

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2249—2012

菠萝凋萎病病原分子检测技术规范

Technical specification of molecular detection for pineapple mealybug wilt pathogen

2012-12-07 发布

2013-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

菠萝凋萎病病原分子检测技术规范

1 范围

本标准规定了菠萝凋萎病病原(包括菠萝凋萎伴随病毒和菠萝杆状病毒)的分子检测方法。
本标准适用于菠萝种苗及大田植株中菠萝凋萎伴随病毒和菠萝杆状病毒的定性检测。

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 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

菠萝凋萎病病原 pathogen of pineapple mealybug wilt (PMW)

包括菠萝凋萎伴随病毒(*Pineapple mealybug wilt-associated virus*, PMWaV)和菠萝杆状病毒(*Pineapple bacilliform virus*, PBCoV),其中菠萝凋萎伴随病毒包括菠萝凋萎伴随病毒1号(PMWaV-1),菠萝凋萎伴随病毒2号(PMWaV-2)和菠萝凋萎伴随病毒3号(PMWaV-3)。该病害病原的分类地位、寄主范围、危害症状及地理分布参见 A.1~A.4。

3.2

热休克蛋白-70 heat shock protein 70, HSP-70

分子量约为70 kD的一类热休克蛋白,是分子伴侣的主要成分,对蛋白的跨膜转运及特定构象的维持等起着重要作用,是进化序列保守的蛋白之一。

3.3

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

模板基因序列先经高温变性成为单链,在DNA聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别与模板DNA两条链上相应的一段互补序列发生退火而互相结合,接着在DNA聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核酸(dNTP)为底物,使引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

3.4

逆转录聚合酶链式反应 reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

RT-PCR是先利用依赖于RNA的DNA聚合酶,将待测RNA逆转录为DNA;再以逆转录后的一段DNA作为模板,以模板DNA两端序列互补的一对特异性寡核苷酸序列作为引物,在四种脱氧核糖核苷三磷酸存在下,利用依赖于DNA的DNA聚合酶的催化作用。经过数十次变性、退火和延伸的反应循环,使模板上介于两个引物之间的DNA片段得到特异性的技术扩增,再通过电泳等手段检测到被特异性扩增的片段。

3.5

tRNA^{met}结合区

tRNA^{met}是携带延长肽链上甲硫氨酸的tRNA,它负责识别延伸中AUG密码子。tRNA^{met}结合区

为基因间隔区,该结合区为所有杆状病毒(*Badnavirus*)所共有。

4 原理

根据 PMWaV-1、PMWaV-2、PMWaV-3 的 HSP-70 特有碱基序列设计特异性引物进行 RT-PCR 扩增,依据是否分别扩增获得预期的 590 bp、611 bp 和 499 bp 的 DNA 片段,判断样品中是否携带菠萝凋萎伴随病毒;根据 PBCoV 的 tRNA^{met} 结合区特有碱基序列设计特异性引物进行 PCR 扩增,依据是否扩增获得预期 973 bp 的 DNA 片段,判断样品中是否携带菠萝杆状病毒。

5 仪器设备、用具和试剂

按 B.1 和 B.2 的规定执行。

6 取样

以田间菠萝大苗植株或冠芽较嫩叶片或菠萝组培苗叶片作为检测样品,取样量为 1.0 g~5.0 g,实验室检测用样量为 0.1 g。

7 检测方法

7.1 PMWaV 的 RT-PCR 检测

7.1.1 检测样品总 RNA 提取

参照附录 B 的方法提取检测样品和对照样品的总 RNA,设超纯水作为空白对照,进行 RT-PCR 扩增。

7.1.2 引物序列

表 1 引物序列

引物	引物序列	正反义	扩增片段长度	检测病毒
PMWaV-1 F	5'-CGCACAACTTCAAGCAATC-3'	正义	590 bp	PMWaV-1
PMWaV-1 R	5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'	反义		
PMWaV-2 F	5'-CCATCCACCAATTTTACTAC-3'	正义	611 bp	PMWaV-2
PMWaV-2 R	5'-CATACGAAGTAGACTCATACG-3'	反义		
PMWaV-3 F	5'-ATTGATGGATGTGTATCG-3'	正义	499 bp	PMWaV-3
PMWaV-3 R	5'-AGTTCAGTGTAGATTTTCGA-3'	反义		

