

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 772—2013
代替 NY/T 772—2004

禽流感病毒RT-PCR检测方法

RT-PCR detection method for avian influenza viruses

2013-09-10 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 772—2004《禽流感病毒 RT-PCR 试验方法》。

本标准与 NY/T 772—2004 相比,主要变化如下:

- 将原标准名称中“试验方法”改为“检测方法”;
- 将原标准中两套操作标准,合并成一套操作标准;
- 将原标准中异硫氰酸胍提取 RNA 方法,改用商品化 RNA 提取试剂提取方法;
- 将原标准中 RT-PCR 检测模式,改为商品化一步法 RT-PCR 试剂盒的检测模式;
- 更新了检测 H7 亚型禽流感病毒的引物序列,新增通用型 HA 和 NA 基因全长的 RT-PCR 检测方法;
- 更新了 RT-PCR 扩增产物与加样缓冲液进行混合的方法;
- 增设检测流程,说明如何搭配使用此标准中含有的多对引物,实现不同的检测目的。

本标准由中华人民共和国农业部兽医局提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:王秀荣、刘朔、陈继明、蒋文明、包红梅、陈化兰。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 772—2004。

禽流感病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了禽流感病毒型特异性 RT-PCR(反转录—聚合酶链式反应)检测技术(各亚型通用),以及禽流感病毒 H5、H7、H9 血凝素(HA)亚型和 N1、N2 神经氨酸酶(NA)亚型的 RT-PCR 检测技术。

本标准适用于检测禽组织、分泌物、排泄物和禽胚尿囊液中禽流感病毒的核酸。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术

3 实验室条件

3.1 仪器

PCR 仪、台式低温高速离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、紫外凝胶成像仪、微量移液器和水浴箱等。

3.2 操作区域

样品处理区要有相应的生物安全设施;RNA 提取区和 RT-PCR 配液区要求高度洁净;电泳区要其他操作区域相互隔离。

3.3 操作者

操作者应接受过 RT-PCR 技术培训;熟悉防止 RNA 降解、核酸污染和溴化乙锭污染的具体措施;熟悉 RT-PCR 检测结果的判断方法。

4 试剂的准备

4.1 试剂

4.1.1 商品化的 RNA 提取试剂盒。

4.1.2 商品化的一步法 RT-PCR 试剂盒。

4.1.3 1.5%琼脂糖凝胶,见 A.1。

4.1.4 1×TAE 缓冲液;见 A.2。

4.1.5 溴化乙锭(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),见 A.3。

4.1.6 核酸电泳加样缓冲液,见 A.4。

4.1.7 商品化的 DNA 分子量标准,要求在 100 bp~1 000 bp 之间有 5 条以上的指示条带。

4.1.8 用已知的含有与 RT-PCR 检测引物(附录 B)相对应的且灭活的禽流感病毒制作的阳性对照标准品(来自商品化试剂盒或者省部级以上的实验室)。

4.1.9 用高压灭菌的蒸馏水作为阴性对照标准品。

4.2 引物

序列见附录 B,浓度均为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,在 RT-PCR 反应体系的最终浓度是 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

5 操作程序

5.1 样品采集和处理

按照 GB/T 18936 中提供的方法进行。

5.2 对照设置

每次检测每对引物,用相应的阳性对照标准品和阴性对照标准品,至少设置一个或一个以上的阴性对照和样品对照。

5.3 RNA 提取

按照 RNA 提取试剂盒的说明书,提取样品和对照的 RNA。提取的 RNA 应随即进行检测,否则应于 -70°C 冻存。

5.4 RNA 扩增体系的配制

按照商品化的一步法 RT-PCR 试剂盒说明书,配制 RT-PCR 反应体系。例如,在 RT-PCR 管中,依次加入 DEPC 水 $13\ \mu\text{L}$ 、 $2\times$ RT-PCR 缓冲液 $25\ \mu\text{L}$ 、RT-PCR 酶混合物 $2\ \mu\text{L}$ 、上下游引物($10\ \mu\text{mol/L}$)各 $2\ \mu\text{L}$ 、待检测的 RNA $6\ \mu\text{L}$;如果同时进行多个样品的检测,可以按照上述比例,将待测的 RNA 以外的溶液混合在一起,然后每个 RT-PCR 管中分别加入 $44\ \mu\text{L}$ 此混合液,再加入 $6\ \mu\text{L}$ 对应样品的 RNA。对于采用 PCR 管底部加热的 PCR 仪,每管加样后,需要再加 PCR 专用的 $20\ \mu\text{L}$ 石蜡油。有时可以选择总体积为 $25\ \mu\text{L}$ 的 RT-PCR 反应体系。

