



中华人民共和国国家标准

GB/T 27537—2011

动物流感检测 A 型流感病毒分型基因 芯片检测操作规程

Animal influenza detection—Protocol of DNA microarray examination
for influenza A virus subtypes

2011-11-21 发布

2012-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中国人民解放军军事医学科学院、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：韩雪清、刘伯华、李建、林祥梅、王慧煜、刘建、陈茹、侯义宏、刘业兵、贾广乐、吴绍强、梁成珠、秦智锋、宁宜宝、薄清如、王伊琴。

动物流感检测 A 型流感病毒分型基因 芯片检测操作规程

1 范围

本标准规定了 A 型流感病毒分型基因芯片检测的操作规程。

本标准适用于口岸样品中 A 型流感病毒全部亚型(H1~H16, N1~N9)的筛查。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ctrl1, ctrl2 和 ctrl3:质控探针 1、2 和 3(control 1、control 2 and control 3)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

PBS:磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer solution)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate)

SSC:氯化钠/柠檬酸钠缓冲液(sodium chloride-sodium citrate buffer)

TAMRA:羧基四甲基若丹明(carboxytetramethylrhodamine)

4 主要试剂和仪器

4.1 主要试剂

4.1.1 试验用水

蒸馏水,按照 GB/T 6682,三级用水,除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯。

4.1.2 提取试剂

Trizol 试剂等或商品化的病毒 RNA 提取试剂。

4.1.3 A 型流感病毒多重不对称 RT-PCR 扩增引物和探针的合成

特异性引物和探针(参见附录 A)。探针和引物合成后,采用无 RNA 酶的水(参见附录 B)分别溶解为 50 μmol , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4.1.4 RT-PCR 反应试剂

一步法 RT-PCR 缓冲液, dNTP, 酶混合物, RNA 酶抑制剂等。

4.1.5 基因芯片

含有 A 型流感病毒 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型特异性探针和质控探针, 参见附录 C。

4.1.6 基因芯片杂交液

商品化的基因芯片杂交液(参见附录 B), 每份含有 ddH₂O 0.7 μL, 20×SSC 1.5 μL, 50×Denhardt's 1.5 μL, 50%(质量体积比)硫酸葡聚糖 3.0 μL, 4%(质量体积比)SDS 1.5 μL, 共 8.2 μL/份。

4.1.7 杂交质控探针

TAMRA 荧光标记的一段寡核苷酸(ctr1), 与芯片上杂交阳性参照(PC, ctr2)序列互补, 用于质控杂交过程(序列参见附录 A)。合成后, 采用无 RNA 酶的水溶解为 50 μmol/L, -20 °C 保存备用。

4.2 仪器

4.2.1 微型台式高速冷冻离心机(大于 13 000 r/min)。

4.2.2 PCR 仪。

4.2.3 涡旋混匀器。

4.2.4 恒温水箱。

4.2.5 芯片杂交盒。

4.2.6 脱色摇床。

4.2.7 基因芯片扫描仪。

4.2.8 冰箱(2 °C~8 °C、-20 °C 和 -80 °C 三种)。

4.2.9 微量可调移液器。

4.2.10 离心管和枪头。

5 操作方法

5.1 采样工具

下列采样工具应经(121±2)°C, 15 min 高压灭菌并烘干:

——棉拭子;

——剪刀;

——镊子;

——1.5 mL 离心管;

——研钵。

5.2 样品采集

5.2.1 活动物

取鼻拭子、咽喉拭子和泄殖腔拭子, 采集方法如下:

——取鼻拭子时将拭子深入鼻腔来回刮 2 次~3 次并旋转, 取鼻腔分泌液;

——取咽喉拭子时将拭子深入喉头口及上颌裂来回刮 2 次~3 次并旋转, 取咽喉分泌液;

- 取泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔旋转一圈并沾取少量粪便；
- 将采样后的拭子分别放入盛有 1.0 mL PBS 的 1.5 mL 离心管中，加盖、编号。

5.2.2 脏器或肌肉组织

用无菌镊子和剪刀等工具采集待检脏器或肌肉组织，装入一次性塑料袋或其他灭菌容器，编号。

5.3 样品贮运

样品采集后，放入密闭的塑料袋内（一个采样点的样品放一个塑料袋），于保温箱中加冰、密封，24 h 内送实验室。

5.4 样品的处理

5.4.1 棉拭子处理方法

样品在混匀器上充分混合后，用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出，室温放置 30 min，取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中，编号备用。

