

ICS 65.020.01

B 05

# DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T 2341—2014

---

## 马铃薯种薯（种苗）病毒多重 RT-PCR 检测 技术规程

2014 - 07 - 05 发布

2014 - 09 - 05 实施

---

辽宁省质量技术监督局 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由沈阳市农业科学院提出。

本标准由沈阳市质量技术监督局归口。

本标准起草单位：沈阳市农业科学院、辽宁省农业科学院、铁岭市农产品质量安全检验检测中心。

本标准主要起草人：杨双、潘菊、左丽君、岳玲、王辉、李金凤、马东梅、刘延斌、孙嘉兴、李雪。

# 马铃薯种薯（种苗）病毒多重 RT-PCR 检测技术规程

## 1 范围

本标准规定了马铃薯种薯（种苗）的总RNA提取、多重RT-PCR扩增、电泳检测及结果判定的方法和操作规程。

本标准适用于马铃薯Y病毒、马铃薯A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，仅所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 18133-2012 马铃薯种薯

GB/T 29377-2012 马铃薯脱毒种薯级别与检验规程

## 3 术语和定义

下列术语及定义适用于本标准。

### 3.1

**马铃薯Y病毒**（potato virus Y, PVY）

马铃薯Y病毒(Potato virus Y, 简称PVY)，在马铃薯上引起严重花叶或坏死斑和坏死条斑。PVY是马铃薯Y病毒属(Potyvirus)的主要成员，病毒粒体线形，长730nm，该病毒寄主范围较广，可侵染茄科多种植物。病毒基因组为9.7Kb的单链正义RNA，基因组5'端共价结合基因组连接蛋白（VPg），3'端含有P10y A尾巴，该基因组为一个长的开放读码框（ORF），可翻译成一个多聚蛋白，随后切割产生8-10个产物。

### 3.2

**马铃薯A病毒**（potato virus A, PVA）

马铃薯A病毒(Potato virus A, 简称PVA)，在马铃薯上引起轻花叶或不显症。PVA是马铃薯Y病毒属(Potyvirus)成员，病毒粒体线形，长730nm，其寄主范围较窄，仅侵染茄科少数植物。病毒基因组为近1Kb的单链正义RNA，基因组5'端共价结合基因组连接蛋白（VPg），3'端含有P10y A尾巴，该基因组包含一个开放读码框（ORF），可翻译成一个多聚蛋白，随后切割产生11个产物。

### 3.3

**DEPC水**（DEPC-Treated Water）

DEPC是焦碳酸二乙酯,分子式为 $C_6H_{10}O_5$ , 分子量为162.14, 通过和RNA酶的活性基团组氨酸的咪唑环结合使蛋白质变性, 从而抑制酶的活性, 常用于生物实验中RNA的提取等。DEPC水指经过是指用DEPC处理过并经高温高压消毒的纯水。

### 3.4

#### 反转录-聚合酶链式反应 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

一种在体外利用反转录酶将RNA反转录为cDNA, 再以cDNA为模板进行PCR反应, 实现扩增RNA上特异片段的技术。

### 3.5

#### cDNA

互补DNA, 指与单链RNA互补的DNA, 此为单链cDNA分子, 或以此单链DNA为模板合成另一条与其互补的单链DNA, 两条互补的单链DNA分子组成一个双链cDNA分子。

## 4 原理

本标准涉及的马铃薯Y病毒 (PVY) 和马铃薯A病毒 (PVA) 属于单链正义RNA病毒, 在宿主内以RNA形式存在, 通过提取待测植物组织总RNA, 利用2对引物的多重RT-PCR方法扩增2种病毒的特异序列, 通过琼脂糖电泳检测目标条带的有无, 确定是否感染相应病毒。

## 5 仪器设备及试剂

### 5.1 仪器设备

PCR仪; 水平电泳槽; 电泳仪; 万分之一电子天平; 微量加样器; 恒温水浴锅; 磁力搅拌器; 高速冷冻离心机; 紫外-可见成像系统; 高压灭菌锅; pH计等。

### 5.2 试剂

乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- $Na_2$ ); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris); 硼酸; 盐酸 (HCl, 36%); 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB); 氯化钠 (NaCl); 氯化锂溶液 (LiCl, 10 mol/L, RNase-free); 氢氧化钠 (NaOH);  $\beta$ -巯基乙醇; 无水乙醇; M-MLV Reverse Transcriptase (200 units/ $\mu$ L); Oligo (dT)<sub>15</sub> (10  $\mu$ mol/L); (dN)<sub>9</sub> (10  $\mu$ mol/ $\mu$ L); dNTPs (10 mmol/L); RNase inhibitor (40 units/ $\mu$ L); 二硫苏糖醇 (100 mM); 2 $\times$ Taq PCR Mix (with Dye); 引物; DEPC水; 琼脂糖; Gold View染料等。

