

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2744—2015

马铃薯纺锤块茎类病毒检测 核酸斑点杂交法

Detection of *potato spindle tuber viroid* (PSTVd)—
Nucleic acid spot hybridization (NASH)

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由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）、中国农业科学院植物保护研究所、黑龙江八一农垦大学。

本标准主要起草人：邱彩玲、刘尚武、张志想、吕典秋、白艳菊、李世访、王绍鹏、魏琪、董学志、耿宏伟、万书明、金光辉、高艳玲、郭梅、闵凡祥、王亚洲、杨光辉、王晓丹、申宇、张威、范国权、张抒、宿飞飞、李勇、胡林双、马纪、刘振宇、高云飞、杨帅、李学湛。

马铃薯纺锤块茎类病毒检测 核酸斑点杂交法

1 范围

本标准规定了马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd)的检测方法。
本标准适用于马铃薯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

GB 7331 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 18133 马铃薯种薯

NY/T 1962—2010 马铃薯纺锤块茎类病毒检测

3 原理

经过标记的 PSTVd 探针通过氢键与其互补的靶序列结合,洗去未结合的游离探针后,经放射自显影或显色反应检测特异结合的探针,鉴定马铃薯组织是否感染 PSTVd。

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 CHCl_3 (三氯甲烷)。

4.2 正电荷尼龙膜(Hybond-N+)。

4.3 抗地高辛-AP(Anti-Digoxigenin-AP)。

4.4 CDP-Star(化学发光法使用)。

4.5 X光片(化学发光法使用)。

4.6 显影液、定影液(化学发光法使用)。

4.7 Tween-20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$,聚氧乙烯去山梨醇单月桂酸酯)。

4.8 杂交液。市售。

4.9 $10\times$ 阻断液。市售。

4.10 提取缓冲液。在 160.0 mL 蒸馏水中依次加入 NaCl 11.7 g、 MgCl_2 0.4 g、醋酸钠(CH_3COONa) 8.21 g、无水乙醇 40.0 mL 和十二烷基磺酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) 6.0 g,用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 6.0。

4.11 20 倍柠檬酸缓冲液储备液($20\times$ SSC 储备液)。在 800 mL 水中加入 NaCl 175.3 g、柠檬酸钠 88.2 g,加入数滴 10 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。或者选择市售商品。

4.12 10% SDS。在 80 mL 水中加入 SDS 10 g,溶解后定容至 100 mL。

4.13 $2\times$ SSC/0.1% SDS。在 35.6 mL 蒸馏水中加入 20 倍柠檬酸缓冲液储备液(4.11) 4 mL,10% SDS(4.12)400 μL ,混匀。

4.14 $0.1\times$ SSC/0.1% SDS。在 39.4 mL 蒸馏水中加入 20 倍柠檬酸缓冲液储备液(4.11)200 μL ,

10% SDS(4.12)400 μ L,混匀。

4.15 马来酸缓冲液。在 800 mL 水中加入马来酸(顺丁烯二酸, $C_4H_4O_4$) 11.607 g, NaCl 8.77 g, 用 NaOH 调 pH 至 7.5(20℃), 定容至 1 L, 5℃~25℃ 稳定。

4.16 洗涤缓冲液。在 100 mL 马来酸缓冲液(4.15)中加入 0.3 mL Tween-20(4.7), 混匀, 5℃~25℃ 稳定。

4.17 5×检测缓冲液。在 80 mL 水中加入 Tris-HCl 7.88 g, NaCl 2.92 g, 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 9.5(20℃), 定容至 100 mL。使用时用水稀释至 1×工作液, 5℃~25℃ 稳定。

4.18 探针。参考吕典秋^[1]或其他相关文献制备, 或直接购买商品化的探针。

4.19 阻断液。用马来酸缓冲液(4.15)稀释 10×阻断液(4.9), 制成 1×工作液。如: 2 mL 10×阻断液 + 18 mL 马来酸缓冲液, 现用现配。

