

T/JSF

团 体 标 准

T/JSF XXXX—2XXX

松材线虫分子检测（RPA 法）技术规程

Technical regulation for molecular detection of pine wood nematode
(RPA method)

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

江苏省林学会 发 布

目次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 检测鉴定对象 2

5 检测原理 2

6 检测所用仪器设备 2

7 检测流程 2

 7.1 样品 DNA 的提取 2

 7.1.1 木屑中线虫 DNA 的提取 2

 7.1.2 线虫液 DNA 的提取 2

 7.2 试剂的设计与配置 2

 7.2.1 引物设计 2

 7.2.2 荧光探针设计 2

 7.2.3 试剂配制 3

 7.3 扩增反应 3

8 结果判定 3

 8.1 荧光监测设备结果判定 3

 8.2 胶体金试纸条结果判定 3

9 记录和归档 3

 9.1 仪器自动保存 3

 9.2 胶体金试纸条保存 3

附录 A 体系配制表 4

前 言

本标准按照 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。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由江苏省林学会提出并发布。

本标准由南京生兴有害生物防治技术股份有限公司；南京林业大学；江苏省林业科学研究院；湖北省林业科学研究院；安徽省林业科学研究院；湖南省林业科学研究院；江西省林业有害生物防治检疫中心；贵州省森林病虫检疫防治站；湖南省林业有害生物防治检疫站；南京海关动植物与食品检测中心起草。

本标准主要起草人：许嘉麟；贾玉娟；王晨；乔钰航；柴忠心；陈凤毛；柴寅初；谢实猛；丁志鹏；董晓燕；鲍友山；徐福元；田伟龙；张浩伟；秦正文；吉凯；王昭鑫；解春霞；查玉平；徐小文；蔡三山；董广平；尹华阳；杨静；李萍；雷舒；李宸；孙凯；刘循；喻锦秀。

松材线虫分子检测（RPA 法）技术规程

1 范围

本标准规定了松材线虫分子检测 RPA 法技术规程的术语和定义、检测对象、检测流程、结果判定以及记录和归档。

本标准适用于进出境植物检疫，国内植物检疫以及林业有害生物调查中松材线虫及其寄主植物和制品携带松材线虫的分子检测鉴定工作。

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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

GB/T35342-2017 松材线虫分子检测鉴定技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准

3.1 松材线虫 pine wood nematode [Bursaphelenchus xylophilus (Steiner et Buhrer) Nickle]

一种无脊椎动物，属于线虫门(Nematoda)，侧尾腺纲(Secernentea)，滑刃目(Aphelenchida)、滑刃总科(Aphelenchoidoidea)、滑刃科(Aphelenchoididae)，伞滑刃亚科(Bursaphelenchinae)，伞滑刃属(Bursaphelenchus)的植物寄生线虫。

3.2 松材线虫病 pine wilt disease caused by pine wood nematode

又名松树萎蔫病，是由松材线虫寄生在松树体内所引起的一种松树毁灭性森林病害。

3.3 寄主植物及其制品 pine wood and wood products

松材线虫寄主植物及其原木，锯材和用于承载、包装、铺垫，支撑、加固货物的木质材料，如木板箱、木条箱，木托盘、木框、木桶、木轴、木楔、垫木、枕木和衬木等。经人工合成或经加热、加压等深度加工的包装木质材料，如胶合板、纤维板等除外。

3.4 分子检测 molecular detection

以功能基因、核糖体、ITS 等区域为靶标，采用分子生物学的方法在基因水平上对物种进行鉴定。

3.5 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，引导合成一条与模板互补的 DNA 的序列。

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无菌水替代。

4 检测鉴定对象

疑似松材线虫，或疑似带有松材线虫及其传播媒介昆虫活体的寄主植物(参见 GB/T 35342-2017 附录 A)及其制品。

5 检测原理

重组酶介导等温扩增 Recombinase Polymerase Amplification, RPA

RPA 技术主要依赖于三种酶：能结合单链核酸(寡核苷酸引物)的重组酶、单链 DNA 结合蛋白(SSB)和链置换 DNA 聚合酶。这三种酶的混合物在常温下也有活性，最佳反应温度在 39℃ 左右。

重组酶与引物结合形成的蛋白-DNA 复合物，能在双链 DNA 中寻找同源序列。一旦引物定位了同源序列，就会发生链交换反应形成并启动 DNA 合成扩增，对模板上的目标区域在等温 39℃ 左右条件下进行指数式扩增。被替换的 DNA 链与 SSB 结合，防止进一步替换。依赖核酸内切酶 IV (nfo 酶)的作用，加入根据模板设计的特异的分子探针，使用胶体金技术(三明治夹心法)可以对最终结果进行检测。也可结合荧光检测设备检测扩增过程中的荧光信号，通过检测系统配置的软件进行最终结果的判读。

