

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4043—2021

中华蜜蜂囊状幼虫病诊断技术

Diagnostic techniques for sacbrood disease of
Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*)

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	2
5.1 感染特点	2
5.2 箱外观察	2
5.3 开箱检查	2
5.4 流行特点	2
5.5 结果判定	2
6 实验室诊断	2
6.1 采样	2
6.2 电镜法鉴定	2
6.3 反转录-聚合酶链式反应扩增(RT-PCR)鉴定	3
6.4 荧光定量 PCR 鉴定	4
7 综合判定	5
7.1 CSBV 病原检测结果判定	5
7.2 CSBD 检测结果判定	5
附录 A(资料性) 中华蜜蜂囊状幼虫病	6
附录 B(资料性) 溶液配制方法	8
附录 C(资料性) 病毒粒子分离纯化	10
附录 D(资料性) PCR 检测用引物和探针、反应体系及反应条件	11

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院蜜蜂研究所。

本文件主要起草人：徐书法、武江利、李南南、于慧敏、刘彦杰、徐进、李小英。

引 言

中华蜜蜂囊状幼虫病 (Chinese sacbrood disease, CSBD) 是由中华蜜蜂囊状幼虫病毒 (Chinese sacbrood virus, CSBV) 引起的一种可导致大量中华蜜蜂幼虫死亡的烈性传染病, 简称中蜂囊幼病, 是危害中华蜜蜂的主要病害之一。恶劣的气候和环境、不充足的蜜粉源和不科学的管理技术是造成囊状幼虫病暴发的主要诱因。患囊状幼虫病的蜂群, 通常导致 3 日龄~4 日龄的幼虫死亡。该病典型症状表现为幼虫体色逐渐由珍珠样白色变黄、黄褐、褐, 甚至黑色, 后期虫体软化, 大量的液体聚积于病虫躯体和未脱去的表皮之间, 从巢房中拖出病死幼虫呈小囊状。

本文件规定了中华蜜蜂囊状幼虫病的临床诊断和实验室诊断(中华蜜蜂囊状幼虫病毒纯化鉴定、荧光定量 PCR 检测方法)的技术要求, 可对中华蜜蜂囊状幼虫病进行综合诊断。

中华蜜蜂囊状幼虫病诊断技术

1 范围

本文件规定了中华蜜蜂囊状幼虫病的临床初步诊断以及电镜法鉴定、反转录-聚合酶链式反应扩增(RT-PCR)鉴定、荧光定量 PCR 鉴定的实验室诊断技术。

本文件适用于中华蜜蜂囊状幼虫病的诊断和病原检测。

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

GB/T 34738—2017 蜜蜂囊状幼虫病荧光 PCR 检测方法

NY 5138—2002 无公害食品 蜜蜂饲养兽药使用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

中华蜜蜂囊状幼虫病 Chinese sacbrood disease

由囊状幼虫病毒引起的中华蜜蜂幼虫期传染病。

3.2

子脾 brood comb

巢房内以蜜蜂卵、幼虫、蛹为主的巢脾。

3.3

花子 spotty brood pattern

同一子脾平面上,同时出现健康的封盖子、空巢房、卵巢房和日龄不一的幼虫巢房相间排列的状态。

3.4

穿孔 punch

蜜蜂子脾上的封盖子由于感病后巢房内虫、蛹的发育异常或死亡,内勤蜂啃咬而造成巢房盖上出现小孔的现象。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSBD:中华蜜蜂囊状幼虫病(Chinese sacbrood disease, CSBD)

CSBV:中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate)

dNTP:三磷酸脱氧核糖核苷酸(Deoxyribonucleoside-5'-triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution)

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

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

TAE: Tris-乙酸-EDTA(Tris-acetate-EDTA)

