

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.2—2004

H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection of

Avian Influenza Virus Subtype H5

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 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：刘环、张鹤晓、赖平安、周琦、刘宁。

本标准系首次发布的国家标准。

H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了H5亚型禽流感病毒荧光RT-PCR操作方法。
本标准适用于活禽及其产品中H5亚型禽流感病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 19438.1-2004 禽流感病毒型通用型荧光RT-PCR检测方法

3 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。
<i>Taq</i> 酶	<i>Taq</i> DNA 聚合酶
PBS	磷酸盐缓冲生理盐水
DEPC	焦碳酸乙二酯

4 原理

采用TaqMan方法，在比对禽流感病毒血凝素基因的基础上，设计一对仅在H5亚型禽流感病毒血凝素基因间保守的特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。该探针的结合部位位于目的扩增片段内部。其中5'端标记FAM荧光素为报告荧光基团（用R表示），3'端标记TAMRA荧光素为淬灭荧光基团（用Q表示），它在近距离内能吸收5'端荧光基团发出的荧光信号。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R基团发出的荧光信号被Q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R基团游离出来，所发出的荧光不再为Q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 试剂和材料

5.1 试剂

除另有说明，所用试剂均为分析纯；所有试剂均用无RNA酶的容器分装。

氯仿

异丙醇：-20 预冷

75 %乙醇：用新开启的无水乙醇和DEPC水（符合GB6682要求）配制，-20 预冷

0.01 mol/L (pH 7.2) 的PBS：配方见GB/T 19438.4-2004附录A。121 ± 2 ，15 min高压灭菌冷却后，无菌条件下加入青霉素、链霉素各10 000 U/mL。