ICS 65.150

CCS B 51

团　　体　　标　　准

T/FTS 010－2026

仿刺参腐皮综合征诊断方法 美人鱼发光杆菌

Diagnostic Methods for Skin Ulceration Syndrome in Apostichopus japonicus Caused by Photobacterium damselae subsp. damselae

福建省水产学会

2026 - 11 - 09 发布　　2026 - 11 - 09 实施

福建省水产学会　　发 布

福建省水产学会

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这些专利的责任。

本文件由福建省水产学会提出并归口。

本文件起草单位：福建农林大学、霞浦县海洋渔业发展中心、福建省水产研究所、福州国仪科技有限公司

本文件主要起草人：覃盼、谢宇坪、陈新华、杨林蔚、刘树铭、母尹楠、杨求华、敖敬群、陈润、陈启沂、李功良

福建省水产学会

福建省水产学会

仿刺参腐皮综合征诊断方法 美人鱼发光杆菌

1 范围

本文件界定了由美人鱼发光杆菌（*Photobacterium damselae*）感染仿刺参（*Apostichopus japonicus*）引起的腐皮综合征诊断方法的术语和定义，描述了患病仿刺参的临床症状、样品采集与处理、细菌鉴定、综合判定的方法。

本文件适用于由美人鱼发光杆菌引起的仿刺参腐皮综合征的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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试验方法

NY/T 755 绿色食品 渔药使用准则

SC/T 7028 水产养殖动物细菌耐药性调查规范 通则

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

福建省水产学会

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 仿刺参腐皮综合征

由美人鱼发光杆菌（*Photobacterium damselae* subsp. *damselae*）感染仿刺参引起的高传染性、高死亡率的细菌性疾病。

4 缩略语

bp：碱基对（base pair）

BHQ-1：黑洞荧光淬灭剂（black hole quencher 1）

Ct 值：阈值循环数（cycle-threshold value）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

DNA marker：DNA 分子量标准品（DNA molecular weight marker）

EDTA：乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid）

FAM：6-羧基荧光素（6-Carboxyfluorescein）

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

qPCR：定量聚合酶链反应（quantitative polymerase chain reaction）

rRNA：核糖体 RNA（ribosomal Ribonucleic Acid）

ROX：5-羧基-X-罗丹明（5-carboxy-X-rhodamine）

SDS：十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate）

TSA：胰蛋白胨大豆琼脂培养基（tryptic soy agar）

Tris：三羟甲基氨基甲烷（tris（hydroxymethyl）aminomethane）

TE：Tris-EDTA

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）

5 试剂和材料

5.1 水：符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.2 DNA marker（DL5000）：-20 ℃保存。

福建省水产学会

5.3 胰 RNA 酶：-20 ℃保存。

5.4 50 × TAE 电泳缓冲液：按附录 A.1 配制，室温保存。使用时稀释至 1 × TAE 缓冲液。

5.5 TE 缓冲液：按附录 A.2 配制，4 ℃保存备用。

5.6 上样缓冲液（6 ×）：按附录 A.3 配制，避光存放。

5.7 细胞裂解缓冲液：按附录 A.4 配制，4 ℃保存备用。

5.8 蛋白酶 K：按附录 A.5 配制，-20 ℃保存备用。

5.9 PCR 反应预混液：商业化试剂，-20 ℃保存。

5.10 qPCR 反应预混液：商业化试剂，-20 ℃保存。

5.11 qPCR 检测阳性对照：纯培养美人鱼发光杆菌基因组 DNA，-20 ℃保存。

5.12 qPCR 检测阴性对照：健康仿刺参组织基因组 DNA, -20 ℃保存。

5.13 qPCR 检测空白对照：灭菌双蒸水。

5.14 ROX 参比染料。

5.15 16S rRNA 上游引物：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'。

5.16 16S rRNA 下游引物：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

5.17 qPCR 上游引物：5'-CGAAGATGAAGACGAAGA-3'。

5.18 qPCR 下游引物：5'-CTGCTTGAAGATCTCAGA-3'。

5.19 qPCR 探针：5'-FAM-CAGCGACGACAGCGATGACA-BHQ-1-3'。

5.20 TSA 固体培养基（胰蛋白胨大豆琼脂培养基）：按产品说明书配制，用于美人鱼发光杆菌的分离、培养。

6 器材和设备

福建省水产学会

6.1 培养皿：无菌培养皿，直径 90 mm～100 mm。。

6.2 冰箱（-20 ℃冰箱、-80 ℃冰箱）。

6.3 微量移液器（最大量程 10 μL，100 μL，1000 μL）。

6.4 荧光定量 PCR 仪。

6.5 凝胶成像仪。

6.6 台式高速冷冻离心机。

6.7 水平电泳系统。

6.8 恒温振荡培养箱。

6.9 超净工作台：具备局部空气净化功能，工作区洁净度及气流形式应满足无菌操作要求。

6.10 电子分析天平：量程应满足 3 g 试剂的称量要求，分度值不大于 0.01 g（10 mg）。

6.11 菌落计数仪。

福建省水产学会

7 临床症状

主要临床症状参见附录 B。

8 采样

8.1 采样对象与数量

采样时优先选择具有典型临床症状的仿刺参，建议采集 10～30 只；当发病数量较少时，可根据实际发病情况适当调整采样数量，并记录采样数量及样品来源。无明显症状的按照 SC/T 7103 的要求进行采样。

