



# 中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

## 禽流感、新城疫、马立克氏病、传染性法氏囊病、鸡传染性贫血、J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法

Protocol of Luminex-based Suspension Array to Molecular Identification of Six Avian  
Immunosuppressive Diseases of AIV, NDV, MDV, IBDV, AIAV, J-ALV

(送审稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国 发布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前 言

本标准是依据GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》制定。请注意本文件的某些内容有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC181)归口。

本标准起草单位：略。

本标准主要起草人：略。

# 禽流感、新城疫、马立克氏病、传染性法氏囊病、鸡传染性贫血、J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法

## 1 范围

本标准规定了禽流感、新城疫、马立克氏病、传染性法氏囊病、鸡传染性贫血病、J亚型禽白血病等六种免疫抑制性疾病病毒的液相芯片检测方法。

本标准适用于禽类相关样品（包括肌肉组织、脏器、咽喉拭子、泄殖腔拭子、血清或血浆等）中禽流感、新城疫、马立克氏病、传染性法氏囊病、鸡传染性贫血病、J亚型禽白血病等六种免疫抑制相关疾病的快速鉴别诊断。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室生物安全通用要求

## 3 原理

鉴于每种疾病都可通过特异性的PCR引物来进行扩增检测原理，在每种特定目的片段的扩增引物的5'端加入人工序列作为超级引物，通过不对称扩增原理在富集阶段来实现多种疾病特异性引物与靶标序列的特异性结合与扩增，通过选择性扩增阶段在每个靶标序列中引入超级引物序列，通过目标扩增阶段来实现超级引物对所有靶标序列的同步扩增。在超级引物对中，反向引物用生物素标记，其所扩增的基因片段将带有生物素标记，以供后期的液相芯片检测之用。

采用2种荧光染料对直径约为5.6 μm带磁性的聚苯乙烯小球（以下简称微球）进行着色，通过精确的混合比例产生100种不同颜色，每一种颜色赋予唯一编码，通过编码识别染色的微球。这些荧光微球表面带有羧基基团（如羧基、亲和素和组氨酸等）可共价结合（或称偶联）不同类型的探针（如抗原、抗体、寡核苷酸探针等），形成带标记的荧光微球。待测样本（如蛋白、核酸等）以生物素标记，再与结合了探针的荧光微球进行特异性结合反应，生物素标记与添加到反应体系中的以PE荧光染料标记的链霉亲和素（Streptavidin）或称SA-PE发生连接可实现荧光信号的放大。因此，整个反应结束后形成的阳性复合物可检测到微球的荧光和SA-PE的荧光信号。液相芯片检测仪工作时，上述复合物在液流系统中快速通过，第一束红色激光识别微球染料和编码，第二束绿色激光检测SA-PE荧光信号的强弱，仪器将获取到的两种光信号进行快速处理并形成数字信号，经软件分析后计算得到每一种待测样本的含量。因此，液相芯片检测技术集流式细胞技术、荧光编码微球、激光、数字信号处理和传统的生化技术于一体，可以实现快速高通量检测。

## 4 仪器与试剂

### 4.1 仪器

液相芯片检测仪、全自动核酸抽提仪、高速台式冷冻离心机、梯度核酸扩增仪、振荡器、超声波仪、台式离心机、计时器、分析天平、涡旋振荡器等。

## 4.2 试剂

### 4.2.1 试剂

4.2.1.1 本标准试剂除特殊规定外，均指分析纯试剂。

4.2.1.2 表面带有羧基的荧光编码微球 ( $1.25 \times 10^7$  微球/mL)、1-乙基-(3-二甲基-丙烷) 氢氯化二酰亚胺 (EDC)、0.5 mol/L 的 2-(N-吗啡基) 乙磺酸 (pH 4.5, MES)、0.02% (w/v) 吐温-20、0.1% (w/v) 十二烷基硫酸钠 SDS、5 mol/L 的 TMAC (Tetramethylammonium chloride solution)、SA-PE 反应液 (荧光染料标记的链霉亲和素 (Streptavidin))、Qiagen One-Step RT-PCR Kit、EZ1 Virus mini Kit2.0。1.5×TMAC 杂交液 (微球稀释液) 的配制见附录 A.5, 1×TMAC 杂交液 (检测缓冲液) 的配制见附录 A.6。

