



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.2—2004

H5 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 H5

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 : 刘环、张鹤晓、赖平安、周琦、刘宁。

本标准系首次发布的国家标准。

H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了H5亚型禽流感病毒荧光RT-PCR操作方法。

本标准适用于活禽及其产品中H5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 禽流感病毒型通用型荧光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。
Taq酶	Taq DNA 聚合酶
PBS	磷酸盐缓冲生理盐水
DEPC	焦碳酸乙二酯

4 原理

采用TaqMan方法，在比对禽流感病毒血凝素基因的基础上，设计一对仅在H5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。该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（用R表示），3'端标记TAMRA荧光素为淬灭荧光基团（用Q表示），它在近距离内能吸收5'端荧光基团发出的荧光信号。反应进入退火阶段时，引物和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反应的循环往复，PCR产物呈指数形式增长，荧光信号也相应增长，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步。

5 试剂和材料

5.1 试剂

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。

氯仿

异丙醇：-20 预冷

75 %乙醇：用新开启的无水乙醇和DEPC水（符合GB6682要求）配制，-20 预冷

0.01 mol /L (pH 7.2) 的PBS：配方见GB/T 19438.4-2004附录A。121 ± 2 , 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。

H5 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。

5.2 仪器设备

5.2.1 高速台式冷冻离心机

最大离心力 12 000 g 以上。

5.2.2 荧光 PCR 检测仪、计算机

5.2.3 2~4 冰箱和-20 冰箱

5.2.4 微量加样器

0.5 μL ~ 10 μL , 5 μL ~ 20 μL , 20 μL ~ 200 μL , 200 μL ~ 1 000 μL。

5.2.5 组织匀浆器

5.2.6 混匀器

5.2.7 可移动紫外灯

6 样品的采集与前处理

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

6.1 取样工具

下列取样工具必须经121 ± 2 , 15 min高压灭菌或经160 干烤2 h。

- 拭子；
- 剪、镊；
- 研钵；
- Eppendorf管 (1.5 mL)。

6.2 采样方法

6.2.1 活禽样品

取咽喉拭子和泄殖腔拭子，具体采集方法如下：

- 咽喉拭子，采取时要将拭子深入喉头及上腭裂来回刮3~5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沾取粪便；
- 将咽喉拭子和泄殖腔拭子一起放入盛有1.0 mL PBS的Eppendorf管中，编号备用。

6.2.2 内脏或肌肉样品

用无菌镊剪夹取待检样品2.0 g于研钵中充分研磨，再加10 mL PBS混匀，或置于组织匀浆器中，加入10 mL PBS匀浆，然后将组织悬液转入无菌Eppendorf管中3 000 r/min离心10 min，取上清液转入Eppendorf管中，编号备用。

6.2.3 血清或血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌Eppendorf管中，编号备用。

6.3 存放与运送

采集或处理的样本在2 ~ 8 条件下保存应不超过24 h；若需长期保存，须放置-70 冰箱，但应避免反复冻融（最多冻融3次）。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，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 样本的处理

在样本处理区进行。

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。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

7.2.1 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,对每个管进行编号。

7.2.2 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 ,吸头反复吸打混匀(一份样本换用一个吸头);再加入200 μL 氯仿,混匀器上震荡混匀5 s(不宜过于强烈,以免产生乳化层,也可用手颠倒混匀)。于4 条件下,12 000 r/min离心15 min。

7.2.3 取与本标准7.2.1中相同数量的1.5 mL灭菌Eppendorf管,加入400 μL 异丙醇(-20 预冷),对每个管进行编号。吸取本标准7.2.2离心后各管中的上清液转移至相应的管中,上清液至少吸取500 μL ,注意不要吸出中间层,颠倒混匀。

7.2.4 12 000 r/min离心15 min(Eppendorf管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,沾干液体,不同样品应在吸水纸不同地方沾干。加入600 μL 75%乙醇,颠倒洗涤。

7.2.5 于4 条件下,12 000 r/min离心10 min(Eppendorf管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,沾干液体,不同样品应在吸水纸不同地方沾干。

7.2.6 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,用微量加样器尽量将其吸干,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。不宜过于干燥,以免RNA不溶。

7.2.7 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RT-PCR扩增或放置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.3 扩增试剂准备与配置

在反应混合物配制区进行。

从试剂盒中取出AI V H5亚型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PCR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,每个样本测试反应体系配制见下表。

表 测试反应体系配制表

试剂	RT-PCR 反应液	Taq 酶
用量	15 μL	0.25 μL

计算好各试剂的使用量,加入一适当体积试管中,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。

7.4 加样

在样本处理区进行。在各设定的PCR管中分别加入本标准7.2.7中制备的RNA溶液各10 μL ,盖紧管盖后,500 r/min离心30 s。

7.5 荧光RT-PCR反应

在检测区进行。将本标准7.4中加样后的PCR管放入荧光PCR检测仪内,记录样本摆放顺序。

循环条件设置

荧光RT-PCR检测H5亚型禽流感病毒的反应参数为:

——第一阶段,反转录42 /30 min;

——第二阶段,预变性92 /3 min;

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

——第四阶段,92 /10 s,60 /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

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品扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准。或可根据仪器噪音情况进行调整。

8.2 质控标准

8.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

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 值并且无扩增曲线，表示样品中无禽流感病毒。

8.3.2 阳性

Ct 值 > 30.0 ，且出现典型的扩增曲线，表示样本中存在禽流感病毒。

8.3.3 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)

H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 试剂盒组成、说明及使用时的注意事项

A. 1 试剂盒的组成

组 成 成 分 (48 tests/盒)	体 积
样本处理试剂	
裂解液	30mL × 1 盒
核酸扩增试剂	
H5 亚型禽流感病毒 RT-PCR 反应液	750 μL × 1 管
RT-PCR 酶 (带盖 PCR 反应管装)	1 颗/管 × 12 管
Taq 酶 (5U/ μL)	12 μL × 1 管
DEPC 水	1mL × 1 管
对照品	
阴性对照	1mL × 1 管
阳性对照 (非感染体外转录 RNA)	1mL × 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，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 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

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 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意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，RT-PCR酶在室温条件下必须置于干燥器内保存，使用时取出所需数量，剩余部分立即放回干燥器中。

A. 3. 4 除裂解液外，其它试剂-20℃保存。有效期为6个月。