

# 禽流感病毒 RT-PCR 试验方法

## 禽流感病毒 RT-PCR 试验方法（一）

### 1 范围

本标准规定了禽流感病毒型特异性检测技术和禽流感病毒 H5、H7、H9 血凝素亚型及 N1、N2 神经氨酸酶亚型的 RT-PCR 鉴别技术。

本标准适用于检测禽组织、分泌物、排泄物和鸡胚尿囊液中禽流感病毒核酸。

### 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。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术

### 3 实验室条件

3.1 仪器：PCR 仪、台式低温高速离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、手提紫外线灯、紫外凝胶成像仪、微量移液器、水浴箱等。

3.2 从事 RT-PCR 工作的实验室尽可能分区，根据条件划分出 RNA 提取区、基因扩增区、电泳区。特别注意电泳后的琼脂糖凝胶要及时处理，避免对实验室造成污染。

3.3 注意个人防护和环境保护，电泳中用到的 EB 可诱发基因突变，试验中被 EB 污染的物品要有专用收集处，并通过焚烧作无害化处理。

### 4 试剂的准备

#### 4.1 试剂

4.1.1 变性液：见附录 A.1。

4.1.2 2M 醋酸钠溶液(pH4.0)：见附录 A.2。

4.1.3 水饱和酚（pH 4.0）。

4.1.4 氯仿/异戊醇混合液：见附录 A.3。

4.1.5 M-MLV 反转录酶（200u/μL）。

4.1.6 RNA 酶抑制剂(40u/μL)。

4.1.7 Taq DNA 聚合酶(5u/μL)。

4.1.8 1.0% 琼脂糖凝胶：见附录 A.4。

- 4.1.9 50×TAE 缓冲液：见附录 A.5。
- 4.1.10 溴化乙锭(10 μg/μL)：见附录 A.6。
- 4.1.11 加样缓冲液：见附录 A.7。
- 4.1.12 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的灭菌双蒸水：见附录 A.8。
- 4.1.13 5×反转录反应缓冲液（附录 A.9）。
- 4.1.14 2.5mmol dNTPs（附录 A.10）。
- 4.1.15 10×PCR Buffer（附录 A.11）。
- 4.1.16 DNA 分子量标准。
- 4.2 引物：见附录 B。

## 5 操作程序

5.1 样品的采集和处理：按照 GB/T 18936 中提供方法进行。

### 5.2 RNA 的提取

5.2.1 设立阳性、阴性样品对照。

#### 5.2.2 异硫氰酸胍一步法

5.2.2.1 将组织或细胞中加入适量的变性液，匀浆。

5.2.2.2 将混合物移至一管中，按每毫升变性液中立即加入 0.1mL 乙酸钠，1mL 酚，0.2ml 氯仿-异戊醇。加入每种组分后，盖上管盖，倒置混匀。

5.2.2.3 将匀浆剧烈振荡 10sec。冰浴 15min 使核蛋白质复合体彻底裂解。

5.2.2.4 12 000 rpm，4℃离心 20min，将上层含 RNA 的水相移入一新管中。为了降低被处于水相和有机相分界处的 DNA 污染的可能性，不要吸取水相的最下层。

5.2.2.5 加入等体积的异丙醇，充分混匀液体，并在-20℃沉淀 RNA 1h 或更长时间。

5.2.2.6 4℃ 12 000 rpm 离心 10 min，弃上清，再用 75%的乙醇洗涤沉淀，然后离心，再用吸头彻底吸弃上清，在自然条件下干燥沉淀，溶于适量 DEPC 处理的水中。-20℃贮存，备用。

5.2.3 或者选择市售商品化 RNA 提取试剂盒，完成 RNA 的提取。

### 5.3 反转录

5.3.1 取 5 μL RNA，加 1 μL 反转录引物，70℃ 5min。

5.3.2 冰浴 2min。

5.3.3 继续加入：

5×反转录反应缓冲液	4 μL
0.1M DTT	2 μL
2.5mmol dNTPs	2 μL
M-MLV 反转录酶	0.5 μL
RNA 酶抑制剂	0.5 μL
DEPC 水	11 μL