7.1.3 RT-PCR 扩增反应

RT-PCR 反应体系:苜蓿花叶病毒(AMV)反转录酶反应缓冲液 12.5 μ L,分别加入 10 μ mol/L 的引物 PMWaV-1 F、PMWaV-1 R、PMWaV-2 F、PMWaV-2 R 与 PMWaV-3 F、PMWaV-3 R 各 1.5 μ L,RNA 1 μ L,AMV 反转录酶混合液 1 μ L,加无 RNA 酶的超纯水至 25 μ L。

RT-PCR 反应条件:50℃ 反转录 30 min;94℃ 反应 2 min 灭活反转录酶,94℃ 30 s,不同温度退火(检测 PMWaV-1 退火温度为 60℃,PMWaV-2 和 PMWaV-3 退火温度为 55℃)1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min。取出 PCR 反应管,对反应产物进行电泳检测或 4℃ 条件下保存,存放时间不超过 24 h。

7.2 PBCoV 的 PCR 检测

7.2.1 引物序列

PBCoV-F:5'-AGAAAAGAGAATGAACAAAC-3'

PBCoV-R:5'-AGTGATAAAGGGTCAAATAA-3'

PCR 片段长度为 973 bp。

7.2.2 PCR 扩增

反应体系:10×PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus)2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.25 μ L, 四种脱氧核糖核苷酸 dNTP(100 nmol/L)0.5 μ L, PBCoV-F、PBCoV-R 引物(400 nmol/L)各 1 μ L, 加超纯水补足 25 μ L。

PCR 反应条件:94℃ 2 min; 然后进入 35 个循环, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min; 最后 72℃ 延伸 10 min。取出 PCR 反应管, 对反应产物进行电泳检测或 4℃ 条件下保存, 存放时间不超过 24 h。

7.3 反应体系中对照的设置

7.3.1 阳性对照样品

以温室培养经菠萝粉蚧传毒接种后, 呈现典型症状确定感染菠萝凋萎伴随病毒的菠萝叶片为材料, 提取总 RNA, 以其为模板合成 cDNA 第一链, 作为 PMWaVs 检测体系的阳性对照。

以温室培养经菠萝粉蚧传毒接种后, 呈现典型症状确定感染菠萝杆状病毒的菠萝叶片为材料, 提取基因组 DNA, 作为 PBCoV 检测体系的阳性对照。

7.3.2 阴性对照样品

用脱毒的菠萝组培苗提取的总核酸作为样品阴性对照。

7.3.3 PCR 反应体系阴性对照

用配制反应体系的无菌超纯水代替 DNA 模板, 检测试剂是否受到污染。

8 琼脂糖电泳

按 B.8 的规定执行。

9 凝胶成像分析

将电泳后的琼脂糖凝胶置于紫外凝胶成像仪系统观察窗内, 根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小, 并拍照保存, 参考图 1 和图 2。



图 1 菠萝凋萎伴随病毒 PCR 检测结果电泳图

注: 图中 M 为标准分子量, 1~3 分别为 PMWaV-3 样品、阴性对照和 PMWaV-3 阳性对照; 4~6 分别为 PMWaV-1 样品、阴性对照和 PMWaV-1 阳性对照; 7~9 分别为 PMWaV-2 样品、阴性对照和 PMWaV-2 阳性对照。

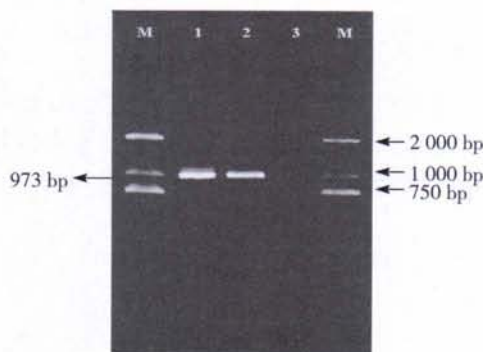


图 2 菠萝杆状病毒 PCR 检测结果电泳图

注: 图中 M 为标准分子量, 1~3 分别为 PBCoV 样品、PMWaV-3 阳性对照和阴性对照。

10 防污染措施

检测过程中防污染措施按 SN/T 1193 的规定执行。

11 结果判定

11.1 反应体系正常与否的判定

如果阳性对照样品出现目的扩增条带,阴性对照样品和 PCR 反应体系阴性对照不出现目的条带,表明 PCR 反应体系正常。

如果阳性对照样品未出现目的扩增条带,或 PCR 反应体系阴性对照出现目的条带,或阴性对照样品出现目的条带,表明 PCR 反应体系不正常,需更换试剂,重新进行 PCR 检测。具体操作按 7.1.3 和 7.2.2 的规定执行。

