

ICS 65.150

CCS B 50

T/GDSF

广东水产学会团体标准

T/GDSF 0003—2023

罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法

Duplex Real-time PCR Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* and
Streptococcus iniae in Tilapia

2023 - 9 - 4 发布

2023 - 9 - 5 实施

广东水产学会 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 试剂和耗材	1
5.1 试剂	1
5.2 引物和探针	1
6 仪器设备	2
7 样品采集与处理	2
7.1 样品采集	2
7.1.1 采样工具	2
7.1.2 待检样本	2
7.1.3 样品运输	2
7.2 样品前处理	2
7.2.1 池塘水样品前处理	2
7.2.2 环境拭子前处理	2
7.2.3 细菌培养物	2
7.2.4 组织样品前处理	2
8 操作方法	2
8.1 DNA 提取	3
8.2 反应体系的配制	3
8.3 加样	3
8.4 荧光 PCR 反应	3
8.4.1 上机	3
8.4.2 循环条件设置	3
8.4.3 荧光通道设定	3
9 结果判定	3
9.1 阈值设定	3
9.2 质控标准	3
9.3 结果描述及判定	3
附录 A (规范性) 溶液配置	5
A.1 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 溶液的配置	5
A.2 阳性对照	5
A.3 阴性对照	5
附录 B (规范性) 引物、探针的名称、序列和工作浓度	6

B.1 引物、探针的名称、序列和工作浓度	6
附 录 C （规范性） DNA 提取试剂盒方法	7
C.1 DNA 提取方法.....	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东水产学会提出并归口。

本文件起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、广东加和检测技术服务有限公司、广东加和生物技术有限公司、广东海大畜牧兽医研究院有限公司、东莞市石排镇农业技术服务中心。

本文件主要起草人：张险朋、李敏、李小军、吴胜旭、李中圣、胡毅军、袁玲、萧广勇、王伟强、丁文桂、李永福、伍建敏、王自强、黄育浩、龙海鹰、邓海燕、李本旺。

罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了同时检测罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌的双重荧光PCR检测方法。

本文件适用于罗非鱼组织样品、鱼苗、细菌培养物、养殖池塘水、环境等样品中罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

Ct值: 阈值循环数 (Cycle threshold)。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)。

F: 上游引物 (Forward primer)。

R: 下游引物 (Reverse primer)。

P: 探针 (Probe)。

BHQ: 黑洞淬灭剂 (Black Hole Quencher)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

HEX: 5-羟基四氢呋喃并[2,3-a:6,7-a']二咪唑-3-羧酸 (5-Hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 二级水的要求。

5.1.2 PBS (pH 7.2) 配制方法按照附录 A 中 A.1。

5.1.3 阳性对照分别采用无乳链球菌和海豚链球菌标准菌株，配制方法按照附录 A 中 A.2。

5.1.4 阴性对照为灭菌生理盐水，配制方法按照附录 A 中 A.3

5.1.5 PCR 预混液 (包含 5×PCR buffer、Mg²⁺、dNTP)。

5.1.6 Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)。

5.1.7 DNA 提取试剂盒。

5.2 引物和探针

荧光PCR扩增上、下游引物和探针序列参见附录B.1。

6 仪器设备

- 6.1 荧光 PCR 仪。
- 6.2 移液器（量程：0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、100 μL ~1 000 μL ）。
- 6.3 生物样品均质器。
- 6.4 冷冻高速离心机。
- 6.5 II 级生物安全柜。
- 6.6 高压灭菌器。
- 6.7 pH 计。

7 样品采集与处理

采样及样品前处理过程须戴一次性手套，样品不得交叉污染。实验室生物安全符合 GB 19489 规定。

7.1 样品采集

7.1.1 采样工具

剪刀、镊子、1.5 mL离心管、研磨管等采样工具经过 121 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)，高压灭菌 15 min，冷却后，烘干，备用。采样瓶使用前用 5% HCl 溶液浸泡 1 h 以上，0.2 μm 滤膜过滤的双蒸去离子水清洗，密闭包装后置高压灭菌锅，121 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)，高压灭菌 20 min，冷却后，烘干，备用。