5.5 RT-PCR 反应

按一步法 RT-PCR 试剂盒操作说明,设置反应条件。通常,第一步是 RT,AMV 反转录酶最适反应温度是 42°C ,MMLV 反转录酶最适反应温度是 37°C ,还有一些反转录酶最适反应温度是 50°C ,反转录时间为 $30\ \text{min}$;第二步是灭活反转录酶, 95°C 、 $3\ \text{min}$;第三步是 PCR。各对引物反应条件见附录 B。

5.6 RT-PCR 产物电泳

RT-PCR 结束后,每个 RT-PCR 管加入 $5\ \mu\text{L}$ 核酸电泳加样缓冲液,密闭 RT-PCR 管,充分混合,再每管取 $5\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ 加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,在位于凝胶中央的孔加入 DNA 分子量标准。对于加封石蜡油的 RT-PCR 扩增产物,需要吸取 RT-PCR 产物,按比例加入核酸电泳加样缓冲液充分混匀。加样后,按照每厘米凝胶 $5\ \text{V}$ 电压,电泳 $20\ \text{min}\sim 40\ \text{min}$ (每次电泳时,每隔 $10\ \text{min}$ 观察一次。当加样缓冲液中溴酚蓝电泳过半至凝胶下 $2/5$ 处时,可停止电泳)。电泳后,置于紫外凝胶成像仪下观察,用分子量标准判断 RT-PCR 扩增产物大小。

5.7 RT-PCR 产物测序

RT-PCR 阳性扩增产物,用 Sanger 方法进行序列测定。

6 结果判定

6.1 阳性对照出现相应大小的扩增条带,且阴性对照无此扩增带时,判定检测有效;否则,判定检测结果无效,不能进行下面的判断。

6.2 用附录 B 中的 M-229 或 NP-330 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为禽流感病毒核酸阳性;否则,判定为禽流感病毒核酸阴性。

6.3 用附录 B 中的 H5-380 或 H5-545 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为 H5 亚型禽流感病毒核酸阳性;否则,判定为 H5 亚型禽流感病毒核酸阴性。

6.4 用附录 B 中的 H7-263 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为 H7、H10 或 H15 亚型禽流感病毒核酸阳性(对扩增产物进行测序分析,可以确定是 H7 亚型禽流感病毒核酸阳性,还是 H10 或 H15 亚型禽流感病毒核酸阳性);否则,判定为 H7 亚型禽流感病毒核酸阴性。

6.5 用附录 B 中的 H9-487 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为 H9 亚型禽流感病毒核

酸阳性;否则,判定为 H9 亚型禽流感病毒核酸阴性。

6.6 用附录 B 中的 N1 - 358 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为 N1 亚型禽流感病毒核酸阳性;否则,判定为 N1 亚型禽流感病毒核酸阴性。

6.7 用附录 B 中的 N2 - 377 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为 N2 亚型禽流感病毒核酸阳性;否则,判定为 N2 亚型禽流感病毒核酸阴性。

6.8 用附录 B 中的 HA - WL 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为禽流感病毒核酸阳性;由于该方法灵敏度不高,电泳未出现对应大小的扩增条带,不能判定为禽流感病毒核酸阴性。

6.9 用附录 B 中的 NA - WL 引物检测,电泳出现对应大小的扩增条带,判定为禽流感病毒核酸阳性;由于该方法灵敏度不高,电泳未出现对应大小的扩增条带,不能判定为禽流感病毒核酸阴性。

