

T/ZJSC

团 体 标 准

T/ZJSC 2025—0024

中华鳖腮腺炎诊断方法

Diagnostic methods for mumps in Chinese soft-shelled turtle

2025 - 12 - 29 发布

2026 - 01 - 29 实施

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。

本文件由浙江省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江省淡水水产研究所、浙江省农业科学院。

本文件主要起草人：张海琪、陈静、刘莉、姚嘉赟、袁雪梅、吕孙建、林锋、焦锦彪、郭琦。

全国团体标准

中华鳖腮腺炎诊断方法

1 范围

本文件给出了中华鳖 (*Pelodiscus sinensis* Wiegmann, 1834) 腮腺炎诊断的缩略语、试剂和材料、仪器设备, 描述了临床症状、样品采集、解剖学及组织病理检查、病原菌分离及形态观察、细菌PCR检测、病毒套式RT-PCR检测以及综合判定的方法。

本文件适用于中华鳖腮腺炎的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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/T 28630.4 白斑综合征 (WSD) 诊断规程 第4部分: 组织病理学诊断方法
SC/T 7011.1 水生动物疾病术语与命名规则 第1部分: 水生动物疾病术语
SC/T 7011.2 水生动物疾病术语与命名规则 第2部分: 水生动物疾病命名规则

3 术语和定义

SC/T 7011.1和SC/T 7011.2界定的术语和定义适用于本文件。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- bp: 碱基对 (base pair)
cDNA: 互补DNA (complementary DNA)
DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)
DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
dNTPs: 脱氧核苷三磷酸混合物 (deoxy-ribonucleotide triphosphate mixture)
EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)
Oligo(dT)₁₅: 15个胸腺嘧啶组成的寡聚核苷酸
PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)
RT-PCR: 逆转录PCR (reverse transcription PCR)
Taq DNA聚合酶: 水生栖热菌DNA聚合酶 (thermus aquaticus DNA polymerase)
TSA: 胰酪大豆胨琼脂 (tryptic (trypticase) soy agar)
TSB: 胰酪大豆胨肉汤 (tryptic soy broth)
TSHSV: 中华鳖出血综合征病毒 (*Trionyx sinensis* hemorrhagic syndrome virus)

5 试剂和材料

除非另有说明, 在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.1 琼脂糖: 电泳级, 常温保存。

- 5.2 电泳核酸染料：溴化乙锭或其他等效试剂，-20℃保存。
- 5.3 DNA 分子质量标准溶液：Marker DL2000，-20℃保存。
- 5.4 $MgCl_2$ (25 mmol/L)：-20℃保存。
- 5.5 dNTPs (10 mmol/L)：含 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 2.5 mmol/L 的混合物，-20℃保存。
- 5.6 *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L)：-20℃保存。
- 5.7 10×PCR 缓冲液 (无 Mg^{2+})：随 *Taq* DNA 聚合酶提供，-20℃保存。
- 5.8 6×载样缓冲液：室温保存。
- 5.9 5×M-MLV 逆转录酶缓冲液：商品化试剂，-20℃保存。
- 5.10 M-MLV 逆转录酶 (200 U/ μ L)：商品化试剂，-20℃保存。
- 5.11 RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L)：商品化试剂，-20℃保存。
- 5.12 TRIzol 试剂：商品化试剂，4℃保存。
- 5.13 氯仿：分析纯，常温保存。
- 5.14 无水乙醇：分析纯，常温保存。
- 5.15 异丙醇：分析纯，常温保存。
- 5.16 $Oligo(dt)_{15}$ (50 μ mol/L)：商品化试剂，-20℃保存。
- 5.17 TSA 培养基：按 A.1 配制。
- 5.18 TSB 培养基：按 A.2 配制。
- 5.19 75%乙醇：按 A.3 配制。
- 5.20 EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)：按 A.4 配制。
- 5.21 1×TAE 电泳缓冲液：按 A.5 配制。
- 5.22 引物 HPBc-F：5' - CTACAGGTCGCAGATAAAACAGTC-3' ；
引物 HPBc-R：5' - GCAAGGGCTAAAAATGAAATCT-3' ；
引物 TSHSV-hp2-F1：5' - ACCAGGATCATGGCCACCTAC-3' ；
引物 TSHSV-hp2-R1：5' - TTCTTGGCAACATCGGCTTTCT-3' ；
引物 TSHSV-hp2-F2：5' - GGGGACTGCTGGAAGTCTATTA-3' ；
引物 TSHSV-hp2-R2：5' - GTTTGGACCAGAAAGGTGAATG-3' 。
- 5.23 阳性对照：受蜡样芽孢杆菌感染的鳖组织样品，用于细菌 PCR 检测；受中华鳖出血综合征病毒 (TSHSV) 感染的鳖组织样品，用于病毒套式 RT-PCR 检测。
- 5.24 阴性对照：未受蜡样芽孢杆菌感染的鳖组织样品、未受 TSHSV 感染的鳖组织样品。
- 5.25 空白对照：无菌双蒸水。

