

### 籽用西葫芦种子病毒 RT-PCR 检测技术规程

Technical code of practice for RT-PCR detection of seed-used  
pumpkin(*Cucurbita pepo* L.) seed virus

地方标准信息服务平台

2023-09-15 发布

2023-10-15 实施



## 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。

本文件由内蒙古自治区农牧厅提出。

本文件由内蒙古自治区果蔬标准化技术委员会（SAM/TC 25）归口。

本文件起草单位：内蒙古农业大学。

本文件主要起草人：王萍、刘杰才、陈贵华、许珂、尚鹏、李石恒、毕晓宇。

地方标准信息服务平台



# 籽用西葫芦种子病毒 RT-PCR 检测技术规程

## 1 范围

本文件规定了籽用西葫芦种子病毒RT-PCR检测技术中涉及的试剂与材料、仪器和设备、对照设置、样品采集、样品病毒检测、结果分析与表述。

本文件适用于籽用西葫芦种子中黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)、西瓜花叶病毒 (Watermelon mosaic virus, WMV)、小西葫芦黄化花叶病毒 (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 的RT-PCR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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**黄瓜花叶病毒** cucumber mosaic virus, CMV

黄瓜花叶病毒(CMV)属于雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*)，可以侵染1000多种植物。主要通过蚜虫以口针型非持久方式传播，也是典型的种传病毒。黄瓜花叶病毒一般为系统侵染植物，主要表现为叶片斑驳，叶肉浅绿，叶脉深绿；严重时呈现叶片皱缩，叶肉退化，蕨叶等症状。

### 3.2

**西瓜花叶病毒** watermelon mosaic virus, WMV

西瓜花叶病毒 (WMV) 属于马铃薯Y病毒科 (*Potyviridae*) 马铃薯Y病毒属 (*Potyvirus*)，在自然界中通过蚜虫以非持久性方式传播，也可经汁液摩擦接种传播，可侵染葫芦科、豆科、藜科等多种植物种类。受侵染的病株叶片表现花叶、畸形、新生叶片扭曲，植株生长受阻，果实畸形。

### 3.3

**小西葫芦黄化花叶病毒** zucchini yellow mosaic virus, ZYMV

小西葫芦黄化花叶病毒 (ZYMV) 属于马铃薯Y病毒科 (*Potyviridae*) 马铃薯Y病毒属 (*Potyvirus*)，可由多种蚜虫以非持久性方式传播，也能通过种子传播。可侵染葫芦科、苋科、豆科等11个属的植物。小西葫芦黄化花叶病毒表现为系统侵染，整株花叶、黄化、叶片皱缩、果实畸形、表面有泡状或者瘤状突起。

## 4 试剂与材料

- 4.1 琼脂糖。
- 4.2 核酸染料。
- 4.3 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液：在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠，溶解后，冷却至室温，再加水定容至 200 mL。
- 4.4 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)溶液(pH 8.0)：称取 186 g 乙二胺四乙酸二钠，加入 70 mL 水中，缓慢滴加氢氧化钠溶液(见 4.3)直至 EDTA-Na<sub>2</sub> 完全溶解，用氢氧化钠溶液(见 4.3)调 pH 至 8.0 加水定容至 100 mL。在 121 °C 条件下灭菌 20 min。
- 4.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)：称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷溶解于 800 mL 水中，用盐酸调 pH 至 8.0 加水定容至 1000 mL。在 121 °C 条件下灭菌 20 min。
- 4.6 TE 缓冲液(pH 8.0)：分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(见 4.5)和 2 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(见 4.4)，加水定容至 1000 mL。在 121 °C 条件下灭菌 20 min。
- 4.7 50×TAE 缓冲液：称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)，先用 500 mL 水加热搅拌溶解后，加入 100 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(见 4.4)，用冰乙酸调 pH 至 8.0，然后加水定容至 1000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE。
- 4.8 加样缓冲液：称取 250.0 mg 溴酚蓝，加入 10 mL 水，在室温下溶解 12 h；称取 250.0 mg 二甲苯腈蓝，加 10 mL 水溶解；称取 50.0 g 蔗糖，加 30 mL 水溶解。混合以上 3 种溶液，加水定容至 100 mL，在 4°C 下保存。
- 4.9 DNA 分子量标准：可以清楚区分 100 bp~500 bp 的 DNA 片段。
- 4.10 Premix Taq 酶。
- 4.11 CMV 病毒检测上游引物 CMV-F：5′-TTCGATAAGAAGCTTGTTCGCG-3′，下游引物 CMV-R：5′-AGACGTGGGAATGCGTTGGTGCT-3′。预期扩增目的片段大小为 345 bp(参见附录 A 中的 A.1)。
- 4.12 WMV 病毒检测上游引物 WMV-F：5′-CCAGTGGCAAAGGTGATA-3′，下游引物 WMV-R：5′-TGCTGCGTCTGAGAAATG-3′。预期扩增目的片段大小为 485 bp(参见附录 A 中的 A.2)。
- 4.13 ZYMV 病毒检测上游引物 ZYMV-F：5′-ATGCAGAGGCACCATACAT-3′，下游引物 ZYMV-R：5′-TACTGCATTGTGTTACACC-3′。预期扩增目的片段大小为 283 bp(参见附录 A 中的 A.3)。
- 4.14 引物溶液：用 TE 缓冲液(见 4.6)将上述引物稀释到 10 μmol/L。
- 4.15 TRIzol 试剂。
- 4.16 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒。
- 4.17 PCR 产物回收试剂盒。
- 4.18 pMD18-T 载体。
- 4.19 大肠杆菌感受态细胞 DH5a。