### 4.2.1.3 引物、探针序列及碱基修饰

六种免疫抑制性疾病的引物探针见附件 A.1。超级引物的反向引物 (RSP) 5' 端第一个碱基的第 6 位或者第 10 位羟基上标记生物素 (biotin)，各个疾病特异性探针 5' 端第一个碱基的 12 位碳基上连接胺基 (-NH<sub>2</sub>)，所有的引物探针合成后均需要进行色谱级 (HPLC) 纯化。RT-PCR 扩增时的引物混合配方见附件 A.2。

## 5 样品的采集与处理

### 5.1 一般要求

样品的采集、保存及运输应符合 GB/T 18088 的相关要求。

### 5.2 样品的采集

#### 5.2.1 喉腔及泄殖腔棉拭子

将灭菌的棉拭子插入禽类的咽喉、肛门或者粪便中轻轻左右搅动，然后取出拭子并放入盛有 2 mL 灭菌的 0.01 mol/L pH7.2 PBS 溶液的试管内，加盖、编号。

#### 5.2.2 全血

用无菌注射器直接吸取全血至无菌 Eppendorf 管中，加盖，编号。

#### 5.2.3 组织脏器

取待检肝脏、肾脏和脾脏样品装入一次性塑料袋或其它灭菌容器，编号，送实验室。

### 5.3 样品的保存和运输

待检样品在 2 °C~8 °C 保存不应超过 24 h；-20 °C 保存不超过三个月；-80 °C 以下可长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

### 5.4 样品制备

5.4.1 棉拭子样品于旋涡振荡器上振荡混匀约 5 s 后，于离心机中瞬时离心待用。

5.4.2 血清或血浆样品于台式冷冻离心机上 3 000 r/min 4 °C 离心 5 min，取上清待用。

5.4.3 组织样品，用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 3 g-5 g 于研钵中充分研磨，再加 10 mL PBS 混匀，或置于组织匀浆器中，加入 10 mL PBS 进行匀浆处理，然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中 3000

r/min 4 °C离心 15 min, 取上清液转入另一无菌 1.5 mL 离心管中, 编号备用。

## 6 液相芯片检测

### 6.1 一般要求

样品的实验室检测应符合GB 19489的相关要求。

### 6.2 寡核苷酸探针与羧基化的荧光编码微球偶联

6.2.1 按照附录 A.3, 不同禽免疫抑制性疾病的特异性探针, 与相应编码的微球进行偶联。

6.2.2 所有试剂需先恢复至室温, 所有的操作均应避光, 最好使用不透明管或用铝铂膜包严实透明离心管后进行操作。

6.2.3 用水溶解各个疾病特异性探针至 1 nM/μl。

6.2.4 取出装有微球的贮存管, 使用前从 2~8°C 回温至室温。取出微球之前, 以大约 20rpm 旋转 1~2 分钟或者通过轻摇倒置混合。不可涡旋, 不可长时间震荡。

6.2.5 取出  $5 \times 10^6$  个微球至 1.5 mL 的聚丙烯微量离心管中, 使用磁力架吸附磁珠或是用 10000 g 离心 2 min 使微球聚集。

6.2.6 去上清, 加入 50 μl 的 0.1 mol/L MES (pH 4.5), 于旋涡震荡器上震荡, 再用 40 khz 超声波处理 20 秒, 至微球充分分散。

6.2.7 加入 2μl (= 0.2 nM) 的特异性探针混合液到微球中, 于旋涡震荡器上瞬时震荡。

6.2.8 加 1.0 mL 的去离子水到 10 mg 的 EDC 中, 现用现配。吸取 2.5 μl 的 EDC 溶液到微球与探针的混合液中, 瞬时震荡, 室温避光孵育 30 min。

