

ICS 65.020.20

CCS B15/19

T/TBXH

新疆维吾尔自治区植物保护学会团体标准

T/TBXH 123—2025

蝗虫微孢子虫Real-time PCR检测技术规范

Technical specification for detection of parnosema locustae by Real-time PCR

2025 - 09 - 20 发布

2025 - 09 - 27 实施

新疆维吾尔自治区植物保护学会 发布

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。

本文件中某些内容可能涉及相关知识产权保护内容，本文件的发布机构不承担相关识别等责任。

本文件由新疆师范大学提出。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会归口。

本文件起草单位：新疆师范大学、新疆维吾尔自治区草原生物灾害防控中心、察布查尔县农业农村局。

本文件主要起草人：扈鸿霞、康晗晔、杨坤、吴建国、樊泰山、季荣、林峻。

本文件适用于新疆维吾尔自治区内所有相关单位及组织，自愿采用。

本文件由采用本标准的单位及组织自行承担相关责任。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会负责解释。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆师范大学。

蝗虫微孢子虫 Real-time PCR 检测技术规范

1 范围

本文件规定了蝗虫微孢子虫 (*Paranosema locustae*) TaqMan实时荧光定量PCR检测方法。本文件适用于蝗虫及蝗虫组织中微孢子虫的快速检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

TaqMan探针 TaqMan Probe

一种双标记荧光寡核苷酸探针，其序列与PCR扩增的靶DNA片段互补。

3.2

实时荧光定量 PCR quantitative real-time PCR

在体外扩增微量DNA片段的方法，在扩增过程中由于荧光物质的释放或荧光物质与扩增产物结合而释放荧光信号，通过对荧光信号积累的实时监测来实现对起始模板中的靶标DNA的定量分析。

3.3

16S ribosomal RNA基因 16S ribosomal RNA gene

在此标准中指蝗虫微孢子虫（详见附录 A）的小亚基核糖体rRNA (ribosomal RNA, 16S)基因，详见附录 B.1。

3.4

Ct值 cycle threshold

每个管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 原理

探针法荧光定量 PCR 是一种在 PCR 反应中实时监测扩增产物量的技术。其核心原理在于利用一种特异性荧光标记的探针-TaqMan 探针。本规范利用荧光信号随着目的 PCR 产物的增加而增强的原理，统计 PCR 扩增过程的荧光信号值，最后根据 Ct值来判断样品中是否含有蝗虫微孢子虫。该探针 5'端标记 6-FAM，3'端标记 MGB，当探针完整时，MGB 有效淬灭 FAM 的荧光，无信号。当探针被水解后，FAM与MGB分离，MGB的淬灭作用消失，FAM 便可自由地发出可检测的绿色荧光。详见附录 B.2。

5 荧光定量PCR 检测

本规范根据蝗虫微孢子虫的 16S rRNA 基因的保守序列设计特异性引物进行 PCR 扩增反应，统计 PCR 扩增过程的荧光信号值，最后根据 Ct值来判断样品中是否含有蝗虫微孢子虫。在 PCR 扩增的退火/延伸阶段，Taq 酶发挥 5' → 3' 外切核酸酶活性，将探针水解切割，使两个基团分离。一旦分离，R 基

团的荧光信号便得以释放。每扩增一条 DNA 链，就有一个探针被水解，释放一个荧光信号。因此，荧光信号的强度与 PCR 产物的数量成正比。通过实时监测荧光强度的变化，即可精确地对起始模板 DNA 进行定量分析。详见附录 C、D。

6 结果判定

6.1 蝗虫微孢子虫拷贝数与荧光定量 Ct 值的关系： $Y=-0.2665X+11.712$ 相关系数 $R^2=0.9994$ 。

(X: 荧光定量 Ct 值; Y: 蝗虫微孢子虫拷贝数)。详见附录 E。

6.2 每一次检测都加入阴性和阳性样品做对照，在 PCR 反应体系正常工作的情况下，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果，判定规则如下：

——待测样品检测 Ct 值小于或等于阳性对照的 Ct 值，判定该样品检出蝗虫微孢子虫。

——待测样品检测 Ct 值大于或等于阴性对照的 Ct 值，判定该样品未检出蝗虫微孢子虫。

6.3 检测数据整理，详见附录 F。

6.4 档案管理：qPCR 检测的原始数据、引物探针序列、标准品信息、质控记录等单独归档。

7 样品的运输与采集

7.1 样品采集

在研究区域设置样地，每个样地内设三条间隔 10 m 样线，采样人员沿着每条样线进行扫网，左右各挥动 180° 为一复网，每条样线扫 50 复网，每个样地共 150 复网，对网内蝗虫种类、数量和龄期相关数据记录和统计。使用 50 mL 离心管或广口瓶保存，无水乙醇体积需完全浸没所有蝗虫样本，且液面高出样本顶部 1 cm~2 cm。

