



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1439—2013  
代替 SN/T 1439—2004

## 国境口岸埃博拉病毒分子 生物学检测方法

Molecular detection methods of Ebola virus at frontier ports

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1439—2004《国境口岸埃博拉出血热病毒检验规程》。

本标准与 SN/T 1439—2004 相比,主要技术变化如下:

——修改了标准的中英文名称;

——原标准提供的检测方法,如病毒分离培养、电子显微镜检查、间接免疫荧光试验、免疫印迹试验等都涉及活病毒,必须在 BSL-4 实验室内才能进行,基本不具备可操作性,因此,本标准结合生物安全要求,将原标准中的方法全面进行了修改。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:黄吉城、李燕、师永霞、郑夔、李小波、洪烨、幸芦琴、相大鹏、郭波旋、钟玉清、莫秋华、史咏梅。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1439—2004。

# 国境口岸埃博拉病毒分子 生物学检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸埃博拉出血热疑似病例血清标本中埃博拉病毒检测的生物安全要求,标本的采集、运输和保存,标本的处理,苏丹埃博拉病毒和扎伊尔埃博拉病毒常规 RT-PCR 检测和实时荧光 RT-PCR 检测以及埃博拉病毒基因芯片法等检测方法。

本标准适用于国境口岸入出境人员埃博拉出血热疑似病例临床标本中的分子生物学检测。

## 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 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**埃博拉出血热 Ebola hemorrhagic fever; EHF**

由埃博拉病毒(Ebola virus, EBV)引起的一种急性出血性传染病。人主要通过接触病人或感染动物的体液、排泄物、分泌物等而感染,临床表现主要为发热、出血和多脏器损害。埃博拉出血热的病死率高,可达 50%~90%。本病于 20 世纪 70 年代在非洲首次发现,主要在非洲的乌干达、刚果、加蓬、苏丹、科特迪瓦、利比里亚、南非等国家流行。

### 3.2

**埃博拉病毒 Ebola virus**

又称埃博拉出血热病毒,属丝状病毒科,为单股负链 RNA 病毒,是至今人类所知的最为恐怖的病毒之一,被世界卫生组织(WHO)列为潜在的生物战剂病原体。可分为四种不同亚型:扎伊尔埃博拉(EBO-Z)、苏丹埃博拉(EBO-S)、科特迪瓦埃博拉(EBO-C)和莱斯顿埃博拉(EBO-R)。前 3 种亚型可使人和灵长类动物发病。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RT-PCR:反转录-聚合酶链反应

实时荧光 RT-PCR:实时荧光反转录-聚合酶链反应

Ct 值:每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数

RNA:核糖核酸

FAM:FAM 荧光染料,一种荧光报告基团

5 生物安全要求

- 埃博拉出血热疑似病例血清标本中相关材料的生物安全要求按 GB 19489 执行,如:
- 埃博拉病毒相关的感染性材料的操作应在生物安全三级(BSL-3 或 ABSL-3)实验室内进行;
  - 埃博拉病毒相关的灭活材料的操作应在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行;
  - 埃博拉病毒的病毒培养物运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814。

6 标本的采集、运输和保存

无菌采集疑似病例发病 1 周内静脉血 3 mL~5 mL,室温静置 30 min 使其凝固,500 g 离心 10 min,收集血清于 2 mL 无菌螺口塑料管中,用耐低温油性记号笔记录编号,低温送到实验室检测。如 24 h 内不能送到实验室,将血清置于-70 °C 保存。

7 标本的处理

血清标本直接进行分子生物学核酸的提取,如不能在 24 h 内检测应存放在-70 °C 冰箱。

8 分子生物学检测

8.1 RT-PCR 法

8.1.1 主要仪器

- 本方法使用的主要仪器如下:
- PCR 扩增仪;
  - 千分之一天平;
  - 超净工作台;
  - II 级生物安全柜;
  - 高压灭菌锅;
  - 低温高速离心机:最大离心力 20 000 g;
  - 电泳仪;
  - 凝胶成像分析系统;
  - 旋涡振荡器;
  - 冰箱:4 °C、-20 °C 和 -70 °C;
  - 移液器:10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 和 1 mL;
  - 恒温水浴锅。

