

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1962—2010

马铃薯纺锤块茎类病毒检测

Detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd)

2010-12-23 发布

2011-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)。

本标准主要起草人：吕典秋、刘尚武、邱彩玲、宿飞飞、王绍鹏、李勇、于德才、张抒、王文重、王亚洲、范国权、李学湛。

马铃薯纺锤块茎类病毒检测

1 范围

本标准规定了马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的检测方法。

本标准适用于马铃薯种薯、商品薯、试管苗及其根、茎、叶不同部位组织中的马铃薯纺锤块茎类病毒的检测。

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

方法一 聚合酶链式反应

3 原理

类病毒是没有外壳蛋白、裸露的、低分子闭合环状 RNA 分子, RNA 分子大小在 246 nt~401 nt 之间,马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的序列在 356 nt~360 nt 之间。根据 PSTVd 序列设计特异性引物,进行扩增,扩增片段大小为 359 bp 左右。

4 试剂与材料

以下所用试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 三氯甲烷。

4.2 M-MLV 反转录酶(200 u/ μ L)。

4.3 RNA 酶抑制剂(40 u/ μ L)。

4.4 Taq DNA 聚合酶(5 u/ μ L)。

4.5 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水。

在 100 mL 水中,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)50 μ L,室温过夜,121℃ 高压灭菌 20 min,分装到 1.5 mL DEPC 处理过的微量管中。

4.6 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2)。

称取乙酸钠·3H₂O 24.6 g,加水 80 mL 溶解,用冰乙酸调 pH 至 5.2,定容至 100 mL。

4.7 水饱和酚(pH 4.0)。

4.8 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)。

称取溴化乙锭 200 mg,加水溶解,定容至 20 mL。

4.9 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)。

称取 Tris 碱 121.1 g,溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,121℃ 高压灭菌 20 min。

4.10 RNA 提取缓冲液。

称取 Tris 碱 12.12 g,氯化钠 5.88 g,乙二醇四乙酸二钠 3.75 g,加水至 900 mL,溶解,用浓盐酸调

pH 至 9~9.5,加水定容至 1 000 mL,121℃高压灭菌 20 min。

4.11 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0)。

称取乙二铵四乙酸二钠 186.1 g,溶于 700 mL 水中,用氢氧化钠调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。

4.12 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液。

称取 Tris 碱 27 g,硼酸 13.75 g,量取 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(4.11)10 mL,加灭菌双蒸水 400 mL 溶解,定容至 500 mL。

4.13 1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液。

量取 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(4.12)200 mL,加水定容至 1 000 mL。

4.14 加样缓冲液。

分别称取聚蔗糖 25 g,溴酚蓝 0.1 g,二甲苯腈 0.1 g,加水至 100 mL。

4.15 5×反转录反应缓冲液。

量取 1 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(4.9)5 mL,0.559 g 氯化钾,0.029 g 氯化镁,0.154 g 二硫苏糖醇(DTT),加水定容至 100 mL。

4.16 10 mmol/L 的四种脱氧核糖核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)混合溶液。

4.17 10×PCR 缓冲液。

称取氯化钾 3.73 g,氯化镁($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)0.30 g,溶于 70 mL 水中,加入 1 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(4.9)10 mL,加水至 100 mL,121℃高压灭菌 20 min。

4.18 TE 缓冲液。

量取 1 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(4.9)10 mL,0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(4.11)2 mL,加入水定容至 1 000 mL,121℃高压灭菌 20 min。

4.19 引物。

Pc:5'GGA TCC CTG AAG CGC TCC TCC GAG CCG 3'

Ph:5' CCC GGG AAA CCT GGA GCG AAC TGG 3'

预期扩增片段为 359 bp 左右。

4.20 引物缓冲液。

用 TE 缓冲液(4.18)分别将上述引物稀释到 20 μ mol/L。

4.21 100 bp DNA 分子量标准物。

5 仪器

5.1 PCR 仪。

5.2 台式低温高速离心机(可以控制在 4℃下进行离心)。

5.3 电泳仪、水平电泳槽。

5.4 紫外凝胶成像仪。

5.5 微量移液器(0.5 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、20 μ L~200 μ L、100 μ L~1 000 μ L)。

5.6 水浴锅、灭菌锅等。

6 分析步骤

设立阳性对照和阴性对照。在以下实验过程中,要设立阴阳性对照,即标准的阳性样品和阴性样品要同待测样品一同进行如下操作。

6.1 样品 RNA 的提取

6.1.1 RNA 的抽提

称取 0.5 g 样品,放于灭菌冷冻的小研钵中,分别加入 1 mL RNA 提取缓冲液(4.10)、1 mL 水饱和酚(4.7)和 1 mL 三氯甲烷(4.1),充分研磨后倒入 1.5 mL 离心管中,于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min,用移液器小心将上层水相移入另一离心管中。

