



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 27538—2011

---

## 动物流感检测 A型H1N1流感病毒中 HA、NA的焦磷酸测序检测方法

Animal influenza detection—Method of pyrosequencing for HA and NA in  
influenza virus A (H1N1)

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  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 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：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：徐彪、梁成珠、凌宗帅、张太翔、岳志芹、高宏伟、孙涛、方绍庆、林祥梅、韩雪清、朱来华、张鹤晓、单虎。

# 动物流感检测 A 型 H1N1 流感病毒中 HA、NA 的焦磷酸测序检测方法

## 1 范围

本标准规定了焦磷酸测序技术用于 A 型 H1N1 流感病毒及其墨西哥变异株中的 HA 和 NA 核酸序列检测方法。

本标准适用于 A 型 H1N1 流感病毒通用及 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株的核酸检测。

## 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/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP:三磷酸腺苷(adenosine triphosphate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PBS:磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate balanced solution)

Pyrosequencing:焦磷酸测序

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

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶

## 4 原理

焦磷酸测序是通过测序引物和 PCR 扩增单链 DNA 模板杂交,与 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶和底物(APS)、荧光素孵育,逐一加入四种 dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP),如与模板配对,此 dNTP 与引物的末端形成共价键,释放焦磷酸基团(PPi);ATP 硫酸化酶在 APS 存在的情况下催化焦磷酸形成 ATP,ATP 驱动荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素转化,氧化荧光素发出与 ATP 量成正比的可见光信号;光信号由电荷耦合检测器(CCD)收集并由软件转化为峰。每个光信号的峰高与反应中掺入的核苷酸数目成正比。ATP 和未掺入的 dNTP 由三磷酸腺苷双磷酸酶降解,淬灭光信号,并再生反应体系。

## 5 试剂和材料

- 5.1 除特别说明外,本标准所用试剂为分析纯或生化试剂,所有试剂均用无 RNA 酶污染的器具(用 DEPC 水处理)分装,实验用水符合 GB/T 6682 的规定。
- 5.2 焦磷酸测序用引物(对)序列见附录 A。
- 5.3 AMV 反转录酶。
- 5.4 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.5 Pyro Gold SQA Reagents DNA 序列分析试剂盒或其他等效试剂。
- 5.6 DNTPs。
- 5.7 琼脂糖(电泳纯)。
- 5.8 三氯甲烷。
- 5.9 异丙醇。
- 5.10 70%乙醇:配制方法见附录 B。
- 5.11 DNA 分子量标准品(100 bp ~2 000 bp)。
- 5.12 裂解液:Trizol 或其他等效总 RNA 提取试剂。
- 5.13 PBS:配制方法见附录 B。
- 5.14 10×PCR 缓冲液:建议使用厂家提供,如需配制见附录 B。
- 5.15 电泳缓冲液:配制方法见附录 B。
- 5.16 溴化乙锭贮存液:用水配制成 10 mg/mL。
- 5.17 电泳加样缓冲液:配制方法见附录 B。
- 5.18 磁珠悬液。

## 6 仪器设备

- 6.1 焦磷酸测序仪。
- 6.2 焦磷酸测序仪 96 孔板。
- 6.3 真空吸附器。
- 6.4 PCR 仪。
- 6.5 冷冻离心机(最大离心力 12 000g 以上)。
- 6.6 微量移液器。
- 6.7 电泳仪。
- 6.8 紫外检测仪。
- 6.9 1.5 mL Eppendorf 管。

## 7 采样和样品制备

### 7.1 采样

按照 NY/T 541 和 GB/T 18088 选取样品。样品处理和其他实验活动符合 GB 19489 的有关规定。

### 7.2 样品处理

#### 7.2.1 鼻腔拭子

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,3 000g 离心 5 min,取上清液

转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,编号备用。

### 7.2.2 肌肉或组织脏器

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 ℃,3 000g 离心 15 min,根据需要取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,编号备用。

### 7.3 样本存放

制备的样本在 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)。

## 8 操作方法

### 8.1 病毒 RNA 的提取

8.1.1 取灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,编号。

8.1.2 用微量移液器向每管中各加入 600 μL 裂解液,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL,混匀后再加入 200 μL 三氯甲烷,混匀器上振荡混匀 30 s。于 4 ℃ 12 000g 离心 15 min。

