



团 体 标 准

T/GDAAV 0112—2025

鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测技术规范

Technical Specification for Ultra-fast real-time PCR Detection of
Streptococcus agalactiae in Fish

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3 术语和定义	1
3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR.....	1
4 缩略语	1
5 试剂和耗材	2
5.1 试剂	2
5.2 引物和探针	2
6 仪器设备	2
7 样品采集与处理	2
7.1 采样工具	2
7.2 样品前处理	2
8 操作方法	3
8.1 DNA 提取	3
8.2 反应体系的配制.....	3
8.3 加样.....	4
8.4 超快速荧光 PCR 反应.....	4
9 结果判定	4
9.1 阈值设定	4
9.2 质控标准	4
9.3 结果描述及判定	5
附录 A（规范性） 溶液配置.....	6
附录 B（资料性） 引物、探针的名称、序列和工作浓度.....	7
附录 C（资料性） DNA 提取试剂盒方法（磁珠法）	8

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。

本文件由东莞市动物疫病预防控制中心、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、深圳市动植物疫病预防控制中心、深圳海关动植物检验检疫技术中心、广州白云机场海关综合技术服务中心、广州国家实验室、广东省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广东海大集团股份有限公司、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市厚街镇农业技术服务中心。

主要起草人：张险朋、林华剑、李 敏、管知深、李秋剑、阮周曦、翁文川、徐 强、李柏生、吴新伟、丁文桂、赖笑娴、王桂兰、王婉君、曹 兰、林仰孝、蒋文武、李小军、叶毅飞、钟群芳、刘雪怡、龙海鹰、邓海燕、莫钻兰、谭铭光、林梦哲。

鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测技术规范

1 范围

本文件描述了鱼类无乳链球菌的超快速荧光PCR检测方法。

本文件适用于鱼组织样品、鱼苗、细菌培养物、养殖池塘水、环境等样品中无乳链球菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR

一种基于快速温控模块技术（升降温速率40℃/s以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在8-15分钟内完成45个循环检测。

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: 阈值循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

BHQ1: 黑洞淬灭剂1 (Black Hole Quencher1)

BHQ2: 黑洞淬灭剂2 (Black Hole Quencher2)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

Cy5: 近红外荧光染料 (Near-infrared fluorescent dyes)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

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 6682二级水的要求。
- 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标准菌株，配制方法按照附录A中A.2。
- 5.1.4 内参为健康鱼肉组织（不含无乳链球菌）。
- 5.1.5 阴性对照为灭菌生理盐水，配制方法按照附录A中A.3。
- 5.1.6 超快速荧光PCR预混液（包含5×PCR buffer、Mg²⁺、dNTP）。
- 5.1.7 快速启动聚合酶（5U/μL）。
- 5.1.8 超快速荧光PCR反应板。
- 5.1.9 DNA提取试剂盒。

5.2 引物和探针

超快速荧光PCR扩增（无乳链球菌和内参）上、下游引物和探针序列参见附录B.1。

6 仪器设备

- 6.1 超快速荧光PCR仪。
- 6.2 移液器（量程：0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL）。
- 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

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

7.1 样品采集

7.1.1 采样工具

剪刀、镊子、1.5 mL离心管、研磨管等采样工具经过121℃（±2℃），高压灭菌15min，冷却后，烘干，备用。采样瓶使用前用5% HCL 溶液浸泡1 h以上，0.2 μm滤膜过滤的双蒸去离子水漱洗，密闭包装后置高压灭菌锅，121℃（±2℃），高压灭菌20min，冷却后，烘干，备用。

7.1.2 待检样本

待检样品可包括鱼组织，养殖池塘水、环境拭子。鱼组织：用75% 酒精棉球对样品体表进行擦拭消毒后，无菌操作取脑、肾脏、肝脏、脾脏等器官组织（采样数量、个体要求等应符合 应符合SC/T 7014的规定）。养殖池塘水：取待检水样50 mL于灭菌的采样瓶中。环境拭子：采集环境拭子时，将拭子来回刮2次~3次。

7.1.3 样品运输

样品运输应符合SC/T 7103的规定。

7.2 样品前处理

7.2.1 内参的制备

取绿豆大小（约150mg）的健康且未感染无乳链球菌的鱼肉，放置于匀浆管内，匀浆后待用或-20℃保存备用。

7.2.2 池塘水样品前处理

取水样1mL，12000 r/min离心1min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.3 环境拭子前处理

每支拭子加入1mL PBS溶液，充分震荡混匀，12000r/min离心1min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.4 细菌培养物

取细菌培养液1mL，12000r/min离心5min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。取可疑菌落，加入1mL PBS溶液，充分震荡混匀，12000r/min离心5min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.5 组织样品前处理

样品放入2mL研磨管中，加入1mL PBS溶液，放入生物样品均质器7000r/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，取200μL可直接用于核酸提取或-20℃保存备用。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

样品前处理后，除了鱼组织以外，其他类型样品加入内参参与提取。池塘水样品、环境拭子样品在提取核酸时，取处理后的样品150μL，加入7.2.1制备的内参50μL。DNA提取过程详见附录C，也可采用其他等效的DNA提取方法。