7.2 样品贮运与保存

采集的蝗虫样品用无水乙醇固定的可用离心管分装放低温环境，与采集记录一并寄送实验室检测。保存完整的样本进行样品 DNA 提取。

附录 A

(资料性)

蝗虫微孢子虫生物学特性

A.1 分类地位

蝗虫微孢子虫 (*Paranosema locustae*) 是一类专性细胞内寄生的单细胞真核生物。

A.2 形态特征

在光学显微镜下观察到成熟孢子的大小在2 μm 到7 μm 之间,形态主要以卵圆形或者梨形为主。在电子显微镜可进一步观察到孢子的超微结构。孢子具有外壁和内壁,内壁厚度大约为100 nm,具有选择通透性,外壁厚度约10 nm到200 nm之间。极管的长度通常介于50-150 μm 之间,直径则在0.1-0.2 μm 范围内。孢子后端可见大量空泡,在未成熟的孢子外,有电子致密物质包裹,侧面起伏,带有两侧壳层的胞质体紧密包裹在前端和后端的壳层,胞质体位于双核中央或双核稍微靠后处(图1)。

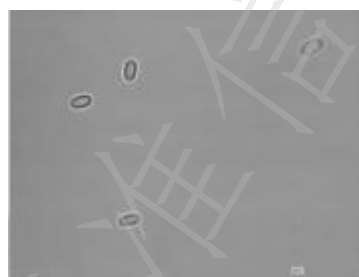


图1 光学显微镜下的蝗虫微孢子虫

A.3 生活史

微孢子虫生活史基本可概括为三个阶段:感染期 (Infective phase)、裂殖增殖期 (Proliferative phase) 和孢子形成期 (Sporogonic phase)。

感染期核心载体为成熟的孢子,是蝗虫微孢子虫实现宿主侵染且唯一能够在宿主细胞外存活的阶段。

裂殖增殖期是微孢子虫在寄主体内扩大种群数量的核心阶段。当孢子遇到适当的环境条件时,孢子激活并通过中空极管将孢原质转运宿主细胞,进入增值阶段。孢原质在其中发育成裂殖体,通过二分裂或多分裂进行增殖。

孢子形成期裂殖体随着胞质分裂发育形成母孢子,并最终分裂形成孢子母细胞,孢子母细胞发育形成成熟孢子。一旦宿主细胞不能再容纳更多成熟孢子,细胞就会破裂,释放成熟孢子到环境中,从而完成微孢子虫的生命周期。

A.4 传播方式

A.4.1 水平传播

蝗虫微孢子虫在同一世代蝗虫群体内,通过健康蝗虫取食被孢子污染的食物或残食感病蝗虫尸体等方式进行的传播。在适宜的环境条件下,孢子在蝗虫体内发育成熟后,又可随蝗虫粪便排出体外,再次污染环境,继续传播给其他健康蝗虫。

A.4.2 垂直传播

蝗虫微孢子虫由亲代蝗虫通过产卵将病原体传递给子代的传播方式。

附 录 B

(资料性)

原理和荧光定量PCR 产物信息

B.1 检测基因

蝗虫微孢子虫*16S rRNA*基因部分片段^[1]，Genebank登录号：AY305324（1337 bp）。

B.2 原理

根据蝗虫微孢子虫的*16S rRNA*基因的保守序列设计特异性引物进行PCR扩增反应。利用荧光信号随着目的PCR产物的增加而增强的原理，统计PCR扩增过程的荧光信号值，最后根据Ct值来判断样品中是否含有蝗虫微孢子虫。

B.3 扩增产物大小和序列

扩增产物为59 bp。

CCGGAGGATCAAAGATGATTAGATACCGTTCGTAGTTCCGGCAGTAAACGATGCCGACGG

注：实线部分为引物序列，虚线部分为探针序列。

附录 C

(资料性)

仪器设备、试剂材料和样品DNA提取

C.1 仪器设备

5430 小型台式高速离心机；FA1104N 电子天平；Nano Drop2000 超微量分光光度计；MIKRO 200R 离心机；荧光定量 PCR 仪；DK-8D 数显恒温水浴锅；TM-1F 涡旋振荡器；研磨仪；灭菌的镊子和手术剪刀；-20℃和-80℃冰箱；微量移液器和微量移液器枪头。

