



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 35900.3—2018

---

## 动物流感检测 第3部分：H1和H3亚型流感病毒核酸 双重荧光 RT-PCR 检测方法

Animal influenza detection—Part 3: Method of duplex real-time RT-PCR for  
the detection of H1 and H3 subtype influenza virus

2018-02-06 发布

2018-09-01 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

订单号: 0100191211052077 防伪编号: 2019-1211-0427-0605-7798 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

## 前 言

GB/T 35900《动物流感检测》目前分为 3 个部分：

——第 1 部分：H1 亚型流感病毒核酸荧光 RT-PCR 检测方法；

——第 2 部分：H3 亚型流感病毒核酸荧光 RT-PCR 检测方法；

——第 3 部分：H1 和 H3 亚型流感病毒核酸双重荧光 RT-PCR 检测方法。

本部分为 GB/T 35900 的第 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本部分起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：蒲静、高志强、谷强、刘环、吴丹、乔彩霞、张伟、张鹤晓、张利峰。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

## 引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到本文件 4.1.8 与“H1 和 H3 亚型流感病毒双重荧光 RT-PCR 检测引物和探针序列”相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意向任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人:中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

地址:北京市朝阳区甜水园街 6 号。

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

# 动物流感检测

## 第 3 部分:H1 和 H3 亚型流感病毒核酸 双重荧光 RT-PCR 检测方法

### 1 范围

GB/T 35900 的本部分规定了同时检测 H1 和 H3 亚型流感病毒核酸的双重荧光 RT-PCR 操作方法。

本部分适用于禽和猪及其产品中 H1 和 H3 亚型流感病毒核酸的检测。

### 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/T 19438.1—2004 禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 RT-PCR	实时荧光反转录聚合酶链反应(real-time reverse transcript polymerase chain reaction)
BHQ1	无荧光淬灭基团(black hole quencher-1)
$C_t$ (或 $C_p$ )值	每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数(cycle threshold, or crossing point)
cRNA	互补 RNA(complement RNA)
DEPC	焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)
FAM	羧基荧光素(carboxy fluorescein)
HA	血凝素(hemagglutinin)
HEX	六氯-6-甲基荧光素(hexachloro fluorescein)
LNA	锁核酸(locked nucleic acid)
MGB	小沟结合物(minor groove binder)
PBS	磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)
RNA	核糖核酸(ribonucleic acid)

### 4 试剂和材料

#### 4.1 试剂

4.1.1 总则:除非另有说明,所用试剂均为分析纯,所用液体试剂均需使用无 RNA 酶的容器进行分装。

- 4.1.2 TRIzol: 2℃~25℃保存。
- 4.1.3 氯仿: 2℃~8℃预冷。
- 4.1.4 异丙醇: -20℃预冷。
- 4.1.5 DEPC水: 见附录A中A.1。
- 4.1.6 75%乙醇: 用新开启的无水乙醇和DEPC水配制, -20℃预冷。
- 4.1.7 PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素): 配方见A.2。
- 4.1.8 引物和探针序列及反应液配方: 见附录B。
- 4.1.9 阳性对照为灭活的H1和H3亚型动物流感病毒混合液, 或H1和H3亚型流感病毒HA基因体外转录cRNA混合液; 阴性对照为已知流感病毒阴性的禽或猪组织悬液。

## 4.2 仪器设备及耗材

- 4.2.1 荧光PCR检测仪及配套反应管(板)。
- 4.2.2 高速台式冷冻离心机(最高离心速度不低于12 000 r/min)。
- 4.2.3 台式离心机。
- 4.2.4 振荡器。
- 4.2.5 组织匀浆器。
- 4.2.6 冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)。
- 4.2.7 微量移液器(5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套吸头(无核酸酶)。
- 4.2.8 1.5 mL离心管(无核酸酶)和5 mL采样管。

## 5 实验室的标准化设置与生物安全管理

本方法的实验室设置与管理见GB/T 19438.1—2004附录C; 实验室生物安全管理见GB 19489。

## 6 样品的采集与前处理

### 6.1 总则

采样过程中样本不得交叉污染, 采样及样品前处理过程中应戴一次性手套。

### 6.2 采样及处理工具

- 6.2.1 采样专用商品化棉拭子、剪刀、镊子、研钵、5 mL采样管、一次性采样袋。
- 6.2.2 除棉拭子和采样袋外, 上述取样工具应经121℃±2℃, 15 min高压灭菌并烘干或经160℃干烤2 h。