6 仪器设备

- 6.1 恒温培养箱。
- 6.2 切片机。
- 6.3 组织脱水机。

- 6.4 包埋机。
- 6.5 染色机。
- 6.6 展片水浴锅。
- 6.7 平板烘片机。
- 6.8 封片机。
- 6.9 水平电泳仪。
- 6.10 普通 PCR 仪。
- 6.11 摇床。
- 6.12 紫外观察仪或凝胶成像仪：波长范围 280 nm ~ 320 nm。
- 6.13 光学显微镜。
- 6.14 高速冷冻离心机：转速 12000 rpm 以上。
- 6.15 微量移液器。
- 6.16 生物安全柜。

7 临床症状

发病前期病鳖表现出行动迟缓，食性下降发病后期可见病鳖多趴在岸边，脖子肿胀，软弱无力，在水面游动时左右摇摆，形似“摇头”，严重时病鳖口鼻出血，部分病鳖底板发红，见B. 1。

8 样品采集

8.1 采样对象

稚鳖、幼鳖、成鳖等。

8.2 采样部位

无菌采集脾脏、肝脏、肾脏、肺和肠道组织样品。

8.3 采样数量

具有临床症状的幼鳖或成鳖采3只~5只；稚鳖、无临床症状的幼鳖或成鳖采8只~10只。

8.4 保存和运输

做组织病理检查的鳖样应活体送达实验室，及时取样检测；不做组织病理检查的鳖样，应活体或冰鲜24 h内送达实验室。采样应加贴标签，标签上清楚标明样品编号、采样时间、采样地点。

9 解剖学及组织病理检查

9.1 样品处理和观察

将纱布浸75%乙醇后，覆盖于病鳖表面，或用含75%乙醇的棉球擦拭。针对幼鳖和成鳖，无菌解剖鳖背甲，观察鳖口咽腔及内脏；取肝脏、脾脏、肾脏和肠道组织，迅速切成厚度不超过3 mm的组织块，按GB/T 28630.4的方法进行组织固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木精染色和伊红染色、封片，并置于光学显微镜下观察。鳖腮腺炎解剖学特征示例见B. 2和B. 3，组织病理特征示例见B. 4。

9.2 结果判定

若观察到解剖学特征表现为口咽腔红肿，内脏充血明显，肝脏有花斑样淤血点；或肝脏无花斑样淤血点，但组织病理学特征表现为大量细菌在肝脏和脾脏中聚集，判定为疑似鳖腮腺炎。

10 病原菌分离及形态观察

10.1 病原菌分离和培养

用接种环或接种针（无菌）取鳖的脾脏、肝脏、肾脏、肺组织，分别划线接种于 TSA 培养基上，倒置于恒温培养箱 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $8\text{ h} \sim 12\text{ h}$ 。

