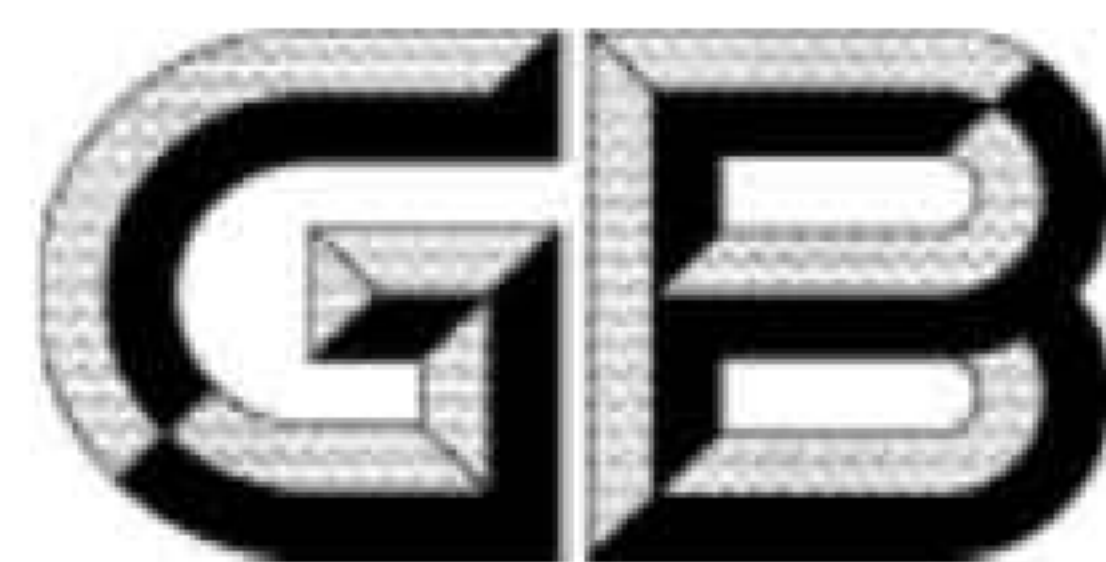




中华人民共和国国家标准

GB/T 36812—2018

马铃薯黄矮病毒分子生物学检测方法

Molecular detection method of *Potato yellow dwarf virus*

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国福州出入境检验检疫局、福建农林大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：沈建国、蔡伟、高芳銓、张永江、陈细红、李敏、王宇、吴祖建、陈寿铃。

马铃薯黄矮病毒分子生物学检测方法

1 范围

本标准规定了马铃薯黄矮病毒(*Potato yellow dwarf virus*)的分子生物学检测方法。
本标准适用于可能携带马铃薯黄矮病毒的植物及植物产品检疫鉴定。

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
- SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样
- SN/T 2964 植物病毒检测规范
- SN/T 3457 植物病毒分子生物学检测规范

3 马铃薯黄矮病毒基本信息

中文名:马铃薯黄矮病毒
学名:*Potato yellow dwarf virus*,缩写:PYDV。
分类地位:弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)、细胞核弹状病毒属(*Nucleorhabdovirus*)。
马铃薯黄矮病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

马铃薯黄矮病毒的分子生物学特性是制定本检测方法的主要依据。

5 仪器、用具及试剂

5.1 仪器

高速冷冻离心机、电子天平、PCR 仪、荧光 PCR 仪、水平电泳系统、-20 ℃低温冰箱和-80 ℃超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH 计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台等。

5.2 用具

可调移液器(2.5 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL)和可调移液器枪头、离心管、研钵等。

5.3 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中相关规定。RT-PCR 检测试剂见附录 B;实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 C。

6 抽样和样品制备

6.1 抽样

尽量抽取有病毒危害症状的植物材料, PYDV 的危害症状描述参见附录 A; 抽样方法按照 SN/T 2122 中规定执行。

6.2 样品制备

分别按照有症和无症进行样品制备, 具体方法按照 SN/T 2964 和 SN/T 3457 中规定执行。

7 检测鉴定

7.1 RT-PCR 检测

以含 PYDV 材料作为阳性对照, 以不含 PYDV 的健康植物组织作为阴性对照, 同时以双蒸水代替模板作为空白对照。分别提取样品和对照的总 RNA, 反转录合成 cDNA 后进行 PCR 检测, 具体操作见附录 B。如采用商品化一步法试剂盒, 则按照试剂盒说明进行。

