

湖南省农业技术规程

HNZ118-2016

生姜脱毒及检测技术规程

Technical regulations for virus-free and detection of ginger

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2016年12月31日

生姜脱毒检测技术规程

为规范生姜脱毒及检测技术，制定本规程。

1 基本要求

1.1 实验室条件

具备生姜脱毒、组织培养、病毒检测所需的实验场所、仪器设备和实验条件。

1.2 实验人员要求

实验人员应具备生姜脱毒、组织培养及分子检测技术操作的能力，能力应根据相应的专业教育、培训、经验或可证明的技能进行资格确认。

2 种姜的选择与处理

2.1 种姜的选择

9-11月，在生姜叶片全部枯萎前，于种姜生产田上选取感染烟草花叶病毒（TMV）和黄瓜花叶病毒（CMV）症状较轻的生姜植株，挖取其种姜，所挖取的每块种姜单独为一个株系，并进行编号。

2.2 种姜的处理

在人工光照培养箱内（温度：40℃，湿度：70%，光照：0）催芽，约4-6周，待新芽（外植体）长至2cm-3cm时，备用。

3 培养基的配制

3.1 MS培养基的配制

3.1.1 母液的配制

按照附件1的成分表(100倍液)配制MS大量元素母液、微量元素母液、有机母液、铁盐母液。

3.1.2 MS培养基配制方法

先在烧杯中放入适量蒸馏水，置于电炉上加热；依次加入上述母液各10ml，蔗糖30g；溶解后加入琼脂粉5.5g左右，边加热边搅拌至完全溶解；加蒸馏水定容至1L；用0.1mol/L的盐酸或0.1mol/L的氢氧化钠调节pH至5.7-5.8；根据不同需要定量分装，盖好瓶盖，或用封口膜封口并扎绳；分装好的培养基置于0.8kg/cm²-1.1kg/cm²消毒锅120℃高压灭菌20min；为检验培养基灭菌效果，须放置5天未发现杂菌污染才能使用。培养基贮存时间不超过一个月。

3.2 初代培养基的配制

在MS培养基的基础上，加入激素NAA 0.5mg/L、6-BA 2.0mg/L和病毒唑40mg/L，其见操作同3.1.2。

3.3 增殖培养基的配制

在 MS 培养基的基础上，将蔗糖用量调整至 80g/L，不加任何激素，其它操作同 3.1.2。

4 茎尖接种

4.1 接种前准备

4.1.1 在接种前应准备酒精灯或电热灭菌器、酒精或新洁尔灭、无菌脱脂棉或纱布以及接种器械、培养基、接种用外植体等。

4.1.2 超净工作台提前 30min 开机通风，打开接种用电热灭菌器，同时开启操作间、更衣间及缓冲间的紫外灯，30min 后关掉紫外灯。

4.1.3 接种人员应在准备室消毒后在更衣室更换拖鞋、穿白大褂、戴上帽、口罩后方可进入接种室。

4.1.4 超净工作台消毒：用 75%酒精消毒仔细擦拭一遍。

4.1.5 操作人员洗手后，用 75%酒精喷或擦手，在操作台内自然吹干。

4.2 外植体的消毒灭菌

将备用的外植体用解剖刀切下，放入器皿中用洗衣粉等清洁剂冲洗 20 min，转入超净工作台进行操作，将芽段放入灭菌后的烧杯内，用 75%酒精清洗 30s，无菌水冲洗 1 次，0.1%HgCl 溶液浸泡 20 min，最后用无菌水冲洗 5-6 次。

4.3 茎尖剥离及接种

将完成消毒灭菌操作的生姜芽段放在无菌滤纸上吸干水分，在 30-40 倍解剖镜下用无菌的解剖刀、解剖针剥取带一个叶原基的茎尖（大小约 0.2mm-0.5mm），将生长点迅速按无菌操作程序接入初代培养基中，每个株系的芽点分别编号。