10.2 结果判定

若观察到 TSA 培养基上可见形态一致，圆形乳白色凸起，融蜡状，表面光滑，边缘清晰整齐的菌落，判定为疑似鳖细菌性腮腺炎。

11 细菌 PCR 检测

11.1 组织 DNA 提取

无菌取 $100\text{ mg} \sim 300\text{ mg}$ 内脏组织放入无菌的研钵中，加入适量液氮研磨至粉状。将研磨后的样品转移放入 2 mL 离心管中，加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 的 2% CTAB 抽提缓冲液，混匀后在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 2 h ，加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿-异戊醇（体积比 $24:1$ ）， 12000 r/min 离心 10 min ，转移上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 2 倍体积预冷异丙醇，充分混匀后 12000 r/min 离心 5 min ，得到 DNA 沉淀。用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 75% 乙醇洗涤 DNA 沉淀， 12000 r/min 离心 5 min ，弃乙醇，重复操作 2 次，在室温干燥 5 min ，使乙醇挥发干净，加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 无菌超纯水溶解 DNA 沉淀， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。提取过程同时设置阳性对照（感染蜡样芽孢杆菌的鳖组织样品）、阴性对照和空白对照。也可采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 提取试剂盒。

11.2 PCR 扩增

在冰盒上配制 $50\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系。在 PCR 反应管中加入：无菌水 $31.75\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\times$ PCR 缓冲液 $5\text{ }\mu\text{L}$ ，dNTPs (10 mmol/L) $3\text{ }\mu\text{L}$ ， MgCl_2 (25 mmol/L) $3\text{ }\mu\text{L}$ ，引物 HPBc-F ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$ 和引物 HPBc-R ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $1\text{ }\mu\text{L}$ ，提取的 DNA $5\text{ }\mu\text{L}$ ，*Taq* DNA 聚合酶 ($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$ 。混匀，置于 PCR 仪中，按以下程序进行 PCR 扩增： $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ； $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s ， $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s ，35 个循环； $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。也可采用等效的商品化 PCR 试剂盒。

11.3 琼脂糖凝胶电泳

用琼脂糖 1.0 g ， $1\times$ TAE 电泳缓冲液 100 mL ，混匀后在微波炉中完全融化，待冷至 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，加适量的电泳核酸染料，摇匀倒入电泳板上，凝固后取下梳子，备用。取 $5\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物与 $1\text{ }\mu\text{L}$ $6\times$ 载样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。每次电泳加阳性对照和阴性对照的扩增产物，并设立 DNA 分子质量标准溶液做分子质量大小对照。盖好电泳仪，插好电极， 5 V/cm 电压电泳， $30\text{ min} \sim 45\text{ min}$ （指示剂跑至 $1/2$ 处）。

11.4 结果判定

11.4.1 若阳性对照在 680 bp 附近有特异性条带，阴性对照在 680 bp 附近无特异性条带，空白对照无任何条带，检测有效。

11.4.2 若样品 PCR 扩增在 680 bp 附近无特异性目的条带，则判定 PCR 检测结果为阴性。

11.4.3 若样品 PCR 扩增在 680 bp 附近有特异性目的条带，需要回收 PCR 产物测序，测序结果与附录 C 参考序列一致性 (Identities) $>98.3\%$ ，则判定 PCR 检测结果为阳性，否则判定 PCR 检测结果为阴性。

12 病毒套式 RT-PCR 检测

12.1 RNA 提取

取30 mg ~ 50 mg样品置于1.5 mL无RNA酶离心管中，加入1 mL TRIzol试剂，充分研磨后，室温放置5 min。于4 °C下12000 r/min离心10 min，取上清液转移至新的1.5 mL无RNA酶离心管。加入0.2 mL氯仿，振荡混匀15 s，室温下静置5 min。于4 °C下12000 r/min离心10 min，取上清液转移至新的1.5 mL无RNA酶离心管。加入0.5 mL预冷的异丙醇，上下颠倒混匀，室温下静置10 min。于4 °C下12000 r/min离心10 min，弃上清液。加入1 mL预冷的75%乙醇，于4 °C下12000 r/min离心5 min，弃上清液，室温晾干沉淀。加入30 μL ~ 50 μL DEPC处理水溶解，测定RNA质量和浓度后，立即用于RT-PCR或保存于-80 °C备用。同时设置阳性对照（感染中华鳖出血综合征病毒的鳖组织样品）、阴性对照和空白对照。也可采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化RNA抽提试剂盒。

12.2 cDNA 合成

在冰盒上配制10 μL反应体系，在PCR管中加入1.0 μL 引物Oligo(dT)₁₅，3.5 μL DEPC处理的水和2 μL总量为100 ng ~ 200 ng的待测RNA模板。混匀离心后，70 °C 10 min，冰浴2 min；加入2 μL 5 × M-MLV逆转录酶缓冲液、0.5 μL RNA酶抑制剂（40 U/μL）、0.5 μL 10 mmol/L dNTPs、0.5 μL M-MLV逆转录酶（200 U/μL），42 °C 1 h，80 °C 5 min，冰浴中冷却。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。合成的cDNA可立即用于PCR扩增，或保存于-20 °C备用。也可采用等效的商品化cDNA合成试剂盒，或采用等效的商品化一步法RT-PCR试剂盒，省略cDNA合成步骤。

12.3 第一轮 PCR 扩增

按照表1的要求，加入除Taq DNA聚合酶以外的各项试剂，在冰盒上配制成预混物，保存于-20 °C。临用前，加入相应体积的Taq DNA聚合酶，混匀，按24 μL/反应体系配制于PCR管中，然后加入1 μL 12.2步骤合成的cDNA。置于PCR仪中，按以下程序进行第一轮PCR扩增：95 °C 5 min；94 °C 30 s、58 °C 30 s、72 °C 40 s，35个循环；72 °C 5 min，最后4 °C保存。也可采用等效的商品化PCR试剂盒或一步法RT-PCR试剂盒。

表1 第一轮PCR预混物所需试剂

试剂	加样量 (μL)	试剂终浓度
10 × PCR缓冲液 (无Mg ²⁺)	2.5	1 × PCR缓冲液
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0	2.0 mmol/L
dNTPs (各2.5 mmol/L)	2.0	200 μmol/L
TSHSV-hp2-F1 (10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
TSHSV-hp2-R1 (10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
灭菌双蒸水	16.0	-
Taq DNA聚合酶 (5 U/μL)	0.5	0.1 U/μL

12.4 第二轮 PCR 扩增

按照表2的要求，在冰盒上配制除Taq DNA聚合酶以外的预混物，保存于-20 °C。临用前，加入相应体积的Taq DNA聚合酶，混匀，按24 μL/反应体系配制于PCR管中。然后加入1 μL第一轮PCR反应产物为模板，加入前可根据第一轮PCR产物浓度，做100倍~1000倍稀释。置于PCR仪中，按以下程序进行第二轮PCR扩增：95 °C 5 min；94 °C 30 s、58 °C 30 s、72 °C 30 s，35个循环；72 °C 5 min，最后4 °C保存。也可采用等效的商品化PCR试剂盒。

表2 第二轮PCR预混物所需试剂

试剂	加样量, μL	试剂终浓度
10 × PCR缓冲液 (无Mg ²⁺)	2.5	1 × PCR缓冲液
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0	2.0 mmol/L
dNTPs (各2.5 mmol/L)	2.0	200 μmol/L
TSHSV-hp2-F2 (10 μmol/L)	1.0	0.4 μmol/L
TSHSV-hp2-R2 (10 μmol/L)	1.0	0.4 μmol/L

表 2 (续)

灭菌双蒸水	15.0	-
<i>Taq</i> DNA聚合酶 (5 U/ μ L)	0.5	0.1 U/ μ L

12.5 琼脂糖凝胶电泳

按照11.3的步骤执行。

12.6 结果判定

12.6.1 检测样品第一轮PCR扩增后在528 bp附近有特异性目的条带,和/或第二轮PCR扩增后在231 bp附近有特异性目的条带,且PCR产物测序结果与附录D参考序列一致性(Identities) $>95\%$,判定TSHSV套式RT-PCR检测结果为阳性。

12.6.2 检测样品第一轮PCR扩增后在528 bp附近无特异性目的条带且第二轮PCR后在231 bp附近无特异性目的条带,判定TSHSV套式RT-PCR检测结果为阴性。

13 综合判定

13.1 确诊病例的判定

PCR或者套式RT-PCR检测结果为阳性,且符合以下任意一项,判定为确诊病例:

- 出现临床症状,具备解剖学特征;
- 内脏组织分离出病原菌,具有组织病理学特征。

13.2 阴性病例的判定

不具有临床症状和解剖学特征,且同时符合以下几项,判定为阴性病例:

- 内脏组织不能分离出病原菌菌落,不具有组织病理特征;
- PCR和套式RT-PCR检测结果均为阴性。

附录 A (规范性) 试剂及其配制

A.1 TSA 培养基

胰蛋白胨	15.0 g
大豆木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
pH	7.3 ± 0.2

加热搅拌溶解于1000 mL纯化水中，分装于容器中，121 °C 高压灭菌15 min，灭菌后取出培养基，冷却至60 °C左右，倾倒细菌培养皿，备用。

A.2 TSB培养基

胰蛋白胨	15.0 g
大豆木瓜蛋白酶消化物	5.0 g
氯化钠	5.0 g
pH	7.3 ± 0.2

加热搅拌溶解于1000 mL纯化水中，分装于试管或其他的容器中，121 °C 高压灭菌15 min，备用。

A.3 75%乙醇

无水乙醇	75 mL
------	-------

加水25 mL，混匀，定容至100 mL。

A.4 EDTA (0.5 mol/L, pH 8.0)

乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O)	18.6 g
水	80 mL

磁力搅拌，用2.5 M NaOH调节溶液pH值至8.0，完全溶解，定容至100 mL。
高压蒸气灭菌，室温贮存。

A.5 1×TAE 电泳缓冲液

Tris	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	100 mL

加水定容至1000 mL，配置成50 × TAE电泳缓冲液。
50 × TAE电泳缓冲液 20 mL
加水定容至1000 mL，室温贮存。

附录 B (资料性) 中华鳖腮腺炎

B.1 疾病描述

中华鳖腮腺炎是近年来对鳖养殖业危害较大的一类疾病，可发生在中华鳖的各个养殖阶段，包括苗种阶段和成鳖阶段均容易发生，死亡率高。该病原具有较强的传染性和致死性。2022年农业农村部发布的《一、二、三类动物疫病病种名录》中，将鳖腮腺炎列入三类动物疫病。鳖腮腺炎的病原包含两种，一种是由中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌引起的鳖细菌性腮腺炎，另一种是由中华鳖出血综合征病毒 (*Trionyx sinensis* hemorrhagic syndrome virus, TSHSV) 引起的鳖病毒性腮腺炎。

B.2 病原

鳖细菌性腮腺炎病原为中华鳖蜡样芽孢杆菌，该细菌 16S rDNA 鉴定与蜡样芽孢杆菌、苏云金杆菌等具有较高的同源性；生理生化鉴定为蜡样芽孢杆菌；全基因组测序分析发现，除染色体基因组外，还包含两个不同大小的质粒基因组。

鳖病毒性腮腺炎病原为中华鳖出血综合征病毒 (TSHSV)，为首次发现的水生动物动脉炎病毒。球形病毒、直径约 60 nm ~ 80 nm，病毒有囊膜。其基因组为单链正链 RNA，基因组大小约为 17.9 kb。

B.3 易感宿主

易感宿主为中华鳖。病原可感染稚鳖、幼鳖和成鳖，在环境条件发生改变时易暴发，病原菌芽孢在自然环境条件难以彻底清除，已感染的养殖场易反复发病。

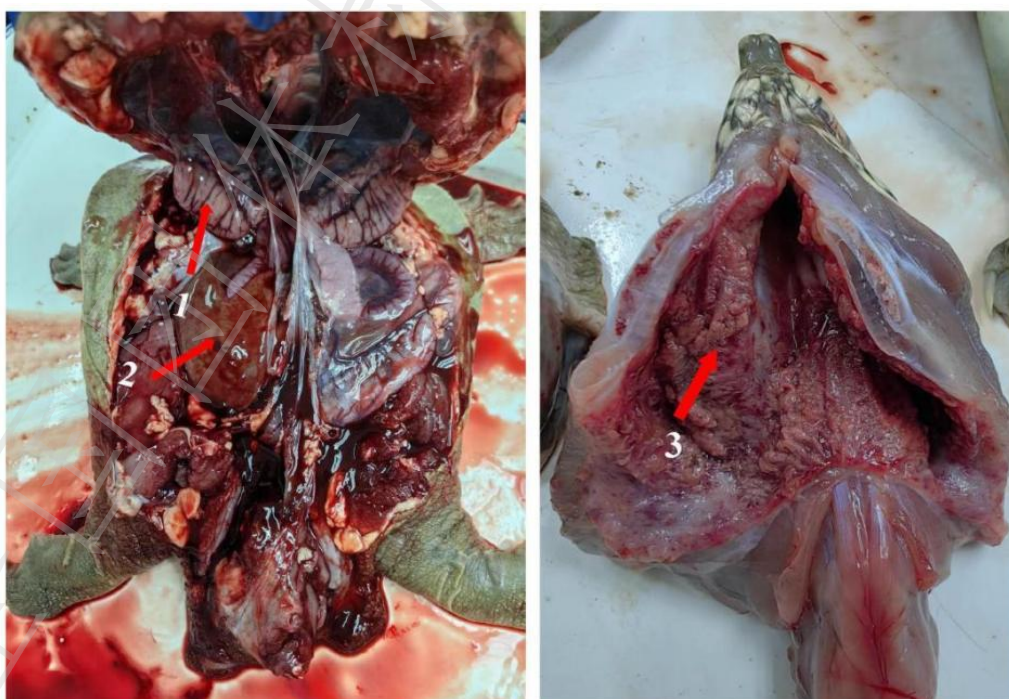
B.4 临床症状

病鳖临床主要表现为活力差，在水面无力浮游，脖子肿胀，不断摇头，食欲减退，严重时完全不吃食 (图 B.1)；剖检可见鳖口咽腔红肿，肠壁和肺充血，肝易碎无弹性。此外，患细菌性腮腺炎的中华鳖肝脏部分有失血现象，但无淤血点现象 (图 B.2)；而患病毒性腮腺炎的中华鳖肝脏有淤血点 (图 B.3)。



标引序号说明：
1——患病鳖脖子肿胀（红色箭头指示）。

图 B.1 病鳖临床特征



标引序号说明：
1——细菌性腮腺炎鳖肠道组织严重充血；
2——细菌性腮腺炎鳖肝脏组织无淤血点；
3——细菌性腮腺炎鳖咽喉部粘膜充血。

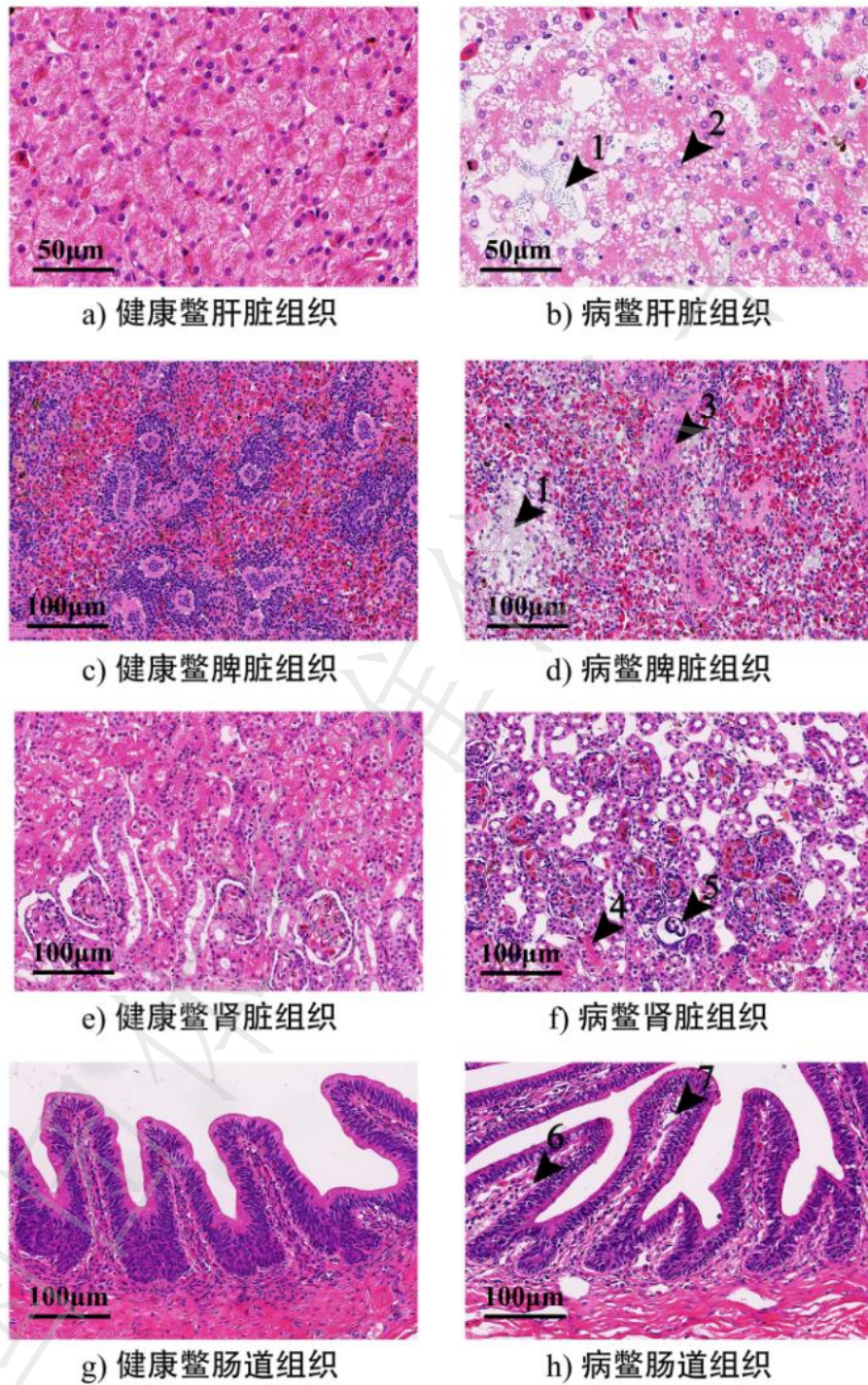
图B.2 细菌性腮腺炎鳖解剖学特征



标引序号说明：

- 1 ——TSHSV病鳖咽喉部粘膜充血（红色箭头指示）；
- 2 ——TSHSV病鳖肠道充血（红色箭头指示）；
- 3 ——TSHSV病鳖肝脏出现花斑且淤血严重（红色箭头指示）。