## 5 仪器和设备

- 5.1 分析天平。
- 5.2 组织研磨仪。
- 5.3 PCR 扩增仪。
- 5.4 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 5.5 Nanodrop 微量分光光度计。
- 5.6 凝胶成像系统或照相系统。

## 6 对照设置

### 6.1 阳性对照

以经过RT-PCR扩增和测序分析精确含有CMV、WMV、ZYMV的样品为阳性对照。

### 6.2 阴性对照

经过RT-PCR扩增和测序分析精确不含有CMV、WMV、ZYMV的样品为阴性对照。

### 6.3 空白对照

以灭菌ddH<sub>2</sub>O为空白对照。

## 7 样品采集

采集适量的籽用西葫芦种子，放入自封袋中封口后及时进行分析。如需保存可置于-80℃冰箱中。样品应避免交叉污染。

## 8 样品病毒检测

### 8.1 RNA 提取和纯度检测

8.1.1 每个对照和试样设置2次重复。

8.1.2 RNA 提取：选取感染病毒的籽用西葫芦种子50粒，冷冻研磨至粉状后，称取0.1g待测样品置于灭菌2mL离心管中，加入1mL TRIzol 试剂后混匀，提取籽用西葫芦种子总RNA。

8.1.3 RNA 浓度检测：提取的样品总RNA用Nanodrop微量分光光度计测定RNA相对浓度，当OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值为1.8~2.0时，可用于RT-PCR检测。

8.1.4 RNA 质量检测：称量1g琼脂糖加入到100mL 1×TAE缓冲液中，加热混匀。冷却后加入2μL核酸染料，混匀，将其倒入电泳槽，插上梳板。室温下凝固成凝胶后，倒入1×TAE缓冲液中，垂直向上轻轻拨去梳板。取2μL RNA与4μL加样缓冲液混合后，加入凝胶点样孔，同时在其中一个点样孔加入DNA分子量标准，进行电泳检测。电泳结束后，观察结果（参见附录B.1）。如果总RNA条带清楚，就可以用于后续实验。

### 8.2 反转录

8.2.1 每个对照和试样设置2次重复。

8.2.2 以总RNA为模板，进行反转录合成第一链cDNA。在离心管中加入1μg RNA模板，1μL Anchored Oligo (dT) 18引物和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，混匀，65℃孵育5min，冰浴2min。然后加入10μL 2×TS反应液，1μL反转录酶和1μL gDNA Remover，轻轻混匀，42℃孵育30min。85℃加热5sec终止反应，-20℃冰箱保存备用。

### 8.3 PCR 扩增

8.3.1 每个对照和试样PCR扩增设置2次重复。

8.3.2 按表1依次加入反应试剂，混匀，分装到PCR管中。

表1 PCR 扩增体系

试剂	体积
Premix Taq	25 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L上游引物	1 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L下游引物	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补足50 $\mu$ L

