

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4348—2015

螯虾瘟检疫技术规范

Quarantine protocol for crayfish plague

2015-12-04 发布

2016-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准修改采用世界动物卫生组织(OIE)《水生动物疾病诊断手册》(2014 年版)的 2.2.1,主要修改如下:

- 原文格式及内容顺序排版上作了调整,按照 GB/T 1.1—2009 进行编写;
- 原文中“Disease information”内容经修改简缩后作为本标准附录 A;
- 删除了原文“4.2. Clinical methods”内容;
- 原文 4.3.1.2.3.1. 普通 PCR 上游引物(B0 42)序列为 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CF-3'。该引物序列 3'末端有误。经与 OIE 参考实验室专家确认,正确的引物序列为 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3';
- 增加了实时荧光 PCR 方法 C_t 阈值的描述;
- 对原文“7. Corroborative diagnostic criteria”的表述形式进行了调整。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:贾鹏、史秀杰、王津津、于力、郑晓聪、何俊强、兰文升、刘荭、陈兵、王红英、叶奕优。

螯虾瘟检疫技术规范

1 范围

本标准规定了螯虾瘟的临床症状、病原分离、普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。
本标准适用于螯虾瘟的诊断、流行病学调查和监测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 概述

螯虾瘟(crayfish plague)是由 *Aphanomyces astaci* 感染十足目螯虾科和刺蛄科螯虾的一种水生动物传染性疾病。*A. astaci* 属于藻界(Chromista)、卵菌门(Oomycota)、卵菌纲(Oomycetes)、硅藻和褐藻类(Diatoms 和 Brown algae)。根据 *A. astaci* 对宿主的易感程度,检疫对象分为北美螯虾和高度易感螯虾两大类。北美螯虾是指野生或养殖于北美地区的所有种类螯虾,是 *A. astaci* 的自然携带者,被感染后通常无临床症状或死亡。高度易感螯虾是指除北美螯虾外,对 *A. astaci* 易感且易出现临床症状或死亡的螯虾(参见附录 A)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ITS:核糖体 DNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer)

ITS1:核糖体 DNA 内转录间隔区 1(internal transcribed spacer 1)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

CTAB:十六烷基三甲基溴化胺(cetyltrimethyl ammonium bromide)

UNG:尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-N-glycosylase)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

5 仪器和设备

5.1 倒置显微镜。

5.2 冷冻离心机。

5.3 微量移液器。

5.4 PCR 扩增仪。

- 5.5 实时荧光 PCR 仪。
- 5.6 水平电泳仪。
- 5.7 凝胶成像仪。
- 5.8 超净工作台。
- 5.9 恒温培养箱。
- 5.10 二级生物安全柜。

6 试剂和材料

- 6.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 6.2 螯虾瘟菌株:由指定单位提供。
- 6.3 无水乙醇,分析纯,使用前预冷至 -20°C 。
- 6.4 70%乙醇。
- 6.5 DNA 聚合酶: -20°C 保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。
- 6.6 dNTPs:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP。
- 6.7 螯虾瘟普通 PCR 检测引物 B0 42/B0 640:
 - 上游引物 B0 42:5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3';
 - 下游引物 B0 640:5'-CTA TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3';
 - 扩增 *A. astaci* ITS 基因中大小为 569 bp 片段。
- 6.8 螯虾瘟普通 PCR 复核引物 TS1/TS4:
 - 上游引物 TS1:5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3';
 - 下游引物 TS4:5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3';
 - 扩增 *A. astaci* ITS 基因中大小为 757 bp 片段。
- 6.9 实时荧光 PCR 引物及探针:
 - 上游引物 AphAstITS-39F:5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3';
 - 下游引物 AphAstITS-97R:5'-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3';
 - 探针:AphAstITS-60T:5'-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-3';
 - 扩增 *A. astaci* ITS1 基因中大小为 59 bp 的片段。

7 临床症状

高度易感螯虾感染 *A. astaci* 后,失去正常厌光性,独自游动,失去平衡,腹部朝上且不易翻转。病虾透明软角质层下肌肉组织有白色和棕色坏死斑点,发病初期前腹部和足关节处变白。有时可见局部透明软表皮和肌肉组织有褐色黑化病灶,在病灶表皮上可见棕色菌丝向外延伸。