8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表1，总体积为40μL。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡。反应体系试剂可采用等效果的商品化试剂盒。

表1 超快速荧光PCR反应体系配制表

反应体系组分	用量（μL）
5×PCR Buffer	10.00
快速启动聚合酶（5 U/μL）	4.00

dNTP		0.80
无乳链球菌	F1 (10 μmol/L)	5.00
	R1 (10 μmol/L)	5.00
	P1 (10 μmol/L)	2.00
内参	F2 (10 μmol/L)	3.00
	R2 (10 μmol/L)	3.00
	P2 (10 μmol/L)	1.50
ddH2O		5.70
合计		40.00

8.3 加样

在各设定的超快速荧光PCR反应板中分别加入8.1提取的DNA溶液10μL，盖紧管后瞬时离心，取50μL反应液加入超快速荧光PCR反应板中。

8.4 超快速荧光 PCR 反应

8.4.1 上机

将8.3中加样后的反应板放入超快速荧光PCR仪中，记录样品放置顺序。

8.4.2 循环条件设置

95℃预变性，1min；95℃、1s，50℃，10s（收集荧光信号）（升降温速率40℃/s），45个循环。

8.4.3 荧光通道设定

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；内参为探针5'端标记报告荧光基团BHQ2，3'端标记淬灭荧光基团Cy5。

9 结果判定

9.1 阈值设定

超快速荧光PCR仪自动分析。

9.2 质控标准

阳性对照FAM通道（无乳链球菌）Ct值≤30.0，Cy5通道（内参）的Ct值≤35.0，并出现典型的“S”型扩增曲线。阴性对照FAM通道无Ct值，或无典型扩增曲线；Cy5通道（内参）的Ct值≤35.0，并出现典

型的“S”型扩增曲线。样品中的Cy5通道（内参）的Ct值 ≤ 35.0 ，并出现典型的“S”型扩增曲线。阳性对照、阴性对照和内参通道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 FAM通道无Ct值或无典型“S”型扩增曲线，Cy5通道（内参）的Ct值 ≤ 35.0 ，判为无乳链球菌核酸阴性。

9.3.2 FAM通道出现典型“S”型扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，Cy5通道（内参）的Ct值 ≤ 35.0 ，判为无乳链球菌核酸阳性。

9.3.3 FAM通道 $35 < \text{Ct值} < 45$ 且有典型“S”型扩增曲线，Cy5通道（内参）的Ct值 ≤ 35.0 ，判为可疑。可疑样品应重新检测，若重新检测 FAM通道无特异性扩增曲线或无Ct值或等于45则为无乳链球菌核酸阴性，若 FAM通道Ct值小于45且有典型“S”型扩增曲线则判为无乳链球菌核酸阳性。

附 录 A

（规范性）

溶液配置

A.1 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 溶液的配置

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 (K_2HPO_4) 0.2g, 氯化钠 (NaCl) 8g, 加二级水定容至1000 ml, 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

将无乳链球菌标准菌株接种于灭菌的BHI液体培养基, 210r/min、36℃摇床培养20 h后进行细菌平板计数, 无乳链球菌为1000 CFU/mL (± 10 CFU/mL)。用体积分数为0.5%的甲醛溶液于28℃条件下灭活48h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将菌液洗涤3次, 混匀, 分装至1mL冻存管保存, 于-20℃冰箱保存备用。

A.3 阴性对照

为灭菌生理盐水: 称取0.9g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

表B.1列出了超快速荧光PCR引物、探针信息和工作浓度。

表B.1 引物、探针的名称、序列和浓度

名称	序列 (5' — 3')	工作浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
无乳链球菌F1	GGTCTTAATGAAGGTTCTA	10
无乳链球菌R1	CAGCATTACGCAAAACAA	10
无乳链球菌P1	FAM-AGCCAACGAAGCCACTGTCTC-BHQ1	10
内参F2	CCTGGAGAAGAGCTACGA	10
内参R2	CTGCTGGAGCTGATACATGC	10
内参P2	BHQ2-GAARGAAGGCTGGAAGAG-Cy5	10

附 录 C

(资料性)

DNA 提取试剂盒方法 (磁珠法)

- C.1 取经过处理的样品、阳性对照和阴性对照200μL，直接加入装有715μL裂解液管中，漩涡混匀5s，室温静置10min使样品充分裂解，转移离心管至磁力架上，静置30s，磁珠完全吸附后吸弃上清液，将离心管从磁力架上取下。
- C.2 加洗涤液700μL至裂解液管中，振荡混匀30s，转移离心管至磁力架上，静置30s，磁珠完全吸附后吸弃上清液，将离心管从磁力架上取下。
- C.3 短暂离心收集管壁上的液滴，转移离心管至磁力架上，磁珠完全吸附后吸弃上清液。
- C.4 打开离心管盖，室温干燥3min晾干磁珠，将离心管从磁力架上取下。
- C.5 加洗脱液100μL至裂解液管中，振荡混匀，转移裂解液管至磁力架上，静置1min，磁珠完全吸附后小心将DNA溶液转移至一个新离心管中，应尽快用于下游试验，如不能立即使用，应置于-20℃储存。