

虾肝肠胞虫核酸检测技术规范

Molecular detection technical specification for *Enterocytozoon
hepatopenaei*

送审稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

前 言

本标准按照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。

本标准由浙江省农业农村厅提出并组织实施。

本标准由浙江省水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省水产技术推广总站、浙江省休闲观赏渔业行业协会、杭州市农业技术推广中心。

本标准主要起草人：朱凝瑜、郑晓叶、梁倩蓉、叶键、黄家庆、周凡、许婷、丁雪燕、吴洪喜。

虾肝肠胞虫核酸检测技术规范

1 范围

本标准规定了虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 套式PCR检测、SYBR荧光定量PCR检测、环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法所需试剂和材料、仪器和设备、操作步骤和结果判定。

本标准适用于虾类、饵料生物、养殖水体及浮游动物等样品中虾肝肠胞虫的检测和监测。

2 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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

本标准没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

Bst DNA 聚合酶: *Bst* DNA Polymerase

bp: 碱基对 (base pair)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribo Nucleic acid)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EHP: 虾肝肠胞虫 *Enterocytozoon heppenatoaei*

LAMP: 环介导等温扩增 (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

PCR: 聚合酶链反应 polymerase chain reaction

SWP: 孢子壁蛋白 (spore wall protein)

TAE缓冲液: 由三羟甲基氨基甲烷 (Tris base)、乙酸 (acetic acid) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 组成的缓冲液

SYBR Green qPCR Mix: 含双链嵌合荧光染色剂的荧光定量PCR预混液。

5 试剂和材料

5.1 除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的化学试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.2 无水乙醇。

5.3 95 %乙醇见附录A。

5.4 70 %乙醇见附录A。

- 5.5 0.45 μm 硝酸纤维素膜。
- 5.6 3% 牛肉膏洗脱液见附录A。
- 5.7 16% PEG8000见附录A。
- 5.8 0.2 mol/L磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄) 见附录A。
- 5.9 抽提缓冲液：见附录A。
- 5.10 蛋白酶K：见附录A。
- 5.11 平衡酚、10 mol/L乙酸铵、酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)、三氯甲烷/异戊醇(24:1)。
- 5.12 TE缓冲液：见附录A。
- 5.13 Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)：生化试剂，-20℃保存，避免反复冻融。
- 5.14 10×PCR 缓冲液：生化试剂，随 Taq DNA 聚合酶提供，-20℃保存。
- 5.15 氯化镁 (MgCl₂) 溶液 (25 mmol/L)：生化试剂，-20℃保存。
- 5.16 dNTP：生化试剂，含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L 的混合物，-20℃保存。
- 5.17 套式引物：套式两对引物，使用浓度均为 10 μmol/L，-20℃保存。
- 1) F514: 5' -TTGCAGAGTGTGTTAAGGGTT-3' ;
 - 2) R514: 5' -CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC-3' , 扩增514 bp的片段;
 - 3) F147: 5' -TTGGCGGCACAATTCTCAAACA-3' ;
 - 4) R147: 5' -GCTGTTGTCTCCAACCTGTATTTGA-3' , 扩增上述片段中的147 bp片段。
- 5.18 1×TAE电泳缓冲液：见附录A。
- 5.19 琼脂糖：电泳级。
- 5.20 样品缓冲液：见附录A。
- 5.21 电泳核酸染料，生化试剂。
- 5.22 DNA Marker。
- 5.23 SYBR Green qPCR Mix。
- 5.24 荧光PCR引物，使用浓度为10 μmol/L，-20℃保存。
- 1) F118: 5' -ACAAAGTTACCAGAAGGTTATGAAG-3' ;
 - 2) R118: 5' -TTGTGCCGCCAAACTCGTA -3' 。
- 5.25 10× thermal 缓冲液。
- 5.26 甜菜碱，5 mol/L。
- 5.27 硫酸镁，150 mmol/L。
- 5.28 *Bst* DNA 聚合酶，8 U/μL。
- 5.29 环介导等温扩增引物：
- 1) F3: 5' -TAGAAGATGCAAAGAGATATGTTGA-3' (10 μmol/L) ;
 - 2) B3: 5' -GTTTGTCTCCAACCTGTATTTGAAA-3' (10 μmol/L) ;
 - 3) FIP: 5' -TTACTTAAACCTTAAACAACACTCTAAGTTACCAGAAGGTTATGAAGAA-3' (40 μmol/L) ;
 - 4) BIP: 5' -TTGGCGGCACAATTCTCAATGTCTGTGTAATATCGTCTCTTT-3' (40 μmol/L) ;
 - 5) FLP: 5' -AACATTTAGTTCGTCACGCATTT-3' (40 μmol/L) ;
 - 6) BLP: 5' -TTCAAACACTGTAAACCTTAAAGCA-3' (40 μmol/L) 。
- 5.30 阳性对照：已知受 EHP 感染的对虾样品提取的 DNA，-20℃保存。
- 5.31 阴性对照：不含 EHP 的对虾样品提取的 DNA，-20℃保存。
- 5.32 空白对照：无菌双蒸水。

