STANDAARDPROTOCOL NAKTUINBOUW

Real-time RT-PCR (RT TaqMan PCR) voor pospiviroiden (CEVd, CLVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd en TPMVd) op zaden tomaat (*Solanum lycopersicum*).

Protocolnummer:	SPN-V043
Versie:	2.6
Datum:	20-04-2021
Validatie:	Gevalideerd

Dit rapport is vertrouwelijk. Niets uit dit rapport mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Naktuinbouw.

1. Doel

Het aantonen van de afwezigheid of de aanwezigheid van verschillende voor tomaat relevante pospiviroïden (CEVd, CLVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd en TPMVd) in tomatenzaad door middel van isolatie van RNA en detectie met behulp van TaqMan RT-PCR.

2. Principe/stroomdiagram

Met een RNA-isolatie kit wordt uit tomatenzaad RNA geïsoleerd m.b.v. KingFisher. De mogelijke aanwezigheid van pospiviroïde RNA wordt aangetoond met behulp van TaqMan RT-PCR's waarbij gebruik wordt gemaakt van selectieve primer sets en gelabelde TaqMan probes. In dit proces worden monsters vóór de extractie gespiked met DLVd. Door deze spike kan per submonster vastgesteld worden of de RNA extractie en TaqMan RT-PCR goed verlopen zijn.

3. Afkortingen

cDNA	Complementair DNA
CEVd	Citrus exocortis viroid
CLVd	Columnea latent viroid
Ct-waarde	"Cycle threshold" waarde (aantal cycli totdat drempelwaarde bereikt is)
DLVd	Dahlia latent viroid (spike viroïde)
DTT	Dithiothreitol
GH+ buffer	Guanidine–hydrochloride extractiebuffer
KF	King Fisher
NAC	Negatieve Amplificatie Controle
NIC	Negatieve isolatie controle tomatenzaad (procescontrole)
PAC	Positieve Amplificatie Controle
PCFVd	Pepper chat fruit viroid
PIC	Positieve isolatie controle PSTVd besmet tomatenzaad (procescontrole)
PSTVd	Potato spindle tuber viroid
RT TaqMan	Reverse transcriptase TaqMan
TASVd	Tomato apical stunt viroid
TCDVd	Tomato chlorotic dwarf viroid
TPMVd	Tomato planta macho viroid

4. Materialen

Apparatuur
Biorad CFX 96 PCR apparaat
Interscience BagMixer 100
KingFisher Flex 96 (ThermoFisher Scientific)
Thermoshaker

Reagentia/buffers
DLVd stock (spike)
DTT Sigma Aldrich
GH+ buffer (zie bijlage of 6M GH+ bufferoplossing van Actu-All Chemicals)
Primers en probes (zie bijlage)
Positief/negatief zaad (PIC/NIC)
Positieve RNA controles
Sbeadex maxi plant kit, 960 samples (LGC genomics, Cat. No. 41620)
UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x) (Quanta Biosciences)

Consumables
Hard-Shell® Low-Profile, Thin-Wall, Skirted 96-Well PCR Plates, White Well van Biorad (of vergelijkbaar)
KingFisher 96 tip comb for DW magnets, (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 97002534)
KingFisher 96 KF plate, 200µl (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 97002540)
KingFisher deepwell 96 plate, (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 95040450)

Maalzakken 100 ml (Interscience BagPage)

5. Werkwijze

5.1 Veiligheid en waarschuwingen

Viroïden kunnen in zeer hoge concentraties aanwezig zijn in plantenweefsel en contaminatie is al mogelijk bij aanraking. Verricht alle handelingen met handschoenen aan en gebruik filtertips .
GH+ buffer is schadelijk bij inademing, opname door de mond en aanraking met de huid. GH+ buffer bevat guanidine hydrochloride, hetgeen zeer gevaarlijke gassen vormt bij contact met chloor.

5.2 Uitvoering

5.2.1 Voorbewerken monsters tomatenzaad

1. Weeg per monster 3 submonsters van 1.000 of het benodigd aantal submonsters van 400 zaden (conform opdracht) af en breng elk submonster over in een maalzak (Interscience BagPage 100ml).
2. Spike de totaal benodigde hoeveelheid GH+ extractiebuffer met geconcentreerde DLVd stock conform instructie R&D.

