ICS 65.020.01
CCS B04

DB15

内 蒙 古 自 治 区 地 方 标 准

DB XX/ TXXXXX—XXXX

籽用西葫芦叶片病毒分子检测技术规程

Technical code of practice for RT-PCR detection of seed-used pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) leaf virus

征求意见稿

XXXX - XX - XX发布 XXXX - XX -

内蒙古自治区市场监督管理局 发 布

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。

本文件主要起草人： 王萍、刘杰才、陈贵华、苏利民、孙婧、尚鹏、许珂、李石恒、苏娜、董静、冯凯、钟鸣萧

籽用西葫芦叶片病毒分子检测技术规程

1 范围

本文件规定了籽用西葫芦叶片病毒 RT-PCR 检测技术中涉及的试剂与材料、仪器和设备、样品制备、病毒检测方法、结果分析与表达。

本文件适用于内蒙古地区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，CMV

黄瓜花叶病毒(CMV)属于雀麦花叶病毒科（*Bromoviridae*）黄瓜花叶病毒属（*Cucumovirus*），可以侵染 1000 多种植物。主要通过蚜虫以口针型非持久方式传播，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，WMV

西瓜花叶病毒（WMV）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，可侵染葫芦科、豆科、藜科等多种植物种类。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，ZYMV

小西葫芦黄化花叶病毒（ZYMV）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。可侵染葫芦科、苋科、豆科等 11 个属的植物。

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 琼脂糖。

4.2 核酸染料。

4.3 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。

4.4 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2)溶液(pH 8.0)：称取 186 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-Na_2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 ℃条件下灭菌 20 min。

4.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCI)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 ℃条件下灭菌 20 min。

4.6 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 ℃条件下灭菌 20 min。

4.7 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。

4.8 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 二甲基苯腈蓝，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℃下保存。

4.9 DNA 分子量标准：可以清楚区分 100bp～500bp 的 DNA 片段。

4.10 Premix Taq 酶。

4.11 CMV 病毒检测上游引物 CMV-F: 5’-TTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCG-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)。

4.12 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)。

4.13 ZYMV 病毒检测上游引物 ZYMV-F: 5’-ATGCAGAGGCACCATACAT-3’，下游引物 ZYMV-R: 5’-TACTGCATTGTGTTCACACC-3’。预期扩增目的片段大小为 283 bp(参见附录 A 中的 A.2)。

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

4.15 TRIzol 试剂。

4.16 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒。

4.17 PCR 产物回收试剂盒。

4.18 pMD18-T 载体。

4.19 大肠杆菌感受态细胞 DH5a。

5 仪器和设备

5.1 分析天平。

5.2 组织研磨仪。

5.3 PCR 扩增仪。

5.4 电泳槽、电泳仪等电泳装置。

5.5 Nanodrop 微量分光光度计。

5.6 凝胶成像系统或照相系统。

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ddH_2O作为模板进行PCR扩增的产物为空白对照。

7 样品采集

采集适量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及时进行检测分析。如需保存可置于-80℃冰箱中。样品应避免交叉污染。

8 样品病毒检测

8.1 RNA提取和纯度检测

8.1.1 每个对照和试样设置2次重复。

8.1.2 RNA提取：选取疑似感染病毒的籽用西葫芦叶片0.1 g，在液氮冷冻研磨至粉状后，置于灭菌2 mL离心管中，加入1 mL TRIzol试剂后混匀，提取籽用西葫芦叶片总RNA。

8.1.3 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。

8.1.4 RNA 质量检测：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 μL

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 2 μL RNA 与 4 μL 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。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。

8.2 反转录

8.2.1 每个对照和试样设置 2 次重复。

8.2.2 以总 RNA 为模板，进行反转录合成第一链 cDNA。在离心管中加入 1 μg RNA 模板，1 μL Anchored Oligo（dT）$_{18}$引物和 RNase-Free ddH_2O，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。

8.3 PCR扩增

8.3.1 每个对照和试样 PCR 扩增设置 2 次重复。

8.3.2 按表 1 依次加入反应试剂，混匀，分装到 PCR 管中。

表 1 PCR 扩增体系

试剂	体积
Premix Taq	25μL
cDNA	2μL
10μmol/L 上游引物	1μL
10μmol/L 下游引物	1μL
ddH_2O	补足 50μL

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

8.3.4 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。

8.3.5 反应结束后取出 PCR 管，对 PCR 扩增产物进行电泳检测。

8.4 琼脂糖凝胶电泳检测

8.4.1 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 μL 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 2 μL RNA 与 4 μL 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。电泳结束后，观察结果。

8.4.2 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。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段，按照 8.4.3 的规定执行。

8.4.3 PCR 产物用凝胶回收试剂盒纯化目的片段，并在 4 ℃连接至 pMD18-T 载体，转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5a，经红白斑筛选，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 结果分析与表述

