

ICS 11.220
B41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19440-2004

禽流感病毒 NASBA 检测方法

protocol of detecting avian influenza virus using NASBA

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

禽流感由正粘病毒科流感病毒属中 A 型流感病毒引起，其中高致病性禽流感因其传播快、危害大，世界动物卫生组织（OIE）将其列为 A 类疾病，我国将其列为一类动物疫病。

依赖核酸序列的扩增技术（NASBA）检测禽流感病毒的敏感性与经典的鸡胚病原分离方法相当，并具有检测速度快、特异性强、与鸡胚病原分离方法符合率高、易于操作的特点。

本标准是在综合我国科研成果的基础上，参考 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》（2000 年版），并结合我国现有动物卫生法规及农业部对禽流感的相关政策和措施制定的。

本标准附录 A、附录 B 为规范性附录，附录 C 为资料性附录。

本标准由上海市质量技术监督局和上海出入境检验检疫局提出。

本标准由国家质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：上海出入境检验检疫局、上海市质量技术监督局、香港基因晶片开发有限公司。

本标准起草人：单松华、刘乐庭、倪旦红、胡永强、李树清

本标准系首次发布的国家标准。

禽流感病毒 NASBA 检测方法

1 范围

本标准规定了 NASBA 快速检测禽流感病毒技术规范的材料准备、操作方法和结果判定。

本标准适用于禽类、禽肉产品中所有亚型禽流感病毒快速检测、诊断。

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 18936 - 2003 高致病性禽流感诊断技术

3 原理

NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA, 依赖核酸序列的扩增技术) 是一项连续、等温、基于酶反应的核酸扩增技术。该技术使用三种酶（反转录酶、核糖核酸酶 H、噬菌体 T7 核糖核酸聚合酶）和两条寡核苷酸引物。上游引物 5' 末端含有噬菌体 T7 的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的启动子序列，下游引物的 5' 末端含有和钉标电化学发光检测探针互补的序列。在扩增步骤中，两个 5' 端都整合进扩增序列中，这样既成为产生互补 RNA 序列的模板，又能特异性结合检测步骤中的 ECL 探针。扩增底物与 ECL 探针形成复合物，携带该复合物的磁珠被电极的表面磁性捕获。电极上的电压引起电化学发光 (ECL) 反应。已杂交上的钉标磁珠发出的光和扩增反应产生的 RNA 扩增产物总量成比例对应。

4 材料准备

4.1 试验环境

干净的环境，最好分区。分为核酸提取、核酸扩增和核酸检测三个区。

4.2 器材

采用常规的分子生物学器材，包括：一次性手套、移液器（量程 5 μ L 到 200 μ L）、枪头、无 RNA 酶的 1.5mL 塑料离心管、1.5mL 离心管架、5mL 试管架、旋涡振荡器、计时器、高速台式离心机、温度计（精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、加热器、水浴锅、5mL 聚丙烯试管（VWR）、封口膜。

如果采用 ECL 方法，需要 NucliSens 阅读器或者其他等同仪器。

如果采用 ELISA 方法，需要酶标仪。

4.3 引物

上游引物 AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG G A(A/G)G GCA TT(C/T) TGG ACA AA(G/T) CGT CTA

下游引物 GAT GCA AGG TCG CAT ATG AGGAGA GAA GAA GAA AAA AGA GAG GAC

4.4 检测试剂:

所有检测试剂在使用前,使其达到室温。

a) 裂解缓冲液(lysis buffer) (5M 异硫氰酸胍, 10% Triton X-100, 10mM Tris/HCl);

b) 冲洗缓冲液(wash buffer) (5M 异硫氰酸胍, 10mM Tris/HCl);

c) 500mg/mL 硅土(Silica) (500mg/ml 盐酸活化的二氧化硅);

d) 洗脱缓冲液(elution buffer) (10mM Tris/HCl);

e) 酶溶液(见附录 A);

f) H5 捕捉探针(H5 capture probe) (10mM 生物素化寡聚核苷酸);