5 临床诊断

5.1 感染特点

CSBV 主要感染 1 日龄~3 日龄幼虫。感病幼虫于封盖前后死亡,其中约有 1/3 死于封盖前,2/3 死于封盖后(见附录 A)。

5.2 箱外观察

早晨蜜蜂开始活动时,若发现箱前有蜜蜂从巢内拖出幼虫及预蛹期呈“尖头”状尸体。

5.3 开箱检查

5.3.1 花子、房盖穿孔

患病初期蜂群出现蜂王产卵量减少,蜂群骚乱,情绪暴躁现象。提出子脾观察,发现蜂群内的子脾表现为花子、穿孔。病害严重期,病虫数量多,脾面上可见部分幼虫的体色逐渐由珍珠白色变黄色、黄褐色、褐色,甚至黑色。伴随体色变化,虫体逐渐软化,体壁内出现大量的液体。

5.3.2 幼虫死亡

患病蜂群巢房内有死亡大龄幼虫,从巢房中夹出病死幼虫呈囊袋状;随虫体水分蒸发,干枯成黑褐色尸体,头、尾部略上翘,形如“龙船状”。

5.4 流行特点

5.4.1 流行时间

南方和北方 CSBD 的流行有时间差异。南方 CSBD 常出现在 3 月~4 月和 11 月~12 月,北方则在 4 月~5 月和 8 月~9 月。蜂群因长期无法培育新成年蜜蜂,最终导致蜂群快速衰弱、飞逃或消亡。

5.4.2 传播途径

5.4.2.1 群内传播

成年蜜蜂因清理感病幼虫而被感染,感病的成蜂则通过饲喂幼虫,将病毒传染给健康幼虫,导致更多幼虫患病。

5.4.2.2 群间传播

主要通过盗窃、迷巢等行为方式与感病蜜蜂接触而传染。

5.5 结果判定

结合该病的流行特点,若蜂群出现 5.2 和 5.3 的典型症状,即可初步判定为 CSBD 疑似阳性。

6 实验室诊断

6.1 采样

6.1.1 采样比例

当蜂群数量小于或等于 10 群时,对所有蜂群均采样。当蜂群数量在 10 群以上时,以 10 群为基础采样量,每增加 10 群,采样量增加 1 群。采样时,每个蜂群取 10 只~20 只幼虫。

临床诊断时,若发现蜂群疑似感染 CSBD,可根据实际情况增加采样比例,同时采集疑似感染个体。

6.1.2 采样方法

根据临床诊断结果,选择疑似感染的蜂群采集蜜蜂幼虫样品。采样时,应尽量无菌采集变色或死亡幼虫,样品保存于 2℃~8℃ 的条件下,24 h 内送实验室检测。长期保存要经液氮处理后于 -80℃ 冰箱保存。

6.2 电镜法鉴定

6.2.1 病毒分离纯化

采集疑似 CSBD 中华蜜蜂幼虫样品,加入等量的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(见附录 B 中的 B.2)和 1/4 体积四氯化碳,充分研磨至匀浆。蔗糖密度梯度离心,纯化提取液(见附录 C)。

6.2.2 典型特征

将纯化后的提取液负染后用于制备电镜片。电镜下观察,可见大量圆形病毒颗粒,接近球状的六边形,直径约 28 nm(见图 C.1)。

6.2.3 结果判定

如电镜观察到 CSBV 典型特征,可判为疑似阳性。

6.3 反转录-聚合酶链式反应扩增(RT-PCR)鉴定

6.3.1 试剂

6.3.1.1 10×PCR 反应缓冲液(含 15 mmol/L 镁离子)。

6.3.1.2 5×反转录酶缓冲液。

6.3.1.3 75%乙醇。

注:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制。

6.3.1.4 DEPC 水,配制方法见 B.3。

6.3.1.5 DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。

6.3.1.6 dNTPs,每种浓度均为 10 mmol/L。

6.3.1.7 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)。

6.3.1.8 反转录酶。

6.3.1.9 氯仿。

6.3.1.10 异丙醇。

6.3.2 器材

6.3.2.1 1.5 mL 离心管。

6.3.2.2 凝胶成像系统。

6.3.2.3 普通 PCR 仪。

6.3.2.4 琼脂糖凝胶电泳系统。

6.3.3 样品材料

6.3.3.1 CSBD 阳性对照,由实验室合成含有 CSBV 阳性片段的质粒。

6.3.3.2 CSBD 阴性对照,选用健康且无 CSBD 临床症状的幼虫作为阴性对照。

6.3.4 制备样品 RNA(等效 RNA 提取)