C.2 试剂材料

所需试剂材料包括：

裂解液 A 液：称取 2.4228 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1.755 g 氯化钠 (NaCl)、0.9305 g 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 0.5 g 十二烷基硫酸钠(SDS)至烧杯中，加入超纯水溶解，定容到 100 mL，室温保存。裂解液 B 液：分别量取 2.5 mL DNA 提取酚试剂、2.4 mL 氯仿和 0.1 mL 异戊醇（酚：氯仿：异戊醇=25:24:1）于烧杯中，室温保存。70%（体积分数）乙醇：量取 70 mL 纯乙醇于烧杯中，加入 30 mL 超纯水溶解，室温保存。钢化珠（直径 2.5 mm）。异丙醇，室温保存。荧光定量 PCR 试剂盒（Takara）。灭菌的枪头、离心管和 0.1 mL 平盖八排管（含盖）。除规定外，所有生化试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 一级水的规定。

C.3 样品 DNA 提取

C.3.1 将待检样品用手术剪刀剪掉翅膀、腿和头，保留腹部组织。

C.3.2 每个离心管中放一只蝗虫腹部组织，加 400 μ L 超纯水和 3 颗小钢珠，置于 1.5 mL 离心管中。用研磨仪研磨，程序为频率 65 hz，运行三次，每次 60 s，中断 1 s。

C.3.3 研磨结束后，14000 rpm 离心 3 min 弃上清，取出钢珠，称取 25 mg 蝗虫组织，加入 600 μ L 裂解液 A 再次研磨。

C.3.4 研磨结束后，将离心管置于 56℃水浴锅中，作用 5 min。

C.3.5 取出离心管加入 600 μ L 裂解液 B，充分混匀后，14000 rpm 离心 5 min。

C.3.6 取上清（有机相）置于新的离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，轻轻混匀后，置于冰上 3 min，14000 rpm 离心 5 min。

C.3.7 弃上清，加入 1 mL 70%的乙醇洗涤沉淀，14000 rpm 离心 5 min，重复两次。

C.3.8 弃掉乙醇后，空气干燥 10 min，加入 50 μ L 超纯水溶解沉淀，得到提取的 DNA。

C.3.9 将溶解后的 DNA 取 1 μ L 在 Nano Drop2000 超微量分光光度计测量浓度，记录 A260/280 值与 A260/230 值，-20℃冷冻保存备用，作为荧光定量的模板。

附录 D

(资料性)

荧光定量PCR检测

D.1 引物序列

正向引物：5'—GCCTGACGTAGACGCTATACTC—3'，-20℃保存。

反向引物：5'—CATAGTTATAATCCTAATACATCAA—3'，-20℃保存。

探针 Probe: 5'—ACCGTCGTAGTTCCG—3'，探针 5'端荧光基团为 FAM，3'端荧光淬灭基团为 MGB，-20℃保存。

D.2 对照设置

阳性对照：蝗虫微孢子虫 16S rRNA 质粒标准品。

阴性对照：未感染蝗虫微孢子虫的蝗虫基因组 DNA。

空白对照：无菌水。

荧光定量 PCR 产物相关信息参见附录 B。

D.3 扩增试剂配制

用无菌超纯水配制10 μmol/L 16S rRNA基因特异性引物和TaqMan探针。

D.4 TaqMan 探针法 (20 μL 反应体系)

D.4.1 加入 0.3 μL 正反引物、0.05 μL 探针到 10 μL 荧光定量 PCR 预混液中，加入适量灭菌超纯水，震荡混匀。

D.4.2 取 0.1 mL 平盖八排管（含盖），编号后每管中加入 19 μL 上步所配反应液。

D.4.3 反应管中分别加入待测样品 DNA 1 μL/每管；未感染蝗虫微孢子虫的蝗虫为阴性对照，无菌水作空白对照，蝗虫微孢子虫 16S rRNA 质粒标准品作为阳性对照，1 μL/每管代替待测样品设置对照，盖紧试管盖，3000 g 瞬时离心，以混匀并去除气泡。

D.4.4 在荧光定量 PCR 仪上进行的扩增，程序为：95℃预变性 3 min，95℃变性 10 s，63℃退火 1 min，共 40 个循环。对同一浓度样品进行 3 次重复检测。检测结束后，根据采集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

实时荧光定量PCR反应体系参见表D.1。

表D.1 实时荧光定量PCR反应体系

反应试剂	体积(共 20 μL)
荧光定量 PCR 预混液	10
DNA 模板	1
正向引物 (10 μmol/L)	0.3
反向引物 (10 μmol/L)	0.3
Probe (10 μmol/L)	0.05
超纯水	8.35

反应程序：95℃预变性 3 min，95℃变性 10 s，63℃退火 1 min，共 40 个循环。对同一浓度样品进行 3 次重复检测。

附录 E

(资料性)

