

罗非鱼无乳链球菌病双重 PCR 诊断规程

Diagnostic protocols of tilapia infected with streptococcus agalactiae
by duplex polymerase chain reaction

地方标准信息服务平台

2013-08-01 发布

2013-11-01 实施

前 言

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。
本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写。
本标准由福建省海洋与渔业厅提出并归口。
本标准负责起草单位：福建省淡水水产研究所、顺昌县水产技术推广站。
本标准主要起草人：樊海平、吴斌、张新艳、邓志武、郑磊、钟全福、曾占壮。

地方标准信息服务平台

罗非鱼无乳链球菌病双重 PCR 诊断规程

1 范围

本标准规定了罗非鱼无乳链球菌病的术语和定义、流行情况与主要症状、样品采集与处理、双重PCR检测和诊断。

本标准适用于罗非鱼无乳链球菌病的诊断、流行病学调查、检疫与监测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

SC/T 7014-2006 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7103-2008 水生动物产地检疫采样技术规范

SC/T 7202.2-2007 斑节对虾杆状病毒病诊断规程 第2部分：PCR检测法

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本文件。

3.1

罗非鱼无乳链球菌病 streptococcosis of tilapia infected by streptococcus agalactiae

罗非鱼受无乳链球菌感染，发生病理变化，出现行为异常或死亡。

4 试剂与溶液

4.1 无乳链球菌 16S rRNA 基因部分序列引物：

——F1：5'-TTTGGTGTACTACTAGACTG-3'，浓度10 μmol/L，-20℃保存；

——R1：5'-TGTGTTAATTACTCTTATGCG-3'，浓度10 μmol/L，-20℃保存。

4.2 无乳链球菌 sip(表面免疫相关蛋白)基因序列引物：

——F2：5'-ATGAAAATGAATAAAAAGGTACTATTG-3'，浓度10 μmol/L，-20℃保存；

——R2：5'-TTATTTGTAAATGATACGTGAACA-3'，浓度10 μmol/L，-20℃保存。

4.3 溶菌酶 (100 μg/mL)：生化试剂，-20℃保存。

4.4 蛋白酶 K(100 μg/mL)、NaCl (3 mol/L)、裂解缓冲液和 SYBR Green I 工作液按附录 A 的规定配制。

4.5 DNA 分子量标准 (0.1 kb~1.5 kb)：生化试剂，-20℃保存。

4.6 阳性对照：无乳链球菌标准株的 DNA 模板，-20℃保存。

4.7 阴性对照：已知无乳链球菌阴性的罗非鱼组织样品 DNA 模板，-20℃保存。

4.8 空白对照：无菌双蒸水为空白模板。

4.9 除上述试剂与溶液外，其余按 SC/T 7202.2-2007 第 5 章的规定执行，实验室用水符合 SC/T 7014-2006 中第 5 章的规定。

5 仪器与设备

- 5.1 PCR 扩增仪: 配备 25 μL 和 50 μL 的 PCR 反应底座。
- 5.2 凝胶成像仪: 可发射紫外线, 携带摄影系统。
- 5.3 电泳仪: 输出直流电压 0 V~400 V, 直流电流 1 mA~500 mA。
- 5.4 水平电泳槽: 容量 250 mL~650 mL, 带凝胶板、样孔梳。
- 5.5 台式离心机: 配置 1.5 mL 转子, 转速 16 000 r/min 以上。
- 5.6 电动组织研磨器: 转速 500 r/min~5 000 r/min。
- 5.7 研磨棒: 1.05 Kg/cm²、121.3 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸气灭菌 15 min。
- 5.8 离心管: 容量 1.5 mL, 1.05 Kg/cm²、121.3 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸气灭菌 15 min。
- 5.9 PCR 反应管: 25 μL 和 50 μL , 1.05 Kg/cm²、121.3 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸气灭菌 15 min。
- 5.10 除上述仪器设备外, 其余按 SC/T 7202.2-2007 第 6 章的规定执行。

6 流行情况与主要症状

6.1 流行情况

该病流行于春、夏和秋季, 高峰期为 5 月~9 月, 水温 25 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$, 传染性强, 主要危害 100 g 以上的罗非鱼, 也可感染体长 1 cm~3 cm 的苗种。