6.1.2 RNA 的沉淀

在 RNA 抽提液中(6.1.1),加入 3 倍体积无水冷乙醇,1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液(4.6),混匀,−20℃ 沉淀 1.5 h 以上。

6.1.3 RNA 的溶解

取出冷冻保存的 RNA 沉淀(6.1.2),于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清,用 1 mL 70% 乙醇清洗沉淀,然后离心,再用吸头彻底吸弃遗留在管中的上清液,在自然条件下干燥至核酸沉淀变成白色或透明状态,再将核酸沉淀溶于 30 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水(4.5)中。−20℃ 贮存,备用。

注:或者选择市售商品化 RNA 提取试剂盒,完成 RNA 的提取。

6.2 RT-PCR 反应(二步法)

将待测样品的 RNA 溶解液(6.1.3),引物缓冲液(4.20),四种脱氧核糖核苷酸混合溶液(4.16),5× 反转录反应缓冲液(4.15)在冰上溶解。

6.2.1 反转录第一链合成

在 200 μL 薄壁 PCR 管中依次加入引物 Pc(4.19)0.6 μL,待测样品 RNA 溶解液(6.1.3)1 μL,10 mmol/L 的四种脱氧核糖核苷酸混合溶液(4.16)1 μL,无菌双蒸水 9.4 μL,轻轻混匀,将该反应管在 65℃ 水浴中加热 5 min,然后冰浴 5 min,以 4 000 r/min 离心 10 s。再加入 5× 反转录反应缓冲液(4.15)4 μL,0.1 mmol/L DTT 2 μL,RNA 酶抑制剂(40 u/μL)(4.3)1 μL,轻轻混匀,42℃ 孵育 2 min,再加入 1 μL M-MLV 反转录酶(200 u/μL)(4.2),42℃ 孵育 50 min,然后在 70℃ 下失活 15 min。

6.2.2 聚合酶链式反应

另取一个 200 μL 薄壁 PCR 管,依次加入 10× PCR 缓冲液(4.17)5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 3 μL,10 mmol/L 四种脱氧核糖核苷酸混合溶液(4.16)1 μL,引物(Pc 和 Ph)(4.19)各 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 u/μL)(4.4)0.5 μL,cDNA 中第一链合成产物(6.2.1)2 μL,灭菌双蒸水 36 μL,轻轻混合。再加入约 20 μL 石蜡油(有热量设备的 PCR 仪可以不加石蜡油)。4 000 r/min 离心 10 s 后,将 PCR 管插入 PCR 仪中。94℃ 2 min;进行 30 次扩增反应循环(94℃ 60 s,55℃ 60 s,72℃ 60 s);然后 72℃ 10 min,取出 PCR 管,对反应产物进行电泳检测或在 4℃ 下保存。

注:6.2 步骤也可以按照市售商业化一步 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。

6.3 PCR 产物的电泳检测

6.3.1 1.0% 琼脂糖凝胶板的制备

称取 1.0 g 琼脂糖,加入 1× Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(4.13)定容至 100 mL,在微波炉中加热至琼脂糖融化,待溶液冷却至 50℃~60℃ 时,加溴化乙锭溶液(4.8)5 μL,摇匀,倒入电泳槽中,凝固后取下梳子,备用。

将 20 μL PCR 产物与 20 μL 加样缓冲液(4.14)混合,取混合液 10 μL 加入到琼脂糖凝胶板的加样孔中。

6.3.2 加入 100 bp DNA 分子量标准物(4.21)。

6.3.3 电泳

在 5 V/cm 稳定电压下,电泳 30 min~40 min。

6.3.4 观察结果

电泳胶板在紫外灯下观察,或者用紫外凝胶成像仪扫描图片存档,打印。用 100 bp DNA 分子量标准物比较,判断 PCR 片段大小。

7 结果判定

RT-PCR 扩增产物大小应在 359 bp 左右。如果检测结果的阴性样品和空白样品没有特异性条带,阳性样品有特异性条带时,则表明 RT-PCR 反应正确可靠;如果检测的阴性样品或空白样品出现特异性条带,或阳性样品没有特异性条带,说明在 RNA 样品制备或 RT-PCR 反应中的某个环节存在问题,需重新进行检测。

待测样品在 359 bp 左右显现核酸带,表明样品为阳性样品,含有 PSTVd;若待测样品在 359 bp 左右没有该特异性条带,表明该样品为阴性样品,不含有 PSTVd。

方法二 往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法

8 原理

类病毒在自然条件下呈棒状、高度配对的状态,在 70℃~80℃ 条件下将会变性,由棒状变成环状,在聚丙烯酰胺胶中的迁移率减慢。正向电泳是在常温非变性条件下,核酸从上往下迁移,反向电泳是在第一次正向电泳结束后,变换电极,在高温变性条件下进行。通过两次电泳将类病毒的核酸与寄主中的其他核酸分离出来,达到检测类病毒的目的。