阳性质粒的制备及标准曲线的建立

E.1 *16S rRNA*-pMD20-T 标准质粒的构建E.1.1 *16S rRNA* 基因扩增

以蝗虫微孢子虫的cDNA为模板，用*16S rRNA*基因的正向和反向引物扩增目的基因片段，PCR反应体系为Prime STAR Mix预混液10 μL，正向引物和反向引物（10 μmol/L）各0.3 μL，cDNA模板1 μL，无菌水补足至20 μL。PCR反应程序为95℃ 3 min，95℃ 30 s，65.5℃ 30 s，72℃ 55 s，共30个循环，72℃ 10 min。反应结束后取1 μL PCR产物在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

E.1.2 *16S rRNA* 与 pMD20-T 连接和转化到大肠杆菌

PCR产物经电泳鉴定后，采用EZ-10柱式DNA胶回收试剂盒对目的片段的纯化与回收，将目的片段与pMD20-T载体连接，将其转化至大肠杆菌感受态，提取重组质粒并测序。

E.1.3 *16S rRNA* 与 pMD20-T 重组质粒的提取

按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒，质粒DNA置于-20℃保存备用。提取测序正确的重组质粒，用ND2000测定浓度，并根据拷贝数计算公式： $[6.02 \times 10^{23} \times (\text{ng} / \text{L} \times 10^{-9})] / (\text{DNA长度} \times 660)$ [2]，计算每微升质粒含有的拷贝数。将该阳性质粒作为质粒标准品。

E.2 标准曲线的建立

用无菌水梯度稀释上述质粒DNA作为标准曲线的模板。扩增循环条件95℃预变性3 min，95℃变性10 s，63℃退火1 min，共40个循环。定量扩增在定量PCR仪上进行。当模板浓度为 1.29×10^5 copies/L时Ct值为37.32，相当于0.002 ng/L微孢子虫DNA浓度，Ct值为37.32，为最低检出浓度。

标准质粒从 10^{10} 的梯度稀释至 10^6 ，进行定量PCR扩增^[3]。以重组质粒拷贝数的对数值为横坐标（X轴）、CT值为纵坐标（Y轴），绘制标准曲线，其方程为 $y = -0.2665x + 11.712$ ，相关系数 $R^2 = 0.9994$ （图2）。

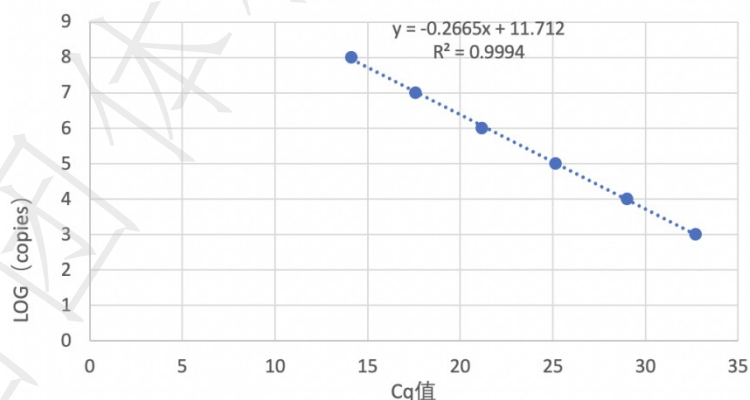


图2 荧光定量PCR的标准曲线

E.3 阳性质粒保存

将稀释好的阳性质粒样品置于-20℃冰箱保存备用，保存期限在3个月内，长期保存应置于-80℃冰箱。

附录 F

(资料性)

蝗虫微孢子虫 Real-time PCR 检测报告记录

F.1 蝗虫微孢子虫 Real-time PCR 检测报告记录见表F.1

表F.1 检测报告记录表

样本来源地			
检测日期			
实验人员			
样本编号	Ct值		蝗虫种类
阳性对照			
阴性对照			
空白对照			

参考文献

- [1] Huo F, Liu H, Guo W, Kang H, Zhang H, Jashenko R, Ji R, Hu H. Proliferation dynamic of *Paranosema locustae* after infection and histopathogenic features on *Locusta migratoria*[J]. Pest Manag Sci. 2025 Apr;81(4):2051-2060.
- [2] 扈鸿霞, 郑秋英, 叶小芳, 等. 蝗虫微孢子TaqMan探针Real-time PCR检测新方法[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(06):796-802.
- [3] 扈鸿霞, 马宇轩, 王艳红, 等. 蝗虫微孢子虫套式PCR检测方法的建立及应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(21):4239-4245.
-