37℃水浴 1h，合成 cDNA 链。取出后可以直接进行 PCR，或者放于-20℃保存备用。试验中同时设立阳性和阴性对照。

### 5.4 PCR

根据扩增目的不同，选择不同的上/下游引物，M-229U/M-229L 是型特异性引物，用于扩增禽流感病毒的 M 基因片段；H5-380U/H5-380L、H7-501U/H7-501L、H9-732U/H9-732L 分别特异性扩增 H5、H7、H9 亚型血凝素基因片段；N1-358U/N1-358L、N2-377U/N2-377L 分别特异性扩增 N1、N2 亚型神经氨酸酶基因片段。

PCR 为 50 μL 体系，包括：

双蒸灭菌水	37.5 μ L
反转录产物	4 μ L
上游引物	0.5 μ L
下游引物	0.5 μ L
10×PCR Buffer	5 μ L
2.5mmol dNTPs	2 μ L
Taq 酶	0.5 μ L

首先加入双蒸灭菌水，然后再按照顺序逐一加入上述成分，每一次要加入到液面下。全部加完后，混悬，瞬时离心，使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入 1 滴液体石蜡(约 20 μ L)。循环参数为 95°C 5 min, 94°C 45 sec, 52°C 45 sec, 72°C 45 sec, 循环 30 次, 72°C 延伸 6 min 结束。设立阳性对照和阴性对照。

## 5.5 电泳

5.5.1 制备 1.0%琼脂糖凝胶板，见附录 A.4。

5.5.2 取 5 μ L PCR 产物与 0.5μL 加样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。

5.5.3 加入分子量标准。

5.5.4 盖好电泳仪，插好电极，5V/cm 电压电泳，30-40min。

5.5.5 在手提紫外线下观察；或者用紫外凝胶成像仪扫描图片存档，打印。

5.5.6 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

## 6 结果判定

6.1 在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时判定结果。

6.2 用 M-229U/M-229L 检测，出现大小为 229bp 扩增片段时，判定为禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

6.3 用 H5-380U/H5-380L 检测，出现大小为 380bp 扩增片段时，判定为 H5 血凝素亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

6.4 用 H7-501U/H7-501L 检测，出现大小为 501bp 扩增片段时，判定为 H7 血凝素亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

6.5 用 H9-732U/H9-732L 检测，出现大小为 732bp 扩增片段时，判定为 H9 血凝素亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

6.6 用 N1-358U/N1-358L 检测，出现大小为 358bp 扩增片段时，判定为 N1 神经氨酸酶亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

6.7 用 N2-377U/N2-377L 检测，出现大小为 377bp 扩增片段时，判定为 N2 神经氨酸酶亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

## 附录 A (规范性附录) 相关试剂的配制

### A.1 变性液

- 4M 异硫氰酸胍
- 25mM 柠檬酸钠.2H<sub>2</sub>O,
- 0.5% (m/V) 十二烷基肌酸钠
- 0.1M β-巯基乙醇

具体配制：将 250g 异硫氰酸胍、0.75M (PH7.0) 柠檬酸钠 17.6ml 和 26.4ml 10% (m/V) 十二烷基肌酸钠溶 293ml 水中。65°C 条件下搅拌、混匀，直至完全溶解。室温条件下保存，每次临用前按每 50ml 变性液加入 14.4 mol/L 的 β-巯基乙醇 0.36ml 的剂量加入。变性液可在室温下避光保存数月。

A.2	2mol/L 醋酸钠溶液(pH4.0)	
	乙酸钠	16.4 g
	冰乙酸	调 pH 至 4.0
	灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.3	氯仿/异戊醇混合液	
	氯仿	49 mL
	异戊醇	1 mL