探针序列为 Biotin-CCG TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA

g) 电化学发光法属别检测探针(10mM generic ECL detection probe) (钆标记的 DNA 寡聚核苷酸);

ECL 序列为 GAT GCA AGG TCG CAT ATG AG CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG TA

h) 仪器调试参照液(instrument reference solution);

i) 检测稀释液(detection diluent) (15mM Tris-HCl);

j) 分析缓冲液(assay buffer); (50mM Tris-HCl);

k) 清洗液(cleaner solution); (100mM KOH, 10% SDS, 10% Triton X-100);

l) 无水乙醇(alcohol)。

4.5 样品采集、保存、处理

按 GB/T 18936 - 2003 中 2.1 款进行。

5 操作方法

5.1 核酸释放和提取按以下顺序:

a) 将 0.1mL 样品加入盛有 0.9mL 裂解缓冲液的管中并振荡混合;

b) 振荡混合硅土悬浮液并向每个管中加入 50 μ L;

c) 振荡混合均匀;

d) 室温下温育 10min (每 2min 振荡混合一次, 防止硅土沉淀);

- e) 在 12,000r/min 下离心裂解缓冲液管 30sec ;
 - f) 小心移除上清液 (不要搅动沉淀) 后 , 向每个管中加入 1mL 冲洗缓冲液 ;
 - g) 振荡混合直至管中沉淀重新完全悬浮为止 ;
 - h) 在 12,000r/min 下离心 30sec , 然后移除上清液 ;
 - i) 重复第 f) 步到第 h) 步的步骤。依次为一次使用冲洗缓冲液 ; 两次使用 70% 乙醇 ; 最后一次使用 100% 乙醇 ;
 - j) 最后一次洗涤步骤后 , 用移液器小心移除残余乙醇 ;
 - k) 使用加热器在 56 °C 敞口干燥硅土 10min (用薄纸覆盖每个管避免污染) ;
 - l) 干燥后向每个管加入 50 μ L 洗脱缓冲液 ;
 - m) 振荡试管直至沉淀物再次重新完全悬浮 ;
 - n) 56 °C 温育硅土悬浮液 10min 以洗脱核酸 (5min 后开始振荡试管) ;
 - o) 在 12,000r/min 下离心 2min ;
 - p) 将 5 μ L 核酸上清液转移至新试管 , 在 1h 内开始扩增反应。
- 以上步骤也可采用 Qiagen 试剂盒或者其他等同试剂盒进行。

5.2 核酸扩增

- a) 在向上述 5 μ L 核酸 (5.1 p) 中加入 10 μ L 扩增试剂 ;
- b) 65 °C 温育 5min ;
- c) 41 °C 温育 5min ;
- d) 加入 5 μ L 酶溶液 , 并用手指轻轻扣击试管促使混合均匀 ;
- e) 放回试管 , 并继续在 41 °C 温育 5min ;
- f) 将试管稍作离心后 , 在 41 °C 温育 90min ;
- g) 检测扩增产物 ;
- h) 在 -70 °C 下保存扩增产物不超过 30d。

5.3 核酸检测

按照以下步骤或用 ELISA 进行检测。

- a) 将 ($N^* + 2$) 个 5mL 聚丙烯试管进行编号。试管 1 作为空白对照 ;
- b) 振荡混合 , 除了试管 1 外 , 其余试管各加入 20 μ L 杂交溶液 (见附录 B) ;
- c) 试管 2 中加入 5 μ L 检测稀释液作为空白对照 ;
- d) 其余试管各加 5 μ L RNA 扩增产物 ;
- e) 封口膜封住所有试管 , 振荡混合 ;
- f) 所有试管 41 °C 温育 30min。每 10min 混合一次 ;
- g) 除了试管 1 外 , 其余试管各加入 0.3 mL 分析缓冲液 ;
- h) 振荡仪器调试参照液直至不透明 , 然后加 0.25 mL IRS 到试管 1。