### 5.3 溶液配制

相关溶液配制方法见附录A。

## 6 方法步骤

### 6.1 抽样

按照GB/T 29377-2012的规定进行抽样。

## 6.2 总 RNA 提取

### 6.2.1 组织裂解

将少量样品（植物叶片、块茎芽眼或者脱毒种苗茎叶）在液氮中迅速研碎，取约0.05 g加入盛有500  $\mu\text{L}$  CTAB提取RNA缓冲液的2 mL离心管中，振荡混匀后于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min。

### 6.2.2 去蛋白质

加入等体积氯仿/异戊醇（24: 1）抽提，4 $^{\circ}\text{C}$  10,000 rpm离心5 min后，将上清液转移至1.5 mL离心管。

### 6.2.3 沉淀 RNA

加入总体积1/4的10 mol/L LiCl，- 20 $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h后，4 $^{\circ}\text{C}$  10,000 rpm离心10 min，弃上清。

### 6.2.4 去多糖、盐等杂质

用DEPC水溶解沉淀，加入总体积1/10的3 mol/L NaAC（pH 5.2）混匀，再加入2倍体积无水乙醇，- 20 $^{\circ}\text{C}$ 放置20 min，4 $^{\circ}\text{C}$  10,000 rpm离心10 min，弃上清。70%乙醇洗涤沉淀2次，放置超净工作台上吹干，加入50  $\mu\text{L}$  DEPC水溶解。

## 6.3 多重 RT-PCR 扩增

### 6.3.1 cDNA 合成

20  $\mu\text{L}$  体系：DEPC水6.5  $\mu\text{L}$ ，Oligod (T)<sub>15</sub> (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ；(dN)<sub>9</sub> (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ；dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ ；提取的RNA 1  $\mu\text{L}$ ，置于65 $^{\circ}\text{C}$  5min，立刻冰浴3 min，再加入5 $\times$ M-MLV Buffer 4  $\mu\text{L}$ ，RNase inhibitor (40 units/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ；二硫苏糖醇 (100 mM) 2  $\mu\text{L}$ ；M-MLV Reverse Transcriptase (200 units/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$  2h，94 $^{\circ}\text{C}$  5 min，立刻置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 6.3.2 PCR 扩增

#### 6.3.2.1 反应体系

总体积 10  $\mu\text{L}$ ，包括 5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Taq PCR Mix (with Dye)、1  $\mu\text{L}$  PVY F引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  PVY R引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  PVA F引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  PVA R引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  cDNA，混匀。引物序列见附录 B。

#### 6.3.2.2 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45s，循环 35次；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 6.4 电泳检测

### 6.4.1 凝胶制作

称取0.48g琼脂糖倒入150ml三角瓶中，加入30ml 1 $\times$ TBE缓冲液，在微波炉中加热溶解后，再加入3  $\mu\text{L}$  Goldview生物染料，倒入调平并安放适当梳齿的制胶板上，冷凝后小心拔出梳齿。

### 6.4.2 电泳

每个加样孔加入5  $\mu$ L PCR产物。100 V恒压电泳至指示带到达胶板的2/3处。

#### 6.4.3 观察

电泳结束后，取出凝胶置于紫外成像系统，拍照。

#### 6.5 结果判定

观察PCR产物的有无和片段大小，与阳性对照、阴性对照比较。如果检测样品与阳性对照相同具有目标条带，判定样品感染相应病毒；如果检测样品与阴性对照相同无目标条带，判定样品没有感染相应病毒。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

A.1 CTAB提取RNA缓冲液

包含 2% CTAB(W/V), 25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2.0 mol/L NaCl, 灭菌后加入 2% (V/V)  $\beta$ -巯基乙醇。

A.2 引物稀释

按照引物合成单的说明先配制100  $\mu$  mol/L的储存液,取适量储存液稀释10倍,配制浓度为10mmol/L的使用液。

A.3 10 倍电泳缓冲液

Tris 108g, 硼酸55g, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 溶液37 mL, 定容至1000 mL。

附 录 B  
(规范性附录)  
引物序列

序号	引物名称	序列	目标条带大小 (bp)
1	PVY Primer	F:ACGTCCAAAATGAGAATGCC R:TGGTGTTCCGGTGATGTGACCT	480
2	PVA Primer	F:GTTGGAGAATTCAAGATCCTGG R:TTTCTCTGCCACCTCATCG	255

---