8.1.3 取与 8.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,加入-20 ℃预冷的 500 μL 异丙醇,做标记。吸取本标准 8.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中,上清液应至少吸取 500 μL。

8.1.4 于冷冻离心机上 4 ℃ 12 000g 离心 15 min,小心倒去上清,倒置于吸水纸上,吸干液体,加入 600 μL 70%乙醇,颠倒洗涤。

8.1.5 于 4 ℃ 12 000g 离心 10 min,小心倒去上清,倒置于吸水纸上,尽量沾干液体,室温干燥。

8.1.6 加入 10 μL DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000g 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增;若需长期保存须放置-70 ℃冰箱。

### 8.2 RT-PCR 扩增

#### 8.2.1 反转录

在 3 μL 模板中分别加入 2 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 μL 10 × PCR 缓冲液, 1 μL 2.5 mmol/L dNTP, 0.25 μL 40 U/μL RNA 酶抑制剂, 0.5 μL 5 U/μL AMV 反转录酶, 0.5 μL 20 pmol/μL 焦磷酸测序引物对(见附录 A)中的 RT-PCR 上下游引物,用 DEPC 水补足体积至 10 μL,瞬时离心混合。在 PCR 仪上进行反转录,条件为 42 ℃ 30 min, 98 ℃ 1 min,冷却到 4 ℃。

#### 8.2.2 PCR 反应

##### 8.2.2.1 PCR 反应体系

在反转录后的 10 μL cDNA 溶液中加入 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 20 pmol/μL 焦磷酸测序引物对(见附录 A)中的 RT-PCR 上下游引物各 0.5 μL, DEPC 水补足体积至 50 μL,在 PCR 仪上扩增。

##### 8.2.2.2 PCR 循环条件

8.2.2.2.1 A 型 H1N1 流感病毒 HA 基因: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共循环 45 次; 然后 72 ℃ 再延伸 10 min。

8.2.2.2.2 A 型 H1N1 流感病毒 NA 基因: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s,

72 °C 延伸 30 s, 共循环 45 次; 然后 72 °C 再延伸 10 min。

8.2.2.2.3 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥株 HA 基因; 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 45 次; 然后 72 °C 再延伸 10 min。

8.2.2.2.4 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥株 NA 基因; 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 45 次; 然后 72 °C 再延伸 10 min。

### 8.2.3 对照系统

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

## 8.3 PCR 扩增产物电泳检测

在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面刚刚没过含有溴化乙锭的琼脂糖凝胶; 将 3 μL~6 μL PCR 扩增产物分别和适量电泳加样缓冲液混合, 点样; 以 DNA 分子量标准品做对照; 9 V/cm 恒压电泳, 直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部; 紫外检测仪下观察电泳结果并记录; 扩增到目标片段的 PCR 产物用于测序。

## 8.4 焦磷酸测序

### 8.4.1 测序单链模板的制备

8.4.1.1 测序使用焦磷酸测序专用试剂盒或其他等效试剂。

8.4.1.2 在焦磷酸测序仪 96 孔板中每孔预先加入 44 μL 退火缓冲液, 1 μL 20 pmol/μL 测序引物, 混匀。

8.4.1.3 混匀磁珠悬液, 将需要使用的磁珠总量(按每样 3 μL) 转移到一个 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入结合缓冲液, 使得平均每样达 50 μL。

8.4.1.4 将 50 μL 标记有生物素的 PCR 产物与 50 μL 链霉亲和素包被的磁珠混合, 在室温 25 °C 下振荡孵育 20 min。

8.4.1.5 用真空吸附器将与磁珠结合后的 PCR 产物吸起, 然后在纯水中清洗 30 s; 在 70% 乙醇中清洗 5 s; 变性缓冲液洗 5 s; 最后移到洗涤缓冲液中清洗 10 s。

8.4.1.6 真空吸附器放入含有焦磷酸测序引物的板中, 摇动, 释放磁珠。将样品放入 80 °C 烘箱 2 min, 再冷却到室温。

### 8.4.2 测序反应

测序反应在 28 °C 下于焦磷酸测序仪上进行, 加样使用 600 mb/8 ms 的加样压力和时间, 每轮反应时间 65 s。引物链随着不同 dNTP 的加入而延伸。随着核酸的结合, CCD 摄像机检测到发出的光信号, 读出 DNA 序列。