5.4.2 肌肉或组织脏器处理方法

取待检样品 2.0 g，加入等量灭菌石英砂，于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨，加入 10 mL PBS 混匀，4 ℃，3 000 r/min 离心 15 min，取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中，编号备用。

5.5 样品 RNA 的制备

5.5.1 取上清液 200 μ L，分别加入 1.5 mL 离心管内，各加入 Trizol 试剂 1.0 mL，反复混匀，冰上放置 5 min。

5.5.2 加入 200 μ L 氯仿，小心盖上帽盖，用力摇动离心管 15 s，室温放置 5 min。

5.5.3 12 000 r/min，4 ℃，离心 15 min，可见分为三层，上层水相含 RNA。

5.5.4 转移水相至一新离心管内，加入等量异丙醇，混匀，室温放置 15 min。

5.5.5 12 000 r/min，4 ℃，离心 10 min，离心后在离心管边和底部可见有胶样 RNA 沉淀（对于细胞毒而言，可能看不到沉淀）。

5.5.6 小心吸弃上清，加入 500 μ L 75% 乙醇（用 DEPC 水配制），小心颠倒以漂洗沉淀及管壁，12 000 r/min，4 ℃，离心 5 min。

5.5.7 小心吸弃上清，室温干燥 RNA 沉淀 5 min~10 min。然后加入 20 μ L 无 RNA 酶的水溶解沉淀。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增，若需长期保存，应放置 -80 ℃ 冰箱保存。

5.6 A 型流感病毒 RNA 多重不对称 RT-PCR 扩增体系

5.6.1 引物混合比例

25 对引物分为 4 组。第 1 组包括 H1、H3、H5、H6、H7、H9、N1 和 N2，其中 H5 和 H7 亚型的上游引物为 0.65 μ L，下游引物为 1.3 μ L，N2 亚型的上游引物为 0.6 μ L，下游引物为 1.2 μ L，其余亚型的上游引物均为 0.5 μ L，下游引物均为 1 μ L；第 2 组包括 H2、H4、H8、H10、H11、H13、H15 和 H16，每个亚型的上游引物均为 0.5 μ L，下游引物均为 1 μ L；第 3 组包括 H14、N4、N6、N7 和 N9，其中 N7 上游引物为 0.65 μ L，下游引物为 1.3 μ L，其余亚型上游引物均为 0.5 μ L，下游引物均为 1 μ L；第 4 组包括 H12、N3、N5 和 N8，其中 N5 上游引物为 0.6 μ L，下游引物为 1.2 μ L，其余亚型上游引物均为 0.5 μ L，下游引物均为 1 μ L。

5.6.2 RT-PCR 反应体系

每个样品分 4 个管进行 RT-PCR。在 0.2 mL PCR 反应管中依次加入一步法 RT-PCR 缓冲液

10 μL , 10 mmol/L dNTP 2.0 μL , 酶混合物 2.0 μL , RNA 酶抑制剂 0.5 μL , 通用引物上游 0.5 μL 、下游 5.0 μL , RNA 模板 5.0 μL , 按照 4 组引物混合物的用量分别加入引物混合物, 补无 RNA 酶的水至 50.0 μL 。置于 PCR 仪立即进行 RT-PCR 扩增。

5.7 A 型流感病毒多重不对称 RT-PCR 反应条件

反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 20 个循环; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 20 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后, 取出放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.8 基因芯片的杂交、洗涤与扫描

5.8.1 杂交步骤

5.8.1.1 扩增产物 5.2 μL (4 组 RT-PCR 产物各取 1.3 μL)、杂交质控探针 0.8 μL 和杂交液 6 μL 于 0.2 mL PCR 管中, 混匀。

5.8.1.2 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 立即冰浴 3 min, 4 000 r/min 离心 5 s~10 s, 将离心管放回冰浴。