6.2.9 重复步骤 5.2.8, 再加入一次新鲜配制的 2.5μl 的 EDC 溶液处理一次。

6.2.10 加 1.0 mL 0.02% (w/v) 的吐温-20 后, 使用磁力架吸附磁珠或是以 12000 g 离心 2 min 使微球聚集。

6.2.11 去上清, 向微球中加入 1.0 ml 0.1% (w/v) 的 SDS 溶液, 震荡分散微球后, 使用磁力架吸附磁珠或是以 12000 g 离心 2 min 使微球聚集。

6.2.12 弃上清, 加入 100 μl 的 TE (pH 8.0), 于旋涡震荡器上震荡, 再用 40 khz 超声波处理 20 秒, 至微球充分分散悬浮。

6.2.13 制备的微球计数: 按 dH<sub>2</sub>O: 上述处理好的微球溶液= 1: 100 进行稀释, 充分震荡混匀, 取 10μl 加至血球计数器, 对血球计数器格子的 4 个大角进行微球计数。微球数/μl = 4 个大角微球总和 × 2.5 × 100 微球。

6.2.14 偶联好的微球在 2°C~8°C 避光可保存半年。

6.2.15 偶联后与阳性对照 PCR 产物进行, 设空白对照, 以确定偶联效率。当每种荧光编码微球个数不少于 100 个且空白对照荧光强度不高于 300, 表明微球偶联成功。

### 6.3 核酸抽提

#### 6.3.1 一般要求

应使用能够同时抽提病毒DNA和病毒RNA的核酸抽提方法, 如传统酚-氯仿法, 也可采用自动化核酸抽提仪器和配套核酸抽提试剂进行核酸抽提。

#### 6.3.2 设立对照

- 6.3.2.1 在样品处理过程中必须设立阳性对照、阴性对照，并与待检样品一起处理。
- 6.3.2.2 取标准的禽流感病毒、新城疫病毒、马立克病毒、传染性法氏囊病病毒、鸡传染性贫血病毒、J亚型禽白血病病毒灭活毒株作为阳性对照，均由中国兽药监察所提供。
- 6.3.2.3 取SPF鸡的正常样品组织或SPF鸡胚尿囊液作为阴性对照。

### 6.3.3 酚-氯仿法抽提核酸

- 6.3.3.1 取灭菌的1.5 mL离心管，做好标识。
- 6.3.3.2 每管加入600  $\mu\text{L}$ 裂解液，分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各200  $\mu\text{L}$ ，再加入200  $\mu\text{L}$ 氯仿，混匀器上振荡混匀5 s，于4 $^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心15 min。
- 6.3.3.3 取灭菌的1.5 mL离心管，加入-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷400  $\mu\text{L}$ 异丙醇，吸取本标准5.3.3.2各管中的上清液转移至相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。
- 6.3.3.4 于4 $^{\circ}\text{C}$  12000 g离心15 min，弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；加入600  $\mu\text{L}$  75%预冷乙醇，盖上管盖，颠倒洗涤。
- 6.3.3.5 于4 $^{\circ}\text{C}$  12000 g离心10 min，弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体。
- 6.3.3.6 10000 g离心10 s，用微量加样器将其吸干，室温干燥5 min~10 min。
- 6.3.3.7 加入15  $\mu\text{L}$  DEPC水，溶解管底的核酸，5000 g离心5 s，冰上保存备用，若需长期保存应放置-80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## 6.4 核酸扩增

### 6.4.1 一般要求

由于六种家禽免疫抑制性疾病既有DNA病毒，又有RNA病毒。为了保证能够同时扩增出所有的病毒，统一使用RT-PCR方法进行核酸扩增。

### 6.4.2 反应液的配制

在PCR溶液配制区，参照各试剂盒相应说明书进行配制，每份检测样品的RT-PCR体系为50  $\mu\text{L}$ （附录B.2以Qiagen One-Step RT-PCR Kit为例，列出反应体系配制表，仅供参考）。将配制的每个反应管内试剂充分混匀，瞬时离心后转移至样本处理区。