6.3.4.1 采集具有 CSBD 疑似症状和健康的幼虫样品置于液氮中,于液氮条件下充分研磨病料组织。

6.3.4.2 取 0.1 g 充分研磨后的组织于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL TRIzol 提取液,室温放置 5 min,使其充分裂解。

6.3.4.3 于 12 000 g 离心 5 min,取上清液。

6.3.4.4 加入 200 μ L 氯仿,振荡混匀后室温放置 15 min。

6.3.4.5 4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 15 min,取上层水相,转移至另一离心管。

6.3.4.6 按异丙醇:TRIzol=1:2(V/V)的比例加入异丙醇混匀,室温放置 5 min~10 min。

6.3.4.7 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 g 离心 10 min,弃上清液。

6.3.4.8 加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制),温和振荡离心管,悬浮沉淀。

6.3.4.9 4 $^{\circ}$ C 条件下 8 000 g 离心 5 min,弃上清液。

6.3.4.10 室温晾干或真空干燥 5 min~10 min。

6.3.4.11 用 50 μ L 无 RNase 水,TE buffer 或 0.5% SDS 溶液重悬 RNA 样品,储存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

6.3.5 cDNA 合成

6.3.5.1 在离心管中依次加入随机引物 2 μ L,无 RNase 水 12 μ L;轻微振荡,瞬时离心。

6.3.5.2 70 ℃ 10 min,冰浴 2 min。

6.3.5.3 3 000 g 离心 1 min。

6.3.5.4 向离心管中依次加入:5× 反转录酶缓冲液 4 μL,dNTPs 1 μL,RNA 酶抑制剂 0.5 μL,反转录酶 0.5 μL,瞬时离心。

6.3.5.5 42 ℃ 1 h,70 ℃ 15 min,冰浴 3 min,瞬时离心,产物为第一链 cDNA,立即进行 PCR 扩增或 -20 ℃ 保存备用。

6.3.6 RT-PCR 检测

以 6.3.5 得到的第一链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。上、下游引物序列见附录 D 中表 D.1,RT-PCR 反应体系见表 D.2,RT-PCR 反应条件见 D.3。

6.3.7 琼脂糖凝胶电泳

6.3.7.1 制备 1.0% 琼脂糖凝胶(见 B.4),根据样品数选用适宜的梳子,待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1× TAE 缓冲液(见 B.6)淹没胶面。

6.3.7.2 取 8 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔,每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照和阳性对照。电泳条件为电压 80 V~100 V,电泳 30 min~60 min。

6.3.8 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶板置于凝胶成像系统下观察结果。阳性样品应检测到一条约 426 bp 的特异条带,阴性对照无扩增条带,则试验成立;否则,此次试验视为无效。

6.3.9 RT-PCR 结果判定

6.3.9.1 若待检样品扩增结果,检测为 426 bp 大小单一条带,可以初步判为检测样品中 CSBV 阳性(见图 D.1)。

6.3.9.2 若待检样品检测出现与 6.3.9.1 不一致的情况,则需要序列测定,与参考序列(见 D.5)进行比对。

6.3.9.3 如待测样品无目的条带扩增,判为阴性。

6.4 荧光定量 PCR 鉴定

6.4.1 试剂

6.4.1.1 2× Premix Ex Taq 酶。

6.4.1.2 DEPC 水,配制方法见 B.3。

6.4.1.3 引物和探针(见表 D.1)。

6.4.2 器材

6.4.2.1 白色 96 孔 PCR 板。

6.4.2.2 荧光定量 PCR 仪。

6.4.3 样品 RNA 制备

同 6.3.4。

6.4.4 cDNA 合成

同 6.3.5。

6.4.5 荧光定量 PCR 检测

在 96 孔 PCR 板中加入 20 μL 反应体系(见表 D.3),封口,500 g 离心 30 s 后使用荧光定量 PCR 仪进行检测,PCR 扩增条件见 D.7。

