



中华人民共和国国家标准

GB/T 27538—2011

动物流感检测 A型H1N1流感病毒中 HA、NA的焦磷酸测序检测方法

Animal influenza detection—Method of pyrosequencing for HA and NA in
influenza virus A (H1N1)

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:徐彪、梁成珠、凌宗帅、张太翔、岳志芹、高宏伟、孙涛、方绍庆、林祥梅、韩雪清、朱来华、张鹤晓、单虎。

动物流感检测 A 型 H1N1 流感病毒中 HA、NA 的焦磷酸测序检测方法

1 范围

本标准规定了焦磷酸测序技术用于 A 型 H1N1 流感病毒及其墨西哥变异株中的 HA 和 NA 核酸序列检测方法。

本标准适用于 A 型 H1N1 流感病毒通用及 A 型 H1N1 流感病毒墨西哥变异株的核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP:三磷酸腺苷(adenosine triphosphate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PBS:磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate balanced solution)

Pyrosequencing:焦磷酸测序

RT-PCR:反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶

4 原理

焦磷酸测序是通过测序引物和 PCR 扩增单链 DNA 模板杂交,与 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶和底物(APS)、荧光素孵育,逐一加入四种 dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP),如与模板配对,此 dNTP 与引物的末端形成共价键,释放焦磷酸基团(PPi);ATP 硫酸化酶在 APS 存在的情况下催化焦磷酸形成 ATP,ATP 驱动荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素转化,氧化荧光素发出与 ATP 量成正比的可见光信号;光信号由电荷耦合检测器(CCD)收集并由软件转化为峰。每个光信号的峰高与反应中掺入的核苷酸数目成正比。ATP 和未掺入的 dNTP 由三磷酸腺苷双磷酸酶降解,淬灭光信号,并再生反应体系。