

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4178—2015

南瓜花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Squash mosaic virus

2015-02-09 发布

2015-09-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 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。本文件的发布结构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、武汉哇哇噻纳技术开发有限公司。

本标准主要起草人：廖富荣、黄迎波、林石明、梁新苗、吴媛、陈青、邓丛良、赵晓丽、聂棱、陈红运。

南瓜花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了南瓜花叶病毒血清学、分子生物学的检测和鉴定方法。
本标准适用于植物上南瓜花叶病毒的检测与鉴定。

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。

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 南瓜花叶病毒基本信息

中文名称:南瓜花叶病毒

英文名称:Squash mosaic virus

缩写:SqMV

分类地位:小 RNA 病毒目(Picornavirales)、伴生豇豆病毒科(Secoviridae)、豇豆花叶病毒亚科(Comovirinae)、豇豆花叶病毒属(*Comovirus*)成员。

传播方式:种子传播、昆虫介体传播和机械传播。

SqMV 的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

南瓜花叶病毒血清学、分子生物学特征是制定本标准的主要依据。

5 仪器设备与试剂

5.1 主要仪器设备与用具

本标准主要涉及到的仪器设备和用具为:植物汁液提取仪、研磨仪、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、水浴槽或恒温孵育器、pH 计、各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L)。

5.2 主要试剂与配制

血清学试剂及其缓冲液配制见附录 B,分子生物学试剂及其缓冲液配制见附录 C 和附录 D。

6 检测与鉴定

6.1 抽样检查

按照 SN/T 2122、SN/T 1809 给出的方法进行抽样、取样。

6.2 隔离种植

对于种子样品,一方面,可用种子直接检测(如取 6 g 的种子,研磨粉碎后检测);另一方面,可先隔离种植后用苗进行检测。

隔离种植:在温室或植物生长箱等隔离条件下播种,至 2 片~3 片叶后观察。对于疑似病毒症状的植株,用以下方法(如 DAS-ELISA、RT-PCR 等)进行检测;对于未表现症状的植株,取约 10 株为一混合样品,用 DAS-ELISA 方法检测。

6.3 血清学检测

6.3.1 DAS-ELISA 检测

按附录 B 给出的方法,进行 DAS-ELISA 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,样品提取缓冲液作空白对照。

6.3.2 免疫层析检测

按试剂操作说明,进行免疫层析检测。

6.4 分子生物学检测

6.4.1 RT-PCR 检测

按附录 C 给出的方法,进行 RT-PCR 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,并设置空白对照。

6.4.2 IC-RT-PCR 检测

按附录 D 给出的方法,进行 IC-RT-PCR 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,并设置空白对照。

6.4.3 序列测定与分析

RT-PCR 或 IC-RT-PCR 检测阳性的样品,可进一步进行序列测定分析。把测定的序列与已知序列进行比对,以确定是否为 SqMV 序列。

注:根据国际病毒分类委员会(ICTV)第九次分类报告中伴生豇豆病毒科(Secoviridae)病毒种类的分类标准,其中关于基因组序列的判定依据为:CP 的氨基酸序列一致性小于 75%。

7 结果判定

7.1 当血清学检测(DAS-ELISA 或免疫层析)和分子生物学检测(RT-PCR 或 IC-RT-PCR)结果均为阳性时,则判定为检出 SqMV。

7.2 当分子生物学检测(RT-PCR 或 IC-RT-PCR)结果均为阳性、测定的序列为 SqMV 序列时,则判定

为检出 SqMV。

8 结果记录

记录各项实验数据,包括样品种类、来源,检测时间、地点、方法和结果等。血清学检测结果保存吸光值的数据,分子生物学检测结果保存电泳照片,免疫层析检测结果保存照片。

9 样品保存

阳性的样品应妥善保存在低温或超低温冰箱中,并做好登记和标识,以备复核。

附 录 A
(资料性附录)
南瓜花叶病毒相关信息

A.1 同物异名

squash mosaic comovirus
muskmelon mosaic comovirus
cucurbit ring mosaic virus
muskmelon necrotic mosaic virus
pumpkin mosaic virus
watermelon stunt virus

