|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GXAS |   B 52 |

团体标准

T/GXAS XXXX—XXXX

虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法

Detection for Enterocytozoon hepatopenaei by real time PCR method

（本草案完成时间：2021.4）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

1. 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。

本文件由广西壮族自治区水产科学研究院提出并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区水产技术推广站、广西壮族自治区水产科学研究院。

本文件主要起草人：童桂香、江林源、韦信贤、林勇、谭红连、胡大胜、介百飞、李旻、李秀珍。

虾肝肠胞虫检测 荧光定量PCR法

* 1. 范围

本文件描述了虾肝肠胞虫荧光定量PCR检测法的试剂与材料、仪器设备、操作方法及结果判定。

本文件适用于虾肝肠胞虫的检测。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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实验方法

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

* 1. 试剂与材料
     1. 一般要求

本标准所用试剂如无特殊说明均为分析纯试剂；试验用水应符合GB/T 6682一级水的要求。

* + 1. 引物与TaqMan-MGB探针

上游引物EHP-qF、下游引物EHP-qR、TaqMan-MGB探针EHP-qP根据表1给出的寡核苷酸序列人工合成，扩增66bp的目的片段。使用浓度均为10 μmol/L。使用前按本标准要求先用灭菌DEPC水稀释，稀释后分装成小量置于-20℃保存备用，避免反复冻融。

1. 特异性引物及探针寡核苷酸序列及扩增的目的片段大小

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物/探针 | 序列（5′--3′） | 扩增产物（bp） |
| EHP-qF | CGCGGTAATTCCAACTCCAA | 66 |
| EHP-qR | TCTACGACTACGGACCCTTTAACTG |
| EHP-qP | FAM-AGTGTCTATGGTGGATGCT-MGB |

* + 1. DNA抽提试剂

商品化DNA抽提试剂盒。

异丙醇。

无水乙醇。

* + 1. 荧光定量PCR试剂

2×*Premix Ex Taq*™ (Probe qPCR)。

ROX Reference DyeⅡ或ROX Reference Dye：参考仪器使用说明，用以校正孔间荧光信号误差。

工作标准品为pMD18-T-SSU EHP：可委托生物公司制备，使用浓度为1.0×104拷贝/μL～1.0×107拷贝/μL。

阳性对照为已知EHP阳性的对虾组织，-80℃保存。

阴性对照为已知EHP阴性的对虾组织，-80℃保存。

空白对照以无菌双蒸水为模板。

* 1. 仪器设备及耗材
     1. 仪器设备

定量PCR仪。

高压灭菌锅。

组织匀浆机。

普通冰箱：具冷藏箱，可达到-18℃以下冷冻箱体。

超低温冷藏设备：可达到–80℃。

水浴锅或金属浴。

台式高速离心机：最高转速可达12000r/min以上。

旋涡振荡器。

微量离心机。

微量移液器。

* + 1. 耗材

微量移液器枪头。

1.5mL微量离心管：经高压蒸汽灭菌，一次性使用。

灭菌 0.2mL PCR 管：经高压蒸汽灭菌，一次性使用。

塑料或乳胶手套：一次性使用。

* 1. 操作方法
     1. 采样

样品采集按SC/T 7103的规定执行。

* + 1. 样品前处理

虾样按不同规格取不同组织。其中，受精卵、幼体、仔虾采集整条虾作为样品，3cm以下幼虾采集除虾眼外整条虾作为样品，3cm以上虾采集鳃、肝胰腺作为样品。采集的样品用组织匀浆机匀浆，立即进行DNA提取操作或–80℃超低温冰箱保存。

* + 1. 阳性对照样品和阴性对照样品的处理

阳性对照样品和阴性对照样品的采集和取样分别按6.1和6.2进行，将采集的虾组织样品匀浆后小量（30mg）分装于1.5mL离心管后置于-80℃超低温冰箱保存备用。每次检测前各取出1管阳性对照和阴性对照样品，与待检样品进行下面的操作。

* + 1. DNA的提取

取5.2中30mg样品，按照商品化动物组织基因组DNA快速提取试剂盒说明书提取总DNA，最后加60 μL洗脱缓冲液溶解DNA，置于-20℃保存备用。

* + 1. 荧光定量PCR

采用50μL反应体系。在荧光定量PCR管中依次加入灭菌DEPC水10.5μL，2×*Premix Ex Taq*™ (Probe qPCR) 25μL，ROX Reference DyeⅡ 0.5μL，上游引物EHP-qF、下游引物EHP-qR、探针EHP-qP各3μL，模板5μL。加完试剂后瞬时离心，将PCR反应管置于定量PCR扩增仪内，按下面反应程序进行反应：95℃预变性30s；95℃变性5s，60℃退火并延伸45s，扩增40个循环；在60℃结束时收集荧光信号。

* 1. 结果判定
     1. 定性检测

阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct值不显示且未出现扩增曲线，实验有效；若检测样品的Ct值小于或等于35，且有扩增曲线，则判为EHP DNA阳性；Ct值大于35，且有扩增曲线，则重复1次，如结果一致，判为EHP DNA阳性；Ct值大于35，重复结果未出现扩增曲线，判为EHP DNA阴性。

* + 1. 定量检测

标准曲线的相关系数小于或等于-0.970，阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct值不显示且未出现扩增曲线，实验有效。