6 检测所用仪器设备

荧光检测仪、金属浴、离心机等。

7 检测流程

7.1 样品 DNA 的提取

7.1.1 木屑中线虫 DNA 的提取

在寄主植物或其制品上用 6.5mm 的钻头钻取木屑 1g~2g，加入 2mL 离心管中，再加入 1.6 mL 裂解 A 液，5 μL B 液浸没木屑，放入设好程序的金属浴中，先在 65℃ 下加热 25 分钟，再 95℃ 下加热 5 分钟。12000r/min 离心 3 分钟，上清液既是提取好的 DNA 扩增模板。

[来源：GB/T 35342-2017， 附件 C，有修改]

7.1.2 线虫液 DNA 的提取

在 20 μL 线虫液中加入 20 μL 裂解 A 液，2 μL 裂解 B 液，放入设好程序的金属浴中，先在 65℃ 下加热 5 分钟，再 95℃ 下加热 5 分钟。12000r/min 离心 3 分钟，上清液既是提取好的 DNA 扩增模板。

两种提取方法的裂解液相同。裂解液分为 A 液和 B 液，A 液包含 2.5 mmol/LDDT，1.125%Tween20，0.025%Gelatin，2.5 倍 PCR Buffer；B 液为 20 μg/mL 的 Proteinase K。

[来源：GB/T 35342-2017， 附件 C，有修改]

7.2 试剂的设计与配置

7.2.1 引物设计：

建议使用长度在 30bp~35 bp 的引物，引物过短会影响扩增速度和检测灵敏度；下游引物的 5' 端标记一个修饰基团(常用生物素)。引物设计避免形成二级结构而影响扩增；扩增子长度建议在 150bp~300bp，通常不超过 500bp。

正向引物序列：5' -TTCAGGATCTGATGCGCAGAAGTAGACAGG-3'

反向引物序列：5' -TACGCAAACTCCCATATTTGCTGCAGATCA-3'

7.2.2 荧光探针设计：

在上下游引物中间，设计一段长度为 46nt~52nt 与目的片段互补的序列；5' 端修饰一个抗原标记（典型 FAM）；在 5' 端和 3' 末端的中部位置标记一个 dSpacer（四氢呋喃，THF），作为 nfo 酶的识别位点；3' 末端标记一个修饰基团，例如氨基、磷酸基团或 C3-Spacer 等。

探针序列为：5' -CTGTTGGCTCTTAGATATCCTATGGAGCACGTATAGTTACAGATTG-3'

7.2.3 试剂配制

试剂配制体系表见附录 A。

7.3 扩增反应

（1）每个反应管缓冲液中加入核酸模板（可根据核酸浓度调整加入的核酸模板体积，并相应调整加入的 ddH₂O 体积，至模板与 ddH₂O 总体积为 45.4 μL）

（2）每个反应管中再依次加上游引物、下游引物和探针充分混匀；

（3）混匀后，将反应液甩（或快速离心）至管子底部，然后将反应管放入恒温设备中 39℃ 孵育 8min~12min；或将反应管放入荧光检测设备中，荧光检测程序设置为：恒温 39℃；每 30s 采集一次荧光值；反应时间 8min~12min。

（4）反应结束后，取 10 μL 加入含有 190 μL ddH₂O 的离心管中，混合均匀后，将稀释后的扩增产物反应液取 100 μL 加入试纸条的加样孔中，5mins 内观察质控线与检测线判读结果；或者通过配套核酸荧光检测设备实时采集信号，绘制荧光信号-时间曲线，计算 Ct 值，然后根据样品 Ct 值的大小及曲线的形状自动判定结果。

8 结果判定

8.1 荧光监测设备结果判定

每次检测需设置阳性及阴性对照；

阴性：没有典型扩增曲线，判定结果显示为阴性，无 Ct 值；

阳性：具有典型扩增曲线，判定结果显示为阳性，Ct 值 ≤ 30。

8.2 胶体金试纸条结果判定

每次检测需设置阳性及阴性对照；

阴性：试纸条质控区（Control Line，C 线）出现一条红色条带，检测区（Test Line，T 线）没有条带。阴性结果表明样本中不含待检测目的核酸或者其含量低于试纸条最低检出量；

阳性：试纸条出现两条红色条带，一条位于质控区（C 线），一条位于检测区（T 线）。阳性结果表明样本中含有待检测的目的核酸片段，其含量大于等于试纸条最低检出量。

无效：试纸条质控区（C 线）和检测区（T 线）均未出现条带。此结果提示所使用试纸条失效、损坏或操作有误。应重新扩增与检测。

9 记录和归档

9.1 仪器自动保存

实验记录自动保存到仪器的文件夹，文件名称为当天日期，以荧光曲线及 Ct 值表现结果。

9.2 胶体金试纸条保存

胶体金试纸条通过手机拍照，上传电脑或硬盘保存，以检测线和质控线表现结果。

附录 A
(资料性附录)
体系配制表

A. 1 体系配制表

表 1 体系配制

组分	体积 (μ L)
上游引物 (10 μ M)	2
下游引物 (10 μ M)	2
探针 (10 μ M)	0. 6
ddH ₂ O 和核酸模板	45. 4
总体积	50