7.1.2 待检样本

待检样本可包括罗非鱼及其变种鱼类，养殖池塘水、环境拭子。罗非鱼及其变种鱼类：用 75%酒精棉球对样品体表进行擦拭消毒后，无菌操作取脑、肾脏、肝脏、脾脏等器官组织（采样数量、个体要求等应符合 SC/T 7014 的规定）。养殖池塘水：取待检水样 50 mL 于灭菌的采样瓶中。环境拭子：采集环境拭子时，将拭子来回刮 2 次~3 次。

7.1.3 样品运输

应符合 SC/T 7103 的规定。

7.2 样品前处理

7.2.1 池塘水样品前处理

取水样 1 mL，10 000 r/min 离心 1 min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.2.2 环境拭子前处理

每支拭子加入 1 mL PBS 溶液，充分震荡混匀，10 000 r/min 离心 1 min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.2.3 细菌培养物

取细菌培养液 1 mL，10 000 r/min 离心 1 min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取可疑菌落，加入 1 mL PBS 溶液，充分震荡混匀，10 000 r/min 离心 1 min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.2.4 组织样品前处理

样品放入 2 mL 研磨管中，加入 1 mL PBS 溶液，放入生物样品均质器 7 000 r/min 匀浆 3 次，每次 20 s，每次间隔 20 s 进行匀浆，瞬时离心后获组织匀浆液，取 200 μL 可直接用于核酸提取或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

DNA提取过程详见附录 C，也可采用其他等效的DNA提取方法。

8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表 1，总体积为 20 μL 。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡。反应体系试剂可采用等效效果的商品化试剂盒。

表1 每个双重荧光 PCR 反应体系配制表

反应体系组分	用量 (μL)
PCR预混液	7.00
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL)	0.60
F1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.50
R1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.50
P1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.80
F2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.50
R2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.50
P2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.40
ddH ₂ O	9.20
合计	20.00

8.3 加样

在各设定的荧光PCR管中分别加入8.1提取的DNA溶液 5 μL ，盖紧管后瞬时离心，上机前应检查管盖是否盖紧。

8.4 荧光 PCR 反应

8.4.1 上机

将8.3中加样后的反应管放入荧光PCR仪中，记录样品放置顺序。

8.4.2 循环条件设置

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性，3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s，53 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s(收集荧光信号)，45个循环。

8.4.3 荧光通道设定

海豚链球菌为探针5' 端标记报告荧光基团HEX，3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1；无乳链球菌为探针5' 端标记报告荧光基团FAM，3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值设定以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为原则。不同仪器可根据仪器特性进行调整。

9.2 质控标准

阳性对照FAM和HEX通道的Ct值 \leq 30.0，并出现典型的“S”型扩增曲线；阴性对照FAM和HEX通道均无Ct值，或无典型扩增曲线。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 无 Ct 值或无典型“S”型扩增曲线，判为无乳链球菌和海豚链球菌核酸阴性。

9.3.2 两个通道同时出现典型“S”型扩增曲线，且 FAM 通道 Ct 值 \leq 37、HEX 通道 Ct 值 \leq 34，表示样品中同时存在无乳链球菌和海豚链球菌核酸。

9.3.3 FAM 通道 Ct 值 \leq 37，且有典型“S”型扩增曲线，判为无乳链球菌核酸阳性。

9.3.4 HEX 通道 Ct 值 \leq 34, 且有典型“S”型扩增曲线, 判为海豚链球菌核酸阳性。

9.3.5 FAM 通道 $37 < \text{Ct 值} < 40$ 且有典型“S”型扩增曲线, 判为可疑。可疑样品应重新检测, 若重新检测结果无特异性扩增曲线或无 Ct 值或大于 40 则为无乳链球菌核酸阴性, 若 Ct 值 \leq 40 且有典型“S”型扩增曲线则判为无乳链球菌核酸阳性。