8.1.2 主要试剂

- 除另有规定外,所有试剂均采用分析纯。本方法使用的主要试剂如下:
- 核酸提取试剂:用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit<sup>1)</sup> 提取病毒核酸;

1) 由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

- RT-PCR 试剂:德国 Qiagen 公司 One step RT-PCR kit<sup>1)</sup>;
- DEPC 处理的无 RNA 酶的水;
- 电泳缓冲液(TAE):称取 242 g Tris 碱,溶于 700 mL 的重蒸水中,加入 100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)、57.1 mL 冰乙酸,至充分溶解后用水定容至 1 L,室温储存;
- DNA 染料:SYBR green。
- RT-PCR 检测的引物,见表 1。

表 1 埃博拉病毒 RT-PCR 检测的引物

引 物	序列(5'-3')	扩增片段
上游外引物 EBOV(P890)	GAGACAACGGAAGCTAATGC	预期扩增片段为 187 bp
下游外引物 EBOV(P1076)	AACGGAAGATCACCATCATG	
注：等效的引物或其他等效的商品化检测试剂盒也可使用。		

### 8.1.3 检测步骤

#### 8.1.3.1 核酸提取

- 8.1.3.1.1 吸取 140  $\mu$ L 血清样本加入溶解的 560  $\mu$ L 裂解液 AVL。
- 8.1.3.1.2 脉冲混匀 15 s,置于室温 10 min。
- 8.1.3.1.3 短暂离心,加入 560  $\mu$ L 乙醇(96%~100%)脉冲混匀 15 s。
- 8.1.3.1.4 短暂离心。
- 8.1.3.1.5 将 QIAamp 旋转柱置于 2 mL 收集管中。吸取 8.1.3.1.3 中溶液 630  $\mu$ L 转移至旋转柱上,6 000 g 离心 1 min,将旋转柱放至干净的收集管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.1.3.1.6 打开旋转柱盖,重复 8.1.3.1.5。
- 8.1.3.1.7 打开旋转柱盖,加入 500  $\mu$ L 洗液 AW1,盖紧盖子,6 000 g 离心 1 min。将旋转柱放至干净的收集管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.1.3.1.8 打开旋转柱盖,加入 500  $\mu$ L 洗液 AW2,盖紧盖子,20 000 g 离心 3 min。将旋转柱放至干净的收集管上,20 000 g 再离心 1 min。将旋转柱放至干净的 1.5 mL 离心管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.1.3.1.9 打开旋转柱盖,加入 60  $\mu$ L 室温平衡的缓冲液 AVE。
- 8.1.3.1.10 盖紧盖子,室温放置 1 min。
- 8.1.3.1.11 6 000 g 离心 1 min。
- 8.1.3.1.12 收集滤出液,用于 RT-PCR 扩增。 $-20^{\circ}\text{C}$  或  $-70^{\circ}\text{C}$  储存 RNA。

#### 8.1.3.2 RT-PCR 检测

- 8.1.3.2.1 准备 RT-PCR 反应液,设 25  $\mu$ L 反应体系,每个待检标本反应液的组成为:5 $\times$ RT-PCR 缓冲液 5  $\mu$ L,10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L,10 mmol/L EBOV(P890)2  $\mu$ L,10 mmol EBOV(P1076)2  $\mu$ L,RT-PCR Enzyme mix 1  $\mu$ L,无 RNA 酶的 DEPC 水 9  $\mu$ L,RNA 模板 5  $\mu$ L。同时设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板为根据埃博拉病毒核苷酸序列体外转录的 RNA 片段;阴性对照模板为不含埃博拉病毒核酸的标本或无 RNA 酶的水。
- 8.1.3.2.2 将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪上进行操作,RT-PCR 反应程序为:50  $^{\circ}\text{C}$  逆转录 30 min,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,50  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min;4  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 8.1.3.3 凝胶电泳

扩增结束后,在 5  $\mu\text{L}$  扩增产物中加入 1  $\mu\text{L}$  6 $\times$ DNA 上样缓冲液,用含 1 $\times$ SYBR green 的 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,用凝胶成像系统照相记录结果。

### 8.1.4 结果判定

#### 8.1.4.1 质量控制

反应结果应同时符合以下 2 个条件:

- 阴性对照未出现特异性条带;
- 阳性对照出现预期 187 bp 大小的扩增条带。

#### 8.1.4.2 结果分析

在实验结果有效情况下,如待测样品出现预期 187 bp 大小的扩增条带,则可判断待测样品埃博拉病毒核酸 PCR 阳性,判断为阳性结果的样品可通过复检和核酸序列测定进行确认。如待测样品中未出现预期大小的扩增产物,则可判断待测样品埃博拉病毒核酸 PCR 阴性。

### 8.1.5 测序

对于首发病例,必需将 PCR 扩增产物进行序列测定,确定其碱基组成。使用 BLAST 分析其与已公布的埃博拉病毒序列的同源性,才能判断扩增产物是否为埃博拉病毒核酸。

## 8.2 实时荧光 RT-PCR 法

### 8.2.1 主要仪器

本方法使用的主要仪器如下:

- 荧光定量 PCR 仪;
- 超净工作台;
- 生物安全柜;
- 高压灭菌锅;
- 低温高速离心机:最大离心力 20 000  $g$ ;
- 旋涡振荡器;
- 冰箱:4  $^{\circ}\text{C}$ 、-20  $^{\circ}\text{C}$  和 -70  $^{\circ}\text{C}$ ;
- 移液器:10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  和 1 mL。

### 8.2.2 主要试剂

本方法使用的主要试剂如下:

- 核酸提取试剂:用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit<sup>2)</sup> 提取病毒核酸;
- 实时荧光 RT-PCR 通用试剂:Ag-Path-ID™ One step RT-PCR Kit,美国 Ambion 公司产品<sup>2)</sup>;
- DEPC 处理的无 RNA 酶的水;
- 引物和探针:引物和探针序列见表 2。

---

2) 由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

表 2 埃博拉病毒实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'-3')	扩增片段
EBOV-FP	CGGACACACAAAAAGAAAGAA	预期扩增片段为 90 bp 或 93 bp
EBOV-RP1	TGTAAATGTCAATGAGAGGAAAT	
EBOV-RP2	TAGTTTGAGTTTGAGGAAAATGAT	
EBOV-Probe <sup>a</sup>	FAM-CTT+CCT+CATAGTTATT+CG+CACAC-BHQ1	
注：等效的引物和探针或其他等效的商品化检测试剂盒也可使用。		
<sup>a</sup> EBOV-Probe 为 Taq Man-LNA 探针,探针序列中前面带“+”号的碱基表示 LNA 修饰碱基。		

### 8.2.3 核酸提取

见 8.1.3.1。

### 8.2.4 加样

准备实时荧光 RT-PCR 反应液，设 20  $\mu$ L 反应体系，每个待检标本反应液的组成为：2 $\times$ RT-PCR 缓冲液 10  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L EBOV-FP 1.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L EBOV-RP1 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L EBOV-RP2 1  $\mu$ L、5  $\mu$ mol/L EBOV-Probe 1.5  $\mu$ L、25 $\times$ RT-PCR Enzyme Mix 0.8  $\mu$ L、模板 RNA 4.2  $\mu$ L。同时设立阴性对照和阳性对照，阳性对照模板为根据埃博拉病毒核苷酸序列体外合成的 RNA 片段，阴性对照模板为不含埃博拉病毒核酸的标本或无 RNA 酶的水。

### 8.2.5 实时荧光 RT-PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上，*Taq* Man 探针实时荧光 RT-PCR 的反应条件略有不同。以 ABI 7 500 或 StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪为例，实时荧光 RT-PCR 检测扩增程序为：50  $^{\circ}$ C 10 min，95  $^{\circ}$ C 10 min；95  $^{\circ}$ C 5 s，55  $^{\circ}$ C 30 s（收集荧光信号），45 个循环。如使用其他仪器，应根据其他仪器的要求设置具体的反应条件。

### 8.2.6 结果分析

#### 8.2.6.1 阈值确定

阈值确定的方法对所有的样品都是统一的，一般是以荧光 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号，以本底信号标准差的 10 倍作为荧光阈值，以样品扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值（Ct 值）。