6 仪器和设备

- 6.1 PCR 扩增仪。
- 6.2 荧光定量 PCR 仪。
- 6.3 恒温荧光扩增检测仪。
- 6.4 电泳仪：输出直流电压 0 V~600 V。
- 6.5 水平电泳槽：50 mL~500 mL，带有凝胶船及样孔梳。
- 6.6 微量移液器及适配吸头，建议使用带滤芯的吸头。
- 6.7 凝胶成像仪。
- 6.8 恒温培养箱或金属浴。
- 6.9 普通冰箱：具冷藏箱，并带-18 °C 以下冷冻箱体。
- 6.10 离心机：转速可达 12 000 r/min 以上。
- 6.11 超声破碎仪。
- 6.12 5 mL、0.2 mL PCR 管及 1.5 mL 离心管：经高压灭菌，一次性使用。
- 6.13 无菌研磨棒：适用于 1.5 mL 离心管，经高压灭菌，一次性使用。

7 样品采集和处理

7.1 样品的采集

样品采集的要求和数量按 SC/T 7103 的规定。

活体或冷冻幼体、仔虾及体长 3 cm 以下稚虾个体样品约 5 mg ~100 mg；活体或冷冻虾的肝胰腺 5 mg~100 mg；活体或冰冻饵料生物样品 5 mg~100 mg。4 °C 运输尽快进行核酸抽提，或置于灭菌采样容器内，加入待检样三倍体积的 95% 乙醇没过待检样，-20 °C 保存。

水样用无菌容器采集 100 mL~500 mL，4 °C 运输尽快进行核酸抽提，如未能及时检测，应将水样置于 -20 °C 冰柜保存待检。

7.2 样品处理

7.2.1 通用要求

样品处理过程中应避免交叉污染。

7.2.2 生物样

取样品置于灭菌 1.5 mL 的离心管中，用研磨棒研磨均匀，用于核酸提取。

7.2.3 水样

7.2.3.1 取 100 mL 水样经 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤后，取出硝酸纤维素膜并剪碎，放入装有 1.5 mL 的 3 % 牛肉膏洗脱液及铅珠的 2 mL 样品处理管中，震荡 20 min~30 min，或用超声破碎仪破碎 15 min。

7.2.3.2 取出上清转移至干净的 5 mL 离心管中。加入等体积的 16 % PEG8000 溶液，震荡充分混匀，调节 pH 至 7.0，4 °C 静置 2 h~3 h，或静置过夜。

7.2.3.3 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清。加入 500 μL 0.2 mol/L Na₂HPO₄，振荡至重悬沉淀。