9.3.6 HEX 通道 $34 < \text{Ct 值} < 40$ 且有典型“S”型扩增曲线, 判为可疑。可疑样品应重新检测, 若重新检测结果无特异性扩增曲线或无 Ct 值或大于 40 则为海豚链球菌核酸阴性, 若 Ct 值 \leq 40 且有典型“S”型扩增曲线则判为海豚链球菌核酸阳性。

附录 A (规范性) 溶液配置

A.1 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 溶液的配置

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2 g, 氯化钠 (NaCl) 8 g, 加二级水定容至 1 000 mL, 完全溶解后用 3 mol/L NaOH 调 pH 为 7.2 经 121 °C (± 2 °C), 高压灭菌 15 min, 室温保存。

A.2 阳性对照

将海豚链球菌和无乳链球菌标准菌株分别接种于灭菌的 THB 和 BHI 液体培养基, 210 r/min、36 °C 摇床培养 20 h 后进行细菌平板计数, 配成海豚链球菌菌液浓度为 3 000 CFU/mL (± 10 CFU/mL), 无乳链球菌为 1 000 CFU/mL (± 10 CFU/mL)。用体积分数为 0.5% 的甲醛溶液于 28 °C 条件下灭活 48 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将菌液洗涤 3 次, 混匀, 分装至 1 mL 冻存管保存, 于 -20 °C 冰箱保存备用。

A.3 阴性对照

为灭菌生理盐水: 称取 0.9 g 氯化钠, 溶解在少量蒸馏水后, 定容至 100 mL, 121 °C (± 2 °C), 高压灭菌 15 min 后作为阴性对照使用。

附 录 B

(规范性)

引物、探针的名称、序列和工作浓度

B.1 引物、探针的名称、序列和工作浓度

表B.1列出了荧光PCR引物、探针信息和工作浓度。

表B.1 引物、探针的名称、序列和浓度

名称	序列 (5'—3')	工作浓度 (μmol/L)
海豚链球菌F1	GTGTAGCCGTCTAAACCAATCA	10
海豚链球菌R1	AGAAGAGATGAAAGCACAGATG	10
海豚链球菌P1	HEX-CGCACGGTCACTAACGACAATGGAT-BHQ1	10
无乳链球菌F2	AGTTTCTCTCAATACAATTCGGA	10
无乳链球菌R2	AGAAGAATATGTCTTCATTGGCG	10
无乳链球菌P2	FAM-ATGACACCAGAAGCAGCAACAACGAT-BHQ1	10

附 录 C
(规范性)
DNA 提取试剂盒方法

C.1 DNA 提取方法

- C.1.1 将经过处理的样品、阳性对照和阴性对照直接加入 200 μL 缓冲液GA, 涡旋震荡 15 s。
 - C.1.2 加入 20 μL 蛋白酶K, 涡旋混匀, 瞬时离心, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 直至组织完全溶解, 瞬时离心。
 - C.1.3 加入 200 μL 缓冲液GB, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 瞬时离心。
 - C.1.4 加入 200 μL 无水乙醇, 充分颠倒混匀, 瞬时离心。
 - C.1.5 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入个吸附柱中, 12 000 r/min离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - C.1.6 向吸附柱内加入 500 μL 缓冲液GD, 12 000 r/min离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - C.1.7 向吸附柱内加入 600 μL 缓冲液PW, 12 000 r/min离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱放回收集管中。重复操作上一步骤。
 - C.1.8 将吸附柱放回收集管中, 12 000 r/min离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱置于室温放置 2 min, 晾干吸附材料中残余的漂洗液。
 - C.1.9 将吸附柱放入一个灭菌的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μL ~200 μL 洗脱缓冲液, 室温放置 2 min~5 min, 12 000 r/min离心 2 min, 将溶液收集到离心管中, 直接检测或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
-