

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2678—2015

马铃薯6种病毒的检测 RT-PCR法

Detection of the six potato viruses—RT-PCR method

2015-02-09 发布

2015-05-01 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）、湖南农业大学园艺学院、华中农业大学生命科学技术学院、福建农林大学。

本标准主要起草人：张威、白艳菊、李学湛、柳俊、詹家绥、聂碧华、胡新喜、何长征、高艳玲、范国权、申宇、张抒、王晓丹、王文重、魏琪、邱彩玲、耿宏伟、董学志、万书明。

马铃薯 6 种病毒的检测 RT-PCR 法

1 范围

本标准规定了马铃薯 S 病毒(*Potato virus S*, PVS)、马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)、马铃薯 M 病毒(*Potato virus M*, PVM)、马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*, PVY)、马铃薯卷叶病毒(*Potato leaf-roll virus*, PLRV)和马铃薯 A 病毒(*Potato virus A*, PVA)的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)分子生物学检测方法(见附录 A)。

本标准适用于马铃薯试管苗、原原种和田间马铃薯块茎、植株等组织中病毒的检测。

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

3 原理

本标准采用反转录—聚合酶链式反应(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测马铃薯病毒。其原理是,将 RNA 的反转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的技术, RNA 在反转录酶的作用下反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板,在 Taq DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 扩增,根据 PCR 扩增结果判断该样品中是否含有目的片段,从而达到鉴定病毒的目的。

4 试剂和材料

以下所有试剂,除非另有规定仅使用分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 TRIzol RNA 提取试剂

4.2 三氯甲烷

4.3 异丙醇

4.4 75%乙醇

量取无水乙醇 75 mL,加水定容至 100 mL。

4.5 M-MLV 反转录酶(200 U/L)

4.6 RNA 酶抑制剂(40 U/L)

4.7 Taq DNA 聚合酶(5 U/L)

4.8 10×PCR buffer(Mg²⁺ free)

4.9 MgCl₂(25 mmol/L)

4.10 dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)

4.11 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水

在 100 mL 水中,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)50 μL,室温过夜,121℃ 高温灭菌 20 min,分装到 1.5 mL DEPC 处理过的离心管中。

4.12 10×TAE 电泳缓冲液

羟基甲基氨基甲烷(Tris)242 g,冰乙酸 57.1 mL,乙二胺四乙酸二钠·2H₂O 37.2 g,用氢氧化钠调 pH 至 8.5,加水定容至 1 000 mL。

4.13 1×TAE 电泳缓冲液

量取 10×TAE 电泳缓冲液(4.12)100 mL,加水定容至 1 000 mL。

4.14 溴化乙锭溶液(10 mg/L)

称取溴化乙锭 200 mg,加水溶解,定容至 20 mL。

4.15 1.5%琼脂糖凝胶板

称取琼脂糖 1.5 g,加入 1×TAE 电泳缓冲液(4.13)定容至 100 mL,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(4.14)5 μ L,摇匀,倒入制胶板中均匀铺板,凝固后取下梳子,备用。

4.16 引物缓冲液

用 DEPC 水将上、下游引物分别配制成浓度为 100 ng/ μ L 的水溶液。

4.17 100 bp DNA 分子量标准物

4.18 阳性对照

参见附录 B 中 B.1。

4.19 阴性对照

参见附录 B 中 B.2。

5 主要仪器

5.1 PCR 仪。

5.2 台式低温高速离心机。

5.3 电泳仪、水平电泳槽。

5.4 凝胶成像仪。

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

5.6 灭菌锅等。

6 操作步骤

6.1 对照的设置

实验分别设立阳性对照、阴性对照和空白对照(即用等体积的 DEPC 水代替模板 RNA 做空白对照),在检测过程中要同待测样品一同进行如下操作。

6.2 样品制备

取马铃薯试管苗、块茎芽眼及周围组织或茎叶组织 0.05 g~0.1 g,现用现取或 4℃ 条件下保存,最多存放 3 d。

6.3 RNA 提取

将样品置于研钵中,加液氮研磨成粉末,转至 1.5 mL 离心管,加入 1 mL TRIzol 混匀,使其充分裂解;4℃ 14 000 g 离心 5 min;取上清,加入 200 μ L 三氯甲烷,振荡混匀,室温放置 15 min;4℃ 12 000 g 离心 15 min;吸取上层水相至新 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,室温放置 10 min;4℃ 12 000 g 离心 10 min;弃上清,留沉淀,加入 1 mL 75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀;4℃ 7 500 g 离心 5 min,弃上清,将离心管倒置于滤纸上,自然干燥;加入 25 μ L~100 μ L DEPC 水溶解沉淀,即得到 RNA。

