

甜瓜病毒 RT-PCR 检测技术规程

Code of practice for RT-PCR detection of muskmelon viruses

2025-07-10 发布

2025-08-10 实施

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：张磊、刘艳、李正男、孙平平、李晓艳、樊丽、郭金丽、徐磊、张佳、张璐。

甜瓜病毒 RT-PCR 检测技术规程

1 范围

本文件规定了甜瓜病毒检测中的术语和定义、检测对象、抽样、取样、检测方法和判定规则等内容。
本文件适用于甜瓜病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 34265 Sanger法测序技术指南
- GB/T 40974 核酸样本质量评价方法
- SN/T 2497.21 进出口危险化学品安全试验方法 第21部分：琼脂糖凝胶电泳试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

RNA 病毒 RNA viruses

核糖核酸病毒，其遗传物质为RNA。

3.2

反转录 Reverse transcription (RT)

以RNA为模板，逆转录酶催化合成DNA的过程。

3.3

互补DNA complementary DNA (cDNA)

由逆转录酶催化合成的、与RNA模板互补的DNA。

3.4

聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction (PCR)

利用DNA聚合酶，对DNA或cDNA模板的特定区域进行体外扩增的技术。反应混合物通常由DNA聚合酶、脱氧核苷三磷酸、引物和缓冲液组成，反应过程主要包括变性、退火和延伸三个步骤。

3.5

引物 Primers

人工合成的具有一定长度的单链DNA分子，与DNA模板链的特定区域互补，其3'末端在PCR过程中作为复制延伸的起始位点。

4 检测 RNA 病毒种类

西瓜花叶病毒 (Watermelon mosaic virus, WMV)。

小西葫芦黄花叶病毒 (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)。

5 抽样方法

采用 5 点法抽样。

吊蔓栽培的甜瓜，种植面积在 3335 m² 以内（含 3335 m²），抽检 100 株。种植面积在 3335 m² 到 33350 m² 之间（含 33350 m²），首个 3335 m² 抽 100 株，之后每增加 3335 m² 增检 50 株。种植面积超过 33350 m²，前 33350 m² 按上述方法抽样，之后每增加 3335 m² 增检 20 株。

爬地栽培的甜瓜，种植面积在 10005 m² 以内（含 10005 m²），抽检 100 株。种植面积在 10005 m² 到 100050 m² 之间（含 100050 m²），首个 10005 m² 抽 100 株，之后每增加 10005 m² 增检 50 株。种植面积在超过 100050 m²，前 100050 m² 按上述方法抽样，之后每增加 10005 m² 增检 20 株。

6 取样方法

对样方内的甜瓜进行采样，取靠近顶部或侧枝的新鲜叶或枝条，掸掉灰尘或除去其他附着物，放置于自封采样袋内。

采样点距离检测点较远时，用湿纸巾、海绵或布条包裹叶或枝条的切割处，置于采样自封袋内进行运输。

样品在检测点存储时间较短时（一般不超过24 h），在4℃存放即可。长期存放样品时，需要将样品用液氮预冷后，保存于-80℃超低温保存箱。

7 检测方法

7.1 样品前处理

避开叶片中脉，切取叶片组织用于检测。

7.2 样品核酸提取

选择市售的用于提取含有多糖多酚材料RNA的试剂盒，按照试剂盒自带的说明书进行操作。核酸质量评价按照GB/T 40974执行。

7.3 反转录

以提取的质量合格的总RNA为模板，选择市售的具有基因组DNA去除功能的反转录试剂盒进行反转录，合成cDNA。反应体系和反应程序按照试剂盒自带的说明书进行设置。

7.4 PCR 扩增

7.4.1 PCR 反应体系

市售产品通常为预混液或单品，根据所选产品提供的说明书，进行PCR反应混合物配制，并按说明书指示加入cDNA模板以及病毒检测引物。各种病毒的特异性检测引物见表1。

表1 甜瓜病毒的特异性检测引物

病毒名称	引物名称	引物序列/（5' → 3' 方向）	目标DNA片段大小/（bp）
WMV	WMV-F	GATGAATTTAAGGAACCTGC	1238
WMV	WMV-R	CAACAAACATTACCGTACCT	1238
ZYMV	ZYMV-F	TCACCTGAGCCGAGCCTGTA	394
ZYMV	ZYMV-R	TTAGTTGATGAACAACCAGGG	394
^a F 表示上游引物。 ^b R 表示下游引物。			

7.4.2 PCR 反应程序

95 ℃预变性2 min。35个反应循环：95 ℃变性20 s；退火20 s，退火温度按引物合成报告设置，两个引物退火温度不一致时，取较低温度；72 ℃延伸，延伸时间根据所选产品说明书提供的参数进行计算。最后，72 ℃终延伸5 min。

7.5 琼脂糖凝胶电泳检测

7.5.1 琼脂糖凝胶制备

用Tris-乙酸缓冲液溶解琼脂糖，制备质量体积比为1%的琼脂糖凝胶。琼脂糖凝胶的制备按照SN/T 2497.21执行。

7.5.2 电泳检测

用Tris-乙酸缓冲液，在水平板电泳槽中进行电泳。上样、电泳按照SN/T 2497.21执行。电泳结束时，凝胶置于紫外灯或凝胶成像系统进行观测和拍照，获取的图片用于结果判定。

8 结果判定

8.1 异常结果

根据琼脂糖凝胶电泳图，与图中DNA相对分子质量标准品相比，从阴性对照样品扩增到了预期大小的DNA片段，或从阴性对照和阳性对照样品均未扩增到预期大小的DNA片段。此时，判定为检测错误，应重新进行检测。

8.2 阳性结果

从阴性对照样品未扩增到预期大小的DNA片段，从被检测样品扩增到了预期大小的DNA片段。有阳性对照时，从阳性对照扩增的DNA片段大小，与判定为阳性的样品中扩增的DNA片段大小一致。此时，判定被检测样品为阳性，即甜瓜样品携带了特定的病毒。

8.3 阴性结果

从阴性对照和被检测样品中未扩增到预期大小的DNA片段，从阳性对照中扩增到预期大小的DNA片段。此时，判定被检测样品为阴性，即甜瓜样品未携带被检测病毒。

9 结果验证

当不具备阳性对照，只有阴性对照时，应当随机选取3~5个被判定为阳性的样品，对扩增的DNA片段进行序列测定，序列测定按照GB/T 34265执行，根据序列信息确证是否携带病毒。

10 病毒检出率

按照公式（1）。

$$R = \frac{P_p}{P_t} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：
R—病毒检出率；
P_p—病毒阳性样品数量；
P_t—检测样品总数。