



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4097—2015

贝类派琴虫实时荧光 PCR 检测方法

Real-time fluorescent PCR quarantine protocol for *Perkinsus* sp.in shellfish

2015-02-09 发布

2015-09-01 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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张雪、肇慧君、李叶、李振荣、贾赞。

贝类派琴虫实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了贝类中派琴虫的实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于贝类组织中派琴虫的检测。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 PCR real-time fluorescent PCR

在普通聚合酶链反应的基础上加入一条特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,*Taq* 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告基团和淬灭基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步,达到实时定量的目的。

3.2

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数,也可称为 C_p 值。

4 试剂和材料

4.1 1 mol/L Tris · Cl(pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)、SDS(10%)。溶液配制见附录 A。

4.2 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)。

4.3 Tris-饱和酚。

4.4 三氯甲烷。

4.5 异戊醇。

4.6 无水乙醇。

4.7 生理盐水。

4.8 10×PCR buffer、25 mmol/L $MgCl_2$ 、2.5 mmol/L dNTP、5 U/ μ L *Taq* 酶。

4.9 10 μ mol/L 上游引物、10 μ mol/L 下游引物、10 μ mol/L 探针。

4.10 TE 缓冲液(pH 8.0)。

5 仪器和设备

- 5.1 组织研磨器。
- 5.2 电子天平。
- 5.3 冷冻离心机。
- 5.4 涡旋振荡器。
- 5.5 水浴锅。
- 5.6 超纯水机。
- 5.7 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-80℃)。
- 5.8 高压灭菌锅。
- 5.9 实时荧光 PCR 仪。

6 检测步骤

6.1 取样

选取濒死的新鲜贝类样品,或者有感染派琴虫临床症状的样品(消化腺发白,贝壳不能闭合,套膜收缩,性腺发育受到抑制,生长迟缓等)。采集贝类的腮、套膜和消化腺等组织 25 mg,置于冰冷的生理盐水中反复冲洗,用滤纸吸干表面水分,在液氮中冻 5 min,放至室温,再置于匀浆研磨器中并加入冷的生理盐水 50 μ L,进行手工匀浆研磨。

6.2 DNA 提取和纯化

- 6.2.1 将匀浆液倒入 1.5 mL 离心管中,加入生理盐水补充体积至 200 μ L,加 20 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),再加 SDS 至终浓度为 1%,上下颠倒混匀。
- 6.2.2 混合液置于 55℃ 水浴锅内水浴 2.5 h。
- 6.2.3 向匀浆液中按 1:1 比例加入苯酚:三氯甲烷:异戊醇混合液(A.5),上下颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。
- 6.2.4 转移上层水相,加入等体积三氯甲烷:异戊醇混合液(A.6),上下颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。
- 6.2.5 转移上层水相,加入两倍体积的无水乙醇,-20℃ 放置 30 min 或过夜。
- 6.2.6 12 000 r/min 离心 5 min,沉淀 DNA,倾去上清液。
- 6.2.7 于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500 μ L,轻轻混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,倾去上清液,室温晾干。
- 6.2.8 用 20 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20℃ 保存备用。

组织 DNA 提取也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行操作。

6.3 实时荧光 PCR 检测

6.3.1 实时荧光 PCR 引物

该引物扩增派琴虫核糖体 DNA 序列中的 ITS 区域基因序列,扩增片段长度为 69 bp,参见附录 B。

上游引物:5'-TCAAAACGAAATTCCAACTCTCA-3'

下游引物:5'-CTTCGCTGCGTCCTTCATC-3'

Taqman 探针:5'-FAM-CGATGGATGCCTCGGCTCGAG-ECLIPSE-3'

引物与探针合成后配制成 100 μmol/L 储备液，-20 ℃ 保存备用。使用前均采用灭菌蒸馏水稀释为 10 μmol/L 加入体系。

6.3.2 实时荧光 PCR 反应体系

见表 1。

表 1 反应体系

试剂	体积/μL
10×PCR 缓冲液(不含 MgCl ₂)	2.5
MgCl ₂ 溶液(25 mmol/L)	4
dNTP 溶液(2.5 mmol/L)	2.5
上游引物(10 μmol/L)	0.5
下游引物(10 μmol/L)	0.5
探针(10 μmol/L)	0.5
Taq 酶(5 U/μL)	0.5
DNA 模板	10
灭菌蒸馏水	至总体积 25

6.3.3 实时荧光 PCR 反应参数

PCR 反应程序为：94 ℃ 预变性 3 min；94 ℃ 变性 10 s，57 ℃ 退火 30 s，共 40 个循环，每个循环结束后采集 FAM 通道数据。

6.4 结果判定

6.4.1 试验成立判定

试验结束后读取 Ct 值。反应结果应同时符合以下条件，否则试验结果无效：

- a) 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线；
- b) 空白对照无 Ct 值并且无扩增曲线；
- c) 阳性对照 Ct 值小于或等于 35 并且有明显扩增曲线。

6.4.2 试验结果报告

试验结果报告如下：

- a) 检测样品的 Ct 值大于或等于 40 时，判定为派琴虫阴性。
- b) 检测样品的 Ct 值小于或等于 35 时，判定为派琴虫阳性。
- c) 检测样品的 Ct 值大于 35 而小于 40 时，判定为可疑。此时可对样品重复进行荧光 PCR 检测，如果样品重复检测的 Ct 值大于或等于 40，则判定为派琴虫阴性；如果样品重复检测的 Ct 值小于 40，并且有明显扩增曲线，则判定为派琴虫阳性。

附 录 A
(规范性附录)
相关溶液配制

A.1 1 mol/L Tris · HCl 溶液(pH 8.0)

称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。

A.2 10%SDS

在 900 mL 水中溶解 100 g 电泳级 SDS,加热至 68 ℃助溶,加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 至 7.2,加水定容至 1 L,分装备用。

A.3 0.5 mol/L EDTA 溶液

称取 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)加入 700 mL 水中,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 10 mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,用水定容到 1 L,分装后高压灭菌。

A.4 TE 缓冲液(pH 8.0)

在 800 mL 水中依次加入 10 mL 的 1 mol/L Tris · HCl(pH 8.0)和 2 mL 的 500 mmol/L EDTA (pH 8.0),加水定容至 1 000 mL,在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。

A.5 苯酚:三氯甲烷:异戊醇溶液

将苯酚、三氯甲烷和异戊醇按照 25:24:1 的体积比混合。

A.6 三氯甲烷:异戊醇溶液

将三氯甲烷和异戊醇按照 24:1 的体积比混合。

A.7 蛋白酶 K 溶液

蛋白酶 K 冻干品,用高压灭菌的去离子水或双蒸水溶解为 20 mg/mL 的溶液,分装后于 -20 ℃保存,避免反复冻融。

A.8 10×PCR 缓冲液

将 KCl 和 MgCl_2 分别按 500 mmol/L 和 15 mmol/L 加入 100 mmol/L Tris · HCl 中,调节溶液的 pH 至 8.3,分装备用。

A.9 75%乙醇

将无水乙醇和灭菌去离子水按照 3:4 的体积比混合。

附 录 B
(资料性附录)
派琴虫 PCR 目标扩增序列

tcaaaacgaattcctcaactctca acgatgcctcggctcgagaatc gatgaaggacgcagcgaag

阴影部分为引物序列。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
贝类派琴虫实时荧光 PCR 检测方法
SN/T 4097—2015

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2016 年 3 月第一版 2016 年 3 月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066 • 2-29647 定价 16.00 元



SN/T 4097-2015