- i) 把试管放在转盘式传送盘的适当位置上。
- j) 运行 NucliSens 阅读器，对数据进行分析和解释（见附录 C）。

*注：N 为样品数。

6 结果判定

通过大量分析已知阴性对照样品后，确定 NASBA/ECL 的临界值为 0.15 X 仪器参照溶液的数值。样品的读数超过临界值时，判为禽流感病毒阳性，低于临界值时，判为禽流感病毒阴性。

附 录 A
(规范性附录)
酶溶液的配制

A.1 配制材料

- a) 酶球(enzymes spheres)(单个酶球(6.5mg)含1.3U/ μ L AMV-RT, 0.51.3U/ μ L RNase H, 151.3U/ μ L T7 RNA 聚合酶, 100mM Tris/HCl, 10% BSA);
- b) 酶球稀释剂(enzyme sphere diluent)(0.42 μ g/ μ L BSA);
- c) 球状骨针(reagentsphere)(单个球状骨针为10mg, 4mM NTP, 15mM DTT, 40mM MgCl₂);
- d) 球状骨针稀释剂(reagent sphere diluent)(100mM Tris/HCl pH8.3, 2mM dNTP);
- e) 氯化钾溶液(100mM KCl solution);
- f) 引物混合物(10mM Primer Mixture);
- g) 阳性对照 RNA (positive control RNA);
- h) DEPC 水。

A.2 配制过程

A.2.1 酶稀释液的制备

- a) 单个球状骨针中加入 80 μ L 球状骨针稀释剂, 并迅速振荡均匀;
- b) 稀释的球状骨针中加入 16 μ L KCl 溶液和 14 μ L DEPC 水, 振荡均匀;
- c) 加入 10 μ L 引物混合物, 振荡混合;
- d) 不能离心;
- e) 在 30min 内使用。

A.2.2 酶溶液的制备

- a) 单个酶球中加入 55 μ L 酶稀释液, 将此溶液放置室温至少 20 分钟;
- b) 用手指轻轻扣击试管让酶球充分溶解;
- c) 不能剧烈振荡任何含酶的溶液;
- d) 使用前, 稍作离心;
- e) 在 60min 内使用。

附 录 B
(规范性附录)
杂交溶液的配制

B1 杂交溶液制备

- a) 振荡通用型捕捉探针和 ECL 探针直到形成不透明溶液。
- b) 对于 N 次特异性检测反应，在新试管中混合 $(N + 2) \times 10 \mu\text{L}$ 捕捉探针和 $(N + 2) \times 10 \mu\text{L}$ ECL 探针。
- c) 使用前稍作振荡。
- d) 在 60min 内使用。

附录 C (资料性附录)

NucliSens 阅读器的操作运行

- C.1 建立一个新的运行程序。
 - C.1.1 打开 NucliSens 阅读器的个人电脑。
 - C.1.2 在开始界面点击“Prime”来执行系统校准。
 - C.1.3 机器准备好后，点击“Start”。校准步骤大约持续 3min。
 - C.1.4 在登入(log-in)界面的用户名(user name)上选择“service engineer”并且点击“login”。不需要输入密码。
 - C.1.5 在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“New Run”。
 - C.1.6 在弹出的工作表界面点击“yes”。
 - C.1.7 输入文件名(不超过 8 个字符)并且点击“ok”。
 - C.1.8 一个工作表单会打开，在分析选择栏(selected assay)选择“Free tube”。
 - C.1.9 输入样品号并且点击“Add to list”。
 - C.1.10 重复上述步骤直到输入所有样品 ID。
 - C.1.11 输入所有样品号后，点击“close”键。
 - C.1.12 屏幕出现了一张列有所有样品号的工作表。检查工作表，检查无误后点击“OK”。
 - C.2 确定样品放在转盘式传送盘(instrument carousel)上，并且按照计算机中输入的样品 ID 顺序摆放。
 - C.3 在屏幕上方选择“Routine”菜单然后点击“Run Worklist”。
 - C.4 出现一个检查弹出窗口，点击“Proceed”。
 - C.5 检测开始(每个试管用时大约 1.5min)。
 - C.6 检测停止后，在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“Sample results”或者“Assay result”显示结果。
-