

籽用西葫芦叶片三种病毒 RT-PCR 检测 技术规程

Technical code of practice for RT-PCR detection of three viruses
from leaves of seed-used pumpkin (*Cucurbita pepo* L.)

地方标准信息服务平台

2024-06-28 发布

2024-07-28 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、内蒙古弘昌农业有限责任公司、呼和浩特市农牧技术推广中心。

本文件主要起草人：王萍、龙建国、刘杰才、陈贵华、苏利民、孙婧、许珂、尚鹏。

地方标准信息服务平台

籽用西葫芦叶片三种病毒 RT-PCR 检测技术规程

1 范围

本文件规定了籽用西葫芦叶片三种病毒RT-PCR检测技术中涉及的术语和定义、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。

本文件适用于籽用西葫芦叶片中黄瓜花叶病毒（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

属于雀麦花叶病毒科（Bromoviridae）黄瓜花叶病毒（Cucumovirus），可以侵染1000多种植物。主要通过蚜虫以非持久方式传播，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花叶，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

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。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

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。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 试剂

琼脂糖、核酸染料、Premix Taq酶、TRIzol试剂、PCR产物回收试剂盒、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒、pMD18-T载体、大肠杆菌感受态细胞DH5a、DNA分子量标准：可以清楚区分100 bp~500 bp的DNA片段。

4.2 溶液配制

4.2.1 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。

4.2.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)溶液(pH 8.0)：称取18.6 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-Na₂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。

4.2.3 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。

4.2.4 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。

4.2.5 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。

4.2.6 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。

4.2.7 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)。

4.2.8 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435 bp(参见附录A中的A.2)。

4.2.9 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.2)。

4.2.10 引物溶液：用TE缓冲液(见4.6)将上述引物稀释到10 μmol/L。

5 仪器和设备

分析天平、组织研磨仪、PCR扩增仪、电泳槽、电泳仪等电泳装置、Nanodrop微量分光光度计、凝胶成像系统或照相系统、切胶仪、离心机。

6 对照设置

6.1 阳性对照

以通过RT-PCR扩增和测序分析明确含有CMV、WMV、ZYMV的样品为阳性对照。

6.2 阴性对照

通过RT-PCR扩增明确不含有CMV、WMV、ZYMV的样品为阴性对照。

6.3 空白对照

以灭菌ddH₂O作为模板进行PCR扩增的产物为空白对照。

7 样品采集

采集有明显症状的疑似病毒感染的籽用西葫芦叶片，放入自封袋中封口后，快速冷冻于液氮或干冰中，进行检测分析。如需长期保存可置于-80℃冰箱中。样品应避免交叉污染。

8 样品病毒检测

8.1 重复次数

每个对照和试样设置2次重复。

8.2 RNA提取和质量检测

8.2.1 RNA提取:将样品在液氮下研磨至粉状后称取0.1 g,置于灭菌2 mL离心管中,加入1 mL TRIzol试剂后混匀,提取总RNA。

8.2.2 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OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.8~2.0时,可用于RT-PCR检测。

8.2.3 RNA完整性检测:取2 μL RNA与4 μL加样缓冲液混合后,加入凝胶点样孔,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。

8.3 反转录

在离心管中加入1 μg RNA模板,1 μL Anchored Oligo (dT) 18引物和RNase-Free ddH₂O,混匀,65℃孵育5 min,冰浴2 min。然后加入10 μL 2×TS反应液,1 μL反转录酶和1 μL gDNA Remover,轻轻混匀,42℃孵育30 min。85℃加热5 sec终止反应,-20℃冰箱保存备用。

8.4 PCR扩增

8.4.1 在PCR管中按表1依次加入反应试剂,混匀。

表1 PCR扩增体系

试剂	体积
Premix Taq	25 μL
cDNA	2 μL
10 μmol/L上游引物	1 μL
10 μmol/L下游引物	1 μL
ddH ₂ O	补足50 μL

8.4.2 将PCR管放入离心机中,瞬时离心2 sec,取出PCR管,放入PCR仪中。

8.4.3 PCR反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 sec,退火30 sec(CMV 58℃,WMV 50℃,ZYMV 50℃),72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。