## 8.5 结果判定

### 8.5.1 A 型 H1N1 流感病毒的确定

8.5.1.1 H1 和 N1 RT-PCR 反应均为阳性的, 进行焦磷酸测序分析, 测序片段与 H1、N1 目标片段完全相同的, 确定为 A 型 H1N1 流感病毒亚型。

8.5.1.2 H1 和 N1 RT-PCR 反应均为阳性的, H1 和 N1 测序片段与目标片段有一个以上碱基不同定为可疑, 进行 HA 或 NA 基因全序列测定, 确定其亚型和毒株, 如为 H1N1 变异株, 建议将其作为新序列公布, 以供其他诊断参考。

8.5.1.3 H1、N1 RT-PCR 反应全部或有一个为阴性的判定为非 A 型 H1N1 流感病毒。

## 8.5.2 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株的确定

8.5.2.1 8.5.1 中确定为 A 型 H1N1 流感病毒的样品,建议采用 A.2 中的引物,按照 8.1 到 8.4 的程序进行测序。

8.5.2.2 所得序列参照 8.5.1 中的方法,对照附录 C 中的 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株的目标片段确定是否为 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株。

## 9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 要求执行。

## 10 废弃物处理

检测过程中的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附录 A  
(规范性附录)  
RT-PCR 及测序引物

A.1 A 型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 及测序引物

H1 基因上游引物(88 bp)	5'-TTTGGCGATCTACTCCACAGTC-3'	
H1 基因下游引物	5'-ACCCATTAGAACACATCCAGAAGC-3'	5'生物素标记
H1 基因测序引物	5'-AGAACACATCCAGAAGC-3'	
N1 基因上游引物(249 bp)	5'-AATTGGCATGGCTCAAATCG-3'	
N1 基因下游引物	5'-TGGATCCCAAATCATCTCAAAA-3'	5'生物素标记
N1 基因测序引物	5'-CGTTTAAATACGGCAAT-3'	

A.2 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株 RT-PCR 及测序引物

H1 基因上游引物(86 bp)	5'-GAAGACAAGCATAACGGGAAAC-3	
H1 基因下游引物	5'-AGGATCCAGCCAGCAATGTTAC-3	5'生物素标记
H1 基因测序引物	5'-CAAGCATAACGGGAAA-3	
N1 基因上游引物(147 bp)	5'-GGGAATCAAAATCAGATTGAAACA-3	
N1 基因下游引物	5'-GGAATTGCCCGCTAATTTCA-3	5'生物素标记
N1 基因测序引物	5'-CAACTTTGCTGCTGG-3	



**附录 B**  
(规范性附录)  
**试剂配制**

**B.1 70%乙醇**

取 70 mL 乙醇加蒸馏水稀释定容至 100 mL。

**B.2 磷酸盐缓冲生理盐水配方****B.2.1 A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液)**

一水合磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

**B.2.2 B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液)**

七水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )53.6 g,[或十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )71.6 g 或二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )35.6 g]加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

**B.2.3 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
氯化钠	8.5 g

用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

**B.3 10×PCR 缓冲液**

500 mmol/L KCl  
100 mmol/L Tris-Cl(pH8.3,室温下)  
15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$   
在 1.05 kg/cm<sup>2</sup> 高压下蒸汽灭菌 10 min。分装后贮存在-20 ℃。

**B.4 电流缓冲液****B.4.1 贮存液(50×)**

Tris	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	100 mL

加蒸馏水至 1 000 mL。

**B.4.2 使用液**

将上述贮存液做 50 倍稀释。

**B.5 溴化乙锭贮存液**

取 1 g 溴化乙锭加蒸馏水稀释定容至 100 mL,磁力搅拌数小时,确保完全溶解。然后用铝箔包裹容器或将溶液保存于棕色瓶中,于室温保存。

**B.6 电泳加样缓冲液**

溴酚蓝	0.25 g
-----	--------

蔗糖	40.0 g
----	--------

加水稀释至 100 mL。

附 录 C  
(规范性附录)  
已知亚型目标片段

A 型 H1N1 流感病毒 H1 目标片段:GGGGGCAAT

A 型 H1N1 流感病毒 N1 目标片段:GGTGTTTGGATAGG

A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株 H1 目标片段:TGCAAAC TAAGAGGGGTA

A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株 N1 目标片段:CAGTCAGTGGTT

---