### 6.3 样品采集

#### 6.3.1 拭子样品

活动物采集拭子样品。根据动物种类可采集咽喉拭子、泄殖腔拭子(禽类)或鼻拭子(猪)。采集方法如下:

- 取咽喉拭子时将拭子深入喉头及上颚裂来回刮2次~3次并旋转, 取分泌液;
- 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;
- 取鼻拭子时将拭子深入鼻腔来回刮2次~3次并旋转, 取分泌物。

将采样后的拭子放入盛有2.0 mL PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)的采样管中, 编号。

### 6.3.2 组织样品

病死动物采集肺脏或气管等组织。用无菌剪、镊采集待检组织,装入一次性采样袋或其他灭菌容器,编号。

### 6.4 样品贮运

样品采集后置保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,24 h 内送实验室。

### 6.5 样品处理

#### 6.5.1 拭子样品

样品在振荡器上充分混合后,将拭子中的液体挤出,3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 1.0 mL 转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。

#### 6.5.2 组织样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于研钵或组织匀浆器中充分研磨,再加 10.0 mL PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)混匀,3 000 r/min 离心 5 min 后,取 1.0 mL 上清液转入无菌 1.5 mL 灭菌离心管中,编号备用。

### 6.6 样品存放

采集或处理好的样品在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置 -70℃ 冰箱,但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

## 7 操作方法

### 7.1 样品核酸提取

7.1.1 在样本制备区进行,采取 TRIzol 裂解法提取;也可采用其他等效的 RNA 提取方法。

7.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用  $n$  表示,取  $n$  个灭菌 1.5 mL 离心管,逐管编号。

7.1.3 每管加入 600  $\mu$ L TRIzol。

7.1.4 每管对应编号分别加入 200  $\mu$ L 待检样品、阳性对照或阴性对照,混匀。

7.1.5 每管加入 200  $\mu$ L 氯仿,充分颠倒混匀。于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min。

7.1.6 新取  $n$  个灭菌的 1.5 mL 离心管,逐管编号,每管加入 500  $\mu$ L 异丙醇(-20℃ 预冷)。

7.1.7 吸取本标准 7.1.5 各管中的上清液 500  $\mu$ L,转移至 7.1.6 相应的管中,避免吸出中间层,颠倒混匀。

7.1.8 于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min,轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,沥干液体,不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

7.1.9 每管加入 600  $\mu$ L 75%乙醇(-20℃ 预冷),颠倒洗涤。

7.1.10 于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,沥干液体,不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

7.1.11 4 000 r/min 离心 10 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量移液器尽量将其吸干。注意一份样本换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面。

7.1.12 室温干燥 3 min。不宜过于干燥,以免 RNA 不溶。

7.1.13 每管加入 11  $\mu$ L DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,获得 RNA 溶

液,冰浴保存备用(4℃保存不超过8h,若需长期保存应放置-70℃冰箱)。

## 7.2 扩增试剂的准备与配制

7.2.1 反应混合物配制区进行。

7.2.2 每个检测反应体系需使用40μL荧光RT-PCR反应液。根据7.1.2中提到的*n*值,按表B.2配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管40μL。转移反应管至样本制备区。

## 7.3 加样

7.3.1 在样本制备区进行。

7.3.2 在上述7.2.2的反应管中分别加入7.1.13中制备的RNA溶液10μL,使每管总体积达到50μL,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,瞬时离心。

## 7.4 荧光RT-PCR反应

7.4.1 在检测区进行。

7.4.2 应使用能采集并区分FAM和HEX这两种不同荧光信号的多通道荧光PCR仪。

7.4.3 将7.3.2中加样后的反应管放入荧光PCR检测仪内,编辑样品表后,选定FAM检测通道读取H3亚型流感病毒核酸的检测结果,并选择MGB无荧光淬灭基团;选定HEX检测通道读取H1亚型流感病毒核酸的检测结果,并选择BHQ1作为无荧光淬灭基团。反应参数设置如下:

——第一阶段,反转录42℃/30min;

——第二阶段,预变性94℃/3min;

——第三阶段,94℃/15s,50℃/10s,60℃/35s,40个循环,在第三阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验结束后,根据收集的荧光曲线和*C<sub>t</sub>*(或*C<sub>p</sub>*)值判定结果。