6.4 单重 RT-PCR

6.4.1 反转录

6.4.1.1 反转录引物

PVS(用附录 C 中 PVS 的第 1 对引物)、PVX、PVM、PVY、PLRV 或 PVA 病毒的特异性下游引物 [也可以用随机引物或 oligo-dT(但不适用于 PLRV,只能用于其他 5 种病毒)]。

6.4.1.2 RNA 预变性

取 2.5 μL RNA,65 $^{\circ}\text{C}$ 8 min, RNA 冰上放置 2 min;

6.4.1.3 反转录反应体系

加入 0.5 μL 下游引物,反转录反应程序和反应体系中其他成分按照反转录酶说明书,混合物瞬时离心,使试剂沉降到 PCR 管底。反转录反应后取出直接进行 PCR 或置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.4.2 PCR 扩增

6.4.2.1 PCR 扩增引物

上、下游引物为 PVS(用附录 C 中 PVS 的第 1 对引物)、PVX、PVM、PVY、PLRV 或 PVA 病毒的特异性引物(见附录 C)。

6.4.2.2 PCR 反应体系

按表 1 顺序加入试剂,混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。

表 1 PCR 扩增反应体系

试剂名称	用量 μL
DEPC 水	16.5
反转录产物	2.0
上游引物	0.5
下游引物	0.5
10 $\times$ PCR 缓冲液	2.5
MgCl ₂	2.6
dNTP	0.25
Taq 酶	0.15
总量	25

6.4.2.3 PCR 反应程序

92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,循环 30 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。

6.5 多重 RT-PCR

采用双重和三重 RT-PCR 检测 PVS、PVX、PVM、PVY、PLRV 和 PVA 病毒。应用固定的组合,双重 RT-PCR 病毒组合:PVY+PLRV、PVM+PVS、PVX+PVA;三重 RT-PCR 病毒组合:PVY+PVS+PLRV、PVX+PVM+PVA。

6.5.1 反转录

执行双重 RT-PCR 的反转录时,每种病毒下游引物加 0.5 μL ,DEPC 水减少 0.5 μL ;执行三重 RT-PCR 的反转录时,每种病毒下游引物加 0.5 μL ,DEPC 水减少 1.0 μL ,其他操作参照 6.4.1。

6.5.2 PCR 扩增

执行双重 PCR 时,每种病毒上、下游引物各加 0.5 μL ,DEPC 水加入 15.5 μL ;执行三重 PCR 时,每种病毒上、下游引物各加 0.5 μL ,DEPC 水加入 14.5 μL ,其他操作参照 6.4.2。

6.6 PCR 产物的电泳检测

在电泳槽中加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液,使液面刚刚超过琼脂糖凝胶板。取 5 μL PCR 产物分别和 2 μL 加样缓冲液混合后,加入到琼脂糖凝胶板的加样孔中,以 5 μL 100 bp DNA 分子量标准物为参照物在恒压(120 V~150 V)下电泳 20 min~30 min,将凝胶放到凝胶成像系统上观察结果。

7 结果

7.1 试验成立的条件

阳性对照的扩增产物检测到预期大小的特异性条带,阴性对照和空白对照的扩增产物均没有检测到预期大小的目的条带。阴性、阳性和空白对照同时成立则表明试验有效,否则试验无效。检测结果判定图参见附录 D。

7.2 阳性判定

待检样品如果在 729 bp、711 bp、520 bp、447 bp、336 bp 或 273 bp 对应位置出现特异性条带,则判定样品为 PVS、PVX、PVM、PVY、PLRV 或 PVA 病毒阳性;如果在 729 bp 对应位置没有出现特异性条带,再用引物 PVS-F1, PVS-R1 对样品进一步扩增,如果在 602 bp 对应位置出现特异性条带则判断样品为 PVS 病毒阳性。

7.3 阴性判定

如果相应病毒电泳谱带没有扩增到预期大小的特异性条带,则判定样品为该病毒阴性。

附 录 A
(规范性附录)
缩 略 语

下列缩略语适用于本文件。

- A. 1 PVS:马铃薯 S 病毒(*Potato virus S*)。
- A. 2 PVX:马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*)。
- A. 3 PVM:马铃薯 M 病毒(*Potato virus M*)。
- A. 4 PVY:马铃薯 Y 病毒(*Potato virus Y*)。
- A. 5 PLRV:马铃薯卷叶病毒(*Potato leaf-roll virus*)。
- A. 6 PVA:马铃薯 A 病毒(*Potato virus A*)。
- A. 7 DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)。
- A. 8 dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)。
- A. 9 EB:溴化乙锭(ethidium bromide)。
- A. 10 M-MLV:莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)。
- A. 11 PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)。
- A. 12 RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)。
- A. 13 RT-PCR:反转录—聚合酶链式反应(reverse-transcription polymerase chain reaction)。
- A. 14 Taq DNA 聚合酶:水生栖热菌 DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)。
- A. 15 DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。