8.2 样本采集

采集病损边缘及其邻近区域体壁组织，无症状取表皮组织。样品不少于 3 g。

8.3 样品运输

取样后应加贴标签，标签上清楚标明样品编号、采样时间、采样地点。样品运输应符合 SC/T 7103 中的规定。

8.4 样品固定与保存

细菌分离样品冷藏 4 ℃冰箱保存，24 h 内检测；PCR 检测样品用无水乙醇固定、-20 ℃保存备用。

9 细菌鉴定

9.1 细菌的分离与纯化培养

无菌条件下，用无菌接种环从病损边缘肌肉组织中取少量组织划线接种于 TSA 固体培养基，28 ℃±1 ℃恒温培养箱倒置培养 24 h±2 h。挑取优势单菌落接种于 TSA 固体培养基划线，倒置培养 24h ±2 h，再次纯化获得纯培养物。

9.2 16S rRNA 基因鉴定

9.2.1 总 DNA 提取

取纯化后的单菌落，经 TSB 培养基培养后收集菌体，采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，作为 PCR 检测模板。

福建省水产学会

9.2.2 16S rRNA 基因序列扩增

将提取 DNA 作为模板，利用细菌 16S rRNA 通用引物扩增，反应在 25 μL 体系中进行：PCR 反应预混液 (2×) 10 μL，上下游引物各 1.0 μL（引物浓度为 10 μmol/L），模板 DNA 2.0 μL（调整 DNA 浓度至 10~100 ng/μL），灭菌双蒸水补足至 25 μL。

反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1.5 min，循环扩增 30 次；72 ℃终延伸 10 min。4 ℃保存备用。空白对照取等体积的双蒸水代替 DNA 模板。

9.2.3 琼脂糖凝胶电泳

用 1×TAE 电泳缓冲液配制 1%的琼脂糖凝胶，凝固后放入水平电泳槽，将上述扩增产物 6 μL 样品加入样品孔，使用 DNA marker 作对照。

120 V 电泳约 15 min～30 min，当溴酚蓝指示剂到达底部时停止。

于紫外光下观察电泳条带位置，在长波紫外灯下用刀片切下含有目的条带（约 1500 bp）的胶块，放入无菌离心管中称重。

9.2.4 PCR 扩增产物纯化、测序及序列比对

将琼脂糖凝胶电泳产物，使用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。PCR 产物回收后进行克隆、测序后与参考序列（附录 C）进行比对分析。

9.3 结果判定

阳性对照的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后在约 1500 bp 处有特定条带，阴性对照的 PCR 产物电泳结果不显示任何条带，实验结果有效。样品的 l6S rRNA 基因 DNA 序列与 GenBank 数据库中已登录的美人鱼发光杆菌序列相似度大于 99%，可判定检测结果为阳性。

10 qPCR 检测

10.1 DNA 提取

NA 提取操作如下：

取 3 g 仿刺参组织用无菌剪刀剪碎，置于玻璃匀浆器中，加入 1 mL 的细胞裂解缓冲液，匀浆至组织块完全消失，随后转入 1.5 mL 离心管中，转入 1.5 mL 离心管中，加入蛋白酶 K（500 μg/mL）20 μL，混匀。

福建省水产学会

在 65 ℃恒温水浴锅中 30 min，期间取出间歇振荡离心管 6 次。12000 r/min 离心 5 min，取上清液至另一离心管中。加 2 倍体积异丙醇，倒转混匀后，12000 r/min 离心 5 min，去上清，沉淀物晾干后用 200 μL TE 重新溶解，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25:24:1），振荡混匀，12000 r/min 离心 5 min。取上层溶液至另一管，加入等体积的氯仿：异戊醇（24:1），振荡混匀，12000 r/min 离心 5 min。取上层溶液至另一管，加入 1/2 体积的 7.5 mol/L 乙酸铵，加入 2 倍体积的无水乙醇，混匀后室温沉淀 2 min，12000 r/min 离心 10 min。弃上清液，用 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀物 1 次，12000 r/min 离心 5 min。弃上清液，将离心管倒置于吸水纸上，室温干燥。加 200 μL TE 重新溶解沉淀物，作为 qPCR 扩增模板。