## 8 结果判定

### 8.1 结果分析条件设定

阈值设定原则:根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。

### 8.2 实验成立的条件

8.2.1 阴性对照两个检测通道均无*C<sub>t</sub>*(或*C<sub>p</sub>*)值并且无扩增曲线。

8.2.2 阳性对照两个检测通道均出现典型扩增曲线(参见附录C),且*C<sub>t</sub>*(或*C<sub>p</sub>*)值均应≤30。

8.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件,此次试验视为无效。

### 8.3 结果描述及判定

#### 8.3.1 阴性

两个检测通道均无*C<sub>t</sub>*(或*C<sub>p</sub>*)值并且无典型扩增曲线,表示样品中无H1亚型和H3亚型流感病毒核酸。

#### 8.3.2 双检测通道阳性

两个检测通道出现两条对应的典型扩增曲线,且*C<sub>t</sub>*(或*C<sub>p</sub>*)值≤30,表示样品中同时存在H1亚型和H3亚型流感病毒核酸。



### 8.3.3 单检测通道阳性

如仅 FAM 检测通道出现典型扩增曲线,且  $C_t$ (或  $C_p$ )值 $\leq 30$ ,而 HEX 检测通道无  $C_t$ (或  $C_p$ )值并且无扩增曲线,表示样品中存在 H3 亚型流感病毒核酸,但不含有 H1 亚型流感病毒核酸。

如仅 HEX 检测通道出现典型扩增曲线,且  $C_t$ (或  $C_p$ )值 $\leq 30$ ,而 FAM 检测通道无  $C_t$ (或  $C_p$ )值并且无扩增曲线,表示样品中存在 H1 亚型流感病毒核酸,但不含有 H3 亚型流感病毒核酸。

上述结果描述及判定可参见表 1。

表 1 结果描述与判定

FAM 检测通道	HEX 检测通道	结果描述判定
阳性	阳性	同时存在 H1 亚型和 H3 亚型流感病毒核酸
阳性	阴性	存在 H3 亚型流感病毒核酸,但不含有 H1 亚型流感病毒核酸
阴性	阳性	存在 H1 亚型流感病毒核酸,但不含有 H3 亚型流感病毒核酸
阴性	阴性	无 H1 亚型和 H3 亚型流感病毒核酸

### 8.3.4 有效原则

任一检测通道的  $C_t$ (或  $C_p$ )值 $> 30$ ,且出现典型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的,判相应检测通道的流感亚型为阳性,否则判为阴性。

附录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 DEPC 水配方

将 DEPC 加入去离子水(符合 GB/T 6682 要求)中至终浓度为 0.1%(体积比),充分混合均匀后作用 12 h,分装,121 °C ± 2 °C 高压灭菌 30 min,冷却后冷藏备用。

A.2 磷酸盐缓冲液(PBS)配方(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)

A.2.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  7.6 g,溶于蒸馏水中,最后定容至 1 000 mL。

A.2.2 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,最后定容至 1 000 mL。

A.2.3 0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL,加 NaCl 8.5 g,牛血清白蛋白 5 g,用蒸馏水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后,无菌条件下分别按 10 000 U/mL 加入青霉素和链霉素。

## 附录 B

(规范性附录)

## 引物探针序列及荧光 RT-PCR 反应液配方

## B.1 引物探针序列

H1 和 H3 亚型流感病毒核酸双重荧光 RT-PCR 检测方法所用的引物探针序列见表 B.1。

表 B.1 引物探针序列

引物或探针名称	序列(5'-3')	基因组位置	检测靶基因
H1 上游引物	CAGATTYTGGCGATCTAYTC	1 617 nt~1 636 nt	H1 亚型流感病毒 HA 基因
H1 下游引物	GACCCATTAGARCACATCCAG	1 688 nt~1 708 nt	
H1 LNA 短探针	[HEX]CCCCAGGAGAC[BHQ1]	1 665 nt~1 676 nt	
H3 上游引物	TGGATTTCMTTYGCCATATCAT	1 597 nt~1 618 nt	H3 亚型流感病毒 HA 基因
H3 下游引物	GCAAATGTTGCAYCTRATR TTG	1 674 nt~1 695 nt	
H3 MGB 短探针	[FAM]TGGCARGCCACAT[MGB]	1 654 nt~1 667 nt	

注 1: H1 和 H3 的上游、下游引物均为简并引物, H1 短探针为 LNA 修饰的荧光素双标记短探针, 斜体加粗字母表示该碱基用 LNA 进行修饰; H3 探针为 MGB 修饰的短探针。