8.3.3 将 PCR 管放在离心机上，瞬时离心 2 sec，然后取出 PCR 管，放入 PCR 仪中。

8.3.4 PCR 反应程序：94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94  $^{\circ}$ C 变性 30 sec，退火 30 sec（CMV 58  $^{\circ}$ C，WMV 50  $^{\circ}$ C，ZYMV 50  $^{\circ}$ C），72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min，35 个循环；72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4  $^{\circ}$ C 保存。

8.3.5 反应结束后取出 PCR 管，对 PCR 扩增产物进行电泳检测。

#### 8.4 琼脂糖凝胶电泳检测

8.4.1 称量 1 g 琼脂糖加入到 100 mL 1 $\times$ TAE 缓冲液中，加热混匀。冷却后加入 2  $\mu$ L 核酸染料，混匀，将其倒入电泳槽，插上梳板。室温下凝固成凝胶后，倒入 1 $\times$ TAE 缓冲液中，垂直向上轻轻拔去梳板。取 2  $\mu$ L RNA 与 4  $\mu$ L 加样缓冲液混合后，加入凝胶点样孔，同时在其中一个点样孔加入 DNA 分子量标准，进行电泳检测。电泳结束后，观察结果。

8.4.2 电泳结束后，取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪上成像，进行结果分析。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段，按照 8.4.3 的规定执行。

8.4.3 PCR 产物用凝胶回收试剂盒纯化目的片段，并在 4  $^{\circ}$ C 连接至 pMD18-T 载体，转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5a，经红白斑筛选，挑取阳性克隆，送至测序。测序引物为病毒特异性引物。获得的序列与 NCBI 数据库的 CMV、WMV、ZYMV 病毒序列（参见附录 A）比对，确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

### 9 结果分析与表述

#### 9.1 CMV 基因检测结果分析

9.1.1 判定条件：RT-PCR 特异性扩增产物在 345 bp 处有无条带（参见附录 B 中的图 B.2）

9.1.2 试样和阳性对照扩增出 CMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未得到扩增。说明被检测样品感染 CMV 病毒。

9.1.3 试样、阴性对照和空白对照未扩增出 CMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 CMV 特异性条带。说明被检测样品未感染 CMV 病毒。

9.1.4 阳性对照未扩增出 CMV 特异性条带，试样、阴性对照和空白对照扩增出 CMV 特异性条带或条带不清楚。说明检测结果无效，将实验中的所有试剂更换，并重新提取样品 RNA，进行 RT-PCR 检测。

#### 9.2 WMV 基因检测结果分析

9.2.1 判定条件：RT-PCR 产物在 485 bp 处有无条带（参见附录 B 中的图 B.2）

9.2.2 试样和阳性对照扩增出 WMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未得到扩增。说明被检测样品感染 WMV 病毒。

9.2.3 试样、阴性对照和空白对照未扩增出 WMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 WMV 特异性条带。说明被检测样品未感染 WMV 病毒。



9.2.4 阳性对照未扩增出 WMV 特异性条带，试样、阴性对照和空白对照扩增出 WMV 特异性条带或条带不清楚。说明检测结果无效，将实验中的所有试剂更换，并重新提取样品 RNA，进行 RT-PCR 检测。

### 9.3 ZYMV 基因检测结果分析

9.3.1 判定条件：RT-PCR 产物在 283 bp 处有无条带（参见附录 B 中的图 B.2）

9.3.2 试样和阳性对照扩增出 ZYMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未得到扩增。说明被检测样品感染 ZYMV 病毒。

9.3.3 试样、阴性对照和空白对照未扩增出 ZYMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 ZYMV 特异性条带。说明被检测样品未感染 ZYMV 病毒。

9.3.4 阳性对照未扩增出 ZYMV 特异性条带，阴性对照和空白对照扩增出 ZYMV 特异性条带或条带不清楚。说明检测结果无效，将实验中的所有试剂更换，并重新提取样品 RNA，进行 RT-PCR 检测。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