11.2 送检样品阴性判定

在 PCR 反应体系正常的条件下,如果待检样品没有出现与阳性对照样品相同大小的目的扩增条带,则需要重新提取待检样品总 RNA 或 DNA,进行 RT-PCR(加入引物 PMWaV-1F、PMWaV-1R, PMWaV-2F、PMWaV-2R 与 PMWaV-3F、PMWaV-3R)或 PCR 检测(加入引物 PBCoV-F、PBCoV-R),具体操作按 7.1.3 和 7.2.2 的规定执行,如果待检样品仍未出现与阳性对照相同大小的目的扩增条带,该待测样品可判为阴性,即待检样品未携带菠萝凋萎伴随病毒(PMWaV)或菠萝杆状病毒(PBCoV)。

如果第二次检测待检样品出现与阳性对照样品相同大小的目的扩增条带,则初步判定为阳性,按 11.3 的程序检验。

11.3 送检样品阳性判定

如果待检样品的 PCR 扩增产物出现与阳性对照相同大小的目的扩增条带,该样品初步判为阳性;将提取的总核酸分别进行 RT-PCR(加入引物 PMWaV-1F、PMWaV-1R, PMWaV-2F、PMWaV-2R 与 PMWaV-3F、PMWaV-3R)或 PCR 检测(加入引物 PBCoV-F、PBCoV-R),如果仍出现与阳性对照样品相同大小的目的扩增条带,即可判定待检样品携带菠萝凋萎伴随病毒(PMWaV)或菠萝杆状病毒(PBCoV)。

如果第二次检测待检样品未出现与阳性对照相同大小的目的扩增条带,则重做一次 PCR 再次验证,以此次结果为最终判定依据。

11.4 结果记录

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间、地点、植株生长状况,检测时间、地点、方法和结果等,并有经手人和实验室检测人员的亲笔签名。PCR 检测电泳结果图片须妥善保存备查。

12 样品保存及销毁

经检测确定携带 PMWaV 或 PBCoV 的阳性样品经液氮干燥后,于-70℃以下保存 30 d 以备复核,同时将已知感染病毒的菠萝植株种植在温室保存,以备试验用。保存的样品必须做好登记和标记工作。

保存期过后的样品及用具应进行灭活处理。

附录 A

(资料性附录)

菠萝凋萎病病原背景资料

A.1 分类地位

A.1.1 菠萝凋萎伴随病毒

属长线病毒科(*Closteroviridae*)葡萄卷叶病毒属(*Ampelovirus*),学名为 *Pineapple mealybug wilt associated virus*。

已发现和报道的菠萝凋萎病毒有5种,已定名种为:菠萝凋萎病毒1号(*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1*, PMWaV-1),菠萝凋萎病毒2号(PMWaV-2)和菠萝凋萎病毒3号(PMWaVs-3);未定名种为:菠萝凋萎病毒4号(PMWaV-4)和菠萝凋萎病毒5号(PMWaV-5)。我国已分离鉴定出引起菠萝凋萎病的3种致病病毒,分别为 PMWaV-1、MWaV-2、PMWaV-3。

A.1.2 菠萝杆状病毒

菠萝杆状病毒(*Pineapple bacilliform virus*, PBCoV),属花椰菜花叶病毒科(*Caulimoviridae*),杆状DNA病毒属(*Badnavirus*)。

A.2 寄主范围

A.2.1 菠萝凋萎伴随病毒

菠萝凋萎病毒在自然界主要侵染菠萝(*Ananas comosus*),也有报道表明该病毒还可侵染菠萝大田杂草如须芒草(*Andropogon insularis*)、丝毛雀稗(*Paspalum urvillei*)。