7.2 实时荧光 RT-PCR 检测

以含 PYDV 材料作为阳性对照, 以不含 PYDV 的健康植物组织作为阴性对照, 同时以双蒸水代替模板作为空白对照。分别提取样品和对照的总 RNA, 反转录合成 cDNA 后进行实时荧光 PCR 检测, 具体操作见附录 C。如采用商品化一步法试剂盒, 则按照试剂盒说明进行。

8 结果判定

样品检测时, 检测流程及结果判定按下述原则进行:

- RT-PCR 初步筛检, 若检测结果为阴性, 则判定样品不携带 PYDV; 若检测结果为阳性, 则采用 PCR 产物序列测定或实时荧光 RT-PCR 进行验证;
- 若验证结果为阳性, 则判定样品携带 PYDV; 若验证结果为阴性, 则判定样品不携带 PYDV。

9 样品保存与结果记录

9.1 样品保存

经检测确定携带 PYDV 的样品应保存在适合的条件以备复核。种苗、叶片等样品保存在 -80°C 冰箱中; 做好登记和标记工作, 保存期限至少 1 年。

9.2 结果记录

记录包括样品来源、种类、检测时间、地点、方法和结果、检测人员签字。RT-PCR 检测应有电泳图片; 实时荧光 RT-PCR 检测应有实时荧光结果图片。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯黄矮病毒相关资料

A.1 寄主范围

已报道的寄主包括茄科、夹竹桃科、菊科、十字花科、唇形科、豆科、蓼科和玄参科植物,主要自然寄主为马铃薯(*Solanum tuberosum*)。

A.2 病害症状

侵染马铃薯引起病株矮缩、黄化,茎的生长点早期坏死等症状(见图 A.1)。



注:引自 Cornell University, Bugwood.org。

图 A.1 PYDV 侵染马铃薯引起的症状

A.3 分布地区

主要分布于加拿大、美国。

A.4 传播途径

主要经昆虫介体叶蝉 *Aceratagallia sanguinolenta*、*Aceratagallia* sp.、*Agallia constricta* 传播,也可通过带毒种薯、块茎远距离传播。

A.5 粒体形态

病毒粒体有包膜,杆菌状或子弹状,大小约 380 nm×75 nm。

A.6 病毒基因组

负义单链 RNA 病毒,全长约 12 875 bp。



附 录 B
(规范性附录)
RT-PCR 检测

B.1 试剂

B.1.1 Trizol 裂解液。

B.1.2 5× TBE 缓冲液：

Tris 碱	54.0 g
硼酸(H ₃ BO ₃)	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20 mL

补充蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 0.5×TBE。

B.1.3 三氯甲烷。

B.1.4 异丙醇。

B.1.5 75%乙醇。

B.1.6 无水乙醇。

B.1.7 RT 缓冲液。

B.1.8 dNTPs:10 mmol/L。

B.1.9 M-MLV RT:200 U/μL。

B.1.10 RNasin:40 U/μL。

B.1.11 *Taq* PCR mix。

B.1.12 引物序列：

根据已报道的 PYDV 基因组序列设计 1 对用于特异性扩增的引物。

正向引物 PYDV-F:5'-ATATTCATTTCCAGGCTTGCAT-3'

反向引物 PYDV-R:5'-CTATTTTCCCCTCAGTAGTCCAC-3'

PCR 产物大小 588 bp。

B.2 RT-PCR 检测

B.2.1 总 RNA 提取

取 0.1 g 样品组织置于研钵中,加入液氮充分研磨至粉末状后迅速移入 1.5 mL 离心管,再加入 1 mL Trizol 裂解液,剧烈震荡摇匀 3 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加入三氯甲烷300 μL,剧烈震荡 15 s,室温静置 5 min,4℃,12 000 g 离心 15 min,取上层水相;加入等体积的异丙醇,颠倒混匀后室温下静置 15 min,4℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 75%的乙醇洗涤沉淀 2 次,每次 4℃,7 500 g 离心 3 min,弃上清液;RNA 沉淀干燥后,用 20 μL~40 μL 经 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的双蒸水溶解,-80℃保存备用。

B.2.2 cDNA 合成

在 PCR 管中加入 3 μL 总 RNA,1 μL 反向引物(PYDV-R,10 μmol/L),双蒸水 7 μL,70℃水浴 10 min,迅速冰浴 5 min,再加入下列试剂:5× RT 缓冲液 5 μL、dNTPs(10 mmol/L)2 μL、M-MLV RT