籽用西葫芦种子 CMV/WMV/ZYMV 特异性片段序列

A.1 CMV 特异性片段序列

```
1   TTCGATAAGAAGCTTGTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCC
50  GAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACGGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCT
100 TCGGACCTGTCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATGTTTTCGGACGGAGCCTC
150 ACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGGAGTCCAAGCCAACAATA
200 AATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGCGACATGCGA
250 AAGTACGCCGTTCTCGTGTATTCAAAGACGATGCTCTCGAGGCGGATGA
300 GTTAGTACTTCATGTCGACATCGAGCACCAACGCATTCCCACGTCT
```

A.2 WMV 特异性片段序列

```
1   CCAGTGGCAAAGGTGATAAGCCACAAAACCTGCAAACCTGGGCAGGGTAG
50  CAAGGAACCAACAAAAGCTGGCACAGTCAGCAAAGATGTGAACGTTGGAT
100 CAAAAGGAAAAGAAGTCCCACGACTACAGAAGATAACAAAGAAAATGAAC
150 CTTCCAACAGTTGGTGGGAAAATCATTCTCAGCTTAGACCATTGCTCGA
200 ATACAAGCCTAATCAAGTTGATTTGTTTAACTCGAGCAACAAAAACAC
250 AGTTTGAATCATGGTACAGCGCAGTTAAAGTTGAATATGATCTTAATGAT
300 GAGCAGATGGGTGTGATTATGAATGGTTTTATGGTTTGGTGCATCGATAA
350 TGGTACATCTCCAGATGTCAATGGAGTATGGGTGATGATGGATGGGGAAG
400 AGCAAGTTGAGTACCCACTAAAGCCAATTGTTGAAAATGCAAAGCCAAC
450 TTGAGACAAATCATGCATCATTCTCAGACGCAGCA
```

A.3 ZYMV 特异性片段序列

```
1   ATGCAGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAATCTACG
50  GGATAGGAGTTTGGCTCGATACGCTTTCGACTTCTACGAAGTCAACTCT
99  AAAACTCCTGAAAGAGCCCGCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCA
147 GCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGC
197 CACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCACGTGATGTTAATAGA
245 AACATGCACACCTTGTTAGGTGTGAACACAATGCAGTA
```

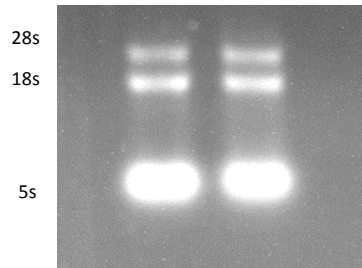
注1: 序列方向为5′-3′。

注2: 5′下划线为PCR方法上游引物序列, 3′下划线为PCR方法下游引物的反向互补序列。

附录 B  
(资料性)

