



中华人民共和国国家标准

GB/T 40251—2021

牡蛎单孢子虫病诊断规程 原位杂交法

Code of diagnosis for MSX disease of oysters—In situ hybridization method

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、全国水产技术推广总站。

本文件主要起草人：白昌明、杨冰、王崇明、黄健、李清、万晓媛、辛鲁生、李晨、余卫忠。



牡蛎单孢子虫病诊断规程

原位杂交法

1 范围

本文件规定了牡蛎单孢子虫病诊断规程中病原定位方法的要求,针对主要病原尼氏单孢子虫(*Haplosporidium nelsoni*),给出了原位杂交检测法所需试剂或材料、仪器设备、样品、试验步骤和结果判定。

本文件适用于尼氏单孢子虫在牡蛎中感染程度的评估和确诊;其他贝类也可参照执行。

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。

SC/T 7205.1—2007 牡蛎包纳米虫病诊断规程 第1部分:组织印片的细胞学诊断法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AP:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)

BCIP:5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸-甲苯胺盐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)

DAFA:戴维森氏乙醇-福尔马林-乙酸固定液(davidson's alcohol-formalin-acetic acid fixative)

DIG:地高辛(digoxigenin)

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:二水合乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium dihydrate)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:六水合氯化镁(magnesium chloride hexahydrate)

NaCl :氯化钠(sodium chloride)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$:十二水合磷酸氢二钠(sodium phosphate dibasic dodecahydrate)

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:二水合柠檬酸三钠(sodium citrate dihydrate)

NBT:氯化硝基四氮唑蓝(4-Nitro blue tetrazolium chloride)

KH_2PO_4 :磷酸二氢钾(potassium phosphate monobasic)

KCl:氯化钾(potassium chloride)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline buffer)

SSC:枸橼酸钠缓冲液(saline sodium citrate buffer)

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

Triton X-100; 聚乙二醇辛基苯基醚 (Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether)

5 试剂或材料

- 5.1 除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。
- 5.2 NaCl。
- 5.3 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。
- 5.4 KCl。
- 5.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。
- 5.6 KH_2PO_4 。
- 5.7 Tris。
- 5.8 Triton X-100。
- 5.9 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。
- 5.10 $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。
- 5.11 NBT。
- 5.12 BCIP。
- 5.13 蛋白酶 K。
- 5.14 多聚赖氨酸(相对分子质量 25 000)。
- 5.15 聚乙烯醇(相对分子质量 30 000~70 000)。
- 5.16 盐酸左旋咪唑。
- 5.17 俾斯麦棕 Y。
- 5.18 牛血清白蛋白。
- 5.19 聚蔗糖 400。
- 5.20 聚乙烯吡咯烷酮 360。
- 5.21 寡聚核苷酸探针 MSX1347,序列:5'-ATG-TGT-TGG-TGA-CGC-TAA-CCG-3',合成时用 DIG 标记的脱氧核糖核苷尿嘧啶代替脱氧核糖核苷胸腺嘧啶残基。
- 5.22 阳性对照:已知受尼氏单孢子虫感染,且原位杂交结果显示阳性的贝类组织样本。
- 5.23 阴性对照:已知未受尼氏单孢子虫感染,且原位杂交结果显示阴性的贝类组织样本。
- 5.24 石蜡(熔点 52 ℃~54 ℃):切片级。
- 5.25 甲酰胺。
- 5.26 丹哈特液(Denhardt's)。
- 5.27 鲑精 DNA。
- 5.28 硫酸葡聚糖。
- 5.29 山羊血清。
- 5.30 二甲基甲酰胺。
- 5.31 浓盐酸。
- 5.32 碱性磷酸酶偶联的 DIG 抗体(AP-抗 DIG,0.75 U/ μL ,4 ℃):生化试剂。
- 5.33 二甲苯。
- 5.34 中性树胶:生物染色用。
- 5.35 无水乙醇。
- 5.36 95%乙醇。
- 5.37 甲醛(37%)。
- 5.38 冰醋酸。