A.2.2 菠萝杆状病毒

PBCoV 在自然界主要侵染菠萝(*Ananas comosus*)。

A.3 引起病害的症状

A.3.1 菠萝凋萎伴随病毒

田间菠萝发病初期的症状通常是叶片逐渐褪绿转黄,由黄变紫红色,中期整株叶片变紫红色,后期中下层老叶叶缘变灰白色枯死,叶片边缘向下反卷,叶尖纵卷,严重时整株凋萎死亡;病株显著矮小,果实小,早熟。生长旺盛或已座果的菠萝植株比生长势衰弱的植株发病更早,症状表现更明显。菠萝受病毒感染后到表现症状一般需要2个月~5个月,通常在高温干旱、土壤缺水的时症状表现更加典型和明显(图 A.1)。

A.3.2 菠萝杆状病毒

染病菠萝中 PMWaVs 的存在比较普遍,PBCoV 是除 PMWaVs 外侵染菠萝的一种主要病毒,其与菠萝凋萎病虽未呈现明显的相关性,但在凋萎病隐症植株以及显症菠萝上均能检测到 PBCoV。

A.4 分布地区

A.4.1 菠萝凋萎伴随病毒

1910 年在美国的夏威夷首次报道菠萝凋萎病(PMW),至今该病害已在世界各菠萝种植区传播流行。

亚洲:中国(广东、广西、海南、台湾)、印度、印度尼西亚、马来西亚、菲律宾、斯里兰卡。



图 A.1 菠萝凋萎病的症状

非洲:毛里求斯、南非。

美洲:危地马拉、牙买加、波多黎各、美国(佛罗里达、夏威夷)、巴西、秘鲁、哥斯达黎加、圭亚那、洪都拉斯、古巴。

大洋洲:澳大利亚。

欧洲:西班牙。

A.4.2 菠萝杆状病毒

中国、澳大利亚、美国(夏威夷)。

A.5 传播途径

A.5.1 菠萝凋萎伴随病毒

主要以菠萝粉蚧包括菠萝洁白粉蚧(*Dysmicoccus brevipes*)和新菠萝灰粉蚧(*D. neobrevipes*)为媒介进行传播。不能机械接种进行传播。通过带毒的芽苗和植株组织远距离传播。

A.5.2 菠萝杆状病毒

主要通过带毒的种苗寄主植物扩散传播,自然界中由菠萝洁白粉蚧(*Dysmicoccus brevipes*)和新菠萝灰粉蚧(*D. neobrevipes*)以半持久方式进行传播。菠萝杆状病毒不能通过机械接种进行传播。

A.6 病毒形态及基因组

A.6.1 菠萝凋萎伴随病毒

菠萝凋萎病毒的粒子为弯曲的长线形,长度为1 000 nm~2 200 nm,直径约12 nm。正向单链RNA分子,大小为16.9 kb~19.5 kb,外壳蛋白(CP)亚基分子量为35 ku~39 ku。PMWaV-1基因长度为13.1 kb,包含7个ORFs,有无尾部结构尚不清楚。

在RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)和p6 ORFs之间缺少一个基因间区,CP大小仅为28.1 ku,并且缺失一个编码CPd的开放阅读框(ORF)。PMWaV-2具有典型的长线病毒科(Closteroviridae)单链RNA丝状病毒的基因组结构。PMWaV-2基因组3'末端14 861 nt区域包含10个ORFs,ORF1a编码一个蛋白酶类蛋白酶(Papain-like proteinase, PRO)、一个甲基转移酶(Methyltransferase, MTR)和一个解旋酶(Helicase, HEL),ORF1b编码一个依赖于RNA的RdRp,ORF2编码一个疏水蛋白,ORF3编码一个热击蛋白70(Heatshock protein, HSP70),ORF4、ORF 7、ORF 8、ORF 9分别编码一个46 ku、20 ku、22 ku和6 ku的蛋白质,ORF5编码一个34 ku的CP蛋白,ORF6编码一个CP差异蛋白,3'末端还有一个非编码区。

A.6.2 菠萝杆状病毒

病毒粒子为菌杆状,两端圆滑,侧边平行,无包薄膜,大小为25 nm~30 nm×60 nm~900 nm,多数

为 $30\text{ nm} \times 130\text{ nm}$ 。基因组为单分子开环状双链 DNA, 大小为 $7.5\text{ kb} \sim 8\text{ kb}$ 。

