

H9N2 亚型流感病毒核酸参考品研制及荧光 RT-PCR 检测验证

宋洁^{1,2*}, 李翠^{3*}, 李晶^{1,2}, 张爽¹, 范文辉¹, 刘丽蓉¹, 贾泓毅⁴, 俞葛毕⁴, 郝睿⁴, 牛春艳⁵, 王晶⁵, 赵启祖³, 刘文军^{1,2}

- 1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 中国兽医药品监察所, 北京 100081
- 4 北京海淀外国语实验学校, 北京 100195
- 5 中国计量科学研究院, 北京 100013

宋洁, 李翠, 李晶, 等. H9N2 亚型流感病毒核酸参考品研制及荧光 RT-PCR 检测验证. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1579–1586.

Song J, Li C, Li J, et al. Development and verification of reference nucleic acid materials of H9N2 influenza viruses by real-time RT-PCR. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1579–1586.

摘要: 从 H9N2 亚型流感病毒 A/chicken/Hunan/04.14 (H9N2) 核酸中扩增了 HA 基因的编码序列, 克隆测序后, 采用体外转录方法制备 RNA。用 RNA 保存液稀释至含量约 10^9 copies/ μ L。分装后进行均匀性和稳定性检验, 通过 4 家实验室协作标定, 取平均值作为定值结果。此外, 文中建立的实时荧光定量 PCR (qPCR) 快速检测技术, 对临床样品进行准确检测验证, 检测限可达 10 个拷贝。结果表明, 文中制备的核酸参考品可作为 H9N2 亚型流感病毒核酸快速检测方法的阳性定量参考品。

关键词: H9N2 亚型流感病毒, HA 基因, 参考品, 荧光 RT-PCR

Received: January 21, 2018; **Accepted:** March 9, 2018

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1200502).

Corresponding author: Jing Li. Tel: +86-10-64807503; E-mail: li418@163.com

*These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划 (No. 2018YFC1200502) 资助。

Development and verification of reference nucleic acid materials of H9N2 influenza viruses by real-time RT-PCR

Jie Song^{1,2*}, Cui Li^{3*}, Jing Li^{1,2}, Shuang Zhang¹, Wenhui Fan¹, Lirong Liu¹, Hongyi Jia⁴, Aibi Yu⁴, Ke Hao⁴, Chunyan Niu⁵, Jing Wang⁵, Qizu Zhao³, and Wenjun Liu^{1,2}

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

4 Beijing Haidian Foreign Language Experiment School, Beijing 100195, China

5 National Institute of Metrology, Beijing 100013, China

Abstract: The HA gene of H9N2 influenza virus (A/chicken/Hunan/04.14 (H9N2)) was amplified and sequenced. The RNA was synthesized by *in vitro* transcription. The RNA transcription solutions were diluted to 10^9 copies/ μL using the RNA storage solution. The aliquoted RNA solutions were used to evaluate the homogeneity and stability. The results were determined by the average value obtained from four independent laboratories. Furthermore, the fluorescence quantitative RT-PCR method was also developed to verify the detection accuracy of clinical samples. The detection limit of this method is approximately 10 copies. Taken together, the RNA transcription solution established in our study can be used as positive standard reference for rapid detection of H9N2 influenza virus.

Keywords: H9N2 subtype influenza virus, HA gene, reference materials, real-time RT-PCR

H9N2 亚型流感病毒属于低致病性流感病毒，机体感染该病毒后一般表现为呼吸道或消化道局限性感染症状，并导致条件性致病的继发感染。病毒侵入机体后可在消化道和呼吸道内不断增殖，随粪便或分泌液排出，在外界环境中有很强的抵抗力，可存活相当长的时间，并通过污染源、饲料或鸡舍内设施而水平传播感染。此外，该病毒可与呼吸道病原菌混合感染，增强其致病性，并加剧临床症状，提高继发感染率。