- 5.39 过滤海水:经纱网(≥ 200 目)过滤的海水。
- 5.40 DAFA 固定液:按附录 A 的 A.1 配制。
- 5.41 80%乙醇:按 A.2 配制。
- 5.42 70%乙醇:按 A.3 配制。
- 5.43 50%乙醇:按 A.4 配制。
- 5.44 500 $\mu\text{g/mL}$ 多聚赖氨酸:按 A.5 配制。
- 5.45 2 \times SSC:按 A.7 配制。
- 5.46 1 \times SSC:按 A.8 配制。
- 5.47 0.5 \times SSC:按 A.9 配制。
- 5.48 PBS:按 A.10 配制。
- 5.49 100 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K:按 A.12 配制。
- 5.50 0.4% 甲醛:按 A.13 配制。
- 5.51 杂交缓冲液:按 A.14 配制。
- 5.52 缓冲液 I:按 A.16 配制。
- 5.53 缓冲液 II:按 A.17 配制。
- 5.54 缓冲液 III:按 A.19 配制。
- 5.55 缓冲液 IV:按 A.21 配制。
- 5.56 显色液:按 A.23 配制。
- 5.57 0.5% 俾斯麦棕 Y (Bismark brown Y):按 A.24 配制。

6 仪器设备

- 6.1 石蜡切片机:满足 4 μm ~7 μm 厚度的石蜡连续切片要求。
- 6.2 显微镜:配备高倍镜(40 \times)和油镜(100 \times)。
- 6.3 微量移液器:量程 0.5 μL ~10 μL 、200 μL ~1 000 μL 。
- 6.4 普通冰箱。
- 6.5 切片保湿孵育箱。
- 6.6 展片水浴锅。
- 6.7 烘片机。

7 样品

7.1 采样对象

牡蛎、扇贝和蛤等易感双壳贝类。

7.2 采样数量、方法和保存运输

采样数量、方法和保存运输应符合 SC/T 7205.1—2007 附录 B 的要求。海水温度高于 10 $^{\circ}\text{C}$,且盐度高于 15‰时为采样的最佳时期。

7.3 样品的采集

稚贝(附着后~2 mm)和幼贝(2 mm~30 mm)取内脏团;成贝(>30 mm)取胃、肠道、闭壳肌和外套膜。

8 试验步骤

8.1 组织切片制备

8.1.1 脱水

组织块依次浸入盛有不同浓度乙醇溶液的烧杯中；流程如下：70%乙醇(1 h 45 min)→80%乙醇(1 h 45 min)→80%乙醇(1 h 45 min)→95%乙醇(45 min)→95%乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)→无水乙醇(45 min)。

8.1.2 透明

脱水后的组织块依次浸入盛有无水乙醇：二甲苯(1：1)混合液和二甲苯溶液的烧杯中，流程如下：无水乙醇：二甲苯(1：1)(25 min)→二甲苯(20 min)→二甲苯(20 min)。

8.1.3 浸蜡

恒温箱温度调节至高于石蜡熔点，流程如下：透明后的组织块依次浸入两个盛有融化石蜡的烧杯中各 80 min。

8.1.4 包埋

将恒温箱温度调节至高于石蜡熔点进行熔蜡，将熔蜡倒入包埋盒与包埋模具，也可用折叠纸盒；用预温的镊子迅速夹取组织块，切面朝下平放在模具底部；轻轻提起模具，置于冰上使其冷却凝固。

8.1.5 切片

用蜡铲或刀片将包埋块四周修平，使上下两面修成平行面，保留组织周围附着宽 2 mm~3 mm 的石蜡。用石蜡切片机切片，厚度 5 μ m。对每个石蜡包埋块至少切取两张不连续的切片。

8.1.6 展片

将切片平放于展片水浴锅水面上，待伸展平整后，用涂有多聚赖氨酸的载玻片捞出；置于烘片机上或烘箱内，45 $^{\circ}$ C 烘片 2 h。

8.2 原位杂交

8.2.1 组织切片(包括阴性对照和阳性对照)依次通过二甲苯(2 次, 5 min/次)、无水乙醇(2 次, 10 min/次)、95%乙醇(2 次, 10 s/次)、80%乙醇(2 次, 10 s/次)、50%乙醇(1 次, 10 s)，然后用双蒸水冲洗 2 次(每次 3 min)。

8.2.2 切片平放在切片保湿孵育箱中，吸取 500 μ L 100 μ g/mL 蛋白酶 K 溶液，加到每张组织切片上，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

8.2.3 把组织切片上的蛋白酶 K 溶液吸净，然后将其浸入预冷到 4 $^{\circ}$ C 的 0.4% 甲醛溶液中 5 min。

8.2.4 室温下，用 2 \times SSC 浸洗组织切片 5 min。

8.2.5 把组织切片平放在切片保湿孵育箱中，添加 500 μ L 杂交缓冲液至每张组织切片，42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。

