

水中病毒的富集浓缩方法

Methods for the enrichment and concentration of waterborne viruses

（报批稿）

（本草案完成时间：2025 年 12 月 31 日）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和耗材 1

6 设备 2

7 操作步骤 2

8 病毒核酸提取和纯化 3

9 RT-qPCR 反应体系和参数 4

10 质量控制 4

11 生物安全 6

附录 A（规范性） RNase 的去除和无 RNase 试剂的配制 7

附录 B（规范性） 过程控制病毒培养及引物和探针 1

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出并组织实施。

本文件由江苏省卫生标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、无锡市疾病预防控制中心、江苏省农业科学院。

本文件主要起草人：霍翔、倪云龙、乔昕、冯微宏、谢雅晶、管红霞、周连、田亭、沈赟、曹会。

水中病毒的富集浓缩方法

1 范围

本文件规定了水中病毒的富集浓缩方法。

本文件适用于水源水、生活饮用水、娱乐景观用水、污水等水样中噬菌体病毒、诺如病毒、柯萨奇病毒、轮状病毒、肠道病毒、星状病毒、腺病毒、新冠病毒、札如病毒、呼吸道合胞病毒等病毒的富集浓缩。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 5750.2 生活饮用水标准检验方法 第2部分：水样的采集与保存
- GB/T 5750.4 生活饮用水标准检验方法 第4部分：感官性状和物理指标
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

NTU Nephelometric Turbidity Unit
散射浊度单位，用于衡量水中悬浮颗粒对光线的散射能力，反映水的清澈程度。

4 原理

根据水样浊度，对水样预过滤处理，去除悬浮物后，加入多价阳离子，病毒在多价阳离子的作用下，吸附在阴离子交换滤膜上。洗脱吸附在滤膜上的病毒，使用超滤管浓缩洗脱液，病毒因直径大于超滤膜孔径被截留在超滤膜面上达到浓缩的目的。使用过程控制对照和核酸扩增对照对富集浓缩过程质量控制。使用核酸提取技术和荧光定量聚合酶链式反应（RT-qPCR）方法，检测水中病毒核酸。

5 试剂和耗材

5.1 试剂

除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯；实验用水均为无 RNase 超纯水（见A.2.1）。

- 5.1.1 磷酸盐缓冲液（PBS）：见附录 A.2.2。
- 5.1.2 MgCl₂ 溶液：见附录 A.2.3。
- 5.1.3 三氯甲烷。

- 5.1.4 75 %乙醇：见附录 A.2.4。
- 5.1.5 异丙醇。
- 5.1.6 Trizol 试剂：见附录 A.2.5。
- 5.1.7 盐酸（HCl）溶液（1 mol/L）：见附录 A.2.6。
- 5.1.8 1 % Tris/甘氨酸/牛肉膏（TGBE 洗脱液）：见附录 A.2.7。
- 5.1.9 过程控制病毒：见附录 B。
- 5.1.10 过程控制病毒的引物和探针，见附录 B。

5.2 耗材

除微生物实验室常规耗材外，其他耗材如下；实验耗材均使用无 RNase、无菌耗材。

- 5.2.1 离心管、移液器吸管和吸头、PCR 薄壁管：见附录 A.1。
- 5.2.2 混合纤维素酯过滤膜（孔径：1.2 μm 、0.22 μm ）或其他等效过滤膜。
- 5.2.3 定性滤纸。
- 5.2.4 超滤管（容积 $\geq 15\text{ mL}$ ；截留分子量 30 KD）。

6 设备

除微生物实验室常规灭菌和培养设备外，其他设备如下。

- 6.1 移液器。
- 6.2 蠕动泵或真空泵。
- 6.3 涡旋仪。
- 6.4 圆盘式滤器或其他等效过滤装置。
- 6.5 震荡器或摇床。
- 6.6 冷冻高速离心机（4℃，50 mL，离心力 $\geq 5000 \times g$ ）。
- 6.7 pH 计：精度 ≥ 0.01 。
- 6.8 荧光定量 PCR 仪。
- 6.9 浊度仪。
- 6.10 天平：感量为 0.1 g。
- 6.11 医用冷藏冷冻冰箱（-20℃~4℃）。
- 6.12 超低温冰箱（-80℃）。
- 6.13 II级生物安全柜。

