



中华人民共和国国家标准

GB/T 35806—2018

动物流感检测 H7N9 亚型流感病毒 双重荧光 RT-PCR 检测方法

Animal influenza detection—Protocol of duplex real-time RT-PCR
for influenza virus subtypes H7 and N9

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

订购号: 0100191211052073 防伪编号: 2019-1211-0406-3513-4625 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

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 35806-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052073
防伪号: 2019-1211-0406-3513-4625
时 间: 2019-12-11
定 价: 21元

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动物流感检测 H7N9 亚型流感病毒
双重荧光 RT-PCR 检测方法

GB/T 35806—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: 155066·1-59180

版权专有 侵权必究

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国出入境检验检疫协会、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:蒲静、高志强、汪琳、乔彩霞、张锡全、周琦、张鹤晓、张伟、尹羿、柏亚铎、刘艳华、刘环、王秀荣、包红梅、韩雪清、王慧煜。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052073 防伪编号: 2019-1211-0406-3513-4625 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

动物流感检测 H7N9 亚型流感病毒 双重荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了同时检测 H7 和 N9 亚型动物流感病毒核酸的 TaqMan 双重荧光 RT-PCR 操作方法。

本标准适用于 H7 和 N9 亚型动物流感病毒核酸的快速检测和筛查。

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。

Ct(或 Cp)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(Threshold Cycle, or Crossing Point)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate)

FAM:羧基荧光素(Carboxyfluorescein)

HA:血凝素(Hemagglutinin)

HEX:六氯-6-甲基荧光素(Hexachloro fluorescein)

MGB:小沟结合物(Minor Groove Binder)

NA:神经氨酸酶(Neuraminidase)

TAMRA:羧基四甲基罗丹明(Carboxytetramethylrhodamine)

荧光 RT-PCR:实时荧光反转录聚合酶链反应(Real-time RT-PCR)

4 试剂和材料

4.1 试剂

4.1.1 总则:除另有说明,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:配方见 A.1。

- 4.1.6 75 %乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制, -20 °C 预冷。
- 4.1.7 PBS(含青霉素和链霉素):配方见 A.2。
- 4.1.8 H7 和 N9 亚型流感病毒双重荧光 RT-PCR 检测引物、探针序列,反应液配方见附录 B。
- 4.1.9 阳性、阴性对照
- 阳性对照:为灭活的 H7N9 亚型流感病毒液或体外转录的 H7 和 N9 cRNA。
- 阴性对照:为已知流感病毒阴性的动物组织悬液。

4.2 仪器设备

- 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(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 °C ~ 8 °C 和 -20 °C 两种)。
- 4.2.7 微量移液器(5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套吸头。
- 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 中的附录 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,注意无菌操作。

6.2 采样工具

- 6.2.1 采样专用商品化棉拭子、剪刀、镊子、研钵、5 mL 采样管、商品化一次性采样袋。
- 6.2.2 除商品化棉拭子、采样袋外,上述采样工具应经 121 °C ± 2 °C, 15 min 高压灭菌并烘干或经 160 °C 干烤 2 h。

6.3 样品采集

6.3.1 拭子样品

根据动物种类,可采集咽喉拭子、泄殖腔拭子(禽)或鼻拭子(猪等其他动物)。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(含青霉素和链霉素)的采样管中,编号。

6.3.2 组织样品

病死禽采集肺脏或气管分泌物等组织;其他动物用无菌剪、镊采集肺脏等组织脏器,装入无菌采样

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 于研钵中充分研磨,再加 10.0 mL PBS(含青霉素和链霉素)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 ℃冰箱中,但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

6.7 其他样品说明

急性感染且出现病毒血症的动物也可采集全血分离血清或血浆进行检测。

H7N9 流感病毒疫情监测需要采集环境样品,应根据具体环境情况采集可能含有流感病毒的样品,如笼具表面、禽鸟粪便、产品加工砧板或用具表面等环境样品。

7 双重荧光 RT-PCR 检测操作方法

7.1 样本核酸的提取

7.1.1 在样本制备区进行,采取 TRIzol 裂解法提取。也可采取其他等效的 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 μ L TRIzol。

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

7.1.5 每管加入 200 μ 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 μ L 异丙醇(-20 ℃预冷)。

7.1.7 吸取 7.1.5 各管中的上清液 500 μ 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 μ 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 μ 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。提取的 RNA 应立即进行荧光 RT-PCR 扩增,或者 4 ℃ 保存不超过 8 h;若需长期保存应放置 -70 ℃ 冰箱中。

7.2 双重荧光 RT-PCR 扩增试剂的准备与配制

在反应混合物配制区进行。

每个检测反应体系需使用 15 μL 荧光 RT-PCR 反应液。根据 7.1.2 中提到的 n 值,按 B.2 配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管 15 μL。转移反应管至样本制备区。

7.3 加样

在样本制备区进行。

在上述 7.2 的反应管中分别加入 7.1.13 中制备的 RNA 溶液 10 μL,使每管总体积达到 25 μL,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

