

附录 D
(规范性附录)

杂交信号阳性结果判读原则

- D.1 每个检测点信号值=该点荧光强度值-该点背景强度值。
- D.2 空白对照平均信号值=3个空白对照点信号值的平均值。
- D.3 阴性对照平均信号值=3个阴性对照点信号值的平均值-空白对照平均信号值。
- D.4 每条探针的每个检测点信号值-空白对照平均信号值>3倍阴性对照平均信号值即判读该检测点为阳性。
- D.5 每条探针的3个重复检测点平均值为阳性即判读该条探针杂交结果为阳性。
- D.6 如定位探针部分或全部为阴性,则表明探针与片基结合有问题,实验结果不准确,重做试验。
- D.7 如阳性对照为阴性,则表明扩增标记环节或杂交环节存在问题,实验结果不准确,重做试验。

GB/T 28065—2011

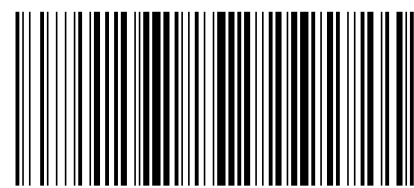


中华人民共和国国家标准

GB/T 28065—2011

地中海实蝇生物芯片检测方法

Biochip detection of *Ceratitis capitata* (Wiedemann)



GB/T 28065-2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44583

定价: 16.00 元

2011-12-30 发布

2012-06-01 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

附录 C
(规范性附录)

荧光标记 PCR 引物、反应体系和阳性质粒序列

C.1 地中海实蝇生物芯片检测荧光标记 PCR 引物(李文芬等 2008)见表 C.1。

表 C.1 地中海实蝇生物芯片检测荧光标记 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'-3')	长度 nt	正/反向	来源基因
P ₃	TTTTAGTTGACTGGCTACATTACATGG	27	正向	COI
P ₅	CTGGAGGGGTATTTTGAAGTCATT	24	反向	

C.2 荧光标记 PCR 反应体系见表 C.2。

表 C.2 荧光标记 PCR 反应体系见表

试剂名称	PCR 反应体系终浓度	杂交信号阳性参考体系 ^a
10×缓冲液(Mg ²⁺)	1.5 mmol/L	1.0 μL
dNTP ^b	0.2 mmol/L	0.2 μL
正向引物 P ₃	0.2 mmol/L	0.2 μL
反向引物 P ₅	0.2 mmol/L	0.2 μL
Taq 酶	1 U	0.15 μL
DNA 模板或阳性质粒	10 ng~20 ng	0.5 μL
去离子水	补足反应总体积到 10 μL	7.75 μL

^a 反应体系中各试剂的量可根据反应体系的总体积进行适当调整。
^b dNTP 配方(以 10 μL 为例):dATP 1 μL, dCTP 1 μL, dGTP 1 μL, dTTP 0.65 μL, 1mM CY3-dCTP 3.5 μL, 去离子水 2.85 μL。

C.3 实蝇芯片阳性质粒序列(扩增长度:235 bp)

TTTTAGTTGACTGGCTACATTACATGGCACGAGGAGTCTGCTACCCGAGAAACCATAT
TCAGAGCGAATCATCTGTGAGCCGTTTCAGTTGGTTGGTCTCAAAAGCCCTTCTGCCAG
AGTGATCTCACTCGTCGAGGCCATCGGCTCTGACGCGATATACGGTTGTGCCGAGTGTC
TAGTTTCAAATGAGGTAGCAGACTCCTCGTGAATGACTTCAAATACCCCTCCAG

注:实蝇芯片阳性质粒载体为 T 载体。

中华人民共和国
国家标准
地中海实蝇生物芯片检测方法

GB/T 28065—2011

*

中国标准出版社出版发行
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)

网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2012 年 4 月第一版 2012 年 4 月第一次印刷

*

书号:155066·1-44583 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

附录 B
(资料性附录)

芯片检测探针点阵图及在基片上布局示意图

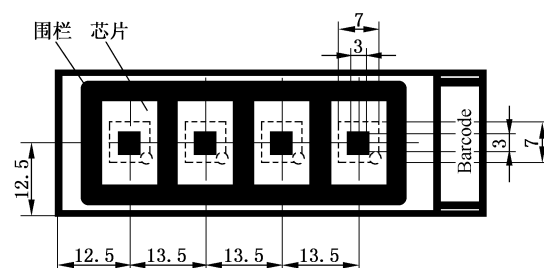
B.1 地中海实蝇芯片检测探针阵列示意图见图 B.1。

A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
A	teph	teph	teph						
A	caco	caco	caco	caro	caro	caro			
A	ccca	ccca	ccca	ccco	ccco	ccco	cpro	cpro	cpro
A	P	P	P	N	N	N	B	B	B

图 B.1 地中海实蝇芯片检测探针阵列示意图

B.2 探针点阵在基片上布局示意图见图 B.2。

单位为毫米



说明：
每张基片有四个探针点阵(小正方形区域)。

图 B.2 探针点阵在基片上布局示意图

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局,本元正阳基因有限公司、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:余道坚、李建光、任鲁风、徐浪、周琦、章桂明、陈枝楠、汪万春、康林、仲建忠、向才玉。