混合液的离心管或试管前，应将其快速离心数秒；
- 在整个本区的实验操作过程中，操作者必须戴手套，并经常更换。工作结束后必须立即对工作区进行清洁。本工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等的化学物质的消毒清洁作用。实验台表面用可移动紫外灯(254 nm 波长)进行照射。

C.3.3 检测区

检测区功能及注意事项如下：

- RT-PCR 扩增及扩增片段的分析在本区内进行；
 - 本区注意避免通过本区的物品及工作服将扩增产物带出。为避免气溶胶所致的污染，应尽量减少在本区内的走动；
 - 完成操作及每天工作后都必须对实验室台面进行清洁和消毒，紫外照射方法与前面区域相同。如有溶液溅出，必须处理并作出记录。本区的清洁消毒和紫外照射方法同前面区域。
-