

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.1—2004

禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection of Avian Influenza Virus

2004-2-15 发布

2004-2-15 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
国家 标 准 化 管 理 委 员 会

发布

前 言

本标准是依据 GB/T1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》制定的。

本标准的附录 A、附录 C 是本标准的规范性附录，附录 B 是本标准的资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、深圳市匹基生物工程股份有限公司。

本标准主要起草人：赖平安、张鹤晓、谷强、王甲正、周琦、杨伟、赖少梅。

本标准系首次发布的国家标准。

禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测的操作方法。
本标准适用于活禽及其产品中禽流感病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准：

荧光 RT-PCR	荧光反转录-聚合酶链反应。
Ct 值	每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。
RNA	核糖核酸。
DEPC	焦碳酸乙二酯。
PBS	磷酸盐缓冲盐水（配方见附录 A）。
<i>Taq</i> 酶	<i>Taq</i> DNA聚合酶。

3 原理

禽流感病毒各亚型均属 A 型流感病毒，根据 A 型流感病毒共有基因特定的序列，合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。该探针与禽流感病毒特有的共同基因特异性结合，结合部位位于引物结合区域内。探针的 5'端和 3'端分别标记不同的荧光素，如 5'端标记 FAM 荧光素，它发出的荧光能够被检测仪器接收，称为报告荧光基团（用 R 表示），3'端一般标记 TAMRA 荧光素，它在近距离内能吸收 5'端报告荧光基团发出的荧光信号，称为淬灭荧光基团（用 Q 表示）。

当PCR反应在退火阶段时，一对引物和一条探针同时与目的基因片段结合，此时探针上R基团发出的荧光信号被Q基团所吸收，仪器检测不到R所发出的荧光信号；当PCR反应进行到延伸阶段时，*Taq*酶在引物的引导下，以四种核苷酸为底物，根据碱基配对的原则，沿着模板链合成新链；当链的延伸进行到探针结合部位时，受到探针的阻碍而无法继续，此时的*Taq*酶发挥它的5'→3'外切核酸酶的功能，将探针水解成单核苷酸，消除阻碍，与此同时标记在探针上的R基团游离出来，R所发出的荧光不再为Q所吸收而被检测仪所接收；在*Taq*酶的作用下继续延伸过程合成完整的新链，R和Q基团均游离于溶液中，仪器可继续检测到R所发出的荧光信号。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

荧光RT-PCR检测仪
高速台式冷冻离心机（离心速度12 000 r/min以上）
台式离心机（离心速度3 000 r/min）
混匀器
冰箱（2 °C ~ 8 °C和-20 °C两种）
微量可调移液器（10 μL、100 μL、1 000 μL）及配套带滤芯吸头
Eppendorf管（1.5 mL）

4.2 试剂