

# SZDB/Z

## 深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 51—2011

---

### 动物甲型 H1N1 (2009) 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

2011-12-29 发布

2012-01-01 实施

---

深圳市市场监督管理局 发布

I

## 目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语与缩略语.....	1
4 仪器与试剂.....	1
5 生物安全要求.....	2
6 样品采集和前处理.....	3
7 核酸提取.....	3
8 实时荧光 RT-PCR 检测.....	4
9 分析条件设定和结果判定.....	4
附录 A.....	6
附录 B.....	7
附录 C.....	8

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本文件的某些内容有可能涉及专利，应按照专利法的规定执行。本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本文件由深圳出入境检验检疫局提出并归口管理。

本文件起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心、深圳市疾病预防控制中心、深圳市儿童医院、美国应用生物系统有限公司、深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室。

本文件起草人：秦智锋、孙洁、卢体康、房师松、花群义、刘建利、方兴旺、邓继岚、陶虹、吕建强、曾少灵、詹爱军、曹琛福、陈兵、林庆燕、陈书琨、阮周曦、张彩虹。

## 引 言

为促进深圳市有效应对突发公共卫生事件，规范我市对甲型H1N1(2009)流感病毒的实时荧光RT-PCR检测，保障动物及人类的生命健康，制定本指导性技术文件。

本指导性技术文件中的主要技术指标参照美国农业部制订的《REAL-TIME RT-PCR FOR THE DETECTION OF H1N1 2009 N1 GENE》的标准，结合深圳市动物和人类甲型H1N1(2009)流感病毒快速筛选检测的实际需求确定。

本指导性技术文件中的甲型H1N1(2009)流感病毒实时荧光RT-PCR检测可以采用等效一步法或二步法，本标准以一步法为例规定各项操作，等效二步法可参见相应的说明书。



# 动物甲型H1N1(2009)流感病毒实时荧光RT-PCR检测方法

## 1 范围

本指导性技术文件规定了动物甲型H1N1(2009)流感病毒实时荧光RT-PCR的检测方法。

本指导性技术文件适用于快速检测咽拭子、鼻拭子、泄殖腔拭子、组织样品等临床样品中甲型H1N1(2009)流感毒株。本指导性技术文件同样适用于人甲型H1N1(2009)流感病毒实时荧光RT-PCR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，仅所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/T 18936 高致病性禽流感诊断技术

GB19442 高致病性禽流感防治技术规范

GB19489 实验室生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

## 3 术语与缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值     Cycle threshold, 反应管的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数

DEPC     diethylprocarbonate,二乙基焦磷酸酯

FAM     6-carboxy-fluorescein, 6-羧基荧光素

PBS     磷酸盐缓冲液

pH1N1 (2009)     pandemic H1N1 virus of 2009, 甲型H1N1(2009)流感病毒

RT-PCR     reverse transcription Polymerase Chain Reaction,反转录聚合酶链式反应

## 4 仪器与试剂

### 4.1 仪器与材料

——实时荧光PCR仪;

- 高速冷冻离心机（最高离心力达15 000 g 以上）；
- 生物安全柜；
- 混匀器；
- 冰箱（2℃~8℃， -20℃， -80℃）；
- 微量可调移液器（10 μL, 100 μL, 1000 μL）；
- 微量带滤芯吸嘴（10 μL, 100 μL, 1000 μL）；
- 灭菌研钵；
- 离心管；
- PCR光学反应管。

## 4.2 试剂

### 4.2.1 试剂级别

除另有规定，本方法试验用水应符合GB/T 6682规定的二级水，所用化学试剂均为分析纯。

### 4.2.2 引物与探针

上游引物pH1N1(2009)F序列为：5'-CAA CAC CAA CTT TGC TGC-3'，下游引物pH1N1(2009)R序列为：5'-GGA ACC GAT TCT TA(C/T) ACT GTT GTC-3'，TaqMan探针pH1N1(2009)Pb序列为：5'-CAG TCA GTG GTT TCC GTG AAA TTA GC-3'，其5'端和3'端分别标记FAM和BHQ，或者可以选择标记其它荧光基团及其相应的淬灭基团。采用无DNA酶、无RNA酶水将每条引物与探针配制成100 μmol/L储存液，置-20℃或更低温度冻存。使用时取适量配制成10 μmol/L工作液，避免多次冻融。

### 4.2.3 一步法实时荧光RT-PCR检测试剂盒。

4.2.4 阳性对照为灭活疫苗，-20℃保存备用。阴性对照样品可采用健康的动物组织材料，空白对照样品为试剂盒本身试剂不加模板。

### 4.2.5 其他试剂

- DEPC水(按照附录A制备，推荐使用商品化DEPC处理的无DNA酶和RNA酶的水)；
- 三氯甲烷；
- 异丙醇；
- 无水乙醇；
- 70%乙醇（用新开启的灭菌双蒸水配制，-20℃预冷）；
- 0.01 mol/L PBS（pH7.0~7.4，配制方法见附录A）。