7.2.3.4 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min，取上清用于核酸抽提。

8 核酸抽提

- 8.1 经 6.2 处理样品，按以下方法进行核酸抽提，也可采用同等效果商业化 DNA 提取试剂盒抽提 DNA。
- 8.2 加入 450 μL 的抽提缓冲液、3 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL)，混匀，56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。
- 8.3 冷却至室温，加入等体积平衡酚，颠倒混合 10 min，于 10 000 r/min 离心 3 min，取上层水相至新 1.5 mL 离心管中。
- 8.4 加入等体积酚/三氯甲烷/异戊醇 (25:24:1)，颠倒混合 10 min，于 10 000 r/min 离心 1 min，取上层水相至新 1.5 mL 离心管中。
- 8.5 加溶液等体积三氯甲烷/异戊醇 (24: 1)，颠倒混合 10 min，于 10 000 r/min 离心 1 min，取上层水相至新 1.5 mL 离心管中。
- 8.6 加入 100 μL 10 mol/L 乙酸铵，混匀后，再加入两倍体积预冷无水乙醇(-20 $^{\circ}\text{C}$) 混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h。10 000 r/min 离心 10 min，弃上清。
- 8.7 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次，每次洗涤后 10 000 r/min 离心 5 min，小心倾去上清，沉淀于室温晾干。
- 8.8 加入 50 μL ~100 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。若 DNA 样品需保存，建议用 50 μL ~100 μL TE 缓冲液溶解并保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

9 套式 PCR

9.1 通用要求

样品的 PCR 扩增应在 PCR 反应区独立完成，避免造成区域间污染。PCR 检测产物序列见附录 B。

9.2 第一步 PCR 反应

在 0.2 mL PCR 管中加入 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL 、dNTP 0.5 μL 、引物 F148 和 R148 各 1 μL 、Taq 酶 0.1 μL 、待测模板 DNA 1 μL ，最后加灭菌双蒸水至 25 μL 体积（或者按商品化预混液说明书配制反应体系）。同时设阳性对照、阴性对照及空白对照。短暂离心后将 PCR 管置于 PCR 仪中，按以下程序进行扩增：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，30 次循环；68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

9.3 第二步 PCR 反应

在 0.2 mL PCR 管中加入 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、25 mmol/L 氯化镁 1.5 μL 、dNTP 0.5 μL 、引物 F148 和 R148 各 1 μL 、Taq 酶 0.1 μL 、第一轮反应产物 1 μL ，最后加灭菌双蒸水至 25 μL 体积（或按商品化预混液说明书配制反应体系）。短暂离心后将 PCR 管置于 PCR 仪中，按以下程序进行扩增：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，20 次循环；68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

9.4 琼脂糖凝胶电泳

用 1 \times TAE 电泳缓冲液配制 1.5 % 且含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核酸染料的琼脂糖凝胶。将该凝胶平板放入水平电泳槽，加样孔朝负极，加入 1 \times TAE 电泳缓冲液至没过胶面 1 mm~2 mm。将 6 μL PCR 扩增产物和 2 μL 样品缓冲液混匀后加入加样孔。同时设立 DNA 分子量标准对照。5 V/cm 电泳 30 min，当溴酚蓝迁移至琼脂糖凝胶的 1/2~2/3 处时停止电泳，凝胶成像仪观察并判断结果。

9.5 结果判定

9.5.1 阳性对照第一步 PCR 在 514 bp 处有条带，或/和第二步 PCR 在 147 bp 处有条带，阴性对照和空白对照没有相应条带，实验有效。

9.5.2 待测样品第一步 PCR 在 514 bp 处有条带或/和第二步 PCR 在 147 bp 处有条带的，均判定为阳性。

9.5.3 待测样品第一步 PCR 在 514 bp 处无条带且第二步 PCR 在 147 bp 处均无条带的可判定为样品阴性。

10 荧光定量 PCR

10.1 通用要求

样品的荧光PCR扩增应在PCR反应区独立完成，避免造成区域间污染。荧光定量PCR检测产物序列见附录C。

10.2 反应体系

在荧光 PCR 小管中加入 2×SYBR Green qPCR Mix 10 μL，引物 F118 和 R118 各 0.8 μL，待检样品 DNA 1 μL，最后加灭菌双蒸水至 20 μL 体积。（或者按商品化预混液说明书配制反应体系）。同时设阳性对照、阴性对照及空白对照。低速离心后将 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪中，按以下程序进行扩增：95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 30 s，40 个循环。

