

广东水产学会团体标准

《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法》

编制说明

东莞市动物疫病预防控制中心

《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法》

编制说明

一、立项来由

《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌的双重荧光 PCR 检测方法》是东莞市动物疫病预防控制中心承担的 2021 年省乡村振兴战略专项资金（“大专项+任务清单”）项目——《东莞市淡水鱼主要疫病流行情况调查及防控措施研究》（20211800400112）的研究内容之一，在项目实施过程中，发现目前尚无有关于罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌的双重荧光 PCR 检测方法的标准。因此，根据团体标准的要求，特制定本标准。

二、立项的必要性，拟解决的问题

无乳链球菌和海豚链球菌是罗非鱼的主要致病菌，所引发的罗非鱼链球菌病死亡率可达 50%。同时无乳链球菌和海豚链球菌也会危害人类及 20 多种易感动物，给全球养殖业带来巨大经济损失。目前，针对罗非鱼链球菌的控制策略和人兽共患风险不同，且临床体征相似，准确及时检测两种链球菌，对于预警和解决水产养殖中的链球菌病至关重要。

传统上，无乳链球菌和海豚链球菌的检测是基于病原分离和生理生化特征鉴定，然而使用快速生化鉴定盒和自动化设备时，因两者之间表型相似可能导致被错误识别，且检测时间长，至少需要 2 天。随着研究进展，基于分子生物学和血清学检测的新方法也在不断被提出及应用。为解决罗非鱼感染无乳链球菌和海豚链球菌临床体征相似，

且通常存在于同一地理区域，但防控策略又不同的问题，建立可同时检测罗非鱼无乳链球菌、海豚链球菌，且敏感性高、可定量的双重荧光 PCR 检测方法尤为重要。

三、标准框架的确定和编写原则

（一）框架的确定

根据罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法的技术经验，结合标准撰写格式确定标准的框架为适用范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、仪器设备、试剂和耗材、采样与前处理、样品及细菌核酸的提取、荧光 PCR 检测、结果判定。

（二）标准的编写原则

1. 标准引用

检测样品的采集和用水方面引用了已经发布的国家标准 GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》、GB 19489 《实验室生物安全通用要求》、水产行业标准 SC/T 7014-2006 《水生动物检疫实验技术规范》、SC/T 7013-2008 《水生动物产地检疫采样技术规范》。

2. 实际科研和检测工作经验

标准编写人员为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，多年来一直从事罗非鱼的流行病学研究和疫病防控工作，在本标准的编写过程中，结合实验室的实际工作经验，对实验操作的具体细节进行编写。

四、主要试验或验证的分析

1. 引物、探针的设计

根据 GenBank 收录的众多鱼源无乳链球菌菌株全基因组和鱼源海豚链球菌菌株，利用 NCBI 网站分别筛选保守基因序列，即无乳链球菌 *LysM* 肽聚糖结合结构域蛋白质编码基因组中 *Sip* 基因序列片段和海豚链球菌 *LysR* 家族转录调节基因序列片段，使用 Primer Premier6.0 软件分别设计特异性引物和探针，详见表 1。

表 1 海豚链球菌和无乳链球菌的引物、探针序列

海豚链球菌		
引物、探针名称	序列	工作浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
F1	GTGTAGCCGTCTAAACCAATCA	50
R1	AGAAGAGATGAAAGCACAGATG	50
P1	CGCACGGTCACTAACGACAATGGAT	50
无乳链球菌		
引物、探针名称	序列	
F2	AGTTTCTCTCAATACAATTTTCGGA	50
R2	AGAAGAATATGTCTTCATTGGCG	50
P2	AGCTAAAGTAGCACCGGT	50

注：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。

2. 标准菌株的来源、制备

2.1 标准菌株的来源

2.1.1 罗非鱼无乳链球菌菌株，编号 DG210721，由东莞市动物疫病预防控制中心分离鉴定。

2.1.2 罗非鱼海豚链球菌标准菌株，编号 ATCC29178，来源于美国模式培养物集存库。

2.2 标准菌株的制备

将无乳链球菌和海豚链球菌的标准菌株接种于灭菌的 BHI、

THB 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。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-80 °C 冰箱保存备用。

3. 罗非鱼组织样品和细菌核酸提取

按照广州达安基因股份有限公司《核酸提取或纯化说明书》（磁珠法）操作提取核酸。依次取 200 μ L 菌液或样品和 20 μ L 蛋白酶 K，加入提取板，放入核酸提取仪，程序运行结束后，将核酸转移至灭菌的离心管中，于-80°C 冰箱保存备用。