7 操作步骤

7.1 水样采集与保存

参照 GB/T 5750.2 采集水样1 L。水样应在4℃以下的环境中运输。实验室应0℃~4℃冷藏、避光保存水样并尽快检测，如果在24 h内不能检测，应将水样保存在-80℃冰箱中，实验前取出，放置室温，至水样完全解冻。

7.2 预过滤

- 7.2.1 在 1 L 水样中加入 10 μL 浓度为 10^6 PFU/ μL 的过程控制病毒，混匀。

7.2.2 参照 GB/T 5750.4 要求测定水样浑浊度, 当水样浑浊度 ≤ 1 NTU 时, 直接进入步骤 7.3。

7.2.3 当水样浑浊度 >1 NTU 时, 用镊子夹取混合纤维素酯过滤膜 ($1.2\ \mu\text{m}$), 置于过滤器上, 正压下, 将 1 L 水样通过过滤膜, 去除水中杂质, 将预过滤后的水样收集于烧杯中。

7.3 吸附

7.3.1 在 1 L 水样中加入 10 mL MgCl_2 溶液, 使其终浓度为 0.025 mol/L, 用 1 mol/L 盐酸调节水样 pH 至 3.0 ± 0.5 。

7.3.2 用镊子夹取混合纤维素酯过滤膜 ($0.22\ \mu\text{m}$), 置于过滤器上, 正压过滤。

7.4 洗脱

7.4.1 用镊子取下过滤完样品的过滤膜, 放入平皿中, 用剪刀将过滤膜剪碎, 剪碎后转入 50 mL 离心管。

7.4.2 离心管中加入 15 mL 1% TGBE 洗脱液, 使用震荡器或摇床上, 400 次/min 振荡洗脱 30 min。

7.5 超滤

7.5.1 用吸管将洗脱液转移至另一 50 mL 离心管中, $3\ 000 \times g$ 离心 10 min。

7.5.2 吸取上清液, 转移入超滤管, 4°C , $3\ 000 \times g$ 离心 15 min。

7.5.3 在超滤管中加入 500 μL PBS, 用微量移液器吸取超滤管中 PBS, 沿着固定超滤膜的管壁反复吹打 20 次, 得到水样的病毒浓缩液。

7.5.4 将病毒浓缩液吸入 1.5 mL 离心管, 4°C 保存, 24 h 内完成核酸提取和检测。若无法及时提取核酸, -80°C 长期冻存病毒浓缩液。

注: 使用其他等效过滤装置时, 应根据过滤装置大小选择不同规格的混合纤维素酯过滤膜 ($0.22\ \mu\text{m}$), 同时调整 1% TGBE 洗脱液用量、超滤管规格和 PBS 用量。

8 病毒核酸提取和纯化

8.1 病毒裂解

将病毒浓缩液加入离心管, 加入病毒浓缩液 3 倍体积 Trizol 试剂, 混匀, 剧烈涡旋震荡 1 min, 室温放置 5 min, 加入 0.2 倍体积三氯甲烷, 涡旋混匀 30 s, $12\ 000 \times g$, 离心 5 min, 上层水相移入新离心管中, 不能吸出中间层。

8.2 病毒核酸提取

离心管中加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 5 min, $12\ 000 \times g$, 室温, 离心 5 min, 弃上清, 倒置于吸水纸上, 沾干液体, 不同样品应使用不同的吸水纸沾干, 防止交叉污染。

