



修订 0  
2008 年 7 月  
海康生命科技有限公司

#### 【兽药名称】

通用名:

H5 亚型禽流感病毒 NASBA 检测试剂盒 (微孔板版本)

商品名:

VDS AIV H5

英文名:

Avian Influenza Virus H5 Subtype NASBA Diagnostic Kit  
(MP version)

汉语拼音:

H5 YaXing QinLiuGan BingDu NASBA JianCe ShiJiHe  
(WeiKongBan BanBen)

#### 【主要成分与含量】

酶球, 6.5 mg/包×5 包; 试剂球, 10 mg/包×5 包;  
酶球稀释剂, 0.5 ml/管×1 管; 试剂球稀释剂, 0.6 ml/管×1 管;  
KCl, 0.5 ml/管×1 管; H5 引物混合物, 60 μl/管×1 管;  
H5 阳性对照, 25 μl/管×1 管; NASBA 水, 1.5 ml/管×2 管;  
H5 探针溶液, 55 μl/管×2 管; 10×TBS 清洗缓冲液, 10 ml/管×1 管;  
杂交缓冲液 800 μl/管×3 管; 检测缓冲液 1.1 ml/管×5 管;  
终止液, 1.1 ml/管×5 管; 连接液, 1.1 ml/管×5 管;  
检测浓缩液, 11 μl/管×1 管。微孔板条 8 孔/条×12 条; 支持板框 1 个,  
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 H5 亚型禽流感病毒 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 H5 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 1 小时内使用

##### 检测溶液的预备

- 1.3 H5 探针溶液解冻至室温, 注意在使用前完全混匀
- 1.4 杂交缓冲液在使用前完全混匀
- 1.5 检测缓冲液在使用前完全混匀
- 1.6 检测浓缩液按 1:500 在检测缓冲液中稀释, 并在使用前完全混匀
- 1.7 将连接液避光解冻至室温, 注意在使用前完全混匀
- 1.8 终止液无需处理即可使用
- 1.9 10x TBS 清洗缓冲液以 0.1% DEPC 处理过的水按 1:10 稀释并在使用前完全混匀
- 1.10 微孔板条和微孔板支持板框无需处理即可使用

## 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 在支持板框中安放足够检测所需的微孔板板条。
- 3.2 加 2 μl 探针溶液, 5 μl NASBA 产物和 43 μl 杂交缓冲液至 1 个 0.5 ml 或 1.5 ml 的微量离心管中并完全混匀。
- 3.3 每个 NASBA 产物重复上述步骤。
- 3.4 将杂交混合物加入微孔板每个独立的孔中。避免在孔中引入泡沫。牢牢盖上塑料膜避免蒸发。
- 3.5 在 45°C 温育 1 小时。
- 3.6 以 250 μl 1x TBS, pH 7.4 清洗小孔三次。每次倾去溶液后要拍干微孔板。
- 3.7 每孔加 100 μl 检测缓冲液 (必须确定已加进检测浓缩液, 检测缓冲液配制方法请参见 1.6)。牢牢盖上塑料膜避免蒸发。在室温下温育 30 分钟。
- 3.8 以 250 μl 1x TBS, pH 7.4 清洗小孔三次。每次倾去溶液后要拍干微孔板。
- 3.10 每孔加 100 μl 连接液 (小心避免在孔中引入泡沫)。
- 3.11 避光室温温育 5 分钟。
- 3.12 每孔加 100 μl 终止液并轻轻摇动来终止显色反应。
- 3.13 将微孔板和微孔板板框放入标准 96 孔微孔板分光光度计并读取 405 nm 吸光度。使用 100 μl 连接液加 100 μl 终止液 (没有杂交和检测试剂) 作为背景参照。

## 4 数据收集、分析和解释

微孔板放置及检测的详细指导方针参考你的分光光度计说明书。

表 1. 典型的光吸收读数

样品名	定性结果	信号 (Abs405 + S.D)
阳性检验 (所有试剂 / 水取代核酸)	阴性	0.097 + 0.026
阴性对照 (非 H5 核酸)	阴性	0.151 + 0.037
阳性对照 (H5 核酸)	阳性	0.959 + 0.053

## 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 (cut-off limit) 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 10 个已知阴性的样品和 10 个已知“弱阳性”的样品 (例如, 稀释已知为阳性的样品)。
- 5.2 确定临界值 (cut-off limit) 能够正确区分上述检测的样品中的阴性和弱阳性。该临界值必须比已知最高的已知阴性样品的 Abs405 信号值高, 并比最低的已知弱阳性样品的 Abs405 信号值低。
- 5.3 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。
- 5.4 选择的临界值 (cut-off limit) 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)。
- 5.5 建议临界值是阴性对照值加 10 S.D  
[例如 0.12 + (10 × 0.012) = 0.24]。

[后页续]

我们实验室通常阴性对照样品获得的 S.D 在  $0.15 \pm 0.03$  的范围。因此，我们的临界值大约是 0.45。

**【注意事项】**

1. 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。
2. 已经准备好的酶球和试剂球若保存于  $-70^{\circ}\text{C}$  下，应在两周内使用。其它扩增试剂开口后若保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  下可继续使用。使用前将所有试剂放至室温。
3. 核酸检测试剂（小盒子中的试剂）开口后剩下的若保存在  $2-8^{\circ}\text{C}$  下可继续使用；使用前将所有试剂放至室温，并离心所有微量离心管将液体甩到管子底部。
4. 反复冻融冰冻试剂可能降低试剂盒灵敏度。未解冻试剂可稳定存放 12 个月。
5. 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（杂交缓冲液、检测缓冲液、检测浓缩液和终止液）储存在  $4^{\circ}\text{C}$ ， $10\times\text{TBS}$  清洗缓冲液贮存在室温，微孔板条和支持板框避光贮存在室温，其它所有试剂均应储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。有效期为 12 个月。

**【生产企业】**

海康生命科技有限公司

**仅供兽医诊断使用**