8.4.4 反应结束后取出PCR管,对PCR扩增产物进行电泳检测。

8.5 琼脂糖凝胶电泳检测

8.5.1 称量 1 g 琼脂糖加入到 100 mL 1×TAE 缓冲液中，加热混匀。冷却后加入 8 μ 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×TAE 缓冲液中，垂直向上轻轻拔去梳板。取 5 μ L PCR 产物与 10 μ 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。

8.5.2 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。

8.6 测序验证

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，经蓝白斑筛选，挑取阳性克隆，送至公司测序。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

参见附录 B.2，阳性对照 CMV 在 345 bp、WMV 在 485 bp、ZYMV 在 283 bp 处有目标条带，阴性和空白对照无条带，判定结果有效。阳性对照无条带或阴性和空白对照有条带，判定结果无效，需要重复检测。当结果有效时，试样检测出目标条带判定为病毒感染。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

籽用西葫芦叶片 CMV/WMV/ZYMV 特异性片段序列

A.1 CMV 特异性片段序列

1 TTCGATAAGAAGCTTGTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCC
 50 GAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACGGTCCGTAAGTTCTGCCTCT
 100 TCGGACCTGTCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATGTTTTCGGACGGAGCCTC
 150 ACCGGTACTGTTTATCAGTATGCTGCATCCGGAGTCCAAGCCAACAATA
 200 AATTGTTGATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGCGACATGCGA
 250 AAGTACGCCGTTCTCGTGTATTCAAAGACGATGCTCTCGAGGCGGATGA
 300 GTTAGTACTTCATGTCGACATCGAGCACCAACGCATTCCCACGTCT

A.2 WMV 特异性片段序列

1 CCAGTGGCAAAGGTGATAAGCCACAAAACCTGCAAACCTGGGCAGGGTAG
 50 CAAGGAACCAACAAAAGCTGGCACAGTCAGCAAAGATGTGAACGTTGGAT
 100 CAAAAGGAAAAGAAGTCCCACGACTACAGAAGATAACAAAGAAAATGAAC
 150 CTTCCAACAGTTGGTGGGAAAATCATTCTCAGCTTAGACCATTTGCTCGA
 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 CACCCTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCACGTGATGTTAATAGA
 245 AACATGCACACCTTGTTAGGTGTGAACACAATGCAGTA

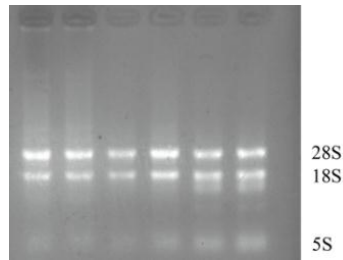
注1：序列方向为5'-3'。

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

附录 B
(资料性)