(200 U/ μ L)1 μ L、RNasin(40 U/ μ L)1 μ L。42 $^{\circ}$ C水浴 60 min,70 $^{\circ}$ C水浴 10 min,自然冷却至室温,−20 $^{\circ}$ C保存备用。

B.2.3 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 B.1,每个反应设置 2 个重复。
PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 B.1 PCR 反应体系

名称	加样量/ μ L
cDNA	3.0
PYDV-F (10 μ mol/L)	1.0
PYDV-R (10 μ mol/L)	1.0
2 $\times$ Taq PCR mix	12.5
双蒸水	7.5
总体积	25.0

B.2.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

- B.2.4.1 阴性对照:不含 PYDV 的健康植物组织。
- B.2.4.2 阳性对照:含 PYDV 材料。
- B.2.4.3 空白对照:双蒸水。

B.2.5 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5% 的琼脂糖凝胶,对 PCR 产物进行电泳。电泳结束后,在溴化乙锭(EB,浓度为 0.5 μ g/mL)溶液染色 10 min,再在凝胶成像分析系统中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍照并做记录。

B.2.6 结果判断

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 588 bp 大小处有扩增条带,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为阳性。
如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 588 bp 大小处有扩增条带,待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为阴性。
如果采用 PCR 产物序列测定方法进一步确认,当序列测定得到的核苷酸序列与已知的 PYDV 序列一致,则判定样品携带 PYDV;若序列不一致,则判定样品不携带 PYDV。



附 录 C
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 检测

C.1 试剂

核酸提取、反转录试剂同 B.1。
*Taq*Man PCR mix。

C.2 引物及探针

实时荧光 RT-PCR 检测引物及探针见表 C.1。

表 C.1 实时荧光 RT-PCR 检测引物及探针

名称	序列 (5'-3')
PYDV-f1	GGTCAAATCGGAAATGAG
PYDV-r1	CTGGTTACAGTGATCAGA
PYDV-f2	CTACCATTAGAACAAGTTACG
PYDV-r2	GGTGGATAACTGTTGAAG
PYDV-Probe1	FAM-TAAGCGGCAACCAACTGTCG -TAMRA
PYDV-Probe2	FAM-CAGTCAGCGGAAGTCACCAATT-TAMRA

C.3 总 RNA 提取

方法同 B.2.1。

C.4 cDNA 合成

方法同 B.2.2。

C.5 实时荧光 PCR 反应

实时荧光 PCR 反应体系见表 C.2,每个反应设置 2 个重复。
反应程序:95 ℃ 10 s,95 ℃ 5 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 20 s,共 40 个循环。



表 C.2 实时荧光 PCR 反应体系

名称	加样量/ μL
$2\times\text{Taq Man PCR mix}$	12.5
PYDV-f1($10\ \mu\text{mol/L}$)	1
PYDV-r1($10\ \mu\text{mol/L}$)	1
PYDV-f2($10\ \mu\text{mol/L}$)	1
PYDV-r2($10\ \mu\text{mol/L}$)	1
PYDV-Probe1($5\ \mu\text{mol/L}$)	1
PYDV-Probe2($5\ \mu\text{mol/L}$)	1
cDNA	2.0
双蒸水	4.5
总体积	25.0

C.6 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

同 B.2.4。

C.7 结果判定

在空白对照及阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线、阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现典型扩增曲线的条件下：

待测样品的 Ct 值 >40 时，判定 PYDV 阴性。

待测样品的 Ct 值 <35 时，判定 PYDV 阳性。

待测样品的 $35\leq\text{Ct 值}\leq 40$ 时，应重新进行测试；如果重新测试的 Ct 值 ≥ 40 时，判定 PYDV 阴性；如果重新测试的 Ct 值 <40 ，则判定 PYDV 阳性。

参 考 文 献

- [1] 李芝芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京:中国农业科学出版社, 2004: 111.
 - [2] Barrus M F, Chupp C C. Yellow dwarf of potatoes[J]. *Phytopathology*, 1922, 12(3): 122-133.
 - [3] Brakke M K, Black L M, Wyckoff R W G. The Sedimentation Rate of Potato Yellow-Dwarf Virus[J]. *American Journal of Botany*. 1951, 38(5): 332-342.
 - [4] Brakke M K. Stability of potato yellow-dwarf virus[J]. *Virology*, 1956, 2(4): 463-476.
 - [5] Lin N S, Hsu Y H, Chiu R J. Identification of Viral Structural Proteins in the Nucleoplasm of Potato Yellow Dwarf Virus-infected Cells[J]. *Journal of General Virology*, 1987, 68(10): 2723-2728.
-