### 6.4.3 加样

在5.4.2的反应管中分别加入已提取好的核酸各5  $\mu\text{L}$ ，盖上管盖，放入PCR检测仪内。同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照。记录样本放置顺序。

### 6.4.4 扩增

在PCR扩增区进行RT-PCR扩增，反应条件参照附录A.4。

## 6.5 微球探针与核酸扩增产物杂交

- 6.5.1 所有试剂恢复到室温，所有的操作均应避光，可选用不透明离心管或用铝铂膜包裹遮光的离心管进行操作。
- 6.5.2 取出装有偶联好探针微球的贮存管，于旋涡震荡器上震荡，再用40 kHz超声波处理20 s，使微球充分分散。
- 6.5.3 从贮存管中分别吸取6种荧光编码偶联好探针微球，依据微球的计数浓度，使用1.5 $\times$ TMAC杂交液，配制含有6种荧光微球的混合荧光编码微球工作液，使浓度为2500个微球/种/33  $\mu\text{L}$ 。
- 6.5.4 取一定数量的0.1 mL的PCR反应管，设置空白对照管、阳性对照管、阴性对照管和检测样品管。
- 6.5.5 在每个样品管和空白对照管，加入33  $\mu\text{L}$ 混合荧光编码微球工作液。
- 6.5.6 按照附录B.3，配制混合微球探针与RT-PCR产物杂交反应液，空白对照管以1 $\times$ TE(pH8.0)作为空白对照。

- 6.5.7 轻轻反复吹打混匀后盖上盖子，于 PCR 仪中进行如下反应：94℃ 15min，52℃ 30min。
- 6.5.8 在 PCR 仪孵育杂交期间，用 1×TMAC 杂交液将 SA-PE 溶液稀释至 4 μg/mL，制成报告混合液。
- 6.5.9 杂交结束后使用磁分离板吸附磁珠，弃各管上清。
- 6.5.10 加入 75 μL 的报告混合液，轻微吹打几次混匀，于 PCR 仪上 52℃ 孵育 5 min。

## 6.6 液相芯片检测仪检测

- 6.6.1 在 PCR 扩增进行时，打开液相芯片检测所有相关仪器，并将仪器的上样加热陶瓷底板预先加热至 52℃。
- 6.6.2 按照液相芯片检测仪操作说明书，进行各个参数的设置。
  - 6.6.2.1 每个样品检测时，应同时选择检测 6 种荧光编码微球（33、34、35、36、37、38），并填写每种荧光微球对应疾病名称。
  - 6.6.2.2 检测体积为 45 μL，流速为快速，每种荧光微球设置计数为 100 个，计数时间为 120 s。
- 6.6.3 取出已完成 PCR 扩增的各个反应管作为液相芯片检测的待检样品，按照空白对照、阴性对照、阳性对照和样品管等顺序依次放入液相芯片检测仪，并在软件界面进行相应的标注。开启检测。
- 6.6.4 同一批样品建议在 30 min 内检测读取数据完毕。

## 6 结果判定

### 6.1 数据有效性分析

每种荧光编码微球个数不少于 50 个，空白对照荧光强度不高于 100，阴性对照与各个寡核苷酸探针杂交荧光强度不高于 200，阳性对照与自身对应寡核苷酸探针特异性杂交荧光强度高于空白对照五倍以上。

### 6.2 结果计算

液相芯片定性比值结果(Luminex qualitative ratio result, LQRR)等于样品校正后的荧光强度中位值(Median fluorescence intensity, MFI)与空白对照 MFI 的平均值(MFIB)的比值。

