|  |  |
| --- | --- |
| 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1部分 中华蜜蜂囊状幼虫病毒荧光RT-PCR检测方法

Detection methods of three viruses in *Apis cerana*

Part 1：Fluroscent real-time PCR method for detection of sacbrood 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](#_Toc107301837)

[1 范围 1](#_Toc107301838)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc107301839)

[3 缩略语 1](#_Toc107301840)

[4 试剂与材料 1](#_Toc107301841)

[4.1 水 1](#_Toc107301842)

[4.2 RNA提取和检测反应试剂 1](#_Toc107301843)

[4.3 引物序列及对照样品 2](#_Toc107301844)

[5 仪器与耗材： 2](#_Toc107301845)

[6 实验室诊断 2](#_Toc107301846)

[6.1 样品采集 2](#_Toc107301847)

[6.2 样品检测前处理 2](#_Toc107301848)

[6.3 实时荧光qRT-PCR反应 2](#_Toc107301849)

[6.4 结果判定 3](#_Toc107301850)

[附录A 4](#_Toc107301851)

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：锦州市农业农村综合服务中心、锦州医科大学。

本文件主要起草人：樊琼、郭维军、王立岩、张芷宁、赵岩。

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：锦州市农业农村综合服务中心锦州市古塔区士英街8号），联系电话：18841631886。

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PCR检测方法

* 1. 范围

本文件规定了中华蜜蜂种群中中蜂囊状幼虫病毒Taqman探针qRT-PCR检测方法。

本文件适用于中华蜜蜂囊状幼虫病毒的检测。

* 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。

CSBV：中蜂囊状幼虫病毒（Chinese sacbrood virus）

qRT-PCR：实时荧光定量反转录聚合酶链反应（Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR）

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）

* 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）、随机引物（50 μm）、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。

* + 1. 引物序列及对照样品

检测CSBV上游引物 (F1:5’- CCTGGGAAGTTTGCTAGTATTTACG-3',10 pmol/μl)；

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

探针（P1：5’-(FAM) CGACATACCCGCAAATTCAGCACGC(Eclipse)-3',5 pmol/μl）；

CSBV阳性对照，含有靶基因片段的质粒；

CSBV阴性对照，选用健康且无中蜂囊状幼虫病临床症状幼虫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12 000 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。

5.6 普通冰箱：2℃～8℃

5.7 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。

* 1. 实验室诊断
     1. 样品采集

采集疑似感染的中华蜜蜂幼虫或工蜂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，2～8℃条件下保存应不超过24h检测，若需长期保存，应置于-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100 U/ml）的PBS 3 ml,混匀后充分研磨。在4℃条件下，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. 实时荧光qRT-PCR反应
       1. 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+空白对照，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、阴性对照和空白对照,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。在4℃条件下，12000 r/min离心10 min，将上层上清液转移至1.5 ml无RNA酶离心管中，编号，加入等量异丙醇（-20℃预冷），颠倒混匀。然后， 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。

**注：**可选市售商品化RNA提取试剂盒，按说明书进行。或按上述方法进行。

* + - 1. cDNA合成

在提取的RNA的离心管中加入DEPC水12 μl，随机核苷酸引物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，向离心管中依次加入： 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℃作用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。

* + - 1. 荧光PCR反应

在与荧光PCR检测仪配套的PCR管中，依次加入下列试剂：10×PCR缓冲液2.5 μl，三磷酸脱氧核糖核苷酸1.0 μl，DNA聚合酶0.5 μl，上游引物F1和下游引物R1各1.0 μl，探针1.0 μl，6.3.2中合成cDNA模板1.0 μl，无RNA酶水17 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：50℃ 2 min，95℃ 10min；95℃ 5 s，60℃ 60 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

实时荧光PCR反应结束后，设置荧光信号阈值，其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对照样品扩增曲线的最高点为准。

* + - 1. 实验成立条件

检测过程中分别设立阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为含CSBV靶基因片段的质粒，阴性对照为健康中华蜜蜂幼虫cDNA，空白对照为等体积的无菌一级水代替模板DNA。空白对照，无Ct值且无扩增曲线；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，并出现典型的S型扩增曲线。否则，本次实验无效，需要查明原因重新检测。

* + - 1. 结果判定与描述

阴性：符合6.4.2的条件，无Ct值且无扩增曲线，判定为阴性；表明样品无CSBV病毒。

阳性：符合6.4.2的条件，Ct值小于或等于30.0，且出现典型的扩增曲线，判定为阳性；确诊样品存在中华蜜蜂囊状幼虫。

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。