5.8.1.3 在杂交盒的沟槽中加入 200 μL 蒸馏水以防止杂交体系蒸发, 将芯片正面向上放入盒中。

5.8.1.4 将已变性的杂交样品从冰盒中取出, 用枪头轻轻吹吸 3 次~5 次。

5.8.1.5 取 7 μL 杂交混合液加到探针点阵区, 迅速盖上盖片和杂交盒并密封。

5.8.1.6 将杂交盒水平放入 52 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中, 杂交 2.5 h。

5.8.2 洗涤步骤

5.8.2.1 杂交结束后, 立即将芯片取出, 放入预热至 45 $^{\circ}\text{C}$ 的洗涤液 I 中, 100 r/min 水平振荡洗涤 5 min, 相同条件重复一次。

5.8.2.2 取出芯片, 放入预热至 45 $^{\circ}\text{C}$ 的洗涤液 II 中, 100 r/min 水平振荡洗涤 5 min, 相同条件重复一次。

5.8.2.3 取出芯片, 放入洗液 III 中, 100 r/min 室温振荡 5 min。

5.8.2.4 将芯片在无水乙醇中浸提几次, 然后把芯片放入芯片盒中, 1 000 r/min 离心 5 min。

5.8.3 扫描

用基因芯片扫描仪 (波长 532 nm, PMT60%, 激光能量 90%, 扫描仪参数不作硬性规定) 进行芯片扫描。

6 结果判定

6.1 检测结果成立条件

A 型流感病毒基因芯片点样阳性参照 (QC, 即 ctr3) 和杂交阳性参照 (PC, 即 ctr2), 经杂交扫描后出现特异性荧光信号, 同时点样 buffer 参照 (NC) 和空白参照 (N) 无荧光信号, 则检测结果成立, 否则结果不成立, 应重新试验。

6.2 结果判断

6.2.1 阳性判定

在试验结果成立的前提下, 如果样品 RT-PCR 产物经杂交后, 在各自的位置上 (见图 1) 出现特异性

荧光信号,则判定为 A 型流感病毒各个亚型(包括 HA 和 NA)核酸阳性。每条探针有 2 个重复位点,出现 2 个或 2 个以上荧光信号者判为该亚型核酸阳性;出现 1 个荧光信号需进行重复试验再次读判,如果仍出现 1 个荧光信号,就判为可疑,可采用其他方法进一步验证。如果只有 HA 或者只有 NA 位点出现荧光信号,或者 2 个以上 HA 或 NA 亚型位点出现荧光信号,都判定为该亚型核酸阳性。

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| QC | QC | H1 | H1 | H1 | H1 | NC | NC | H1 | H1 | H2 | H2 | QC | QC |
| H2 | H2 | H3 | H3 | H3 | H3 | H4 | H4 | H4 | H4 | H5 | H5 | H5 | H5 |
| H6 | H6 | H6 | H6 | H7 | H7 | H7 | H7 | H7 | H7 | H7 | H7 | H8 | H8 |
| H8 | H8 | H9 | H9 | H9 | H9 | H10 | H10 | H10 | H10 | H11 | H11 | H11 | H11 |
| NC | NC | H12 | H12 | H12 | H12 | PC | PC | H13 | H13 | H13 | H13 | NC | NC |
| H14 | H14 | H14 | H14 | H15 | H15 | H15 | H15 | H16 | H16 | H16 | H16 | N1 | N1 |
| N1 | N1 | N2 | N2 | N2 | N2 | N3 | N3 | N3 | N3 | N4 | N4 | N4 | N4 |
| N5 | N5 | N5 | N5 | N6 | N6 | N6 | N6 | N7 | N7 | N7 | N7 | N8 | N8 |
| QC | QC | N8 | N8 | N9 | N9 | NC | NC | N9 | N9 | N | N | QC | QC |

QC——点样阳性参照;

PC——杂交阳性参照;

NC——点样 buffer 参照;

N——空白参照;

DP(H1~H16,N1~N9)——检测探针。

图 1 芯片探针排布图

6.2.2 阴性判定

如果在各亚型特异性探针位置上(见图 1)均未出现荧光信号,则判定为 A 型流感病毒亚型核酸阴性。

7 注意事项

7.1 样品处理、RNA 提取和 RT-PCR 加模板等操作应该符合相关生物安全操作管理规定的要求,同时注意自身防护。扩增后芯片杂交检测可在普通实验室进行操作。

7.2 因涉及 RNA 操作,为了防止 RNA 降解,用于试验的器皿和离心管、PCR 管及枪头等均需要用 DEPC 水处理,并经过 121 ℃、15 min 高压灭菌后才可使用。操作时应戴一次性手套,并经常更换。

