

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.3—2004

H7 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Method of real-time RT-PCR for the detection

of the Avian Influenza virus subtype H7

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为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：高志强，张鹤晓，郭晋优，刘继红，吴丹。

本标准系首次发布的国家标准。

H7 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了荧光RT-PCR检测H7亚型禽流感病毒的操作方法。
本标准适用于活禽及其产品中H7亚型禽流感病毒的检测。

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：

荧光 RT-PCR	荧光反转录-聚合酶链式反应。
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数。
RNA	Ribonucleic acid, 核糖核酸。
Taq 酶	Taq DNA 聚合酶。
PBS	磷酸盐缓冲盐水。
DEPC	焦碳酸乙二酯。

4 原理

采用TaqMan方法，通过比对禽流感病毒血凝素基因，设计一对仅在H7亚型禽流感病毒血凝素基因间保守的特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。探针的结合部位位于目的扩增片段内部。其中5'端标记FAM荧光素为报告荧光基团（R），3'端标记的TAMRA荧光素（Q）在近距离内能吸收5'端荧光基团发出的荧光信号，称为淬灭荧光基团。反应在退火时，引物和探针同时与目的基因片段结合，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酶发挥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 试剂和材料

5.1 试剂

除特别说明外，本标准所用试剂均为分析纯，所用液体试剂均须使用无RNA酶的容器进行分装。

H7亚型禽流感病毒荧光RT-PCR检测试剂盒¹⁾：试剂盒的组成、说明及使用注意事项见本标准附录A。

氯仿。

异丙醇。

75%乙醇，用新开启的无水乙醇和无RNA酶的水（符合GB 6682-92要求）配制。

0.01 M (pH7.2)的PBS：配方见GB/T 19438.4-2004附录A。121 ± 2 ，15 min 高压灭菌后，

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。

无菌条件下按 10 000 U/mL 加入青霉素和链霉素。

5.2 仪器设备

高速台式冷冻离心机：要求最大离心力在12 000 g以上。

荧光PCR仪。

计算机。

2 ~ 8 冰箱。

-20 冰箱。

微量加样器 (0.5 μ L ~ 10 μ L ; 5 μ L ~ 20 μ L ; 20 μ L ~ 200 μ L ; 200 μ L ~ 1 000 μ L)。

混匀器。

可移动紫外灯：要求近工作台面。

6 样品的采集与前处理

采样过程中样本间不得交叉污染，采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

6.1 取样工具

需要下列取样工具：

——棉拭子；

——剪刀、镊子；

——Eppendorf 管；

——研钵。

以上取样工具必须经 121 \pm 2 ， 15 min 高压灭菌并烘干。

6.2 采样方法

6.2.1 活禽样品

取咽喉拭子和泄殖腔拭子，采集方法为：

——对于咽喉拭子，采取时要深入喉头及上颚裂来回刮 3 次 ~ 5 次取咽喉分泌液；

——取泄殖腔拭子时，将拭子深入泻殖腔转一圈沾取粪便；

——将咽喉拭子和泄殖腔拭子一并放入盛有 1.0 mL PBS 的 Eppendorf 管中备用。

6.2.2 肌肉或脏器样品

用无菌的剪刀、镊子取待检样品 2.0 g 于研钵中充分研磨，加 10 mL PBS 混匀，1 000 g 离心 10 min 后，取上清液转入 Eppendorf 管中备用。

6.2.3 血清或血浆

用无菌注射器直接吸取至 Eppendorf 管内备用。

6.2.4 保存与运送

采集或处理的样本在 2 ~ 8 条件下保存应不超过 24 h，长期保存须在 -70 以下，但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

样品采集后，将采集的样品密封并编号，采用保温壶或泡沫箱加冰密封尽快运送到实验室。

7 操作方法

7.1 实验室的设置与管理

实验室的设置与管理见 GB/T 19438.1-2004 附录 C。

7.2 样本的制备

7.2.1 在样本制备区进行。

7.2.2 样本的制备程序

7.2.2.1 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，对每个管编号标记；

7.2.2.2 每管加入 600 μL 裂解液，然后分别加入待测样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL ，一份样本换一个吸头；再加入 200 μL 氯仿，混匀器上剧烈震荡混匀 5 s。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12 000 g 离心 15 min；

7.2.2.3 取与本标准 7.2.2.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管，加入 500 μL 异丙醇（-20 预冷），对每个管编号标记；

7.2.2.4 吸取本标准 7.2.2.2 离心后各管中的上清液转移至已加入异丙醇的相应管中，上清液至少吸取 500 μL ，不要吸出中间层，颠倒混匀；

7.2.2.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12 000 g 离心 15 min，注意固定离心管方向，即将离心管开口朝离心机转轴方向放置。轻轻倾去上清液，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；

7.2.2.6 加入 600 μL 75%乙醇，颠倒洗涤。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12 000 g 离心 15 min。轻轻倾去上清液，倒置于吸水纸上，沾干液体；

7.2.2.7 4 000 g 离心 10 s 将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量加样器将其吸干，一份样本换一个吸头，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；

7.2.2.8 加入 11 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000g 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，长时间保存，须置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下。

7.3 靶核酸的反转录和扩增

7.3.1 扩增试剂准备与配制

7.3.1.1 在反应混合物配制区进行。

7.3.1.2 从试剂盒中取出相应的 RT-PCR 反应液、*Taq* 酶，待反应液室温下融化后，2 000 g 离心 5 s。设所需 PCR 反应数为 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，加入一试管中，向其中加入 $0.25 \times n$ 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。

7.3.2 加样

7.3.2.1 在样本处理区进行。

7.3.2.2 在各设定的 PCR 管中分别加入本标准 7.2.2.8 制备的 RNA 溶液各 10 μL ，盖紧管盖后，500 g 离心 30 s。

7.3.3 荧光 RT-PCR 反应

7.3.3.1 在检测区进行。

7.3.3.2 将本标准 7.3.2.2 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内并记录样本摆放顺序。

7.3.4 反应参数设置

荧光 RT-PCR 检测 H7 亚型禽流感病毒的反应参数为：

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

——第四阶段，92 $^{\circ}\text{C}$ /10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ /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。

8 结果判定

8.1 结果分析条件设定

8.1.1 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扩增曲线的最高点。

8.1.2 不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

8.2 质控标准

阴性对照的检测结果显示没有特异性扩增，阳性对照的 Ct 值应 < 28.0。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 阳性

Ct值 ≤ 30 ，而且出现明显的扩增线，表明样品中存在H7亚型禽流感病毒。

8.3.2 阴性

无Ct值并且无扩增曲线，表明样品中无H7亚型禽流感病毒。

8.4 有效原则

Ct值 > 30.0 的样本须重做，重做结果无Ct值者为阴性，否则为阳性。

附录 A
(资料性附录)

H7 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 试剂盒组成、说明、功能及使用时的注意事项

A.1 试剂盒组成

每个试剂盒（规格为48反应/盒）包括以下成分：

裂解液	30 mL × 1盒
DEPC水	1 mL × 1管
H7亚型禽流感病毒RT-PCR反应液	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

A.2 说明

A.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，其他试剂保存于-20℃。

A.2.2 DEPC水，是用1%DEPC处理后的去离子水，用于溶解RNA。

A.2.3 RT-PCR反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

A.3 使用时的注意事项

使用时应注意：

- 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。
- 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。