



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7239—2020

三疣梭子蟹肌孢虫病诊断规程

Code of diagnosis for microsporidiosis caused by *Ameson portunus*

2020-08-26 发布

2021-01-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会(SAC/TC 156)归口。

本标准起草单位:中国水产科学研究院东海水产研究所、浙江万里学院、江苏省海洋水产研究所、华东理工大学。

本标准主要起草人:周俊芳、程家骅、王元、姜亚洲、房文红、焦海峰、万夕和、吉红九、李新苍、王启要、肖婧凡、赵姝、符贵红。

引 言

本文件的发布机构提请注意如下事实,声明符合本文件时,可能涉及 9 操作步骤和附录 B 引物与《一种用于我国养殖与野生三疣梭子蟹微孢子虫感染早期预警的套式引物及其应用》(专利号: ZL 201510289724. 7)等相关专利的使用。

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保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,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:中国水产科学研究院东海水产研究所

地址:上海市军工路 300 号东海水产研究所

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这些专利的责任。

三疣梭子蟹肌孢虫病诊断规程

1 范围

本标准给出了三疣梭子蟹肌孢虫病(microsporidiosis caused by *Ameson portunus*)诊断所需试剂和材料、器材和设备、临床症状,规定了三疣梭子蟹肌孢虫病的采样、组织病理学检测、PCR 检测和综合判定。

本标准适用于三疣梭子蟹肌孢虫病的鉴定,用于三疣梭子蟹肌孢虫引起的相关疾病的流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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

GB/T 28630.4 白斑综合征(WSD)诊断规程 第4部分:组织病理学诊断法

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

PBS:磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Percoll:Percoll 分层液(Percoll layered liquid)

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

Tris:三(羟基甲基)氨基甲烷[Tris (hydroxymethyl) aminomethane]

4 试剂和材料

4.1 除特别说明外,分析所用试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.2 DNA 提取相关试剂:100%乙醇、95%乙醇、75%乙醇、Tris、HCl、EDTA、NaCl、SDS、蛋白酶 K、RNase A(100 mg/mL)、苯酚、氯仿、异戊醇。

4.3 PCR 检测相关试剂:DNA 分子量标准、PBS、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、PCR 反应缓冲液(10 $\times$, 20 mmol/L Mg²⁺)、dNTPs(2.5 mmol/L)、上样缓冲液(6 $\times$)、电泳缓冲液。

常规 PCR 引物(10 μ mol/L):MI1F:TGGCGACCAGTTCTAAG 和 MI545R:AAGCCGAACAATC-CACA;

套式 PCR 引物(第一轮扩增为常规 PCR 引物,第二轮扩增为 MI230F:CARATAGATAGG GGCAGTAGC 和 MI426R:ATCGGTCACTGCTAGAACTAC)。

4.4 组织病理学检测相关试剂:中性树胶、DAFA 固定液、苏木精染色液、1%伊红储存液、1%焰红储存液、伊红-焰红染色液、粘片剂、100%乙醇、95%乙醇、85%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、50%乙醇。

4.5 组织病理学检测用阳性对照为确诊三疣梭子蟹肌孢虫病且显示明显病理变化的蟹肌肉组织切片;PCR 检测用对照:阳性对照为确诊三疣梭子蟹肌孢虫病的蟹肌肉组织, -80 $^{\circ}$ C 保存,阴性对照为经套式

PCR 检测未感染三疣梭子蟹肌胞虫的健康蟹肌肉组织, -80°C 保存, 空白对照为 ddH_2O 。

4.6 以上配制试剂按附录 A 的规定执行; 引物对应靶基因序列及其扩张片段参见附录 B。

5 器材和设备

5.1 切片机。

5.2 组织脱水机。

5.3 包埋机。

5.4 染色机。

5.5 展片水浴锅。

5.6 烘片机。

5.7 光学显微镜。

5.8 组织破碎仪或研磨机。

5.9 PCR 扩增仪。

5.10 高速冷冻离心机。

5.11 纯水仪。

5.12 恒温水浴锅。

5.13 生物安全柜。

5.14 电泳仪。

5.15 凝胶成像系统或紫外观察仪。

5.16 超微量分光光度计。

6 临床症状

三疣梭子蟹肌胞虫病发病蟹摄食量减少, 个体消瘦, 防御、自洁和摄食等行为受到严重影响, 腹面和肢关节外观失去透明感, 剖检可见肌肉白浊、不透明, 甚至完全白浊化, 参见附录 C。

7 采样

7.1 采样对象

三疣梭子蟹。

7.2 采样数量

采样数量应符合 SC/T 7103 的规定。

7.3 采样方法和保存运输

揭开三疣梭子蟹头胸甲, 剪取小块肌肉, 收集于离心管中。采集样品的封存和运输应符合 SC/T 7103 的规定。

7.4 样品采集

用于组织病理学检测的肌肉样品 ($<1\text{ cm}^3$), 用 DAFA 固定液固定 24 h 以上, 固定液体积是组织体积的 10 倍以上; 用于 PCR 检测的肌肉样品 (50 mg~100 mg), 用 95% 乙醇保存。