注 2: 引物和探针可由生物公司合成, 纯度为 HPLC 级, 用 DEPC 水溶解并稀释至终浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

注 3: 引物探针是根据已发布的毒株序列进行设计, H1 引物探针的基因组位置参考毒株 A/swine/Jiangsu/s16/2011(H1N1) HA 序列(GenBank 登录号 JF820285); H3 引物探针的基因组位置参考毒株 A/Swine/Minnesota/593/99 (H3N2) HA 序列(GenBank 登录号 AF251427.2)。

## B.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

H1 和 H3 亚型流感病毒核酸双重荧光 RT-PCR 反应液配方见表 B.2。

表 B.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

组 分	1 个检测体系的加入量
5 $\times$ RT 缓冲液 <sup>a</sup>	10.0 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	4.0 $\mu\text{L}$
dNTP(2.5 mmol/L)	2.0 $\mu\text{L}$
H1 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
H1 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
H1 LNA 短探针(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.5 $\mu\text{L}$
H3 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$

表 B.2 (续)

组 分	1 个检测体系的加入量
H3 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
H3 MGB 短探针(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.5 $\mu\text{L}$
M-MLV 反转录酶(200 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
<i>Taq</i> 酶 <sup>b</sup> (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
DEPC 水	11.0 $\mu\text{L}$
<sup>a</sup> 5 $\times$ RT 缓冲液的组成为:375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl <sub>2</sub> 、50 mmol/L DTT、250 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3, 25 $^{\circ}\text{C}$ )。 <sup>b</sup> <i>Taq</i> 酶:具有 5' $\rightarrow$ 3'外切活性。	

### B.3 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。

附录 C  
(资料性附录)  
典型扩增曲线示意图

H1 和 H3 亚型流感病毒核酸双重荧光 RT-PCR 检测方法阳性和阴性典型扩增曲线见图 C.1。

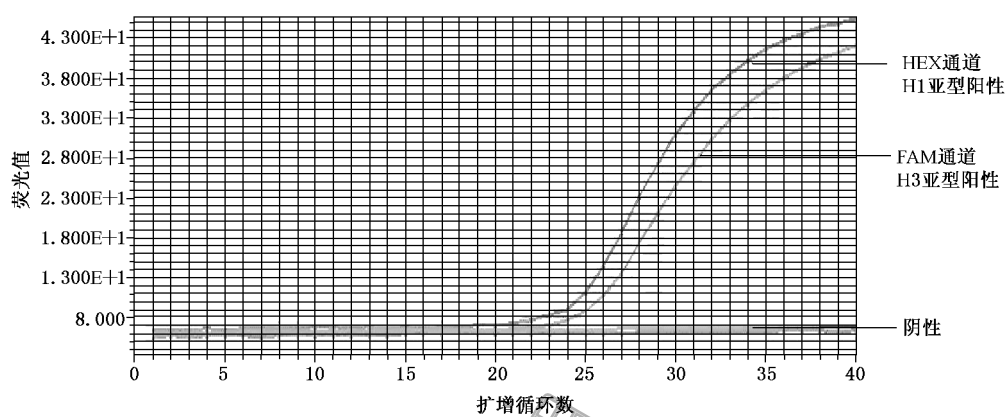


图 C.1 H1 和 H3 亚型流感病毒核酸双重荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图

全国动物卫生标准化技术委员会

订单号: 0100191211052077 防伪编号: 2019-1211-0427-0605-7798 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

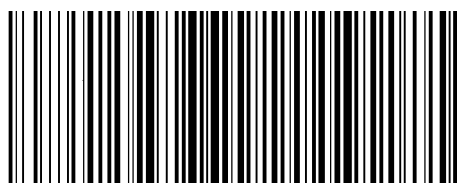
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网  
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 35900.3-2018  
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会  
订单号: 0100191211052077  
防伪号: 2019-1211-0427-0605-7798  
时 间: 2019-12-11  
定 价: 24元



GB/T 35900.3-2018

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
动 物 流 感 检 测  
第 3 部 分 : H1 和 H3 亚 型 流 感 病 毒 核 酸  
双 重 荧 光 RT-PCR 检 测 方 法

GB/T 35900.3—2018

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年2月第一版

\*

书号: 155066·1-59530

版权专有 侵权必究