8.3 病毒核酸纯化

8.3.1 加入 1 mL 75% 乙醇, 颠倒洗涤核酸沉淀, $12\ 000 \times g$, 4°C , 离心 10 min, 弃上清。

8.3.2 重复加入 1 mL 75% 乙醇, 颠倒洗涤核酸沉淀, $12\ 000 \times g$, 4°C , 离心 10 min, 弃上清, 将离心管倒置于吸水纸上, 沾干液体, 不同样品应使用不同的吸水纸沾干, 防止交叉污染。或用微量移液器吸干, 不同样品应更换枪头, 吸头勿触碰沉淀物, 室温干燥 3 min。

8.3.3 加入 50 μL 无 RNase 超纯水, 轻轻混匀, 溶解管壁上的核酸, $2\ 000 \times g$, 室温, 离心 5 s, 置

于冰上保存备用。

8.4 其他要求

病毒核酸可使用手工方法提取和纯化，也可使用商品化病毒核酸提取纯化试剂盒。提取完成后，为延长核酸保存时间可加入 RNase 抑制剂。提取核酸后应立即开展 RT-qPCR 检测，或保存在4℃小于8 h。长期储存建议-80℃保存。

9 RT-qPCR 反应体系和参数

- 9.1 根据目标病毒选择合适的引物、探针、反应体系和反应参数开展 RT-qPCR 检测。也可使用商品化病毒 RT-qPCR 检测试剂盒。
- 9.2 过程控制病毒 RT-qPCR 检测的引物和探针见附录 B。也可使用商品化过程控制病毒检测试剂盒。
- 9.3 过程控制病毒 RT-qPCR 反应体系见表 1。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的试剂盒要求适当调整。

表 1 过程控制病毒 RT-qPCR 反应体系

名称	终浓度	加样量（μL）
RT-qPCR缓冲液	1×	5.0
MgSO4	1 mmol/L	1.0
dNTPs	0.2 mmol/L	0.5
上游引物	1 μmol/μL	0.5
下游引物	1 μmol/μL	0.5
探针	0.1 μmol/μL	0.5
逆转录酶	0.1 U/μL	0.5
DNA聚合酶	0.1 U/μL	0.5
无 RNase 超纯水	--	11.0
模板	--	5.0
总体积	--	25.0

9.4 过程控制病毒 RT-qPCR 反应参数见表 2。荧光通道选用 FAM；逆转录温度应根据使用的逆转录酶的最适温度调整。

表 2 过程控制病毒 RT-qPCR 反应参数

步骤		循环数	温度（℃）	反应时间
逆转录		1	50	30 min
预热		1	95	5 min
扩增	变性	45	95	15 sec
	退火		60	30 sec
	延伸		65，收集荧光信号	30 sec

10 质量控制

10.1 富集浓缩的质量控制

10.1.1 空白对照

以1 L无 RNase 超纯水为水样，进行病毒富集及提取核酸，作为空白对照，RT-qPCR 检测与目标病毒 RT-qPCR 检测过程相同。空白对照结果为阴性。

10.1.2 过程控制对照

用过程控制病毒的回收率评估水样目标病毒的富集浓缩效果。

10.1.2.1 将过程控制病毒按步骤 8 提取和纯化核酸。

10.1.2.2 将 10 μ L 过程控制病毒核酸进行 10 倍梯度稀释，依次稀释 5 个稀释度，形成过程控制病毒核酸原液 (10^6)， 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 共 6 个浓度的标准系列。

10.1.2.3 按照步骤 9 进行过程控制病毒 RT-qPCR，确定 6 个标准系列过程控制病毒核酸的 C_t 值。

10.1.2.4 以 6 个标准系列过程控制病毒核酸浓度 \lg 值为 X 轴，以其 C_t 值为 Y 轴，建立标准曲线，拟合标准曲线计算公式，标准曲线 r^2 应 ≥ 0.98 。

10.1.2.5 将含过程控制病毒的样品核酸提取液，按照步骤 9 进行 RT-qPCR 反应，确定 C_t 值，代入标准曲线公式，计算经过病毒富集和核酸提取等步骤后过程控制病毒核酸浓度。