8 组织病理学检测

8.1 修块

样品固定方法和切片前的取材修整, 宜符合 GB/T 28630.4 的要求。

8.2 脱水

75% 乙醇 (1 h 45 min) → 85% 乙醇 (1 h 45 min) → 85% 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)。

8.3 透明

100%乙醇:二甲苯(1:1)(25 min)→二甲苯(20 min)→二甲苯(20 min)。

8.4 浸蜡

纯石蜡(1 h 20 min)→纯石蜡(1 h 20 min)。

8.5 包埋、切片

将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋,包埋好的蜡块修整后置于切片机上切片,片厚 5 μm 。对每个石蜡包埋块至少切取 2 块不连续的切片。

8.6 展片

40℃下展片,用涂有一层粘片剂的载玻片捞出,置于平板烘片机上于 45℃烘片 2 h。

8.7 染色

二甲苯(5 min)→二甲苯(5 min)→100%乙醇(2 min)→100%乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→95%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→80%乙醇(2 min)→50%乙醇(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→蒸馏水(2 min)→苏木精染色液(5 min)→缓慢流动的自来水(6 min)→伊红-焰红染色液(2 min)→95%乙醇(1 min 20 s)→95%乙醇(2 min)→100%乙醇(2 min)→100%乙醇(2 min)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)→二甲苯(2 min 30 s)。

8.8 封片

滴加 2 滴中性树胶封片。

8.9 观察

光学显微镜下观察、拍照。

8.10 结果判定

8.10.1 正常三疣梭子蟹肌肉组织切片中肌细胞质染成红色,细胞核染成蓝色,肌原纤维排列整齐,无断裂、溶解现象。

8.10.2 三疣梭子蟹肌胞虫病发病蟹的肌肉组织可见肌原纤维断裂、溶解,肌原纤维间隙分布大量红色、直径为 1.0 μm ~1.4 μm 的椭圆形孢子,参见附录 C。

9 PCR 检测

9.1 总 DNA 提取

9.1.1 取 50 mg~100 mg 肌肉组织样品,加入 250 μL PBS 和少量玻璃珠,6 500 r/min 30 s 匀浆处理 2 次,破碎梭子蟹肌胞虫的孢子壁;组织匀浆液 5 000 r/min 离心 3 min,取上清液 200 μL ,提取 DNA。

9.1.2 将 200 μL 裂解液和 20 μL 蛋白酶 K 加入上清液,56℃水浴 2 h~4 h。

9.1.3 加入 RNase A 至终浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,60℃水浴 30 min。

9.1.4 加入 350 μL 苯酚、336 μL 氯仿、14 μL 异戊醇,轻微颠倒混匀 10 min,12 000 r/min 离心 5 min。

9.1.5 取上清液,转移至一个新的 2 mL 离心管中,加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)混合 10 min,12 000 r/min 离心 5 min。

9.1.6 取上清液,加入 2 倍~2.5 倍体积的 100%乙醇,颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min,去上清液。

9.1.7 加入 300 μL 75%乙醇,漂洗沉淀 2 次。

9.1.8 加入 300 μL 100%乙醇漂洗沉淀,12 000 r/min 离心 5 min 后,尽可能去除全部液体,室温干燥。

9.1.9 根据沉淀量加入 30 μL ~50 μL 的 ddH₂O,使 DNA 完全溶解。

9.1.10 取 2 μL 样品 DNA 溶液使用超微量分光光度计测定 OD 值。将 DNA 分装,置于-20℃保存。

9.1.11 可以采用同等抽提效果的其他方法或使用商品化 DNA 抽提试剂盒。提取过程同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

9.2 常规 PCR 检测

9.2.1 常规 PCR 反应体系见表 1。配制好的反应液置于普通 PCR 扩增仪内,按如下程序扩增:95℃

5 min;95℃ 45 s,47℃ 35 s,72℃ 40 s,循环 25 次;72℃延伸 5 min;4℃保温。阳性对照、阴性对照和空白对照与样品的体系和程序相同。

表 1 三疣梭子蟹肌胞虫病常规 PCR 检测反应体系

试剂	添加量
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.25 μL
10× PCR 缓冲液(Mg ²⁺ 20 mmol/L)	5 μL
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	4 μL
引物 MI1F(10 μmol/L)	5 μL
引物 MI545R(10 μmol/L)	5 μL
DNA 模板	2 μL
注:添加 ddH ₂ O 至总体积 50 μL。	