图B.3 病毒性腮腺炎鳖解剖学特征



标引序号说明:

- 1——细菌聚集;
- 2——细胞质空泡化;
- 3——细淋巴滤泡萎缩和坏死;
- 4——肾小管坏死;
- 5——肾小球淋巴细胞浸润和萎缩;
- 6——绒毛固有层结构紊乱, 平滑肌松弛;
- 7——中央乳糜微粒受损。

图B.4 病鲨的组织病理学特征

附录 C

(资料性)

中华鳖蜡样芽孢杆菌 PCR 检测产物及引物在靶基因中的位置

1	GCAAGGGCTA	AAAATGAAAT	CTCAGTTTCA	TGTAATGTAA	CGCCGAAAGA	GTTTTGTAGC
		HPBc-F				
61	TCTGGGGTTA	TAGACGATAC	TGTTTTATAA	TGATCATCAT	TTTTATTTAC	TAAAATAAGT
121	CCACTTACAT	TATCTATTGT	ATTTCCCTGAT	AGTAATCTGG	AGATTGTTAT	AGCGAACAAA
181	ACACACAATT	TGTGTTTTGA	ATAAGTGATC	ATTTGTACAT	CTAAATTTTT	TTCCATTTTA
241	TTAATTAGAT	CAGTGATATT	TTGTTTATTA	ATATAGGGAA	ACGGCCAATA	ATCATTTGGA
301	ATATTGCAAT	ATAACCTTAA	CATAAATACG	CGGACATCTT	GTTCTCTTCC	CGATATTTCT
361	AGAGGTTTTT	TTTTGATATT	TAAATGACTT	GACTGTATAT	CATAATTTAT	TTGATTAATA
421	ATTGGATATA	AAGCTCCTAC	TTGTAAGTGG	AGCTTTTGAG	CTAAGGATTG	CATACTGTTT
481	TTTTTGAATA	CAAGTTCTTC	GCAAATTTGA	AGATTTAGTG	ATTTTCTTAA	AATTTTTGAT
541	TCAACAAAGG	AAGGGGATTC	ATTTAATGGT	TTTTTTAGAT	AAATTCCTTT	TCCTTTTTGA
601	ACAAGTAAAT	TCCAAGATGG	AGGAATTTTCG	TCTTCTAATA	ATTTTAAATA	TTTTCG GACT
661	GTTTTATCTG	CGACCTGTAG				
		←				
		HPBc-R				

附录 D

(资料性)

中华鳖出血综合征病毒 PCR 产物序列及引物在靶基因中的位置

1 ACCAGGATCA TGGCCACCT ACGGGACTG CTGGAACCTT ATTAAGGAAA CAGGACTTGC
 TSHSV-hp2-F1 TSHSV-hp2-F2

61 CATGGACTTT GACCAGTACT ACGCACATAA TTCATACCAG ATTCTGCTCT ACAAGAGCCA

121 CTACGTAGTA CTCGGATACG CTCTAGGCAA CCCCTACTTT TACGAAGATG GCAAGAAACA

181 AGACCCATGG AGGTATGCAT TCTACGTTGA TGATTACATC ACCATTGACG TCATTCACCT
 TSHSV-hp2-R2

241 TTCTGGTCCA AACCGTGAAG GAAAAGACCC AGGAACATCT TGGGTACATG CAGCCACTAG
 TSHSV-hp2-R1

301 GGACCACCGC AGGTGGAATA CTGACACTAA GCTTACCGAC ACAGTTTTCA GCAATCCATC

361 AAGATACT AACTTTGCAG AAAAGCTCGC AAACAATGTG ACCATCAGAG ACAGATACTA

421 TGTCCATGCAT GAGACCGGGT TTGACGACCC TGAGGTCTCT ACTCCAATG ACATGAAGAA

481 AAAGAAGAGG AAGAAGACCC CTA~~CT~~CAGAA AGCCGATGTT GCCAAGAA