按照仪器数据分析软件操作，获得检测结果的输出。

### 6.3 结果判定

- 6.3.1  $LQRR \geq 3$ ，判定为阳性样本。
- 6.3.2  $LQRR < 2$ ，则判定为阴性。
- 6.3.3  $2 \leq LQRR < 3$ ，则判定为可疑。可疑样品应重新进行检测，如结果值仍介于此区间，则判定为阴性。

## 附 录 A

(规范性附录)

## 家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法规范性附录

以下列出标准方法中应用到的引物和探针的序列(表1)以及其配制浓度和使用浓度(表2),特异性探针与不同编码微球偶联的对应情况(表3),RT-PCR扩增反应条件(表4),杂交液浓度(表5、6)。

## A. 1

表1 六种免疫抑制性疾病的引物探针序列及碱基修饰方式

引物名称	Primer 名称	碱基序列(5'to3')*	修饰种类
超级引物	FSP	CAGGCCACGTATTGTCATGC	引物 5'端第一个碱基的第 6 位或者第 10 位羟基上标记 biotin
	RSP	biotin-5'-TTCTTGGCGTTATGTCGCTG-3'	
禽流感	FSP+AIV-M-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGCAGATGAGTCYTCTAACCG AGGTGC	5'端第一个碱基的 C12 位上连接(-NH <sub>2</sub> )
	RSP+AIV-M-Rp	TTCTTGGCGTTATGTCGCTGTGCAAARACAYYTTCMAGTCT CTG	
	33#微球+AIV-M-Probe	TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA	
新城疫	FSP-NDV-M-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGCAGTGATGTGCTCGGACCTTC	5'端第一个碱基的 C12 位上连接(-NH <sub>2</sub> )
	RSP+NDV-M-Rp	TTCTTGGCGTTATGTCGCTGCCTGAGGAGAGGCATTTGCTA	
	34#微球+NDV-M-Probe	TTCTCTAGCAGTGGACAGCCTGC	
马立克	FSP+-MDV-RLORF12-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGCAGGTGAGCCAATCGGATA	5'端第一个碱基的 C12 位上连接(-NH <sub>2</sub> )
	RSP+MDV-RLORF12-Rp	TTCTTGGCGTTATGTCGCTGAAGAGAGAAGGAAC TCG	
	35#微球+MDV-RLORF12-Probe	ACCGCCCCAAATTCGCACTTGA	
传染性法氏囊	FSP+IBDV-VP2-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGCTTCATACGGAGCCTTCTGATt	5'端第一个碱
	RSP+IBDV-VP2-Rp	TTCTTGGCGTTATGTCGCTGACAATTAGCCCTGACCCT	
	36#微球+IBDV-VP2-Probe	CAACCGGACCGGCGTCCATTC	



基的C12位上  
连接(-NH<sub>2</sub>)

	FSP+AIAV-VP1-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGC GCCGATTTTACGCCTCA	
鸡传 染性 贫血	RSP+AIAV-VP1-Rp	TTCTTGCGTTATGTCGCTG TACCGCTGTCTCCTCCG	
	37#微球+AIAV-VP1-Probe	CACCTCAAGCGACTTCGACGAA	5'端第一个碱 基的C12位上 连接(-NH <sub>2</sub> )
J亚 型禽 白血 病	FSP+J-ALV-gp95-Fp	CAGGCCACGTATTGTCATGC AGAAAGACCCGGAGAAGAC	
	RSP+J-ALV-gp95-Rp	TTCTTGCGTTATGTCGCTG ACACGTTTCCTGGTTGTT	
	38#微球+J-ALV-gp95-Probe	ATTTCCGTTGTCCCAGGGGTGG	5'端第一个碱 基的C12位上 连接(-NH <sub>2</sub> )

