

ICS 65.150

CCS B 50

T/GDSF

广东水产学会团体标准

T/GDSF XXXX—XXXX

花鲈苗种质量检验技术规范

Specification for examination of quality inspection for seedings of spotted sea bass

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广东水产学会 发布

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这些专利的责任。

本文件由中国水产科学研究院南海水产研究所提出。

本文件由广东水产学会归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院南海水产研究所、广东省农业技术推广中心、珠海粤顺水产养殖有限公司、饶平县万佳水产有限公司、饶平县少华水产科技有限公司、广东丰滋农业科技有限公司。

本文件主要起草人：王鹏飞、邱丽华、赵超，冯娟、张博¹、张博²、闫路路、姜志勇、吴郁丽、杨铿、张晓阳、郑镇雄、郑少华、赵艳飞、李庆。

注：张博¹与张博²同名，张博¹1987年10月出生，张博²1987年12月出生。

花鲈苗种质量检验技术规范

1 范围

本文件规定了花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 苗种质量要求、检验方法、检验规则、判定规则等内容。

本文件适用于花鲈苗种的质量检验。

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/T 15805 鱼类检疫方法

GB/T 18654.3 养殖鱼类种质检验 第3部分：性状测定

GB/T 22213 水产养殖术语

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

GB/T 22213 界定的术语和定义适用于本文件。

4 质量要求

4.1 外观

体形正常，鳍条完整；体色正常，呈青灰色，不发黑；体表光滑有粘液；规格整齐；集群，游动活泼，对外界刺激反应灵敏。

4.2 可量指标

全长 ≥ 30 mm，体重 ≥ 0.40 g。

4.3 可数指标

全长合格率 $\geq 95\%$ ，体重合格率 $\geq 95\%$ ，伤残率 $\leq 3\%$ ，畸形率 $\leq 1\%$ 。

4.4 疫病

不携带病毒性神经坏死病毒及真鲷虹彩病毒。

5 检验方法

5.1 外观检验

在光线充足环境下，肉眼逐项观察体形、体色、活力等指标。

5.2 可量指标

按照GB/T 18654.3 规定的方法测量全长和体重。

5.3 可数指标

5.3.1 全长、体重合格率检验

抽样后计算出全长 ≥ 30 mm 的个体数占抽样样品总数的百分比；计算出体重 ≥ 0.40 g 的个体数占抽样样品总数的百分比。

5.3.2 畸形、伤残率检验

抽样后用肉眼或与显微镜检查相结合进行观察，分别计算出畸形、伤残的个体数占样品总数的百分比。

5.4 疫病检验

按照SC/T 7103的方法进行采样。采用PCR方法检测花鲈苗种是否携带病毒性神经坏死病毒，详见附录A和附录B。采用PCR方法检测花鲈苗种是否携带真鲷虹彩病毒，详见附录C和附录D。

6 检验规则

6.1 组批规则

以同一培育池、同一规格或一次交货的苗种作为一个检验批次，销售前按批抽检。每一检验批应抽取三个以上的样品进行检验，取其平均数为检测值。

6.2 抽样方法

抽样时应选择能代表整批苗种群体水平的样品，随机抽取。每个样品的抽样量应不少于 150 尾。

7 判定规则

在疫病检验项中有一项或一项以上检验不合格的，则判定该批苗种为不合格，不得复检。其他项目有指标不合格的，对原批检验批进行此项指标复检，以复检结果为准；复检仍不合格的，则判定该批苗种不合格。

附录 A
(规范性)
花鲈苗种神经坏死病毒 (NNV) 巢式 PCR 检测方法

A.1 样品采集、RNA 提取及逆转录

采取花鲈苗种脑组织，保存于液氮或RNAStore保存液。采用商品化RNA提取试剂或RNA提取试剂盒进行脑组织RNA提取。采用商品化cDNA合成试剂盒将提取的脑组织RNA逆转录为cDNA，用于PCR扩增。无症状的鱼最多15尾为1个样品，有症状的鱼每1尾为1个样品。

A.2 巢式 PCR 引物

引物NNV-F1和 NNV-R1是第一轮PCR引物，目的产物大小为 1017 bp；引物NNV - F2和NNV - R2是第二轮PCR引物，目的产物大小为 777 bp。序列如下：