9.2.2 琼脂糖凝胶电泳:用 1×电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖溶液,加热溶解。降温至 60℃,加入 1×核酸染料制备凝胶平板。用 1×上样缓冲液混合 PCR 产物加入凝胶孔,并设置 DNA 分子量标准。100 V 电泳约 30 min。电泳结束,将凝胶置于紫外观察仪或凝胶成像系统下观察和拍照。

9.2.3 结果判定:常规 PCR 扩增后在 545 bp 处有特定电泳条带,而阴性对照和空白对照均无相应核酸条带,即判断为阳性,并且实验有效;阳性对照无特定条带出现或阴性对照或空白对照有特定条带出现都表明 PCR 失败,应在排除原因、清除污染后重新检测。

9.3 套式 PCR 检测

9.3.1 套式 PCR 第一轮,反应体系和程序同常规 PCR 检测。

9.3.2 套式 PCR 检测第二轮,反应体系见表 2。配制好的反应液置于普通 PCR 扩增仪内,按如下程序扩增:95℃ 5 min;95℃ 35 s,50℃ 30 s,72℃ 20 s,循环 20 次;72℃延伸 5 min;4℃保温。阳性对照、阴性对照和空白对照与样品的体系和程序相同。

表 2 三疣梭子蟹肌胞虫病套式 PCR 检测第二轮反应体系

试剂	添加量
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.25 μL
10× PCR 缓冲液(Mg ²⁺ 20 mmol/L)	5 μL
dNTPs(各 2.5 mmol/L)	4 μL
引物 MI230F(10 μmol/L)	0.6 μL
引物 MI426R(10 μmol/L)	0.6 μL
第一轮 PCR 产物	2 μL
注:添加 ddH ₂ O 至总体积 50 μL。	

9.3.3 琼脂糖凝胶电泳(见 9.2.2)。

9.3.4 结果判定:套式 PCR 扩增后在 197 bp 处有特定电泳条带,而阴性对照和空白对照均无相应核酸条带,即判断为阳性,并且实验有效;阳性对照无特定条带出现或阴性对照或空白对照有特定条带出现都表明 PCR 失败,应在排除原因、清除污染后重新检测。

10 综合判定

10.1 疑似病例的判定

组织病理变化、常规 PCR 检测和套式 PCR 检测中的任何一种检测阳性,即判定为三疣梭子蟹肌胞虫阳性。

10.2 确诊病例的判定

病蟹出现典型临床症状,且组织病理变化、常规 PCR 检测和套式 PCR 检测中的任何一种检测阳性,即判定为三疣梭子蟹肌胞虫病。

附录 A

(规范性附录)

相关试剂配制

A.1 戴维森氏 AFA(DAFA)固定液

95%乙醇	330 mL
甲醛(37%)	220 mL
冰醋酸	115 mL
水	335 mL

混匀,室温密封储存。

A.2 苏木精染色液

温水(50℃~60℃)	1 000 mL
苏木素	1.0 g
碘酸钠	0.2 g
钾明矾	90.0 g
柠檬酸	1.0 g
水合三氯乙醛	50.0 g

按上述顺序混合,溶解后即可使用,室温储存。

A.3 1%伊红储存液

伊红 Y(水溶性)	5 g
水	500 mL

溶解后置于棕色瓶中,室温储存。

A.4 1%焰红储存液

焰红 B(水溶性)	1 g
水	100 mL

溶解后置于棕色瓶中,室温储存。

A.5 伊红-焰红染色液

1%伊红储存液	100 mL
1%焰红储存液	10 mL
95%乙醇	780 mL
冰醋酸	4 mL

混匀后即可使用,室温储存。

A.6 粘片剂

明胶	1 g
热水	100 mL

溶解后,加入:

苯酚	2 g
甘油	15 mL
混匀,在棕色瓶中室温储存。	

A.7 DNA 提取用组织裂解液

溶液 A:称取 15.142 4 g Tris,加入 150 mL 灭菌水,使用浓盐酸调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 B:称取 7.306 2 g EDTA,加入 200 mL 灭菌水,调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 C:称取 29.22 g NaCl,加入 90 mL 灭菌水,定容至 100 mL。

溶液 D:称取 10 g SDS,加入灭菌水,定容至 100 mL。

然后,取

溶液 A	200 mL
溶液 B	250 mL
溶液 C	100 mL
溶液 D	100 mL
灭菌水定容至	1 000 mL
混匀,室温储存。	

A.8 蛋白酶 K

蛋白酶 K 粉	20 mg
水	1 mL

溶解后分装于无菌离心管中,−20℃下储存。

A.9 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)

Na ₂ HPO ₄	1.19 g
NaH ₂ PO ₄	0.22 g
NaCl	8.50 g
水	1 000 mL

充分搅拌溶解后,4℃储存备用。

A.10 TE 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	2 mL
水定容至	1 000 mL
高温高压灭菌,4℃储存备用。	