4.20 抗体液工作液。每次使用前, 需要 10 000 r/min 离心抗 Dig-AP(4.3) 5 min, 从表面小心吸取所需的量, 用阻断液按 1:5 000 稀释抗体液。例如: 2 μ L 抗 Dig-AP + 10 mL 阻断液(4.9), 2℃~8℃ 保存, 12 h 稳定。

4.21 二甲基甲酰胺(C_3H_7NO , DMF)。

4.22 硝基蓝四氮唑($C_{40}H_{30}N_{10}O_6 \cdot 2Cl$, NBT)储备液(化学显色法使用)。NBT 30 mg + DMF 70% 1 mL, 4℃或-20℃保存备用。

4.23 对甲苯胺蓝(BCIP)储备液(化学显色法使用)。BCIP 15 mg + DMF 100% 1 mL, 4℃或-20℃保存备用。

4.24 显色液(化学显色法使用)。加 NBT 储液(4.22)和 BCIP 储液(4.23)各 10 μ L 于 1 mL 1×检测缓冲液中, 混匀, 现用现配。

4.25 发光底物(化学发光法使用)。10 μ L CDP-STAR(4.4) 加入到 1 mL 1×检测缓冲液中, 混匀。

5 仪器

5.1 紫外交联仪。

5.2 台式低温高速离心机($\geq 10\,000$ r/min, 4℃)。

5.3 杂交箱。

5.4 水平摇床。

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 天平仪、灭菌锅、暗盒(化学发光法)等。

6 分析步骤

6.1 阴阳对照的设立

设立阳性对照和阴性对照。在以下实验过程中, 要设立阴性、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, 阴阳对照的制备方法参见附录 A。

6.2 样品的采集和制备

样品采集按照 GB 18133 和 GB 7331 中的规定进行。

6.3 样品 RNA 的提取

取 0.2 g 样品放于研样袋或研钵中, 加入 0.3 mL 提取缓冲液(4.10), 磨碎, 转入 1.5 mL 离心管中, 盖严盖, 37℃ 孵育 15 min, 加入等体积(0.3 mL)的三氯甲烷(4.1), 振荡离心管或涡旋震荡使之彻底混匀, 直至出现乳状液, 4℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 至溶液分离(上层水相, 下层三氯甲烷, 或把离心管放在 4℃ 冰箱过夜, 分离 RNA), 吸出上清液, 4℃ 保存, 备用。

或者选择市售商品化 RNA 提取试剂盒,完成 RNA 的提取。

6.4 点样及固定

用移液器吸取 $2\ \mu\text{L}\sim 3\ \mu\text{L}$ RNA 溶液(6.3),点在提前画好方格的尼龙膜上,室温干燥后,将尼龙膜放在紫外交联仪上正反面各交联 1 min,能量为 1 200 J。

6.5 杂交

根据尼龙膜的大小取相应体积的杂交液(大约 4 mL 杂交液/100 cm² 尼龙膜),加入变性过的探针(5 ng/mL $\sim$ 20 ng/mL 杂交液),混匀,将固定好的尼龙膜放入杂交管中,排除气泡,于 68℃,8 r/min $\sim$ 15 r/min,杂交过夜。

6.6 洗膜

用镊子取出尼龙膜,放入装有 20 mL 2 $\times$ SSC,0.1% SDS 溶液(4.13)的平皿中,在室温下振荡洗涤 2 次,每次 5 min;用镊子将尼龙膜转入 0.1 $\times$ SSC,0.1% SDS 溶液(4.14)(先 50℃ 预热),55℃ 水浴振荡洗涤 2 次,每次 15 min(也可以在杂交管中用最大转速洗涤);将尼龙膜取出转入装有 20 mL 洗涤缓冲液(4.16)的平皿中振荡洗涤 5 min。

6.7 孵育

在 20 mL $\sim$ 30 mL 阻断液(4.19)中孵育 30 min;在 10 mL 抗体液(4.20)中孵育 30 min;在 20 mL $\sim$ 30 mL 洗涤缓冲液(4.16)中洗涤 2 次,每次 15 min;在 15 mL 检测缓冲液(4.17)中平衡 2 min $\sim$ 5 min。所有孵育过程应在 15℃ $\sim$ 25℃ 下搅拌进行。

