|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 11.220 |
| CCS  | B41 |

|  |
| --- |
|  21 |

辽宁省地方标准

DB XX XXXXX—XXXX

中华蜜蜂三种主要病毒检测方法

第3部分 中华蜜蜂以色列麻痹病毒RT-RPA检测方法

Detection methods of three viruses in *Apis cerana*

Part 3：RT-RPA method for detection of Israeli acute paralysis virus of *Apis cerana*

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

辽宁省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc107302677)

[1. 范围 1](#_Toc107302678)

[2. 规范性引用文件 1](#_Toc107302679)

[3. 缩略语 1](#_Toc107302680)

[4. 试剂与材料 1](#_Toc107302681)

[4.1 水 1](#_Toc107302682)

[4.2 RNA提取和检测反应试剂 1](#_Toc107302683)

[4.3 引物序列及对照样品 2](#_Toc107302684)

[5. 仪器与耗材 2](#_Toc107302685)

[6. 样品采集、运输及处理 2](#_Toc107302686)

[6.1 样品采集 2](#_Toc107302687)

[6.2 样品检测前处理 2](#_Toc107302688)

[7. 操作程序 2](#_Toc107302689)

[8. 结果判定 3](#_Toc107302690)

[8.1 结果分析条件设定 3](#_Toc107302691)

[8.2 质控标准 3](#_Toc107302692)

[8.3 结果判定与描述 3](#_Toc107302693)

[附录A 4](#_Toc107302695)

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。

本文件共分为三个部分：

——中华蜜蜂三种主要病毒检测方法 第1部分 中华蜜蜂囊状幼虫病毒荧光RT-PCR检测方法

——中华蜜蜂三种主要病毒检测方法 第2部分 中华蜜蜂残翅病毒SYBR Green I实时荧光RT-PCR检测方法

——中华蜜蜂三种主要病毒检测方法 第3部分 中华蜜蜂以色列急性麻痹病毒RT-RPA检测方法

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本文件起草单位：锦州医科大学、锦州市农业农村综合服务中心。

本文件主要起草人：费东亮、宁岱、于东哲、马鸣潇、王玉荣、王炜、张季、刘兵锋、马军、吴艳婕、马跃宇。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862；

标准起草单位通讯地址：锦州医科大学（锦州市凌河区松坡路3段40号），联系电话：0416-4673073。

中华蜜蜂三种主要病毒检测方法

第3部分 以色列麻痹病毒RT-RPA检测方法

* 1. 范围

本文件规定了中华蜜蜂种群中以色列麻痹病毒RT-RPA检测方法。

本文件适用于检测中华蜜蜂以色列麻痹病毒检测。

* 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试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

 IPAV：以色列麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus）

RT-RPA：实时荧光定量聚合酶链反应（Real-Time Quantitative Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification）

Ct值：反应管内荧光信号达到设定阈值时候所需的循环数（Cycle threshold）

PBS溶液：磷酸盐缓冲溶液（Phosphate buffer solution）

DEPC：焦碳酸二乙酯（Diethyl pyrocarbonate）

RNA：核糖核酸（Ribonucleic acid）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribon ucleicacid）

FAM：发光基团；

THF: 四氢呋喃修饰；

BHQ1：淬灭基团；

C3-Spacer: 聚合酶延伸阻断基团;

* 1. 试剂与材料

若无另有规定，仅使用分析纯试剂。所有试剂均需无RNA酶污染的容器（使用焦炭酸二乙酯水处理后高压灭菌）分装。

* + 1. 水

本标准所用水应符合GB/T 6682-2008中三级水的规格要求。

* + 1. RNA提取和检测反应试剂

总RNA抽提试剂、氯仿、异丙醇、DEPC水、75%乙醇（DEPC处理的水配制）、6核苷酸随机引物（50 uM）、逆转录酶、RNA酶抑制剂（40 U/μl）、5×逆转录酶缓冲液、三磷酸脱氧核糖核苷酸（dNTPs 每种浓度均为10 mmol/l）、DNA聚合酶（5 U/μl）、10×PCR缓冲液、预装冻干酶粉的0.2 mlTwistAmp反应管（TwistDx公司）。

* + 1. 引物序列及对照样品

IAPV上游引物 (F1:5’- CCACTTTGTATGGACACAATTCTTGARA -3',10 pmol/μl)；

IAPV下游引物 (R1:5’- TCACATATAGTATTCCAGAAATCGCTCCTG -3',10 pmol/μl)；

 探针（P1：5’- attgtgaaaatgcaattatggagctttcca[FAM6-dT]g[THF]a[BHQ1-dT]gaagagagcgttt[C3- Spacer],5 pmol/μl）；

