



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.4—2004

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection

of Avian Influenza virus subtype H9

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 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 : 张利峰、张鹤晓、刘继红、郭晋优、刘艳华、杨伟。

本标准系首次发布的国家标准。

H9 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H9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H9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/T19438.1-2004 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。

4 原理

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法是采用 TaqMan 技术。设计一对仅在 H9 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 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，将探针切成单核苷酸，消除阻碍，与此同时标记在探针上的 R 基团游离出来，R 所发出的荧光再不为 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。

5 材料与试剂

5.1 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无 RNA 酶的水配制 (符合 GB 6682 - 92 要求) , -20 °C 预冷

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒¹⁾ : 组成、说明及使用注意事项见附录 A

5.2 仪器与器材

荧光 RT-PCR 检测仪

高速台式冷冻离心机 (最高转速 12 000 r/min 以上)

台式离心机 (最高转速 2 000 r/min)

混匀器

冰箱 (2 °C ~ 8 °C 和 -20 °C 两种)

可移动紫外灯

微量可调移液器及配套带滤芯吸头 (10 μL 、 100 μL 、 1 000 μL)

专用毛细玻璃管或 PCR 管

Eppendorf 管 (1.5 mL)

6 抽样

6.1 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。

6.2 样品采集

6.2.1 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颤裂来回刮 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 ;

——将同一样品的咽喉拭子和泄殖腔拭子一并放入盛有 1.0 mL PBS 的 1.5 mL Eppendorf 管中 , 加盖、编号。

6.2.2 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。

6.2.3 血清、血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌 Eppendorf 管中 , 编号备用。

6.3 样品储运

样品采集后 , 将采集的样品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。

6.4 样品制备

6.4.1 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。

6.4.2 肌肉或组织脏器

取待检样品 2.0 g 于已洗净、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。

6.5 样本存放

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。

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

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 样本的处理

在样本制备区进行。

7.2.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管 ,其中 n 为被检样品、阳性样品与阴性样品的和 (阳性样品、阴性样品在试剂盒中已标出) ,做标记。

7.2.2 每管加入 600 μ L 裂解液 ,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μ L ,一份样本换用一个吸头 ,再加入 200 μ L 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 °C、12 000 r/min 离心 15 min。

7.2.3 取与 6.2.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管 ,加入 500 μ L 异丙醇 (-20 °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 μ L ,不能吸出中间层 ,颠倒混匀。

7.2.4 于 4 °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 μ L 75% 乙醇 ,颠倒洗涤。

7.2.5 于 4 °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)。

7.2.6 4 000 g 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。

7.2.7 加入 11 μ L 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于-70 °C 冰箱。

7.3 检测

7.3.1 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、阳性样品与阴性样品的和 ,每个样品测试反应体系配制见下表。

每个样品测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	Taq 酶
用量	15 μ L	0.25 μ L

根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量 ,加入到适当体积试管中 ,按每4份样品加入1颗RT-PCR 反转录酶颗粒 ,计算应加入的酶颗粒数 ,充分混合均匀 ,向每个荧光RT-PCR管中各分装15 μ L反应混合物液体 ,转移至样本处理区。

7.3.2 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7.1.7中制备的RNA溶液各10 μ L ,盖紧管盖 ,500 r/min 离心 30 s。

7.3.3 荧光 RT-PCR 检测

在检测区进行。

将本标准7.2.2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 °C /30 min；

第二阶段，预变性92 °C/3 min；

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

第四阶段，92 °C/10s，60 °C/30s，40个循环，在第四阶段每次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。

8 结果判定

8.1 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。

8.2 质控标准

8.2.1 阴性样品无 Ct 值或无扩增曲线。

8.2.2 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。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 阴性

无Ct值或无扩增曲线，表示样品中无H9亚型禽流感病毒。

8.3.2 阳性

Ct值≤30，且出现典型的扩增曲线，示样品中存在H9亚型禽流感病毒。

8.3.3 有效原则

Ct>30的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

附录 A
(资料性附录)

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒的组成

A. 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
H9亚型禽流感病毒RT-PCR反应液	750 μL × 1管
RT-PCR酶	1颗/管 × 12管
Taq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。

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 H9亚型禽流感病毒RT-PCR反应液中含有检测H9亚型禽流感病毒的特异性引物、探针及各种离子。

A. 3 使用时的注意事项

A. 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。

A. 3. 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。

A. 3. 3 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。