



中华人民共和国国家标准

GB/T 27539—2011

动物流感检测 A 型流感病毒 通用荧光 RT-PCR 检测方法

Animal influenza detection—Method of real-time RT-PCR for detection of
influenza virus A

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、深圳匹基生物工程有限公司。

本标准主要起草人：汪琳、林志雄、周琦、高志强、陈茹、乔彩霞、蒲静、杨伟、梁成珠。

动物流感检测 A 型流感病毒 通用荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了 A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于活动物及其产品中 A 型流感病毒的检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求
GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫
SN/T 1330 进出口生、熟毛皮检验规程

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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(Ct value)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PBS:磷酸盐缓冲液(配方见附录 A)(phosphate buffer saline)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction)

4 原理

流感病毒(influenza virus)属正粘病毒科,根据抗原特性及其基因特性的不同,流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)型。乙型变异性较弱、丙型抗原性比较稳定,仅感染人类;甲(A)型抗原变异性最强,感染人类和其他动物,常引起世界性大流行。编码基质蛋白的 M 基因是 A 型流感病毒共有且较保守。采用 Taqman 技术,针对 M 基因中特定序列,合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针,探针的 5'端标记报告荧光基团(R),3'端标记淬灭荧光基团(Q)。在 PCR 退火阶段,一对引物和一条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 R 所发出的荧光信号;在 PCR 延伸阶段,Taq 酶在引物的引导下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,Taq 酶发挥 5'→3'外切核酸酶的功能,将探针水解成单核苷酸,标记在探针上的 R 基团就游离出来,R 所发出的荧光不为 Q 所吸收而被检测仪所接收,随着 PCR 反应的进行,PCR 产物量与荧光信号呈现正比关系。

5 材料与试剂

5.1 仪器设备

- 5.1.1 荧光 PCR 检测仪。
- 5.1.2 高速微型离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。
- 5.1.3 台式高速离心机(离心速度 3 000 r/min 以上)。

5.2 试剂

- 5.2.1 除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,实验室用水符合 GB/T 6682 的要求。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。
- 5.2.2 DEPC 水(见附录 B)。
- 5.2.3 Trizol。
- 5.2.4 氯仿。
- 5.2.5 异丙醇: -20 ℃ 预冷。
- 5.2.6 PBS: (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。
- 5.2.7 75%乙醇: 用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制, -20 ℃ 预冷。
- 5.2.8 A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测引物、探针序列、反应液体系组成及使用注意事项见附录 B。

6 抽样

6.1 采样工具

下列采样工具应该经(121±2)℃, 15 min 高压灭菌并烘干:

- 棉拭子;
- 剪刀;
- 镊子;
- 注射器;
- 1.5 mL 离心管;
- 研钵。

6.2 样品采集

6.2.1 活动物

取鼻拭子、咽喉拭子和泄殖腔拭子, 采集方法如下:

- 取鼻拭子时将拭子深入鼻腔来回刮 2 次~3 次并旋转, 取鼻腔分泌液;
- 取咽喉拭子时将拭子深入喉头口及上颚裂来回刮 2 次~3 次并旋转, 取咽喉分泌液;
- 取泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔旋转一圈并沾取少量粪便;
- 将采样后的拭子分别放入盛有 1.0 mL PBS 的 1.5 mL 离心管中, 加盖、编号。

6.2.2 脏器或肌肉组织

用无菌镊子采集待检脏器或肌肉组织, 装入一次性塑料袋或其他灭菌容器, 编号。

6.2.3 血清、血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌离心管中,编号备用。

6.2.4 动物皮

采样方法按照 SN/T 1330,将待检样品装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号。

6.3 样品贮运

样品采集后,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,24 h 内送实验室。

6.4 样品处理

6.4.1 拭子

样品在混合器上充分混合后,用灭菌镊子将拭子中的液体挤出,3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 1 mL 转入无菌的 1.5 mL 离心管中备用。

6.4.2 脏器或肌肉组织

取待检样品 2.0 g 于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,加 10 mL PBS 混匀,4 ℃,取上清液 1 mL 转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。

6.4.3 动物皮

先用消毒的镊子、剪刀将动物皮剪成 1 mm³ 大小的颗粒,称取 2.0 g 于无菌的研钵中,加液氮充分研磨后,加 10 mL PBS 混匀,4 ℃,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液 1 mL 转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。

6.5 样品存放

制备的样品在 2 ℃~8 ℃条件下保存应不超过 24 h,若需长期保存应置-70 ℃以下,但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

7 操作方法

7.1 实验室设置标准与生物安全管理

A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测按照 GB/T 27401,GB 19489,GB/T 19495.2 的规定。

7.2 样品核酸提取

7.2.1 在样品制备区进行。取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管,其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和,编号。

7.2.2 每管加入 600 μ L Trizol,分别加入被检样品、阴性对照、阳性对照各 200 μ L,混匀,再加入 200 μ L 氯仿,上下颠倒混匀。于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。

7.2.3 取与 7.2.1 相同数量灭菌的 1.5 mL 离心管,加入等体积异丙醇(-20 ℃预冷),做标记。吸取本标准 7.2.2 各管中的上清液转移至相应的管中,吸取上清液,不能吸出中间层,颠倒混匀。

7.2.4 于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,小心倒去上清,加入 600 μL 75%乙醇(-20℃预冷),颠倒洗涤。

7.2.5 于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,小心倒去上清,晾干。

7.2.6 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 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,若需长期保存应放置-70 ℃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。

荧光 RT-PCR 反应液体体系组成见附录 B,充分混匀后,转移至样品处理区。

7.3.2 加样

在样品处理区进行。

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入样品处理 7.2.6 中制备的 RNA 溶液各 10 μL,盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。

7.3.3 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。

将本标准 7.3.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,记录样品摆放顺序。

循环条件设置:

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,在第四阶段每个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。

8.2.3 当 8.2.1 和 8.2.2 都成立时,此次试验才有效;否则,此次试验视为无效。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线,判为阴性。

8.3.2 阳性

Ct 值小于 30,且出现典型的扩增曲线,判为阳性。

8.3.3 有效原则

Ct 值大于 30 的样品建议重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。

附录 A
(规范性附录)

磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)配方

A.1 A液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A.2 B液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g,(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲生理盐水的配制

0.2 mol/L A液 14 mL

0.2 mol/L B液 36 mL

NaCl 8.5 g

用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

附录 B

(规范性附录)

引物探针序列及 RT-PCR 反应体系组成

B.1 引物探针序列

引物探针序列见表 B.1。

表 B.1 引物探针序列

名称	序列
上游引物	5'-GTC TTC TAA CCG AGG TCG AAA C-3'
下游引物	5'- AAG ATC TGT GTT CTT TCC TGC AAA -3'
探针	5'-(FAM)-CCC TCA AAG CCG AGA TCG C-(TAMRA)-3'

B.2 RT-PCR 反应液体系组成

10×PCR Buffer	1.25 μL
上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
下游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
探针(10 μmol/L)	0.4 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	0.75 μL
dNTPs (25 mmol/L)	0.1 μL
Taq 酶	0.25 μL
RT-PCR 反转录酶颗粒	0.25 颗
补 H ₂ O(RNase-free)至	15 μL

B.3 说明

DEPC 水,是用 1% DEPC 处理后的去离子水,用于溶解 RNA。

B.4 使用时的注意事项

在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

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 反转录酶颗粒极易吸潮失活,应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。