## A. 2

表2 六种免疫抑制性疾病RT-PCR扩增时的混合引物 (primer mix) 配方

疾病名称	引物名称	引物贮存 浓度 ( $\mu\text{M}$ )	取贮存液 体积( $\mu\text{L}$ )	加无RNA 酶水( $\mu\text{L}$ )	配制成 总体积 ( $\mu\text{L}$ )	各个引物混 合液浓度 ( $\mu\text{M}$ )	RT-PCR体 系加入混合 引物( $\mu\text{L}$ )	RT-PCR体系 中各引物工作 液浓度( $\mu\text{M}$ )
禽流感	FSP+AIV-M-Fp	200	1.25	62.5	100	2.5	1	0.05
	RSP+AIV-M-Rp	200	5			10		0.2
新城疫	FSP-NDV-M-Fp	200	1.25			2.5		0.05
	RSP-NDV-M-Rp	200	5			10		0.2
马立克	FSP+-MDV-RLORF12-Fp	200	1.25			2.5		0.05
	RSP+MDV-RLORF12-Rp	200	5			10		0.2
传染性法氏囊	FSP+IBDV-VP2-Fp	200	1.25			2.5		0.05
	RSP+IBDV-VP2-Rp	200	5			10		0.2
鸡传染性贫血	FSP+AIAV-VP1-Fp	200	1.25			2.5		0.05
	RSP+AIAV-VP1-Rp	200	5			10		0.2
J亚型禽白血病	FSP+J-ALV-gp95-Fp	200	1.25			2.5		0.05
	RSP+J-ALV-gp95-Rp	200	5			10		0.2

## A. 3

表3 六种免疫抑制性疾病特异性探针与不同编码微球偶联对应表

编号	1	2	3	4	5	6
编码微球	33	34	35	36	37	38
探针	AIV-M-Probe	NDV-M-Probe	MDV-RLORF12-Probe	IBDV-VP2-Probe	AIAV-VP1-Probe	J-ALV-gp95-Probe
对象	AIV	NDV	MDV	IBDV	AIAV	J-ALV

## A. 4

表4 六种免疫抑制性疾病RT-PCR扩增反应条件

反应阶段	反应温度	反应时间	循环次数
逆转录	50℃	35 min	1
逆转录酶的灭活及热启动	95℃	15 min	1
富集阶段	变性	94℃	30 s
	退火	52℃	1 min 30 s
	延伸	72℃	1 min
选择性扩增阶段	变性	94℃	30 s
	退火和延伸	70℃	1 min 30 s
目标扩增阶段	变性	94℃	30 s
	退火	55℃	30 s
	延伸	72℃	30 s
后延伸	72℃	10 min	1

## A.5

表5 1.5×TMAC杂交液（微球稀释液）（250 mL）

试剂名称	货号	最终浓度	数量/250 mL
5M TMAC	Sigma T-3411-1L	4.5 M	225 mL
20% 肌胺酰	Sigma L7414	0.15%	1.88 mL
1 M Tris-HCl, pH 8.0	Sigma T-3038-1L	75 Mm	18.75 mL
0.5 M EDTA, pH 8.0	Sigma 03690-100ml	6 mM	3.0 mL
去离子水			1.37 mL

备注：过滤灭菌后室温保存

## A.6

表6 1×TMAC杂交液（检测缓冲液）（250mL）

试剂名称	货号	最终浓度	数量/250mL
5M TMAC	Sigma T-3411-1L	3 M	150mL
20% 肌胺酰	Sigma L7414	0.1%	1.25mL
1 M Tris-HCl, pH 8.0	Sigma T-3038-1L	50 Mm	12.5 mL
0.5 M EDTA, pH 8.0	Sigma 03690-100ml	4 mM	2.0 mL
牛血清白蛋白	Sigma A9418	0.2%	0.5g
去离子水			84.25 mL

备注：过滤灭菌后室温保存

## 附录 B

(资料性附录)

## 家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法规范性附录

以下列以图示方式展示超级引物进行特定产物的扩增原理（图1）和六种免疫抑制性疾病液相芯片检测流程（图2），以及六种免疫抑制性疾病RT-PCR反应液的配制（表7）和混合微球探针与RT-PCR产物杂交反应液配制（表8）。