5 茎尖苗的初代培养

观察接入初代培养基的芽点，约 30 天左右，芽点转绿，60-80 天后成苗，待苗长至 2-3cm 时，整株取出接入增殖培养基中进行增殖培养。

6 茎尖苗的增殖培养

初代培养的组培苗接入增殖培养基后，约 40-50 天，发出 4-6 个丛生芽，切取其丛生芽转入增殖培养基中进行增殖培养，约 30 天后，选取高度 $\geq 5\text{cm}$ 的分化苗，去除基部老化组织，切取其丛生芽继续进行增殖培养，增殖培养的周期以 30-40 天为宜，增殖率为 4-6，继代 3-4 次后，抽取一定数量的增殖苗用于病毒检测，经检测脱毒成功的株系方可进一步扩繁。

7 培养室环境调控

培养室温度应控制在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；相对湿度保持在 30%-50%，如果相对湿度高于 50%，则必须采用除湿机进行除湿；光照强度控制在 1500lx-3000lx，光照培养时间为 16h/d，黑暗培养 8h/d。

8 病毒检测

HNZ118-2016

8.1 检测对象

烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)和黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV)

8.2 抽样

每个株系随机抽取 1%-2%的增殖苗进行检测, 每个株系至少取样 3 个以上。

8.3 检测方法

A 逆转录-聚合酶链式反应法(Reverse Transcription-PCR, RT-PCR)

A.1 植物总 RNA 的提取

(1)取样品适量放入无菌研钵中,加入液氮充分研磨组织至粉末状, 转移至 1.5ml 离心管中, 加入 1ml 提取液, 用匀浆仪进行匀浆处理, 室温静置 5min。

(2)往上述离心管中加入 200uL 氯仿, 剧烈震荡 30s, 室温孵育 3 min。

(3)10,000rpm, 4℃条件下离心 15 min。

(4)取上清液转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入与上清液相同体积的异丙醇, 颠倒混匀, 室温孵育 10 min。

(5)10,000rpm, 4℃条件下离心 10 min。

(6)去掉上清液, 加入 1ml 75%的乙醇, 剧烈涡旋。

(7)7500rpm, 4℃条件下离心 5 min。

(8)去掉上清, 室温晾干约 5 min, 溶于 50 uL -100uL RNA 溶解液中。

(9)55℃-60℃孵育 10 min, 将样品保存在-70℃中。

A.2 反转录操作步骤

(1) 用移液枪吸取 2.5uL RNA 样品于 1.5ml 离心管中, 65℃孵育 8min。

(2) 冰上冷却 3min, 往离心管中加入 7.5uL RTmix, 7.5uL RTmix 中包含 dNTPs (5mmol/L) 2uL, 5×RT buffer 2uL, RNasin 0.125uL, 反义链引物 (10umol/ul) 0.5uL, M-MLV 反转录酶 0.5uL, 超纯水 2.375uL。

(3) 42℃水浴 1h

(4)将离心管从水浴锅中取出, 92℃孵育 2min 终止反应, 冰上冷却得到 CDNA。

A.3 PCR 扩增

单重及双重 RT-PCR 体系: 采用 50uL PCR 反应体系, 包含模版 2uL, 正向和反向引物 (引物序列见表 1) 各 2uL, 10×TransTaq-T buffer 5uL, 2.5mM dNTPs 4uL, TransTaq-T DNA polymerase 0.5uL, 最后加 ddH₂O 至 50uL。

表 1 病毒病检测引物序列表

病害	上游引物	下游引物	目的片段
CMV	CCCACTCTTAACCACCCAACC	GACGCAGCATACTGATAAACCAA	323
TMV	TAGACCCGCTAGTCACAG	CAGAGGTCCAAACCAAAC	237

PCR 反应条件为：92℃ 预变性 2min，92℃ 变性 30s，62℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1 min，循环 4 次后，92℃ 变性 30s，60℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1 min，循环 5 次后，92℃ 变性 30s，58℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1 min，循环 14 次后，92℃ 变性 30s，55℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1 min，循环 14 次后，最后 72℃ 延伸 10min。

