

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19438.4—2004

H9 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 H9

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：张利峰、张鹤晓、刘继红、郭晋优、刘艳华、杨伟。

本标准系首次发布的国家标准。

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了荧光RT-PCR检测H9亚型禽流感病毒的操作方法。
本标准适用于活禽及其产品中H9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/T19438.1-2004 禽流感病毒通用荧光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。
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。

4 原理

H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法是采用 TaqMan 技术。设计一对仅在 H9 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。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，将探针切成单核苷酸，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。

5 材料与试剂

5.1 试剂

除特别说明以外，本标准所用试剂均为分析纯，所有试剂均用无RNA酶污染的容器（用DEPC水处理后高压灭菌）分装。

氯仿