8.2.6 添加 500 μ L 含 2 ng/ μ L DIG 标记的寡聚核苷酸探针杂交混合液至每张组织切片，置于 90 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 平板烘片机上保温 10 min。

8.2.7 将组织切片置于平整的冰面上淬冷 1 min。

- 8.2.8 在切片保湿孵育箱内 42 ℃下孵育 16 h~18 h。
- 8.2.9 依次用缓冲液 2×SSC(5 min, 室温)、2×SSC(5 min, 室温)、1×SSC(5 min, 室温)、1×SSC(5 min, 室温)、0.5×SSC(10 min, 42 ℃)、0.5×SSC(10 min, 42 ℃)浸洗组织切片,然后将组织切片放入缓冲液 I (1 min~2 min, 室温)。
- 8.2.10 加 500 μL 缓冲液 II 封闭组织切片, 37 ℃温浴 30 min。
- 8.2.11 用缓冲液 II 将 AP-抗 DIG 稀释至 0.75 U/μL (1 μL 0.75 U/μL AP-抗 DIG 加到 1 mL 缓冲液 II 中), 添加 250 μL 至每张组织切片, 在湿盒中 37 ℃温浴 3 h。
- 8.2.12 用缓冲液 II (2 次, 5 min/次, 室温)、缓冲液 III (2 次, 5 min/次, 室温)浸洗组织切片。
- 8.2.13 吸 500 μL 显色液于每张组织切片上, 在暗处于室温放置 1 h~3 h, 随时观察显色情况, 当阳性对照有明显显色或阴性对照开始普遍出现非特异性显色, 立即终止显色。
- 8.2.14 把组织切片置于缓冲液 IV 中 15 min 终止反应。
- 8.2.15 组织切片依次在双蒸水(1 次, 10 s)、0.5% 俾斯麦棕 Y (1 次, 1 min)、95% 乙醇(3 次, 10 s/次)、无水乙醇(3 次, 10 s/次)、二甲苯(4 次, 10 s/次)中浸洗。
- 8.2.16 空气自然干燥后, 滴加 2 滴中性树胶, 封片。
- 8.2.17 显微镜下(400 倍), 寻找着色明显的蓝黑色杂交信号, 并拍照。

9 结果判定

9.1 检测结果成立条件

阳性对照样品组织病灶部位观察到明显的蓝黑色杂交信号, 阴性对照样品组织中未观察到任何的蓝黑色杂交信号, 实验有效。

9.2 检测结果判定

检测样品组织中观察到蓝黑色杂交信号(参见附录 B), 则原位杂交检测结果为阳性, 判定为尼氏单孢子虫感染; 待测样品组织中未观察到蓝黑色杂交信号, 则原位杂交检测结果为阴性。牡蛎单孢子虫病及其主要病原简介参见附录 C。

附 录 A
(规范性)
试剂配方

A.1 DAFA 固定液

95%乙醇	330 mL
甲醛(37%)	220 mL
冰醋酸	115 mL
过滤海水	335 mL
混匀,室温密封贮存。	

A.2 80%乙醇

95%乙醇	800 mL
加水定容至	950 mL
混匀,室温贮存。	

A.3 70%乙醇

95%乙醇	700 mL
加水定容至	950 mL
混匀,室温贮存。	

A.4 50%乙醇

95%乙醇	500 mL
加水定容至	950 mL
混匀,室温贮存。	

A.5 500 µg/mL 多聚赖氨酸

多聚赖氨酸(相对分子质量 25 000)	5 mg
加水定容至	10 mL
混匀,4 ℃贮存。	

A.6 20×SSC

NaCl	175.32 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	88.23 g
加水溶解定容至	1 000 mL
调节 pH 至	7.0
高压蒸气灭菌后,室温贮存。	

