

# 湖南省农业技术规程

HNZ087-2015

---

## 柑橘(类似)病毒病分子检测技术规程

Technical regulations for molecular detection of citrus

virus and viroid

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2015年12月31日

# 柑橘(类似)病毒病分子检测技术规程

为了规范柑橘（类似）病毒病分子检测操作技术，制定本规程。

## 1 实验室条件

具备柑橘（类似）病毒病分子生物学检测所需的实验场所、仪器和实验管理条件。

## 2 技术人员资质要求

从事分子生物学检测的人员应具备仪器操作和分子技术操作的能力，能力应根据相应的专业教育、培训、经验和（或）可证明的技能进行资格确认。

## 3 检测对象

为我国发生的柑橘（类似）病毒病害，包括柑橘衰退病、柑橘碎叶病、柑橘黄龙病、柑橘裂皮病、温州蜜柑萎缩病。每种病毒病单独检测。

## 4 检测样品要求

采集树体四个方向上当年抽生的枝条。对于枝条少的树体，至少采集 3 片带有叶柄的完全展开叶片。样品运输过程中，需要进行保湿处理（如用打湿的吸水纸包裹枝条或叶片的切口处）。样品到达实验室后，经保湿处理后贮藏在 4℃ 低温环境，并按照附件 1 登记样品信息。样品在采集后三天内完成后续的样品制备工作。

## 5 样品制备

去除叶片，枝条用 75% 酒精棉擦拭，再用吸水纸吸干。枝条清洗干净后，将剥取的韧皮部切成 1cm 小段。对于叶片样品，去除叶柄，同样经酒精擦拭、吸水纸吸干后，再切成小块。混合同一树体的枝条（或者叶片）样品，取混合样直接进行核酸提取，或者装入自封袋内，立即放于液氮中冷冻，保存于 -80℃ 冰箱。

## 6 核酸提取

对于柑橘衰退病、柑橘碎叶病、柑橘裂皮病和温州蜜柑萎缩病的检测，提取组织的总 RNA；对于柑橘黄龙病的检测，提取组织的总 DNA。具体操作分别参考附件 2 和 3。每份样品的核酸物质分装一部分，放置于 -80℃ 冰箱中，以备复检。

## 7 反转录（Reverse Transcription）

用提取的 RNA 进行反转录，合成 cDNA。反转录的反应体系如下：dNTPs (1 mmol/L) 5 μL，5 × buffer 5 μL，RNasin (30U/μL) 0.5 μL，下游引物 (10 μmol/μL) 0.5 μL（引物序列见附件 4），M-MLV 反转录酶 (200 U/μL) 0.5 μL，RNA 50 ng~5μg，最后加 DEPC 处理过的水至 25 μL。反应液在 42℃ 处理 1 h 后，再进行 95℃ 处理 10min 终止反应。反应在 PCR 仪上进行。

## 8 聚合酶链式反应（PCR）

以反转录合成的 cDNA 或 DNA 为模板，用相应的引物（引物见附件 4）对其进行 PCR 扩增。反应体系为：10 × PCR Buffer 2 μL，dNTPs (1 mmol/L) 5 μL，上游引物 (10 μmol/μL) 0.5 μL，下游引物 (10 μmol/μL) 0.5 μL，核酸模板 0.1~1 μg，Taq DNA 聚合酶 (2 U/μL) 0.15

$\mu\text{L}$ ，最后加灭菌去离子水至  $20\ \mu\text{L}$ 。反应步骤为： $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ，之后  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $30\ \text{sec}$ ，退火（退火温度见附件 4） $15\ \text{sec}$ ， $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $60\ \text{sec}$ ，35 个循环，最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\ \text{min}$ 。反应在 PCR 仪上进行。

## 9 凝胶电泳

PCR 反应完成后，取扩增产物，将 PCR 扩增产物与  $2\ \mu\text{L}$  上样缓冲液（ $10\times$ ）混合，加入到  $1.0\%$  琼脂糖凝胶（含有  $0.5\ \mu\text{g/ml}$  溴化乙锭）的点样孔内，同时设置标准分子量 DNA 作为片段大小标准，在  $1\times\text{TAE}$  的缓冲液中进行凝胶电泳，电泳电压  $120\ \text{V}$ ，电泳时间约  $30\ \text{min}$ 。将电泳后的琼脂糖凝胶放置于凝胶成像系统内，打开紫外灯，在凝胶成像系统控制软件上观察 PCR 扩增条带。

## 10 检测对照

在样品检测的 PCR 和凝胶电泳操作过程中，同时设置阳性对照和空白对照。阳性对照的 PCR 模板为从经过分子生物学检测和生物学检测确诊的病原样品中提取的核酸物质。空白对照的 PCR 模板为 PCR 反应所用的灭菌去离子水。

## 11 结果判定

根据凝胶电泳的结果进行判定：检测样品和阳性对照均出现目的片段大小的扩增条带（见附件 4），空白对照无目的片段扩增条带，该检测样品判为阳性，即该检测样品携带病原；阳性对照出现目的片段大小的扩增条带，检测样品和空白对照中均无目的片段扩增条带，该检测样品判为阴性，即该检测样品未检出病原。