A.2 分布

由于种子传播在栽培的葫芦科作物中非常普遍,很可能在葫芦科作物的生长区域均有分布。以下列出了目前已报道的主要国家或地区:

- 欧洲:希腊、意大利、荷兰;
- 亚洲:孟加拉国、中国、印度、伊朗、以色列、日本、约旦、哈萨克斯坦、黎巴嫩、菲律宾、也门;
- 非洲:埃及、摩洛哥;
- 中美洲与加勒比海:洪都拉斯、牙买加、蒙特塞拉特岛;
- 北美洲:加拿大、墨西哥、美国;
- 南美洲:阿根廷、巴西、委内瑞拉;
- 大洋洲:新西兰。

A.3 寄主范围

A.3.1 自然寄主

主要侵染葫芦科(Cucurbitaceae)作物,如西瓜(*Citrullus lanatus*)、甜瓜(*Cucumis melon*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*),以及藜属(*Chenopodium*)的灰菜(*C. album*)。

A.3.2 诊断寄主

诊断寄主上的症状:

- 甜瓜(*Cucumis melon*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*):系统花叶、常有环斑、叶畸型。
- 角瓜(*Cucumis metuliferus*):局部褪绿斑。

不能侵染的寄主种类:苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、普通烟(*N. tabacum* cvs Turkish, Havana)。

A.4 形态特征

等轴多面体病毒,正二十面体,直径 28 nm~30 nm。

A.5 基因组

基因组分段、正单链 RNA 片段分布在 2 个粒体中。基因组的 5'-末端含有基因组链接蛋白(VPg), 3'-末端含有 poly(A)尾。RNA-1 全长 5 867 nts[不含 poly(A)序列](EU421059),含有一个大的开放阅读框,编码一个 1 858 个氨基酸的 209.4 kDa 聚合蛋白,被剪切成 5 个推断的蛋白。RNA-2 全长 3 395 nts [不含 poly(A)序列](EU421060),且 RNA1 和 RNA2 的 5'-末端序列高度一致,含有一个开放阅读框,编码一个聚合蛋白,被剪切成运动蛋白、大外壳蛋白和小外壳蛋白。

A.6 病毒的血清型

根据血清学反应,SqMV 曾被分为两种血清型。血清组 I 在罗马甜瓜上引起严重的症状、而在南瓜上多数为轻型的症状。血清组 I 的一些成员侵染西瓜,而血清组 II 则不侵染西瓜。另外,不同血清型的 SqMV 其种子传播的特性有所不同。血清组 I (SqMV-I) 株系通过甜瓜、南瓜、笋瓜和西瓜种子传播,而血清组 II (SqMV-II) 通过南瓜种子传播,引起南瓜和笋瓜严重症状,但在甜瓜上产生轻型症状。

A.7 传播途径

A.7.1 种子传播

SqMV 血清组 I (SqMV-I) 株系通过甜瓜、南瓜、笋瓜和西瓜种子传播,血清组 II (SqMV-II) 通过南瓜种子传播。种子传播率通常为 0.1%~10%,商业性和试验种子产生大约 10% 的被感染幼苗。也有报道传播率达到 94%。来自摩洛哥的一些 SqMV 分离物可以通过昆诺阿藜(*C.quinoa*)和墙生藜(*C.murale*)种子传播,传播率为 20%~25%。

A.7.2 介体传播

至少可通过 14 种咀嚼式昆虫传播,大多数是属于叶甲科(Chrysomelidae)(*Acalymma* sp.、*Atrachya* sp.、*Aulacophora* sp.和 *Diabrotica* sp.),或者瓢虫科(Coccinellidae)(食植瓢虫属 *Epilachna* sp.)。在西半球,主要是西部黄瓜条叶甲(*Acalymma trivittata*)和黄瓜十一星叶星甲(*Diabrotica undecimpunctata*)。在地中海盆地,主要是黄瓜叶甲(*Epilachna chrysomelina*[*E.elaterii*])。另外,一种蝗虫(*Melanoplus differentialis*)也报道可以传播该病毒。