H9N2 亚型流感病毒具有较强的跨宿主传播能力，不仅感染鸟类，同时也可跨宿主感染包括人在内的猪犬等哺乳动物，并在传播过程中不断与其他亚型的禽流感病毒发生重组变异^[1]。尽管目前对该疫病的感染溯源还不清楚，但研究人员已从我国多地区检测到 H9N2 亚型流感病毒^[2-3]。该病诊断常采用传统的鸡胚病毒分离法，但该方法检测成本较高，费事、费力，在某些情况下，应用 RT-PCR 方法来检测病原已逐步替代鸡胚病毒分离法^[4]，但分子生物学方法因人员操作及检

测系统差异等存在较大误差，而以核酸标准物质为参比，可校准检测方法并标定被检样品。目前流感 H9N2 亚型病毒的核酸标准物质国内外均未见报道，且无该标准物质提供，导致 H9N2 亚型流感病毒核酸检测标准至今尚未统一。

为校准 H9N2 亚型流感病毒的分子生物学检测方法，本研究针对 H9N2 亚型流感病毒最具检测意义的血凝素 (HA) 基因片段，在扩增克隆的基础上，采用体外转录方法制备 RNA，定量分装后经均匀性检验、稳定性监测及协作标定定值等。此外，采用荧光定量检测技术，以该核酸参考品为参比对临床流感样品进行检测验证。本研究旨在为 H9N2 亚型流感病毒核酸参考品的建立和分子生物学诊断方法标准化等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒核酸

本研究涉及的 8 株 H9N2 亚型流感病毒来源见表 1。

表 1 H9N2 亚型流感病毒株来源

Table 1 Sources of H9N2 influenza virus strains

No.	Viruses strain (H9N2)	NCBI ID
1	A/chicken/NanJing/02/2001	KF844248.1
2	A/chicken/Shandong/LX06/2007	FJ231865.1
3	A/chicken/Guangdong/16/2003	HM008899.1
4	A/chicken/Hunan/661/2015	Isolated
5	A/chicken/Hunan/507/2015	Isolated
6	A/chicken/Hunan/521/2015	Isolated
7	A/duck/Hong-Kong/Y280/1997	AF156376.1
8	A/turkey/Wisconsin/1/1966	CY130054.1

1.2 主要试剂及仪器

TRIzol LS 试剂购自 Invitrogen 公司；逆转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司；dNTPs、Oligo dT、Taq DNA 聚合酶由北京诺派生物科技有限公司惠赠；Spe I 核酸内切酶购自 NEB 公司；DNA marker、T 载体转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；DNA 纯化试剂盒、荧光定量 RT-PCR (SYBR Green I) 试剂盒购自天根生化科技有限公司；7500 实时定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司；NanoDrop 1000 核酸蛋白微量测定仪购自赛默飞世尔科技公司。

1.3 引物设计

根据毒株 HA 基因的保守位点,设计引物 (表 2), 用于 HA 基因片段的扩增。

1.4 核酸参考品候选物筛选

将 H9N2 亚型流感病毒临床分离毒株、疫苗毒株与经典毒株通过序列比对,用 DNASTar 软件包进行遗传分析,用 Neighbor-Joining Tree 方法建

表 2 H9N2 亚型流感病毒特异性 HA 基因引物及荧光定量 RT-PCR 检测用引物

Table 2 Primers for detection of HA genes of H9N2

Primers	Primer sequences (5'-3')
HA-F	GCTCCACACAGAGCATAAT
HA-R	CTTCTGTTGCCACACTCGTT
qHA-F	TGGGATGCTGTGTGCAAC
qHA-R	GAGTCAACCATCTCATGC

立 HA 基因遗传进化树,分析毒株进化溯源关系,确定候选毒株。

将候选毒株 HA 基因的上下游引物进行 PCR 反应,反应条件为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s,57.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,循环 30 次;72 °C 延伸 10 min。取反应产物用 1% 琼脂糖凝胶检测。

