

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3990—2014

蜜蜂囊状幼虫病检疫技术规范

Quarantine protocol for sacbrood disease of bees

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

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

本标准主要起草人：郑腾、张体银、李宋钰、张志灯、宋战昀、王武军、白泉阳、王伟利。

蜜蜂囊状幼虫病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了蜜蜂囊状幼虫病的临床诊断方法和实验室诊断方法。

本标准适用于蜜蜂囊状幼虫病的临床诊断与检疫鉴定。

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

3 临床诊断

3.1 箱外观察法

当蜜蜂外出活动采集时,可看到蜜蜂从巢箱内拖出病死幼虫,在蜂箱前也可观察到零散的死亡幼虫,则需进一步对蜂群进行检查。

3.2 蜂群检查法

打开蜂箱观察封盖子脾,检查是否存在死亡幼虫比健康幼虫多的现象。由于发病初期病虫不断被工蜂清除,因此脾面上会出现卵、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(参见图 A.1)。但病害严重时,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。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(参见图 A.2)。死虫逐渐由乳白色变褐色,当虫体水分蒸发后,会干燥成黑褐色的鳞片,头尾部略上翘,形如“龙船状”。死虫体不具黏性、无臭味、易清除。通过检查幼虫和封盖子脾,可以依据以上特征性病变做出初步诊断。如需进一步确诊,可进行实验室诊断。

3.3 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 1)。

表 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	发病时间	死亡虫体特征			
囊状幼虫病	病毒	封盖子发病	无臭味	无黏性	枯干后呈褐色龙舟状	枯干后易与巢房分离
美洲幼虫腐臭病	细菌	封盖子发病	腐败、鱼腥臭味	黏性强,用镊子可拉成细丝	黑色鳞片样	枯干后不易与巢房分离

4 实验室诊断

4.1 设备、材料和试剂

4.1.1 设备

- 4.1.1.1 梯度 PCR 扩增仪。
- 4.1.1.2 台式冷冻高速离心机。
- 4.1.1.3 微量移液器(100 μL ~1 000 μL , 20 μL ~200 μL , 2 μL ~20 μL , 0.5 μL ~10 μL)。
- 4.1.1.4 电泳系统。
- 4.1.1.5 凝胶成像仪系统。
- 4.1.1.6 电子天平(感量 0.01 g)。
- 4.1.1.7 防护用具(包括蜂帽、防蛰手套、养蜂工作服和喷烟器)。

4.1.2 材料和试剂

4.1.2.1 普通 RT-PCR 检测用引物(对)序列为:

F1 5'-ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG-3'

R1 5'-CCT TGG AAC TCT GCT GTG TA-3'

扩增片段约 469 bp。

- 4.1.2.2 焦炭酸二乙酯处理水(DEPC 水)。
- 4.1.2.3 无水乙醇。
- 4.1.2.4 脱氧核苷酸三磷酸(dNTPs)。
- 4.1.2.5 琼脂糖(电泳纯)。
- 4.1.2.6 溴化乙锭(10 mg/mL)。
- 4.1.2.7 分子量标准(100 bp~1 000 bp)。
- 4.1.2.8 电泳缓冲液。
- 4.1.2.9 加样缓冲液。
- 4.1.2.10 DNA 纯化回收试剂盒。
- 4.1.2.11 RNA 抽提、反转录和 PCR 扩增可以采用等效的提取方法或试剂盒。
- 4.1.2.12 蜜蜂囊状幼虫病病毒标准株,由指定单位提供。
- 4.1.2.13 试验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规格要求。

4.2 采样、送样和处理

4.2.1 幼虫样品的采集和处理

如果蜂群有典型的临床症状,可以无菌割取一小块带有病虫或死虫的巢脾,也可无菌挑取单个病虫

或死虫若干只装入无菌的小试管内,供检测用。如果蜂群没有典型的临床症状,可以随机无菌挑取幼虫若干只分别装入无菌的小试管内,供检测用。

4.2.2 成蜂样品的采集和处理

如果蜂群有典型的临床症状,可以用灭菌后的镊子挑取蜂群内巢脾上或蜂箱底部带有典型病状的蜜蜂,以及在蜂箱前爬行的垂死蜜蜂和死亡蜜蜂 20~30 只,分别装入无菌的小试管内,供检测用。