北美螯虾感染 *A. astaci* 后,有时在其软角质层可见黑化病灶,但通常没有明显临床症状。

8 采样

样品包括活的、濒死的或死亡不超过 24 h 的螯虾,采样数量按照 GB/T 18088 规定执行,实验室检测条件应符合 GB 19489 的规定。

在运送活样品时,需将样品置于通气、潮湿且温度低于 16°C 的容器中,24 h 内送达实验室。对于濒死的或 24 h 内无法送达的样品,将其冷冻运输至实验室,待解冻后取靶器官组织,或将样品按体积比 1:10 固定于乙醇溶液(浓度高于 70%)后送检,但只能用于普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法检测。高

度易感螯虾取其腹部软角质层,北美螯虾取其腹部角质层、腹足和尾节。

9 诊断方法

9.1 病原分离

9.1.1 病原培养

无菌条件下,用蘸有无菌水的棉签或滤纸小心擦拭螯虾腹部软组织或其他可能被污染的部位。用无菌手术刀将易感部位、病灶的肌肉组织或角质层横切下来,置于含有双蒸水的培养皿中轻轻漂洗后,将其切成 $3\text{ mm}^2 \sim 5\text{ mm}^2$ 的小块,置于 IM 培养基(见附录 B 中 B.1)表面,用封口膜密封后置于 $16\text{ }^\circ\text{C} \sim 24\text{ }^\circ\text{C}$ 培养并逐日观察。

9.1.2 孢子囊、初级游走孢子和次级游走孢子的诱导

无菌条件下,取 9.1.1 中带有生长活力菌丝的一小团琼脂(直径约 $3\text{ mm} \sim 4\text{ mm}$),置于含有 30 mL 灭菌池塘水(见 B.2)的培养皿。 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 $12\text{ h} \sim 15\text{ h}$ 或者 $16\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 $20\text{ h} \sim 30\text{ h}$,倒置显微镜下观察。

9.1.3 结果判定

若观察到孢子囊、初级游走孢子或次级游走孢子,判定病原分离方法检测结果为阳性。

9.2 普通 PCR 方法

9.2.1 设立对照

从提取 DNA 开始,每个步骤均需设立阳性对照、阴性对照、空白对照。取已知含有 *A.astaci* 的样品作为阳性对照,取已知无 *A.astaci* 的样品作为阴性对照,取等体积的水作为空白对照。

9.2.2 核酸抽提

螯虾组织和培养后的菌丝均可用于核酸提取。

直接从螯虾组织中提取 DNA 核酸。无菌条件下,用蘸有无菌水的棉签清洗螯虾体表,取螯虾易感组织 $30\text{ mg} \sim 50\text{ mg}$,置于液氮研磨成粉状。将样品转入 2 mL 离心管,加入 $900\text{ }\mu\text{L}$ CTAB(见 B.3),上下颠倒混匀, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 作用 2 h 。加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 抽提液 I(见 B.4),振荡混匀 1 min 。 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min 。取上层水相于新的离心管,加入 $700\text{ }\mu\text{L}$ 抽提液 II(见 B.5),上下颠倒混匀, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min 。取上层水相于新的离心管,加入 1.5 倍体积的预冷无水乙醇,上下颠倒混匀。 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀 2 h 或更长时间, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min 。弃上清液,于沉淀中加入 75% 乙醇溶液 $800\text{ }\mu\text{L}$,漂洗沉淀, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min 。弃上清液,将离心管倒置于滤纸上,室温干燥 30 min 。向 DNA 沉淀中加 $50\text{ }\mu\text{L}$ TE 缓冲液(见 B.6), $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

从培养后的菌丝中提取 DNA 核酸。无菌条件下,从琼脂培养基表面刮取少量菌丝,无需使用液氮研磨,直接抽提核酸,步骤同上。

在实验过程中,可采用蛋白酶 K 消化裂解法或其他同等效果的商业化 DNA 抽提试剂盒代替以上方法。

9.2.3 反应体系

普通 PCR 方法包括 2 对特异性引物,分别为 B0 42/B0 640 和 TS1/TS4。其中,普通 PCR 检测首选 B0 42/B0 640 引物,TS1/TS4 引物仅用于阳性结果复核。

SN/T 4348—2015

B0 42/B0 640 引物和 TS1/TS4 引物的 PCR 反应体系相同。10×PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 模板 DNA 2 μL, 双蒸水补充总体积至 50 μL。瞬时离心后置于 PCR 扩增仪。

9.2.4 反应条件

9.2.4.1 使用 B0 42/B0 640 引物时, 普通 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 再延伸 7 min; 4 °C 保存。

9.2.4.2 使用 TS1/TS4 引物时, 普通 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 再延伸 7 min; 4 °C 保存。