6.4.6 试验成立条件

6.4.6.1 阳性对照扩增曲线应呈标准的 S 曲线,且 C_t 值应小于 30(见图 D.2)。

6.4.6.2 阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线。

6.4.7 荧光定量 PCR 结果判定

6.4.7.1 若备检样本检测结果显示曲线呈标准的 S 曲线,且 C_t 值 ≤ 30 ,报告为 CSBV 核酸阳性。

6.4.7.2 若无 S 曲线,报告为 CSBV 核酸阴性。

6.4.7.3 $30 < C_t \text{ 值} \leq 35$ 判定为可疑,可疑样品重新检测,如重复后仍然 $30 < C_t \text{ 值} \leq 35$,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 CSBV 核酸阳性。

6.4.7.4 如重复后仍然 $30 < C_t \text{ 值} \leq 35$,但无扩增曲线,报告为 CSBV 核酸阴性。

7 综合判定

7.1 CSBV 病原检测结果判定

临床检测中华蜜蜂样本,经电镜法鉴定,或 RT-PCR 检测,或荧光定量 PCR 检测,其中任何一种方法检测为阳性,即可判定为 CSBV 感染。

7.2 CSBD 检测结果判定

临床疑似感染 CSBD 的中华蜜蜂样本,经 RT-PCR 检测,或荧光定量 PCR 检测,结果符合 CSBV 特征,可判定为发生 CSBD。

附录 A

(资料性)

中华蜜蜂囊状幼虫病

A.1 中华蜜蜂囊状幼虫病

中华蜜蜂囊状幼虫病(Chinese sacbrood disease, CSBD)是由中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)引起的一种可导致大量中华蜜蜂幼虫死亡的烈性传染病,简称中蜂囊幼病,是危害中华蜜蜂的主要病害之一。

A.2 病原

CSBD的病原是CSBV。在分类学上,该病原属于小核糖核酸病毒目(Picornavirales)传染性软化病毒科(Iflaviridae)传染性软化病毒属(Iflavirus)。病毒粒子无囊膜,为直径28 nm~30 nm的正二十面体病毒粒子,沉降系数为160 S,浮密度(CsCl)为1.35 g/mL(pH 7.0~9.0, <4.0时不稳定)。病毒粒子三维结构已解析,最外面是衣壳,由3种结构蛋白VP1、VP2、VP3组成,中间是由VP4组成的无定型膜状物,与衣壳松散连接,最里面是病毒核酸。病毒基因组为正义单链RNA,长度约为8 800 bp。基因组编码一个大的多聚蛋白,其中3种结构蛋白位于其近5'端,非结构蛋白(解旋酶、蛋白酶和复制酶)位于其近3'端。多聚蛋白经体内加工会被切割成上述有功能的蛋白。基因组的两侧各存在一个非翻译区(UTR),5'末端与VPg蛋白共价连接,3'末端连有一个Poly(A)尾。

A.3 症状

A.3.1 非典型症状

患CSBD的蜂群,通常导致3日龄~4日龄的幼虫死亡。患病初期的幼虫封盖前即被清除,蜂王重新在被清理的空巢房中产卵,从而呈现出许多巢房内虫态不一,形成花子或出现埋房现象(见图A.1)。在急性暴发期,约有1/3病虫死于封盖前,2/3死于封盖后。



注:红色圈内的蜜蜂幼虫为典型的CSBD病虫。

图 A.1 CSBD 病脾(徐书法 摄)

A.3.2 典型症状

病死幼虫头部上翘,白色,无臭味,体表失去光泽,巢房不封盖或封盖被工蜂咬开,可见“尖头”(见图A.2)。初期病虫与健康幼虫不易区别,随后病虫体色逐渐由珍珠样白色变为黄色、黄褐色、褐色,甚至黑

色。后期虫体软化,大量的液体聚积于病虫躯体和未脱去的表皮之间。从巢房中拖出的病死幼虫呈小囊状,含有大量病毒颗粒液体(见图 A. 3)。工蜂常将病死幼虫房盖咬一小孔或启开房盖,将死虫拖出巢房;没有被拖出巢房的死幼虫残留在巢房里,随虫体水分不断蒸发,干燥成一片黑褐色的鳞片,贴于巢房的一边,头、尾部略上翘,形如“龙船状”。成年蜂也会被病毒感染,但症状表现不明显。