10.3 结果判定

10.3.1 阳性对照 Ct 值≤30 且有明显 S 型扩增曲线，同时阴性对照和空白对照 Ct>30 且无明显 S 型扩增曲线，判断结果有效。

10.3.2 待测样品 Ct 值≤30 且有明显 S 型扩增曲线，结果为阳性。

10.3.3 待测样品 Ct 值>35 或无明显 S 型扩增曲线，结果为阴性。

10.3.4 待测样品 Ct 值 30≤Ct≤35 时，样品为疑似阳性，应重新检测。

11 LAMP 检测

11.1 通用要求

样品的LAMP检测应在PCR反应区独立完成，避免造成区域间污染。

11.2 反应体系

在荧光 PCR 小管中按表 1 体系加入各种试剂（或者按商品化预混液说明书配制反应体系）。同时设阳性对照、阴性对照及空白对照。低速离心后将 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪或恒温荧光 PCR 仪中，63 °C 扩增 40 min。

表1 环介导等温扩增反应体系表

组分	工作液浓度	加样量 (μL)	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10 ×	2.5	1 ×
外侧上游引物 (F3)	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L
外侧下游引物 (B3)	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L
内侧上游引物 (FIP)	40 μmol/L	1.0	1.6 μmol/L
内侧下游引物 (BIP)	40 μmol/L	1.0	1.6 μmol/L
环引物 (FLP)	40 μmol/L	0.5	0.8 μmol/L
环引物 (BLP)	40 μmol/L	0.5	0.8 μmol/L

表1 环介导等温扩增反应体系表（续）

组分	工作液浓度	加样量（ μL ）	反应体系终浓度
dNTPs	10 mmol/L	4	1.6 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	4	0.8 mol/L
硫酸镁	150 mmol/L	1	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
DNA 模板	100 ng/ μL	2	8 ng/ μL
水	—	6.5	—
总体积	—	25	—

11.3 结果判定

11.3.1 阳性对照反应产生典型S型扩增曲线且阴性对照和空白对照反应产生非S型扩增曲线时，结果有效。

11.3.2 待测样品反应产生典型S型扩增曲线，结果为阳性。

11.3.3 待测样品反应产生类似平直的非S型扩增曲线，则结果为阴性。

12 综合判定

12.1 套式PCR结果阳性，荧光定量PCR结果阳性，或LAMP检测结果阳性，符合其中一项则判定为样品EHP阳性。

12.2 当套式PCR、荧光定量PCR、LAMP检测中的一种检测方法结果判定可疑时，选择另一种进行确认。

附 录 A
(资料性)
试剂配制

A.1 70%乙醇

无水乙醇	70 mL
加水 30 mL, 混匀, 定容至	100 mL
室温保存。	

A.2 95%乙醇

无水乙醇	95 mL
加水 5 mL, 混匀, 定容至	100 mL
室温保存。	

A.3 3%牛肉膏洗脱液 (pH 9.0)

牛肉浸膏	30.0 g
加水溶解, 调节 pH 至 9.0, 定容至	1 000 mL
高压灭菌 15 min, 室温保存。	

A.4 16% PEG8000 溶液

PEG8000	160.0 g
NaCl	17.5 g
加水溶解, 定容至	1000 mL
高压灭菌 15 min, 室温保存。	

A.5 0.2 mol/L的 Na_2HPO_4 (pH 9.0)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,	71.6 g
加水溶解, 调节 pH 至 9.0, 定容至	1000 mL
高压灭菌 15 min, 室温保存。	