A.4	1.0%琼脂糖凝胶的配制	
	琼脂糖	1.0 g
	0.5×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

微波炉中完全融化，待冷至 50℃~60℃时，加溴化乙锭（EB）溶液 5μL，摇匀，倒入电泳板上，凝固后取下梳子，备用。

A.5	50×TAE 电泳缓冲液	
A.5.1	0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液 (pH8.0)	
	二水乙二铵四乙酸二钠	18.61 g
	灭菌双蒸水	80 mL
	氢氧化钠	调 pH 至 8.0
	灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.5.2	TAE 电泳缓冲液(50×)配制	
	羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
	冰乙酸	57.1 mL
	0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(Ph8.0)	100 mL
	灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

用时用灭菌双蒸水稀释使用

A.6	溴化乙锭（EB）溶液	
	溴化乙锭	20 mg
	灭菌双蒸水	加至 20 mL

A.7	10×加样缓冲液	
	聚蔗糖	25 g
	灭菌双蒸水	100 mL
	溴酚蓝	0.1 g
	二甲苯青	0.1 g

A.8	DEPC 水	
	超纯水	100 mL
	焦碳酸二乙酯(DEPC)	50 μ L

室温过夜，121℃高压 15min，分装到 1.5 mL DEPC 处理过的微量管中。

A.9	M-MLV 反转录酶5×反应缓冲液	
	1mol Tris-HCl (pH 8.3)	5 mL
	KCl	0.559 g

	MgCl <sub>2</sub>	0.029 g
	DTT	0.154 g
	灭菌双蒸水	加至 100 mL
A.10	2.5mmol/LdNTP	
	DATP(10mmol/L)	20 μL
	DTTP(10mmol/L)	20 μL
	DGTP(10mmol/L)	20 μL
	DCTP(10mmol/L)	20 μL
A.11	10×PCR 缓冲液	
	1M Tris-HCl (pH8.8)	10 mL
	1M KCl	50 mL
	Nonidet P40	0.8 mL
	1.5mol MgCl <sub>2</sub>	1 mL
	灭菌双蒸水	加至 100 mL

附录 B  
(规范性附录)  
禽流感病毒 RT-PCR 试验用引物

C.1 反转录引物

Uni 12: 5' -AGCAAAGCAGG-3' , 引物浓度为 20pmol。

C.2 PCR 引物

见下表, 引物浓度均为 20pmol。

C.2 PCR 过程中选择的引物

引物名称	引物序列	长度(bp)	扩增目的
M-229U	5' -TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'	229	通用引物
M-229L	5' -AAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3'		
H5-380U	5' -AGTGAATTGGAATATGGTAACTG-3'	380	H5
H5-380L	5' -AACTGAGTGTTTCATTTTGTCAAT-3'		
H7-501U	5' -AATGCACARGGAGGAGGAACT-3'	501	H7
H7-501L	5' -TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA-3'		
H9-732U	5' -TCAACAAACTCCACCGAAACTGT-3'	732	H9
H9-732L	5' -TCCCGTAAGAACATGTCCATACCA-3'		
N1-358U	5' -ATTRAATACAAYGGYATAATAAC-3'	358	N1

N1-358L	5' -GTCWCCGAAAACYCCACTGCA-3'		
N2-377U	5' -GTGTGYATAGCATGGTCCAGCTCAAG-3'	377	N2
N2-377L	5' -GAGCCYTTCCARTTGTCTCTGCA-3'		