4. 反应条件优化

根据荧光强度、荧光曲线及 Ct 值筛选最优引物、探针浓度及退火温度。

4.1 反应条件的优化方案、结果

详见图 1。

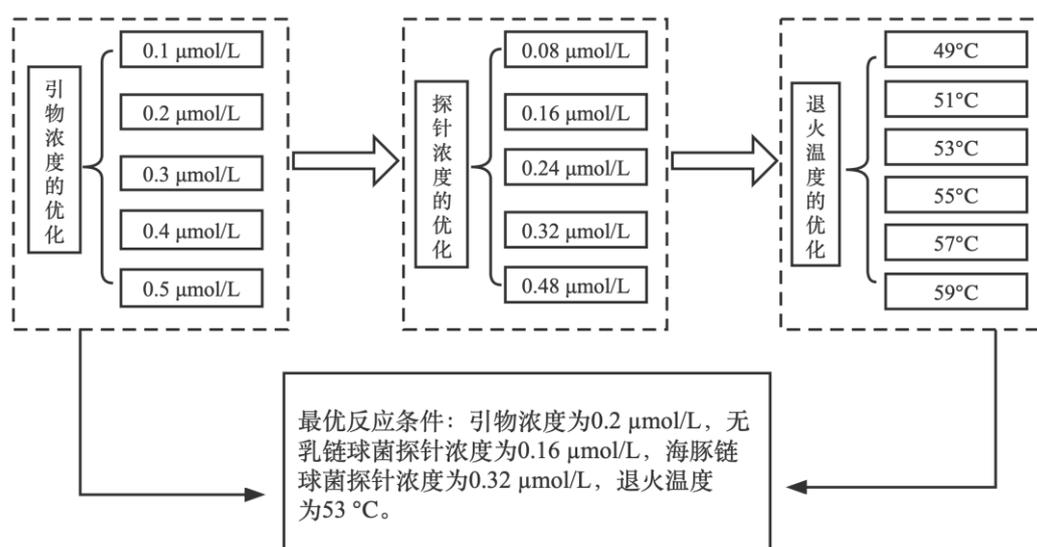


图 1. 反应条件的优化方案、优化结果

4.2 反应体系和反应程序

详见表 2.

表 2 罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 的反应体系和反应程序

反应体系		反应程序	
组份	用量 (μL)	95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 退火温度, 30 s (荧光信号采集), 45 个循环	
5 \times PCR buffer	5.0		
dNTP	2.0		
TaqDNA 聚合酶	0.6		
无乳链球菌	上游引物		0.1
	下游引物		0.1
	探针		0.08
海豚链球菌	上游引物		0.1
	下游引物		0.1
	探针		0.16
模板	5.0		
ddH ₂ O	将反应体系调整至 25.0 μL		

5. 标准曲线的建立及敏感性试验

用 ddH₂O 分别对提取的无乳链球菌和海豚链球菌 DNA 按照 10 倍梯度稀释, 共设 8 个梯度 (10^{-1} – 10^{-8}), 进行双重荧光 PCR 检测, 每个梯度做 3 次重复, 根据所得 Ct 值制作标准曲线, 获得扩增效率 (E)、相关系数 (R^2) 和检测下限。

以细菌数量的对数值为横坐标, 荧光 PCR 反应过程中样品扩增达到阈值循环数即 Ct 值为纵坐标, 绘制海豚链球菌及无乳链球菌荧光 PCR 反应标准曲线 (图 1)。无乳链球菌细胞数为 2.96×10^6 – 2.96×10^3 CFU/mL 时, 得到标准曲线方程为 $y = -3.48x + 42.66$, $E = 93.8\%$, $R^2 = 0.9998$; 海豚链球菌细胞数为 1.07×10^6 – 1.07×10^3 CFU/mL 时, 得到标准曲线方程为 $y = -3.343x + 38.228$, $E = 99.1\%$, $R^2 = 0.9999$ 。两者均有良好线性关系, 且扩增效率均符合要求 (90%–110%)。详见图 2。