#### 8.2.6.2 质量控制

反应结果应同时符合以下 2 个条件：

- 阴性对照无扩增曲线；
- 阳性对照 Ct 值 < 35 并有明显扩增曲线。

#### 8.2.6.3 结果判定

##### 8.2.6.3.1 根据以下条件进行结果判定：

- 无明显扩增曲线，判断为埃博拉病毒荧光 RT-PCR 检测阴性；
- 有明显扩增曲线，且 Ct 值  $\leq$  40，判断为埃博拉病毒荧光 RT-PCR 检测阳性；

——有明显扩增曲线,且  $40 < C_t \text{ 值} \leq 45$  的标本应重做,重做后只要出现扩增曲线,则判断为埃博拉病毒荧光 RT-PCR 检测阳性,否则为阴性。

8.2.6.3.2 阳性标本的确认:荧光 RT-PCR 结果阳性的标本可进一步进行 RT-PCR 扩增。对于首发病例,必需对扩增片断测序和序列比对后,才能确认是否为埃博拉病毒核酸阳性。

8.3 基因芯片法

8.3.1 主要仪器设备

本方法使用的主要仪器如下:

- 微阵列芯片点样系统;
- 微阵列芯片扫描仪;
- 芯片洗涤仪;
- 芯片杂交仪;
- 脱色摇床;
- 基因扩增仪;
- 低温高速离心机。

8.3.2 主要试剂

本方法使用的主要试剂如下:

- 核酸提取试剂:用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit<sup>3)</sup> 提取病毒核酸;
- 逆转录试剂 RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Reverse Transcriptase;
- phi29 DNA 聚合酶<sup>3)</sup>;
- PCR 试剂 Premix PrimeSTAR<sup>®</sup> HS<sup>3)</sup>;
- 核酸共沉剂;
- 预杂交液、2×杂交液、洗液 I、洗液 II、洗液 III;
- Epoxide 包被芯片片基;
- Pronto! 芯片点样液<sup>3)</sup>;
- 芯片盖玻片;
- 随机引物:5'-GAGCGAGCACAACTTCTGNNNNNNNNN-3';
- CY3 染料标记的通用序列引物:5'-(CY3)GAGCGAGCACAACTTCTG-3';
- 埃博拉病毒基因芯片及阳性、阴性对照探针,探针序列见表 3。

表 3 埃博拉病毒基因芯片探针和对照探针

探针名称	序列(5'-3')
EBOV-1	CAACCAGGCAACCTCCACATCACCAAGTCGGGTTCAAACACCAACCAACCACAAGGCAA TATGTCATCTA
EBOV-2	TCTCAGGAGAACATTGGCTGCTATGCCCGAAGAGGAGACAACGGAAGCTAATGCTGGT CAGTTTCTATCC
EBOV-3	CTGCAAGATAAGGGCATCAAACAGGGTGTGTAGCTCTTTCACATATTTGGGCTCCTACT GGGCTAGGGTT
EBOV-4	TTCCTAGTGACTCCAAGTGTGCAAGGATGGAAGGTTTACTGGGCTGGACTTGAGTTTGA TGTC AACCAAA

3) 由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

表 3 (续)