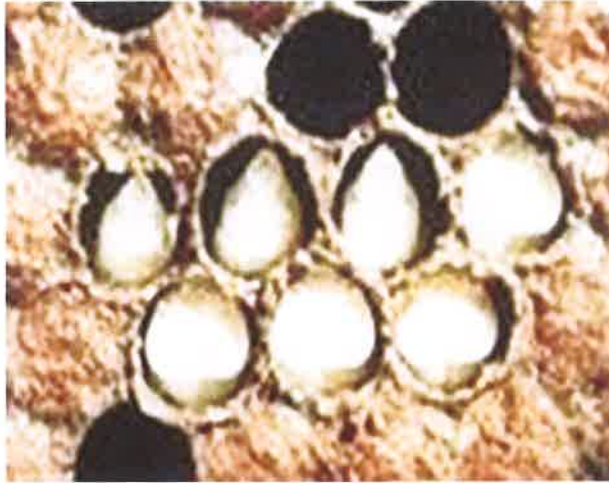


图 A. 2 患 CSBD 典型“尖头”症状(杜桃柱等)



图 A. 3 患 CSBD 典型囊状(杜桃柱等)

A. 4 流行特点

CSBD 的发生与气候、环境、蜜粉源、蜂种、蜂群的抵抗力以及蜂群的管理有关。恶劣的气候和环境、不充足的蜜粉源和不科学的管理技术是造成 CSBD 暴发的主要诱因。气候变化大、温湿度不稳定、蜂群又处于繁殖期时容易发病。温度低、温差大、蜂箱保温差等条件下易发病,特别是早春寒流袭击后,病害发展迅速。病害流行与食物也有关。当蜂群子脾大时,一旦缺乏饲料,幼虫营养不足,体质下降,抵抗力也下降,此时极易发生病害。夏、秋季节,蜂王减少产卵,幼虫数量相对较少,群内饲料较足,幼虫饲喂好,发育健壮,蜂群不易发病。

附录 B
(资料性)
溶液配制方法

B.1 磷酸盐缓冲液**B.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液**

取十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)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, 加蒸馏水定容至 1 L。

B.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液

取磷酸二氢钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)41.2 g, 加蒸馏水定容至 1 L。

B.1.3 0.2 mol/L, pH 7.2 磷酸盐缓冲液

取 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 28 mL, 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液 72 mL, 配成 0.2 mol/L PB 溶液。取 50 mL 0.2 mol/L PB 溶液, 加蒸馏水稀释至 1 L, 调 pH 至 7.2。

B.1.4 灭菌保存

在 121 °C 温度下高压灭菌 15 min, 冷却后无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 U/mL, 配制好的缓冲液保存在 4 °C 冰箱中。

B.2 0.03 mol/L 磷酸缓冲液

取 0.2 mol/L pH 7.2 的磷酸盐溶液 15 mL, 加去离子水定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min, 冷却备用。

B.3 DEPC 水

用超纯水按 0.1% 加入 DEPC, 室温静置过夜, 115 °C 高压灭菌 20 min, 冷却备用。

B.4 1.0% 琼脂糖凝胶

琼脂糖

0.5 g

1× TAE 缓冲液

30 mL

加热溶解, 冷却到 50 °C ~ 60 °C 时加入 5 μL GelRed 核酸染料, 倒入胶槽内自然凝固。

B.5 蔗糖梯度溶液

分别称取蔗糖 1 g、1.5 g、2 g、3 g, 加 1×PBS 溶液充分溶解并定容至 5 mL, 配制成浓度分别为 20%、30%、40%、60%(W/V) 的蔗糖溶液。