附 录 B
(资料性附录)
阳性和阴性对照参考制备方法

B.1 阳性对照

B.1.1 毒源的鉴定

经检测是 PVS、PVX、PVM、PVY、PLRV 或 PVA 病毒的样品,再进行测序,与 Genbank 中相应病毒的序列进行同源性比对,确定为此种病毒。

B.1.2 毒源接种指示植物扩繁

再将毒源接种到相应的指示植物上:PVX 接种到心叶烟(*Nicotiana Glutinosa*)上,PVY 接种到黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum*)上,PVS 接种到德莫尼烟(*Nicotinana Rebneyi*)上,PLRV 接种到白花刺果曼陀罗(*Patuna stramonium*)上,PVM 接种到番茄(*Lycopersicon esculentum*)上,PVA 接种到黄花烟(*Nicotiana Rustica*)上,定期进行检测。当病毒达到高峰期时采收叶片,存放-70℃冰箱保存备用。

B.1.3 定期进行检测

6 个月后对保存的叶片定期进行检测,以保证 RT-PCR 检测中阳性对照的有效性。

B.2 阴性对照

B.2.1 样品的鉴定

经检测无 PVS、PVX、PVM、PVY、PLRV 或 PVA 病毒的样品,存放-70℃冰箱保存备用。

B.2.2 定期进行检测

1 年后对保存的样品定期进行检测,以保证 RT-PCR 检测中阴性对照的有效性。

附 录 C
(规范性附录)
病毒引物序列

病毒引物序列见表 C.1。

表 C.1 病毒引物序列

病毒名称	引物名称	引物序列(5'~3')	PCR 扩增片段长度 bp
PVS ^a	PVS - F	GAGGCTATGCTGGAGCAGAG	729
	PVS - R	AATCTCAGCGCCAAGCATCC	
PVS ^b	PVS - F	TCTCCTTTGAGATAGGTAGG	602
	PVS - R	CAGCCTTTCATTTCTGTTAG	
PVX	PVX - F	ATGTCAGCACCAGCTAGCA	711
	PVX - R	TGGTGGTGGTAGAGTGACAA	
PVM	PVM - F	ACATCTGAGGACATGATGCGC	520
	PVM - R	TGAGCTCGGGACCATTTCATAC	
PVY	PVY - F	GGCATACGGACATAGGAGAACT	447
	PVY - R	CTCTTTGTGTTCTCCTCTTGTGT	
PLRV	PLRV - F	CGCGCTAACAGAGTTTCAGCC	336
	PLRV - R	GCAATGGGGGTCCAACTCAT	
PVA	PVA - F	GATGTCGATTTAGGTACTGCTG	273
	PVA - R	TCCATTCTCAATGCACCATAC	
注 1:F 代表每种病毒的上游引物。			
注 2:R 代表每种病毒的下游引物。			
^a PVS ^O 和 PVS ^A 株系。			
^b PVS ^{BB-AND} 株系。			