9.1 CMV基因检测结果分析

9.1.1 判定条件：RT-PCR 特异性扩增产物在 345 bp 处有无条带（参见附录 B.2 ）

9.1.2 试样和阳性对照中扩增出 CMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未扩增出特异性条带，说明被检测样品感染 CMV 病毒。

9.1.3 试样和阴性对照中未扩增出 CMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 CMV 特异性条带，说明被检测样品感染 CMV 病毒。

9.1.4 阳性对照未扩增出 CMV 特异性条带，阴性对照和空白对照扩增出 CMV 特异性条带或条带不清楚，说明检测结果无效，需重新检测。

9.2 WMV 基因检测结果分析

9.2.1 判定条件：RT-PCR 产物在 485 bp 处有无条带（参见附录 B.2 ）

9.2.2 试样和阳性对照中扩增出 WMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未扩增出特异性条带，说明被检测样品感染 WMV 病毒。

9.2.3 试样和阴性对照中未扩增出 WMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 WMV 特异性条带，说明被检测样品未感染 WMV 病毒。

9.2.4 阳性对照未扩增出 WMV 特异性条带，阴性对照和空白对照扩增出 WMV 特异性条带或条带不清楚，说明检测结果无效，需重新检测。

9.3 ZYMV 基因检测结果分析

9.3.1 判定条件：RT-PCR 产物在 283 bp 处有无条带（参见附录图 B.2）

9.3.2 试样和阳性对照中扩增出 ZYMV 病毒特异性条带，阴性对照和空白对照未扩增出特异性条带。说明被检测样品感染 ZYMV 病毒。

9.3.3 试样和阴性对照种未扩增出 ZYMV 病毒特异性条带，阳性对照扩增出 ZYMV 特异性条带。说明被检测样品未感染 ZYMV 病毒。

9.3.4 阳性对照未扩增出ZYMV特异性条带，阴性对照和空白对照扩增出ZYMV特异性条带或条带不清楚，说明检测结果无效，需重新检测。

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 TTCGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCC
50 GAAATTTGATTCTACCGTGTGGGTGACGGTCCGTAAAGTTCCTGCCTCT
100 TCGGACCTGTCCGTCGCCGCCATCTCTGCTATGTTTGCGGACGGAGCCTC
150 ACCGGTACTGGTTTATCAGTATGCTGCATCCGGAGTCCAAGCCAACAATA
200 AATTGTTGTATGATCTTTCGGCGATGCGCGCTGATATTGGCGACATGCGA
250 AAGTACGCCGTTCTCGTGTATTCAAAAGACGATGCTCTCGAGGCGGATGA
300 GTTAGTACTTCATGTCGACATCGAGCACCAACGCATTCCCACGTCT

A.2 WMV 特异性片段序列

1 CCAGTGGCAAAGGTGATAAGCCACAAAACCTGCAAACTGGGCAGGGTAG
50 CAAGGAACCAACAAAAGCTGGCACAGTCAGCAAAGATGTGAACGTTGGAT
100 CAAAAGGAAAAGAAGTCCCACGACTACAGAAGATAACAAAGAAAATGAAC
150 CTTCCAACAGTTGGTGGGAAAATCATTCTCAGCTTAGACCATTTGCTCGA
200 ATACAAGCCTAATCAAGTTGATTTGTTTAACACTCGAGCAACAAAAACAC
250 AGTTTGAATCATGGTACAGCGCAGTTAAAGTTGAATATGATCTTAATGAT
300 GAGCAGATGGGTGTGATTATGAATGGTTTTATGGTTTGGTGCATCGATAA
350 TGGTACATCTCCAGATGTCAATGGAGTATGGGTGATGATGGATGGGGAAG
400 AGCAAGTTGAGTACCCACTAAAGCCAATTGTTGAAAATGCAAAGCCAACT
450 TTGAGACAAATCATGCATCATTTCTCAGACGCAGCA

A.3 ZYMV 特异性片段序列

1 ATGCAGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTTGCTTCGAAATCTACG
50 GGATAGGAGTTTGGCTCGATACGCTTTCGACTTCTACGAAGTCAACTCT
99 AAAACTCCTGAAAGAGCCCGCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCA
147 GCTCTTAGCAATGTTTCTTCAAGGTTGTTTGGCCTTGATGGAAATGTTGC
197 CACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTGCACGTGATGTTAATAGA
245 AACATGCACACCTTGTTAGGTGTGAACACAATGCAGTA

注 1：序列方向为 5’-3’。

注 2：5’下划线为 PCR 方法上游引物序列，3’下划线为 PCR 方法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。