7.4 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。

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

将 7.3 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 H7 亚型流感病毒检测结果,并选择 TAMRA 淬灭基团;选定 HEX(或 VIC)检测通道读取 N9 亚型流感病毒检测结果,并选择无荧光淬灭基团。之后如下设置反应参数:

- 第一阶段,反转录 42 ℃/30 min;
- 第二阶段,预变性 94 ℃/3 min;
- 第三阶段,92 ℃/15 s,53 ℃/10 s,60 ℃/35 s,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 Ct(或 Cp)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 质控标准

8.2.1 阴性对照通过两个检测通道读取数据均无 Ct(或 Cp)值并且无扩增曲线。

8.2.2 阳性对照通过两个检测通道读取数据出现两条对应的特征性扩增曲线,且 Ct(或 Cp)值均应 ≤ 30.0 。

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 Ct(或 Cp)值并且无特征性扩增曲线,表明样品中无 H7 亚型和 N9 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特征性扩增曲线,且 Ct(或 Cp)值 ≤ 30.0 ,表明样本中同时存在 H7

亚型和 N9 亚型流感病毒核酸。

8.3.3 单检测通道阳性

当有一个检测通道出现特征性扩增曲线时,按照下面的原则进行结果判定:

- 如仅 FAM 检测通道出现特征性扩增曲线,且 Ct(或 Cp)值 ≤ 30.0 ,而 HEX(或 VIC)检测通道无 Ct(或 Cp)值并且无扩增曲线,表示样本中存在 H7 亚型流感病毒核酸,但不含有 N9 亚型流感病毒核酸。
- 如仅 HEX(或 VIC)检测通道出现特征性扩增曲线,且 Ct(或 Cp)值 ≤ 30.0 ,而 FAM 检测通道无 Ct(或 Cp)值并且无扩增曲线,表示样本中存在 N9 亚型流感病毒核酸,但不含有 H7 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

类型	FAM 检测通道	HEX(或 VIC)检测通道	结果描述判定
1	阳性	阳性	同时存在 H7 亚型和 N9 亚型流感病毒核酸
2	阳性	阴性	存在 H7 亚型流感病毒核酸,但不含有 N9 亚型流感病毒核酸
3	阴性	阳性	存在 N9 亚型流感病毒核酸,但不含有 H7 亚型流感病毒核酸
4	阴性	阴性	无 H7 亚型和 N9 亚型流感病毒核酸

8.3.4 有效原则

任一检测通道的 Ct(或 Cp)值 > 30.0 ,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,判相应通道检测的流感病毒亚型为核酸阳性,否则判为阴性。

附录 A
(规范性附录)
溶液配制

以下所用试剂均为分析纯。

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 % (体积分数),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: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 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 121 °C ± 2 °C,15 min 高压灭菌后,冷却后,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 引物和探针

本标准方法中使用的引物探针名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物和探针的名称及序列

引物或探针名称	序列(5'-3')
H7 上游引物	5'- AAAATAGAATACAGATWRACCCRGT -3'
H7 下游引物	5'- GTGCACYGCATGTTTCC -3'
H7 探针	5'-[FAM]- CTTCGGGGCATCATGTTTYMTWCTTCTRG -[TAMRA]-3'
N9 上游引物	5'- CCAAATCAGAAGATTCTATGCACYT -3'
N9 下游引物	5'- GGTTTGCYATTCCWATGARYA -3'
N9 探针	5'-[VIC]或[HEX]- GCCACTGCYATYRTAATA -[MGB]-3'

注：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 μmol/L，-20 °C 保存备用。

B.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

本标准方法中使用的 H7N9 荧光 RT-PCR 的反应液组分及含量见表 B.2。

表 B.2 荧光 RT-PCR 反应液的组分及含量

组分	1 个检测体系的加入量
5×RT 缓冲液 ^a	5.0 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	3.0 μL
dNTP(10 mmol/L)	1.0 μL
H7 上游引物 (20 μmol/L)	0.5 μL
H7 下游引物 (20 μmol/L)	0.5 μL
H7 探针 (10 μmol/L)	0.375 μL
N9 上游引物 (20 μmol/L)	0.625 μL
N9 下游引物 (20 μmol/L)	0.625 μL
N9 探针 (10 μmol/L)	0.5 μL
M-MLV 反转录酶 (200 U/μL)	0.5 μL
RNA 酶抑制剂 (40 U/μL)	0.25 μL
Ex Taq HS 酶 (5 U/μL) ^b	0.25 μL

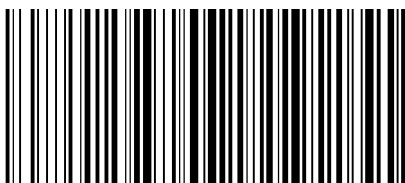
表 B.2 (续)

组 分	1 个检测体系的加入量
DEPC 水	1.875 μL
^a 5 \times RT 缓冲液的组成为:375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl ₂ 、50 mmol/L DTT、250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3,25 $^{\circ}\text{C}$)。 ^b Ex <i>Taq</i> HS 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。



GB/T 35806-2018

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-59180