6.2 主要症状

患病罗非鱼摄食减少, 游动迟缓, 失去平衡, 常在水上层侧游打转; 眼球突出并伴随眼底出血和晶状体浑浊; 鳃盖内侧发红、充血或出血; 下颌、体侧、腹部以及各鳍条基部出血; 肝脏、胆囊和脾脏肿大; 肠黏膜充血; 肠道和腹腔积液。

7 样品采集与处理

7.1 采样

按 SC/T 7014-2006 第 6 章的规定执行。

7.2 样品封存、运输、登记与保存

按 SC/T 7103-2008 第 9 章、第 10 章、第 11 章和第 12 章的规定执行。

8 双重 PCR 检测

8.1 DNA 模板的制备

8.1.1 DNA 提取的环境

应符合 SC/T 7014-2006 附录 B 的规定, 在样品区完成。

8.1.2 样品准备

无菌解剖采集肾脏或脾脏组织 50 mg~100 mg, 放入 1.5 mL 离心管中, 在无菌条件下, 电动研磨器, 3 000 r/min 研磨至匀浆状。

8.1.3 裂解

于研磨样品中加入溶菌酶 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h; 分别加入裂解缓冲液 200 μL 和蛋白酶 K 25 μL , 55 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1 h。

8.1.4 DNA 的提取

裂解样品 16 000 r/min 离心 10 min; 取上清液于 1.5 mL 离心管中, 加等体积的酚-氯仿-异戊醇混合液, 颠倒混匀 8 min, 16 000 r/min 离心 10 min; 取上层液体于 1.5 mL 离心管中, 加 1/10 体积的 3 mol/L NaCl, 2.5 体积的无水乙醇, 颠倒混匀 5 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 16 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 70% 乙醇 500 μL , 重悬沉淀, 16 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 常温干燥 10 min; 加 TE 缓冲液 30 μL , 制成 DNA 提取液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8.2 反应体系的准备

PCR 反应可选择 25 μL 、50 μL 反应体系进行。按表 1 的要求, 加入除 TaqDNA 聚合酶以外的各项试剂, 配制成无酶反应预混物。按检测 PCR 反应体系的 1 份/支或 100 份/支分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在临用前, 根据所需的反应份数, 取出无酶反应预混物, 加入相应体积的 TaqDNA 聚合酶和待测样品模板混匀, 即为完全的反应预混物, 按 1 份/支分装到 0.2 mL PCR 管中。

表1 PCR 反应所需试剂组成

试剂	25 μL 反应体系	50 μL 反应体系	试剂终浓度
10 \times PCR 缓冲液	2.5 μL	5.0 μL	1 \times
氯化镁 (25 mmol/L)	3.0 μL	6.0 μL	3 mmol/L
dNTP (10 mmol/L)	1.0 μL	2.0 μL	200 $\mu\text{mol/L}$
引物 F1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL	1.0 μL	0.08 $\mu\text{mol/L}$
引物 R1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL	1.0 μL	0.08 $\mu\text{mol/L}$
引物 F2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0 μL	2.0 μL	0.32 $\mu\text{mol/L}$
引物 R2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0 μL	2.0 μL	0.32 $\mu\text{mol/L}$
灭菌双蒸水	14.4 μL	28.8 μL	—
TaqDNA 聚合酶 (5 U/ μL)	0.1 μL	0.2 μL	0.02 U/ μL
1 份反应总体积	25.0 μL	50.0 μL	—
100 份反应总体积	250.0 μL	500.0 μL	—
注: 每 25.0 μL 体系模板量 1.0 μL ; 每 50.0 μL 体系模板量 2.0 μL 。			

8.3 双重 PCR 扩增

8.3.1 按表 1 各反应体系所需的模板体积要求, 在含有反应物的 PCR 管中分别加入相应体积的各样品 DNA 模板。并设阳性对照、阴性对照和空白对照。每个样品制备 3 个平行样。

8.3.2 将含有反应物的 PCR 管置于 PCR 仪反应槽中，按以下程序进行扩增：94 °C 预变性 5 min，（94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1.0 min）×35 个循环，72 °C 延伸 10 min，最后 16 °C 保温，准备进行产物的电泳。

8.4 琼脂糖凝胶的制作

8.4.1 用 1×电泳缓冲液配制 1% 的琼脂糖凝胶，加热至溶液完全透明。

8.4.2 将凝胶液缓缓倒入放置好样孔梳的凝胶板，胶液厚度 0.6 cm~0.8 cm。样孔梳底部水平深入凝胶层 0.3 cm~0.5 cm，并距凝胶底部 0.2 cm。

