ICS 11.220
B 41

DB45

广 西 壮 族 自 治 区 地 方 标 准

DB45/T 1509—2017

H10N8 亚型禽流感病毒的检测 多重反转录聚合酶链反应法

Multiplex RT-PCR for detection of H10N8 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　材料与试剂 2
4　检测方法 3
5　结果判定 5
6　废弃物的处理 5
附录A（资料性附录）　引物序列及检测结果判断图示 6
附录B（规范性附录）　溶液的配制 7
附录C（规范性附录）　标准中化学词汇汉英对照 9

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：广西壮族自治区兽医研究所。

本标准主要起草人：谢芝勋、罗思思、谢志勤、谢丽基、邓显文、刘加波、范晴、黄莉、黄娇玲、曾婷婷、王盛、张艳芳。

H10N8 亚型禽流感病毒的检测 多重反转录聚合酶链反应法

1 范围

本标准规定了H10N8亚型禽流感病毒多重反转录聚合酶链反应法检测的术语和定义、材料与试剂、检测方法、结果判定及废弃物的处理。

本标准适用于H10N8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

H10N8 亚型禽流感病毒 H10N8 subtype avian influenza virus, AIV

本病毒属于正黏病毒科，A型流感病毒属，基因组为单股负链、分节段的RNA。其血凝素类型为H10，神经氨酸酶类型为N8。

2.2

反转录 reverse transcription, RT

以RNA为模板合成cDNA的过程。

2.3

聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR

是模板DNA在引物和4种脱氧核糖核酸底物及Mg^{2+}存在的条件下，依赖于Taq DNA聚合酶的酶促反应。又称无细胞分子克隆或特异性DNA序列体外引物定向酶促扩增技术，简称PCR技术。

2.4

引物 primer, P

指分别与待扩增DNA片段两侧互补的一小段(约20 bp)寡核苷酸。

2.5

特异性引物 specific primer, SP

针对特定DNA片段在其两侧设计合成的一小段互补寡核苷酸，在PCR反应中与DNA模板特异性结合。它决定了PCR扩增产物的特异性。

2.6

多重 RT-PCR 反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

是一种特殊RT-PCR形式，通常是指在同一反应体系中加入多对引物，扩增同一模板的几个区域，即一次PCR反应，可同时检测、鉴别出多种病原体。

3 材料与试剂

3.1 试剂

3.1.1 H10N8 亚型 AIV 特异性引物

根据H10N8亚型AIV HA基因和和NA基因序列，分别设计了用于扩增HA和NA基因的两对特异性引物HA1、HA2和NA1、NA2。引物HA1和HA2扩增HA目的片段大小为267 bp，引物NA1和NA2扩增NA目的片段大小为464 bp，引物的使用浓度均为25 μmol/L。根据附录A中A.1.1给出的引物寡核苷酸序列送测序公司合成。使用前先用灭菌双蒸水稀释，置－20 ℃保存备用。

3.1.2 RNA 抽提试剂

RNA 抽提试剂如下：

——Trizol RNA 抽提试剂；

——氯仿；

——异丙醇；

——75％乙醇（DEPC 水配制）。

注：Trizol® RNA抽提试剂（商品名）是由Invitrogen公司（供应商）提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其它等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

3.1.3 RT-PCR 试剂盒

RT-PCR试剂盒如下：

——Taq DNA 聚合酶；

——反转录酶；

——RNA 酶抑制剂；

——随机引物；

——dNTPs 混合物：包括 dATP、dTTP、dCTP、dGTP；

——10 倍 PCR 缓冲液（含 Mg^{2+}）。

注：试剂盒包含了RNA反转录以及PCR扩增所必需的各种酶、dNTPs及Mg^{2+}等全部试剂。可向多个生物工程公司购得，使用时按本标准给出的量使用。

3.1.4 电泳试剂

电泳试剂如下：

——1％琼脂糖溶液；

——10 mg/mL GoldView 染料；

——加样缓冲液；

——1 倍 TAE 电泳缓冲液。

3.1.5 其他试剂

其他试剂如下：

——灭菌双蒸水；

——磷酸盐缓冲液（PBS pH7.2）；

——DEPC 水。

注：试剂的配制见附录B。

3.2 仪器设备

使用的仪器设备如下：

——PCR 仪；

——电泳仪；

——紫外检测仪；

——凝胶成像系统；

——小型高速（15 000 rpm）离心机；

——旋涡振荡器；

——研钵或玻璃研磨器；

——微量加样器；

——超净工作台。

3.3 消耗品

使用的消耗品如下：

——手套；

——离心管；

——PCR 反应管；

——吸头。

4 检测方法

4.1 要求

4.1.1 整个操作应在无 RNA 酶污染的环境下进行。操作人员应戴口罩并使用一次性手套，在超净工作台中操作。

4.1.2 玻璃器皿常规洗净后，用终浓度为 0.1% DEPC 水浸泡 2 h。倒去浸泡的 DEPC 水，再用灭菌双蒸水漂洗 3 次。在 1.034×10^{5} Pa 高压下灭菌 30 min，经 50 ℃烘烤至少 4 h 或 100 ℃ 干烤 15 min。