4.3 操作步骤

4.3.1 RNA 提取

4.3.1.1 RNA 提取按 QIAGEN¹⁾ 公司的 RNA 抽提试剂盒(Rneasy Mini Kit)进行。选取不超过 30 mg 待鉴定虫体或蜂体,置于 DEPC 处理过的研钵中,加入液氮进行研磨,将研磨得到的粉末,快速转移至无 RNase 并经过液氮冷却的 1.5 mL 离心管中。

4.3.1.2 加入 600 μ L 缓冲液 RLT,颠倒混匀,高速涡旋振荡 30 s,10 000 g 离心 3 min,取上清,转移到另一个 1.5 mL 离心管。

4.3.1.3 加入 600 μ L 70%的乙醇,立即吹打混匀。

4.3.1.4 将吸附柱置于收集管中,将 4.3.1.3 中混匀的混合物吸入吸附柱中,8 000 g 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.3.1.5 加入 700 μ L 缓冲液 RW1 到吸附柱中,8 000 g 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.3.1.6 加入 500 μ L 缓冲液 RPE 到吸附柱中,8 000 g 离心 15 s,倒掉废液,将吸附柱重新放回收集管中。

4.3.1.7 加入 500 μ L 缓冲液 RPE 到吸附柱中,8 000 g 离心 2 min,取出吸附柱。

4.3.1.8 将吸附柱中置于新的收集管中,10 000 g 离心 1 min,以去除残留的缓冲液 RPE。

4.3.1.9 将吸附柱中置于 1.5 mL 离心管中,加入 30 μ L~50 μ L DEPC 水,8 000 g 离心 1 min,离心所得溶液中即含有 RNA。含有 RNA 的溶液应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,否则应在-70 $^{\circ}$ C 的条件下保存。

4.3.1.10 RNA 提取可选用等效的商品化试剂盒或等效的提取方法。

4.3.2 RT-PCR

4.3.2.1 反转录合成 cDNA

4.3.2.1.1 变性和退火

反转录合成 cDNA 可选用等效的商品化试剂盒,下面以 Promega²⁾ 公司的反转录试剂盒(Reverse Transcription System)进行 cDNA 合成。在 200 μ L PCR 管中加入 10 μ L RNA 模板,70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,短暂离心后置于冰上。

4.3.2.1.2 cDNA 合成

在另一个 200 μ L PCR 管中加入氯化镁 2.5 μ L、反转录 10 \times 缓冲液 2.5 μ L、dNTP 2.5 μ L、重组的 Rnasina 核糖核酸酶抑制剂 0.5 μ L、AMV 反转录酶 20 U、随机引物 1 μ L、RNA 模板 2 μ L,补充 DEPC

- 1) 使用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 QIAGEN 的产品,标准的使用人可以使用其他公司的同类产品。
- 2) 使用 Promega 公司的反转录试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 Promega 的产品,标准的使用人可以使用其他公司的同类产品。

SN/T 3990—2014

水至 25 μL 。将反应体系在室温下温育 10 min,然后在 42 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min。反应结束后,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 灭活反转录酶,冰浴 5 min。

4.3.2.2 PCR 扩增 DNA

扩增 DNA 按 TIANGEN³⁾ 公司的 DNA 扩增试剂盒 ($2\times\text{Taq PCR MasterMix}$) 进行。在 200 μL PCR 管中依次加入以下试剂: $2\times\text{PCR Master Mix}$ 12.5 μL , F1 和 R1 各 1 μL , 模板 2 μL , 加 DEPC 水到总体积 25 μL , 混匀, 短暂离心 5 s。将 PCR 管置于 PCR 扩增仪。先 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 再开始 35 次循环(核酸变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 引物退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s), 然后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 扩增 DNA 可选用等效的商品化试剂盒。

4.3.2.3 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液(见 B.1) 配制 2% 的琼脂糖凝胶平板, 其中含有 1 $\mu\text{g/mL}$ EB(见 B.2)。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 6 μL PCR 产物和 2 μL 上样缓冲液(见 B.3) 混匀后加入样品孔中进行电泳。在电泳时设立 DNA 标准分子量 Marker 作对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h, 当溴酚蓝到达底部时停止。