也可以选择使用具有同等效能的基因组 DNA 提取试剂盒。

10.2 qPCR 反应体系

qPCR 反应体系的配制应在洁净区完成。根据检测样本量需要，在冰盒中配制 qPCR 反应体系，体系组成见表 1。阳性对照采用经鉴定确认的美人鱼发光杆菌菌株或其基因组 DNA；阴性对照采用健康仿刺参组织提取的 DNA；空白对照采用灭菌双蒸水。

表 1 qPCR 扩增反应体系

试剂	体积	试剂终浓度
qPCR 反应预混液（2×）	10.0 μL	1×PCR 缓冲液
上游引物 1 （10 μmol/L）	0.4 μL	0.2 μmol/L
下游引物 2 （10 μmol/L）	0.4 μL	0.2 μmol/L
探针（10 μmol/L）	0.4 μL	0.2 μmol/L
50×ROX 参比染料	0.4 μL	1×
模板 DNA	1.0 μL	≤ 200 ng
灭菌双蒸水	加至 20 μL	—
qPCR 反应体系配制可采用同等效果的探针法 qPCR 试剂盒。 根据所用荧光定量 PCR 仪的机型要求，决定是否添加 ROX 参比染料及其浓度。		

福建省水产学会

10.3 qPCR 反应条件

将配制好的反应液置于实时荧光 PCR 仪中，按以下程序进行 qPCR 扩增：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 10 s、60 ℃退火延伸 30 s，共进行 40 个循环反应，在每个循环结束后收集荧光信号。

10.4 结果判定

阴性对照和空白对照无 Ct 值，阳性对照 Ct 值≤30，且出现典型扩增曲线，熔解曲线为单峰，则判定实验结果有效。否则，判定实验结果无效。具体判定如下：

A）检测样品有典型的“S”形扩增曲线且 Ct 值≤30 时，判定为 qPCR 检测结果为阳性；

B）若检测样品 Ct 值>35 且无典型扩增曲线，判定 qPCR 检测结果为阴性；

C）检测样品有典型的“S”形扩增曲线且 30＜Ct 值≤35 时，应进行重复检测，若复检后 Ct 值≤35 且出现典型扩增曲线，判定为 qPCR 检测结果为阳性，否则判定为 qPCR 检测结果为阴性。

11 综合判定

11.1 疑似病例

符合以下任何一项，判定为疑似病例：

A) 临床症状符合第 7 章的描述；

B) 分离菌株 16S rRNA 基因鉴定结果阳性；

C) qPCR 检测结果阳性。

11.2 **确诊病例**

临床症状符合第 7 章的描述，且分离菌株 16S rRNA 基因鉴定结果阳性或 qPCR 检测结果阳性。

福建省水产学会

附 录 A
（规范性）
试剂及其配制

A.1 50×TAE 缓冲液

称量 242 g Tris，37.2 g $Na_2EDTA.2H_2O$ 于 1 L 烧杯中，向烧杯中加入约 600 mL 去离子水，充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的冰乙酸，充分搅拌。加去离子水定容至 1 L 后，室温保存。

A.2 TE 缓冲液（pH = 8.0）

将 0.5 mL 的 1 mol/L Tris-HCl（pH = 8.0）、0.1 mL 的 0.5 mol/L EDTA（pH = 8.0）加入到 50 mL 的容量瓶中，调 pH = 8.0 定容至 50 mL 摇匀后，转到准备好的瓶中，贴上标签，使用 0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌，4 ℃保存备用。

A.3 上样缓冲液

每 100 mL 蒸馏水溶液中含：溴酚蓝 0.25 g、二甲苯氰 0.25 g、蔗糖 40 g。

A.4 细胞裂解缓冲液

Tris （pH = 8.0） 100 mmol/L

EDTA （pH = 8.0） 500 mmol/L

NaCl 20 mmol/L

SDS 10%

胰 RNA 酶 20 μg/mL

A.5 蛋白酶 K

称取 20 mg 蛋白酶 K 溶于 1 mL 灭菌的双蒸水中，-20 ℃备用。

福建省水产学会

附 录 B
（资料性）

美人鱼发光杆菌引起仿刺参腐皮综合征主要症状

仿刺参感染美人鱼发光杆菌后，早期仿刺参触手过度张开，接着口部肿大，分泌黏液增多，触手失去伸展活力，然后口部出现溃烂，开始是小的白斑，然后扩大到整个口部，溃烂处产生大量黏液，口与肛门处有白色絮状物粘连，病情严重时全身溃烂直至死亡，皮肤组织有大小不等的白斑。