利用 TA 克隆法将纯化的 cDNA 克隆到 pEASY-T5 克隆载体上,反应结束后将产物转入感受态细胞中,涂布于具有氨苄青霉素 (Amp) LB 琼脂 (2%) 平皿,37 °C 倒置培养,待长出菌落后挑取单菌落进行 PCR 及质粒酶切鉴定。

1.5 核酸参考品的制备

将鉴定过的质粒利用 Spe I 线性化,利用体外转录试剂盒克隆出 H9N2 亚型流感病毒核酸参考品候选物。通过 OD_{260}/OD_{280} 的值,利用拷贝数换算公式获得拷贝数。分析其 RNA 拷贝数,应用 RNA 保存液 (TRIzol : 水=3 : 1) 稀释 RNA 至 10^9 拷贝数/ μ L,将检验合格的候选物无菌、定量分装至冻存管中低温冻存,0.5 mL/管。

拷贝数计算公式为:

$$N_c = C \times \frac{NA}{NB \times MA}$$

其中, N_c =拷贝数(copies/ μ L), C =浓度(g/ μ L)= 10^9 ng/ μ L), NA =阿伏伽德罗常数= 6.02×10^{23} , NB =碱基数, MA =平均分子量。

1.6 核酸参考品的检验

特异性检验:随机取样进行测序分析。

均匀性检验:随机抽取 10 支参考品,提取 RNA 并测定拷贝数,采用方差分析法统计样品均匀性。此方法是通过组间方差和组内方差的比较,来判断各组测量值之间有无系统性差异,如果两者的比小于统计检验的临界值,则认为样品是均匀的。

稳定性检测:随机选取 10 支参考品,-20 °C

保存, 分别于 0、1、6、12 及 24 个月随机选取 1 支提取 RNA 并测定拷贝数, 采用 *t* 检验确定其稳定性。

协作标定: 组织 4 家协作标定单位按统一的协作标定方案进行协作标定。

1.7 核酸参考品定值及不确定度分析

根据多方数据经统计学分析对核酸参考品进行定值, 定值结果表示为: 总几何平均值±总标准偏差 *S*。

对参考品的各个不确定度分量进行合成, 平均测量样品的不确定度公式为:

$$U_A = S/\text{qurt}(n) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (s_i - \bar{s})^2}{n-1}}$$

1.8 荧光定量 RT-PCR 反应体系的建立

选定 1 个拷贝数的模板量, 通过改变反应的退火温度、反应体系、引物浓度, 确定最适荧光定量 RT-PCR 的反应条件 (引物见表 2)。

将制备的参考品按梯度稀释, 每个梯度做 3 个重复, 利用荧光定量 RT-PCR 测出相应的扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时的扩增循环数值 (C_t 值), 以 $C_t \leq 35$ 判定为阳性, 得到参考品的最小检出拷贝数; 以参考品的拷贝数的对数作为横坐标, 以 C_t 值的平均值作为纵坐标做标准曲线。用不同浓度的 RNA, 利用荧光定量 RT-PCR 连续检测 3 次, 计算变异系数, 验证重复性。

1.9 核酸参考品的应用及临床样品检测

临床样本来源为 2015 年收集于湖南省岳阳部分活禽市场的 197 份病死禽的组织样品及健康家禽的咽拭子, 以核酸参考品为参比进行临床样品检测。

2 结果与分析

2.1 HA 基因的扩增、克隆及测序

对 H9N2 亚型流感病毒 HA 基因扩增鉴定,

在 495 bp 处出现阳性特异性条带, 测序成功后确定该毒株为 H9N2 亚型流感毒株 (图 1)。

2.2 参考品候选物筛选

毒株的进化分析结果显示, 本研究中的 8 株病毒株均属于欧亚谱系, 亲缘关系较近, 具有共性序列及病毒特性。所以选择 A/chicken/Hunan/661/2015 (H9N2) 毒株作为核酸参考品候选毒株 (图 2)。