W = (AT); Y = (CT); R = (AG)。

## 禽流感病毒 RT-PCR 试验方法（二）

### 1 范围

本标准规定了禽流感病毒型特异性检测技术和 H5、H7、H9 血凝素亚型的反转录聚合酶链反应（RT-PCR）鉴别诊断技术。

本标准适用于禽组织、分泌物、排泄物和鸡胚尿囊液中禽流感病毒核酸。

### 2 试剂

- 2.1 变性液(见附录 C.1)
- 2.2 2mol/L 醋酸钠溶液(pH4.0)(见附录 C.2)
- 2.3 酚/氯仿/异戊醇混合液(见附录 C.3)
- 2.4 2.5mmol/L dNTP (见附录 C.4)
- 2.5 10X PCR 缓冲液(见附录 C.5)
- 2.6 溴化乙锭 (EB) 溶液(见附录 C.6)
- 2.7 TAE 电泳缓冲液(见附录 C.7)
- 2.8 2%琼脂糖凝胶(见附录 C.8)
- 2.9 上样缓冲液(见附录 C.9)
- 2.10 10pmol/ $\mu$ L RT-PCR 引物(见附录 D)
- 2.11 其它试剂: 5  $\mu$  Taq DNA 聚合酶, 10  $\mu$  / $\mu$ L AMV 反转录酶, 40  $\mu$  / $\mu$ L, RNA 酶抑制剂, 异丙醇, 70%乙醇。

### 3 实验室条件

3.1 实验室应配备的仪器: 分析天平、台式冷冻高速离心机、真空干燥器、制冰机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪 (或紫外分析仪)、液氮罐或-70℃冰箱、微波炉、组织研磨器、-20℃冰箱、可调移液器 (2  $\mu$ L、20 $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。

3.2 实验室分区: PCR 整个试验分 PCR 反应液配制区——配液区、模板提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。

### 4 操作程序

#### 4.1 样品的采集及处理

4.1.1 样品的采集: 病死或扑杀禽, 取脑、肺等组织; 待检活禽, 用棉拭子蘸取气管分泌物或泄殖腔排泄物, 放于 50%甘油生理盐水中(要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融病料)。

#### 4.1.2 样品的处理

4.1.2.1 组织样品处理: 称取待检病料 0.05g 置研磨器中剪碎并研磨, 加入 600 $\mu$ L 变性液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 300  $\mu$ L, 置 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 100 $\mu$ L 变性液, 混匀。

4.1.2.2 分泌物和排泄物样品处理: 将棉拭子充分捻动、拧干后弃去拭子。4℃ 8 000 rpm 离心 5 min, 取上清 100 $\mu$ L, 置 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 300 $\mu$ L 变性液, 混匀。

4.1.2.3 阳性对照处理: 取禽流感病毒液 100 $\mu$ L, 置 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 300 $\mu$ L 变性液, 混匀。

4. 1. 2. 4 阴性对照处理：取灭菌双蒸水 100 $\mu$ L，置 1.5 mL 灭菌离心管中，加入 300 $\mu$ L 变性液，混匀。

#### 4. 2 病毒 RNA 的提取

4. 2. 1 取已处理的待检样品以及阴性对照、阳性对照，每管依次加入醋酸钠溶液 30  $\mu$ L、酚/氯仿/异戊醇混合液 300 $\mu$ L，颠倒 10 次混匀，冰浴 15 min，4 $^{\circ}$ C 10 000 rpm 离心 15 min。

4. 2. 2 取上清 300 $\mu$ L 置于新的经 DEPC 水处理过的 1.5 mL 灭菌离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，置液氮中 3 min 或-70 $^{\circ}$ C 冰箱 20min。取出样品管，室温融化，4 $^{\circ}$ C 15 000 rpm 离心 20 min。

4. 2. 3 弃上清，沿管壁缓缓滴入 1mL 70%乙醇，轻轻旋转洗一次后倒掉，将离心管倒扣于吸水纸上 1min，真空干燥 15min。

4. 2. 4 用 10  $\mu$ L 无 RNA 酶的灭菌双蒸水和 1  $\mu$ L RNA 酶抑制剂溶解沉淀。 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