4.3.2.4 测序

使用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果, 经核酸扩增电泳后如出现一条大小约 469 bp 的 DNA 片段, 应对其切胶回收后进行测序, 参考序列参见附录 C。

4.3.2.5 结果判定

经核酸扩增电泳后阳性对照会出现一条 469 bp 的 DNA 片段, 而阴性对照和空白对照没有该核酸条带。待检样品经核酸扩增电泳后, 在相应 469 bp DNA 位置上有条带并经测序验证者为阳性。无条带或条带的大小不是 469 bp 的为阴性。

5 综合判定

经过箱外观察法、蜂群检查法和鉴别诊断后, 疑似囊状幼虫病的幼虫或成蜂应经 RT-PCR 确认阳性后, 方可判为发生了囊状幼虫病。

3) 使用 TIANGEN 公司的 DNA 扩增试剂盒进行描述只是为了叙述方便, 并不代表推荐 TIANGEN 的产品, 标准的使用人可以使用其他公司的同类产品。

附 录 A
(资料性附录)

患蜜蜂囊状幼虫病的子脾和幼虫

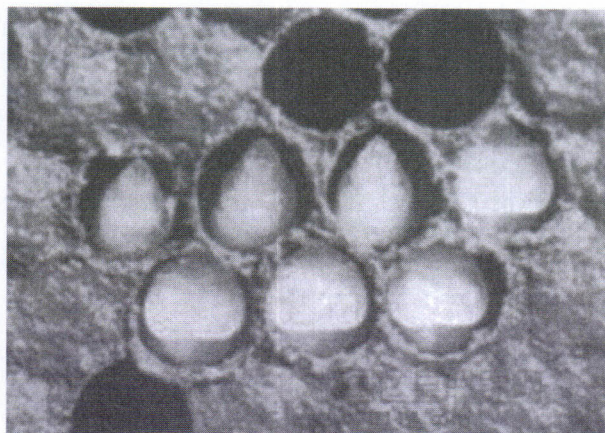


图 A.1 患蜜蜂囊状幼虫病的子脾

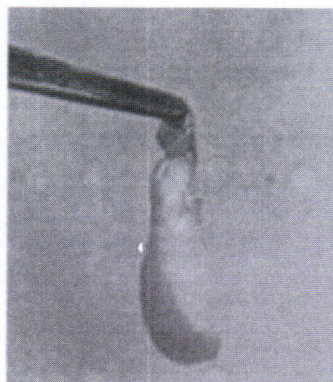


图 A.2 患蜜蜂囊状幼虫病的幼虫

SN/T 3990—2014

附 录 B
(规范性附录)
试剂配制

B.1 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
加水到	1 000 mL

用 5 mol/L 的盐酸(HCl)调到 pH 8.0。

B.2 EB(核酸染色剂)

用水配制成 10 mg/mL 的浓缩液。用时每 10 mL 电泳液或琼脂中加 1 μ L。

B.3 上样缓冲液

每 100 mL 溶液中含有溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g。

附 录 C
(资料性附录)

蜜蜂囊状幼虫病毒基因组核苷酸参考序列(GeneBank AF092924)

RT-PCR 扩增参考序列如下：

(221)

<u>accaaccgat</u>	<u>tcctcagtag</u>	tggaggaatc	agaagaaatc	agtcttctga	atatagttca	60
cgcgccagaa	tctataaaac	caagttggag	gcgcgtaatt	gcggagtgga	aagattatct	120
acaatcctta	cctctagtaa	gaagacattt	gatacagtgg	actcttatac	cgatttggtt	180
aatggttggg	tttctggtat	gtttgttgac	aagaacgtcc	actacaccga	aatgtccagt	240
gatgagagtg	gacgaagaat	ctggaatgtt	agacgcgcag	tgtcaattaa	gaccacagaa	300
ggaactatag	tgtggcgaaa	agttattact	tcgtacagtt	gtaaggtagc	ttcagaacta	360
gctgctaaga	gtatattggt	acaattttta	ggtcctataa	ggacccagag	tgatgaggta	420
ccctcgaagg	aatctattca	gggggacgct	<u>acacagcaga</u>	<u>gttccaagg</u>	(689)	469
