

# DB45

## 广西壮族自治区地方标准

DB 45/T 1508—2017

---

### H6 亚型禽流感病毒的检测 荧光定量反转录聚合酶链反应法

Real-time fluorescent quantitative RT-PCR for detection of H6 subtype avian influenza virus

2017 - 04 - 15 发布

2017 - 05 - 15 实施

---

广西壮族自治区质量技术监督局

发布



# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 术语和定义 .....	1
3 试剂、仪器及耗材 .....	1
4 检测方法 .....	2
5 结果判定 .....	3
附录 A（规范性附录） 引物序列及反应曲线 .....	4
附录 B（资料性附录） 试剂盒成分 .....	5



## 前 言

本标准按照 GB / T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由广西壮族自治区水产畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：莫胜兰、梁媛、邹联斌、张步娴、屈素洁、胡杰、施开创、李军。



# H6 亚型禽流感病毒的检测 荧光定量反转录聚合酶链反应法

## 1 范围

本标准规定了荧光定量反转录聚合酶链反应法检测 H6 亚型禽流感病毒的术语和定义、试剂、仪器及耗材、检测方法及结果判定。

本标准适用于 H6 亚型禽流感病毒的检测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 2.1

**禽流感病毒** avian Influenza virus  
感染禽类为主的流感病毒，属于正黏病毒科，其基因组为单股负链 RNA。

### 2.2

**H6 亚型禽流感病毒** H6 avian Influenza virus  
禽流感病毒根据血凝素 (HA) 的不同，可以分为 16 个 HA 亚型，H6 亚型禽流感病毒是其中的一种。

### 2.3

**反转录** reverse transcription  
以 RNA 为模板合成 cDNA 的过程。

### 2.4

**荧光定量聚合酶链反应** real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction  
指在反应体系中加入特异性的引物和含有荧光基团的探针以扩增特定模板的 PCR 技术，同时利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

## 3 试剂、仪器及耗材

### 3.1 试剂

#### 3.1.1 特异性引物及探针

引物和探针序列见附录 A 中的表 A.1。上、下游引物及探针的使用浓度均为 10 pmol/μL。

#### 3.1.2 RNA 提取试剂盒

商业化的 RNA 提取试剂盒成分见附录 B 中的 B.1，使用前按使用说明经技术验证合格。

#### 3.1.3 一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

商业化的一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒主要成分见附录 B 中的 B.2，使用前按使用说明经技术验证合格。

#### 3.1.4 1 mol/L PBS (pH7.2)

1 mol/L PBS (pH7.2) 可通过商业购买获得，使用前按使用说明经技术验证合格。

### 3.2 仪器及耗材

#### 3.2.1 仪器

本方法使用下列仪器：

- 荧光定量 PCR 仪；
- 核酸蛋白分析仪；
- 高速台式冷冻离心机，最高转速为 17 500 rpm，最大相对离心力为 30 130 g；
- 混匀器；
- 组织匀浆机；
- 冰箱，温度范围：-18 ℃至-20 ℃，2 ℃至 8 ℃；
- 微量移液器。

#### 3.2.2 耗材

一次性耗材：

- 乳胶手套；
- 离心管；
- 吸头；
- 荧光 PCR 反应管。

注：离心管、PCR 反应管、吸头等应使用无 RNA 酶的一次性塑料制品。

## 4 检测方法

### 4.1 检测环境

以下操作应在无 RNA 酶的环境下进行。

### 4.2 待检样品处理

取病禽的肺脏、脾脏和气管等各 1 g，置于 2.0 mL 离心管中，加入灭菌的 1 mol/L PBS (pH 7.2) 1 mL，用组织匀浆机充分研磨后，反复冻融 3 次，以 10 000 ×g 离心 5 min；棉拭子样品直接加入 1 mL PBS，振荡混匀，以 10 000 ×g 离心 1 min。取样品上清，用于总 RNA 提取。

### 4.3 待检样品总 RNA 提取

取 200 μL 待检样品上清置于无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中，按照 RNA 提取试剂盒操作说明书提取总 RNA。总 RNA 可直接作为模板进行反转录，或置 -20 ℃ 保存备用。

### 4.4 荧光定量 RT-PCR 反应

反应液总量 20 μL。在冰浴条件下，在荧光 PCR 反应管中按下列用量分别加入各成分：

- 2 × One Step RT-PCR Buffer III：10 μL ；

- Ex Taq HS (5 U/ $\mu$ L) : 0.4  $\mu$ L ;
- PrimeScript RT Enzyme Mix II: 0.4  $\mu$ L ;
- H6F 引物: 0.4  $\mu$ L ;
- H6R 引物: 0.4  $\mu$ L ;
- Probe H6 探针: 0.8  $\mu$ L ;
- ROX Reference Dye II: 0.4  $\mu$ L ;
- 待检总 RNA 模板: 5  $\mu$ L;
- 灭菌双蒸水: 补足总体积至 20  $\mu$ L。