A.7 2×SSC

20×SSC	100 mL
水	900 mL

A.8 1×SSC

20×SSC	50 mL
水	950 mL

A.9 0.5×SSC

20×SSC	50 mL
水	1 950 mL

A.10 PBS

KCl	0.2 g
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
加水定容至	1 000 mL

A.11 10 mg/mL 蛋白酶 K

蛋白酶 K	100 mg
加水定容至	10 mL
分装于无菌离心管中(0.25 mL/管), -20 °C 下保存。	

A.12 100 µg/mL 蛋白酶 K

10 mg/mL 蛋白酶 K	0.25 mL
PBS	24.75 mL
用前临时配制, 混匀, 4 °C 存放。	

A.13 0.4% 甲醛

甲醛(37%)	5.4 mL
水	500 mL
倒掉前可重复使用 4 次, 用前预冷。	

A.14 杂交缓冲液

20×SSC	10 mL
100% 甲酰胺	25 mL
20×丹哈特液(Denhardt's)	2.5 mL
10 mg/mL 鲑精 DNA	2.5 mL
25% 硫酸葡聚糖	10 mL
混匀, 4 °C 贮存。	

A.15 10×缓冲液 I

Tris	121.1 g
NaCl	87.7 g
加水溶解至	800 mL
用浓 HCl 调节 pH 至	7.5

GB/T 40251—2021

加水定容至 1 000 mL
高压蒸气灭菌, 4 ℃贮存。

A.16 缓冲液 I

10×缓冲液 I 100 mL
水 900 mL
混匀, 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 4 ℃贮存。

A.17 缓冲液 II

Triton X-100 0.3 g
山羊血清 2 mL
缓冲液 I 100 mL
在 60 ℃~80 ℃水浴中溶解, 不断晃动, 直至颗粒溶解。4 ℃可贮存 2 周。

A.18 10×缓冲液 III

Tris 121.1 g
NaCl 58.4 g
加水溶解至 800 mL
用浓 HCl 调节 pH 至 9.5
MgCl₂ · 6H₂O 101.6 g
加水定容至 1 000 mL
混匀, 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 4 ℃贮存, 出现沉淀后丢弃。

A.19 缓冲液 III

10×缓冲液 III 100 mL
水 900 mL
混匀, 0.45 μm 滤膜过滤除菌, 4 ℃贮存, 出现沉淀后丢弃。

A.20 10×缓冲液 IV

Tris 12.1 g
EDTA-Na₂ · 2H₂O 3.7 g
加水溶解, 并定容至 1 000 mL
用 HCl 调 pH 至 8.0, 高压灭菌。4 ℃贮存。



A.21 缓冲液 IV

10×缓冲液 IV 100 mL
水 900 mL
混匀, 0.45 μm 滤膜过滤除菌。4 ℃贮存。

A.22 10% 聚乙烯醇

聚乙烯醇 (相对分子质量 30 000~70 000) 10 g
加水溶解至 100 mL
搅拌溶解后, 分装 10 mL/管, -20 ℃贮存。

A.23 显色液

缓冲液Ⅲ	90 mL
盐酸左旋咪唑	24 mg
10% 聚乙烯醇	10 mL
4 ℃保存	
用前在每 1 mL 上述混合液中加入：	
NBT	4.5 μ L
BCIP	3.5 μ L

A.24 0.5% 俾斯麦棕 Y

俾斯麦棕 Y	2.5 g
水	500 mL
把染料溶于水中,过滤。室温贮存。	

A.25 NBT 贮存液

NBT	100 mg
二甲基甲酰胺	0.931 mL
水	0.402 mL
避光, -20 ℃贮存。	

A.26 BCIP 贮存液

BCIP	100 mg
二甲基甲酰胺	2 mL
避光, -20 ℃贮存。	

A.27 20×丹哈特液

牛血清白蛋白	0.4 g
聚蔗糖 400	0.4 g
聚乙烯吡咯烷酮 360	0.4 g
加水溶解并定容至	100 mL
0.45 μ m 的滤器过滤, 5 mL/支分装, -20 ℃贮存。	

