ICS 65.020 30
CCS B 43

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*

2025-09-26 发布　　2025-10-01 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
3.1 超快速荧光 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 生物安全措施 2
7.2 样品采集 2
7.3 样品前处理 3
8 操作方法 3
8.1 DNA 提取 3
8.2 反应体系的配制 3
8.3 超快荧光 PCR 反应 4
9 试验成立条件与结果判定 4
9.1 阈值设定 4
9.2 试验成立条件 4
9.3 结果判定 5
附录 A 溶液配制 6
附录 B 无乳链球菌和内参引物、探针的名称、序列 7
附录 C DNA 提取方法 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、珠海市动物疫病预防控制中心、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、东莞市横沥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、薛晓阳、翁文川、徐 强、李柏生、吴新伟、丁文桂、赖笑娴、王桂兰、王婉君、曹 蓝、林仰孝、蒋文武、李漪舟、李小军、叶毅飞、钟群芳、刘雪怡、蔡教英、龙海鹰、邓海燕、莫钻兰、谭铭光、林梦哲。

鱼类无乳链球菌快速荧光 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。

本文件适用于细菌培养物、鱼的苗种、鱼的组织样品、池塘水和环境等样品的无乳链球菌检测。

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8min～15min内完成45个循环反应。

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 Quencher 1）

BHQ2：黑洞淬灭剂2（Black Hole Quencher 2）

FAM：6-羧基荧光素（6-Carboxyfluorescein）

Cy5：近红外荧光染料（Near-infrared fluorescent dyes 5）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer solution）

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 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，所用试剂为分析纯。
5.1.3 阳性对照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 5×PCR buffer（含 Mg2+）。
5.1.7 dNTP。
5.1.8 快速启动聚合酶。
5.1.9 超快速荧光 PCR 反应板。
5.1.10 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）引物、探针序列信息见附录 B.1。

6 仪器设备

6.1 超快速荧光 PCR 仪。
6.2 移液器（量程：0.5μL～10μL、10μL～100μL、100μL～1000μL）。
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 高压灭菌锅。
6.7 pH 计。

7 样品采集与处理

7.1 生物安全措施

样品的采集和前处理应避免对病原分析结果有影响的因素发生，防止样品交叉污染。实验室生物安全符合 GB 19489 规定。

7.2 样品采集

7.2.1 采样工具

镊子、剪刀、1.5mL 离心管、 2 mL 组织研磨管、采样瓶等采样器具无菌处理。

7.2.2 样品采集

样品包括鱼苗（≦4cm）、鱼组织器官、养殖池塘水、环境拭子和细菌培养物。鱼苗：采样数量、个体要求等应符合 SC/T 7014 的规定。鱼组织器官：无菌操作取绿豆大小的脑、肾脏、肝脏、脾脏等器官组织。细菌培养物：取 200μL 待检。养殖池塘水：取适量的待检水样于采样瓶中。环境拭子：将拭

子来回涂抹 2 次～3 次后，立即放入装有 50%的甘油-PBS 液的离心管中，剪去露出部分，盖紧离心管盖，密封后冷藏保存。

7.2.3 样品运输

样品运输应符合 SC/T 7103 的规定。

7.3 样品前处理

7.3.1 内参样品的制备

取健康且未感染无乳链球菌鱼的鱼肉（绿豆大小），放置于组织研磨管内，匀浆后待用或-20 ℃保存备用。

7.3.2 鱼苗样品前处理

把整条鱼苗放入组织研磨管内，加入1mL PBS溶液，匀浆（7000r/min，20s/次，3次，每次间隔20s），瞬时离心后取200μL，用于核酸提取或-20 ℃保存备用。

7.3.3 组织器官样品前处理

取绿豆大小样品放入组织研磨管内，加入1mL PBS溶液，匀浆（7000r/min，20s/次，3次，每次间隔20s），瞬时离心后取200μL，用于核酸提取或-20 ℃保存备用。

7.3.4 池塘水样品前处理

取待检水样离心（12000 r/min，1 min），把上清液去掉，所得的沉淀物用于核酸提取或-20 ℃保存备用。

7.3.5 环境拭子样品前处理

取待检拭子充分震荡混匀后离心（12000 r/min，1 min），把上清液去掉，所得的沉淀物用于核酸提取或-20 ℃保存备用。

7.3.6 细菌培养物样品前处理

细菌培养液：混匀后，取1 mL细菌培养液离心（12000 r/min，5 min），把上清液去掉，所得的沉淀物用于核酸提取或-20 ℃保存备用。可疑菌落：取可疑菌落加入到1 mL 的PBS溶液中，震荡混匀后离心（12000 r/min，5 min），把上清液去掉，所得的沉淀物用于核酸提取或-20 ℃保存备用。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