10.1.2.6 计算回收率，过程控制病毒回收率 (A) = (经富集提取等步骤后的过程控制病毒核酸总量 \div 最初加入的 10 μ L 过程控制病毒核酸的总量) $\times 100\%$ 。

10.1.2.7 回收率的判定：

- a) $A \geq 1\%$ ，实验结果有效；
- b) $A < 1\%$ ，应重新富集浓缩；
- c) $A < 1\%$ ，目标病毒检测结果阳性，实验结果有效。

10.2 核酸提取对照

10.2.1 阳性对照

使用目标病毒核酸作为核酸提取过程阳性对照，提取过程与水样核酸提取过程相同，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。核酸提取阳性对照结果为阳性。

10.2.2 阴性对照

使用无 RNase 超纯水作为核酸提取过程阴性对照，提取过程与水样核酸提取过程相同，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。核酸提取阴性对照结果为阴性。

10.3 核酸扩增对照

10.3.1 阳性对照

使用目标病毒核酸作为核酸扩增阳性对照，与水样核酸同时进行 RT-qPCR 检测，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。核酸扩增阳性对照结果为阳性。

10.3.2 阴性对照

使用无 RNase 超纯水作为核酸扩增阴性对照，与水样核酸同时进行 RT-qPCR 检测，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。核酸扩增阴性对照结果为阴性。

10.3.3 扩增对照

使用无 RNase 超纯水5 μL ，加入目标病毒核酸1 μL 作为扩增对照，与待测水样核酸提取液同时进行 RT-qPCR 检测，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。

10.3.4 扩增控制对照

10.3.4.1 使用水样核酸提取液 5 μL 和水样核酸提取液的 10 倍稀释液 5 μL ，分别加入目标病毒核酸 1 μL 作为水样核酸扩增控制对照和 10 倍稀释水样核酸扩增控制对照，反应体系和条件与目标病毒 RT-qPCR 检测条件相同。

10.3.4.2 计算扩增抑制指数：

- a) 扩增抑制指数 1 (B_1) = 水样核酸扩增控制对照 Ct 值-扩增对照 Ct 值
- b) 扩增抑制指数 2 (B_2) = 10 倍稀释水样核酸扩增控制对照 Ct 值-扩增对照 Ct 值

10.3.4.3 扩增抑制指数的判定：

- a) $B_1 < 2$ 时，扩增过程有效；
- b) $B_1 \geq 2$ 时，扩增过程无效，应比较 B_2 ；
- c) $B_2 < 2$ 时，扩增过程有效，使用水样核酸 10 倍稀释液的 Ct 值；
- d) $B_2 \geq 2$ 时，扩增过程无效，重新检测；
- e) $B_2 \geq 2$ ，目标病毒检测结果阳性，实验结果有效。

11 生物安全

标本采集、转运、保存和检验等活动，应执行 GB 19489 相关规定。

附 录 A
(规范性)

RNase 的去除和无 RNase 试剂的配制

A.1 RNase 的去除

- A.1.1 配制溶液用的酒精、异丙醇等应采用未开封的试剂。操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套，并经常更换，以避免将皮肤上的细菌、真菌及人体自身分泌的 RNase 污染用具或带入溶液。
- A.1.2 玻璃容器应在240℃烘烤4 h以去除 RNase。
- A.1.3 离心管、移液器吸嘴、药匙等塑料用具应用无 RNase 超纯水室温浸泡过夜，然后灭菌，烘干；或直接购买无 RNase 的相应用具。