A.7.3 其他方式

机械传播。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测方法

B.1 ELISA 所采用的试剂及配制**B.1.1 包被缓冲液(pH 9.6)**

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.20 g

加入 900 mL 水溶解,用 HCl 调节 pH 到 9.6,然后加水至 1 L。保存在 4 °C 中。

注:叠氮化钠、(NaN_3)为高毒类化学药品,使用时必须采取必要的防护措施。若没有配备必要的防护措施,可不添加。下同。

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

加入 900 mL 水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 7.4,然后加水至 1 L。

B.1.3 洗涤缓冲液(PBST)

1 L 的 PBS 中加入 0.5 mL 的 Tween 20。

B.1.4 样品提取缓冲液(pH 7.4)

1 L 的 PBST 中加入 20 g 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

B.1.5 酶标抗体稀释缓冲液

1 L 的 PBST 加入 20 g 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 2.0 g 的牛血清白蛋白(BSA)。

B.1.6 底物缓冲液

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
二乙醇胺	97 mL
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

用 800 mL 纯水溶解,并用 HCl 调整 pH 至 9.8,然后加 H_2O 到 1 L。

注:缓冲液可以储存在 4 °C~10 °C 中至少 2 个月,使用前回温至室温。

B.1.7 底物溶液(需现配现用)

4-硝基苯磷酸二钠(pNPP)	10 mg
底物缓冲液	10 mL

配制前,先把底物缓冲液回温至室温。在 10 mL 的底物缓冲液中加入 10 mg 的 pNPP 粉末(或 5 mg/片的片剂 2 片),溶解,即配制成 1 mg/mL 的底物溶液。

注:溶液体积根据需要配制。可按照每条(8 孔)需要 1 mL,而一整板需要 10 mL 进行配制。

B.1.8 抗体

SqMV 抗体、碱性磷酸酯酶标记的 SqMV 抗体。

B.2 操作步骤

B.2.1 检测样品的制备

叶片样品:按 1 : 10 的比例(质量体积比)在检测样品中加入样品提取缓冲液,研磨成匀浆后(如果症状样品,则取显示症状的叶片;如果未显示症状,则取 10 株叶片进行混合检测),离心,上清液作为检测样品。

种子样品:种子用研磨仪研磨后(如取 6 g 的种子),按 1 : 5 的比例(质量体积比)在粉末中加入样品提取缓冲液(如在 0.6 g 的粉末中加入 3 mL 样品提取缓冲液),混匀,离心,上清液作为检测样品。

B.2.2 包被抗体

根据检测试剂说明,用包被缓冲液按比例稀释 SqMV 抗体(如 1 : 200)。

注:根据需要估算配制溶液体积,即:每条(8 孔)需要 1 mL,而一整板需要 10 mL。下同。

在 96 孔微孔板中每孔加入 100 μ L 包被抗体溶液。

在室温下孵育 2 h~4 h 或在 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。

B.2.3 加入检测样品

倒去孔中的抗体包被溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。

加入 100 μ L 检测样品提取液到酶标板的孔中,每个样品至少 2 个孔。并设置阳性、空白和阴性对照。

在室温下孵育 2 h 或在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。

B.2.4 加入酶标抗体

在孵育完成前,根据试剂盒说明,用酶标抗体缓冲液稀释相应的酶标抗体(如 1 : 200)。

倒去孔中的检测样品提取液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。

每孔加入 100 μ L 酶标抗体溶液。

在室温下孵育 2 h。

B.2.5 加入底物

根据需要配制 1 mg/mL 的底物溶液(现配现用)。

注:在准备底物溶液的过程中,不要接触药剂或暴露在强光中,以避免在阴性对照孔中出现背景颜色。

倒去酶标抗体溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。

每孔加入 100 μ L 新鲜配制的底物溶液。

B.2.6 吸光值测定

室温下避光放置(30 min~60 min),至阳性对照孔明显显色。用酶标仪在 405 nm 处读取吸光值。

B.3 结果判定

B.3.1 对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:

- 缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值 <0.15 ,当阴性对照孔的 OD_{405} 值 <0.05 时,按 0.05 计算;
- 阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 >5 ;
- 同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判断如下:

- 样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 >2 ,判为阳性;
- 样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值接近阈值,判为可疑样品,需重新做一次;
- 样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 <2 ,判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判断。