7 检测流程

7.1 为确定样品是否含有禽流感病毒或其核酸,用通用引物(如 M - 229 或 NP - 330)检测。

7.2 为确定样品是否含有某一(或某些)亚型的禽流感病毒或其核酸,用这一(或这些)亚型引物(如 H5 - 380、H7 - 263、H9 - 487)检测。

7.3 对于大量的待测样品,可以先用通用引物 M - 229 或 NP - 330 进行检测,确定样品是否含有禽流感病毒或其核酸。如果发现阳性样品,再用某一(或某些)亚型引物进行检测,确立样品是否含有这一(或这些)亚型的禽流感病毒的核酸。

7.4 对于大量的待测样品,如果其中流感病毒含量较高,也可以先用通用引物 HA - WL 和/或 NA - WL 检测,确定样品是否含有禽流感病毒或其核酸。如果发现阳性样品,进行扩增产物的核酸序列测定,可以确立禽流感病毒的 HA 和/或 NA 亚型。

附录 A
(规范性附录)
相关试剂的配制

A.1 1.5%琼脂糖凝胶

琼脂糖	1.5 g
0.5×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

微波炉中完全融化,待冷至 50℃~60℃时,加溴化乙锭(EB)溶液 5 μL,摇匀,倒入电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

A.2 1×TAE 电泳缓冲液**A.2.1 配制 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH8.0)**

二水乙二铵四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.2.2 配制 50×TAE 电泳缓冲液

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

用时用灭菌双蒸水稀释 50 倍使用。

A.2.3 配制 1×TAE 电泳缓冲液

50×TAE 电泳缓冲液	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

A.3 溴化乙锭(EB)溶液

溴化乙锭	20 mg
灭菌双蒸水	加至 20 mL

A.4 10×加样缓冲液

聚蔗糖	25 g
灭菌双蒸水	100 mL
溴酚蓝	0.1 g
二甲苯青	0.1 g

附录 B
(规范性附录)
检测引物

检测引物名称、序列、特异性、基因等见表 B. 1。

表 B. 1

引物名称	引物序列(上下两行分别为上下游引物序列)*	产物大小	特异性	PCR 反应条件	基因
M-229	5'-TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3' 5'-AAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3'	229 bp	甲型通用	94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环	M
NP-330 (备选)	5'-CAGRTACTGGCHATAAGRAC-3' 5'-GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG-3'	330 bp	甲型通用	95℃ 30 s, 50℃ 40 s, 72℃ 45 s, 35 个循环	NP
HA-WL	5'-GGGAGCAAAAAGCAGGGG-3' 5'-GGAGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3'	1 778 bp	甲型通用	94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 3 m, 35 个循环	HA
NA-WL	5'-GGGAGCAAAAAGCAGGAGT-3' 5'-GGAGTAGAAACAAGGAGTTTTT-3'	1 413 bp	甲型通用	94℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 3 m, 35 个循环	NA
H5-380	5'-AACTGAGTGTTCAITTTTGTCAT-3' 5'-AATGCACARGGAGGAGGAAGT-3'	380 bp	H5 亚型	94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环	HA
H5-545 (备选)	5'-ACACATGCYCARGACATACT-3' 5'-CTYTGRTTYAGTGTGATGT-3'	545 bp	H5 亚型	94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环	HA
H7-263	5'-AATGCTGARGAAGATGG-3' 5'-CGCATGTTTCCATTYTT-3'	263 bp	H7 亚型	94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环	HA
H9-487	5'-CTCCACACAGAGCAYAATGG-3' 5'-GYACACTTGTGTGTRTC-3'	487 bp	H9 亚型	95℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 40 s, 35 个循环	HA
N1-358	5'-ATTRAATAACAAYGGYATAATAAC-3' 5'-GTCWCCGAAAACYCCACTGCA-3'	358 bp	N1 亚型	94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环	NA
N2-377	5'-GTGTGYATAGCATGGTCCAGCTCAAG-3' 5'-GAGCCYTTCCARTTGTCTCTGCA-3'	377 bp	N2 亚型	94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环	NA

* 序列中含有的简并碱基 W=A/T, Y=C/T, R=A/G, H=A/C/T。