

ICS 11.220

B 41

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 313—2018

H5N6 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for detection of subtype H5N6 avian influenza virus

2018-07-04 发布

2018-08-01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 仪器与试剂	1
6 生物安全要求	2
7 样品采集和前处理	2
8 核酸提取	3
9 核酸提取	4
10 分析条件设定	4
11 结果判定	4
附录 A（规范性附录） 试剂常用剂配制	6
附录 B（资料性附录） 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制	7
附录 C（资料性附录） H5N6 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 典型扩增曲线图例	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本文件的附录A为规范性附录，附录B和附录C为资料性附录。

本文件由深圳市检验检疫科学研究院提出。

本文件由中华人民共和国深圳出入境检验检疫局归口。

本文件起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心、深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心。

本文件起草人：刘建利、孙洁、曾少灵、秦智锋、曹琛福、廖立珊、卢体康、陶虹、张彩虹、詹爱军、林庆燕、陈书琨、吕建强、杨俊兴。

H5N6 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了H5N6亚型禽流感病毒实时荧光RT-PCR的检测方法。

本文件适用于快速检测禽类咽拭子、鼻拭子、泄殖腔拭子、组织样品等临床样品中H5N6亚型流感病毒。

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

GB 19442 高致病性禽流感防治技术规范

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 缩略语

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, 焦碳酸二乙酯

FAM 6-CARBOXY-FLUORESCEIN, 6-羧基荧光素

RT-PCR REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION, 反转录聚合酶链式反应

4 原理

采用TaqMan方法，分别选择H5N6毒株序列相对最保守的HA基因和NA基因作为H5N6检测的靶序列。采用DNAMAN软件对Genbank公布的所有序列进行Blast比较后，分别在各自的高度保守序列内进行引物和探针的设计。该探针的结合部位位于目的扩增片段内部。其中HA基因探针5'端标记FAM荧光素为报告荧光基团，NA基因探针5'端标记HEX荧光，3'端均标记BHQ为淬灭荧光基团。反应进入退火阶段时，引物和探针同时与目的基因片段结合，此时探针上荧光基团发出的荧光信号被淬灭基团所吸收，仪器检测不到荧光信号；而反应进行到延伸阶段时，Taq酶发挥5'→3'的外切核酸酶功能，将探针降解。这样探针上的荧光基团游离出来，所发出的荧光不再为淬灭基团所吸收而被检测仪所接收。随着PCR反应的循环往复，PCR产物呈指数形式增长，荧光信号也相应增长，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步。

5 仪器与试剂

5.1 仪器

SZDB/Z 313—2018

实时荧光PCR仪、高速冷冻离心机（最大转速15 000 r/min）、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）、带滤芯吸嘴（10 μL，100 μL，1000 μL）、灭菌研钵、离心管、PCR光学反应管。

5.2 试剂

5.2.1 试剂级别

除另有规定，本方法试验用水应符合GB/T 6682规定的一级水，所用化学试剂均为分析纯。

5.2.2 引物与探针

用HA基因引物探针

HA Pb: 5' FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-BHQ1-3'

HA FP: 5' ACR TAT GAC TAY CCA CAR TAY TCA G3'

HA RP: 5' AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC3'

NA基因引物探针

NA Pb: 5' HEX-CCAATAACAGGAGGGAGCCCAGACCC-BHQ1-3'

NA FP: 5' CCCACCAATGGGAACTG3'

NA RP: 5' TCTAGGAATGCAAACCCTTTTACC3'

探针5'端分别标记FAM、HEX，3'端均标记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。

5.2.3 一步法实时荧光RT-PCR检测试剂盒

5.2.4 阳性对照为阳性质粒，-20℃保存备用。阴性对照样品可采用健康的动物组织材料。

5.2.5 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、75%乙醇(用新开启的灭菌双蒸水配制，-20℃预冷)、0.01 mol/L PBS (pH7.2, 配制方法见附录A)。