A.11 电泳缓冲液(50×)

Tris	242 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
冰乙酸	57.1 mL
灭菌水定容至	1 000 mL
室温储存。	

附录 B
(资料性附录)
扩增片段参考序列

常规和套式 PCR 扩增片段对应的序列

TGGCGACCAGTTCTAAGGAGTGCAGCAGGCTCGAACTTACCGAAT TATAGATTAGAGGTAGT-
GATGAAACGTTTATATAGAAATACTGGTAAAGCAAGTATTATCAACTGGAGGGAAAGTCTGGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACCAGCTCCAGGAGCTTCTTCGATATGTTGCGGTAAAACGTCCGTAGTCGCGGCT
TGGGACTGACCTGTAATCTATTGGTCAA CARATAGATACGGGCAGTAGC AAGCTGGAAAAGAGC
AATTTGGTGTCAGCTAATGGTATGGGGAGGGGTGAAGTCTGAGGATCCATGCAGGAGGAGCA
AAGGCGAAAGCACTGACAAAGATTGATTCTGTTGATCAAGGACAGAGGCTAGAGGATCGAAT
ACGATTAGATAC CGTAGTAGTTCTAGCAGTGACCGATGATGATTTTGCTTATGGCAATAGAG
AAATCAAAATAGATCTCCGGGGGGGAGTACATGCGCAAGCAAGAAACTTAAAGAAATTGACGG
AAGACTACCACAAGGTGTGGATTGTTCCGGCTT

注：划线正体部分为常规 PCR 引物和套式 PCR 外引物对应的靶基因序列，划线斜体部分为套式 PCR 内引物对应的靶基因序列。



附录 C
(资料性附录)
三疣梭子蟹肌胞虫病

C.1 流行病学

三疣梭子蟹肌胞虫在养殖和野生三疣梭子蟹中广泛流行,是影响三疣梭子蟹健康养殖的主要病原。东海区局部养殖三疣梭子蟹肌胞虫感染率可达 90% 以上,野生群体也有携带。当三疣梭子蟹肌胞虫感染量达到 1.0×10^9 拷贝/mg 肌肉时,三疣梭子蟹就存在暴发三疣梭子蟹肌胞虫病(俗称“牙膏病”)甚至死亡的风险。因此,该病对海捕种蟹与养殖蟹的健康培育、增殖放流以及养殖与野生种群的维护等均构成威胁。

C.2 临床症状

病蟹摄食量减少,个体消瘦,生长缓慢;有些个体滞留池边,不下潜。患病后期,病蟹游泳足和螯肢等活动严重受限,防御、自洁和摄食等行为受到严重影响。个体外观逐渐失去清亮感,变成白色,附肢关节膜内也失去透明感,严重发病个体肌肉呈现典型的白浊化特征(见图 C.1A)。

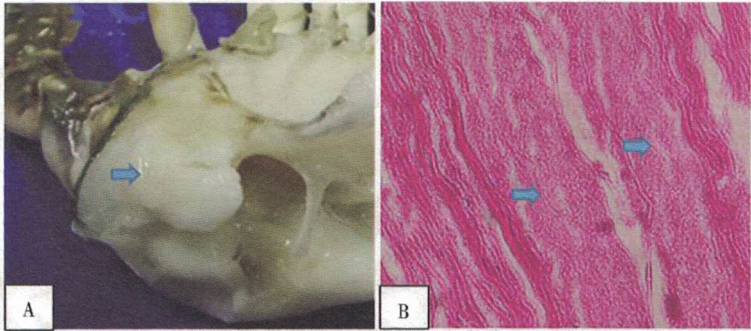


图 C.1 三疣梭子蟹肌胞虫病发病蟹

注:A 图为患病三疣梭子蟹肌肉(箭头所示为肌肉白化);B 图为肌组织病理变化(400×,箭头所示为孢子)。

C.3 病理变化

大量三疣梭子蟹肌胞虫侵入肌肉组织,分布于肌原纤维间隙,导致肌原纤维断裂、溶解,肌原纤维间隙可见大量红色、直径为 $1.0 \mu\text{m} \sim 1.4 \mu\text{m}$ 的椭圆形孢子(见图 C.1B)。

中 华 人 民 共 和 国
水 产 行 业 标 准
三疣梭子蟹肌胞虫病诊断规程

SC/T 7239—2020

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

化学工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

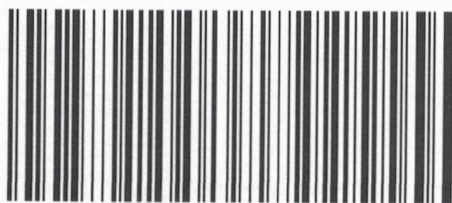
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2020 年 12 月第 1 版 2020 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8362

定价: 25.00 元



SC/T 7239—2020

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261