#### 4. 3 RT—PCR

##### 4. 3. 1 引物选用

4. 3. 1. 1 型特异性引物用于检测禽流感病毒核蛋白基因（NP）片段。

4. 3. 1. 2 H5 亚型引物用于检测禽流感病毒 H5 亚型血凝素基因（HA）片段。

4. 3. 1. 3 H7 亚型引物用于检测禽流感病毒 H7 亚型血凝素基因（HA）片段。

4. 3. 1. 4 H9 亚型引物用于检测禽流感病毒 H9 亚型血凝素基因（HA）片段。

4. 3. 2 反应体系：本试验为反转录和 PCR 扩增同时进行，反应液总体积为 25 $\mu$ L。

DEPC 处理的灭菌双蒸水	13 $\mu$ L
2.5 mmol/L dNTP	2.5 $\mu$ L
10pmol/ $\mu$ L RT—PCR 引物	1.5 $\mu$ L
15 mmol/L 氯化镁	2 $\mu$ L
10 X PCR 缓冲液	2.5 $\mu$ L
AMV 反转录酶	0.2 $\mu$ L
RNA 酶抑制剂	0.3 $\mu$ L,
5u Taq DNA 聚合酶	1 $\mu$ L
提取的样品 RNA	2 $\mu$ L

混匀并作好标记，加入 20 $\mu$ L 矿物油覆盖，在 PCR 扩增仪上进行以下循环：42 $^{\circ}$ C 45 min，95 $^{\circ}$ C 3min；扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 30s，50 $^{\circ}$ C 40s（用型特异性引物时，为 55 $^{\circ}$ C 40s），72 $^{\circ}$ C 40s，35 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

#### 4. 4 电泳

取 PCR 扩增产物 15 $\mu$ L 与 3 $\mu$ L 上样缓冲液混合，点样于 2%琼脂糖凝胶孔中，以 5 V/cm 电压进行电泳，40min，紫外凝胶成像仪或紫外分析仪上观察结果。

#### 5 结果判定

5. 1 在阳性对照出现相应大小扩增带、阴性对照无带此出现的情况下判定结果。

5. 2 用型特异引物检测被检样品出现 330bp 条带时，判定为禽流感病毒阳性，否则为阴性。

5. 3 用 H5 亚型引物检测被检样品出现 545bp 条带时，判定为 H5 亚型禽流感病毒阳性，否则为阴性。

5. 4 用 H7 亚型引物检测被检样品出现 634bp 条带时，判定为 H7 亚型禽流感病毒阳性，否则为阴性。

5. 5 用 H9 亚型引物检测被检样品出现 488bp 条带时，判定为 H9 亚型禽流感病毒阳性，

否则为阴性。

附录 C  
(规范性附录)  
试剂的配制

<b>C.1</b>	变性液	
	柠檬酸钠	0.764g
	十二烷基肌氨酸钠	0.5g
	$\beta$ -巯基乙醇	0.868mL
	硫氰酸胍	47.28g
	灭菌双蒸水	加至 100mL
<b>C.2</b>	2mol/L 醋酸钠溶液(pH4.0)	
	乙酸钠	16.4g
	冰乙酸	调 pH 至 4.0
	灭菌双蒸水	加至 100mL
<b>C.3</b>	酚/氯仿/异戊醇混合液	
	酸性酚	50mL
	氯仿	49mL
	异戊醇	1mL
<b>C.4</b>	2.5mmol/LdNTP	
	dATP(100mmol/L)	20 $\mu$ L
	dTTP(100mmol/L)	20 $\mu$ L
	dGTP(100mmol/L)	20 $\mu$ L
	dCTP(100mmol/L)	20 $\mu$ L
	灭菌双蒸水	加至 800 $\mu$ L
<b>C.5</b>	10X PCR 缓冲液	
	灭菌双蒸水	70mL
	三羟甲基氨基甲烷(Tris)	0.158g
	氯化钾	0.373g
	曲拉通 X-100	0.1 mL
	盐酸	调 PH 至 9.0
	灭菌双蒸水	加至 100mL
<b>C.6</b>	溴化乙锭 (EB) 溶液	
	溴化乙锭	0.2g
	灭菌双蒸水	加至 20mL
<b>C.7</b>	TAE 电泳缓冲液(50X)	
<b>C.7.1</b>	0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液 (pH8.0)	
	二水乙二铵四乙酸二钠	18.61g
	灭菌双蒸水	80mL
	氢氧化钠	调 pH 至 8.0
	灭菌双蒸水	加至 100mL
<b>C.7.2</b>	TAE 电泳缓冲液(50X)配制	