4.1.3 离心管、PCR 反应管、微量加样吸头应使用一次性无 RNA 酶的塑料制品，使用前经 1.034×10^{5} Pa 高压灭菌 30 min。所有参与反转录的溶液用 DEPC 水配制。

4.2 样品的准备

4.2.1 样品的采集和预处理

4.2.1.1 粪便和口鼻分泌物

用棉拭子采取待检家禽或野鸟的粪便、口鼻分泌物，经含有青、链霉素（各10 000单位每毫升）的PBS溶液稀释，650× g离心10 min，取上清250 μL供总RNA抽提或置－70 ℃ 保存备用。

4.2.1.2 病料组织

取患病家禽或野鸟的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰脏和气管样品约各1 g，置于研钵或玻璃研磨器中，加入适量的含有青、链霉素（各10 000单位每毫升）的PBS溶液充分研磨，收集组织悬液，反复冻融3次，650×g离心10 min，取上清250 μL供总RNA抽提或置－70 ℃ 保存备用。

4.2.2 病毒分离培养物的收集及处理

将棉拭子和病料组织的上清无菌处理后，经尿囊腔接种SPF鸡胚，收集24 h后死胚的尿囊液，供总RNA抽提，或者置－70 ℃ 保存备用。

4.2.3 待检样品总 RNA 抽提

在经过预处理的250 μL 待检样品中加入750 μL Trizol®RNA抽提试剂，充分混合均匀，室温作用10 min，继续加入150 μL 氯仿，振荡混匀，室温放置15 min，于4 ℃，7 200 × g 离心10 min，收集上清液，加入500μL 异丙醇，充分混合均匀，室温放置10min，于4 ℃，12 000 × g 离心10 min，弃去上清，加入1 mL 75％冷乙醇，7 200× g 离心10 min，移弃乙醇。将离心管倒置于超净工作台内风干15 min。最后加20 μL DEPC水重新悬浮总RNA沉淀物。测定RNA浓度，取10 ng 总RNA样品进行RT，或置－80 ℃ 保存备用。

4.3 RT-PCR 检测

4.3.1 反转录

4.3.1.1 反应液组成

在冰浴条件下，按下列试剂用量在PCR反应管中，分别加入各成分：

——10 倍 PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})：2 μL；为 1 倍 PCR 缓冲液；

——10 mmol/L dNTPs 混合物：0.5 μL，终浓度为 0.25 mmol/L；

——20 U/μL RNA 酶抑制剂：0.25 μL，终浓度为 0.25 U/μL；

——5 U/μL 反转录酶(AMV)：1 μL，终浓度为 0.25 U/μL；

——10 pmol/μL 随机引物 1 μL，终浓度为 0.5 pmol/μL；

——待检总 RNA 模板：10 ng；

——DEPC 水：补足至总体积为 20 μL。

4.3.1.2 RNA 反转录程序

加完试剂后，置PCR反应管于PCR仪内，按下面程序进行反转录：25 ℃ 10 min，42 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min结束反应，4 ℃保存。

4.3.2 PCR 检测操作

4.3.2.1 PCR 操作

RNA反转录结束后，在冰浴条件下按下列试剂用量在PCR反应管中分别加入各成分如下：

——10 倍 PCR 缓冲液（含 Mg^{2+}）：2.5 μL，终浓度为 1 倍；

——5 U/μL Taq DNA 聚合酶：0.5 μL，终浓度为 0.1 U/μL；

——AIV 引物 HA1、HA2、NA1、NA2(25 μmol/L）：各 1 μL，终浓度均为 1 μmol/L；

——cDNA：2 μL；

——灭菌双蒸水：补足至总体积为 25 μL。

4.3.2.2 PCR 反应程序

将PCR反应管置于PCR仪内，按下面程序进行PCR反应：94 ℃ 预变性5 min；然后进入94 ℃ 30 s，53 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s 的循环共35次；72 ℃ 终延伸10 min；4 ℃ 结束扩增。PCR产物电泳或保存于4 ℃ 冰箱。

4.4 RT-PCR 对照

4.4.1 空白对照

用2 μL灭菌双蒸水代替总RNA为模板作空白对照。

4.4.2 阴性对照

用其它常见禽病病毒性病原体的总 RNA 10 ng 为模板作阴性对照。

4.4.3 阳性对照

用 H10N8亚型AIV 总RNA 10ng 为模板作阳性对照。
用 H10Ny（y≠8）亚型AIV总RNA 10 ng 为模板作阳性对照。
用 HxN8（x≠10）亚型AIV总RNA 10 ng 为模板作阳性对照。

4.5 电泳

4.5.1 琼脂糖凝胶制备

将凝胶托架两端用胶带封闭并水平放置在工作台上，在托架板下沿距0.5 cm～1.0 cm 处，放上梳子，配制足够量的凝胶：称取1.0 g 琼脂糖于三角瓶中，加入100 mL 1倍TAE电泳缓冲液，加热溶解琼脂糖。待琼脂糖溶液冷至50 ℃ 时，加入10 mg/mL GoldView染料5 μL，小心混合均匀(避免起泡)。将胶液沿托架胶板边缓慢连续注入，让胶液自由流向各方，凝胶厚度控制在3 mm～5 mm 之间。待凝胶完全凝固后，撤去两端胶带，拔出梳子。将托架放入电泳槽中，加入1倍TAE电泳缓冲液，使之没过胶面2 mm，以备加样电泳。

4.5.2 加样

将10 μL PCR 产物与3 μL 加样缓冲液混合均匀，加至琼脂糖凝胶样品孔中。同时设置标准100bp DNA分子量对照。

4.5.3 电泳条件

以5 V/cm稳压电泳，直至溴酚蓝指示剂到达离琼脂糖凝胶末端2 cm～3 cm 时停止。

5 结果判定

将电泳后的琼脂糖凝胶置于紫外检测仪上观察，与标准DNA分子量及阳性对照比较，分析结果，或用凝胶成像系统拍照保存。

若被检样品同时在267 bp和464 bp位置处出现DNA扩增带，判定为H10N8亚型AIV阳性，记为H10（+）和N8（+）；若被检样品在267 bp位置处出现DNA扩增带，判定为H10亚型AIV阳性，H10（+）；若被检样品在464 bp位置处出现DNA扩增带，判定为N8亚型AIV阳性，N8（+）；若两处位置均无DNA扩增带出现，则判定为阴性，记为（-）。当阴性样品为阴性，阳性样品为阳性时，整个实验有效。

注：检测结果凝胶电泳图见附录A中的图A.1。

6 废弃物的处理

每1 000 mL GoldView 溶液中加入100 mg 粉状活性炭，在室温作用1 h，不时摇动。用滤纸过滤溶液，丢弃溶液，另用塑料袋封装滤纸和活性炭焚化处理。

附　录　A
（资料性附录）
引物序列及检测结果判断图示

A.1　H10N8 亚型AIV特异性引物的序列及扩增的目的基因

A.1.1　H10N8亚型AIV特异性引物的序列

HA1：　5’－GAARATWATGGARAGTGGAGG－3’；
HA2：　5’－CCATAYAGATCATTCTTYTCTTG－3’；
NA1：　5’－AAYTGGACHGGAACCAACAG－3’；
NA2:　5’－CCACACATCACAATGGAGCT－3’；
上述引物序列中的简并引物：R:A/G；W:A/T；Y:C/T；H:A/C/T。

A.1.2　扩增的目的基因

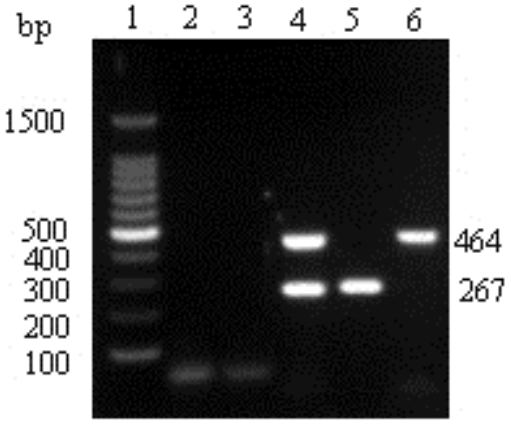
H10N8亚型AIV的HA基因和NA基因。

A.1.3　扩增目的片断的大小

HA1和HA2扩增目的片断大小为267 bp，NA1和NA2扩增目的片断大小为464 bp。

A.2　RT-PCR检测结果琼脂糖凝胶电泳图示例

RT-PCR检测结果琼脂糖凝胶电泳图示例见图A.1。



注：1-标准DNA分子量（100 bp DNA Ladder）；2-空白对照（-），“-”表示检测结果阴性；3-阴性对照（-），“-”表示检测结果阴性；4-H10N8亚型AIV阳性对照（+），“267 bp和464 bp”分别为扩增的H10亚型AIV和N8亚型AIV的目的基因片段；5-H10亚型AIV阳性对照（+），“267 bp”为扩增的H10亚型AIV目的基因片段大小；6-N8亚型AIV阳性对照（+），“464 bp”为扩增的N8亚型AIV目的基因片段大小。

图A.1　多重 RT-PCR 检测结果电泳图

附　录　B
（规范性附录）
溶液的配制

B.1　试剂

所有的试剂均为分析纯（AR）或优质纯（GR）。

B.2　PBS(pH7.2)的配制

配制PBS（pH7.2）所需的试剂如下：
——氯化钠：8.0 g；
——氯化钾：0.2 g；
——磷酸氢二钠：1.44 g；
——磷酸二氢钾：0.24 g；
——双蒸水：定容至1 000 mL。
在800 mL双蒸水中依次加入其成分，用1 mol/L 盐酸调节溶液的pH值至7.2，加水定容至1 000 mL，1.034×10^{5} Pa 高压灭菌25 min。室温保存。

B.3　75 %乙醇的配制

配制75 %乙醇所需的试剂如下：
——无水乙醇：750 mL；
——灭菌双蒸水：250 mL。
在750 mL 无水乙醇中加入250 mL DEPC水，置－20 ℃ 保存。

B.4　DEPC水的制备

制备DEPC 水所需的试剂如下：
——DEPC：0.1 mL；
——双蒸水：100 mL。
将0.1 mL DEPC 加入100 mL 双蒸水中配成0.1 %的水溶液。室温作用12 h 以上，其间间歇摇混几次或在室温下磁力搅拌20 min，然后1.034×10^{5} Pa 高压灭菌30 min，室温保存。

注：DEPC有较强毒性，小心操作。

B.5　加样缓冲液的配制

配制加样缓冲液的试剂如下：
——蔗糖：40.0 g；
——0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）：20 mL；
——10 %SDS：5 mL；

——溴酚蓝：50.0 mg；

——双蒸水：75 mL。

先将蔗糖完全溶解于双蒸水，然后顺序加入其余各成份，待所有成分溶解混合均匀后，用0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌，4 ℃ 保存。

B.6 TAE电泳缓冲液的配制

B.6.1 50倍TAE电泳缓冲液的配制

配制50倍TAE电泳缓冲液的试剂如下：

——Tris：242 g；

——EDTA H_2O：37.2 g。

向烧杯中依次加入其成分，然后加入约 800 mL 的去离子水，充分搅拌溶解后，加入 57.1 mL 的醋酸，充分搅拌，加去离子水定容至 1 L，室温保存。

B.6.2 1倍TAE电泳缓冲液的配制

配制1倍TAE电泳缓冲液的溶液如下：

——50 倍 TAE 电泳缓冲液：10 mL；

——双蒸水：490 mL。

将 10 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液和 490 mL 双蒸水充分混合，室温保存。

附　录　C
（规范性附录）
标准中化学词汇汉英对照

表C.1给出了标准中化学词汇汉英对照。

表 C.1　标准中化学词汇汉英对照

中文名称	英文名称
反转录聚合酶链式反应	reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR
H10N8亚型禽流感病毒	H10N8 subtype avian influenza virus, H10N8 AIV
Taq DNA聚合酶	Taq DNA polymerase
反转录酶	reverse transcriptase
RNA酶	RNAase
RNA酶抑制剂	RNAase inhibitor
随机引物	random primer
脱氧核糖核苷三磷酸	deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP
2′-脱氧腺苷三磷酸	2′-deoxyadenosine triphosphate, dATP
2′-脱氧胞苷三磷酸	2′-deoxycytidine triphosphate, dCTP
2′-脱氧胸苷三磷酸	2′-deoxythymidine triphosphate, dTTP
2′-脱氧鸟苷三磷酸	2′-deoxyguanosine triphosphate, dGTP
十二烷基硫酸钠	sodium dodecyl sulfate, SDS
三（羟甲烷）氨基甲烷	tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris
焦碳酸二乙酯	diethyl pyrocarbonate, DEPC
乙二胺四乙酸	Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA

中华人民共和国广西地方标准

H10N8 亚型禽流感病毒的检测 多重反转录聚合酶链反应法

DB45/T 1509－2017

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