A.2 无 RNase 溶液的配制

A.2.1 无 RNase 超纯水

A.2.1.1 成分

超纯水	100 mL
焦碳酸二乙酯（DEPC）	50 μL

A.2.1.2 制法

室温过夜，121℃，灭菌15 min，或直接购买无 RNase 超纯水。

A.2.2 磷酸盐缓冲液（PBS）

A.2.2.1 成分

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g
无 RNase 超纯水	总体积1000 mL

A.2.2.2 制法

将固体物质溶解于无 RNase 超纯水，25℃时调节 pH 至7.3。121℃，灭菌15 min。

A.2.3 MgCl₂ 溶液

A.2.3.1 成分

六水合氯化镁	507.5 g
无 RNase 超纯水	总体积1000 mL

A.2.3.2 制法

将固体物质溶解于800 mL无 RNase 超纯水中，再用无 RNase 超纯水定容至1000 mL，充分混匀，制成2.5 mol/L MgCl₂ 溶液。

A. 2. 4 75 %乙醇

A. 2. 4. 1 成分

无水乙醇	75 mL
无 RNase 超纯水	25 mL

A. 2. 5 Trizol 试剂

A. 2. 5. 1 成分

异硫氰酸胍	250.0 g
0.75 mol/L 柠檬酸钠溶液（pH ≥ 7）	17.6 mL
10 %十二烷基氨酸钠（Sarcoey）溶液	26.4 mL
2 mol/L NaAc 溶液（pH ≥ 4）	50.0 mL
无 RNase 超纯水	293.0 mL
重蒸苯酚	500.0 mL

A. 2. 5. 2 制法

在2000 mL的烧杯中加入无 RNase 超纯水，然后依次加入异硫氰酸胍、柠檬酸钠溶液、十二烷基肌氨酸钠溶液、NaAc 溶液，混合均匀；加入重蒸苯酚，混合均匀。Trizol 试剂应4℃低温保存，保质期一年。也可使用商业化试剂。

A. 2. 6 1 mol/L盐酸

A. 2. 6. 1 成分

浓盐酸	8.6 mL
无 RNase 超纯水	100 mL

A. 2. 6. 2 制法

将上述组分混匀。

A. 2. 7 1 % TGBE 洗脱液

A. 2. 7. 1 成分

牛肉膏	5.0 g
甘氨酸	1.9 g
Trizma-base	6.0 g
无 RNase 超纯水	定容至1000.0 mL

A. 2. 7. 2 制法

将固体物质溶解于900.0 mL无 RNase 超纯水，室温调节 pH 至9.5，用无 RNase 超纯水定容至1000.0 mL。121℃，灭菌15 min。

附 录 B
(规范性)
过程控制病毒培养及引物和探针

B.1 门戈病毒

B.1.1 概要

本标准使用门戈病毒作为过程控制病毒，或使用大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 或其他等效、不与诺如病毒存在交叉反应的病毒，或使用商业化试剂或试剂盒中的门戈病毒作为过程控制病毒。门戈病毒是小核糖核酸病毒科的鼠病毒。门戈病毒株 MC₀ (ATCC® VR-1597™) 是一种重组病毒，转基因生物，与野生型门戈病毒相比，缺乏 poly[C]，具有相似生长特性的无毒表型。

B.1.2 试剂和耗材

B.1.2.1 HeLa 细胞培养液

使用含有2 mmol/L L-谷氨酸的 Eagle 基础培养液 (Eagle’s minimum essential medium, MEM) 培养 HeLa 细胞，培养液中碳酸氢钠的终含量为1.5 g/L，非必需氨基酸的终浓度为0.1 mmol/L，丙酮酸钠的终浓度为1.0 mmol/L。向培养液中加入胎牛血清，胎牛血清终含量为100 mL/L (胎牛血清/培养液) 为细胞生长液或20 mL/L (胎牛血清/培养液) 为细胞维持液。

B.1.2.2 耗材

细胞培养所需耗材 (例如细胞培养瓶) 等。

B.1.3 仪器

二氧化碳 (CO₂) 恒温培养箱、倒置显微镜。

B.1.4 培养过程

门戈病毒加入铺满80 %~90 %单层 HeLa (ATCC CCL-2™) 细胞的细胞培养瓶中，置于5 % CO₂ 浓度的二氧化碳恒温培养箱中，37℃培养，直至细胞培养瓶中有75 %的 HeLa 细胞出现细胞病变。将细胞培养瓶经过一个冻融循环，取出培养液，3 000 ×g 离心10 min，将上清液冻存于-80℃冰箱，用于本方法的过程控制。