探针名称	序列(5'-3')
EBOV-5	GAAGGCAAACATTCCACTATGGGTGTCTATCCTCTCGAAGGCCAACGCCCTGATCCTCC TGGTGAATTT
EBOV-6	CAATGTCCGCAGTGTTCAAATGCAAAGCAACCAGGTGGGAAACCATTTCGTGTCAGTGGC AGTCAAGAAAC
EBOV-7	CCTTCCTCCAGGAGTTCGTTCTTCCGCCAGTCCAACACTACCCAGTATTTACCTTTGATTT GACAGCACT
EBOV-8	GATCCAAGTACTGAGAAGATAAGACCATTCCTGATGTGGTGGTTGATCCCGATGATGG AAGCTACGGCG
EBOV-9	GCATCATTGGCGTACTGGAGGAGCAGGCACAGAAACAGCAACCGAAAATACTTGGCAAG AGACTCTTCAA
EBOV-10	GCCAGGAACCAGGACAGTGACAACACCCAGCCAGAACACTCTTTTGAGGAGATGTATCG CCACATTCTAA
EBOV-11	TGGACACGACCACCATGTTTCGAGCACGATCATCATCCAGAGAGAATTATCGAGGTGAGT ACCGTCAATCA
EBOV-12	AGGTGTTGATTTTCAAGAGAGTGCGGACAGTTTCCTTCTCATGCTTTGCTTTCATCATGC GTACCAGGGA
EBOV-13	GGTCTGATCTCTGATTGGCTGCTAACAACCAACACTAACCATTTCACATGCGAACACA ACGTGTCAAGG
EBOV-14	GATATTGAGAACAATCCAGGATTATGCTACGCATCCCAAATGCAACAAACCAAGCCAAA CCCGAAGACGC
EBOV-15	GGGCTTGGGCAAGATCAGGCAGAACCTGTTCTCGAAGTATATCAACGATTACACAGTGA TAAAGGAGGCA
EBOV-16	TGCCACAGGAGTCCACAAGCAACGGTCTAATAACTTCAACAGTAACAGGGATTCTTGGG AGTCTTGGGCT
EBOV-17	TTCCTAGTGAAGTCCAACTGTGCAAGGATGGAAGGTTTACTGGGCTGGACTTGAGTTTGA TGTCAACCAAA
EBOV-18	ACGAGGATGATGCTATTAAGGCTAAATTGAAAGATCCGAACGGGAAGGTTCCAGAAAG TGTCAAACAGGC
EBOV-19	AACCTCTTGATTTTCGGGACCATTGCACTATCCTTAGCAGTTCCTCAGGTATTGGGTGGA TTATCCTTCCT
EBOV-20	GCCAGTAATGAGCCTACAGGACAAGTTCCTTGCTGTTCTTCAACATGACTGAGGACCCA TGATTAGTAGA
PC-λDNA	TACAAAGTTACCTGTCAAACGGTGCAATGAAGCCAAGTTAGAACTCGTCAGAATGAATA TTAT
PC-Human 18 s rRNA	CAAGACGGACCAGAGCGAAAGCATTTGCCAAGAATGTTTTTATTAAATCAAGAACGAAAG TCGG
NC-rotovirus	GAACAATGTTGAGTTGAGCATCGACCGCAGCAGCAAGGACGAGAAGCGGCAATGAAGC CATTTTATTGCC
NC-norovirus	CATATTTCTCATTTTATGGTGATGATGAGATTGTGTCAACTGACATAGATTTTGACCCA GCCCCGCTCAC
注：等效的探针或其他等效的商品化检测试剂盒也可使用。	

### 8.3.3 基因芯片探针打印

合成好的芯片探针干粉离心后,按合成量用 Pronto! 芯片点样液稀释成 40  $\mu\text{mol/L}$ ,充分混匀后各吸 10  $\mu\text{L}$  至 384 孔板,用微阵列芯片点样系统将探针打印于 Epoxide 包被芯片片基上,每种探针打印 6 个点,每个阵列包括阴性对照探针、阳性对照探针和空白点样液,打印好的芯片取出后放入湿度 70% 的干净密封容器,过夜处理。

### 8.3.4 病毒 RNA 提取及逆转录

病毒的 RNA 提取见 8.1.3.1。

提取好的 RNA 取 5  $\mu\text{L}$  于 0.2 mL 反应管中,加入 40  $\mu\text{mol/L}$  随机引物 1  $\mu\text{L}$ ,65  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 后立即转到冰中速冻 2 min,随后加入下列混合液:5 $\times$ 反应缓冲液 2  $\mu\text{L}$ ,RiboLock<sup>TM</sup> RNase 抑制剂 0.5  $\mu\text{L}$ ,dNTP Mix(10 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ ,RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Reverse Transcriptase 0.5  $\mu\text{L}$ ,混匀,离心,25  $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后,42  $^{\circ}\text{C}$  逆转录 1 h。

### 8.3.5 全基因组扩增

取上述全部 10  $\mu\text{L}$  逆转录产物,加入 DEPC 水 5.5  $\mu\text{L}$ , $\lambda\text{DNA}$ (100 ng/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ 反应缓冲液 2  $\mu\text{L}$ ,dNTP Mix(10 mmol/L)3  $\mu\text{L}$ ,94  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 后立即转到冰中速冻 2 min,补加 phi29 DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ ,混匀,离心,30  $^{\circ}\text{C}$  保温 3 h,65  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min 使酶失活。