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)	100mL
灭菌双蒸水	加至 1 000mL
用时用灭菌双蒸水稀释使用	

#### C.8 2%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	4g
TAE 电泳缓冲液(50X)	4mL
灭菌双蒸水	196mL

微波炉中完全融化，加溴化乙锭（EB）溶液 50 $\mu$ L。

#### C.9 上样缓冲液

溴酚蓝 0.2g，加双蒸水 10mL 过夜溶解。50g 蔗糖加入 50mL 水溶解后，移入已溶解的溴酚蓝溶液中，摇匀定容至 100mL。

### 附录 D

（规范性附录）

#### 禽流感病毒 RT-PCR 试验用引物

##### D. 1 10 pmol/ $\mu$ L 型特异性引物配制：

2 OD 的上游型特异性引物加灭菌双蒸水至 462 $\mu$ L， 2 OD 的下游特异性型引物加灭菌双蒸水至 445 $\mu$ L。使用时 2 种引物等体积混匀即可。

##### D. 2 10 pmol/ $\mu$ L H5 亚型引物配制：

2 OD 的上游 H5 亚型引物加灭菌双蒸水至 494 $\mu$ L， 2 OD 的下游 H5 亚型引物加灭菌双蒸水至 484 $\mu$ L。使用时 2 种引物等体积混匀即可。

##### D. 3 10 pmol/ $\mu$ L H7 亚型引物配制：

2 OD 的上游 H7 亚型引物加灭菌双蒸水至 487 $\mu$ L， 2 OD 的下游 H7 亚型引物加灭菌双蒸水至 488 $\mu$ L。使用时 2 种引物等体积混匀即可。

##### D. 4 10 pmol/ $\mu$ L H9 亚型引物配制：

3 OD 的上游 H9 亚型引物加灭菌双蒸水至 492 $\mu$ L， 2 OD 的下游 H9 亚型引物加灭菌双蒸水至 516 $\mu$ L。使用时 2 种引物等体积混匀即可。

引物名称	序列	扩增片段大小	扩增片段位置	用途
上游型特异性引物:	5'-CAGRTACTGGGCHATAAGRAC-3'	330bp	核蛋白基因	禽流感病毒
下游型特异性引物:	5'-GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG-3'		1200~1529	型鉴定
上游 H5 亚型引物:	5'-ACACATGCYCARGACATACT-3'	545bp	血凝素基因	禽流感病毒
下游 H5 亚型引物:	5'-CTYTGRITTYAGTGTTGATGT-3'		155~699	H5 亚型鉴定
上游 H7 亚型引物:	5'-GGGATACAAAATGAAYACTC-3'	634bp	血凝素基因	禽流感病毒
下游 H7 亚型引物:	5'-CCATABARYYTRGTCTGYTC-3'		12~645	H7 亚型鉴定
上游 H9 亚型引物:	5'-CTCCACACAGAGCAYAATGG-3'	488bp	血凝素基因	禽流感病毒
下游 H9 亚型引物:	5'-GYACACTTGTGTTGTRTC-3'		151~638	H9 亚型鉴定

Y=C/T R=A/G H=A/C/T B=G/C/T



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市宜山路 705 号 B 座 18 楼

邮编：200233

联系：市场部

电话：64858053 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn