

团体标准

T/CI XXX-2023

养殖鱼类重要病原微阵列基因芯片 检测方法

Detection method of microarray gene chip for important
pathogens in cultured fish
(征求意见稿)

2023-X-X 发布

2023-X-X 实施

中国国际科技促进会 发布

中国国际科技促进会(CIAPST)是1988年经中华人民共和国国务院科技领导小组批准而成立的全国性社会团体。制定团体标准、开展标准国际化和推动团体标准实施,是中国国际科技促进会的工作内容之一。任何团体和个人,均可提出制、修订中国国际科技促进会团体标准的建议并参与有关工作。

中国国际科技促进会标准按《中国国际科技促进会标准化管理办法》进行制定和管理。

中国国际科技促进会征求意见稿经向社会公开征求意见,并得到参加审定会议的80%以上的专家、成员的投票赞同,方可作为中国国际科技促进会标准予以发布。

在本标准实施过程中,如发现需要修改或补充之处,请将意见和有关资料寄给中国国际科技促进会标准化工作委员会,以便修订时参考。

任何团体和个人,均可对本标准征求意见稿提出意见和建议,牵头起草单位联系方式:
suxiurong@nbu.edu.cn。

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》起草。

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。

本文件由中国国际科技促进会标准化工作委员会提出。

本文件归口中国国际科技促进会。

本文件起草单位：省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室、宁波大学海洋学院、自然资源部海洋第一研究所、浙江正合谷生物科技有限公司、青岛南凌生物科技有限公司、山东北游生物科技有限公司、象山蓝尚海洋科技有限公司。

本文件主要起草人：苏秀榕、周君、陈炯、李成华、史西志、徐嘉杰、王中华、韩姣姣、叶欢、伊祥华。

本文件为首次发布。

引 言

人工养殖鱼类包括海水养殖和淡水养殖鱼类。其重要病原包括病毒、细菌和寄生虫。引起的疾病鲤浮肿病毒、鲤疱疹病毒Ⅱ型、草鱼呼肠孤病毒、牙鲆弹状病毒、传染性造血器官坏死病毒、传染性脾肾坏死病毒、锦鲤疱疹病毒、真鲷彩虹病毒、鲤春病毒血症病毒、罗非鱼湖病毒、病毒性出血性败血症病毒、病毒性神经坏死病、刺激隐核虫、多子小瓜虫、溶藻弧菌和鳃弧菌等。这些病原大部分会引起疫病，它们造成的经济损失十分严重。鉴于此，高通量检测这些病原，将促进水产养殖业的健康发展。

本文件由省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室组织实施。

养殖鱼类重要病原的微阵列基因芯片检测方法

1 范围

本文件规定了鲤浮肿病毒、鲤疱疹病毒 II 型、草鱼呼肠孤病毒、牙鲆弹状病毒、传染性造血器官坏死病毒、传染性脾肾坏死病毒、锦鲤疱疹病毒、真鲷彩虹病毒、鲤春病毒血症病毒、罗非鱼湖病毒、病毒性出血性败血症病毒、病毒性神经坏死病、刺激隐核虫、多子小瓜虫、溶藻弧菌和鳃弧菌等 16 种病原的基因芯片检测相关技术。

本文件适于参与水生动物病害筛查病和渔业主管部门对疫病的监测和进行对水产养殖病害的调查。

2 规范性引用文件

文中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改本）均适用于本标准。

GB /T 27990-2011 生物芯片基本术语 标准

GB/T 34733-2017 海水鱼类刺激隐核虫病诊断规程

GB /T 34734-2017 淡水鱼类小瓜虫病诊断规程

SC/T 7011.1—2007 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 7013—2008 水生动物产地检疫采样技术规范

SN/T 1152—2011 鲤春病毒血症检疫技术规范

SC/T 7225—2017 草鱼呼肠孤病毒逆转录环介导等温扩增（RT-LAMP）检测方法

SC/T 7228—2019 传染性肌坏死病诊断规程

SC/T 7229—2019 鲤浮肿病诊断规程

SN/T 2734—2010 传染性鲑鱼贫血病检疫技术规范

SN/T 2706—2010 鱼淋巴囊肿病检疫技术规范

SN/T 2850—2011 病毒性出血性败血症检疫技术规范

SN/T 2982—2011 牙鲆弹状病毒病检疫技术规范

SN/T 3584—2013 草鱼出血病检疫技术规范

SN/T 1674—2014 锦鲤疱疹病毒病检疫技术规范

SN/T 1675—2014 真鲷彩虹病毒病检疫技术规范

SN/T 2121—2014 流行性造血器官坏死检疫技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光标记技术 Fluorescence labeling

将荧光基团（荧光素）共价连接到蛋白、核酸等分子上的过程。常用的荧光素有异硫氰酸荧光素、羟基荧光素、四氯荧光素、罗丹明类染料、菁染料、香豆素类、吖啶类、苝类等。

3.2

非荧光标记技术 None fluorescent labeling technology

将能直接产生颜色反应的物质共价连接到蛋白、核酸等分子上的过程。常用的非荧光标记物有碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、过氧化物酶、纳米金等。

3.3

DNA 分子杂交 DNA hybridization

互补的核苷酸序列通过 Watson-Crick 碱基配对形成稳定的杂合双链分子 DNA 分子的过程称为杂交。

4 缩略语 (Abbreviation)

CEV: 鲤浮肿病毒 (Carp edema virus)

CyHV2: 鲤疱疹病毒II 型 (Cyprinid herpesvirus 2)

GCRV: 草鱼呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus)

HRV: 牙鲆弹状病毒 (Hirame rhabdovirus virus)

IHNV: 传染性造血器官坏死病毒 (Infectious haematopoietic necrosis virus)

ISKNV: 传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus)

KHV: 锦鲤疱疹病毒 (Koi herpesvirus)

RIDV: 真鲷彩虹病毒 (Red sea bream iridovirus)

SVCV: 鲤春病毒血症病毒 (Spring viraemia of carp virus)

TiLV: 罗非鱼湖病毒 (Tilapia lake virus)

VHSV: 病毒性出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus)

VNNV: 病毒性神经坏死病 (Viral nervous necrosis virus)

Ci: 刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*)

Im: 多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*)

Val: 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)

Van: 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)。

SSC: 枸橼酸钠水溶液 (*Saline sodium citrate*)。

SDS: 十二烷基硫酸钠 (*Sodium dodecyl sulfate*)。

ddH₂O: 双蒸水 (*Double distilled H₂O*)。

NBT/BICP: 氯化硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐对甲苯胺 (*Nitro-blue-tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine*)。

5 原理概述

从带有病原的动物样品中提取基因组 DNA 或者 RNA (mRNA 需要反转录成 cDNA), 利用带有荧光/非荧光物质标记的特异性引物进行 PCR 扩增。待检的 PCR 产物, 与微阵列基因芯片上的探针进行杂交, 清洗后荧光标记的微阵列基因芯片用激光扫描仪扫描和结果判定。非荧光标记微阵列基因芯片杂交后清洗、与碱性磷酸酶标记的链霉亲和素结合, NBT/BICP 显色, 用生物芯片检测仪扫描和判定。

6 检测

6.1 仪器设备

PCR 扩增仪

恒温金属浴 (30-100℃)

离心机 (转速≤15000)

干燥箱

高压灭菌锅

漩涡振荡器

电泳仪和水平电泳槽

凝胶成像分析系统

激光扫描仪 (用于荧光标记基因芯片)

生物芯片检测仪 (用于非荧光标记基因芯片)

杂交盒 (4, 5, 10 矩阵)

湿盒

6.2 主要试剂和材料

以下试剂如非特殊说明，均为分析纯。实验用水符合 GB/T5582 的要求。所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

6.2.1 DNA 和 RNA 提取试剂

细菌、寄生虫和病毒 DNA 和 RNA 提取均使用相对应的试剂盒，并按照操作说明进行。

6.2.2 DNA 检测试剂

琼脂糖、Goldred 核酸染料、蓝色 Taq 酶 Mix、不同分子量的 DNA 标准物质、TAE 电泳缓冲液均为商品。

6.2.3 PCR 扩增试剂

荧光标记试剂管：Taq 酶 Mix、dNTP、扩增缓冲液、5'端标记 Hex 的引物。

非荧光标记试剂管：Taq 酶 Mix、dNTP、扩增缓冲液、5'端标记 Biotin 的引物。具体配方见附录 B

6.2.4 杂交试剂

杂交溶液、PC-Hex、PC-Biotin 的配方见附录 B

6.2.5 显色试剂

碱性磷酸酶抗体、抗体稀释液、NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色液的配方见附录 B。

6.2.5 无菌 ddH₂O

双蒸水 (ddH₂O) 121℃±2℃，高压灭菌 20min，冷却常温后无菌分装。

6.2.7 基因芯片试剂

引物、探针、阳性、阴性 DNA 序列见附录 A

7 取样

7.1 选取人工养殖的淡水鱼、海水鱼和观赏鱼等病原携带宿主。

7.2 样品的运输与保存

按照 GB/T18088 采样，GB/T28630 样品至少应在 4℃ 以上的环境中运输，实验室接收样品后应该尽快检测，如果暂时不能检测，应该将样品置于-80℃冰箱中。

8 检测

模板的制备和 PCR 扩增

8.1 DNA 和 RNA 模板制备按照试剂盒说明书提取。提取的 RNA 需要按照试剂盒说明反转成 cDNA 备用。

8.2 PCR 扩增

按照附录 B-1 配制 PCR 扩增体系，模板推荐量为 100 ng。PCR 扩增条件见附录 C。

8.3 杂交

8.3.1 解链：在 50-51°C 将杂交液融化并混匀，将 1/2 模板体积的 2× 杂交液与 PCR 产物混合，95°C 变性 5 min，混合液立即放置冰上约 3-5min，离心将管壁液体甩下，备用。

8.3.2 杂交：将芯片带标签一面朝上，完全插入多功能杂交盒的插槽中。用移液器通过加样孔缓慢注入变性后的杂交混合液，将杂交盒放入湿盒中，61°C，1 h。

8.4 芯片清洗

杂交结束后，从湿盒中取出杂交盒、抽出芯片，用纯净水冲洗芯片表面 1min，离心甩干。荧光标记基因芯片系列试剂盒在杂交结束后，按 8.4 步骤进行。非荧光标记基因芯片系列试剂盒在杂交结束后，按 8.6 步骤进行。

8.5 荧光标记芯片扫描及结果判读

8.5.1 扫描

将干燥后的芯片插入激光扫描仪的插槽中，按照仪器使用说明书进行芯片扫描仪。

8.5.2 结果判定

根据扫描仪获取的探针杂交点信号值判断检测结果。阳性结果的信号值 $\geq$ 背景信号平均值+4 $\times$ 标准差；同时满足信号值 $\geq$ 阴性对照信号平均值+4 $\times$ 标准差。阴性结果：信号值 $\leq$ 背景信号平均值+2 $\times$ 背景信号值标准差；同时满足，信号值 $\leq$ 阴性对照信号平均值+2 $\times$ 阴性对照信号值标准差。疑似结果：阴性对照信号平均值+2 $\times$ 标准差<信号值<阴性对照信号平均值+4 $\times$ 标准差；同时满足，背景信号平均值+2 $\times$ 标准差<信号值<背景信号平均值+4 $\times$ 标准差。

8.6 非荧光标记芯片扫描及结果判读

8.6.1 封闭

杂交结束后，从杂交盒取出芯片，冲洗干净后再装入杂交盒内，将封闭液从杂交盒加样孔加入，使其覆盖杂交区域，常温或 36°C 静置 20 min。

8.6.2 显色

吸出杂交液，水洗后将抗体液覆盖杂交区域，常温或 36°C 静置 30 min。然后吸出抗体液，加入纯净水并吸出。加显色液覆盖杂交区域，显色 1-3 min，待杂交区域出现浅紫立即吸出显色液，并用水洗，重新加入显色液，待再出现紫色，则将芯片与杂交盒分离，放入纯水终止显色反应，冲洗后离心甩干，使用便携式生物芯片检测仪或肉眼观察、识别和判断。

8.6.3 非荧光标记芯片分析及结果判读

使用便携式生物芯片检测仪进行扫描分析，结果由软件自动给出。根据检测仪获取的

探针杂交点信号值，经软件分析后进行结果判断。阳性结果：信号值 $\geq$ 四周背景信号平均值 $\times 10$ ，重复点阳性结果大于等于三分之二；且信号值 $\geq$ 定位质控信号均值 $\times 0.2$ ；同时满足，阳性信号点直径大于 10 像素。阴性结果：信号点直径 < 10 像素；或信号值小于定位质控信号均值 $\times 0.1$ ；或信号值 $<$ 四周背景信号平均值 $\times 10$ ，平行点阳性结果小于 50%。疑似结果：信号值 $\geq$ 四周背景信号平均值 $\times 10$ ，或平行点阳性结果大于等于三分之一；且定位质控信号均值 $\times 0.2 >$ 信号值 $\geq$ 定位质控信号均值 $\times 0.1$ ；同时满足，信号点直径 > 10 像素。**结果报告：**若芯片检测结果为阳性或阴性，则结果报告为相应的病原微生物阳性或阴性；若检测结果为疑似，则分别按照相关标准进行进一步确证。

附录 A

养殖鱼类重要病原的微阵列基因芯片引物和探针 DNA 序列

CEV-F	GGAGTAACTTCACTGCTCA
CEV-R	AACCAGAATTCTACGTCTTCTC
CEV-p	TCTTCTGACTTTGGTGGAAAATAAATCATTGGACATCCTGT
CyHVII 2-F	ATCACCCGACTCGACCAA
CyHVII 2-R	AAAGGTACGGTTCACAAAGC
CyHVII 2-p	GGCAAATATTGGACATGCTCGTCAAAGAAGACTTGTT
KHV-F	AGGAGTTCCTCACGCAGT
KHV-R	AAAGAGTCGTCTTCCATGAAGG
KHV-p	ATGAACCACGACCTCATGTGCAAGTACATCCAGTACG
GCRV-F	GATCGCATTGCTTTCCCT
GCRV-R	ACTCAATCACATATACGTACGC
GCRV-p	ATATCACCCAAGGAGGTAACCCATATCTATCACTAACGACC
HRV-F	AGAAGTGTTTCATTTCAGGCCTCA
HRV-R	TTGGTTGGAATTTCAAGGACA
HRV-p	CACCCAATACCAAAGAGTGAAAGACTATTATGCACAGGA
IHNV-F	ACCTCAGACCACCTACCAG
IHNV-R	GCTGTCTCCTGGGCATAGT
IHNV-p	TCGAGAAGAAGATCCCAATGCAGACCTACTCAGTCAG
ISKNV-F	CTAGTGGAGGAGGTGTCGGTGTC
ISKNV-R	CATTGGTCAGTGCAGGTGCTAC
ISKNV-p	GCAGCAAACAGTCTGGCTACAACAAGATGATTGGCAT
RIDV-F	TGTGCTGTCGAGGTCATC
RIDV-R	AAACATGTCCACCAGGTTT
RIDV-p	CGCATCAGCAGATCCAAGGCATTAAGTCTTACGACAG
SVCV-F	AGTAAGCAGGTCTCCAAACC
SVCV-R	TGTACAATCTCCTCAGTTTGATCC
SVCV-p	ATGAGCCTCCACTGAACATGACCATCCGAGATTTATT
TiLV-F	CTGAGCTAAGGGAACGGCTATTGG
TiLV-R	TCCCTGCCTGAGTTGTGCT
TiLV-p	CTCATAAGCCTGCTACACAGAAGATATTGCCTCTACCAG
VHS-F	CAACACTTCACCGCCGACAAGG
VHS-R	TTGGATGGACCTCGCCTCTGAC
VHS-p	CGTTCATCCTGACTGAGATCGCAGACC
VNNV-F	AGCAGAACAGTCCGACCTC
VNNV-R	GAACACTCCAGCGACACAG
VNNV-p	CTGATACTCCTGTGTGTCGGCAACAACACTGATGT
Ci-F	TTCCAATCGGGTGGACTT
Ci-R	GCTTGGTTGAATTTCTTCACTT
Ci-p	GGACAAGGGGAATCCGACTGTTTATTTAAACATAGCATTGTGATGG

Im-F	CATCAAGCGGTGCTACTGG
Im-R	AAACTGCGTTATTGCCCTTG
Im-p	ATGTTTGGTTGAAGGAGTCACCTGAGATTCGTAGCAT
Val-F	TGTTTTGCTGCACTGGGGT
Val-R	AACCACATAGGGATCAGCGAAA
Val-p	GATTATGGGCGGGATGACTATCACACCTATGCGAAATA
Van-F	ATTCTCAGTGGCTCTTGGGC
Van-R	CCCCATCCCCAATCTAAGCC
Van-p	TCAGAATCTCATCCACCCAACCTTTACCAATGTAGTAGC

注，F:正向引物；R:反向引物；PC： 阳性对照；NC:阴性对照。R 引物的 5'端标记 Hex 为荧光标记微阵列基因芯片；R 引物的 5'端标记 Biotin 为非荧光标记微阵列基因芯片。

附录 B

1. 抗体稀释液配制

BSA 0.5%, NaN₃ 0.05 %, 用 0.05 mol/L pH=7.4 Tris-HCl 缓冲液配制。

2. 25 μ LPCR 扩增体系

2 $\times$ Taq PCR SuperMix 加 12.5 μ L, 引物加 1 μ L, 模板 1 μ L, 水加 10.5 μ L。

3. 杂交液

准确称取 10 g 硫酸葡聚糖, 34 mL 的 20 $\times$ SSC 溶液, 加入 20 mL 50 $\times$ Denhardt's Solution 溶液, 0.4 g SDS 粉末, 加入 4 ml 水, 45 ml 甲酰胺溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

4. 抗体稀释液

BSA 0.5%, NaN₃ 0.05 %, 用 0.05 mol/L pH=7.4 Tris-HCl 缓冲液配制。

附录 C

1. 普通 PCR 扩增条件：95℃预变性 5 min；95℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 40 s，40 个循环；72℃延伸 10 min。

2. 对流 PCR 扩增条件：第一区段温度 47℃，第二区段温度 65℃，第三区段温度 95℃，反应时间 60-80 min。

征求意见稿