9.2.5 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见 B.7)配制 1.5% 的琼脂糖(含 0.5 μg/mL 溴乙啶, 见 B.8)凝胶板。将其放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液盖过胶面。取 5 μL PCR 产物和 1 μL 6×上样缓冲液(见 B.9)混匀后加入样品孔, 5 V/cm 电泳约 40 min 后, 置于凝胶成像仪观察结果。

9.2.6 结果判定

9.2.6.1 阳性对照应扩增出大小为 569 bp 或 757 bp 的特异性条带, 阴性对照和空白对照不能扩增出 569 bp 或 757 bp 的特异性条带。若对照不成立应重新实验。

9.2.6.2 被检样品未扩增出任何条带, 或虽有条带, 但大小不是 569 bp 或 757 bp, 则判定普通 PCR 方法检测结果为阴性。

9.2.6.3 若被检样品扩增出大小为 569 bp 或 757 bp 的特异性条带, 则判定普通 PCR 方法检测结果为阳性。

9.3 实时荧光 PCR 方法

9.3.1 设立对照

同 9.2.1。

9.3.2 核酸抽提

同 9.2.2。

9.3.3 反应体系

PCR 预混液(见 B.10) 12.5 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, 探针 (10 μmol/L) 0.5 μL, DNA 模板 5 μL, 双蒸水补充总体积至 25 μL。

9.3.4 反应条件

50 °C 5 min 激活 UNG 酶; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 58 °C 60 s, 共 50 个循环。

9.3.5 结果判定

9.3.5.1 阳性对照 Ct 值小于 35, 并有典型扩增曲线。阴性对照和空白对照无 Ct 值且无扩增曲线。若对照不成立应重新实验。

9.3.5.2 被检样品无 Ct 值且无扩增曲线, 或 Ct 值大于 40, 可判定为实时荧光 PCR 方法检测结果为阴

性。若被检样品 Ct 值小于 35 且有典型扩增曲线,可判定实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性。

9.3.5.3 若被检样品 Ct 值大于 35 而小于 40,应重新抽提核酸,调整实时荧光 PCR 反应的模板浓度后重新实验。重新实验后,若 Ct 值大于 40 则判定实时荧光 PCR 方法检测结果为阴性;若 Ct 值小于 40 则判定实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性。

9.4 PCR 产物测序及分析

9.4.1 普通 PCR 产物测序及分析

当 B0 42/B0 640 引物扩增产物的测序结果与参考序列(参见附录 C 中 C.1)同源性为 100%,则判定为 *A. astaci* 基因序列。

当 B0 42/B0 640 引物扩增产物的测序结果与参考序列(参见 C.1)同源性低于 100%,则需要使用 TS1/TS4 引物对该样品进行 PCR 复核。当 TS1/TS4 引物扩增产物的测序结果与参考序列(见 C.2)相符,则判定为 *A. astaci* 基因序列。

9.4.2 实时荧光 PCR 产物测序及分析

若实时荧光 PCR 产物测序结果与参考序列(参见 C.3)相符,则判定为 *A. astaci* 基因序列。

10 综合判定

满足以下任何一条均可判定为螯虾瘟阳性:

- 无论样品是何种螯虾,若普通 PCR 方法检测结果为阳性且测序结果表明 PCR 产物为 *A. astaci* 基因;
- 无论样品是何种螯虾,若实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性且测序结果表明 PCR 产物为 *A. astaci* 基因;
- 无论样品是何种螯虾,若病原分离方法检测结果为阳性,且普通 PCR 或实时荧光 PCR 对培养物检测结果为阳性;
- 高度易感螯虾出现临床症状或死亡,而同一水域其他甲壳类水生动物未出现临床症状或死亡,且普通 PCR 或实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性;
- 高度易感螯虾出现临床症状或死亡,且该国或地区曾经发生或被检出过螯虾瘟,且普通 PCR 或实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性;
- 样品为北美螯虾,无论螯虾有无临床症状,普通 PCR 或实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性。

附 录 A
(资料性附录)
螯虾瘟

螯虾瘟(crayfish plague)是由 *Aphanomyces astaci* 感染螯虾(十足目螯虾科、刺蛄科)的一种水生动物传染病。*A. astaci* 属于藻界(Chromista)、卵菌门(Oomycota)、卵菌纲(Oomycetes)、硅藻和褐藻类(Diatoms 和 Brown algae)。