A.6 抽提缓冲液

1 mol/L Tris · HCl (pH8.0)	1 mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	20 mL
1mg/mL胰RNA酶	2 mL
10% SDS	5 mL

加水定容至 100 mL
混匀，室温贮存。

A.7 20 mg/mL 蛋白酶K

蛋白酶K 20 mg
水 1 mL
溶解后分装于无菌离心管中(0.25 mL/管)，-20℃下保存。

A.8 TE 缓冲液

1 mol/L Tris • HCl (pH8.0) 10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 2 mL
加水定容至 1000 mL
高压灭菌，4℃保存。

A.9 50×电泳缓冲液

Tris 242 g
0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 100 mL
冰乙酸 57.1 mL
加水定容至 1000 mL
室温保存，使用时稀释50倍。

A.10 样品缓冲液

蔗糖 40 g
加水溶解，定容至 1 000 mL
溴酚蓝 0.25 g
溶解后，4℃保存。

附录 B
(资料性)

虾肠胞虫 (EHP) SWP 基因套式 PCR 检测产物序列

ATGTTAGAAGATGCAAAGAGATATGTTGAAAGAAAAATTAATAAATGAATACATTCATACAAAGTTACCAGAAGGTT
ATGAAGAAAAACAAAACAGGTACAGAAAAATGCGTGACGAACTAAATGTTTGCAGAGTGTGTTAAGGTTTAAGTAA

F514

TTACGAGTTTGGCGGCACAATTCTCAAACATTTTCACCATTGGTCAAATACAATTTCAAACACTGTAAACCTTAAAGCA
F147

TTAAAAAGAGACGATATTTACACAGACACAGCATTGTAGGATATGAGCTTCAAATACAGTTGGAGACAAACAGCTTA
R147

AAGAAGTTGCAATGATTTTTCTAAAGCATATGAATGCATATCAGAAGATAAAAGGAAAATGAATGAAAAATGGGAGA
TATTTTGAAGAATTAAGTATTTAAAAAAGAAGTGCAAACAAATTGATCATCAACGCAAACTGTAAATAACCTAAGA
TATGATTTAGAAGAAATATTGCAATCAAACATTTATAAAGAAAGATCAAAAAGAAAATTTAGAAAAAAATTAGGAGAAA
CATCTGAAAAAACACTAGTAGAAATGGATGAATTTATGCATTTAAGTATGATAAATGGAGTAATCAAGAAAATGCAAA

R514

GACACATCGTGAATTTTGC

附录 C
(资料性)

虾肠胞虫 (EHP) SWP 基因荧光定量 PCR 检测产物序列

ATGTTAGAAGATGCAAAGAGATATGTTGAAAGAAAAATTAATAAATGAATACATTCATACAAAGTTACCAGAAGGTT

F118

ATGAAGAAAAACAAAACAGGTACAGAAAAATGCGTGACGAACTAAATGTTTTGCAGAGTGTGTTAAGGGTTAAGTAA
TTACGAGTTTGCGGCACAATTCTCAAACATTTTCACCATTGGTCAAATACAATTTCAAACACTGTAAACCTTAAAGCA

R118

TTAAAAAGAGACGATATTTACACAGACACAGCATTGTAGGATATGAGCTTTCAAATACAGTTGGAGACAAACAGCTTA
AAGAAGTTTGAATGATTTTTCTAAAGCATATGAATGCATATCAGAAGATAAAAGGAAAAATGAATGAAAAATGGGAGA
TATTTTTGAAGAATTAAGTATTTAAAAAAGAAGTGCAAAACAATTGATCATCAACGCAAACTGTAATAACCTAAGA
TATGATTTAGAAGAAATATTGCAATCAAACATTTATAAAGAAGATCAAAAAGAAAAATTTAGAAAAAAATTAGGAGAAA
CATCTGAAAAAACACTAGTAGAAATGGATGAATTTATGCATTTAAGTATGATAAATGGAGTAATCAAGAAAAATTGCAAA
GACACATCGTGAATTTTGC
