

口蹄疫亚洲-1 亚型病毒 NASBA 检测试剂盒 (电化学发光版本) 说明书
Cat. No. V01-01-1121



修订 0
2008 年 7 月
海康生命科技有限公司

【兽药名称】

通用名：
口蹄疫亚洲-1 亚型病毒 NASBA 检测试剂盒 (电化学发光版本)

商品名：
VDS FMDV Asia 1

英文名：
Foot and Mouth Disease Virus Asia-1 Subtype NASBA Diagnostic Kit
(ECL version)

汉语拼音：
KouTiYi YaZhouYi YaXing BingDu NASBA JianCe ShiJiHe
(DianHuaXue FaGuang BanBen)

【主要成分与含量】

酶球稀释剂, 0.5 ml/管×1 管; 试剂球稀释剂, 0.6 ml/管×1 管;
KCl 溶液, 0.5 ml/管×1 管; NASBA 水, 1.5 ml/管×2 管;
FMDVA-1 阳性对照, 25 µl/管×1 管; FMDVA-1 引物混合物, 60 µl/管
×1 管; 仪器参照液, 1.7 ml/管×2 管; FMDVA-1 捕获探针 0.65 ml/管×
1 管; FMDVA-1 电化学发光属别检测探针, 25 µl/管×1 管; 酶球, 6.5
mg/包×5 包; 试剂球, 10 mg/包×5 包, 使用说明书。

【作用与用途】

用于检测多种样本 (全血、血浆、内拭物、粪便、笼内垃圾以及草垫等)
中的口蹄疫亚洲-1 亚型病毒 RNA。

【用法与判定】

1. 试剂预备

- 1.1 扩增试剂的预备
 - 1.1.1 试剂球中加入 80 µl 试剂球稀释剂, 并迅速振荡均匀
 - 1.1.2 稀释的试剂球中加入 16 µl KCl 溶液和 14 µl NASBA 水, 并振荡均匀
 - 1.1.3 加入 10 µl FMDVA-1 引物混合物, 振荡混匀, 不能离心, 在 30 分钟内使用
- 1.2 酶溶液的预备
 - 1.2.1 酶球中加入 55 µl 酶稀释液, 将此溶液室温放置至少 20 分钟
 - 1.2.2 用手指轻轻扣击试管让酶球充分溶解
 - 1.2.3 不能剧烈振荡任何含酶的溶液, 使用前温和离心试管, 在一小时内使用
- 1.3 杂交溶液的预备
 - 1.3.1 振荡 FMDVA-1 捕获探针 (FMDVA-1 Capture Probe) 直到形成不透明溶液
 - 1.3.2 对于 N 个核酸检测反应, 在新试管中混合 (N+2) × 10 µl FMDVA-1 捕捉探针 (FMDVA-1 Capture Probe) 和 (N+2) × 10 µl ECL 探针 (Generic ECL Detection Probe)
 - 1.3.3 使用前简单振荡一下杂交溶液

2. 核酸扩增

- 2.1 每个扩增反应须要吸取 5 µl 核酸提取物放入新的试管
- 2.2 加入 10 µl 扩增试剂 (见 1.1)
- 2.3 在 65°C 温育 5 分钟
- 2.4 在 41°C 冷却试管 5 分钟
- 2.5 加入 5 µl 酶溶液 (见 1.1), 并用手指轻轻扣击试管促使混

合均匀

- 2.6 迅速放回试管并在 41°C 温育 5 分钟
- 2.7 将试管稍微离心后在 41°C 温育 90 分钟
- 2.8 立即检测产物, 或者在零下 20°C 保存扩增产物不超过 1 个月

