ICS 65.020.30
CCS B 41

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T —2021

柞蚕微粒子病 PCR 检测技术规程

Technical regulation for PCR detection of pebrine disease in Antheraea pernyi

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022.06.01）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2021－XX－XX 发布 2021－XX－XX 实施

辽宁省市场监督管理局 发 布

目 次

前 言 III
引 言 IV
1 范围 5
2 规范性引用文件 5
3 术语和定义 5
4 仪器与耗材 5
4.1 仪器 5
4.1.1 PCR 仪 5
4.1.2 台式低温高速离心机 5
4.1.3 全自动组织研磨仪 5
4.1.4 核酸电泳仪 5
4.1.5 恒温水浴锅 5
4.1.6 水平电泳仪（槽） 6
4.1.7 紫外凝胶成像仪 6
4.1.8 可调微量移液器：最大量程分别为 10 μL、100 μL、1000 μL 6
4.2 试剂 6
4.2.1 盐酸胍裂解液（见附录 A.1） 6
4.2.2 蛋白酶 K 6
4.2.3 洗脱液Ⅰ（见附录 A.2） 6
4.2.4 洗脱液Ⅱ（70%乙醇） 6
4.2.5 PCR 试剂盒 mix（含 Taq DNA 聚合酶，dNTP,PCR 缓冲液） 6
4.2.6 1.2%琼脂糖凝胶 6
4.2.7 TAE 电泳缓冲液（见附录 A.3） 6
4.2.8 DNA 核酸染料：商品化试剂 6
4.2.9 DNA 分子量标准（DL2000 marker） 6
4.2.10 PCR 引物（工作液为 10 μM） 6
4.3 材料 6
4.2.1 离心管（1.5 mL） 6
4.2.2 PCR 管（0.2 mL） 6
4.2.3 陶瓷研磨珠（0.5 mm） 6
4.2.4 磁力架 6
4.2.5 硅基磁珠（300 nm 直径） 6
5 检测过程 6
5.1 柞蚕样品 DNA 提取 6
5.2 PCR 鉴定 7
5.3 电泳 7
6 结果判定 7

7 废弃物处理 7

A.1 盐酸胍裂解液（5 M） 8
A.2 洗涤液Ⅰ 8
A.3 50×TAE 电泳缓冲液 8
A.4 1.2%琼脂糖凝胶 8
A.5 PCR 反应体系 8
B.1 PCR 扩增结果 9
B.2 灵敏度检测 9
B.3 序列信息 9

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：沈阳农业大学、辽宁省绿色农业技术中心。

本文件主要起草人：王勇、刘微、姜义仁、包阔、贾慧群、石生林、秦利。

本标准发布实施后,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

文件起草单位通讯地址：沈阳农业大学 （辽宁省沈阳市沈河区东陵路120号），联系电话：024-88487148。

引　言

柞蚕（*Antheraea pernyi*）生产是我省传统优势特色产业，也是我省农业支柱性产业之一，柞蚕微孢子虫可以经卵垂直传播，不仅造成丝茧生产减产，而且对种茧生产的影响较大，将会直接威胁柞蚕种质资源的保育、生产和食品安全，严重制约着柞蚕产业的健康发展。目前柞蚕微粒子病检查是采用19世纪70年代巴斯德（Louis Pasteur）提出的显微镜检查法，该方法在柞蚕种繁育过程中防控微粒子病起到的重要作用，但生产中常发生因病原未发育到孢子体阶段而难以发现的问题，因此实行PCR微粒子病分子检测，提高柞蚕微粒子病检测灵敏度，对于控制该病的胚种传染，促进柞蚕产业的提质增效具有重要意义。

本文件对柞蚕微粒子病的PCR检测引物、反应条件和操作规程进行了描述。本文件可供从事柞蚕生产、种茧检验的科研机构和主管部门等实体和个人使用。

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及5中相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款或条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：沈阳农业大学

地址：辽宁省沈阳市沈河区东陵路120号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

柞蚕微粒子病 PCR 检测技术规程

1 范围

本文件规定了柞蚕微粒子病PCR检测方法的主要仪器设备、试剂、引物、取样方法、样品DNA提取方法、PCR扩增程序、对照设置及结果判定等。

本文件适用于柞蚕微粒子病病原物-柞蚕微孢子虫（*Nosema* spp.）的PCR水平分子检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适合于本文件。

3.1 柞蚕微粒子病 Pebrine disease of *Antheraea pernyi*

由微孢子虫寄生而引起的柞蚕传染性病害。

3.2 柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi*

属于真菌界（Fungi）微孢子虫门（Microsporidia）无多孢子膜亚目（Apansporoblastina）微粒子科（Nosematidae）小孢子虫属（*Nosema*），寄生柞蚕并引起微粒子病的病原微生物。