B.6 PCR 电泳需要的溶液及配方**B.6.1 50×TAE 缓冲液**

Tris 242 g

EDTA 18.61 g

冰乙酸 57.1 mL

加入 800 mL 去离子水, 充分搅拌均匀, 用 NaOH 调 pH 至 8.3, 加去离子水定容至 1 L, 室温保存备用。

B.6.2 1×TAE 缓冲液

取 50× TAE 缓冲液 20 mL, 加去离子水定容至 1 L, 得到 1× TAE 缓冲液, 用于 PCR 电泳及琼脂糖凝胶配制。

附录 C
(资料性)
病毒粒子分离纯化

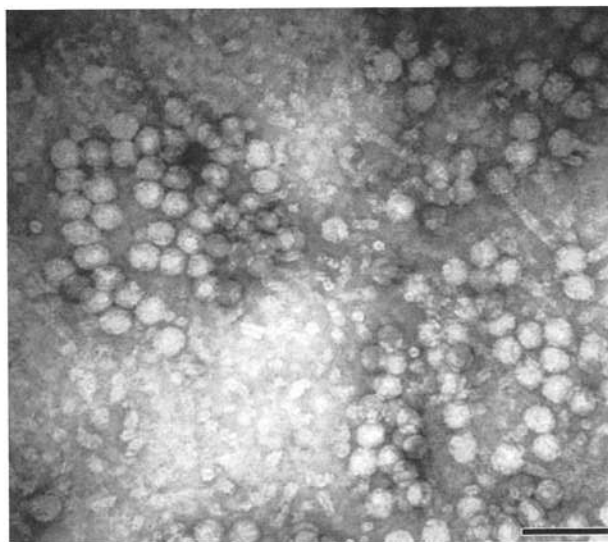
C.1 中华蜜蜂囊状幼虫病毒粒子纯化步骤

中华蜜蜂囊状幼虫病毒粒子纯化步骤如下：

- a) 将患病幼虫迅速于液氮中研磨后,转移至 15 mL 离心管,加入适量 PBS 于 37 °C、200 g 水浴振荡器中振荡 1 h;
- b) 将溶液取出后加入 0.5 mL 氯仿,于冰上涡旋 1 h;
- c) 将溶液于离心机中 12 000 g 4 °C 离心 1 h,取上清液,弃沉淀;
- d) 将收集的上清于 75 000 g 4 °C 离心 3 h,弃上清液,用 PBS 重悬沉淀,4 °C 过夜;
- e) 将沉淀重悬,8 000 g 4 °C 离心 30 min,取上清液,弃沉淀;
- f) 用 1× PBS 配制成浓度分别为 20%、30%、40%、60%(W/V)的蔗糖梯度,用 45 000 g 4 °C 超速离心 3 h;
- g) 从标记 30%蔗糖溶液位置集取产物。

C.2 纯化后病毒粒子的应用

C.2.1 用于电镜观察,负染后电镜观察到 28 nm 的病毒粒子(见图 C.1)。



注:比例尺为 100 nm。

图 C.1 CSBV 电镜结果(于慧敏 摄)

C.2.2 纯化的病毒液作为接种液,用于接种中华蜜蜂幼虫。若接种后幼虫出现 CSBD 发病表征,则可诊断病原为 CSBV。

附录 D

(资料性)

PCR 检测用引物和探针、反应体系及反应条件

D.1 CSBV PCR 检测用引物和探针

见表 D.1。

表 D.1 CSBV PCR 检测用引物和探针

名称	序列(5'-3')	用途
引物 CSBV-F	GGATGAAAGGAAATTACCAG	RT-PCR
引物 CSBV-R	CCACTAGGTGATCCACACT	
引物 F1	5'-AGTGGACGAAGAATCTGGAA-3'	荧光定量 PCR
引物 R1	5'-CCYTGCAACTGTAAGAGGTA-3'	
探针 P1	5' ^{Fam} -CTGCGGTCTTAA ^{TG} ACTGCRCT-Tamra3'	

D.2 CSBV RT-PCR 反应体系

见表 D.2。

表 D.2 CSBV RT-PCR 反应体系

试剂名称	用量, μL
10×PCR 缓冲液	2.5
dNTPs	1
DNA 聚合酶	0.5
引物 CSBV-F	1
引物 CSBV-R	1
cDNA	2
DEPC 水	17

