

# T/GDSF

广东水产学会团体标准

T/GDSFXXXX—XXXX

## 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

(征求意见稿)

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核酸的检测。

## 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/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

SC/T 7013 水生动物产地检疫采样技术规范

SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范

## 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: 每个反应管内的荧光信号量达到设定阈值时所经历的循环圈数。

DNA: 脱氧核糖核酸。

Taq酶: Taq DNA聚合酶。

F: 上游引物 (Forward primer)。

R: 下游引物 (Reverse primer)。

P: 探针 (Probe)。

BHQ: 无荧光淬灭基团 (Black Hole Quencher)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

HEX: 5-羟基四氢萘并[2,3-a:6,7-a']二呋喃-3-羧酸 (5-Hydroxy Tryptamine Hydrobromide)

PBS: 磷酸盐缓冲液

## 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 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 PCR 预混液 (包含 5×PCR buffer、Mg<sup>2+</sup>、dNTP)。

5.1.5 Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)。

## 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：0.5-10  $\mu\text{L}$ 、10-100  $\mu\text{L}$ 、100-1000  $\mu\text{L}$ ）。

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

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

### 7.1 样品采集

#### 7.1.1 采样工具

剪刀、镊子、1.5mL 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15min，并烘干。

#### 7.1.2 采样对象

罗非鱼及其变种。

#### 7.1.3 采样数量

应符合SC/T 7014中6.1的规定。

#### 7.1.4 个体要求

应符合SC/T 7014中6.2的规定。

#### 7.1.5 采集部位

应符合SC/T 7014中6.3的规定。

#### 7.1.6 样品运输

应符合SC/T 7013中10的规定。

### 7.2 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7000 r/min匀浆3次，每次20s，每次间隔20s进行匀浆，瞬时离心后获组织匀浆液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 8 操作方法

### 8.1 DNA 提取

在核酸提取区进行，使用商品化DNA提取试剂盒提取样品或细菌培养物的基因组DNA，也可采用其他等效的DNA提取方法。提取的DNA溶液直接检测或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 8.2 反应体系的配制

在试剂配液区进行，设双重荧光PCR反应数为n，n为待检样品数、2管阳性对照，阴性对照之和，每个样品检测反应体系配制见表1。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡，转移至核酸提取区加样。

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       |
| Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) | 0.6     |
| F1 (50μmol/L)        | 0.1     |
| R1 (50μmol/L)        | 0.1     |
| P1 (50μmol/L)        | 0.16    |
| F2 (50μmol/L)        | 0.1     |
| R2 (50μmol/L)        | 0.1     |
| P2 (50μmol/L)        | 0.08    |
| DNA模板                | 5       |
| ddH <sub>2</sub> O   | 11.76   |

## 8.3 加样

在核酸提取区进行，在各设定的荧光PCR管中分别加入8.1提取的DNA溶液5μL，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 在扩增区进行。

8.4.2 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。

### 8.4.3 循环条件设置

95℃预变性，3 min；95 ℃、15 s，53 ℃，30 s(收集荧光信号)，45 个循环。

### 8.4.4 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

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，不同仪器可根据仪器进行调整。

### 9.2 质控标准

阳性对照FAM和HEX通道的Ct值≤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，且无典型扩增曲线。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，判为罗非鱼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≤37、HEX 通道 Ct 值≤34，表示样品中同时存在罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌核酸。

9.3.3 FAM 通道 Ct 值≤37，且有典型“S”型扩增曲线，判为罗非鱼无乳链球菌核酸阳性。

9.3.4 HEX 通道 Ct 值≤34，且有典型“S”型扩增曲线，判为罗非鱼海豚链球菌核酸阳性。

## 附录 A (规范性) 溶液配置

### A.1 0.01mol/L PBS(PH 7.2)溶液的配制

称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 3.0g, 磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.2g, 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ) 8g, 加二级水定容至1000ml, 完全溶解后用3mol/L NaOH调PH为7.2经121℃ ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), 高压灭菌15min, 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3000 CFU/mL ( $\pm 10$  CFU/mL), 无乳链球菌为1000 CFU/mL ( $\pm 10$  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9g氯化钠, 溶解在少量蒸馏水后, 定容至100ml, 121℃ ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), 高压灭菌15min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

引物、探针的名称、序列和、工作浓度见表B1。

表B.1 表 B1 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             | 50            |
| 海豚链球菌R1 | AGAAGAGATGAAAGCACAGATG             | 50            |
| 海豚链球菌P1 | HEX-CGCACGGTCACTAACGACAATGGAT-BHQ1 | 50            |
| 无乳链球菌F2 | AGTTTCTCTCAATACAATTCGGA            | 50            |
| 无乳链球菌R2 | AGAAGAATATGTCTTCATTGGCG            | 50            |
| 无乳链球菌P2 | FAM-AGCTAAAGTAGCACCAGGT-BHQ1       | 50            |