IAPV阳性对照，含有靶基因片段的质粒；

IAPV阴性对照，选用健康且无以色列急性麻痹病临床症状成峰cDNA；

* 1. 仪器与耗材

5.1 荧光定量PCR扩增仪。

5.2 冷冻高速离心机（离心速度12000 r/min以上）。

5.3 微量可调式移液器及其配套带滤芯吸头（无RNA酶）。

5.4二级生物安全柜。

5.5 涡旋振荡器。

* 1. 恒温水浴锅。
	2. 低温冰柜或液氮罐。
	3. 耗材：1.5 ml离心管、0.2 ml PCR薄壁离心管或八连管、冰盒或冰袋。
	4. 样品采集、运输及处理
		1. 样品采集

 采集疑似感染的中华蜜蜂成蜂10只～20只，分别装入无菌的容器内，再加入5倍体积RNA保存液，置于-70℃超低温冰箱或液氮中保存，供检测使用。

* + 1. 样品检测前处理

 取经DEPC水处理和高压烘干后的研钵，放入3只～5只待测样品，加入含RNA酶抑制剂（终浓度为1 U/ml）的PBS 3 ml,混匀后充分研磨。在4℃，3500 r/min条件下，离心10 min。取出上清液，

 转移至1.5 ml无RNA酶离心管中,进行编号，用于后续反应。

* 1. 操作程序
	2. RNA提取

取n个2 ml无RNA酶的离心管，其中n为待检样品数+阳性对照+阴性对照，并对每个管进行对应编号。然后，每管分别加入400 μL待检样品、阳性对照、阴性对照，加入1 ml总RNA抽提裂解液，再加入200 μl氯仿，剧烈振荡30 s或涡旋振荡器上振荡10 s，充分混匀，室温孵育3 min。每份样品操作时均需更换无RNA酶枪头。4 ℃，12000 r/min离心10 min。将上层上清液转移至无RNA酶1.5 ml离心管中，编号，加入等量异丙醇（-20 ℃预冷），颠倒混匀。4℃，12000 r/min离心10 min。弃去上清，保留管壁和管底胶状沉淀。加入600 μl75%乙醇（DEPC处理的水配制），颠倒洗涤。4 ℃，12000 r/min离心10 min。小心弃去上清（为更好控制RNA中盐离子含量，应尽量去除乙醇），将离心管倒置于吸水纸上，沾干液体。立即进行cDNA合成或置于-70 ℃超低温冰箱保存备用。

7.2 cDNA合成

在提取RNA的离心管中加入DEPC水12 μl，随机6核苷酸引物1.5 μl，三磷酸脱氧核糖核苷酸1 μl后，轻轻振荡，瞬时离心。65 ℃作用5 min，迅速冰浴2 min。3000 r/min，离心1 min。在生物安全柜中，向离心管中一次加入： 5×逆转录酶缓冲液4 μl、RNA酶抑制剂0.5 μl、逆转录酶1 μl，缓慢混匀。42 ℃孵育60 min，95 ℃，5 min，瞬离后产物即为cDNA,立即进行PCR反应或-20 ℃保存备用。

**注：**此过程所有操作在冰盒上进行。

7.3 实时荧光RT-RPA反应

在与荧光PCR检测仪配套的PCR管中，依次加入下列试剂：Rehydration 缓冲液29.5μl，上游引物F1和下游引物R1各2.1 μl，探针0.6 μl，7.2中合成cDNA模板5 μl，无RNA酶水补足到体积50.0 μl；混匀后，2000 r/min离心5 s。将加样后的实时荧光PCR反应管放入荧光PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。实时荧光PCR反应条件随不同仪器略有改变，一般反应程序为：37℃ 2 min；37℃ 30 s，40个循环。在每次循环的延伸阶段收集荧光信号。

* 1. 结果判定
		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。

* + 1. 质控标准

阴性对照：无Ct值且无扩增曲线；阳性对照，Ct值小于或等于30.0，且出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

* + 1. 结果判定与描述

阴性：无Ct值且无扩增曲线，判定为阴性，表明样品内无蜜蜂以色列急性麻痹病毒。

阳性：Ct值小于或等于30.0，且出现典型的扩增曲线，判定为阳性，表明样品存在蜜蜂以色列急性麻痹病毒。

有效原则：Ct值大于30.0，且具有扩增曲线样品建议重做。重做结果无Ct值为阴性，否则为阳性。



附录A

(规范性附录)

溶液配制

A.1 磷酸盐缓冲液（0.01 mol/l PBS，pH 7.4）

 用800 ml蒸馏水溶解8 gNaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na2HPO4和0.24 gKH2PO4。用HCl调节溶液pH值至7.4，加水至1 l。分装后经121 ℃、15 min高压灭菌后备用。

A.2 焦碳酸二乙酯处理水

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