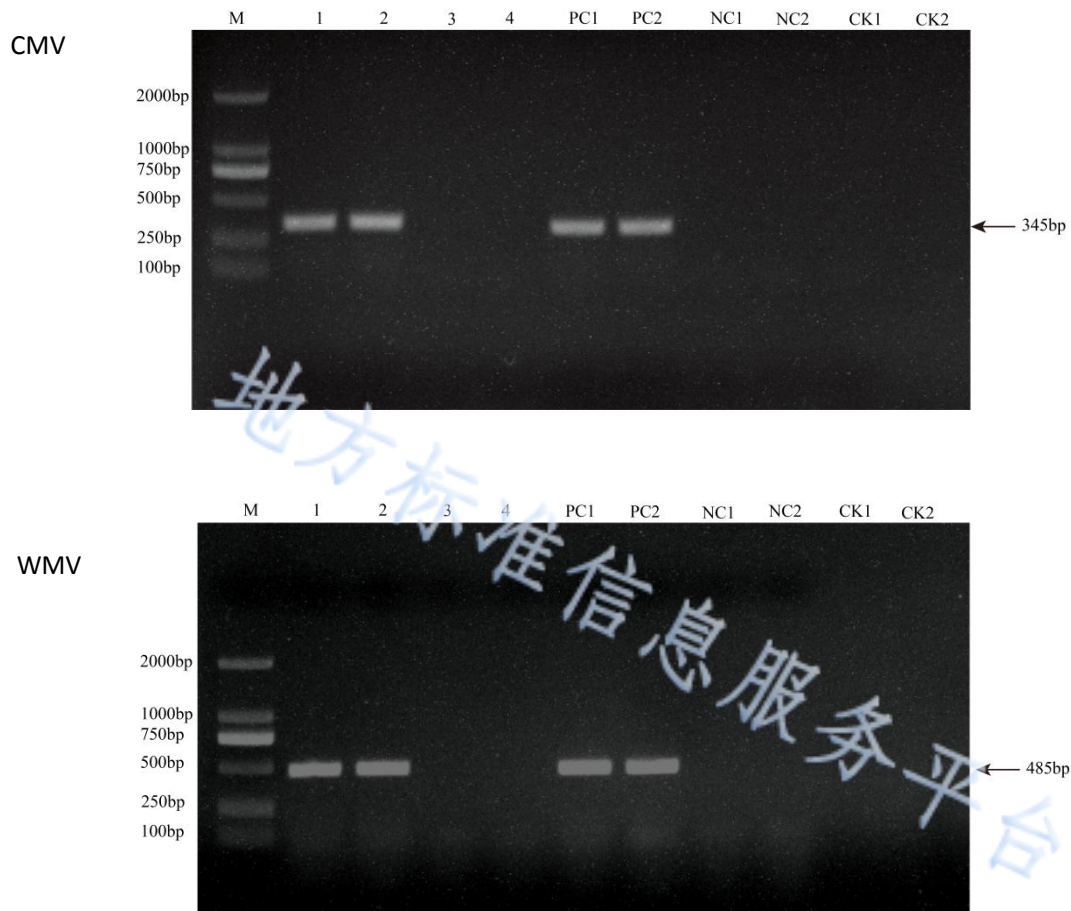
籽用西葫芦叶片 CMV/WMV/ZYMV 的 RT-PCR 检测电泳图

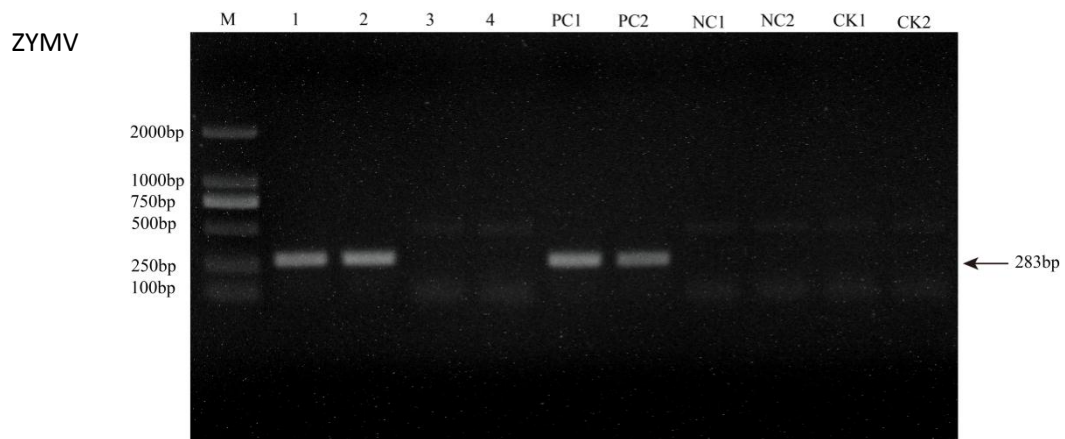
B.1 籽用西葫芦叶片总 RNA 电泳图谱见图 B.1。



图B.1 籽用西葫芦叶片总 RNA 电泳图

B.2 籽用西葫芦叶片病毒 RT-PCR 检测电泳图见图 B.2。





标印序号说明：

- M —— DNA 分子量标准
- 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 籽用西葫芦叶片病毒 RT-PCR 检测电泳图

地方标准信息服务平台