加完试剂后瞬时离心混匀, 将荧光 PCR 反应管置于荧光定量 PCR 仪内, 按如下程序进行反应: 第一阶段预变性 42  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s; 第二阶段 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 35 s, 共 40 个循环; 荧光收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行。

#### 4.5 阳性对照及阴性对照

##### 4.5.1 阳性对照

使用 H6 亚型禽流感病毒 H6-192 质粒作为阳性对照标准品。用核酸蛋白分析仪测定其光吸收值 (OD<sub>260</sub>) 后计算浓度, 用灭菌双蒸水稀释至  $1.0 \times 10^5$  拷贝每毫升, 作为阳性对照标准品, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

##### 4.5.2 阴性对照

用无 RNA 酶水代替模板作为阴性对照模板。

#### 5 结果判定

##### 5.1 结果分析条件设定

阈值设定根据仪器噪声情况进行调整, 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。

##### 5.2 质控标准

5.2.1 阴性对照 Ct  $\geq$  37 或无 Ct 值。

5.2.2 阳性对照 Ct 值均应  $\leq$  30, 并出现典型的 S 型扩增曲线。反之, 此次检测无效。

##### 5.3 结果描述及判定

H6 亚型流感病毒荧光定量反转录聚合酶链反应曲线图参考附录 A 中的图 A.1。若被检样品出现 H6 亚型禽流感病毒的特异性扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq$  30, 判定为 H6 亚型禽流感病毒阳性; 反之, 判定为 H6 亚型禽流感病毒阴性。

附 录 A  
(规范性附录)  
引物序列及反应曲线

A.1 H6 亚型禽流感病毒特异性引物序列

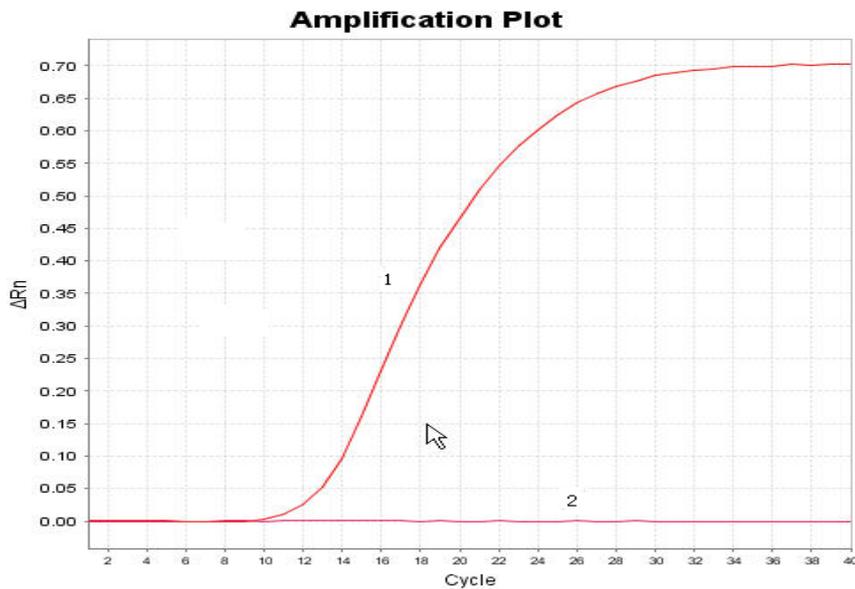
引物序列相关信息见表 A.1。

表A.1 引物序列及扩增长度

引物名称	引物序列 (5' → 3' )	长度 (bp)
H6F	CCTGAGCCTTGAGAATTTTC	192
H6R	GGATAGGAGAATGCCCA	
Probe H6	FAM-CCATCTATCATTCAGTCCATCCTCC	

A.2 H6 亚型禽流感病毒荧光定量反转录聚合酶链反应曲线图

H6 亚型禽流感病毒荧光定量反转录聚合酶链反应曲线见图 A.1。



注：1. H6 亚型禽流感病毒阳性样品；2. 阴性对照。

图A.1 H6 亚型禽流感病毒荧光定量反转录聚合酶链反应曲线图

附录 B  
(资料性附录)  
试剂盒成分

B.1 商业化的 RNA 提取试剂盒

主要成分包括：

- 细胞裂解液；
- Proteinase K；
- Carrier RNA
- 洗液；
- 无水乙醇；
- DEPC 水；

B.2 商业化的一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒

主要成分包括：

- 2× One Step RT-PCR Buffer；
- Ex Taq HS (5 U/μL)；
- PrimeScript RT Enzyme Mix II；
- ROX Reference Dye II。



中华人民共和国广西地方标准

H6 亚型禽流感病毒的检测 荧光定量反转录聚合酶链反应法

DB45/T 1508—2017

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究