## 5 生物安全要求

5.1 样品采集、样品处理及检测过程所涉及的实验操作，应参照GB 19489的规定进行。

5.2 pH1N1(2009) 实时荧光 RT-PCR 检测应符合 SN/T 1193(基因检验实验室技术要求)的相关要求。

## 6 样品采集和前处理

### 6.1 样品采集

#### 6.1.1 一般要求

样品的采集、保存及运输应符合GB/T 18088、GB/T18936和 GB19442的相关要求。

#### 6.1.2 猪的相关病毒样品采集

将灭菌的棉拭子插入猪鼻腔，轻轻擦拭3~5次并慢慢旋转，然后取出拭子并放入盛有2mL灭菌的0.01mol/L pH7.2~7.4 PBS(内含青霉素2000IU/mL，链霉素2mg/mL)管内，加盖、编号，为一个活猪样。

#### 6.1.3 禽的相关病毒样品采集

将两个灭菌的棉拭子于 PBS 溶液中浸湿，取一个棉拭子先插入活禽喉头口及上腭裂来回刮 3~5 次并慢慢旋转 2~3 次，取咽喉分泌液；再将另一个棉拭子插入该禽的泄殖腔内 1.5cm~2cm 轻轻擦拭 3~5 次并旋转 2~3 次；将咽喉拭子和泄殖腔棉拭子一起放入盛有 1mL 灭菌的 0.01mol/L pH7.0~7.4 PBS(内含青霉素 2000IU/mL，链霉素 2mg/mL) 中，加盖、编号，为一个活禽样。小珍禽采咽喉/泄殖腔拭子容易造成伤害,可随机采集 5 个新鲜粪便样品，每个样品 1~2 g。

#### 6.1.4 人的相关病毒样品采集

采集被采样人员的咽拭子、口腔含漱液、鼻咽或气管抽取物、痰等物品。样品不得混合，每个被采样人员的样品需单独检测。

#### 6.1.5 其他动物的相关样品采集

参照6.1.2~6.1.4执行。

### 6.2 样品的保存和运输

待检样品在 2℃~8℃保存不应超过 24h；-20℃保存不超过三个月；-80℃以下可长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

### 6.3 样品制备

将采集的样品于旋涡振荡器上振荡混匀约5s后，于离心机中瞬时离心。

## 7 核酸提取

### 7.1 核酸抽提（酚氯仿法）

- a) 取灭菌的1.5 mL离心管，做好标识。
- b) 每管加入600 μL裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各200 μL，再加入200 μL氯仿，混匀器上振荡混匀5 s，于4℃ 12000 g 离心15 min。



## SZDB/Z 51-2011

c) 取灭菌的1.5 mL离心管，加入-20℃预冷400 μL异丙醇，吸取本标准6.2各管中的上清液转移至相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀7.2.4 于4℃ 12000 g离心15 min，弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；加入600 μL 75%预冷乙醇，颠倒洗涤。

d) 于4℃ 12000 g离心10 min，弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体。

e) 10000 g离心10 s，用微量加样器将其吸干，室温干燥（5~10）min。

f) 加入15 μL DEPC水，溶解管底的RNA，5000 g离心5s，冰上保存备用，若需长期保存应放置-80℃ 冰箱。

## 7.2 其他核酸抽提方法

甲型H1N1(2009)流感病毒核酸提取也可以采用等效RNA提取试剂及方法:如采用自动化核酸抽提仪和配套核酸抽提试剂进行核酸抽提。

## 8 实时荧光 RT-PCR 检测

### 8.1 反应体系配制

在 PCR 溶液配制区，参照各试剂盒说明书进行配制，每份检测样品的实时荧光 RT-PCR 体系为25μL（附录 B 以 AgPath-IDTM One-Step RT-PCR 试剂盒为例，列出反应体系配制表，仅供参考）将配制的每个 PCR 反应试剂充分混匀，瞬时离心后转移至样本处理区。

### 8.2 扩增检测

#### 8.2.1 加样

在已分装有PCR反应混合液的PCR管中分别加入已提取好的核酸5μL，盖上管盖，混匀后瞬时离心，将PCR管放入荧光PCR检测仪内，记录样本放置顺序。

#### 8.2.2 PCR扩增检测（扩增检测区）

##### 8.2.2.1 反应条件设定

①反转录45℃ 30min;

②热启动95℃ 10min(不同的生产商家推荐的时间不同，应根据说明书进行);

③95℃ 15s, 60℃ 45s, 40个循环, 60℃时设置采集荧光。

##### 8.2.2.2 通道选择

报告荧光（ Report Dye）设定为FAM（或按探针实际标记的荧光基团设定），淬灭荧光（Quench Dye）设定为None，校准荧光（Reference dye）设定为None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

## 9 分析条件设定和结果判定

## 9.1 阈值设定

综合分析仪器给出的各项结果, 基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考, 阈值(Threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准, 具体还需根据仪器噪音情况进行调整, 选择FAM通道进行分析。

