



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 34738—2017

---

## 蜜蜂囊状幼虫病荧光 PCR 检测方法

Method of the real-time PCR for the detection of honey bees sacbrood disease

2017-11-01 发布

2018-05-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

订单号: 0100191216052478 防伪编号: 2019-1216-0943-3744-3506 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、吉林大学、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准起草人：宋战昫、冯新、孟日增、刘金华、魏春艳、牟峻、王振国、郑腾、孟庆峰、蔡阳、肖成蕊、王伟利。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052478 防伪编号: 2019-1216-0943-3744-3506 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

# 蜜蜂囊状幼虫病荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了蜜蜂囊状幼虫病荧光 PCR 检测方法。  
本标准适用于蜜蜂及其幼虫中囊状幼虫病的检测。

## 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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

## 3 试剂和材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用焦碳酸二乙酯水处理后高压灭菌)分装。

3.1 水,GB/T 6682,三级。

3.2 蜜蜂囊状幼虫病毒。

3.3 引物和探针,上游引物 F1(10 pmol/ $\mu$ L):5'-AAG TTG GAG GCG CGY ATT TG-3',下游引物 R1(10 pmol/ $\mu$ L):5'-CAA ATG TCT TCT TAC DAG AAG YAA GGA TTG-3',探针 P1(5 pmol/ $\mu$ L):5'-FAM-CGG AGT GGA AAG AT-TAMRA-3'。

3.4 磷酸盐缓冲盐水,配制方法见 A.1。

3.5 总 RNA 抽提试剂。

3.6 氯仿。

3.7 异丙醇。

3.8 75%乙醇。

注:用新开启的无水乙醇和焦碳酸二乙酯水配制。

3.9 焦碳酸二乙酯处理的水。

3.10 反转录酶。

3.11 RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L)。

3.12 5 $\times$ 反转录酶缓冲液。

3.13 10 $\times$ PCR 反应缓冲液(含镁离子)。

3.14 DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)。

3.15 三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNPTs 每种浓度均为 10 mmol/L)。

## 4 器材

4.1 荧光定量 PCR 扩增仪。

- 4.2 台式冷冻高速离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。
- 4.3 微量可调移液器(100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L、20  $\mu$ L~200  $\mu$ L、2  $\mu$ L~20  $\mu$ L、0.5  $\mu$ L~10  $\mu$ L)及配套带滤芯吸头。
- 4.4 研钵。
- 4.5 涡旋震荡器。
- 4.6 恒温水浴锅。
- 4.7 离心管(1.5 mL)。
- 4.8 PCR 管。

## 5 现场检验

### 5.1 临床特征

开箱,提蜂脾查看,出现下列病理变化特征之一者,可判为疑似:

- a) 脾面上会出现卵、小幼虫、大幼虫、封盖子排列不规则的现象,即所谓“花子脾”现象。
- b) 病害严重时,病虫多,工蜂清理不及,可以在脾面上见到病虫巢房被工蜂咬开,巢房盖有大量不规则孔洞,露出患病幼虫上翘的头部呈“尖头”状,其头部有大量的透明液体聚积。
- c) 用镊子小心夹住幼虫头部将其提出,可见虫体末端明显的囊状袋,虫体苍白色、无味、无黏性,参见附录 B。

### 5.2 鉴别诊断

在临床诊断时应注意将本病与美洲幼虫腐臭病相区别,其鉴别诊断要点参见附录 B。

## 6 实验室诊断

### 6.1 样品采集

6.1.1 按 GB/T 18088 要求,采集疑似感染的蜜蜂幼虫 20 只~30 只,也可采集以下样品:

- a) 蜂巢内病变区域成蜂 20 只~30 只,或
- b) 不小于 20  $\text{cm}^2$  的蜂房,或
- c) 取临近蜂巢的蜂蜜、花粉及小幼虫和底部的王浆等蜜蜂食物(30 g~50 g)。

6.1.2 采集的样品分别装入无菌的容器中,加入 5 倍~10 倍样品体积的 RNA 保存液,尽快转移到液氮中保存,供检测用。

### 6.2 样品处理

6.2.1 在洁净、灭菌并烘干的研钵内,加入蜜蜂 3 只~5 只(或幼虫 3 只~5 只,或蜂房 10 g 左右,或蜜蜂食物 10 g 左右),同时加入 PBS(10 mL)和 RNA 酶抑制剂(终浓度为 100 U/mL),混匀并充分研磨。