D.3 CSBV RT-PCR 反应条件

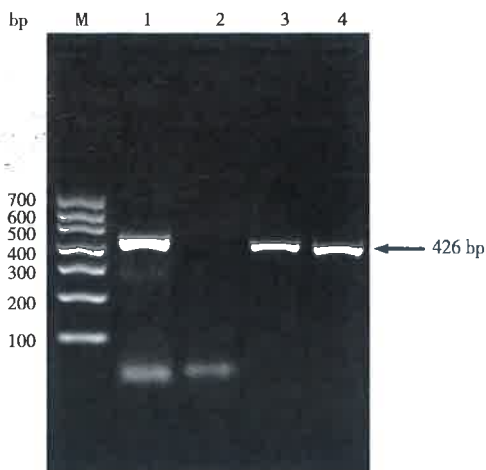
94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 40 s, 72 °C 40 s, 运行 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

D.4 CSBV RT-PCR 扩增结果示例图

见图 D.1。

D.5 CSBV PCR 产物参考序列 (GenBank Accession Number: AF092924. 1)

1 GGATGAAAGG AAATTACCAG AAAAAGTACG AAAGTATGGT GGAACCCGAG TGT^{TTTT}GTAA
61 CCCTCCTATC GATTATATTG TATCAATGAG GCAATATTAT ATGCACTTTG TTGCTGCATT
121 TATGGAACAG CGTTTTAAGC TAATGCATGC AGTGGGAATT AATG^{TT}CAGA GTACAGAGTG
181 GACGCTTTTA GCTTCTAAGT TGCTAGCGAA AGGGAATAAC ATTTGCACCA TTGATTATTC
241 AAATTTTGGT CCGGGTTTTA ATGCTCAAAT AGCGAAAGCT GCTATGGAAT TAATGGTGCG
301 GTGGACTATG GAGCATGTTG AGGGCGTAAA CGAGATAGAG GCGTATACTT TATTACATGA
361 GTGTTTAAAT TCGGTTCACT TAGTGTCTAA TACGCTGTAC CAACAAAAGT GTGGATCACC
421 TAGTGG



标引序号说明：
 M——Trans DNA Marker I； 2——阴性对照；
 1——阳性对照； 3,4——样品。
图 D.1 CSBV RT-PCR 扩增结果示例图

D.6 CSBV 荧光定量 PCR 反应体系

见表 D.3。

表 D.3 CSBV 荧光定量 PCR 反应体系

试剂名称	用量, μL
2× Premix Ex <i>Taq</i>	10
引物 F1	0.4
引物 R1	0.4
探针 P1	0.6
cDNA	2
DEPC 水	6.6

D.7 CSBV 荧光定量 PCR 反应条件

95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 运行 40 个循环; 50 °C 30 s, 1 个循环。

D.8 CSBV 荧光定量 PCR 结果示例图

见图 D.2。

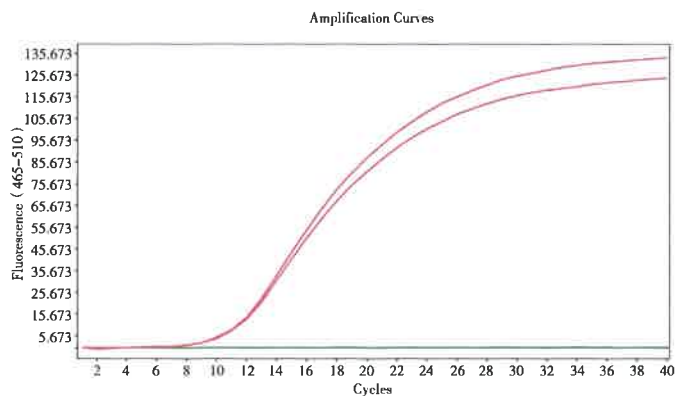


图 D.2 CSBV 荧光定量 PCR 结果示例图

中华人民共和国
农业行业标准
中华蜜蜂囊状幼虫病诊断技术
NY/T 4043—2021

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京科印技术咨询有限公司印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 25千字
2022年4月第1版 2022年4月北京第1次印刷
书号:16109·8941
定价:44.00元



NY/T 4043—2021

版权专有 侵权必究
举报电话:(010) 59194261