B.3.4 如果是采用检测试剂盒,则根据试剂盒的说明来判定。

附 录 C

(规范性附录)

RT-PCR 检测方法

C.1 主要试剂与配制

C.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的去离子水。

C.1.2 RT-PCR 试剂

5×RT 缓冲液、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

C.1.3 研磨缓冲液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3.58 g
KH_2PO_4	0.27 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
BSA	2.0 g

称取上述试剂,溶于 800 mL 的去离子水中,溶解,调节 pH 为 7.5,补足体积至 1 000 mL。

C.1.4 10×TBE 缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱	108 g
硼酸	55 g
Na_4EDTA	9.3 g
加去离子水溶解,定容到 1 L。	

C.1.5 电泳试剂

琼脂糖、0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液、10×TBE 缓冲液。

C.1.6 引物序列与合成

本标准采用的特异引物是根据 SqMV RNA2 基因组序列设计合成,扩增部分的小外壳蛋白(small capsid protein,SCP)基因序列,预计长度为 597 bp(见表 C.1)、(廖富荣等,2013)。

注:也可以采用其他特异性 RT-PCR 方法进行检测(文朝慧,2010)。

表 C.1 引物序列及其位置

引物名称	引物序列	基因名称	位置(NC_003800) ^a
SqM1	5'-CATGGTACAGCAGCTTGAAC-3'	SCP	2681-2701
SqM2	5'-GAAGCCACAACAAAACCCAGA-3'	3'-NTR	3257-3277

^a GenBank 上的基因序列登录号。

C.2 总 RNA 的提取

C.2.1 TRIzol 试剂方法

采用 TRIzol 试剂方法提取病叶总 RNA,具体操作如下:

- 取 0.05 g~0.1 g 的病叶放入研钵中,加入 1 mL 的 TRIzol 试剂充分研磨,15 °C~30 °C 下静置 5 min。
- 在 2 °C~8 °C 下 $12\,000\times g$ 离心 10 min;把上清液转移到一新管中,并加入 0.2 mL 三氯甲烷,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,15 °C~30 °C 放置 3 min。
- 4 °C $12\,000\times g$ 离心 15 min,取上层无色水相(约 600 μL)转移到新管中。
- 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,15 °C~30 °C 静置 10 min。
- 2 °C~8 °C 下 $12\,000\times g$ 离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀。
- 2 °C~8 °C 下 $7\,500\times g$ 离心 3 min,弃尽上清液。
- 室温放置晾干,待乙醇挥发完毕,加入 100 μL DEPC 处理的去离子水,充分溶解 RNA,置于 -20 °C 保存备用。

注:在能够保证总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

C.2.2 纳米磁珠(MNP)法

具体操作如下:

- 称取约 0.1 mg 叶片,放入研钵,加入 1 mL 研磨缓冲液(C.1.3),充分研磨,使样品呈汁状;
- 转移到 1.5 mL 的离心管中,4 °C, $8\,000\times g$ 离心 3 min;
- 取 50 μL 纳米磁珠到 1.5 mL 的离心管中,置于磁性分离架上,吸附纳米磁珠,弃除上清;
- 向装有纳米磁珠的离心管中加入 150 μL 清洗缓冲液(0.05%DEPC 处理的 PBS 缓冲液),置于磁性分离架上,吸附纳米磁珠,弃除上清;
- 重复操作两次;
- 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,15 °C~30 °C 静置 10 min;
- 取研磨离心好的上清液至装有清洗好的纳米磁珠的离心管中,用移液枪吸吐混匀,室温下结合 1 min,期间颠倒混匀 2 次~4 次;
- 将离心管置于磁性分离架上,吸附纳米磁珠,弃除上清;
- 向离心管中加入 150 μL 清洗缓冲液,置于磁性分离架上,吸附纳米磁珠,弃除上清;
- 向离心管中加入 50 μL 核酸释放液(DEPC 处理的去离子水),重新悬浮纳米磁珠;
- 离心管于 95 °C,加热 5 min,使病毒粒子裂解,释放病毒 RNA;加热完毕后立即将离心管置于冰上;
- 用磁性分离架吸附纳米磁珠,将含有病毒 RNA 的上清液转移至新的无 RNase 的 1.5 mL 离心管中,-80 °C 冰箱保存备用。