A.4 PCR 扩增产物的凝胶电泳

取 8uL PCR 扩增产物，用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳，5V/cm 恒压条件下电泳 30min 左右，在柯达凝胶成像系统下观察并照相保存。根据 DNA 分子量标准为参照，观察是否有目的基因大小的条带出现。

A.5 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 模版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 模版为 PCR 反应所用的灭菌去离子水。

A.6 结果判定

根据凝胶电泳的结果进行判定：检测样品盒阳性对照均出现目的片段大小的扩增条带，空白对照无目的片段扩增条带，该检测样品判为阳性，即该样品携带病原；阳性对照出现目的片段大小的扩增条带，检测样品盒空白对照中均无目的片段扩增条带，该检测样品判为阴性，即该检测样品未携带病原。

B 酶联免疫吸附法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA）

B.1 双抗体夹心法（DAS-ELISA）

(1) 根据稀释说明，用 coating buffer 稀释 coating antibody 至适当浓度，往每个反应孔中加入 100uL 稀释后的 coating antibody。

(2) 用保鲜膜或者湿毛巾包裹反应板，置于恒温箱中 37℃ 孵育 4h。

(3) 使用 PBST(磷酸盐缓冲液+吐温 20)清洗酶联板三次。

(4) 取 1g 植物材料用 10ml 提取缓冲液研磨提取（可根据实际情况调整），用纱布过滤或者让其自然沉淀，取上清备用。

HNZ118-2016

(5)按照说明书稀释阳性对照和阴性对照，往反应孔中加入样品、阳性对照、阴性对照、空白对照（空白对照为提取缓冲液）各 100uL。

(6)根据步骤 2 的方法包裹酶联板，然后在 4℃ 培育过夜(16h 以上)。

(7)根据步骤 3 洗板 3-4 次。

(8)按照适当的比例稀释 antibody-enzyme conjugate，往各反应孔中加入 100uL 稀释后的 antibody-enzyme conjugate。

(9)重复步骤 2，37℃ 孵育 1h。

(10)按照步骤 3 洗板 4 次。

(11)配制适当浓度的 substrate，过程中应注意避光。往每个反应孔中加入 100uL 配制好的 substrate。

(12)重复步骤 2，包裹酶联板，在黑暗的室温环境下培养 1h。

(13)使用酶标仪在波长为 405nm 下，读取吸光值（OD 值）。

B.2 结果判定

根据酶标仪中测定的吸光值进行定量判定：阳性对照的 OD 值 \geq 阴性和空白对照的 2 倍，样品的 OD 值大于阳性对照，该检测样品判为阳性，即该样品携带病原；样品的 OD 值小于阳性对照，该检测样品判为阴性，即该样品未携带病原。

9 脱毒苗的扩繁

根据病毒检测结果，使用上述检测方法检测到病原的样品视为感病样品，其相对应的株系未脱毒成功，应停止扩繁，作为废弃物处理；使用上述检测方法未检测到病原的样品视为未感病的样品，其相对应的株系为脱毒组培苗，可进行大量扩繁。

10 引用和参考资料

NY/T 404—2000 脱毒生姜种姜(苗)病毒检测技术规程

编写单位：湖南省湘西自治州农业科学研究所、湖南农业大学园艺园林学院、湖南省农科院蔬菜所。

编写人员：雷艳 肖雅 左小义 胡新喜 吴光辉 杨建国 刘昱卉 肖骋。

附件 1

MS 大量元素各类母液成分表 (100 倍)

母液名称	药品名称	重量	药品名称	重量
大量元素 母液	NH ₄ NO ₃	165g	KH ₂ PO ₄	17g
	KNO ₃	190g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37g		
微量元素 母液	KI	0.083g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025g
	H ₃ BO ₃	0.62g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025g
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86g		
有机母液	肌醇	10g	盐酸硫胺素 (VB ₁)	0.01g
	烟酸	0.05g	甘氨酸	0.2g
	盐酸吡哆醇 (VB ₆)	0.05g		
铁盐母液	EDTA 二钠	3.73g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78g