3.3 PCR

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）的简称，可以从DNA中扩增特异的片段。

3.4 柞蚕微孢子虫核糖体小亚基RNA基因（SSU rRNA）

组成核糖体30S小亚基的主要成分，具有很高的保守型，其核糖体RNA为16S rRNA，编码基因位于rDNA基因簇中，常以多拷贝形式存在。

3.5 磁珠法提取DNA

利用纳米磁珠结合磁力架来提取DNA的方法，具有操作简单、高通量、安全无毒（无需氯仿、酚等有毒试剂）等特征。

4 仪器与耗材

4.1 仪器

4.1.1 PCR 仪

4.1.2 台式低温高速离心机

4.1.3 全自动组织研磨仪

4.1.4 核酸电泳仪

4.1.5 恒温水浴锅

4.1.6 水平电泳仪（槽）

4.1.7 紫外凝胶成像仪

4.1.8 可调微量移液器：最大量程分别为 10 μL、100 μL、1000 μL

4.2 试剂

除另有规定，本标准所用的试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6628的双重蒸馏水（ddH_2O）

4.2.1 盐酸胍裂解液（见附录 A.1）

4.2.2 蛋白酶 K

4.2.3 洗脱液Ⅰ（见附录 A.2）

4.2.4 洗脱液Ⅱ（70%乙醇）

4.2.5 PCR 试剂盒 mix（含 Taq DNA 聚合酶，dNTP,PCR 缓冲液）

4.2.6 1.2%琼脂糖凝胶

4.2.7 TAE 电泳缓冲液（见附录 A.3）

4.2.8 DNA 核酸染料：商品化试剂

4.2.9 DNA 分子量标准（DL2000 marker）

4.2.10 PCR 引物（工作液为 10 μM）

柞蚕微孢子虫小核糖体基因扩增引物序列
上游引物：NpSriboso-F：TAACAAGACTATGACGGATAACGGT
下游引物：NpSriboso-R：GCTTCTGTTCATCCAGTTAGGGT
柞蚕微孢子虫的扩增产物为353 bp。

4.3 材料

4.2.1 离心管（1.5 mL）

4.2.2 PCR 管（0.2 mL）

4.2.3 陶瓷研磨珠（0.5 mm）

4.2.4 磁力架

4.2.5 硅基磁珠（300 nm 直径）

5 检测过程

5.1 柞蚕样品 DNA 提取

5.1.1 将待检测柞蚕卵/幼虫/蛹/蛾等（约0.1 g）与0.3 g陶瓷珠、500 μL 5 M GuHCl 裂解液一起加入高速组织研磨仪中进行研磨，5000次/分钟，研磨时间6分钟，然后于水浴锅内65 ℃裂解30 min；

5.1.2 在4 ℃条件下12000 r/min离心5 min，取上清，加等体积预冷异丙醇，再加入2.5 μL羟基磁珠（50 μg/mL）涡旋震荡混匀，冰上静置10 min后置于磁力架上2 min，吸去全部液体；

5.1.3 移下磁力架加入等体积洗涤液Ⅰ（见附录A.2），移液枪吹匀，再次置于磁力架2 min，吸走全部液体，重复此步骤2次；

5.1.4 加入等体积洗涤液Ⅱ（70%乙醇），移液枪吹匀，再次置于磁力架2 min，吸去全部液体，重复此步骤2次；移下磁力架后，置于常温下风干磁珠；

5.1.5 加入20-40 μL 1×TE buffer洗脱液，并用移液枪吹匀，放入80 ℃水浴锅内水浴5 min；将EP管移至磁力架，等待2分钟后吸取全部溶液转移至新的离心管内，完成DNA提取。

5.2 PCR 鉴定

25 μL的反应体系见附录A.5，PCR扩增条件为：94 ℃预变性 3 min； 94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 20 s，34 个循环；72 ℃延伸 5 min；4 ℃保存。设置空白对照、阳性和阴性对照。

5.3 电泳

取 5 μL PCR产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，相同方法加入阴性对照和空白对照PCR产物，加入标准分子量DL2000 DNA marker，在 5V/cm电压条件下电泳 30 min。凝胶成像系统观察结果。

6 结果判定

观察凝胶判断结果，如柞蚕样品出现 350 bp左右的白色扩增条带，阴性和空白对照未出现目的条带时，检验结果成立，即被检测样品出现 350 bp左右扩增条带为柞蚕微粒子病检测阳性，未出现相应扩增条带的样品判定为阴性。