螯虾瘟分布广泛。该病在德国、法国、俄罗斯、芬兰、英国、瑞典、以色列、土耳其、希腊、挪威均有报道,但新西兰和澳大利亚被 OIE 认定为螯虾瘟无疫国。该病流行有一定规律,主要沿法国和德国两个方向,通过多瑙河进入巴尔干地区,横跨德国北部平原进入俄罗斯再向南传播至黑海,或向西北传播至芬兰。1907 年,该病传入瑞典,随后传入英国、以色列、土耳其、希腊和挪威,并造成巨大损失。1960 年,西班牙首次暴发该病。2007 年,英国养殖的土耳其小龙虾感染该病。另外,由于北美螯虾是 *A. astaci* 的易感宿主,所有种类北美螯虾均被认为有感染 *A. astaci* 的风险。

多种螯虾对 *A. astaci* 易感。欧洲西北部的奥斯塔欧洲螯虾(*Astacus astacus*)、欧洲西部和西南部的白爪小龙虾(*Austropotamobius plaiipes*)、欧洲西南部的巨石螯虾(*Austropotamobius torrentium*)和土耳其小龙虾(*Astacus leptodactylus*)等品种对 *A. astaci* 高度易感。实验条件下,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、澳大利亚种螯虾对 *A. astaci* 高度易感,死亡率达 100%。北美螯虾是 *A. astaci* 的自然携带者,通常不表现临床症状或死亡。北美螯虾是指在北美地区养殖或野生的所有种类螯虾,约有 350 种。例如北美淡螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、叉肢螯虾(*Orconectes* spp.)等。因此,从北美地区或疫区进口螯虾过程中,将螯虾瘟病原引入我国的风险较高。

OIE《水生动物疾病诊断手册》(2014 年版)的 2.2.1 中规定了螯虾瘟的临床症状、组织病理学、病原分离培养、普通 PCR、实时荧光 PCR、PCR 产物测序技术。感染初期,在螯虾薄表皮透明区域下的肌肉组织初期会变白,并伴有褐色黑化病灶,特别是前腹部和足关节。感染中期,螯虾表现为活动范围缩小,失去正常厌光性,白天在开阔水域可见到病虾,运动不协调。感染后期,病虾几乎失去平衡,背朝下而死。但是,北美螯虾感染 *A. astaci* 后,通常不表现任何临床症状,为螯虾临床检疫造成困难。因此,临床症状诊断方法具有很大局限性,不能对螯虾瘟进行确诊。

病原分离是检测螯虾瘟的方法之一,尤其普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法未建立前,病原分离结合其他技术(例如感染试验和组织病例切片等)成为螯虾瘟检测的重要方法。当培养温度大于 7℃ 时,*A. astaci* 可在 IM 培养基表面生长成单个无色菌落,菌丝大小为 5 μm~10 μm,无隔膜。发育阶段的菌丝内含大量粗糙颗粒状细胞质,折光率较强。中后期菌丝的细胞质边缘含有较大空泡,通过细的条状原生质与中央液泡相连接。后期菌丝表面相对光滑,没有任何物质,显微镜下可见游走孢子,可作为鉴定该病的重要参考。

由于仅参考临床症状或病原分离培养结果无法确诊螯虾瘟,普通 PCR 和实时荧光 PCR 结合基因测序成为确诊螯虾瘟相对有效、快速的方法。另外,螯虾瘟阳性判定不仅与样品临床症状、病原分离、普通 PCR、实时荧光 PCR 和基因测序的检测结果密切相关,与样品的来源、样品种属分类、样品状态也有较大关系。

附 录 B
(规范性附录)
试剂及配方

B.1 IM 培养基

琼脂	12 g
酵母提纯物	1 g
葡萄糖	5 g
恶喹酸(Oxolinic acid)	10 mg
灭菌池塘水	1 000 mL

上述成分混合溶解,121 ℃ 高压灭菌 20 min,当冷却到 40 ℃ 时加入浓度为 1 g/mL 青霉素。无菌条件下,制备成平板培养基。

B.2 灭菌池塘水

池塘水是指存在于自然界的河流或湖泊水,而不是去除矿物质的水。将池塘水用滤纸过滤后,加入 2 倍体积的无菌水,121 ℃ 高压火菌 20 min,调节 pH 至 6~7。

B.3 CTAB 溶液

NaCl	8.19 g
EDTA	0.744 g
Tris-HCl	1.12 g
超纯水	60 mL

充分混匀后,用盐酸调节溶液 pH 至 7.5~8,加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)2 g,充分搅拌溶解,用超纯水定容至终体积 100 mL。使用前加巯基乙醇至终浓度为 0.25%。