3. 核酸检测

- 3.1 使用 (N+2) 个 5 µl 聚丙烯试管。请将试管全部做上标记。试管 1 留为仪器调试参照液 (Instrument Reference Solution; IRS)
- 3.2 振荡、混合杂交液至不透明 (参见 1.1)。除了试管 1 外, 每只试管加入 20 µl 溶液
- 3.3 试管 2 中加入 5 µl NASBA 水作为空白对照
- 3.4 准备其余空白试管, 作为样品反应, 在每支试管加 5 µl RNA 提取物
- 3.5 用封口膜封住所有试管, 然后振荡试管直至溶液形成不透明状
- 3.6 41°C 温育所有试管 30 分钟。每 10 分钟振荡混合一次
- 3.7 除了试管 1 外, 每个试管加 0.3 ml 分析缓冲液
- 3.8 振荡仪器调试参照液 (IRS) 直至不透明状, 然后加 0.25 ml IRS 入试管 1
- 3.9 把试管放在转盘式传送器 (instrument carousel) 的适当位置上
- 3.10 建立一个新的运行工作表然后输入样品号码 (见 4)

4. 数据收集、分析和解释

基础和高级操作步骤的详细说明由 NucliSens 阅读器 (NucliSens Reader) 的操作手册 (NucliSens Reader Operation Manual) 提供

- 4.1 建立一个新的运行程序
 - 4.1.1 打开 NucliSens 阅读器的个人计算机
 - 4.1.2 在开始接口点击“Prime”来执行系统校准
 - 4.1.3 机器准备好后, 点击“Start”。校准“Prime”步骤大约持续 3 分钟
 - 4.1.4 在登入 (log-in) 接口的用户名 (user name) 上选择“service engineer”并且点击“log in”。不需要输入密码
 - 4.1.5 在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“New Run”
 - 4.1.6 在弹出的工作表接口点击“yes”
 - 4.1.7 输入文件名 (不超过 8 个字符) 并且点击“OK”
 - 4.1.8 一个工作窗体会打开后, 在分析选择栏 (selected assay) 选择“Free tube”
 - 4.1.9 输入样品号并且点击“Add to list”
- 注意: 不要将样品 100 µl 体积作任何修改。
- 4.1.10 重复上述步骤直到输入所有样品 ID
 - 4.1.11 输入所有样品号后, 点击“close”键
 - 4.1.12 屏幕出现了一张列有所有样品号的工作表。检查工作表并且点击“OK”
 - 4.1.13 确定样品放在转盘式传送器 (instrument carousel) 上, 并且按照计算机中输入的样品 ID 顺序摆放
 - 4.1.14 在屏幕上方选择“Routine”菜单然后点击“Run Worklist”
 - 4.1.15 出现一个检查弹出窗口, 点击“Proceed”
 - 4.1.16 检测开始 (每个试管要花费大约 1.5 分钟)
 - 4.1.17 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

4.2 关机

- 4.2.1 在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“Quit”
- 4.2.2 选择“Exit to DOS”
- 4.2.3 在“exit NucliSens Reader user software”窗口点击“yes”
- 4.2.4 关闭计算机

4.3 结果和解释

NucliSens 阅读器自动检测杂交样品的电化学信号 (ECL signal), 然后软件计算相应的结果。下表中的资料仅供举例, 真实资料与此不同。

[后页续]

表 1. 典型的 NucliSens 结果概要

Sample ID (样品名)	Qualification (条件)	Tube (试管)	Det. (检测)	Qualitative Analysis (定性分析)	Signal (信号值) (Detectable counts)
IRS	有效	1	IRS		35,500
阴性分析 (Assay negative)	有效	2	Free tube	阴性	138
1	有效	3	Free tube	阳性	6,961
2	有效	4	Free tube	阳性	10,494
3	有效	5	Free tube	阳性	10,000,001
阴性对照 (Negative control)	有效	6	Free tube	阴性	70