8.4.3 待凝胶完全凝固后，拔掉样孔梳，即可用于电泳。

8.5 电泳

8.5.1 将琼脂糖凝胶放入水平电泳槽，加样孔朝向负极，加入 1×电泳缓冲液没过胶面 0.1 cm~0.2 cm。

8.5.2 10 μL PCR 扩增产物加入 1.3 μL SYBR Green I 工作液和 2 μL 6×载样缓冲液混匀，室温放置 10 min 后加到加样孔中。同时设一个泳道加入 5 μL DNA 分子量标准物。

8.5.3 盖上电泳槽后通电，在 1 V/cm~5 V/cm 下电泳 30 min，当载样缓冲液中的溴酚蓝指示剂的色带迁移至琼脂糖凝胶的 1/2~2/3 处时停止电泳，将凝胶置于凝胶成像仪上观察与拍照。

8.6 分子量计算

按 SC/T 7202.2-2007 中 7.1.7 的规定执行。

8.7 结果判定

8.7.1 检测样品和阳性对照在 121 bp 和 1 305 bp 处均有二条特定条带出现（参见附录 B）；阴性对照在 121 bp 和 1 305 bp 处无条带出现或仅有一条特定条带出现；空白对照不出现任何条带；判定检测结果为阳性。

8.7.2 阳性对照在 121 bp 和 1 305 bp 处均有二条特定条带出现；检测样品和阴性对照在 121 bp 和 1 305 bp 处无特定条带出现，或仅有一条特定条带出现；空白对照不出现任何条带；判定检测结果为阴性。

9 诊断

9.1 症状与 7 描述相符，双重 PCR 检测阳性，判定检测样品患罗非鱼无乳链球菌病。

9.2 症状与 7 描述不相符，双重 PCR 检测阳性，判定检测样品为携带无乳链球菌。

9.3 双重 PCR 检测阴性，判定检测样品为非罗非鱼无乳链球菌病。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 10 mg/mL蛋白酶K

蛋白酶K	10 mg
水	1 mL

溶解后分装于无菌离心管中 (0.2 mL/管), -20 °C 下保存。

A.2 100 μg/mL蛋白酶K

10 mg/mL蛋白酶K	100 μL
水	10 mL

溶解后分装于无菌离心管中 (0.5 mL/管), -20 °C 保存。

A.3 3 mol/L NaCl

氯化钠 (NaCl)	17.5 g
水	50 mL

磁力搅拌至完全溶解, 加水定容至100 mL, 室温保存。

A.4 裂解缓冲液

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	2 mL
10% SDS	10 mL
3 mol/L NaCl	3 mL
水	75 mL

混匀, 室温保存。

A.5 SYBR Green I 工作液

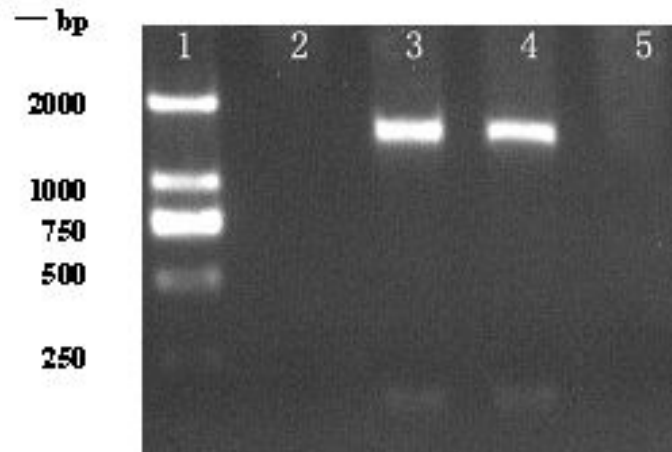
SYBR Green I	10 μL
1×电泳缓冲液	990 μL

混匀, 2 °C~8 °C 保存, 一个月内使用。

附录 B

(资料性附录)

罗非鱼无乳链球菌双重 PCR 检测电泳图



说明:

- 1——DNA Marker;
- 2——空白对照;
- 3——阳性对照;
- 4——阳性样品;
- 5——阴性对照

图B.1 罗非鱼无乳链球菌双重 PCR 检测电泳图

地方标准信息服务平台

福建省地方标准

罗非鱼无乳链球菌病双重 PCR 诊断规程

DB35/T 1354—2013

*

2013年9月第一版 2013年9月第一次印刷