

T/ZJSC

团 体 标 准

T/ZJSC 2025—0021

南美白对虾 5 种病原快速检测 重组酶聚合酶扩增微流控芯片法

Rapid detection of five pathogens in *Litopenaeus vannamei*—Recombinase polymerase amplification integrated microfluidic chip method

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有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由浙江省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：宁波大学、浙江省海洋水产养殖研究所。

本文件主要起草人：周前进、陈炯、闫茂仓、王瑶华、陈琛、冀德伟。

全国团体标准信息平台

南美白对虾 5 种病原快速检测 重组酶聚合酶扩增微流控芯片法

1 范围

本文件规定了南美白对虾5种病原快速检测的原理、材料和试剂、仪器与设备、检测步骤、结果判定、生物安全。

本文件适用于南美白对虾急性肝胰腺坏死病致病弧菌、白斑综合征病毒、传染性皮下及造血器官坏死病毒、对虾十足目虹彩病毒、虾肝肠胞虫5种病原的快速检测。其他水生动物可参照执行。

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
- GB/T 25878 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)检测 PCR法
- GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫
- GB/T 28630.2 白斑综合征(WSD)诊断规程 第2部分：套式PCR检测
- GB/T 41521 多指标核酸恒温扩增检测微流控芯片通用技术要求
- SN/T 5195 对虾急性肝胰腺坏死病检疫技术规范
- SN/T 5336 猪瘟病毒及非洲猪瘟病毒检测微流控芯片法
- SC/T 7237 虾虹彩病毒病诊断规程
- DB33/T 2492 虾肝肠胞虫核酸检测技术规范

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- V_{AHPND} : 致急性肝胰腺坏死病弧菌(acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio* spp.)
- WSSV: 白斑综合征病毒(white spot syndrome virus)
- IHHNV: 传染性皮下及造血器官坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)
- SHIV: 对虾十足目虹彩病毒(shrimp hemocyte iridescent virus)
- EHP: 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)
- THF: 四氢呋喃(tetrahydrofuran)
- FAM: 5-羧基荧光素(5-carboxy fluorescein)
- BHQ1: 荧光淬灭基团(black hole quencher 1)
- RPA: 重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification)
- Tris·HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride)
- SDS: 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)
- EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)
- Tris-EDTA缓冲液: Tris-EDTA缓冲液(Tris-EDTA buffer)

4 原理

RPA是一种在恒温条件下进行的核酸扩增技术。通过重组酶、单链DNA结合蛋白和链置换DNA聚合酶协同作用，实现目标核酸序列的快速扩增。反应体系中使用特异性引物和带有荧光-淬灭标记的探针，当探针与目标序列结合并经酶切断裂后，荧光基团与淬灭基团分离，产生荧光信号。

本方法针对南美白对虾的五种主要病原： V_{AHPND} 、WSSV、IHHNV、SHIV和EHP分别设计了特异性引物和探针，固定于微流控芯片相应的反应池内。检测时，将提取的核酸模板与RPA反应试剂预混后加入芯片，在恒温条件下完成扩增反应。若样品中存在靶核酸，则芯片内相应反应池会产生可检测的荧光信号，其曲线特征（如阈值时间与上升趋势）用于判断检测结果。

5 材料和试剂

5.1 材料

5.1.1 微流控芯片：4×8离心式微流控芯片，5 μL /反应池。

5.1.2 其他耗材：热封膜、封口膜、不含DNA的移液器吸头（10 μL 、100 μL 、1000 μL ）、不含DNA的离心管（1.5 mL、2 mL）。

5.2 试剂

本文件中所有化学试剂，除非另有规定，仅为分析纯试剂。

5.2.1 实验用水符合GB/T 6682要求的一级或二级水。

5.2.2 核酸提取试剂，包括抽提缓冲液、20 mg/mL蛋白酶K、Tris饱和酚、10 mol/L乙酸铵、Tris-EDTA缓冲液（见附录B），或使用等效的商品化试剂盒。

5.2.3 阴性对照、阳性对照、内参对照。

a) 阴性对照：不含核酸的无菌水；

b) 阳性对照：从感染目标病原的虾组织提取的核酸或人工合成的含有目标核酸序列的DNA片段；

c) 内参对照：含一段随机设计的，非病原序列的质粒及其配套引物和探针。质粒DNA、引物、探针预置于芯片反应池中。

5.2.4 RPA反应试剂：30 ng/ μL Bsu DNA聚合酶、120 ng/ μL recA重组酶、30 ng/ μL ExoIII、90 ng/ μL 单链结合蛋白、1 mmol/L dNTP、100 mmol/L Tricine、5 mmol/L二硫苏糖醇、100 ng/ μL 肌酸激酶，保存于200 μL 反应管中冻干。也可采用等效的商品试剂盒。

5.2.5 280 mmol/L醋酸镁溶液。

5.2.6 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物、10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物、10 $\mu\text{mol/L}$ 探针。合成的引物经聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或高效液相色谱（HPLC）纯化，探针经HPLC纯化。引物与探针序列见附录A。

6 仪器与设备

6.1 微流控芯片核酸检测仪。

6.2 高速离心机：能够降低至4 $^{\circ}\text{C}$ ，最大转速可达12000 rpm

6.3 天平：感量0.01 g。

6.4 恒温金属浴或水浴锅：100 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.5 低温冰箱：-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.6 控温摇床：-15 $^{\circ}\text{C}$ \sim 80 $^{\circ}\text{C}$ ， \pm 0.1 $^{\circ}\text{C}$ ；能满足转速180 rpm \sim 220 rpm，振幅择20 mm \sim 25 mm（回旋式）。

6.7 移液器：量程：0.5 μL \sim 10 μL 、10 μL \sim 100 μL 、100 μL \sim 1000 μL 。

6.8 无菌 II 级生物安全柜。

7 检测步骤

7.1 样品采集与准备

采样数量、采样方法、运输与保存应符合 GB/T 28630.2、GB/T 25878、DB33/T 2492、SN/T 5195、SC/T 7237 的要求。

7.2 DNA 提取

7.2.1 取10 mg ~ 50 mg组织样品或粪样，加入抽提缓冲液500 μ L，充分研磨，37 $^{\circ}$ C温浴1 h。

7.2.2 加入2.5 μ L 20 mg/mL的蛋白酶K，充分混匀后50 $^{\circ}$ C水浴3 h，期间颠倒混匀。

7.2.3 将溶液冷却至室温，加入等体积的Tris饱和酚，颠倒混匀10 min，10000 rpm离心5 min，分离水相和有机相。

7.2.4 水相移至新的1.5 mL离心管中，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇（25 : 24 : 1），颠倒混匀10 min，10000 rpm离心1 min分离水相和有机相。

7.2.5 水相移至新的1.5 mL离心管中，加入等体积的氯仿/异戊醇（24 : 1），颠倒混匀10 min，10000 rpm离心1 min分离水相和有机相。

7.2.6 水相移至新的1.5 mL离心管中，加入100 μ L 10 mol/L乙酸铵，混匀后，再加入2倍体积（-20 $^{\circ}$ C）预冷的无水乙醇混匀，-20 $^{\circ}$ C静置2 h。10000 rpm离心10 min，弃上清。

7.2.7 70%乙醇洗涤沉淀2次，每次，10000 rpm离心5 min，弃上清。无色透明的DNA沉淀于室温晾干。

7.2.8 加入100 μ L无菌水溶解DNA，备用，或者溶解于100 μ L无菌的Tris-EDTA缓冲液并保存于-20 $^{\circ}$ C。

7.3 重组酶聚合酶扩增微流控芯片检测

7.3.1 微流控芯片的制作修改参考大黄鱼

a) 微流控芯片的制作应符合GB/T 41521的规定。

b) 引物和探针预混：上游引物（10 μ mol/L）、下游引物（10 μ mol/L）、探针（10 μ mol/L）按照5 : 5 : 3的体积比，进行配制；配制后，稀释10倍，制成引物和探针预混液。

c) 引物包埋：在无菌 II 级生物安全柜内，使用移液器将2.6 μ L引物和探针预混液精准滴加至微流控芯片的指定反应池中，每个反应池对应一个特定靶基因。完成点布后，于室温下自然干燥约30 min。干燥完成后，使用热封膜进行封装，制备成微流控芯片。

注：用于内参对照的质粒与其配套引物和探针同步滴加至预设的内参反应池中。芯片需在避光条件下运输和保存。

7.3.2 反应体系构建

30 μ L反应体系，包括RPA反应试剂17.6 μ L、280 mmol/L的醋酸镁1.5 μ L、DNA模板1.5 μ L，不含核酸的无菌水9.4 μ L。在冰浴条件下，将各组分加入1.5 mL离心管，充分涡旋混匀后瞬时离心。

7.3.3 加样与封片

将配制的反应体系全部加入到微流控芯片的加样孔，用封口膜封住加样孔与排气孔，使用刮片赶走封口膜处气泡，确保封口膜完全贴合密封。

7.3.4 RPA反应与检测

将封好膜的微流控芯片迅速放置于适配的微流控芯片核酸检测仪，按1600 rpm低速离心10 s，4600 rpm高速离心30 s，39 $^{\circ}$ C等温扩增20 min。

8 结果判定

8.1 检测阈值线设置

阈值线设定原则为：阴性对照基线荧光信号的平均值加上10倍标准差，可通过仪器配套软件自行分析计算得出。

8.2 质量控制

- a) 阴性对照：20 min内，扩增曲线荧光强度应始终低于阈值线。
- b) 内参对照：20 min内，出现典型的扩增曲线。
- c) 阳性对照：60 min内，出现典型的扩增曲线。

8.3 结果判定

判定标准如下：

- a) 阳性：20 min内，检测孔出现典型的扩增曲线，判定对应检测指标为阳性。
- b) 阴性：20 min内，检测孔的荧光强度应始终低于阈值线，判定对应检测指标为阴性。

9 生物安全

9.1 采样及检测过程所涉及的实验操作按GB 19489规定执行。

9.2 检验过程中防止交叉污染的措施应符合GB/T 27401的规定。

9.3 样本灭活建议：对于高风险或来源不明的病原样本（如患病虾组织或其提取液），建议在生物安全柜中采用100℃沸水浴处理10 min或121℃高压灭菌15 min～30 min进行彻底灭活。

9.4 废弃芯片与样本废弃物处理规定：检测结束后的微流控芯片、使用过的耗材及残余样本，应作为感染性生物废弃物处理。推荐采取如下处理流程：

- a) 芯片及相关耗材应统一收集，置于专用耐高温生物废物袋中；
- b) 使用121℃高压蒸汽灭菌30 min以上；
- c) 灭菌确认后按医疗废弃物处理规范交由具备资质的单位统一处置。

附 录 A
(资料性)
使用的引物和探针序列

使用重组酶聚合酶扩增微流控芯片法检测对虾急性肝胰腺坏死病致病弧菌、白斑综合征病毒、传染性皮下及造血器官坏死病毒、对虾十足目虹彩病毒、虾肝肠胞虫的引物和探针序列见表A. 1

表A. 1 对虾急性肝胰腺坏死病致病弧菌、白斑综合征病毒、传染性皮下及造血器官坏死病毒、对虾十足目虹彩病毒、虾肝肠胞虫检测所用引物和探针序列

病原名称	检测靶标核酸	引物/探针名称	序列 (5' -3')
EHP	SSU rRNA	EHP-F	AGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAAC
		EHP-R	CTTAGTTTTTCGGGCTCTGGGGATAGTACGC
		EHP-P	TAGAACTACAGCGGTGCTAATCACTTTCGA/FAM-dT//THF/C/BHQ-dT/CTAGCCTTCGTCTTG/C3spacer/
IHHNV	IHHNV-ORF1	IHHNV-F	CCTGGGAATTCGAGAGGGAACAGGAAACGG
		IHHNV-R	CACTGATGTAAGTAATTCCTCTCTGTCTCT
		IHHNV-P	ACAATTCAACTTGGAAAGTGAATCAGAAACC/BHQ1-dT/C/THF/C/FAM-dT/TGGAAGTGTGGAA/C3spacer/
SHIV	主要衣壳蛋白	SHIV-F	CAGATCAGAGCGCATTTCGATCCCATAGGCACCGC
		SHIV-R	CGTAAGAGAACATGTGGTATCCGGTGAGTTCGGG
		SHIV-P	ATACGAATCTTCAGATCGTATCCCGTGA/FAM-dT/G/THF/C/BHQ1-dT/GCCGATTACTTCTC/C3spacer/
V _{AHPND}	<i>PirA</i> 和 <i>PirB</i>	V _{AHPND} -FA	CGTAGTGTAGACATTGAGAATACGGGACGTG
		V _{AHPND} -RA	CTGATGATAGAATGCATTATCAGGGCGTTG
		V _{AHPND} -PA	CTGGCGGCTGGAAGTGGCTAAATCACATG/FAM-dT//THF/G/BHQ1-dT/ACAACGTGATGAAAC/C3spacer/
		V _{AHPND} -FB	TACTCATTACTTGATTGGACTTGAAGAGAAC
		V _{AHPND} -RB	CGATACATCATCATAAAGCTTATCAATATTAC
		V _{AHPND} -PB	CAACTGTAAGTCTTCAAATTACTTACATGGC/FAM-dT//THF/G/BHQ1-dT/GGTCTGGATTATAAG/C3spacer/
WSSV	WSSV-ORF42 1	WSSV-F	CATGGATGAAAACCTCCGATTCTGTGAC
		WSSV-R	CATCAGACTTTCATTGCGGATCTTGATTTTG
		WSSV-P	TGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGA/BHQ1-dT/G/THF/C/FAM-dT/GATGTGCCTTTGAC/C3spacer/
注	C3spacer: 1种含有3个碳原子的修饰基团, 阻断DNA聚合酶从3' 末端延伸		

附录 B
(规范性)
试剂配制方法

B.1 抽提缓冲液的配制：1 mol/L Tris·HCl (pH 8.0) 1 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL, 1 g/L 胰 RNA 酶 2 mL, 10% SDS 5 mL, 加无菌水定容至 100 mL, 混匀, 室温储存。

B.2 蛋白酶 K 的配制 (20 mg/mL)：蛋白酶 K 20 mg, 加入 1 mL 无菌水, 溶解后分装于无菌离心管, -20 °C 保存。

B.3 Tris 饱和酚可使用商品化试剂, 或按下列方法配制：将重蒸酚溶化后, 加入 8-羟基喹啉 (0.1%) 和 β-巯基乙醇 (0.2%), 混匀; 再加入等体积的 1 mol/L Tris (pH 8.0) 进行平衡, 重复操作至水相 pH 为 8.0。弃去水相后, 于棕色瓶中 4 °C 避光保存。

注意：Tris 饱和酚具有强刺激性, 应在通风橱中操作。

B.4 乙酸铵的配制 (10 mol/L)：乙酸铵 77 g, 加入 30 mL 无菌水, 溶解后定容至 100 mL, 经 0.45 μm 滤膜除菌。4 °C 保存。

B.5 Tris-EDTA 缓冲液的配制 (pH 8.0)：1 mol/L Tris·HCl (pH 8.0) 10 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 2 mL, 加无菌水定容至 1000 mL, 高压蒸气灭菌, 4 °C 储存。