2.3 核酸参考品的制备

经体外转录获得 H9N2 亚型流感病毒核酸参考品, OD_{260}/OD_{280} 的值分别为 1.99、1.95 和 2.03, 均在 2.0 ± 0.1 范围内, 结果显示 RNA 浓度较高且稳定。计算其拷贝数为 2.306×10^9 copies/ μL 。

2.4 核酸参考品的检验

2.4.1 特异性检验

测序成功后确定该毒株为 H9N2 亚型流感毒株。

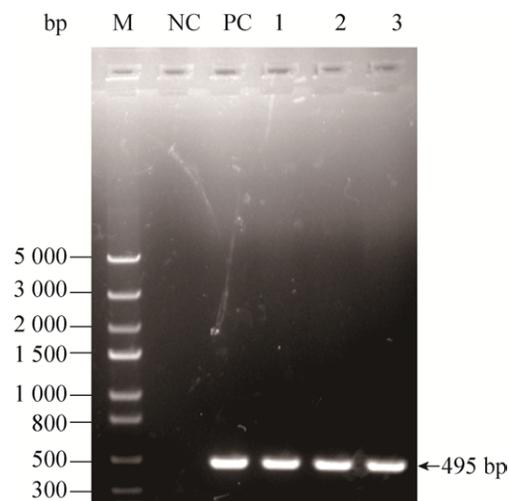


图 1 HA 基因扩增电泳结果

Fig. 1 Identification of HA gene of H9N2 subtype. M: DNA marker; NC: negative control; PC: positive control; 1: A/chicken/Hunan/661/2015(H9N2); 2: A/chicken/Hunan/507/2015(H9N2); 3: A/chicken/Hunan/521/2015(H9N2).

2.4.2 均匀性检测

随机抽取 10 支参考品, 提取 RNA 并测定拷贝数, 作统计量 (F , $F=S_{12}/S_{22}=1.8$, 根据自由度 (v_1 、 v_2) 及给定的显著性水平 α , 可由 F 表得临界的 $F\alpha$ 值, $F\alpha=2.0374>1.8$, 所以 $F<F\alpha$), 认为组内与组间无明显差异, 样品是均匀的, 均匀性计算公式如下。

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \bar{X}_i / m = 0.8024 / 10 = 0.0802$$

$$N = \sum_{i=1}^n n_i = 3 \times 10 = 30$$

$$Q_1 = \sum_{i=1}^n n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 = 0.00015$$

$$Q_2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - X_j)^2 = 0.00018$$

2.4.3 稳定性检测

计算得 $S(b_1)=1.836 \times 10^6$, 自由度为 3 且置信度为 0.95 的置信区间, t 值为 3.24, 参考品的 RNA 含量均为 10^9 拷贝数/ μL (copies/ μL) 数量级。结果显示斜率不显著, 说明 -20°C 条件下保存 24 个月制备的参考品候选物稳定。

2.4.4 参考品协作标定及定值结果

汇总 4 家协作标定单位的试验数据与本

单位的数据进行统计学分析, 平均值为 2.102×10^9 copies/ μL 。经方差分析, 总平均值的标准偏差为 0.928×10^9 copies/ μL 。H9N2 亚型流感病毒 HA 基因 RNA 含量的定值结果为 $(1.918 \pm 0.928) \times 10^9$ copies/ μL 。

2.5 荧光定量 RT-PCR 反应体系的优化结果

通过荧光定量 RT-PCR 实验分析得出, 最适反应体系为 25 μL , 其中模板 10.0 μL , 引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 离子浓度为 6 mmol/L; 最适循环参数为: 42°C 30 min, 94°C 3 min; 之后 92°C 15 s, 53°C 10 s, 60°C 35 s, 40 个循环。