A.28 25%硫酸葡聚糖

硫酸葡聚糖	25 g
加水定容至	100 mL
低热搅拌片刻使之溶解, -20 ℃保存。	

A.29 10 mg/mL 鲑精 DNA

鲑精 DNA	250 mg
水	25 mL

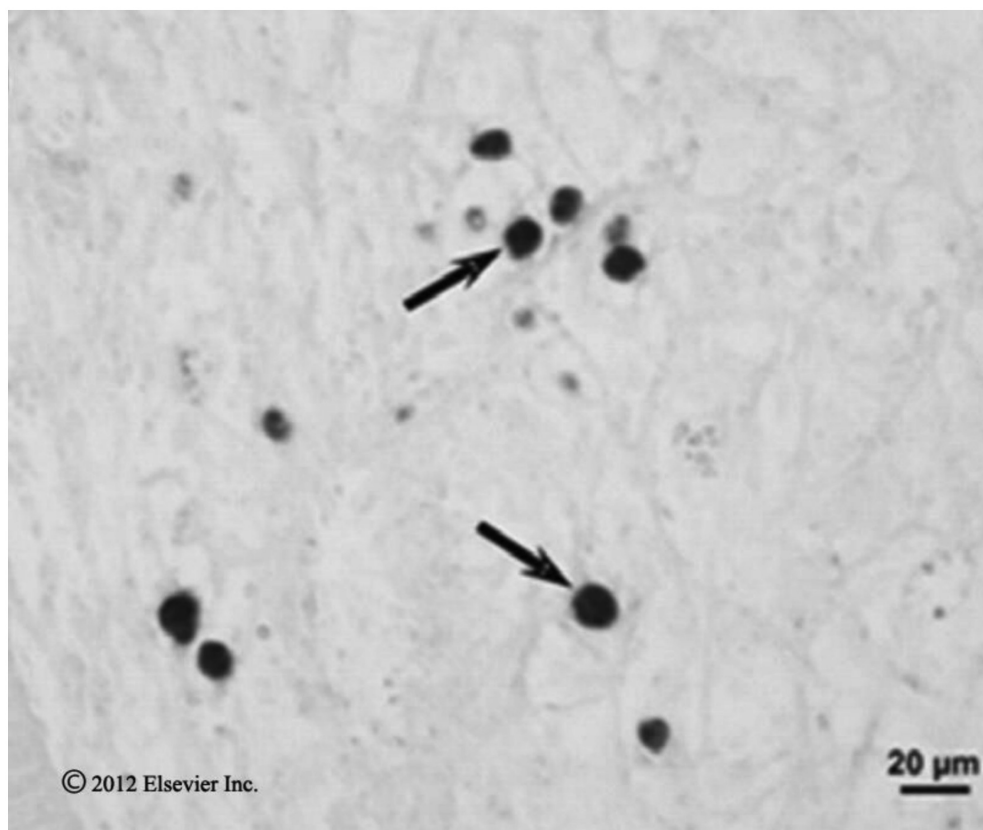
将鲑精 DNA 钠盐加入水中,用玻璃棒搅拌直至完全溶解。用 6 号针头的注射器反复抽打数次。在 100 ℃水浴中加热 10 min,立即放于冰浴中淬冷,分装于无菌小试管中, -20 ℃保存。使用前在 100 ℃水浴中加热 5 min,然后淬冷。

附 录 B

(资料性)

尼氏单孢子虫原位杂交检测结果示例

原位杂交法示例见图 B.1。



说明：

蓝黑颗粒为杂交信号(箭头所示)。

图 B.1 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)感染尼氏单孢子虫原位杂交检测结果

附录 C

(资料性)

牡蛎单孢子虫病及其病原简介

牡蛎单孢子虫病是由尼氏单孢子虫(*Haplosporidium nelsoni*)感染牡蛎等双壳贝类血细胞、结缔组织和消化道上皮,引起靶组织坏死和个体死亡的疫病。该病 1957 年发生于美国的切萨皮克湾和特拉华湾的美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)中。由于最初认为该疫病与一种未知的球形多核体寄生虫有关,因此又被称作 MSX(Multinucleate Sphere X)病。牡蛎单孢子虫病的主要宿主除美洲牡蛎外,还有长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*),几乎易感宿主所有组织器官的上皮和结缔组织均可被尼氏单孢子虫感染,孢子形成阶段仅在消化道上皮中被观察到。

尼氏单孢子虫在全球的分布比较广泛,如美国的佛罗里达州北部、马萨诸塞州和缅因州、法国、日本和韩国等。1993 年,曾在我国山东和辽宁养殖海湾扇贝中发现单孢子虫未定种(*Haplosporidium* sp.)。近年来,利用分子生物学方法,自我国北方海区养殖长牡蛎和海湾扇贝中检测到尼氏单孢子虫 DNA。

牡蛎单孢子虫病在北半球主要发生在 5 月中旬到 10 月底的夏季高温季节,死亡高峰集中在 8 月到 9 月,死亡率可高达 90%。高盐环境下患牡蛎单孢子虫病的牡蛎死亡率明显增高。