



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

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdlijian.com

2004-02-14 发布

2004-02-15 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布



前 言

GB/T 19438—2004 《禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》分为以下四个部分：

- GB/T 19438.1—2004 《禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法》；
- GB/T 19438.2—2004 《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》；
- GB/T 19438.3—2004 《H7 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》；
- GB/T 19438.4—2004 《H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》。

本部分的附录 A 是资料性附录。

本部分由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本部分起草单位：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。

本部分主要起草人：刘环、张鹤晓、赖平安、周琦、刘宁。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本部分规定了 H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 操作方法。

本部分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部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

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部分。

3.1

荧光 RT-PCR

荧光反转录-聚合酶链反应。

3.2

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。

3.3

RNA

核糖核酸。

3.4

Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

3.5

PBS

磷酸盐缓冲生理盐水。

3.6

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(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

5.1.1 三氯甲烷。

5.1.2 异丙醇:−20℃预冷。

5.1.3 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,−20℃预冷。

5.1.4 0.01 mol/L(pH 7.2)的 PBS:配方见 GB/T 19438.1—2004 中附录 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 IU/mL。

5.1.5 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参见附录 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 r/min 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℃±2℃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 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

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。

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(最多冻融三次)。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 中附录 C。

7.2 样本的处理

在样本处理区进行。

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 μ L 裂解液,然后分别加入待测样本、阴性对照、阳性对照各 200 μ L,吸头反复吸打混匀(一份样本换用一个吸头);再加入 200 μ L 三氯甲烷,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 7.2.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管,加入 400 μ L 异丙醇(-20℃ 预冷),对每个管进行编号。吸取 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 μ L,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。加入 600 μ L 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 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 RT-PCR 扩增或放置于 -70℃ 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 AIV 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表 1。

表 1 测试反应体系配制表

试 剂	RT-PCR 反应液/ μ L	Taq 酶/ μ L
用 量	15	0.25

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 μ L,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 7.2.7 中制备的 RNA 溶液各 10 μ L,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 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°C/30 min;

——第二阶段,预变性 92°C/3 min;

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

——第四阶段,92°C/10 s,60°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

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 值应小于 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 H5 亚型禽流感病毒。

8.3.2 阳性

Ct 值小于等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样本中存在 H5 亚型禽流感病毒。

8.3.3 有效原则

Ct 值大于 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 反应/盒)	体 积
样本处理试剂	
裂解液	30 mL×1 盒
核酸扩增试剂	
H5 亚型禽流感病毒 RT-PCR 反应液	750 μ L×1 管
RT-PCR 酶	1 颗/管×12 管
Taq 酶(5 U/ μ L)	12 μ L×1 管
DEPC 水	1 mL×1 管
对照品	
阴性对照	1 mL×1 管
阳性对照(非感染体外转录 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 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,其他试剂-20℃ 保存。有效期为 6 个月。