C.3 cDNA 合成

利用反转录酶合成 cDNA,即在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 3'端引物(10 $\mu\text{mol/L}$),于 95 °C 的水浴中处理 7 min,然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5 \times 反转录缓冲液 2.5 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MLV 反转录酶 0.5 μL 、核糖核酸酶抑制剂 0.5 μL 、DEPC 处理的去离子水 4.5 μL 。然后 37 °C 水浴处理 1 h,95 °C 水浴 10 min,自然冷却至室温,即合成的 cDNA,作为后续 PCR 的模板。

C.4 PCR 扩增

在 25 μL 体系中加入 2 μL 上述合成的 cDNA 模板,进行 PCR 扩增。即 10 \times PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})2.5 μL 、dNTP 混合物 0.5 μL (每种各 10 mmol/L)、*Taq* 聚合酶 0.5 μL (2.5 U/ μL)、SqM1 引物 2.0 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、SqM2 引物 2.0 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、cDNA 模板 2 μL ,用 DEPC 处理的去离子水补足至 25 μL 。

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后延伸 7 min。

C.5 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 0.5 \times TBE 缓冲液的 1.5% 琼脂糖凝胶孔中,然后在一定电压下(如 120 V)电泳。电泳结束后,放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

C.6 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照产生预期大小条带(约 597 bp)情况下:

——如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;

注:如有必要,可进一步测序验证。

——如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
IC-RT-PCR 检测方法

D.1 包被抗体

按一定比例稀释 SqMV 包被抗体(如 1 : 100 稀释),然后把 50 μL 的包被抗体溶液加到 0.5 mL 的离心管中,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h~3 h 或在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。

倒掉包被抗体溶液,用 PBST(见 B.1.3)洗涤 3 次~5 次,去掉残留液体。

D.2 检测样品的制备

叶片样品:按 1 : 10 的比例(质量体积比),在检测样品中加入样品提取缓冲液,研磨成匀浆后,离心,上清液作为检测样品。

种子样品:用研磨仪研磨后,按 1 : 5 的比例(质量体积比)在粉末中加入样品提取缓冲液(如在 0.6 g 的粉末中加入 3 mL 样品提取缓冲液),混匀,离心,上清液作为检测样品。

D.3 加入检测样品

取 50 μL 样品上清液加入到已包被抗体的离心管中,25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h~2 h。倒掉样品上清液,用 PBST 洗涤 3 次~5 次。

D.4 cDNA 合成

每管中加入 37.5 μL DEPC 处理的去离子水,1 μL 的 3'端引物 SqM2(见表 C.1),97 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 7 min,马上转移到冰上放置 5 min;然后继续加入 5 \times 反转录缓冲液 10 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MuLV 反转录酶 0.5 μL 、核糖核酸酶抑制剂 0.5 μL 。然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,自然冷却至室温,即合成的 cDNA,作为后续 PCR 的模板。

D.5 PCR 扩增

在 25 μL 体系中加入 2.5 μL 的 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、dNTP 0.5 μL (每种各 10 mmol/L)、Taq 聚合酶 0.5 μL (2.5 U/ μL)、SqM1 引物 2 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、SqM2 引物 2 μL (5 $\mu\text{mol/L}$)、cDNA 模板 17.5 μL 。

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环,最后延伸 7 min。

D.6 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 0.5 \times TBE 缓冲液的 1.5% 琼脂糖凝胶孔中,然后在 120 V 下电泳。电泳结束后,放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像

系统中观察,拍照,并保存照片。

D.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照产生预期大小条带(约 597 bp)情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

参 考 文 献

- [1] King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses; Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. San Diego: Academic Press, 2012.
- [2] 文朝慧. 利用 RT-PCR 方法检测甜瓜种子中南瓜花叶病毒[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 130-133.
- [3] CAB International. 2005. Crop Protection Compendium, 2005 Edition. Wallingford, UK: CAB International.
- [4] 廖富荣, 叶志红, 陈青, 吴媛, 陈红运, 林石明. 应用 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 方法检测南瓜花叶病毒[J]. 植物检疫, 2013, 27(2): 60-64.
-