单分体基因组含有 3 个 ORF, 前两个 ORF 编码 2 个小蛋白, ORF3 编码一个大的多聚蛋白。ORF3 上有 3 个高度保守的序列, 分别编码天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic protease, AP)、逆转录酶 (Reverse transcriptase, RT) 和 RNA 酶 H (Ribonuclease H, RNase H); 另外还有 3 个较保守的序列, 分别是运动蛋白编码区 (Movement protein domain, MP)、富含半胱氨酸的锌指状的 RNA 结合区 (Cysteine-rich zinc finger-like RNA-binding region, RB)、第二个富含半胱氨酸编码区 (Second cysteine-rich region, 2nd CR)。

附录 B

(规范性附录)

RT-PCR 和 PCR 检测设备、试剂与方法

B.1 设备

PCR 扩增仪、电泳仪、水平电泳槽、稳压器、高速冷冻离心机、凝胶成像分析系统、振荡器、超低温冰箱、恒温水浴锅、电子分析天平(感量为 10 mg)、pH 计、磁力搅拌器、微波炉、高压灭菌锅、烘箱、超净工作台等。

微量可调移液器(量程分别为 0.1 μL ~2 μL , 1 μL ~10 μL , 10 μL ~100 μL , 20 μL ~200 μL , 100 μL ~1 000 μL)、配套吸头、刀片、PCR 管、离心管、研钵等。

B.2 试剂

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸、氯化钠(NaCl)、十二烷基磺酸钠(SDS)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、醋酸钾(KAc)、醋酸钠($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、无水乙醇、曲拉通(TritonX-100)、 β -巯基乙醇、盐酸(HCl)、冰醋酸(HAc)、氢氧化钠(NaOH)、溴化乙锭等。

B.3 试剂的配制

B.3.1 核酸抽提缓冲液

称取 12.1 g Tris, 18.61 g EDTA 和 29.22 g NaCl 放置于合适的容器中,加超纯水定容到 1 L,灭菌冷却至室温,再加入 2 mL β -巯基乙醇,室温保存备用。

B.3.2 5 mol/L KAc 溶液

称取 49.07 g KAc 放置于合适的容器中,用去离子水定容至 100 mL,室温保存备用。

B.3.3 10% SDS 溶液

称取 10 g SDS 溶于约 80 mL 去离子水中,68℃加热溶解,用浓盐酸调节 pH 至 7.2,去离子水定容至 100 mL,室温保存备用。

B.3.4 3 mol/L NaAc 溶液

称取 40.8 g $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于约 40 mL 去离子水中,用冰醋酸调节 pH 至 5.2,去离子水定容到 100 mL,室温保存备用。

B.3.5 0.5 mol/L EDTA

称取 186.13 g EDTA 溶于 800 mL 去离子水中,用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,去离子水定容至 1 L,室温保存备用。

B.3.6 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)

称取 121.1 g Tris 溶解于 800 mL 超纯水中,用盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加超纯水定容至 1 000 mL。灭菌后在 4℃下保存备用。

B.3.7 10 mol/L NaOH

在 160 mL 超纯水中加入 80.0 g NaOH,溶解后再加超纯水定容到 200 mL。

B.3.8 1 mol/L EDTA—Na₂(pH 8.0)

称取 372.2 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA—Na₂),加入 70 mL 超纯水中,再加入适量 NaOH 溶液(B.3.8),加热至完全溶解后,冷却至室温,再用 NaOH 溶液(B.3.8)调 pH 至 8.0,加超纯水定容至 100

mL。灭菌后在 4℃ 下保存备用。

B.3.9 1.2 mol/L NaCl

称取 70.2 g NaCl, 溶解于 800 mL 超纯水中, 加超纯水定容至 1 000 mL, 灭菌后室温保存备用。

B.3.10 TE 缓冲液(pH 8.0)

分别量取 10 mL Tris-HCl(B.3.7)和 1 mL EDTA—Na₂(B.3.9), 加超纯水定容至 1 000 mL。灭菌后在 4℃ 下保存备用。

B.3.11 加样缓冲液

称取 250.0 mg 溴酚蓝, 加 10 mL 超纯水, 在室温下溶解 12 h; 称取 250.0 mg 二甲基苯腈蓝, 加 10 mL 超纯水溶解; 称取 50.0 g 蔗糖, 加 30 mL 超纯水溶解。混合以上 3 种溶液, 加超纯水定容至 100 mL, 在 4℃ 下保存备用。