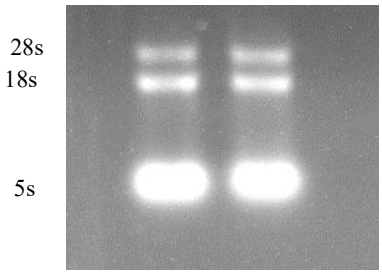
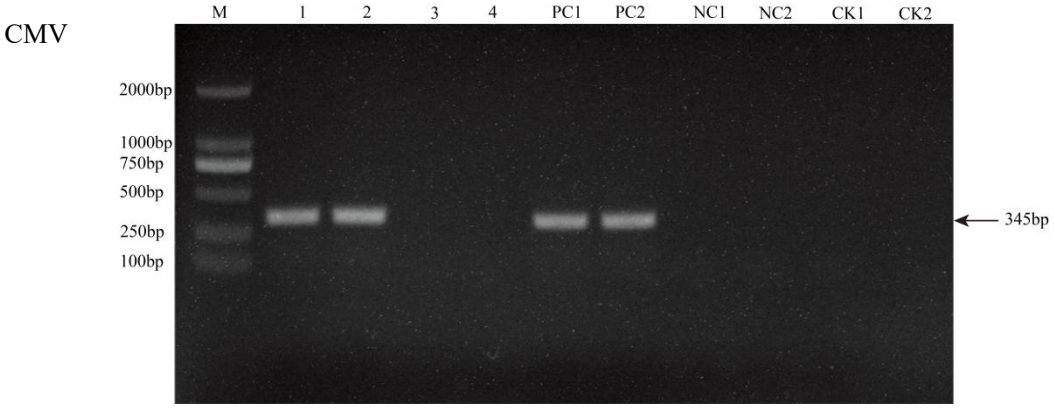
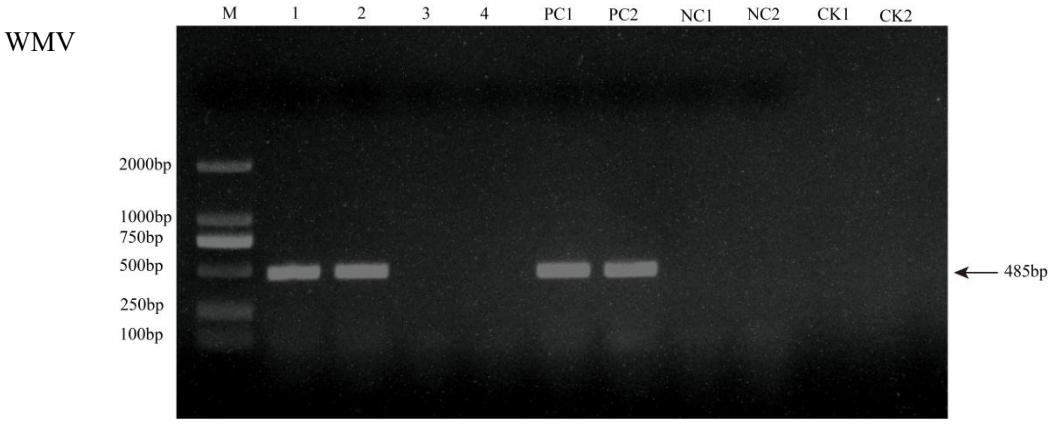
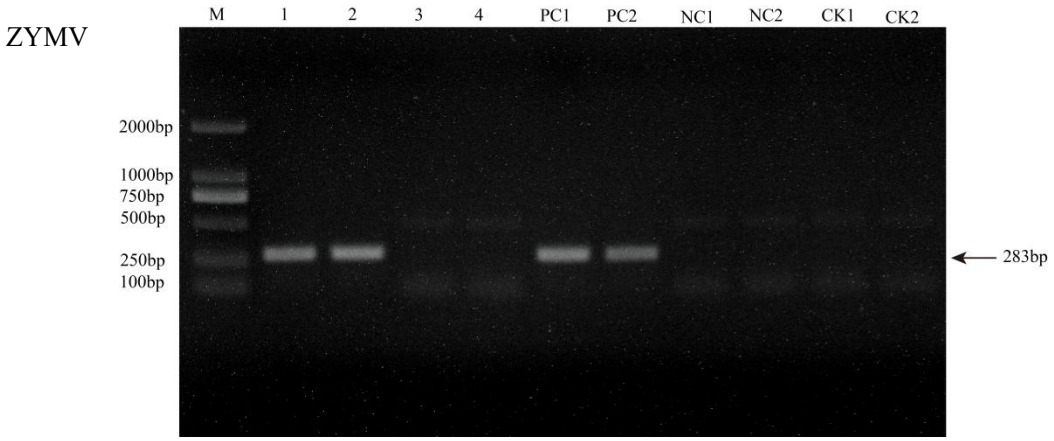


图 B.1　籽用美洲南瓜叶片总 RNA 电泳图

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 Marker

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