

ICS 65.020

B 65

LY

中华人民共和国林业行业标准

LY/T 2350—2014

松褐天牛携带松材线虫的 PCR 检测 技术规范

Technical regulation for detecting *Bursaphelenchus xylophilus* from
Pine sawyer (*Monochamus alternatus* Hope) by PCR amplification

2014-08-21 发布

2014-12-01 实施

国 家 林 业 局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国林业有害生物防治标准化技术委员会（SAC/TC 522）归口。

本标准负责起草单位：华南农业大学。

本标准参加起草单位：国家林业局森林病虫害防治总站、江西省赣州市林业有害生物防治检疫局。

本标准主要起草人：王新荣、孙思、朱孝伟、王永、孔祥超、宋玉双、黄敬怡、任路路、马伟杰、陈晨、赖福胜。

松褐天牛携带松材线虫的 PCR 检测 技术规范

1 范围

本标准规定了松褐天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 成虫携带松材线虫 [*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle] PCR 检测技术的一般原则和技术要求。

本标准适用于利用PCR技术定性检测携带松材线虫的松褐天牛。

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。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 21107-2007 动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR 方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

松褐天牛 *Monochamus alternatus* Hope

又名松墨天牛, 属昆虫纲 (Insecta), 鞘翅目 (Coleoptera), 天牛科 (Cerambycidae), 墨天牛属 (*Monochamus*), 是松树的一种重要蛀干害虫, 又是松材线虫的主要传播媒介。松褐天牛成虫中后胸携带较多松材线虫。松褐天牛成虫形态图和脱翅松褐天牛成虫中后胸示意图见附录 A。

3.2

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*

松材线虫隶属于线虫纲 (Nematoda), 滑刃目 (Aphelenchida), 滑刃亚目 (Aphelenchina), 滑刃总科 (Aphelenchoidoidea), 滑刃科 (Parasitaphelenchidae), 伞滑刃亚科 (Bursaphelenchinae), 伞滑刃属 (*Bursaphelenchus*), 是引起松树枯萎死亡的直接原因, 也是本标准所要检测的目标。

3.3

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction; PCR

聚合酶链式反应, 是体外酶促合成特异DNA片段的一种方法, 由高温变性、低温退火及适温延伸等几步反应组成一个周期, 循环进行, 使目的DNA得以迅速扩增, 具有特异性强、灵敏度高、操作简便和省时等特点。参见GB/T 21107-2007中3.1 的规定。

3.4

引物 primer

一段短核苷酸序列。其功能是作为核苷酸聚合作用的起始点, 在聚合反应时, 刺激合成一条与模板互补的DNA的序列。

3.5

内部转录间隔区 **internal transcribed spacer**

简称ITS，位于核糖体小亚基（18S rDNA）和大亚基（28S rDNA）基因保守序列区之间的核苷酸序列，包括ITS1和ITS2。

3.6

阳性对照 **positive control**

试验的一个控制处理，用于检验试验本身的正确与否。即在用分子生物学技术手段对物种进行检测鉴定时，一个试验处理的模板为该物种的DNA。

3.7

阴性对照 **negative control**

试验的一个控制处理，用于检验试验本身的正确与否。即在用分子生物学技术手段对物种进行检测鉴定时，一个试验处理的模板用灭菌水替代。

4 原理

松褐天牛中后胸的气管组织携带的松材线虫数量最多，用裂解液直接从其中提取DNA作为PCR扩增模板，用松材线虫特异性引物扩增出松材线虫特异性片段，达到快速、准确地检测出携带松材线虫的松褐天牛目的。该检测方法的检测精度是1条松材线虫/2 mg松褐天牛组织。

5 检测技术规范

5.1 试剂和仪器

除另有规定外，试剂应为分析纯或生化试剂，试验用水应符合GB/T 6682-2008的规定。所用试剂和仪器的具体目录参见附录B。

5.2 检测步骤

5.2.1 松褐天牛样本

采集松褐天牛成虫样本，立即保存于75%的酒精内或-20℃以下冰箱内。

5.2.2 松褐天牛组织内待检松材线虫 DNA 模板的制备

将松褐天牛中后胸的2 mg~5 mg气管组织放入灭菌的1.5 mL离心管，液氮中研磨至匀浆，加入60 μL裂解缓冲液，用PCR仪完成温度循环：95℃处理15 min，65℃处理2 min，重复一次。加入8 μL~10 μL蛋白酶K（20 mg/mL），65℃处理1 h，95℃处理15 min。裂解后的DNA提取液经15 300 g离心3 min，吸取2 μL上清液做PCR扩增模板。提取DNA操作流程参见附录C。

5.2.3 PCR 反应体系

采用25 μL反应总体系，各组分浓度及体积可根据所选用Taq DNA聚合酶说明书进行操作。反应体系参考值如下：10×PCR Buffer 2.5 μL（Mg²⁺ free），dNTP（2.5 mmol/L）2 μL，Mg²⁺（25 mmol/L）3 μL，引物P1（10 μM）和P2（10 μM）各1 μL，Taq DNA聚合酶（5 U/μL）0.2 μL，模板DNA 2 μL，灭菌双蒸水补充至总体积25 μL。

检测过程中应分别设阳性对照和阴性对照。用松材线虫基因组DNA作阳性对照，用灭菌的去离子水作阴性对照。

5.2.4 PCR 反应程序

PCR扩增反应程序如下：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性45 s，50 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，40个循环；最后72 ℃延伸10 min。PCR产物直接电泳或4 ℃冰箱保存。