6.2.2 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min。

6.2.3 取上清液,转入无菌离心管(1.5 mL)中,编号备用。

### 6.3 荧光 RT-PCR

#### 6.3.1 阳性对照与阴性对照

阴、阳性样品的制备方法见附录 C。

### 6.3.2 RNA 提取

6.3.2.1 取灭菌的 1.5 mL 离心管, 编号。

6.3.2.2 每管加入 600  $\mu\text{L}$  总 RNA 抽提试剂裂解液, 分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200  $\mu\text{L}$ , 一份样本换用一个吸头, 再加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿, 涡旋震荡器上振荡混匀 5 s (不能过于强烈, 以免产生乳化层, 也可以用手颠倒混匀)。

6.3.2.3 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。

6.3.2.4 取上清液转移至灭菌的 1.5 mL 离心管中, 编号, 加入等量的异丙醇 ( $-20^{\circ}\text{C}$  预冷), 颠倒混匀。

6.3.2.5 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 离心管开口朝向离心机转轴方向。

6.3.2.6 小心倒去上清, 加入 600  $\mu\text{L}$  焦碳酸二乙酯处理水配制的 75% 乙醇, 颠倒洗涤。

6.3.2.7 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min。

6.3.2.8 小心倒去上清, 离心管倒置于吸水纸上, 沾干液体 (不同样品应在吸水纸不同地方沾干)。

6.3.2.9 立即进行 cDNA 的合成或  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 6.3.3 cDNA 合成

注: 本条所有操作在冰盒上进行。

6.3.3.1 在 6.3.2.8 的离心管中依次加入随机引物 2  $\mu\text{L}$ , 焦碳酸二乙酯处理水 12  $\mu\text{L}$ ; 轻微振荡, 瞬时离心。

6.3.3.2 70  $^{\circ}\text{C}$  作用 10 min, 冰浴 2 min。

6.3.3.3 3 000 r/min 离心 1 min。

6.3.3.4 在超净台内, 向离心管中依次加入:  $5\times$  反转录酶缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , 三磷酸脱氧核糖核苷酸 1  $\mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂 0.5  $\mu\text{L}$ , 反转录酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 瞬时离心。

6.3.3.5 42  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, 70  $^{\circ}\text{C}$  作用 15 min, 冰浴 3 min, 瞬时离心, 产物为 cDNA, 立即进行 PCR 扩增或  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 6.3.4 PCR 反应

6.3.4.1 在 PCR 管中, 依次加入以下试剂:  $10\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、三磷酸脱氧核糖核苷酸 1  $\mu\text{L}$ 、DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、引物 F1 1  $\mu\text{L}$ 、引物 F2 1  $\mu\text{L}$ 、探针 1  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2  $\mu\text{L}$ 、焦碳酸二乙酯处理水 16  $\mu\text{L}$ ; 盖紧管盖, 500 r/min 离心 30 s。

6.3.4.2 离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内, 记录样本摆放顺序。

6.3.4.3 设置循环条件: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环, 退火延伸时收集荧光。

## 6.4 结果判定

### 6.4.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

### 6.4.2 实验成立的条件

阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线, 且阳性对照的 Ct 值  $<28.0$ , 并出现典型的扩增曲线。

### 6.4.3 结果判定

6.4.3.1 阴性: 符合 6.4.2 的条件, 无 Ct 值并且无扩增曲线, 结果判为阴性; 表示样品中无蜜蜂囊状幼虫

病病毒。

6.4.3.2 阳性:符合 6.4.2 的条件,Ct 值 $\leq$ 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在蜜蜂囊状幼虫病病毒。

6.4.3.3 有效原则:Ct 值 $>$ 30.0 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。

## 7 综合判定

符合 5.1 的临床特征,且 6.3 荧光 RT-PCR 检测结果出现 6.4.3 的阳性结果,可确诊为蜜蜂囊状幼虫病阳性。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 磷酸盐缓冲盐水配制

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A.1.2 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液

七水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 53.6 g,或十二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71.6 g 或二水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 35.6 g 加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.1.3 0.01 mol/L、pH 7.2 磷酸盐缓冲盐水的配制

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 14 mL,0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液 36 mL,加氯化钠( $\text{NaCl}$ ) 8.5 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,121 °C,15 min 高压灭菌冷却后,无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 U/mL。

A.2 焦碳酸二乙酯处理水

用超纯水按 0.1% 加入焦碳酸二乙酯,室温静置过夜,115 °C,20 min 高压灭菌,冷却备用。

**附 录 B**  
(资料性附录)  
**蜜蜂囊状幼虫病**

**B.1 蜜蜂囊状幼虫病**

蜜蜂囊状幼虫病 (Sacbrood disease) 简称囊幼病, 又叫尖头病、囊雏病, 是由囊状幼虫病毒 (Sacbrood bee virus, SBV) 引起的蜜蜂幼虫肠道传染病, 也是中蜂的主要病害之一。