NNV-F1: 5' -ATGGTACGCAAAGGTGAGAAG-3'
 NNV-R1: 5' -TTAGTTTTCCGAGTCAACCCTG-3'
 NNV-F2: 5' -AGCCGGGACAGGAACAGAC-3'
 NNV-R2: 5' -CCAACAGGCAGCAGGATTT-3'

A.3 巢式 PCR 扩增

A.3.1 设置对照

在PCR扩增过程中，应设立阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为从确定感染NNV的病鱼组织中提取的RNA所逆转录的cDNA、或纯化的NNV RNA所逆转录的cDNA；阴性对照为从未感染NNV的健康鱼组织中提取的RNA所逆转录的cDNA；空白对照为DEPC处理水。

A.3.2 PCR扩增

反应体系为 25 μ L，每个反应体系包括 0.25 μ L *Taq* DNA聚合酶 (5 U/ μ L)；各 1.0 μ L (10 μ mol/L) 的正向引物 (NNV-F1或者NNV-F2) 和反向引物 (NNV-R1或者NNV-R2)；1.0 μ L DNA模板 (20 ng/ μ L)；2.0 μ L dNTP Mix (2.5 mol/L)，2.5 μ L 10 \times PCR缓冲液[含Mg²⁺]，加灭菌蒸馏水至25 μ L。

将转录好的NNV cDNA进行第一轮PCR扩增，程序为：95 $^{\circ}$ C 5 min，98 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 65 s，35个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。将一扩产物作为模板进行第二轮扩增，扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 5 min；98 $^{\circ}$ C 10 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 45 s，35个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。一扩和二扩PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后，在紫外检测仪下观察结果。

A.4 结果判定

阳性对照满足第一轮PCR扩增在1017 bp附近有特异性目的条带或第二轮PCR扩增在777 bp附近有特异性目的条带，同时阴性对照和空白对照均无上述特异性目的条带，实验有效；否则实验无效，应重新进行实验。

样品的第一轮PCR扩增在1017 bp附近有特异性目的条带，或第二轮PCR扩增在777 bp附近有特异性目的条带，且扩增产物序列测定结果符合神经坏死病毒的序列（见附录B），判定检测结果为阳性。

样品的第一轮PCR扩增在1017 bp附近无特异性目的条带，且第二轮PCR扩增在777 bp附近无特异性目的条带，判定检测结果为阴性。

附 录 B

(规范性)

引物NNV-F1和NNV-R1扩增的花鲈NNV基因组的序列 (1017 bp)

1 ATGGTACGCA AAGGTGAGAA GAAATTGGCA AAACCCGCGA CCACCAAGGC CGCGAATCCG
 61 CAACCCCGCC GACGTGCTAA CAATCGTCGG CGTAGTAACC GCACTGACGC ACCTGTGTCA
 121 AAGGCCTCGA CTGTGACCGG ATTTGGACGT GGGACCAATG ACGTCCATCT CTCAGGTATG
 181 TCGAGAATCT CCCAGGCCGT CCTCCCAGCC GGGACAGGAA CAGACGGATA CGTTGTTGTT
 241 GACGCAACCA TCGTCCCCGA CCTCCTGCCA CGACTGGGAC ACGCTGCTAG AATCTTCCAG
 301 CGATACGCTG TTGAAACACT GGAGTTTAA ATTCAGCCAA TGTGCCCCGC AAACACGGGC
 361 GGTGGTTACG TTGCTGGCTT CTGCCTGAT CCAACTGACA ACGACCACAC CTTGACGCGG
 421 CTTCAAGCAA CTCGTGGTGC AGTCGTTGCC AAATGGTGGG AAAGCAGAAC AGTCCGACCC
 481 CAGTACACCC GCACGCTCCT CTGGACCTCG TCGGGAAAGG AGCAGCGTCT CATGTCACCT
 541 GGTGCGCTGA TACTCCTGTG TGTCGGCAAC AACACTGATG TGGTCAACGT GTCAGTACTG
 601 TGTCGCTGGA GTGTTCGACT GAGCGTTCCA TCTCTTGAGA CACCTGAGGA GACAACCGCT
 661 CCCATCATGA CACAAGGTTT CCTGTACAAC GATTCCCTTT CCACAAATGA CTTCAAGTCC
 721 ATCCTCCTAG GATCCACACC ACTGGACATT GCCCCTGATG GAGCAGTCTT CCAGCTGGAC
 781 CGTCCGCTGT CCATTGACTA CAGCCTTGGG ACTGGAGATG TTGATCGAGC TGTCTATTGG
 841 CACCTCAAGA AGTTTGTCTG AAATGCTGGC ACACCTGCAG GCTGGTTTCG CTGGGGCATC
 901 TGGGACAAC TCAACAAGAC GTTACAGAT GCGGTTGCCT ACTACTCTGA TGAGCAGCCC
 961 CGTCAAATCC TGCTGCCTGT TGGCACTGTC TGCACCAGGG TTGACTCGGA AAATAA