将参考品 10 倍系列稀释为 10^1 – 10^9 Copies/ μL 进行检测, 结果显示建立的 qRT-PCR 方法的检测限可达 10 个拷贝数 (图 3)。对 3 个不同浓度的 cDNA 标准模板, 用所建立的荧光 RT-PCR 方法连续检测 3 次, 统计各组 C_t 值的变异系数 (CV%), 均小于 5%。

2.6 临床样品的检测结果

用参考品作为阳性对照, 对临床样本进行检测, 共检出 10 个 H9N2 亚型阳性样品, 与常规 RT-PCR 检测方法 (《SN/T 1182-2010 禽流感检疫技术规范》)^[5] 进行比较, 结果一致。

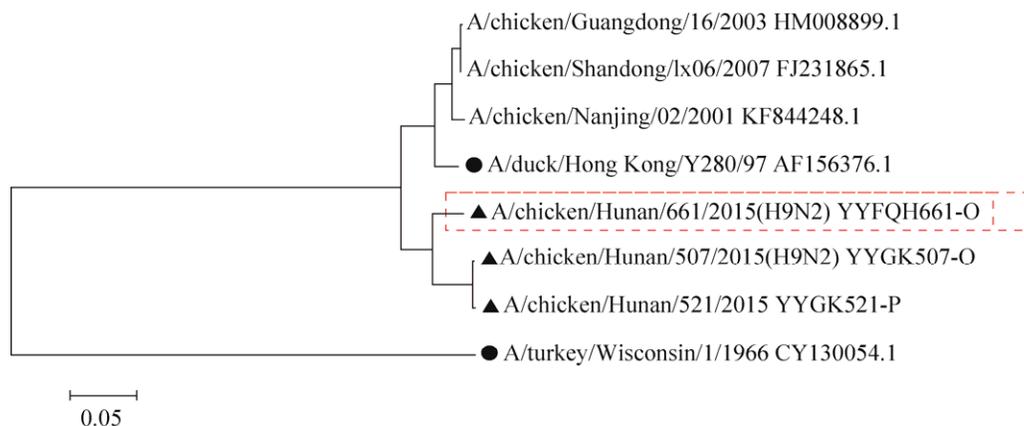


图 2 H9N2 亚型流感病毒 HA 基因遗传进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of HA genes of H9N2 AIV. ▲: isolates; ●: typical strain; Empty: vaccine strain.

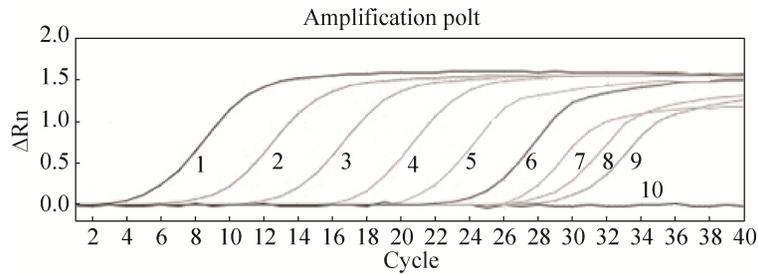


图3 荧光 RT-PCR 灵敏度检验结果

Fig. 3 Sensitivity test of real-time RT-PCR. 1-9: 10^1 - 10^9 copies of RNA standards; 10: negative control.