5.2.5 PCR 产物电泳检测

配制1.0%~1.2%琼脂糖凝胶，待凝胶冷至约60 ℃时加入核酸染料。取5 μl PCR扩增产物与1 μL~2 μL DNA载样缓冲液混匀上样，在0.5×TBE电泳缓冲液中以5 V/cm电压电泳约30 min。用凝胶电泳图像分析系统观察并拍照。

5.3 结果判断与表述

PCR扩增产物电泳检测结果有一条403 bp的松材线虫特异性条段，确定松褐天牛样本体内含有松材线虫，表述为检出松材线虫。

PCR扩增产物电泳检测结果无403 bp松材线虫特异性条带，判为不含松材线虫，表述为未检出松材线虫。

检测结果参见附录D。

附录 A
(资料性附录)
松褐天牛的形态



图 A.1 松褐天牛成虫(背面观)形态图



图 A.2 脱翅松褐天牛成虫中后胸(背面观)示意图

附录 B

(资料性附录)

试剂和仪器

B.1 试剂

试剂包括:

- a) DTT: DL-Dithiothreitol, 二硫苏糖醇;
- b) Tween: 聚山梨酯, 吐温;
- c) Gelatin: 明胶;
- d) Protein kinase K: 蛋白酶K;
- e) TE缓冲液: 10 mm Tris-HCl, 1mmol EDTA, pH=8.0;
- f) 裂解缓冲液: 2.5 mmol/L DTT, 1.125% Tween 20, 0.025% Gelatin, 125 mmol/L KCl, 3.75 mmol/L MgCl₂, 25 mm Tris-HCl (pH8.0);
- g) 10×PCR Buffer: 500 mmol KCl, 100 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 15 mmol MgCl₂, 160 mmol (NH₄)₂SO₄等, 不同公司产品略有差异;
- h) dNTPs: dATP (deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸), dGTP (deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸), dTTP (deoxythymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸), dCTP (deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸);
- i) Taq DNA 聚合酶 (*Thermus aquaticus*, 水生栖热菌);
- j) 核酸染料: Golden view或类似产品;
- k) 载样缓冲液: 0.2%溴酚兰, 0.5 g/mL蔗糖;
- l) 0.5×TBE电泳缓冲液: 0.045 mol/L Tris-硼酸, 0.001 mol/L EDTA;
- m) 琼脂糖: 电泳纯;
- n) 75%酒精;
- o) 液氮;
- p) KCl, MgCl₂;
- q) DNA Marker: 分子量标准品1 000或2 000 bp (bp: 碱基对)。
- r) 松材线虫特异性检测引物 (对) 序列为:
 - 正向引物P1: 5'-CTACGTGCTGTTGTTGAGTTGGC-3'
 - 反向引物P2: 5'-TGGTGCCTAACATTGCGCGA-3'

其中正向引物位于ITS1区, 反向引物位于ITS2区 (图B.1)。引物于-20℃短期保存或-70℃长期保存。



图B.1 松材线虫特异性检测引物 (对) 示意图

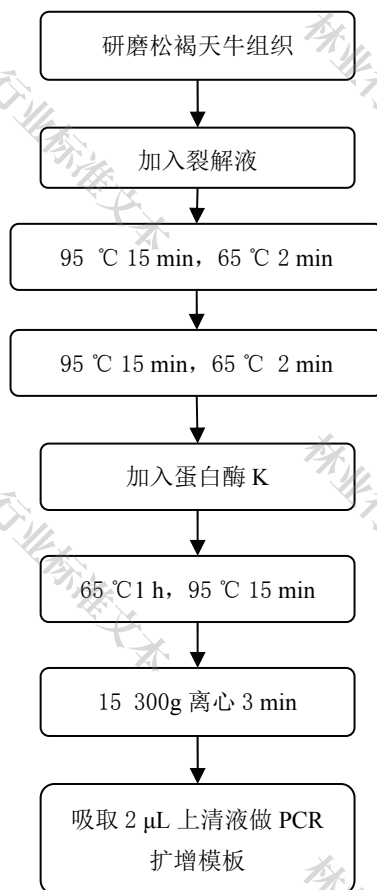
LY/T 2350—2014

B.2 仪器

仪器包括：

- a) PCR仪；
- b) 高速离心机（最大离心力大于16 000 g）；
- c) 微量移液器（0.2 μL ~2 μL ，0.5 μL ~5 μL ，2 μL ~20 μL ，20 μL ~200 μL ，100 μL ~1000 μL ）；
- d) 电泳仪；
- e) pH计；
- f) 恒温水浴锅；
- g) 天平（感量0.001 g）；
- h) -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下低温冰箱；
- i) 凝胶电泳图像分析系统。

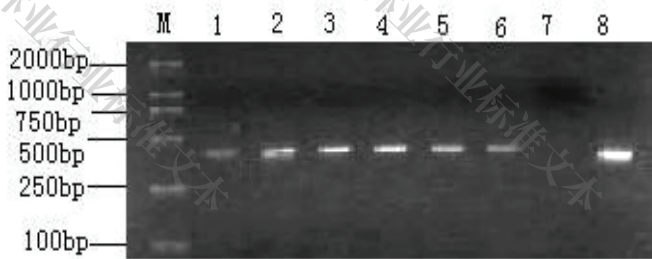
附录 C
(资料性附录)
提取 DNA 操作流程



图C.1 提取DNA操作流程图

附 录 D
(资料性附录)

松褐天牛气管组织 PCR 扩增结果



泳道M—标准DNA；
1～6—携带松材线虫的松褐天牛；
7—阴性对照，灭菌去离子水；
8—阳性对照，松材线虫基因组DNA扩增产物。

图D.1 松褐天牛气管组织PCR扩增结果电泳图

参 考 文 献

[1] GB/T 23476-2009 松材线虫病检疫技术规程

[2] LY/T 1866-2009 松褐天牛防治技术规程