图 B.1 美人鱼发光杆菌感染仿刺参引起腐皮综合征症状图

附 录 C
（资料性）

美人鱼发光杆菌 16S rRNA 基因参考序列及扩增引物序列

C.1 美人鱼发光杆菌 16S rRNA 基因参考序列

```
   1 TAAAAGTCAA CTGCTCTACC AACTGAGCTA ACGACCCATG GCGTCCCGTA GGGGAGTCGA ACCCCTGTTA CCGCCGTGAA AGGGCGGTGT CCTAGGCCTC
 101 TAGACGAACG GGACACTGTT CGTACTTAAT GTTGTTGGGC AACATTAAGT GGCTCTTTTA CATTTCAACC AAGCAATCTG TGTGGACACT GCGTAAAACG
 201 CAGTCTTTTT TGTAAGGAGG TGATCCAGCC CCAGGTTCCC CTAGGGCTAC CTTGTTACGA CTTCACCCCA GTCATGAACC ACACCGTGGT AAACGCCCTC
 301 CCGAAGGTTA AGCTATCTAC TTCTGGTGCA GCCCACTCCC ATGGTGTGAC GGGCGGTGTG TACAAGGCCC GGGAACGTAT TCACCGTGGC ATTCTGATCC
 401 ACGATTACTA GCGATTCCGA CTTCACGGAG TCGAGTTGCA GACTCCGATC CGGACTACGA CATACTTTCT GGGATTCGCT CCACCTCGCG GTCTTGCTGC
 501 CCTCTGTATA TGCCATTGTA GCACGTGTGT AGCCCTACTC GTAAGGGCCA TGATGACTTG ACGTCGTCCC CACCTTCCTC CGGTTTATCA CCGGCAGTCT
 601 CCCTGGAGTT CCCACCCGAA GTGCTGGCAA ACAAGGATAA GGGTTGCGCT CGTTGCGGGA CTTAACCCAA CATTTCACAA CACGAGCTGA CGACAGCCAT
 701 GCAGCACCTG TCTCAGAGTT CCCGAAGGCA CACTCGAATC TCTTCAAGCT TCTCTGGATG TCAAGAGTAG GTAAGGTTCT TCGCGTTGCA TCGAATTAAA
 801 CCACATGCTC CACCGCTTGT GCGGGCCCCC GTCAATTCAT TTGAGTTTTA ATCTTGCGAC CGTACTCCCC AGGCGGTCTA CTTAACGCGT TAGCTCCGAA
 901 AGCCACGGCT CAAGGCCACA ACCTCCAAGT AGACATCGTT TACGGCGTGG ACTACCAGGG TATCTAATCC TGTTTGCTCC CCACGCTTTC GCATCTGAGC
1001 GTCAGTCTTT GTCCAGGGGG CCGCCTTCGC CACTGGTATT CCTTCAGATC TCTACGCATT TCACCGCTAC ACCTGAAATT CTACCCCCCT CTACAAGACT
1101 CTAGCCTGCC AGTTTCAAAT GCAATTCCGA GGTTAAGCCC CGGGCTTTCA CATCTGACTT AACGAGCCGC CTGCATGCGC TTTACGCCCA GTAATTCCGA
1201 TTAACGCTCG CACCCTCCGT ATTACCGCGG CTGCTGGCAC GGAGTTAGCC GGTGCTTCTT CTGTAGGTAA CGTCAAATAA TGCAGGTGTT AACTACACTA
1301 CCTTCCTCCC TACTGAAAGT GCTTTACAAC CCGAAGGCCT TCTTCACACA CGCGGCATGG CTGCATCAGG GTTTCCCCCA TTGTGCAATA TTCCCCACTG
1401 CTGCCTCCCG TAGGAGTCTG GACCGTGTCT CAGTTCCAGT GTGGCTGATC ATCCTCTCAG ACCAGCTAGG GATCGTTGCC TTGGTGAGCC ATTACCTCAC
1501 CAACAAGCTA ATCCCACCTG GGCTAATCCT GACGCGAGAG GCCCGAAGGT CCCCCTCTTT GCTCCGAAGA GATTATGCGG TATTAGCTAT CGTTTCCAAT
1601 AGTTATCCCC CACATCAGGG CATATTCCCA GGCATTACTC ACCCGTCCGC CGCTCGCCGC CCTTAACGTT CCCCGAAGGT TCAGTTAAGT CGCTGCCGCT
1701 CGACTTGCAT GTGTTAGGCC TGCCGCCAGC GTTCAATCTG AGCCATGATC AAACTCTTCA ATTAAAGTTT TGTTGTATCT AACGATACGG CTCAATGAAT
1801 ACTGTTAATT CATCATAAAT GATGAATGAA TTGACTGTGC TGATACTTAC GTATCACTTG GTCACTCAGT TTCATTGATT AAATCTTTTA GACTAAATCA
1901 TTTCACGAGT GCCCACACAG ATTGCATGGT CAAATTGTTA AAGAACGTTG ACTATTCAAT GCCTTAGCGT TTTGCGCTTC AGCAAGTCAG GTGGCGTATA
```

福建省水产学会