资料解释

- IRS = 仪器调试参照液 (instrument reference solution)
- 每个样品可检测计数是由 NucliSens 阅读器 (NucliSens Reader) 记录的绝对值
- 参考适当的临界值 (cut-off limit) 测量 ECL 探针, 在定性分析中 'Positive' 意味着样品包含目的扩增底物。那么这些扩增底物很可能来自 FMDVA-1 RNA
- 在定性分析中 'Negative' 意味着样品不含目的 RNA, 或者说浓度低于 NucliSens 基础分析 (NucliSens Basic kit assay) 的临界值 (cut-off limit)
- 可检测计数的水平不相应于病毒负载

4.4 导出资料 (Export)

打印资料表点击“Print”键或者把资料保存在磁盘中然后转移到用户的个人计算机中 (Personal Computer) 导出 (Export) 资料表:

- 4.4.1 点击“Export.....”键然后选择 Tab delimited
- 4.4.2 选择电子资料表, 输入导出文件名
- 4.4.3 文件导出到驱动器 A (1.44"软盘)
- 4.4.4 在用户个人计算机中用 Microsoft Excel 软件显示

5. 临界值的确定和结果的判定方法

计算能够充分区分真正阳性和阴性样品之间差别的最合适的临界值是一个相对简单的过程。以下提供一个计算临界值的参考方法:

- 5.1 测试 5 个已知阴性的样品和 5 个已知“弱阳性”的样品 (例如, 稀释已知为阳性的样品)。NASBA 反应一般有强阳性电化学发光信号, 并且几乎没有中频电化学发光信号。
- 5.2 每次试验开始运行, 临界值依仪器调试参照液 (instrument reference solution) 的组分来确定, 典型值为 15,000 到 60,000 单位。
- 5.3 确定临界值能够正确区分上述检测的样品中的阴性和弱阳性。临界值大于已知阴性样品的最大电化学发光信号, 低于已知弱阳性样品的最低电化学发光信号。在我们实验室, 一般临界值的系数在 0.01 (0.15 (IRS 之间 (仪器调试参照液的 1% 到 15%))。
- 5.4 更多已知的阴性和弱阳性样品可以进一步验证临界值 (cut-off limit) 是否合适。
- 5.5 选择的临界值只对当前实验有效, 新的试验或新的仪器都需要重新调整 (例如, 缓冲液的组分、提取方法、反应时间等等)。

表 2. 确定临界值的资料摘要

阴性样品 (Negative sample)	电化学信号 (ECL signal)
1	137
2	303
3	275
4	375
5	632
阴性对照	289
阴性分析	127
IRS	36,345
临界值 (Cut-off limit) 例子	
0.01 x IRS	363
0.015 x IRS	545
0.02 x IRS	727
0.025 x IRS	909
0.15 x IRS	5452

已知阴性样品中最大电化学发光信号值为 632, 这种情况下选择最适合的临界值 (cut-off limit) 为 0.025 x IRS。

5.6 检测读数大于临界值则判定为检测结果“阳性”; 检测读数小于临界值则判定为检测结果“阴性”。

【注意事项】

- 使用本品的实验室, 应严格按照国家有关行政主管部门颁布的有关基因扩增检验的实验室管理规范进行管理。
- 已经准备好的酶球和试剂球若保存于 -70°C 下, 应在两周内使用。其它扩增试剂开口后若保存在 -20°C 下可继续使用。使用前将所有试剂放至室温。
- 核酸检测试剂 (小盒子中的试剂) 开口后剩下的若保存在 2-8°C 下可继续使用; 使用前将所有试剂放至室温。
- 实验过程中必须带手套以防止 RNA 样品接触 RNA 酶; 如无特别规定, 所有操作步骤均在室温下完成; 不能剧烈振荡任何含酶的溶液。

【规格】

50 个反应/盒

【贮藏与有效期】

除了其中的小盒子在 4°C, 其它所有试剂均应储存在 -20°C。有效期为 12 个月, 或产品外包装上注明的有效日期。

【生产企业】

海康生命科技有限公司

仅供兽医诊断使用