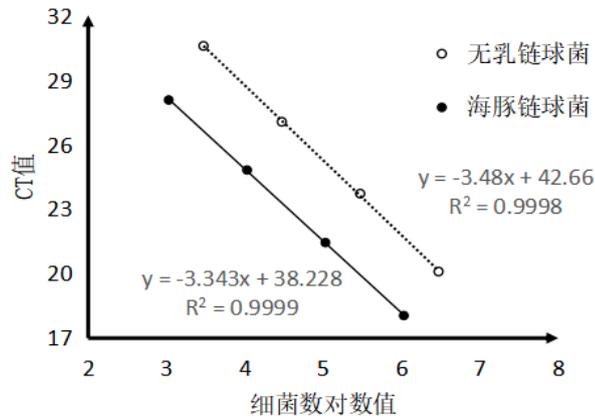


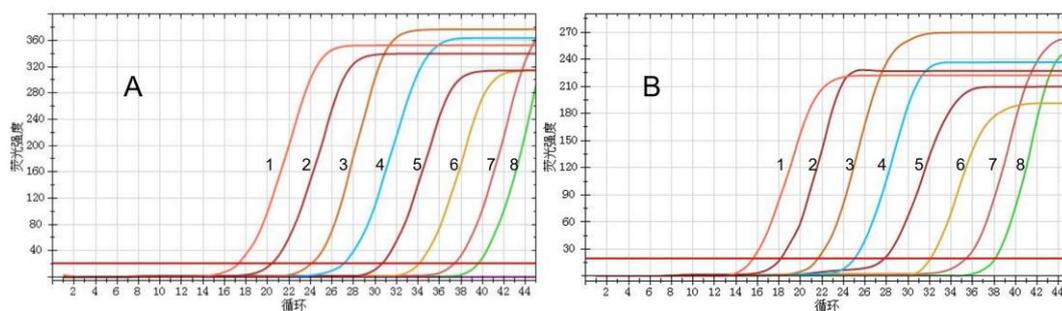
图 2 无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法标准曲线

两者 DNA 模板稀释倍数为 10^7 ，无乳链球菌菌液浓度为 29.6 CFU/mL，海豚链球菌菌液浓度为 10.7 CFU/mL 时，可被稳定检出；稀释倍数为 10^8 ，无乳链球菌菌液浓度为 2.96 CFU/mL，海豚链球菌菌液浓度为 1.07 CFU/mL 时，仍可被检出，但不稳定。所以本标准建立的双重荧光 PCR 检测方法的无乳链球菌和海豚链球菌最低检测限分别为 29.6CFU/mL 和 10.7CFU/mL。根据最低检测限对应的 Ct 值确定临床样品阴、阳性判断标准：无乳链球菌 $Ct \leq 37$ ，且有标准扩增曲线，为阳性；无 Ct 值或 $Ct > 37$ ，判为阴性。海豚链球菌 $Ct \leq 34$ ，且有标准扩增曲线，判为阳性；无 Ct 值或 $Ct > 34$ ，判为阴性。

表 3 无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 方法敏感性试验结果

样品稀释倍数	无乳链球菌			海豚链球菌		
	菌液浓度/ (CFU/mL)	Ct 值	平均数 ± 标准差	菌液浓度/ (CFU/mL)	Ct 值	平均数 ± 标准差
10^1	2.96×10^7	17.21	17.36 ± 0.27	1.07×10^7	15.53	15.60 ± 0.14
		17.68			15.76	
		17.2			15.51	
10^2	2.96×10^6	20.28	20.09 ± 0.20	1.07×10^6	18.14	18.05 ± 0.09
		19.89			17.96	
		20.11			18.04	
10^3	2.96×10^5	24.03	23.71 ±	1.07×10^5	21.58	21.44 ±

		23.65	0.29		21.63	0.29
		23.46			21.11	
10^4	2.96×10^4	27.05	27.05 ± 0.09	1.07×10^4	25.03	24.81 ± 0.19
		26.97			24.69	
		27.14			24.71	
10^5	2.96×10^3	30.56	30.58 ± 0.06	1.07×10^3	27.77	28.07 ± 0.29
		30.65			28.34	
		30.53			28.09	
10^6	2.96×10^2	34.06	33.97 ± 0.11	1.07×10^2	32.08	32.13 ± 0.13
		34			32.03	
		33.85			32.28	
10^7	2.96×10^1	37.27	37.40 ± 0.89	1.07×10^1	35.35	34.78 ± 0.50
		36.58			34.41	
		38.34			34.58	
10^8	2.96×10^0	—	—	1.07×10^0	—	—
		—			—	



A. 无乳链球菌 FAM 通道；B. 海豚链球菌 HEX 通道。

1-8, 为无乳链球菌和海豚链球菌 10^1 - 10^8 倍稀释样品的实时荧光强度曲线。

图 3 无乳链球菌和海豚链球菌 DNA 梯度稀释双重荧光 PCR 荧光强度曲线

6. 特异性试验

同时检测海豚链球菌、无乳链球菌，结果海豚链球菌（HEX 通道）、无乳链球菌（FAM 通道）均有特异性扩增曲线（图 3），猪链球菌 2 型、嗜水气单胞菌株、铜绿假单胞菌株、迟钝爱德华氏菌株、罗非鱼湖病毒、锦鲤疱疹病毒、鲤浮肿病毒、蛙虹彩病毒、草鱼出血病病毒的核酸检测结果均为阴性，未出现特异性扩增曲线，无非特异性扩增的交