6.8 信号检测

可采用下列方法之一进行信号检测。

6.8.1 化学发光检测反应

将尼龙膜夹在两层保鲜膜中间,将上层保鲜膜提起,沿尼龙膜的左边加入适量新鲜配制的发光底物液(4.20),然后缓慢放下上层保鲜膜,使底物均匀的覆盖膜表面。于室温静置作用 5 min。

用镊子夹住膜的边缘轻轻提起,让多余的底物流出,并用滤纸吸干膜外的底物液,在暗室中用 X 光片压片并进行曝光、显影、定影。

6.8.2 化学显色检测反应

在尼龙膜上均匀涂上 NBT/BCIP 显色液(4.24),避光存放,显色,当达到所需的点强度后,照相或复印保存。

7 结果判定

7.1 化学发光检测反应

X 光片上对应点样位置出现斑点者为马铃薯纺锤块茎类病毒阳性样品,参见 B.1。如果检测结果的阴性样品没有特异性斑点,阳性样品有特异性斑点时,则表明此次反应正确可靠,如果检测的阴性样品出现特异性斑点,或阳性样品没有特异性斑点,说明在 RNA 样品制备或杂交反应中的某个环节存在问题,需重新进行检测。

7.2 化学显色检测反应

尼龙膜上对应点样位置出现蓝紫色斑点者为马铃薯纺锤块茎类病毒阳性样品,参见 B.2。如果检测结果的阴性样品没有特异性斑点,阳性样品有特异性斑点时,则表明此次反应正确可靠,如果检测的阴性样品出现特异性斑点,或阳性样品没有特异性斑点,说明在 RNA 样品制备或杂交反应中的某个环节存在问题,需重新进行检测。

附 录 A
(资料性附录)
PSTVd 阴阳对照参考制备方法

A.1 试样来源

田间采集具有植株矮化、叶片皱缩、块茎龟裂、畸形等马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)症状的马铃薯样品和健康的马铃薯样品。

A.2 测定步骤

A.2.1 PSTVd 阴阳对照的鉴定

采用 NY/T 1962—2010 中规定的方法检测上述样品,将马铃薯纺锤块茎类病毒特异性条带回收、测序,并进行 BLAST 比对,确定为 PSTVd 的样品进行隔离种植或试管苗继代保存;经检测为阴性的马铃薯样品同样处理。

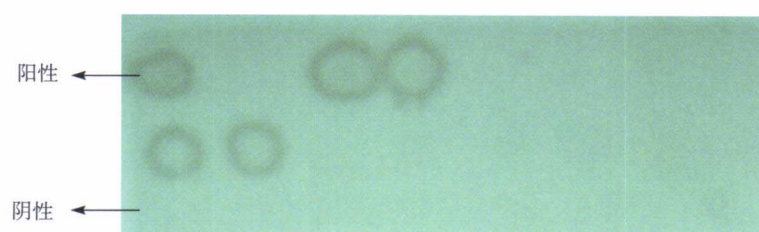
A.2.2 PSTVd 阴阳对照进一步验证

分别取部分保存的植株或试管苗阳性、阴性组织接种到健康马铃薯植株上,接种 30 d 后按照 A.2.1 的方法进行检测,若检测结果与上次(A.2.1)相符,则确认该马铃薯为 PSTVd 阳性或阴性对照物,其组织便可用作 PSTVd 的对照。

附 录 B
(资料性附录)
检测结果判定参考图

B.1 化学发光法检测结果

化学发光法检测结果见图 B.1。

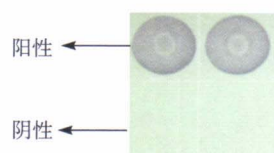


注：图中出现斑点者为阳性，未出现斑点者为阴性。

图 B.1 化学发光法检测结果

B.2 化学显色法检测结果

化学显色法检测结果见图 B.2。



注：图中出现斑点者为阳性，未出现斑点者为阴性。

图 B.2 化学显色法检测结果

参 考 文 献

- [1]吕典秋,刘尚武,宿飞飞,等. 利用 cDNA 双体探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 植物病理学报,2009,36(2):187 - 188.
-