



中华人民共和国国家标准

GB/T 19439—2004

H5 亚型禽流感病毒 NASBA 检测方法

Protocol of detecting avian influenza virus subtype H5 using NASBA

2004-02-14 发布

2004-02-15 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

高致病性禽流感由正粘病毒科流感病毒属中 A 型流感病毒引起,世界动物卫生组织(OIE)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、附录 C 为规范性附录,附录 D 为资料性附录。

本标准由上海市质量技术监督局和中华人民共和国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:中华人民共和国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、陈家华、谢燕、杨锡全、倪旦红、刘乐庭、刘俊平。

H5 亚型禽流感病毒 NASBA 检测方法

1 范围

本标准规定了 NASBA 快速检测 H5 亚型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 H5 亚型禽流感病毒的快速检测、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 1.5 mL 塑料离心管、1.5 mL 离心管架、5 mL 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、5 mL 聚丙烯试管(VWR)、封口膜等。

如果采用 ECL 方法,需要 NucliSens 阅读器或者等同的仪器。

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 CCA IAA AGA (C/T)AG ACC AGC TA

下游引物 GAT GCA AGG TCG CAT ATG AGG AGA 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。

- 裂解缓冲液:5 mol/L 异硫氰酸胍,10% Triton X-100,10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3;
- 冲洗缓冲液:5 mol/L 异硫氰酸胍,10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3;
- 500 mg/mL 硅土:500 mg/mL 盐酸活化的二氧化硅;