引物NNV-F2和NNV-R2扩增的花鲈NNV基因组的序列 (777 bp)

1 AGCCGGGACA GGAACAGACG GATACGTTGT TGTTGACGCA ACCATCGTCC CCGACCTCCT
 61 GCCACGACTG GGACACGCTG CTAGAATCTT CCAGCGATAC GCTGTTGAAA CACTGGAGTT
 121 TGAAATTCAG CCAATGTGCC CCGCAAACAC GGGCGGTGGT TACGTTGCTG GCTTCCTGCC
 181 TGATCCAAC TACAACGACC ACACCTTCGA CGCGCTTCAA GCAACTCGTG GTGCAGTCGT
 241 TGCCAAATGG TGGGAAAGCA GAACAGTCCG ACCCCAGTAC ACCCGCACGC TCCTCTGGAC
 301 CTCGTCGGGA AAGGAGCAGC GTCTCATGTC ACCTGGTCGG CTGATACTCC TGTGTGTCGG
 361 CAACAACACT GATGTGGTCA ACGTGTGAGT ACTGTGTCGC TGGAGTGTTT GACTGAGCGT
 421 TCCATCTCTT GAGACACCTG AGGAGACAAC CGTCCCATC ATGACACAAG GTTCCCTGTA
 481 CAACGATTCC CTTTCCACAA ATGACTTCAA GTCCATCCTC CTAGGATCCA CACCACTGGA
 541 CATTGCCCCT GATGGAGCAG TCTTCCAGCT GGACCGTCCG CTGTCCATTG ACTACAGCCT
 601 TGGAACGGA GATGTTGATC GAGCTGTCTA TTGGCACCTC AAGAAGTTT CTGGAAATGC
 661 TGGCACACCT GCAGGCTGGT TTCGCTGGGG CATCTGGGAC AACTTCAACA AGACGTTTAC
 721 AGATGGCGTT GCCTACTACT CTGATGAGCA GCCCCGTCAA ATCCTGCTGC CTGTTGG

附 录 C
(规范性)
花鲈苗种真鲷虹彩病毒 (RSIV) 普通 PCR 检测方法

C.1 样品采集及 DNA 提取

采取花鲈苗种脾和肾保存于无水乙醇。组织用PBS清洗, 剪碎并用10%蛋白酶K消化后, 按照酚-氯仿抽提法或者使用试剂盒进行总DNA的提取。无症状的鱼最多15尾为1个样品, 有症状的鱼每1尾为1个样品。

C.2 引物序列

引物IV-F1和 IV-R1是第一轮PCR引物, 目的产物大小为570 bp; 引物IV-F2和IV-R2是第二轮PCR引物, 目的产物大小为 567 bp。序列如下:

IV-F1: 5' -CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'

IV-R1: 5' -GCACCAACACATCTCCTATC-3'

IV-F2: 5' -CGGGGGCAATGACGACTACA-3'

IV-R2: 5' -CCGCCTGTGCCTTTTCTGGA-3'

C.3 PCR 扩增

C.3.1 设置对照

在PCR扩增过程中, 应设立阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为从确定感染RSIV的病鱼组织中提取的DNA、或纯化的RSIV DNA; 阴性对照为从未感染RSIV的健康鱼组织中提取的DNA; 空白对照为DRPC处理水。

反应体系为25 μ L, 每个反应体系包括0.25 μ L *Taq* DNA聚合酶 (5 U/ μ L); 各1.0 μ L (10 μ mol/L) 的正向引物 (IV-F1或者IV-F2) 和反向引物 (IV-R1或者IV-R2); 1.0 μ L DNA (20 ng/ μ L); 2.0 μ L dNTP Mix (2.5 mol/L), 2.5 μ L 10 \times PCR缓冲液[含Mg²⁺], 加灭菌蒸馏水至 25 μ L。