样品前处理后，除了鱼组织和鱼苗以外，其他类型样品均加入内参参与提取。在提取池塘水样品、环境拭子样品的核酸时，取处理后的样品 150μL，内参 50μL。DNA 提取方法见附录 C，也可以采用经过验证的等效核酸提取方法。

8.2 反应体系的配制

检测反应体系总体积为50μL，混匀后瞬时离心，加入超快速荧光PCR反应板并放入超快速荧光PCR仪中，反应体系配制见表1。超快速荧光PCR反应体系也可以采用经过验证的等效商品化试剂盒。

表 1　超快速荧光 PCR 反应体系组分表

反应体系组分		用量（μL）
5×PCR Buffer（含Mg^{2+}）		10.00
快速启动聚合酶（5U/μL）		4.00
dNTP（25mmol/L）		0.80
无乳链球菌	F1（10μmol/L）	5.00
	R1（10μmol/L）	5.00
	P1（10μmol/L）	2.00
内参	F2（10μmol/L）	3.00
	R2（10μmol/L）	3.00
	P2（10μmol/L）	1.50
ddH2O		5.70
模板		10.00
合计		50.00

8.3　超快速荧光 PCR 反应

8.3.1　反应条件

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。

8.3.2　荧光通道设定

无乳链球菌选择FAM通道；内参选择Cy5通道。

9　试验成立条件与结果判定

9.1　阈值设定

阈值由超快速荧光 PCR 仪自动分析并设定。

9.2　试验成立条件

阳性对照中 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“S”型的扩增曲线。阴性对照 FAM 通道无扩增曲线或无 Ct 值；Cy5 通道（内参）的 Ct 值≤35.0，并

出现典型“S”型的扩增曲线。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均成立，试验有效，否则判定试验无效。

9.3 结果判定

9.3.1 FAM 通道无典型“S”型扩增曲线或无 Ct 值，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 Ct 值≤35，而且具有典型的“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阳性。

9.3.3 FAM 通道 35＜Ct 值＜45，而且具有典型的“S”型扩增曲线，Cy5 通道（内参）的 Ct 值≤35.0，判为可疑。结果为可疑时应用提取的核酸重新进行检测，若 FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值等于 45，或无典型的扩增曲则判为无乳链球菌核酸阴性；若 FAM 通道有典型“S”型扩增曲线，且 Ct 值小于 45，则判为无乳链球菌核酸阳性。

9.3.4 如 Cy5 通道 Ct 值 > 35.0 或无 Ct 值，则样品应重新检测，重测如 Cy5 通道 Ct 值≤35.0 则结果可采用。

附 录 A
（规范性）
溶液配制

A.1 0.01mol/L pH 7.2 PBS溶液的配制

称取磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4•12H_2O$）3.0g，磷酸氢二钾（K_2HPO_4）0.2g，氯化钠（NaCl）8g，加蒸馏水至1000ml，溶解后用NaOH调pH为7.2，经121℃（±2℃），高压灭菌15 min，保存备用。

A.2 无乳链球菌标准菌株的配制

将无乳链球菌标准菌株接种于灭菌的脑心浸出液液体培养基，36℃、210r/min摇床培养20小时，然后细菌平板计数，无乳链球菌浓度为1000CFU/mL（±10CFU/mL）。用0.5%的甲醛溶液（体积浓度）在28℃灭活48小时，用PBS液洗涤菌液3次，混匀后分装于冻存管中，-20℃保存备用。

A.3 生理盐水的配制及灭菌

称取0.9g氯化钠，加入蒸馏水溶解，定容至100ml，121℃（±2℃），高压灭菌15min，常温保存备用。

附 录 B
（资料性）
无乳链球菌和内参引物、探针的名称、序列

B.1 无乳链球菌和内参引物、探针的名称、序列

表B.1列出了超快速荧光PCR引物、探针序列。

表B.1 无乳链球菌和内参引物、探针的名称、序列信息

名称	序列（5’－3’）
无乳链球菌F1	GGTCTTAATGAAGGGTTCTA
无乳链球菌R1	CAGCATTACGCAAAACAA
无乳链球菌P1	FAM-AGCCAACGAAGCCACTGTCTC-BHQ1
内参F2	CCTGGAGAAGAGCTACGA
内参R2	CTGCTGGAGCTGATACATGC
内参P2	BHQ2-GAARGAAGGCTGGAAGAG-Cy5

附 录 C
（资料性）
DNA 提取方法

C.1 DNA 提取方法（磁珠法）

C.1.1 取阳性对照、阴性对照和经过处理的样品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.1.2 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.1.3 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.1.4 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.1.5 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。

C.2 细菌培养液核酸提取方法（高温裂解法）

取 200μL 细菌培养液，100℃, 15min 后, 12000 r/min，离心 5min, 上清于-20℃保存。