6 生物安全要求

样品采集、样品处理及检测过程所涉及的实验操作，应符合GB 19489的规定。

7 样品采集和前处理

7.1 样品采集

7.1.1 一般要求

样品的采集、保存及运输应符合GB 19489、GB/T 18088、GB/T18936和 GB19442的相关要求。

7.1.2 禽的相关样品采集

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 pH7.2 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1g~2g。

7.1.3 其他动物的相关样品采集

参照7.1.2~7.1.2执行。

7.2 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。

7.3 样品制备

7.3.1 棉拭子样品制备

将采集的样品于旋涡振荡器上振荡混匀约5s后，用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出，弃去拭子，3000 r/min离心10 min，取上清液转入无菌的离心管中备用。

7.3.2 组织样品制备

将所采组织病料置于洁净、灭菌并烘干的研磨器中，按质量体积比(1:1)加入样品保存液进行充分研磨，3000 r/min离心10分钟，取上清液转入无菌的离心管中备用。

8 核酸提取

8.1 核酸提取(酚氯仿法)

8.1.1 取灭菌的1.5 mL离心管，做好标识。

8.1.2 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 r/min离心15 min。

8.1.3 取灭菌的1.5 mL离心管，加入-20℃预冷400 μL异丙醇，吸取本文件7.2各管中的上清液转移至相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀于4℃ 12000 r/min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。

8.1.4 于4℃ 12000 r/min离心10 min，弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体。

8.1.5 10000 r/min离心10 s，用微量加样器将其吸干，室温干燥5~10min。

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

8.2 其他核酸抽提方法

H5N6亚型禽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。

9 核酸提取

9.1 反应体系配置

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25 L（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。。

9.2 扩增检测

9.2.1 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5 μ L，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。

9.2.2 PCR 扩增检测（扩增检测区）

9.2.2.1 反应条件设定

- a) 反转录 45 $^{\circ}$ C 30min;
- b) 热启动 95 $^{\circ}$ C 10min(不同试剂的反应条件不一，应根据说明书进行)；
- c) 95 $^{\circ}$ C 15s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 40 个循环, 58 $^{\circ}$ C时设置采集荧光。

9.2.2.2 通道选择

报告荧光（Report Dye）设定为FAM、HEX（或按探针实际标记的荧光基团设定），淬灭荧光（Quench Dye）设定为BHQ，校准荧光（Reference dye）设定为BHQ。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

10 分析条件设定

10.1 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，分别选择FAM及HEX通道进行分析。

10.2 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。

11 结果判定

11.1 阳性反应结果判定

在试验成立的条件下，FAM及HEX通道结果均呈现Ct值 \leq 35且呈现典型扩增曲线，判为荧光PCR阳性反应，表明H5N6亚型毒株核酸阳性。

11.2 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，或者只出现单一通道有荧光信号，判为荧光PCR阴性反应，表明H5N6亚型毒株核酸阴性。

11.3 可疑反应结果判定

FAM及HEX通道结果 $35 < \text{Ct值} \leq 40$ ，判为可疑样品。

11.4 可疑样品处理

对于可疑阳性样品，应按本文件7.1至9.2再次进行H5N6亚型实时荧光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H5N6亚型毒株核酸阳性。否则判为H5N6亚型毒株核酸阴性。

附录 A
(规范性附录)
试剂常用剂配制

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

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

加一级水800mL, 完全溶解后用HCl 调节溶液pH至7.4, 最后加一级水定容至1000mL。经121℃, 15min 高压灭菌, 室温保存。

A.2 DEPC水

每升一级水中加入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 μ L) 见表 1。

表 1 : 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制表

组分	体积 (μ L)
2X RT-PCR Buffer	12.5
Enzyme Mix	1.0
HA FP(10 μ mol/L)	1.0
HA RP(10 μ mol/L)	1.0
HA 探针(5 μ mol/L)	1.0
NA FP10 μ mol/L)	1.0
NA RP(10 μ mol/L)	1.0
NA 探针(5 μ mol/L)	1.0
无核酸降解酶的水	0.5
总体积	20

附录 C
(资料性附录)

H5N6 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 典型扩增曲线图例