叉反应。使用 NCBI 引物 BLAST 工具对所选两组引物进行多种链球菌比对，匹配结果均为目标菌种。

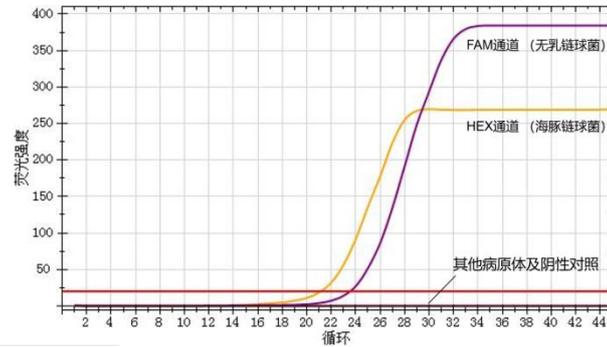


图 4 无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 方法特异性试验结果

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Streptococcus agalactiae strain 01173 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2105299	CP053027.1
Streptococcus agalactiae 515 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2032743	CP051004.1
Streptococcus agalactiae strain Sag153 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2174504	CP036376.1
Streptococcus agalactiae strain ZQ0910 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2064943	CP049938.1
Streptococcus agalactiae strain NJ1606 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2136438	CP026084.1
Streptococcus agalactiae strain YZ1605 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2281602	CP026082.1
Streptococcus agalactiae strain BSE009 chromosome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2148637	CP020387.1
Streptococcus agalactiae strain FDAARGOS_670 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2210718	CP044090.1
Streptococcus agalactiae strain FDAARGOS_669 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2065678	CP044091.1
Streptococcus agalactiae strain PLGBS13 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2095031	CP029749.1
Streptococcus agalactiae strain 32790_3A chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2148904	CP029561.1
Streptococcus agalactiae strain TF_09901 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2080936	CP034315.1
Streptococcus agalactiae strain FDAARGOS_512 chromosome complete genome	Streptococcus ...	48.2	135	87%	0.100	100.00%	2134138	CP033822.1

图 5 双重荧光 PCR 方法无乳链球菌 BLAST 工具特异性验证部分结果

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Streptococcus iniae strain GX005 chromosome complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2095003	CP032401.1
Streptococcus iniae strain YM011 chromosome complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2101557	CP032400.1
Streptococcus iniae strain Mpk1 capsule operon complete sequence and LysR family transcriptional r...	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2640	KY786113.1
Streptococcus iniae strain FPS228 chromosome complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2090625	CP024843.1
Streptococcus iniae strain QMA0248 complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2116570	CP022392.1
Streptococcus iniae strain B9353 complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2098647	CP017952.1
Streptococcus iniae strain YSFST01-82 complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2086959	CP010783.1
Streptococcus iniae strain ISNO complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2070182	CP007587.1
Streptococcus iniae strain ISCT0901 complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2070822	CP007586.1
Streptococcus iniae SF1 complete genome	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	2149844	CP005941.1
Streptococcus iniae clone QMA0076 CpsY (cpsY) gene cpsY-ST1 allele complete cds	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	921	JX164243.1
Streptococcus iniae clone QMA0191 CpsY (cpsY) gene cpsY-ST2 allele partial cds	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	870	JX164242.1
Streptococcus iniae capsule operon complete sequence	Streptococcus i...	47.3	88.2	100%	0.32	73.42%	21365	AY904444.1

图 6 双重荧光 PCR 方法海豚链球菌 BLAST 工具特异性验证部分结果

7. 重复性试验

按照优化的检测方法，分别对 10^4 – 10^6 倍稀释的 3 个浓度核酸进行批内与批间重复试验，重复检测 3 次，计算标准偏差 (SD) 及变异系数 (CV)。试验结果显示：无乳链球菌 3 个浓度核酸检测结果的批内重复试验变异系数均小于 0.32%，批间重复试验变异系数均小于

五、与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系

与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系没有冲突。

六、标准有何先进性或特色性

无乳链球菌和海豚链球菌是罗非鱼的主要致病菌，所引发的罗非鱼链球菌病死亡率可达 50%，同时无乳链球菌和海豚链球菌也会危害人类及二十多种易感动物，给全球养殖业带来巨大经济损失两种链球菌。无乳链球菌和海豚链球菌可以分布于同一区域甚至是同一鱼塘，因此研究一种灵敏、快速、特异性高的双重检测方法，对于同时准确的区分和诊断两种链球菌，从而预警和解决水产养殖中的链球菌病至关重要。本标准可同时检测罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌，且敏感性高、特异性强、重复性好，为罗非鱼链球菌病的临床诊断和研究提供了技术指引，促进罗非鱼养殖业的可持续发展。

七、贯彻标准的要求和措施建议

本标准发布后，可以通过相关部门组织宣贯，推荐给有相应检测设施和检测项目的实验室使用，也可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。