检测样本中1×103拷贝/mg≤EHP DNA≤1×108拷贝/mg，测定结果有效，可直接报告阳性及相应的拷贝量。

检测样本中EHP DNA＞1×108拷贝/mg，即可直接报告为＞1×108拷贝/mg，也可用灭菌DEPC水10 倍梯度做相应稀释，使其拷贝量落在1×105拷贝/mg～1×107拷贝/mg 范围内再重新测定，测定结果应以稀释倍数进行校正。

检测样本EHP DNA的拷贝量为10拷贝/mg～1×103拷贝/mg 时，建议对该样本进行双份重试，如双份样本重试结果仍在10拷贝/mg～1×103拷贝/mg，则按实际值计算；如双份或一份重试结果＜10

拷贝/mg，则判断为阴性。

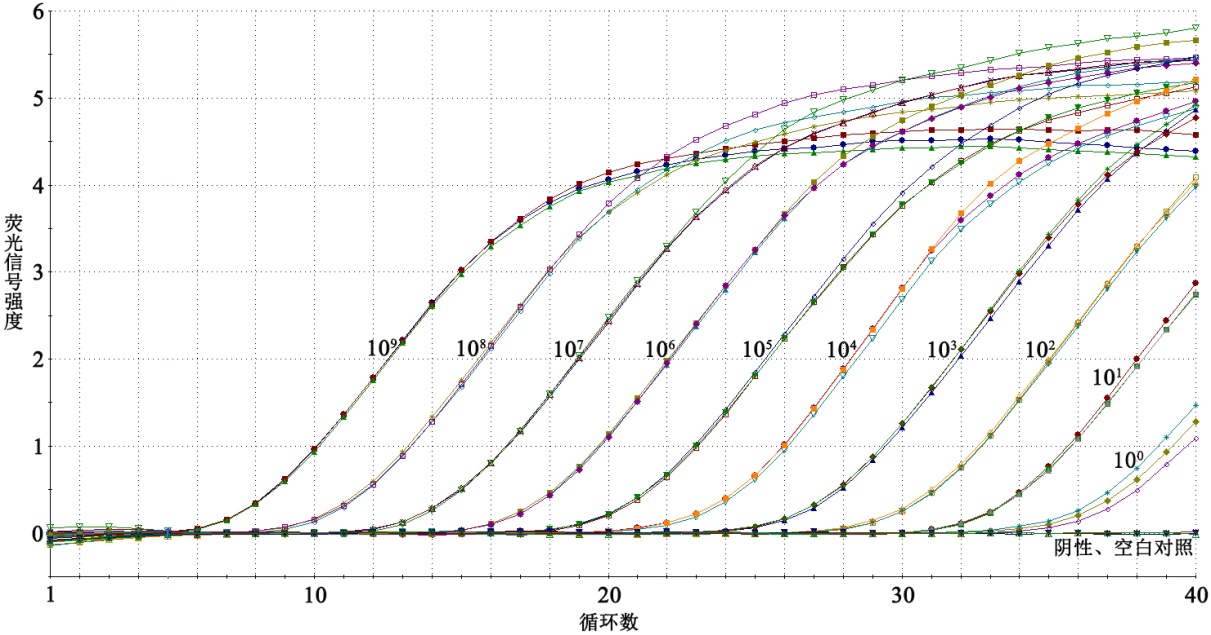
Ct值不显示时或EHP DNA的拷贝量＜10拷贝/mg，该样本EHP DNA为阴性。

2. （规范性）  
   EHP荧光定量PCR特异性引物及探针序列和检测结果图示
   1. EHP SSU rDNA基因序列及特异性引物和探针图示

GATGGCTCCCACGTCCAAGGGATGCAGCAGGCGCGAAAATTGTCCACTCTTTTGAGAGGAGACAGTTATGAAACGTGAGTAGAAGGGTCGAGTGTAAAAACCTTGACGTGAAGCAATTGGAGGGCAAGTTTTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAACTCCAAGAGTGTCTATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGTAGATGCAATTAAAAGGTGGTGTTAAAAGCCATTGAGTTTGTTGAGAGTAGCGGAACGGATAGGGAGCATGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCCACCTGGACCAACGGAGGCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAAACTATGCCGACAATGCTGGGTGTTGCGAGAGCGATGCTTGGTGTGGGAGAAATCTTAGTTTTCGGGCTCTGGGGATAGTACGCTCGCAAGGGTGAAACTTAAAGCGAAATTGACGGAAGGACACTACCAGGAGTGGATTGTGCTGCTTAATTTAACTCAACGCGGGAAAACTTACCAGGGTCAAGTCTATCGTAGATTGGAGACATGAGGTAGACAAGAGTGGTGCATGGCCGTTGGAAATTGATGGGGCGACTTTTAGCTTAAGTGCTGGAACCAGTGAGATCTTCTAGACAGGTGTTATTTAGGCACAGGAGGGAGAAGGCAATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGATATCCTGGGCAGCAAGCGCAATACAATATCTCTTGAGAAGACAAAGCAATTTGAGATGAGTAGGATTAGCTTTTGTAAATAAGCTATGAATGAGGAATTCCTAGTAACAGTGTCTCATCAAGGCATTGTGAATGTGTCCCTGTTC

* 1. EHP 荧光定量PCR检测结果图示

见图A.1。



* 1. 虾肝肠胞虫荧光定量PCR法对标准品(1.0×109~1.0×100 拷贝/μL)的扩增曲线