**B.2 病原**

病原为囊状幼虫病毒, 属于传染性软腐病病毒科 *Iflaviridae*, 传染性软腐病病毒属 *Iflavirus*, 正链 RNA 病毒, 病毒粒子直径 28 nm, 无囊膜, 圆形。

**B.3 症状**

SBV 主要感染幼虫使其致病死亡。一般在 1~2 日龄小幼虫阶段侵入, 在 5~6 日龄大幼虫阶段出现明显的症状, 也可在成蜂体内繁殖, 但不表现出症状。SBV 一般在 1~2 日龄小幼虫阶段侵入, 在中肠细胞、脂肪细胞、王浆腺细胞和气管等组织中大量增殖, 被害幼虫无法化蛹, 一般都在幼虫封盖前后表现症状, 感染幼虫失去光泽, 然后软塌下陷, 贴于巢房下半部, 头部离开巢房壁翘起, 形成钩状幼虫, 虫体由苍白色逐渐变为淡褐色, 由于虫体后部皮下渗出液增多, 用镊子夹出呈现典型的囊状, 如图 B.1 所示。

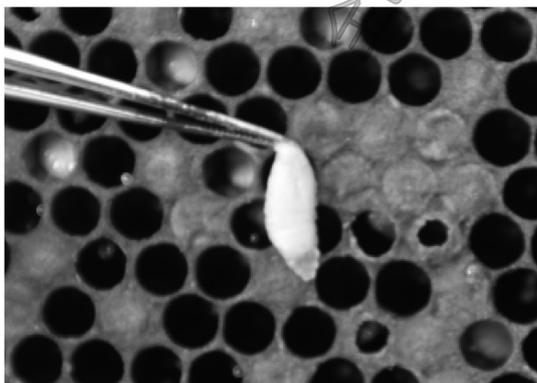


图 B.1 患蜜蜂囊状幼虫病的幼虫<sup>[1]</sup>

**B.4 鉴别诊断**

在临床诊断时应注意将本病与美洲幼虫腐臭病相区别。美洲幼虫腐臭病又称为“烂子病”, 是由幼虫芽孢杆菌引起的一种幼虫的细菌性传染病, 和囊状幼虫病有相似之处, 它们都是引起封盖后的幼虫大量死亡, 但这两种疾病各有特点, 应注意区别(见表 B.1)。

表 B.1 蜜蜂囊状幼虫病与美洲幼虫腐臭病临床诊断时的区别要点

| 病种      | 病原       | 死亡虫体特征  |              |       |            |
|---------|----------|---------|--------------|-------|------------|
|         |          | 囊状幼虫病   | 囊状幼虫病毒       | 无臭味   | 无黏性        |
| 美洲幼虫腐臭病 | 蜜蜂幼虫芽孢杆菌 | 腐败、鱼腥臭味 | 黏性强,用镊子可拉成细丝 | 黑色鳞片样 | 干枯后不易与巢房分离 |

全国动物卫生标准化技术委员会

附 录 C

(规范性附录)

蜜蜂囊状幼虫病毒阳性样品和阴性样品

C.1 阳性样品制备

取蜜蜂囊状幼虫病毒标准毒株按说明书稀释,按体积 1 : 4 加入总 RNA 抽提试剂灭活,剧烈震荡 1 min,再冰浴 10 min,用 10 倍体积的磷酸盐缓冲盐水稀释,0.5 mL/管分装,液氮保存备用。

C.2 阴性样品制备

取健康蜜蜂幼虫,按体积 1 : 4 加入总 RNA 抽提试剂灭活,剧烈震荡 1 min,再冰浴 10 min,用 10 倍体积的磷酸盐缓冲盐水稀释,0.5 mL/管分装,液氮保存备用。

参 考 文 献

- [1] 梁勤,陈大福.蜜蜂病害与敌害防治[M].北京:金盾出版社,2008
- 

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052478 防伪编号: 2019-1216-0943-3744-3506 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网  
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 34738-2017  
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会  
订单号: 0100191216052478  
防伪号: 2019-1216-0943-3744-3506  
时 间: 2019-12-16  
定 价: 24元



GB/T 34738-2017

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
蜜蜂囊状幼虫病荧光 PCR 检测方法  
GB/T 34738—2017

\*

中国标准出版社出版发行  
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)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

\*

书号: 155066·1-57914

版权专有 侵权必究