3 讨论

近年来 H9N2 亚型流感病毒不断出现, 对养殖业造成了严重危害, 同时也严重威胁了人类的公共卫生安全。例如 2013 年 H9N2 亚型变异毒株, 鸡群感染病例被发现后, 研究人员才注意到该病毒的存在^[6-7]。这种被动状态严重制约着流感病毒主动预警研究, 其根源是动物源流感病毒的监测技术和预防水平较低, 缺乏现场快速、准确、标准化的鉴别诊断及计量技术。制定诊断试剂所需的核酸标准物质及建立检验标准, 是推动监测技术改进、提高动物源流感病毒生物安全防控能力的根本。针对临床上常见的病毒均会有相应的标准品研发^[8-9]。

本试验参考兽用生物制品规程^[10], 按照国家一级标准物质技术规范中标准物质的制备程序研制核酸参考品^[11]。为提高产品质量, 本实验采取了以下措施: 一是对参考品的候选物进行筛选, 尽量保证候选物的质量; 二是对参考品进行了均匀性检验, 保证了 RNA 参考品的均匀性; 三是对参考品进行稳定性试验, 提供了其保存期监测数据; 四是组织协作标定, 对不同协作标定单位的试验结果进行统计分析, 最终确定了核酸参考品的含量数量级为 10^9 copies/ μ L, 保证了其实际使用的量值准确性。

血凝素是流感病毒囊膜纤突的主要成分之一, 也是病毒表面最丰富的抗原, 负责与宿主的

受体结合的表面糖蛋白, 能刺激机体产生中和抗体, 是流感病毒的保护性抗原^[12]。本研究中克隆的 HA 片段是经过序列比对而筛选出的保守区域。

本研究通过体外转录的方法, 制备出了高拷贝的 RNA 模板, 与质粒模板相比, 更能够准确地保证转录的准确性。由于待检样品同样是 RNA, 相比 cDNA 模板而言保证了待检品与标准物质的一致, 同时由于 RNA 容易降解, 可以避免引入核酸污染, 不易对环境造成污染或假阴性的结果。

临床中建立的方法通常是利用常规 PCR 或者多重 PCR 的方法^[13-14], 此种方法的弊端在于需要经过多重程序, 实验过程中容易造成污染, 另外由于该方法对模板要求较高, 通常的禽流感病毒浓度偏低, 容易出现假阴性, 相比此种方法, 本实验建立的荧光 RT-PCR 具有较高的灵敏度, 模板浓度为 10 个拷贝即可检测出流感病毒, 同时还可以对其进行定量。本实验建立的方法是 SYBR Green I 染料法, 该方法是利用荧光染料与双链 DNA 的结合的原理, 反应中若有引物二聚体也会被收集, 与 TaqMan 探针法相比, 特异性较低^[15-16]。但由于 SYBR Green I 染料法引物设计容易, 操作简便, 经济有效。另外此方法可适用于任何形式的模板, 省去了实验中不必要的环节^[17-18], 更适用于推广使用。

本试验建立了最佳的反应条件后, 与普通检测方法相比, 结果一致且更加灵敏。我们将用商

品化荧光定量 RT-PCR 试剂盒与本研究制备的参考品及荧光定量 RT-PCR 方法进行平行比对, 同时在比对过程中形成 H9N2 亚型流感病毒荧光定量 RT-PCR 国家标准建议。另外, 临床上分离的样本不会局限于 H9N2 亚型流感病毒, 我们后续会摸索 H7 及 H5 等亚型核酸参考品数据, 作为下一步的工作重点。