7.3 模板 RNA 提取、PCR 反应液配制、芯片杂交、芯片洗涤和结果观察等应分区或分室进行,实验室运作应从洁净区到污染区单方向进行。

7.4 当同时需要进行数个样品的多重不对称 RT-PCR 反应时,先配制除待检样品外的各种试剂的混合液,然后再分装到每个反应管中。这样,可使所取的试剂体积更准确,减少试剂损失,避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作产生的误差。

7.5 使用酶混合物和 RNA 酶抑制剂等酶类时,取样之前要瞬时离心,将液体收集到反应管底部;由于酶保存液中含有 50% 的甘油,黏度高,应慢慢吸取以保证取样量的准确。

7.6 上机运行前应检查各 PCR 管盖是否盖紧,以防 RNA 和 PCR 产物污染仪器。

7.7 取杂交混合液加到探针点阵区时,一定要轻柔,避免出现气泡,否则会影响杂交结果。

7.8 52 ℃ 杂交时,杂交盒要水平放置。

7.9 芯片洗涤时,洗涤液 I 和洗涤液 II 要预热,否则洗涤不干净,影响扫描结果。

7.10 芯片常温避光保存。

附录 A
(资料性附录)
引物和探针序列

表 A.1 A 型流感病毒基因芯片多重不对称 RT-PCR 引物

| 型别 | 引物编号 | 序列(5'~3') | 长度 |
|----------------|----------------------------------|---|--------|
| Univ- ersal | PMA-06001-uf PMA-06002-ur | TCACTTGCTTCCGTTGAGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGT | — |
| H1 | PMA-06003-H1f PMA-06004-H1r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGGAGCAATTGAGTTCAGTATC TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGACACTCTCCTATTGTGACTG | 601 bp |
| H3 | PMA-06005-H3f PMA-06006-H3r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTGTTACCCTTATGATGTGCC TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCCCTGTTGCCAATTCAGAG | 669 bp |
| H5 | PMA-06007-H5f PMA-06008-H5r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGAGTGAATTGGAATATGGTAACTG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAACTGAGTGTTCATTTTGTCAAT | 380 bp |
| H6 | PMA-06017-H6F PMA-06018-H6R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGAAGGCATTATTGGRTCAGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTCTAGTTTCAATCTGTGG | 685 bp |
| H7 | PMA-06009-H7f PMA-06010-H7r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTCAGGWTCTTCWTTCTATGC TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTCYCCTTGTGCATTTTGATG | 641 bp |
| H9 | PMA-06011-H9f PMA-06012-H9r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGT TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGATCTTACTCGCAATGTCTG | 493 bp |
| N1 | PMA-06013-N1f PMA-06014-N1r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTCCCCTTGAATGCAGAAC TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCACATGCACATTCAGACTCTTG | 328 bp |
| N2 | PMA-06015-N2f PMA-06016-N2r | TCACTTGCTTCCGTTGAGGATAGCATGGTCCAGCTCAAG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTACATGCTGAGCACTTCCTG | 299 bp |
| H2 | PMA-06019-H2F PMA-06020-H2R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGCGTCATTCTTCAGGAACATGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGCCTTGTGCTATTTCWGG | 229 bp |
| H4 | PMA-06021-H4F PMA-06022-H4R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTTGTTAYCCATTTGATGTGCC TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTRACTCTTCCAGGGTTGTT | 324 bp |
| H8 | PMA-06023-H8F PMA-06024-H8R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGAAGGTTGGTCATACATAGTGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTCTTACTAATGGTCTGG | 444 bp |
| H10 | PMA-06025-H10F PMA-06026-H10R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGATTGACAAGATAAGCACCGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTTACTYACTCTACTAGGTGCTAT | 435 bp |
| H11 | PMA-06027-H11F PMA-06028-H11R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGACTTAGAAATGTCCCAGCAA TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCATTTCCCTCGTCTTTGGC | 437 bp |
| H12 | PMA-06035-H12F PMA-06036-H12R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGAGTACAAGAACACCAGAGATT TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTGGCCATCCGCCTTCTAT | 537 bp |
| H13 | PMA-06029-H13F PMA-06030-H13R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGACCCCTTCTGCTCCTCATG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAACTGATTGATTCCCCTGG | 474 bp |
| H14 | PMA-06037-H14F PMA-06038-H14R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTCTCCCGACTAAACTGGCTA TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTGCCGCTCTGATTCCCTTAC | 247 bp |

表 A.1 (续)

| 型别 | 引物编号 | 序列(5'~3') | 长度 |
|----------------------------|----------------------------------|--|--------|
| H15 | PMA-06031-H15F PMA-06032-H15R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGACTCCTTGACTGAGATCTGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAGTATCACATCTTTGTACCCAC | 305 bp |
| H16 | PMA-06033-H16F PMA-06034-H16R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTAAACTTCTCGTGCTAATCG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTTCAACTTGATCCCTTC | 252 bp |
| N3 | PMA-06049-N3F PMA-06050-N3R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGGAAAGARTGGATGCATGT TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTGTTGATTCTCATCCAAGG | 366 bp |
| N4 | PMA-06039-N4F PMA-06040-N4R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGGAAGCAATCGACCATGGAT TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCGACACCCATCCATTAGCAT | 260 bp |
| N5 | PMA-06051-N5F PMA-06052-N5R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGACTGTTATTGGGTAATGACG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTGCTTGTTTTGGTCCAACCG | 459 bp |
| N6 | PMA-06041-N6F PMA-06042-N6R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGACCTAATAACAATGCTTCGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCACTCTTCTATATGCTGTGC | 246 bp |
| N7 | PMA-06043-N7F PMA-06044-N7R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTGTGCAGAGATAA YTGCA TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCCGGAATAGCCTGACCAATT | 352 bp |
| N8 | PMA-06045-N8F PMA-06046-N8R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGGGGCMTGATGTATGGATGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAGAATAGCTCCATCGTGCC | 340 bp |
| N9 | PMA-06047-N9F PMA-06048-N9R | TCACTTGCTTCCGTTGAGGTTCTATGCTCTCAGCCAAGG TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTGCCATACGCATTGAGATTC | 310 bp |
| 注: Y=(C,T),W=(A,T),R=(A,G) | | | |

表 A.2 A型流感分型基因芯片探针

| 型别 | 编号 | 探针序列(5'~3') |
|----------|--|---|
| 质控探针 QCP | PBA-08001-ctrl PBA-08002-ctrl2 PBA-08003-ctrl3 | TAMRA-CCTCAACGGAAGCAAGTGAT NH2-T15-ATCACTTGCTTCCGTTGAGG NH2-GCTGCCTCGCAAGGAGT-TAMRA |
| H1 | PBA-08004-H1a PBA-08066-H1d PBA-08068-H1f | NH2-T15-TGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTC NH2-T15-AATAGAACCTGGAGACACAATAA NH2-T15-CGAGATATCCCCAAGACAAGTT |
| H3 | PBA-08007-H3a PBA-08008-H3b | NH2-T15-CCTCGGGTACTTCAAATACG NH2-T15-GGAAGCATTCCCAATGACAAACC |
| H5 | PBA-08011-H5a PBA-08012-H5b | NH2-T15-GTCACCAATAAGGTCAACTCGATC NH2-T15-ACCATAGCAATGAGCAGGGGA |
| H6 | PBA-08025-H6a PBA-08026-H6b | NH2-T15-TGAGATGTTTCCCAAAAGTACATGG NH2-T15-ATGGGAAGTAAAGCATGAATTT |
| H7 | PBA-08013-H7a PBA-08014-H7b PBA-08065-H7e | NH2-T15-CAGACCAAAGTCTATGGAAGTGGGA NH2-T15-GTCAAACACAGACAATGCTGCTT NH2-T15-CAAGGAAAGACCCAGCTCTGATAAT |
| H9 | PBA-08017-H9a PBA-08018-H9b | NH2-T15-CAAGACGCCAATACACAAATAAT NH2-T15-AAGCATGTTGAGATTCATTCTACAG |

表 A.2 (续)

| 型 别 | 编 号 | 探针序列(5'~3') |
|-----|----------------------------------|--|
| N1 | PBA-08019-N1a PBA-08020-N1b | NH2-T15-AGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTG NH2-T15-CAAGAGTTGGAGGAACAACATACT |
| N2 | PBA-08022-N2a PBA-08023-N2b | NH2-T15-GCGTTTGTATCAATGGAACCTGTA NH2-T15-ATGATGGGAAAGCATGGTTACATG |
| H2 | PBA-08027-H2a PBA-08028-H2b | NH2-T15-ACATCAACACTGAATAAGAGGTC NH2-T15-GAACAAAGGACACTGTACCAGAAT |
| H4 | PBA-08029-H4a PBA-08030-H4b | NH2-T15-GACAAAGGTCAACAATGGGGA NH2-T15-CTTCAACTGACGCAGAACAAA |
| H8 | PBA-08031-H8a PBA-08032-H8b | NH2-T15-TGGAGACATCATTTTCTTATGGG NH2-T15-GCATCTTACAAGAGAATAAGGCTATT |
| H10 | PBA-08034-H10a PBA-08035-H10b | NH2-T15-AAAACAACCTTGTGCCTGTGGT NH2-T15-CACAAGAAAAGAATGATCTGTATGG |
| H11 | PBA-08036-H11a PBA-08037-H11b | NH2-T15-CAGTAAAATAGAGGAGAGGATAAACC NH2-T15-AGAAGGATGCTAAAGGACAATG |
| H12 | PBA-08045-H12a PBA-08046-H12b | NH2-T15-TAATCACAGGGAAATCACATGGC NH2-T15-CACTAGTAAGCACTATATTGGGAA |
| H13 | PBA-08038-H13a PBA-08039-H13b | NH2-T15-GGATGAAGATTTACTGGTATTTGATG NH2-T15-GTTCATGGAGTAGGAAATACAACC |
| H14 | PBA-08047-H14a PBA-08048-H14b | NH2-T15-CCATCAAGCGATAATGAGCAAAC NH2-T15-TCTTATGTCAGGCTCTATCTCTGG |
| H15 | PBA-08040-H15a PBA-08041-H15b | NH2-T15-GCATACAATTGACCTTGCAGATTC NH2-T15-CCGATGTGACGATCAATGTATG |
| H16 | PBA-08043-H16b PBA-08044-H16c | NH2-T15-GACAGAACATTAGACCTGCATGAT NH2-T15-ATCATGAGGACTACAAAGAAGAG |
| N3 | PBA-08049-N3a PBA-08050-N3b | NH2-T15-TATGTAGGGACAATTGGAAGGG NH2-T15-GATAATGATGCAAGTGCCCAGA |
| N4 | PBA-08051-N4a PBA-08052-N4b | NH2-T15-GGCTATGTATGTAGTGGGATATTTG NH2-T15-GATGGCACAGGCTCATGTAATAG |
| N5 | PBA-08053-N5a PBA-08054-N5b | NH2-T15-GTTTGCCGAGATAATTGGAATGG NH2-T15-AGGGAGGTACATTGAAGAGT |
| N6 | PBA-08055-N6a PBA-08056-N6b | NH2-T15-GGCAGGAAATATATTAAGGACTCA NH2-T15-CCAGCTAATAACAGAGCAGAAAC |
| N7 | PBA-08057-N7a PBA-08058-N7b | NH2-T15-ATGTTGAAAATACCTAATGCAGG NH2-T15-AAGGGATTCCGGTTTCTAAATGG |
| N8 | PBA-08060-N8a PBA-08061-N8b | NH2-T15-AGCTCCATTGTGATGTGTGG NH2-T15-AACTTAAATTGGTCAGGATACAGCG |
| N9 | PBA-08062-N9a PBA-08063-N9b | NH2-T15-TCATCACCACCCACAGTATACAA NH2-T15-AGAGCCAGGATGTCGATATGTA |

附录 B
(资料性附录)
试剂配制

B.1 无 RNA 酶的水

1 000 mL 超纯水中加入 1 mL DEPC, 37 °C 静置 1 h, 然后 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

B.2 20×SSC

用 800 mL 超纯水溶解 175.3 g 氯化钠和 88.2 g 柠檬酸钠, 调节 pH 值至 7.0, 定容至 1 000 mL。分装后 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

B.3 50×Denhardt's

50×Denhardt's 试剂的成分为: 1%(质量体积比) 聚糖体 400, 1%(质量体积比) 聚乙烯吡咯烷酮和 1%(质量体积比) 牛血清白蛋白。

B.4 50%(质量体积比) 硫酸葡聚糖

用 900 mL 超纯水溶解 500 g 硫酸葡聚糖, 定容至 1 000 mL。

B.5 4%(质量体积比) SDS

用 900 mL 超纯水溶解 40 g SDS, 调节 pH 值至 7.2, 定容至 1 000 mL。

B.6 PBS 缓冲液**B.6.1 A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液)**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g, 溶于超纯水中, 定容至 1 000 mL。

B.6.2 B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g), 溶于超纯水中, 定容至 1 000 mL。

B.6.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲液的配制

| | |
|---------------|-----------|
| 0.2 mol/L A 液 | 14 mL |
| 0.2 mol/L B 液 | 36 mL |
| NaCl | 8.5 g |
| 加超纯水定容至 | 1 000 mL。 |

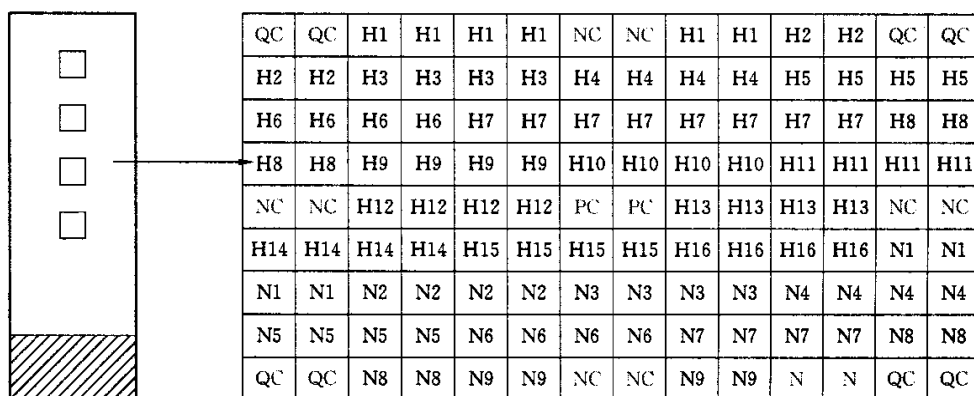
B.7 洗涤液 I、洗涤液 II、洗涤液 III

洗涤液 I: $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS (17.53 g 氯化钠, 8.82 g 柠檬酸三钠, 调 pH=7, 用超纯水定容到 1 000 mL, 后加 1 g SDS); 洗涤液 II: $0.2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS (1.753 g 氯化钠, 0.882 g 柠檬酸三钠, 调 pH=7, 用超纯水定容到 1 000 mL, 后加 1 g SDS); 洗涤液 III: $0.2\times\text{SSC}$ (1.753 g 氯化钠, 0.882 g 柠檬酸三钠, 调 pH=7, 用超纯水定容到 1 000 mL)。

附录 C
(资料性附录)
基因芯片的制备与检验

C.1 芯片的设计方案

本芯片设计为每张经醛基修饰的玻璃片上含 4 个点阵,每个点阵的微矩阵为 14×9 阵列(见图 C.1),芯片点样矩阵图包括 5 个部分:QC 为点样阳性参照,8 个重复位点;NC 为点样 buffer 参照,8 个重复位点;PC 为杂交阳性参照,2 个重复位点;N 为空白参照,2 个重复位点;其他位点为检测探针;HA 亚型和 NA 亚型(H1~H16,N1~N9)的 52 条特异性探针,每条探针 2 个重复位点。



QC——质控探针;
PC——阳性探针;
NC——阴性对照;
N——空白对照;
DP——检测探针(H1~H16,N1~N9)。

图 C.1 芯片点样矩阵图

C.2 芯片的制备

稀释好的探针按照芯片点样矩阵图点制到醛基基片上,即为点制好的芯片,保存期为 12 个月。

C.3 芯片的检验

从每批点制好的芯片中随机抽取 2 张,应无色、透明,无缺刻,无划伤的玻璃片,对光观察能看到有明显的 4 个点阵。