B.1.5 引物和探针

门戈病毒 RT-qPCR 的引物和探针见表B.1。采用其他等效的过程控制病毒，应调整引物和探针。

表 B.1 门戈病毒 RT-qPCR 引物和探针

病毒	名称	序列	扩增产物长度	序列位置
门戈病毒	Mengo 110 (上游引物)	5'-GCGGGTCCTGCCGAAAGT-3'	100 bp	门戈病毒非缺失毒株 M (GenBank 登录号 122089) 的序列 110~270。
	Mengo 209 (下游引物)	5'-GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC-3'		
	Mengo 147	5'-FAM-ATCACATTACTGGCCGAAGC-MGBNFQ-3'		

病毒	名称	序列	扩增产物长度	序列位置
	(探针)			

B.2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2

B.2.1 概要

本文件采用的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 属于单链RNA轻小噬菌体科，直径约26 nm，无尾的正二十面体结构。对宿主具有高度特异性，仅感染大肠埃希氏菌。如果实验室无法培养大肠埃希氏菌噬菌体 MS2，可以使用商业化试剂或试剂盒中的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 作为过程控制病毒。

B.2.2 试剂和耗材

B.2.2.1 菌株和大肠埃希氏菌噬菌体 MS2

大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 (ATCC 15597-B1™) 及其宿主细菌 *E.coli* (ATCC 15597)，或等效的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 和等效菌株。

B.2.2.2 试剂

细菌培养所需试剂（例如 LB 增菌液、TSA-YE 培养基等）。

B.2.2.3 耗材

细菌培养所需耗材（例如无菌培养皿等）。

B.2.3 仪器

恒温培养箱、恒温震荡器。

B.2.4 培养过程

B.2.4.1 宿主菌的制备

用接种环挑取一环宿主细菌 *E.coli* (ATCC 15597或等效菌株)接种在 TSA-YE 平板上,36℃±1℃过夜培养；挑取单个菌落至10 mL LB 增菌液中，36℃±1℃过夜培养。

B.2.4.2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 制备

B.2.4.2.1 将 B.2.4.1 制备的含宿主菌 LB 增菌液按照 0.5 %（体积比）接种到 LB 增菌液中，36℃±1℃,150 次/min 振荡培养 4 h~5 h,按 0.5 %~1 % (体积比)将噬菌体(大约 10⁸ PFU/mL~10⁹ PFU/mL)接种到上述含有宿主菌的增菌液中。

B.2.4.2.2 将接种噬菌体后的宿主菌增菌液在 36℃±1℃，150 次/min 振荡培养 5 h 或静置过夜。按照增菌液体积的 2 %加入三氯甲烷，200 次/min 震荡 10 min，取增菌液 10 000 ×g 离心 10 min，收集上清液，用无菌滤膜（0.45 μm）过滤，得到纯化的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 悬液，分装于 5 mL 冻存管，-80℃保存。

B.2.5 引物和探针

大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 RT-qPCR 的引物和探针见表B.2。采用其他等效的过程控制病毒，应调整引物和探针。

表 B. 2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 RT-qPCR 引物和探针

病毒	名称	序列	扩增产物长度	序列位置
大肠埃希氏菌噬菌体 MS2	MS2-TM3F (上游引物)	5'-GGCTGCTCGCGGATACCC-3'	202 bp	位于大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 毒株 (GenBank 登录号 JF719743.1) 的序列 3135~3336。
	MS2-TM3F (下游引物)	5'-TGAGGGAATGTGGGAACCG-3'		
	MS2-TM2 (探针)	5'-FAM-ACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGT-BHQ1-3'		