7 废弃物处理

检测过程中的废弃物及个人防护，应按GB 19489的规定执行。

附录 A

（规范性附录）
相关试剂配制

A.1 盐酸胍裂解液（5 M）

5 M GuHCl 47.756 g
10 mmol/L Tris-HCl 0.158 g
1 mmol/L EDTA 0.0292 g
0.1%SDS 0.1 g
0.5% 2-巯基乙醇 0.5 ml
750 mmol/L NaCl 4.38 g
加去离子水定容至100 mL，4 ℃保存。

A.2 洗涤液Ⅰ

60 mmol/L GuHCl 4 mL
60%乙醇 6 mL
混合成10 mL洗涤液。

A.3 50×TAE 电泳缓冲液

三羟基甲基氨基甲烷（tris） 242 g
乙二胺四乙酸二钠溶液（$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$） 37.2 g
然后加入800 mL的去离子水，充分搅拌溶解。
加入57.1 mL的醋酸，充分混匀。
加去离子水定容至1 L，室温保存。
需要用时，稀释为1×。

A.4 1.2%琼脂糖凝胶

琼脂糖 1.2 g
1×TAE电泳缓冲液 100 mL
微波炉中完全融化，待冷却至50~60 ℃时，加入Goldview染色剂5 μL，摇匀后倒入电泳槽，凝固后取下梳子，备用。

A.5 PCR 反应体系

表 1 PCR 反应体系（25μL 体系）

反应体系构成	添加量
待检测蚕组织 DNA	1 μL
上、下游引物	各 1 μL
5 U/μL Taq MasterMix	12.5 μL
ddH_2O	9.5 μL
Total	25 μL

附录 B

（规范性附录）
引物

B.1 PCR 扩增结果

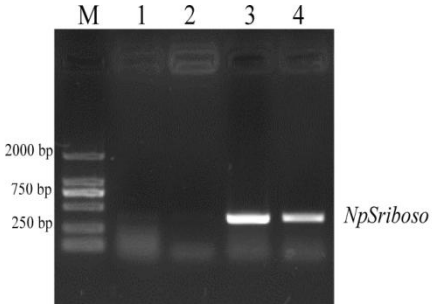

图1 柞蚕微粒子病检测的PCR扩增

注：M: DNA分子量标准DL2000；1: 阴性对照；2: 空白对照；3: 阳性对照（微孢子虫）；4: 检出的阳性样本；

图1结果表明：350 bp的条带即为柞蚕微孢子虫小核糖体基因（*NpSriboso*）。

B.2 灵敏度检测

图2结果显示：在不同稀释倍数下，柞蚕微孢子虫和柞蚕感染微孢子虫幼虫中均检测出*NpSriboso*基因，表明该*NpSriboso*为柞蚕微孢子虫的特征基因，可作为柞蚕感染微孢子虫的检测靶基因，且灵敏度较高。

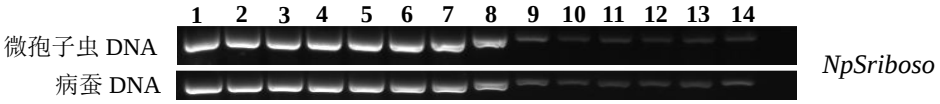

图2 以柞蚕微孢子虫和病蚕DNA为扩增模板的梯度PCR扩增

注：1: 10^{-1} × DNA稀释液；2: 10^{-2} × DNA稀释液；3: 10^{-3} × DNA稀释液；4: 10^{-4} × DNA稀释液；5: 10^{-5} × DNA稀释液；6: 10^{-6} × DNA稀释液；7: 10^{-7} × DNA稀释液；8: 10^{-8} × DNA稀释液；9: 10^{-9} × DNA稀释液；10: 10^{-10} × DNA稀释液；11: 10^{-11} × DNA稀释液；12: 10^{-12} × DNA稀释液；13: 10^{-13} × DNA稀释液；14: 10^{-14} × DNA稀释液

B.3 序列信息

<u>TAACAAGACTATGACGGATAACGGT</u>ATTACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCCTGAGAG
ATTGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACTTGACCTATGATATTATATTGAGGCAG
TTATGAGTAGTATTTTATAATTATTGTAGTATTGTAAGTACATATTACAAGATAAATCGGAGGGC
AAATCGAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTCCGATAGTGTGTATGATGATTGATGCAGTTA
AAAAGTCTGTAGTTTATTTATAATAAGCATTGTAAGGTATACTGTATGGTTAGGAGAGAGATGAA
ATGTGATA<u>ACCCTAACTGGATGAACAGAAGC</u>

注：下划线部分为PCR引物序列。