B.4 抽提液 I

将 Tris-HCl 平衡酚与等体积三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)混合均匀后,移入棕色玻璃瓶,4 ℃ 保存。

B.5 抽提液 II

即三氯甲烷/异戊醇溶液。将三氯甲烷和异戊醇按体积比 24 : 1 进行混合,移入棕色玻璃瓶,4 ℃ 保存。

B.6 TE 缓冲液(pH8)

1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8)	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8)	2 mL

加入约 800 mL 的去离子水,均匀混合。溶液定容至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,冷却至室温后,4 °C 保存。

B.7 TBE 电泳缓冲液(10 倍浓缩液,pH8.3)

Tris	108 g
硼酸	55 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	2.9 g
加水定容至	1 000 mL

用 5 mol/L 的 HCl 调 pH 至 8.3。

B.8 溴乙啶(ethidium bromide,EB)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液。用时每 10 mL 琼脂溶液中加入 1 μL。

B.9 6×上样缓冲液

溴酚蓝 100 mg,加双蒸水 5 mL,在室温下过夜,待溶解后再称取蔗糖 25 g,加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中,摇匀后定容至 50 mL,加入 NaOH 溶液 1 滴,调至蓝色。

B.10 PCR 预混液(Applied Biosystems)

包括 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶,UNG 酶,含有 dUTP 的 dNTPs,ROX 参比染料,实时荧光 PCR 缓冲液。可采用同等效果的其他试剂。

附 录 C
(资料性附录)
参考基因序列

C.1 使用 B0 42/B0 640 引物扩增 *A. astaci* 基因组转录间隔区部分序列,PCR 产物大小为 569 bp,基因序列如下:

```

1  gcttgtgcta gggatgttct tgggacgac cgggctagca gaaggtttcg caagaagccg
61  atgtactttt aatcccttct taaataacat actgataaac ttagccgtca gaaatgatag
121 cttgtaataa aatacaactt tcaacagtgg atgtctaggc tgcacatcg atgaagaacg
181 ctgcgaactg cgatacgtaa tgcgaattgc agaattcagt gagtcataga aattttgaac
241 gcatattgca ctttcgggtt agtcctggaa gtatgtctgt atcagtgtcc gtttaatacaa
301 aattgttttg tctttggacg aagcagaatg tgaaggctct gtttcgacaa gtccttttaa
361 atgacgggcc ctgtatagct gttcaagtac attatacaaa ggtctatatg attctgattt
421 cgaatgtttt gtgttgaaat tgcacaactt ttgaaagaag gctaaattgc ggtagttttg
481 cttgtgtttc ggcacgggtg aacaacatat tgccttttat gtcgtctgga agaggtttgt
541 agttgaaggc agaatgcgga gtcggatag

```

C.2 使用 TS1/TS4 引物扩增 *A. astaci* 基因组转录间隔区部分序列,PCR 产物大小为 757 bp,基因序列如下:

```

1  tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta tccacaccaa aaaactatcc acgtgaatgt
61  attctttata aggcttgtgc tgggatgttc ttcgggacga cccggctagc agaaggtttc
121 gtcaagaagc cgatgtactt ttaatecctt cttaaataac atactgataa acttagccgt
181 cagaaatgat agcttgtaat aaaatacaac tttcaacagt ggatgtctag gctcgcacat
241 cgatgaagaa cgctgcgaac tgcgatagct aatgcgaatt gcagaattca gtgagtcac
301 gaaattttga acgcatattg cacttcggg ttagtcctgg aagtatgtct gtatcagtgt
361 ccgttaatac aaaattgttt tgtctttgga cgaagcagaa tgggaaggtc ttgtttcgac
421 aagtcctttt aaatgacggt cctgtatag ctgttcaagt acattataca aaggctcata
481 tgattctgat ttcgaatggt ttgtgttgaa attgcacaac ttttgaaaga aggctaaatt
541 gcggtagttt tgcttgtgtt tcggcacggg tgaacaacat attgcttttt atgtcgtctg
601 gaagaggttt gtaagttgaa ggcagaatgc ggagtcggat agtatggtct ggtgtgcttg
661 tgtctatatg gaagcaaatt gggaaacaac atccaatttg gaccatgata tcagacaaga
721 ctaccgctg aatttaagca tatcaataag cggagga

```

C.3 实时荧光 PCR 扩增 *A. astaci* 基因组转录间隔区 1 的部分序列,扩增产物大小为 59 bp,基因序列如下:

aaggcttgtgctgggatgttcttcgggacgacccggctagcagaaggtttcgcaagaag