综上, 本试验研究的 H9N2 亚型流感病毒核酸参考品对我国养殖场及临床基础诊断研究领域都具有重大推广意义。

REFERENCES

- [1] Sun QY, Chen Q, Xia LM. Prevalence status of H9N2 subtype avian influenza. *Prog Vet Med*, 2011, 32(10): 107-111 (in Chinese).
孙泉云, 陈琦, 夏炉明. H9N2 亚型禽流感流行现状. *动物医学进展*, 2011, 32(10): 107-111.
- [2] Zhang J, Chen LG, Zhang Y, et al. Prevalence of H9N2 subtype avian influenza virus in different regions of China during 1997 to 2015. *China Poultry*, 2016, 38(20): 20-27 (in Chinese).
张静, 陈立根, 张宇, 等. 1997-2015 年我国不同地区 H9N2 亚型禽流感病毒流行情况研究. *中国家禽*, 2016, 38(20): 20-27.
- [3] Wu HY, Li MY, Fan GC, et al. Epidemiological characteristics of 33 H9N2 subtype avian influenza virus isolates. *Chin J Animal Health Inspect*, 2010, 27(6): 31-33 (in Chinese).
吴海燕, 李明义, 范根成, 等. 33 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株分子流行特点的研究. *中国动物检疫*, 2010, 27(6): 31-33.
- [4] OIE Biological Standards Commission. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (Mammals, Birds and Bees)*. 5th ed. Paris: Office International Des Epizooties, 2004.
世界动物卫生组织著. 农业部兽医局/中国动物卫生与流行病学中心译. *陆生动物诊断试验和疫苗手册 (哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)*. 5 版. 巴黎: 国际兽疫局, 2007.
- [5] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Quarantine protocol for avian influenza(SN/T 1182-2010)[EB/OL]. [2011-05-01]. <http://www.eshian.com/standards/16394.html>.
- [6] Qi WB, Shi WF, Li W, et al. Continuous reassortments with local chicken H9N2 virus underlie the human-infecting influenza A (H7N9) virus in the new influenza season, Guangdong, China. *Prot Cell*, 2014, 5(11): 878-882.
- [7] Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9654-9658.
- [8] Li C, Guan FS, Dai ZH, et al. Preparation and characterization of following the national standard anti-*Brucella abortus* serum, bovine. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 812-816 (in Chinese).
李翠, 关孚时, 戴志红, 等. 牛布鲁氏菌病阳性血清国家标准品的研制. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 812-816.
- [9] Li C, Guan FS, Dai ZH, et al. Preparation and characterization of the national standard for Newcastle disease hemagglutination inhibition test positive serum, chicken. *Chin J Vet Drug*, 2013, 47(1): 10-13 (in Chinese).
李翠, 关孚时, 戴志红, 等. 鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品的研制. *中国兽药杂志*, 2013, 47(1): 10-13.
- [10] Fourth Department of Agriculture Veterinary Biological Products Committee People's Republic of Veterinary Biological Products. Beijing: Chemical Industry Press, 2000 (in Chinese).
农业部第四届兽用生物制品规程委员会. *中华人民共和国兽用生物制品规程*. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [11] National Standard Material Management Committee. Technical norm of primary standard material (JJG 1006-94)[EB/OL]. [2010-12-15]. http://naccrm.china-csm.org/news_info.aspx?id=462.
国家标准物质管理委员会. 一级标准物质技术规范 (JJG 1006-94)[EB/OL]. [2010-12-15]. http://naccrm.china-csm.org/news_info.aspx?id=462.
- [12] Stevens J, Corper AL, Basler CF, et al. Structure of

- the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*, 2004, 303(5665): 1866–1870.
- [13] Wang YJ, Zhu SY, Hong WM, et al. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks. *J Virol Methods*, 2017, 248: 172–176.
- [14] Luan L, Sun ZH, Kaltenboeck B, et al. Detection of influenza A virus from live-bird market poultry swab samples in China by a pan-IAV, one-step reverse-transcription FRET-PCR. *Sci Rep*, 2016, 6: 30015.
- [15] Arikawa E, Sun YY, Jie W, et al. Cross-platform comparison of SYBR[®], Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genom*, 2008, 9: 328.
- [16] Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 85.
- [17] Zhang JH, Wang ZC, Zheng JS, et al. In vitro transcription of HA, NA and M gene of H5N1 avian influenza virus and preparation of RNA standards. *Infect Dis Info*, 2011, 24(1): 26–28 (in Chinese). 张锦海, 王忠灿, 郑纪山, 等. H5N1 禽流感病毒抗原基因的体外转录及 RNA 标准品构建. *传染病信息*, 2011, 24(1): 26–28.
- [18] Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5(2): 209–219.

(本文责编 郝丽芳)