## B. 1

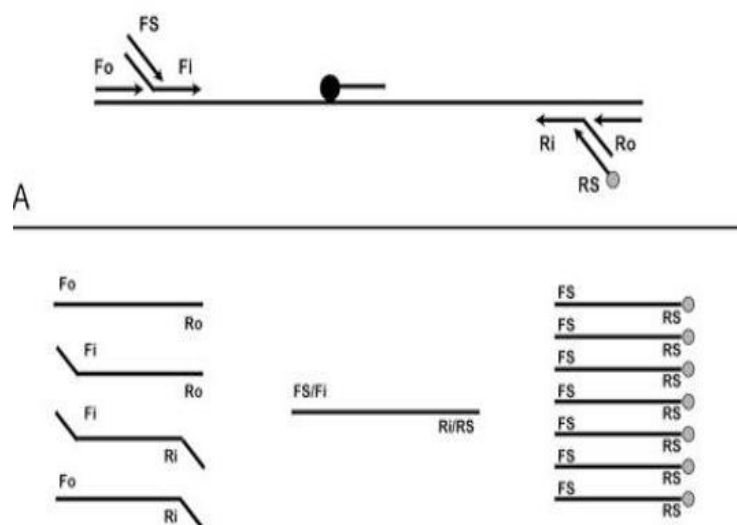
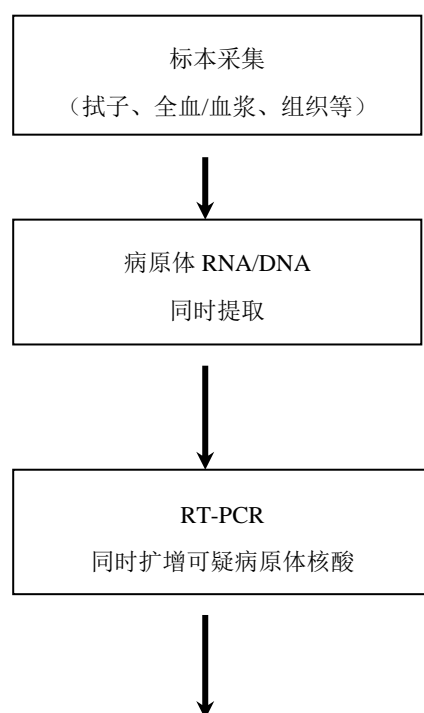


图1 采用超级引物进行特定产物的扩增原理图

## B. 2



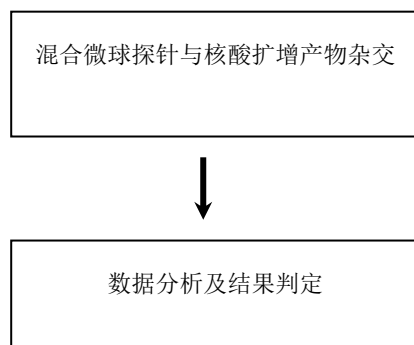


图 2 六种免疫抑制性疾病液相芯片检测流程

## B. 3

表7 六种免疫抑制性疾病RT-PCR反应液配制表

组份	量/反应 (μL)	终浓度
RNase-free water	27	
5× Qiagen one step RT-PCR buffer	10	1 ×
dNTP mix ((10 mM/each)	2	0.4 mM
Mg <sup>2+</sup> (12.5 mM)	0.00	2.5 mM
RNase inhibitor (40 U/μL)	0.25 (10 U/反应)	0.2 U/μL
FSP (20 μM)	1.5	0.6 μM
RSP (80 μM)	1.5	2.4 μM
混合引物 (primer mix)	1	0.05 μM~0.2 μM
Qiagen one step RT-PCR enzyme mix (HotStarTaq DNA Polymerase)	2	
template	5	
Total	50	

## B. 4

表8 混合微球探针与RT-PCR产物杂交反应液配制表

组份	量/反应 (μL)
六种免疫抑制性疾病微球混合杂交液	33
RT-PCR 产物	5
1×TE (PH8.0)	12
Total	50