B.3.12 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

称取 242.2 g Tris, 先用 500 mL 超纯水加热搅拌溶解后, 加入 100 mL EDTA—Na₂(B.3.9), 用冰乙酸调 pH 至 8.0, 然后加超纯水定容到 1 000 mL。使用时用超纯水稀释成 1×TAE。

B.3.13 PCR 反应试剂

10×PCR 缓冲液(Mg²⁺ Plus)、dNTP(各 2.5 mmol/L)、Taq 聚合酶(5 U/μL)、特异性引物对(20 μmol/L)。

B.3.14 其他试剂

Tris 饱和酚(pH≥7.8)、氯仿、异戊醇、异丙醇、70%乙醇、DNA 分子量标准和核酸染料。

B.3.15 说明

本标准所用试剂均为分析纯。除另有说明, 用于 RNA 提取和反应的试剂均用无 RNA 酶的水配制及用无 RNA 酶的容器分装, 耗材(如离心管)均经过无 RNA 酶处理。同时以上所有试剂均须高温高压灭菌处理 121℃, 1.1 kg/cm², 20 min。室温保存备用。

B.4 检测样品总 RNA 提取

- 取 n 个 1.5 mL 去 RNA 酶的离心管, 其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和, 对每个管进行编号标记;
- 剪取病叶基部白色组织约 100 mg, 液氮中迅速研磨成粉, 转移至相应编号的 1.5 mL 离心管中, 每管加入 1 mL 核酸抽提和 38 μL 和 20 μL 巯基乙醇, 匀浆;
- 将匀浆液剧烈震荡混匀, 常温下孵育 5 min~10 min 以使核蛋白分解完全;
- 4℃ 1 529× g 离心 10 min, 小心取上清液转入新的离心管中;
- 加入等体积 Tris 饱和酚(pH≥7.8): 氯仿: 异戊醇(25:24:1)加入 200 μL 氯仿, 充分混匀;
- 4℃ 1 529× g 离心 10 min, 样品溶液分为三层: 下层有机相、中层和上层为无色水相, 将水相转移至新的离心管中;
- 加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 混匀, 4℃ 1 529× g 离心 10 min, 取上清液于另一新离心管;
- 加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀核酸, 4℃ 1 529× g 离心 10 min, 弃上清液;
- 用 75%乙醇悬浮沉淀, 4℃ 1 529× g 离心 10 min, 弃上清液, 重复该步骤一遍;
- 沉淀置于无菌操作台水平风吹 5 min, 尽量除去乙醇;
- 用 50 μL~100 μL 无 RNA 酶灭菌水溶解 RNA 沉淀;
- 取 6 μL RNA 溶液于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。剩余 RNA 液于 -70℃ 保存备用。

B.5 检测样品总 DNA 提取

剪取检测样品 100 mg, 加入少许石英砂和液氮, 快速研磨成浆状; 转入 1.50 mL 离心管中, 加入 1

mL 提取缓冲液和 20 μ L 巯基乙醇,混匀,70℃水浴 30 min;加入 500 μ L 氯仿—异戊醇(24 : 1),充分摇匀,1 529 $\times g$ 离心 10 min,取上清液;氯仿—异戊醇溶液再抽提一次,取上清,加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心管混匀,静置于-20℃ 2 h 以上,离心后倒掉上清,沉淀,室温干燥;溶于 200 μ L 的 TE 缓冲液,-20℃保存备用。

采用 RNA 与 DNA 提取试剂盒的,操作步骤参照产品说明书。

健康香蕉组培苗基因组 DNA 按同样的方法制备与保存。

B.6 凝胶制备

用 TAE 配制 1.0%琼脂糖凝胶(电泳级)在微波炉中熔化混匀,冷却至 55℃左右。加入溴化乙锭或其他核酸染料(0.5 μ g/mL),混匀,倒入制胶平台上,插上样品梳。待凝胶凝固后,轻轻拔出梳子,将带凝胶的胶板置于电泳槽中,使样品孔位于电场负极,加入足够量的 1 $\times$ TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

B.7 加样

在第一个加样孔中加入 5 μ L DNA 标准分子量,分别取 2 μ L 加样缓冲液与 5 μ L PCR 的反应产物混匀,加入后面的加样品孔中。

B.8 电泳

通电源电泳,电压 5 V/cm,电泳 30 min 后,停止电泳。将整个胶置于凝胶成像分析系统上观察,并拍照。