## 12 检测材料废弃处理

经检测后的植物材料废弃物应进行高温消毒后再做垃圾处理。

## 13 技术术语

### 13.1 分子生物学检测

以 DNA 或 RNA 为诊断材料，通过 PCR 或 RT-PCR 技术分析基因的存在从而为病害诊断提供更直接、更科学的信息。

### 13.2 生物学鉴定

利用受（类似）病毒侵染能产生专化症状的指示植物进行（类似）病毒检测。

### 13.3 反转录

对于 RNA 病毒，以其 RNA 为模板，通过反转录酶合成 DNA 的过程。

### 13.4 聚合酶链式反应（PCR）

是用 Taq DNA 聚合酶合成、扩增病原物特异 DNA 片段的一种方法。

编写单位：湖南农业大学

编写人员：戴素明 邓子牛 李大志 李芳 陈岳文等

附件 1

样品检测跟踪档案

序号	样品信息					检测项目	样品编号	样品保存		样品检测		
	品种/ 砧木	来源地	采样 时间	送 样 人	联系 方式			收 样 人	收样 时间	检 测 人	检 测 时 间	检 测 结 果
1												
2												
...												

附件 2:

## RNA 提取操作步骤

(1) 取样品放入液氮遇冷的研钵，加入液氮后使用研磨棒将样品研磨至粉末状，再将 0.1g 粉末转入到 2 mL 的离心管中。

(2) 立即向离心管加入 Trizol 提取液 1 mL，迅速颠倒混匀，室温放置 5 min，使细胞完全裂解。

(3) 4 °C 12 000 rpm 离心 15 min。

(4) 加入 0.2 mL 氯仿，盖紧离心管盖，剧烈摇动 30 sec，室温放置 5 min，再 4 °C 12 000 rpm 离心 10 min。

(5) 上清液转入新离心管，重复步骤 (4)。

(6) 上清液转入新离心管，加入两倍体积的预冷异丙醇，轻轻混匀，-20°C 放置 1h，再 4 °C 12 000 rpm 离心 10 min。

(7) 倒掉上清液，加入 1 mL 的预冷的 75% 酒精漂洗，再 4 °C 7500 rpm 离心 5 min。离心完成后，倒掉废弃的酒精。漂洗步骤可重复 1 次。

(8) 漂洗后的沉淀经风干后，加入 50  $\mu$ L DEPC 处理过的水溶解，-20°C 保存备用。

(9) RNA 浓度和质量检测：用紫外分光光度计测定浓度。取 0.1  $\mu$ g RNA 样品进行电泳（琼脂糖凝胶浓度 0.8%，电压 90 V，电泳时间 30 min），根据凝胶成像结果观察 RNA 质量。

附件 3:

## DNA 提取操作步骤

(1) 取样品放入液氮遇冷的研钵，加入液氮后使用研磨棒将样品研磨至粉末状，再将 0.5 g 粉末转入到 10 mL 的离心管中。

(2) 加入 64 °C 预热的 CTAB 提取液 5 mL，充分混匀，置于 64 °C 水浴中保温 1 h，每隔 10 min 轻缓颠倒混匀一次，再 4 °C 12000 rpm 离心 15min。

(3) 上清液转入新离心管，加入等体积 Tris-平衡酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1)，轻缓颠倒混匀，室温静置 5min，再 4 °C 10000 rpm 离心 10 min。

(4) 上清液转入新离心管，加入等体积氯仿-异戊醇 (24: 1)，充分混匀，室温静置 5min，再 4 °C 10000 rpm 离心 10min。

(5) 上清液转入新离心管，加入 2 倍体积预冷异丙醇，混匀，-20 °C 静置 1h 以上，再 4 °C 10000 rpm 离心 10 min。

(6) 倒掉上清液，加入 1 mL 的 75% 酒精漂洗，再 4 °C 7500 rpm 离心 5 min。漂洗步骤可重复 2-3 次。

(7) 漂洗后的沉淀经风干后，加入 100  $\mu$ L 灭菌去离子水溶解。

(8) 加入 1 $\mu$ l RNase A (20 mg/ml)，充分混匀，37 °C 水浴 1 h，去除残留的 RNA。

(9) DNA 浓度和质量检测：用紫外分光光度计测定浓度。取 0.5  $\mu$ g DNA 样品进行电泳 (琼脂糖凝胶浓度 0.8%，电压 100 V，电泳时间 30 min)，根据凝胶成像结果观察 DNA 质量。

## 附件 4

柑橘（类似）病毒分子生物学检测的技术参数

病害	上游引物	下游引物	目的片段	退火温度
衰退病	GGACAAACTTTIITTTCTGTGAACCTTTC	GATGAAGTGGTGTTCACGGAGAACTC	612 bp	55℃
碎叶病	CCCTCTCAGCTAGAATTGAA	CAGGCATGTCAACCTGCAAG	800 bp	56℃
裂皮病	GGAGGAAGTCGAGGTC	AGGTTTCCCCGGGGATCCCT	370 bp	55℃
黄龙病	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	1160 bp	55℃
温州蜜柑 萎缩病	GGGAGATGATAGGAGCA	AGAGAGATTTCTACTCGCA	251 bp	58℃