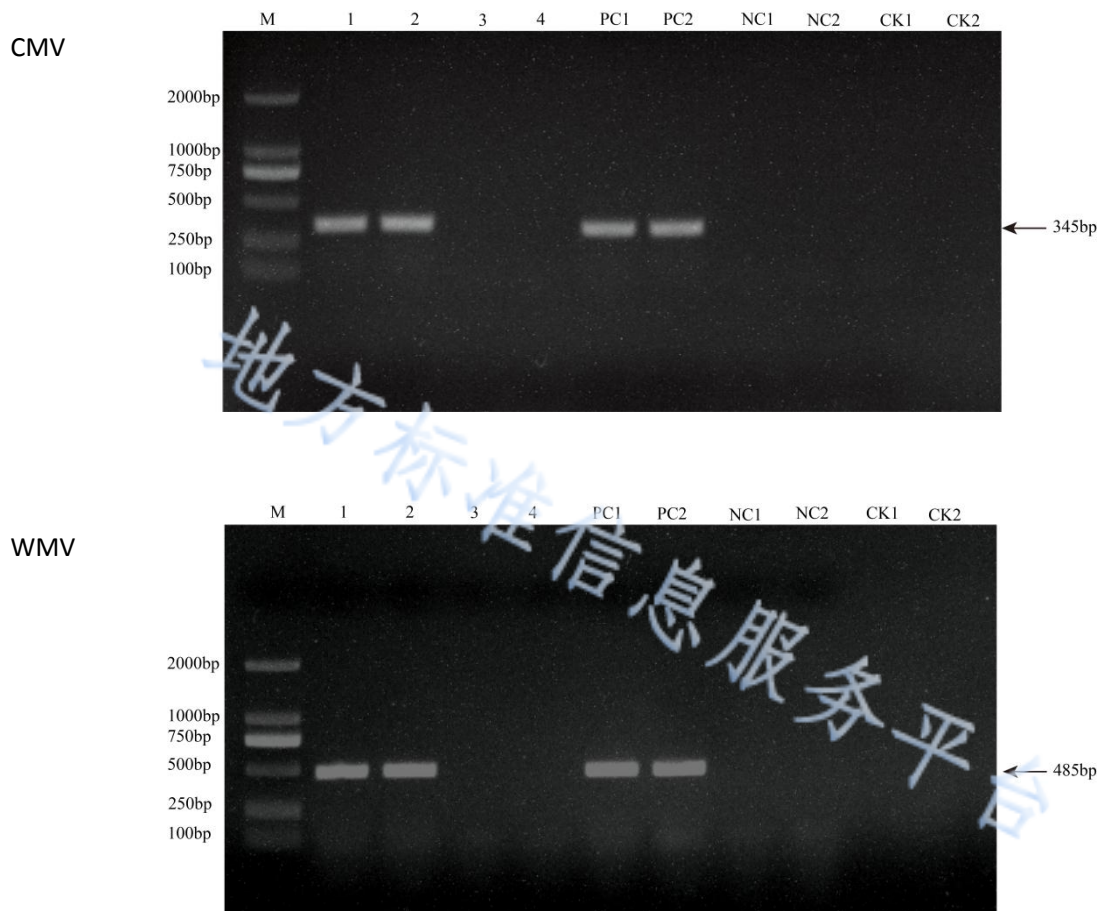
籽用西葫芦种子 CMV/WMV/ZYMV RT-PCR 检测电泳图

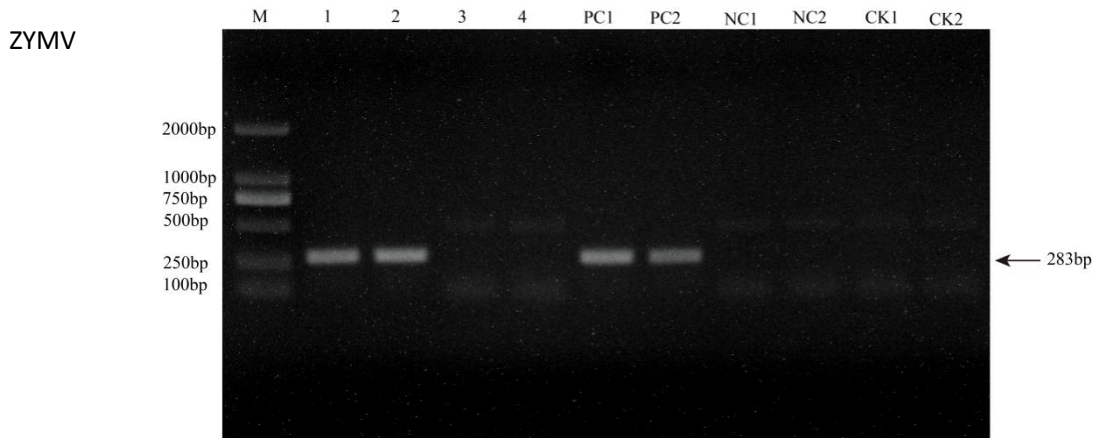
B.1 籽用西葫芦种子总 RNA 电泳图谱见图 B.1。



图B.1 籽用西葫芦种子总 RNA 电泳图

B.2 籽用西葫芦种子 CMV/WMV/ZYMV RT-PCR 检测电泳图见图 B.2。





标引序号说明:

M —— DNA Marker

1-2 —— 感染病毒的检测样品

3-4 —— 未感染病毒的检测样品

PC1-PC2 —— 阳性对照

NC1-NC2 —— 阴性对照

CK1-CK2 —— 空白对照

图B.2 籽用西葫芦种子 CMV/WMV/ZYMV RT-PCR 检测电泳图

地方标准信息服务平台