将提取好的组织DNA同时用引物对IV-F1/R1和IV-F2/R2进行PCR扩增, 程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C保存。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外检测仪下观察结果。

C.4 结果判定

阳性对照PCR扩增在570 bp附近有特异性目的条带, 同时阴性对照和空白对照均无上述特异性目的条带, 实验有效; 否则实验无效, 应重新进行实验。

样品使用引物对IV-F1/R1的PCR扩增在570 bp附近有特异性目的条带, 且使用引物对IV-F2/R2的PCR扩增在567 bp附近有特异性目的条带, 判定检测结果为样品携带RSIV。

样品使用引物对IV-F1/R1的PCR扩增在570 bp附近有特异性目的条带, 但使用引物对IV-F2/R2的PCR扩增在567 bp附近无特异性目的条带, 判定检测结果样品携带传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV), 而非携带RSIV。IV-F1/R1及IV-F2/R2扩增的序列参见附录D。

样品的PCR扩增在570 bp附近无特异性目的条带, 判定检测结果为阴性。

附 录 D
(规范性)

引物 IV-F1 和 IV-R1 扩增花鲈 RSIV 基因组的序列 (570 bp)

1	CTCAAACACT	CTGGCTCATC	TATGTCATCG	TAGTCGTCCA	TTCCGCTGCC	CCCATCGTCA
61	AGCAGTGTAG	GCGGTGGAGT	AACATTATCG	GLGTCTGTTG	GCAGCTCACA	TGAGACACCT
121	ACACAAGGCT	GACTGTCAGA	TGAGATGCGG	CLGGCGTGGC	ATGTGACGGT	CTGCACAGGG
181	TGAGGTTTCA	GCTTGATGAC	AGACAAGATG	GTACCGTCAT	ACAGCACCAC	TCCATGCTTC
241	AGGACTTCAC	TGCTGTTGCG	GCCTACATGG	ACCACCTCGC	CATGTACAAC	ATGCTCCGCC
301	AAGAGGCTGT	TGCTGTCGCT	TGACCAAACA	ATCTTCACAT	CCGTCTCTCG	AGGTACCCCG
361	CAGCTGAGGG	TGGTCGCTCTG	GTTGTCGATT	TCCAGGTTAT	AGAAGGTGGT	GCCGTGAGTA
421	CACGCCACAG	TCAGCAACAG	AAGAAGTAGC	AGGGTCGCCA	TTGCTCATGT	AGCTATGATT
481	CACAGTAGTC	ACCTATGACA	TGAGGATATT	CAAAATTTTT	ATACAAGTAA	AAGATGTTCA
541	CTGTGCTTGA	GATAGGAGAT	GTGTTGGTGC			

引物 IV-F2 和 IV-R2 扩增花鲈 RSIV 基因组的序列 (567 bp)

1	CGGGGGCAAT	GACGACTACA	TACTGCGGCC	GCAAGCTGAT	TGAGAAAAGCC	GCTCATCTCC
61	TCAAGACGGT	GGTGGGCGCT	ACCATTTGTT	ACGGCGACAC	CGACTCATGC	TACATACAGC
121	TGGGCCACGA	CCGCGCATCA	CTCGATGAAC	TGTGGCAGAT	GGCTGTAAAC	GCCAGTGACA
181	CTGTGTCGGC	CTTCTTTGAG	CGCCCGGTGC	GCCTCGAGTT	TGAGCAGTGC	ATCTACACCA
241	AGTTCATCAT	CTTCACCAAG	AAACGTTATG	TGTACAGGGC	ATTCACACGC	GACGGCAAGC
301	AGCGAACAGG	CAGCAAGGGT	GTCATGTTGT	CCAGACGTGA	CAGCGCCATG	TGTGCCAGAA
361	ACACGTATGC	AGCAATCATG	AGTGCAATCC	TTGAGGGGTC	TGCAGATGTG	CCATTCATTG
421	CTGTGCGCAT	GATGCACGAC	ATGATGATAC	CGGGAGCGCT	TCAAGATGAC	GACTTTGTGC
481	TGACAAAGAG	TGTGCAGGAT	ATCGGCAATG	GGGACGACAA	CAACCACGGC	TCGTACAAAG
541	TTAGGAATCC	ACAAAAGGCA	CAGGCGG			