### 8.3.6 扩增产物标记

取上述全部 20  $\mu\text{L}$  phi29 DNA 聚合酶的全基因组扩增产物,补加下列混合液:Premix PrimeSTAR<sup>®</sup> HS 50  $\mu\text{L}$ ,20  $\mu\text{mol/L}$  CY3 染料标记的通用序列引物 4  $\mu\text{L}$ ,DEPC 水 26  $\mu\text{L}$ ,混匀,离心,按 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s、50  $^{\circ}\text{C}$  5 s、72  $^{\circ}\text{C}$  90 s,进行 30 个循环 PCR 扩增标记。

### 8.3.7 标记产物纯化

PCR 扩增标记的 100  $\mu\text{L}$  产物全部用核酸共沉剂进行纯化,干燥后室温保存于暗处备用。

### 8.3.8 芯片预杂交

将芯片浸入预热至 55  $^{\circ}\text{C}$  的预杂交液(5 $\times$ SSC,0.1% SDS,0.1 mg/mL BSA)中,55  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h~3 h,室温下用洗液 III(0.1 $\times$ SSC)清洗共 3 次,每次用脱色摇床 150 g 轻摇 5 min,转至纯水,放置 30 s,离心甩干芯片,然后于洁净处放置待用。

### 8.3.9 芯片杂交

在纯化的扩增标记样品沉淀管中加入 15  $\mu\text{L}$  去离子水和 15  $\mu\text{L}$  2 $\times$ 杂交液(50%去离子甲酰胺,5 $\times$ SSC,0.1% SDS,0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  鲑鱼精 DNA),振荡混匀,95  $^{\circ}\text{C}$  保温 5 min,然后 13 000 g 离心 2 min,取 30  $\mu\text{L}$  样品于盖好盖玻片的芯片上。在杂交仪上 55  $^{\circ}\text{C}$  杂交 2 h~3 h,杂交腔两端各加上 250  $\mu\text{L}$  含甲酰胺的保湿液,盖好,启动杂交程序进行杂交。

### 8.3.10 芯片杂交后清洗

杂交结束后,用镊子从杂交仪上轻轻取出芯片,注意不要触动盖玻片,立即浸入预先预热至 55  $^{\circ}\text{C}$  的洗液 I(2 $\times$ SSC,0.1% SDS)中,上下抽动直至盖玻片滑落,将芯片转至芯片洗涤仪上,用预先设好的程序洗涤:洗液 I 中静置 5 min,将洗液 I 换成洗液 II(1 $\times$ SSC),静置 2 min,再换洗液 II 静置 2 min,接着换洗液 III,静置 1 min,再换液 III(0.1 $\times$ SSC),静置 1 min,最后取出芯片,离心甩干芯片,待扫描检测。

### 8.3.11 芯片扫描

将杂交清洗后的基因芯片放入基因芯片扫描仪进行扫描分析。

### 8.3.12 质量控制

结果应同时符合以下 3 个条件,则可判定为杂交合格。

- 阴性对照探针杂交信号的信噪比均值 $\leq 3.5$ ;
- 基因芯片空白对照点杂交信号的信噪比均值 $\leq 3.5$ ;
- 阳性对照探针杂交信号的信噪比均值 $> 5.0$ 。

### 8.3.13 结果判定

在阴性、阳性对照合格的基础上:

- 目标基因探针杂交信号的信噪比均值 $\geq 5.0$  则判定为阳性信号;
  - 目标基因探针杂交信号的信噪比均值 $> 3.5$  并 $< 5.0$  则判定为可疑阳性;
  - 目标基因探针杂交信号的信噪比均值 $\leq 3.5$  则判定为阴性。
-

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
国境口岸埃博拉病毒分子  
生物学检测方法  
SN/T 1439—2013

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
总编室:(010)64275323

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字  
2013 年 8 月第一版 2013 年 8 月第一次印刷  
印数 1—1 600

\*

书号: 155066 • 2-25790 定价 18.00 元



SN/T 1439—2013