9 试剂与材料

以下所用试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

- 9.1 三氯甲烷。
- 9.2 水饱和酚(pH 4.0)。
- 9.3 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水(同 4.5)。
- 9.4 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH 5.2)(同 4.6)。
- 9.5 1 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷—盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)(同 4.9)。
- 9.6 RNA 提取缓冲液(同 4.10)。
- 9.7 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(同 4.12)。
- 9.8 1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(同 4.13)。
- 9.9 加样缓冲液(同 4.14)。
- 9.10 30%胶贮液。

称取丙烯酰胺 29 g,N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 1 g,加水定容至 100 mL,过滤,4℃ 储存。

- 9.11 10%过硫酸铵溶液(现用现配)。

称取 0.1 g 过硫酸铵,加蒸馏水定容至 1 mL。

- 9.12 四甲基乙二胺(TEMED)。

- 9.13 5%聚丙烯酰胺凝胶。

量取 5×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(9.7)9 mL,30%胶贮液(9.10)7.6 mL,四甲基乙二胺(TEMED)(9.12)44 μL,10%过硫酸铵溶液(9.11)200 μL,加水至 45 mL。

- 9.14 固定液。

量取无水乙醇 30 mL,冰乙酸 3 mL,加水定容至 300 mL。

- 9.15 染色液。

称取硝酸银 0.6 g,加水溶解,定容至 300 mL。

9.16 显色液(现配现用)。

在 300 mL 水中,加入氢氧化钠 3 g,甲醛 1 mL,混合均匀。

9.17 终止液。

称取碳酸钠 3.7 g,加水溶解,定容至 300 mL。

注:电泳中用到的丙烯酰胺是神经毒剂,避免接触皮肤,操作时要带手套。

10 仪器设备

10.1 台式低温高速离心机(可以控制在 4℃ 下进行离心)。

10.2 电泳仪。

10.3 垂直电泳槽。

10.4 紫外凝胶成像仪。

10.5 微量移液器(0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL)。

11 分析步骤

11.1 样品 RNA 的提取

11.1.1 RNA 的抽提

称取 0.5 g 样品,放于灭菌冷冻的小研钵中,分别加入 1 mL RNA 提取缓冲液(9.6)、1 mL 水饱和酚(9.2)和 1 mL 三氯甲烷(9.1),充分研磨后倒入 1.5 mL 离心管中,于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min,用移液器小心将上层水相移入另一离心管中。

11.1.2 RNA 的沉淀

在 RNA 抽提液中(6.1.1),加入 3 倍体积无水冷乙醇,1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液(9.4),混匀,−20℃ 沉淀 1.5 h 以上。

11.1.3 RNA 的溶解

取出冷冻保存的 RNA 沉淀(6.1.2),于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清,用 1 mL 70%乙醇清洗沉淀,然后离心,再用吸头彻底吸弃遗留在管中的上清液,在自然条件下干燥至核酸沉淀变成白色或透明状态,再将核酸沉淀溶于 30 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水(9.3)中。−20℃ 贮存,备用。

注:或者选择市售商品化 RNA 提取试剂盒,完成 RNA 的提取。

11.2 电泳

11.2.1 正向电泳

电泳用 5%聚丙烯酰胺凝胶(9.13),1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液(9.8),电泳方向从负极到正极,电流量为每厘米凝胶 5 mA。点样量为 6 μL ~10 μL 。当二甲苯腈示踪染料迁移到凝胶板底部时停止电泳。

11.2.2 反向电泳

将正向电泳缓冲液倒出,然后把电泳槽放到 70℃~80℃ 的烘箱中预加热,样品变性 30 min。同时,将倒出的电泳缓冲液在微波炉中加热到 80℃。倒入电泳槽中,变换电极进行反向电泳。当二甲苯腈示踪染料迁移到凝胶板顶部时,停止电泳,进行凝胶染色。

11.3 染色

11.3.1 固定

将电泳胶片放在盛有 300 mL 核酸固定液(9.14)的容器中,轻缓振荡 10 min 后,倒掉固定液。

11.3.2 染色

向容器中加入 300 mL 染色液(9.15),轻缓振荡 15 min 后,倒出染色液。用蒸馏水冲洗胶板,反复

冲洗四次。

11.3.3 显色

加入 300 mL 核酸显色液(9.16),轻缓振荡,直至显现清晰的核酸带,然后用自来水冲洗,反复冲洗四次。

11.3.4 终止

将胶板放入 300 mL 终止液(9.17)中终止反应。

12 结果判定

在凝胶板下方 1/4 处的核酸带为类病毒核酸带,与上部寄主核酸带之间有一定距离,二者可明显分开。以电泳时载入的阴阳性样品作为对照,进行结果判定。
