

ICS 11.220  
B 41



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 26618—2011

GB/T 26618—2011

## 派琴虫病诊断操作规程

Protocol of diagnosis for Perkinsosis

中华人民共和国  
国家标准  
派琴虫病诊断操作规程  
GB/T 26618—2011

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2011年8月第一版 2011年8月第一次印刷

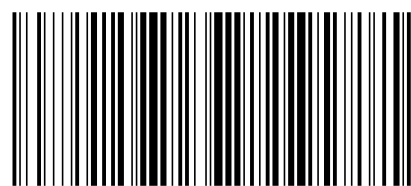
\*

书号: 155066·1-43368 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 26618-2011

2011-06-16 发布

2011-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

附录 B  
(资料性附录)  
派琴虫形态

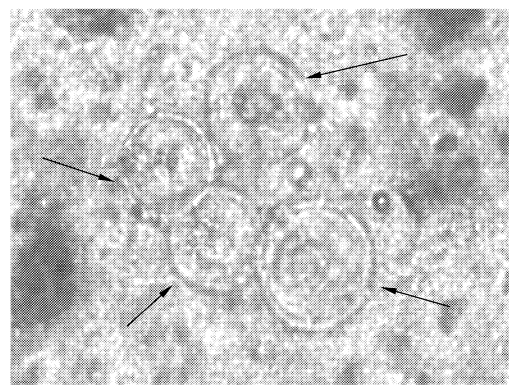


图 B.1 未染色的派琴虫休眠孢子(箭头所指)

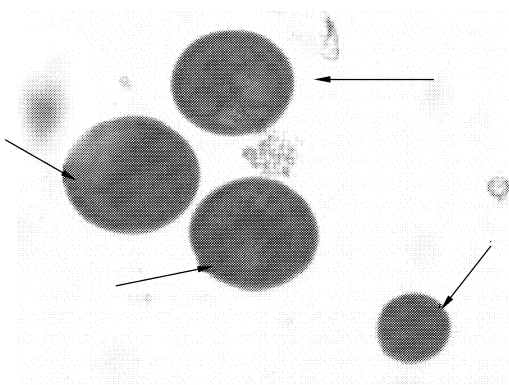


图 B.2 经卢戈氏碘液染色后的派琴虫休眠孢子(箭头所指)

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、福建出入境检验检疫局、黄岛出入境检验检疫局、国家海洋环境监测中心、深圳出入境检验检疫局、上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴绍强、林祥梅、刘建、郑腾、李西峰、梁玉波、刘荃、李建、韩雪清、贾广乐、梅琳。

## 引 言

派琴虫病是影响世界贝类养殖业发展的主要寄生虫病,为国际兽医局(OIE)规定的必报水生动物疫病之一。本病 1946 年首次报道,当时,引起美国路易斯安那州的墨西哥海湾的大批牡蛎(*Crassostrea virginica*)死亡。迄今为止,已发现派琴虫存在于美洲、欧洲、澳洲、亚洲和非洲五大洲的许多贝类体内,包括牡蛎、鲍鱼、蛤子、扇贝、珍珠牡蛎、鸟蛤和贻贝等体内,并在许多地区造成了严重的危害,死亡率高达 95%。

1997 年,我国在栉孔扇贝、虾夷扇贝、皱纹盘鲍、菲律宾蛤仔体内检测到派琴虫。美国 2005 年也从中国广西北海进口牡蛎中检出派琴虫。目前,派琴虫已经成为影响我国贝类养殖业发展的主要病原之一。据对黄海北部三个海域的菲律宾蛤仔的派琴虫感染状况进行调查的结果表明,除 3 月份和 6 月份的感染率分别为 95%和 90%之外,其他月份感染率均为 100%。

目前,派琴虫感染的诊断通常依靠 OIE 推荐的组织切片法、FTM 组织培养法以及 PCR 方法。组织学方法可以通过显微镜下直接观察虫体或观察组织损伤来监测感染的分布情况。FTM 培养派琴虫休眠孢子的方法是将派琴虫滋养体进行培养,培养后,虫体体积增大、细胞壁增厚,而且不繁殖,是一种传统有效的定量检测派琴虫的方法。实时荧光 PCR 检测贝类派琴虫的方法敏感度较高,而且特异性强,检测可在一天之内完成,定量准确、全封闭反应等优点。

## 附 录 A (规范性附录) 样品 DNA 抽提及溶液配制

### A.1 样品 DNA 的抽提

A.1.1 取新鲜贝类的消化腺上皮、腮、触须等组织 25 mg 置于冰冷的生理盐水中反复冲洗,滤纸吸干表面水分后称重,置于匀浆研磨器中并加入冷的生理盐水,进行手工匀浆研磨。注意整个过程在冰上完成。

A.1.2 将匀浆液倒入 1.5 mL 离心管中,加 20  $\mu$ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),再加 SDS 至终浓度为 1%,上下颠倒混匀。

A.1.3 混合液置于 55  $^{\circ}$ C 水浴锅内水浴 2.5 h。

A.1.4 向匀浆液中按 1:1 比例加入酚+三氯甲烷+异戊醇混合液(25+24+1),上下颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。

A.1.5 转移上层水相,加入等体积三氯甲烷+异戊醇混合液,上下颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。

A.1.6 转移上层水相,加入两倍体积的无水乙醇,-20  $^{\circ}$ C 放置 30 min 至过夜。

A.1.7 12 000 r/min 离心 5 min,沉淀 DNA,倾去上清液。

A.1.8 于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500  $\mu$ L,轻轻混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,倾去上清液,室温凉干。

A.1.9 用 20  $\mu$ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

组织 DNA 提取也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行操作。

### A.2 电泳缓冲液的配制

50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液配制方法为:取 Tris 碱 242 g、冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA 10 mL、用 5 mol/L 的 HCl 调制 pH8.0,定容至 1 000 mL。用前采用蒸馏水 50 倍稀释即可。

### A.3 液体巯基乙酸盐培养基(FTM)的配制

称取巯基乙酸盐 29.75 g,放入 1 L 蒸馏水,在微波炉中加热,直到变成金黄色透明液为止,冷却后,分装于 10 mL 的培养试管中,每管 5 mL,高压灭菌,冷却后,用锡箔纸包裹,放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

### A.4 卢戈氏碘液的配制

取 6 g 碘化钾(KI)溶于 20 mL ddH<sub>2</sub>O 中,搅拌到溶解后,加入 4 g 碘,等碘充分溶解,再加入 80 mL 蒸馏水,贮存在棕色试剂瓶内待用。

### A.5 2.5%氯霉素的配制

2.5 g 氯霉素溶解于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中,贮存在试剂瓶内,放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

### A.6 1%制霉菌素的配制

1 g 制霉菌素溶解于 100 mL ddH<sub>2</sub>O 中,贮存在试剂瓶内,放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。