## 9.2 质控

阴性对照和空白对照应无Ct值并无典型扩增曲线, 阳性对照的Ct值应 $\leq 30$ , 且呈现典型扩增曲线, 有明显的对数增长期(典型扩增曲线的图例见附录C), 才可判定试验成立, 否则试验无效。

## 9.3 荧光PCR结果分析及判定

### 9.3.1 阳性反应结果判定

在试验成立的条件下, 检测结果呈现Ct值 $\leq 35$ 且呈现典型扩增曲线, 判为荧光PCR阳性反应, 表明pH1N1(2009)毒株核酸阳性。

### 9.3.2 阴性反应结果判定

检测经40个循环无Ct值且不出现扩增曲线, 判为荧光PCR阴性反应, 表明pH1N1(2009)毒株核酸阴性。

### 9.3.3 可疑反应结果判定

检测结果 $35 < \text{Ct值} \leq 40$ , 判为可疑样品。

### 9.3.4 可疑样品处理

对于可疑阳性样品, 应按本标准7.1至9.3.3再次进行pH1N1(2009)实时荧光RT-PCR检测。如果重复检测的Ct值 $< 40$ , 且呈现典型扩增曲线, 判为阳性反应, 表明pH1N1(2009)毒株核酸阳性。否则判为pH1N1(2009)毒株核酸阴性。

附录 A  
(规范性附录)  
常用试剂配制

A.1 0.01mol/L PBS(pH7.2~7.4)

磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.44g
磷酸二氢钾 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.80g
氯化钾(KCl)	0.20g
氯化钠 (NaCl)	7.90g

加三蒸去离子水 800mL, 完全溶解后用 HCl 调节溶液 pH 至 7.4, 最后加三蒸去离子水定容至 1000mL。经 121℃, 15min 高压灭菌, 室温保存。

A.2 DEPC水

每升三蒸水中加入1mL DEPC, 用力摇匀, 使DEPC充分混匀在水中, 37℃放置12h以上, 再经121℃, 15min高压灭菌备用。

## 附录 B

(资料性附录)

## 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制

AgPath-ID™ One-Step RT-PCR 试剂盒配制每份检测样品的实时荧光 RT-PCR 体系 (20 $\mu$ L) 见表 1。

表 1 : 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制表

组分	体积 ( $\mu$ L)
2X RT-PCR Buffer	12.5
Enzyme Mix	1.0
上游引物(10 $\mu$ mol/mL)	1.0
下游引物(10 $\mu$ mol/mL)	1.0
TaqMan 探针(5 $\mu$ mol/mL)	1.0
无核酸降解酶的水	3.5
总体积	20

附录 C  
(资料性附录)  
典型扩增曲线图例

典型扩增曲线见图1中曲线。

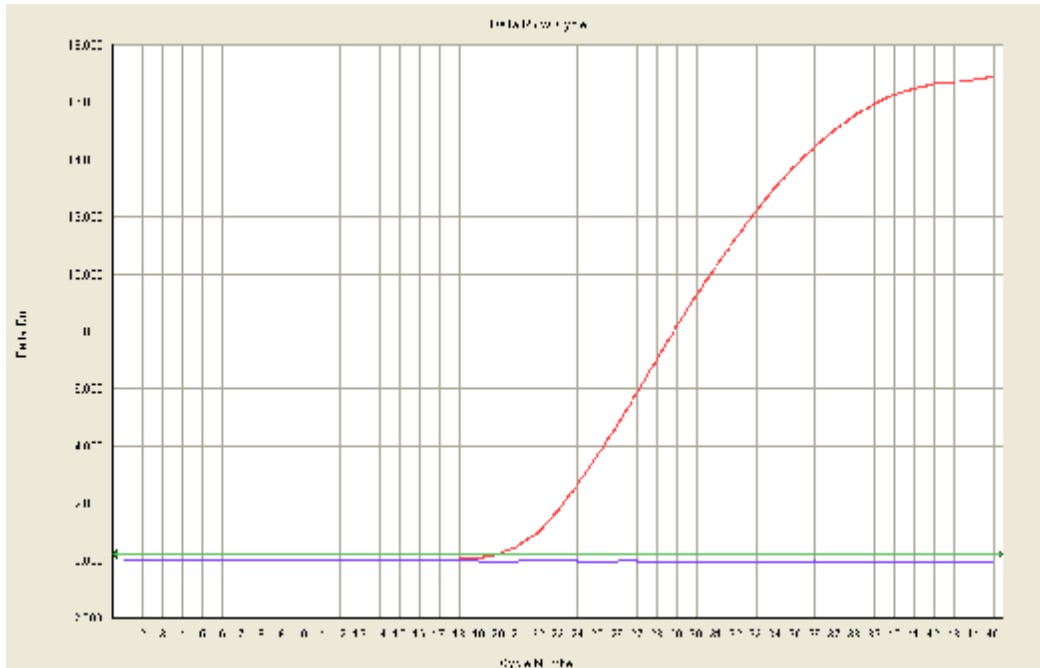


图1：典型扩增曲线图例