附录 D
(资料性附录)
检测结果判定图

D.1 单重 RT-PCR 检测体系建立

见图 D.1。

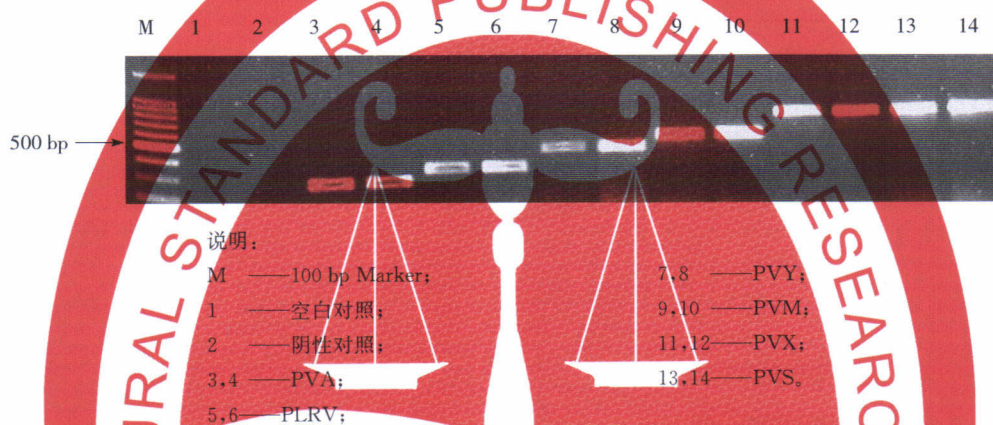


图 D.1 6 种病毒单重 RT-PCR 电泳图

D.2 PVY 和 PLRV 双重 RT-PCR 检测体系建立

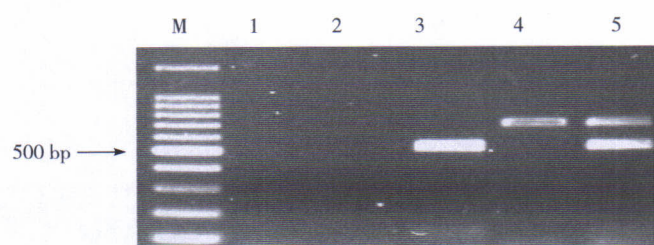
见图 D.2。



图 D.2 PVY 和 PLRV 双重 RT-PCR 检测体系建立

D.3 PVM 和 PVS 双重 RT-PCR 检测体系建立

见图 D.3。



说明:

M——100 bp Marker;

1 ——空白对照;

2 ——阴性对照;

3——PVM;

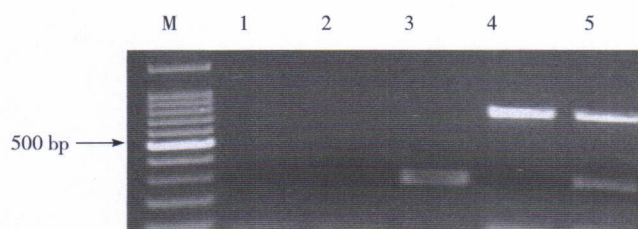
4——PVS;

5——PVM+PVS。

图 D. 3 PVM 和 PVS 双重 RT - PCR 检测体系建立

D. 4 PVA 和 PVX 双重 RT - PCR 检测体系建立

见图 D. 4。



说明:

M——100 bp Marker;

1 ——空白对照;

2 ——阴性对照;

3——PVA;

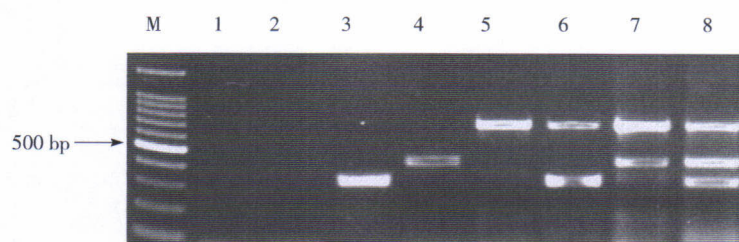
4——PVX;

5——PVA+ PVX。

图 D. 4 PVA 和 PVX 双重 RT - PCR 检测体系建立

D. 5 PVY、PLRV 和 PVS 三重 RT - PCR 检测体系建立

见图 D. 5。



说明:

M——100 bp Marker;

1 ——空白对照;

2 ——阴性对照;

3 ——PLRV;

4 ——PVY;

5——PVS;

6——PVS+PLRV;

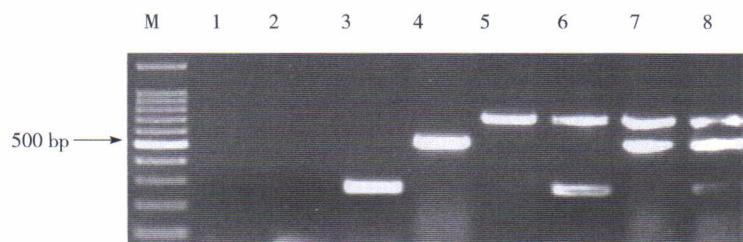
7——PVS+PVY;

8——PVS+PVY+PLRV。

图 D. 5 PVY、PLRV 和 PVS 三重 RT - PCR 检测体系建立

D.6 PVX、PVM 和 PVA 三重 RT-PCR 检测体系建立

见图 D.6。



说明：

M——100 bp Marker；

1 ——空白对照；

2 ——阴性对照；

3 ——PVA；

4 ——PVM；

5——PVX；

6——PVX+PVA；

7——PVX+PVM；

8——PVX+PVM+PVA。

图 D.6 PVX、PVM 和 PVA 三重 RT-PCR 检测体系建立