NB. *Bewaar de DLVd stock aliquots bij -80 ˚C. De DLVd stock aliquots worden aangeleverd door R&D inclusief de te gebruiken verdunningsfactor.*

3. Neem per monsterserie één PSTVd besmet submonster (PIC met een relatief hoge Ct) en een negatieve controle (NIC met een Ct van >35) mee.
4. Voeg per 400 of 1.000 zaden resp. 12 of 20 ml GH+ met DLVd spike toe.
5. Week de zaden 30-60 minuten bij kamertemperatuur.
6. Extraheer de submonsters 90 seconden in de Interscience BagMixer (stand 4).
7. Pipetteer 1 ml zaadextract per submonster voorzichtig over in 1,5 ml epje.
8. Voeg zo spoedig mogelijk 30 µl DTT oplossing (5 M stock) per 1 ml monster toe. Vortex de epjes goed gedurende 10 seconden.
9. Zet thermoshaker aan (instelling: 65°C, 850 rpm) zodat deze kan voorverwarmen.
10. Incubeer de submonsters 15 minuten bij 65°C en 850 rpm in een thermomixer.
11. Centrifugeer de 1,5 ml buis 10 minuten bij 16.000 g op 4ºC.
12. Ga gelijk verder met RNA isolatie.

5.2.2 RNA isolatie

1. Gebruik voor de RNA isolatie de “Sbeadex Maxi Plant Kit” en het juiste invulformulier (MMS: Extractie & PCR formulieren).
2. Vul de platen als aangegeven in Tabel 1.
3. Breng 250 µl van het supernatant (vermijd pellet!) van de submonsters, de NIC zaad en de PIC zaad over in de binding plaat.
4. Bewaar het restant van het extract en de controles van de extractie bij -20°C totdat de toets is afgerond.
5. Zet alle platen in de juiste positie en volgorde in het apparaat.
6. Selecteer en start het programma KF7 op de KingFisher Flex 96 (Tabel 2).
7. Dek na de isolatie de elutieplaat af met sticker folie en zet deze op ijs.
8. Vervolg direct met PCR of vries het gezuiverde RNA in bij -20°C.

Tabel 1. Codering en vulling van KF platen

Soort plaat	Naam	Vulling		
KF deep well 96 plaat	Binding	600	µl	binding buffer PN (groen)
		50	µl	Sbeadex particle suspension (wit)
KF deep well 96 plaat	Was 1	600	µl	Wash buffer PN1 (rood)
KF deep well 96 plaat	Was 2	600	µl	Wash buffer PN1 (rood)
KF deep well 96 plaat	Was 3	600	µl	Wash buffer PN2 (geel)
KF 96 plaat	Elutie	100	µl	Elution buffer PN (zwart)

Tabel 2. King Fisher Flex 96 programma KF7

Stap	Plaat	Stappen per plaat
Tip 1	Tipholder	1. Pak de tip comb uit deze plaat (96 DW tip comb) 2. Laat tip comb achter in plaat 2 “Was 1”
Binding	Plaat 1 “Cel lysaat”	1. Snel mixen, 10 min. 2. Verzamel beads, 3 x 10 sec.
Was 1	Plaat 2 “Was 1”	1. Laat beads los, bodemmix, 20 sec. 2. Snel mixen, 10 min. 3. Verzamel beads, 3 x 10 sec.
Was 2	Plaat 3 “Was 2”	1. Laat beads los, bodemmix, 20 sec. 2. Snel mixen, 10 min. 3. Verzamel beads, 3 x 10 sec.
Was 3	Plaat 4 “Was 3”	1. Laat beads los, bodemmix, 20 sec. 2. Snel mixen, 10 min. 3. Verzamel beads, 3 x 10 sec.
Elutie	Plaat 5 “Elutie”	1. Laat beads los, bodemmix, 1 min. 2. Voorverwarmen en snel mixen bij 65ºC, 10 min. 3. Verzamel beads, 5 x 10 sec.

5.2.3 TaqMan RT- PCR

NB. *Werk zo veel mogelijk op ijs en stel de primer/probes mixen niet te lang bloot aan daglicht. Draag bij het maken van de mix een schone labjas en handschoenen om de kans op contaminatie te minimaliseren.*

1. Bereid de TaqMan RT- PCR mixen (Tabel 3a, 3b, 3c en 3d).
2. Breng 19 µl mix over in PCR platen.
3. Neem bij iedere run een blanco mixcontrole (NAC) mee.
4. Pipetteer 6 µl RNA van het monster bij 19 µl mix.
5. Neem bij iedere run de positieve RNA-controle (PAC) mee.
6. Dek de plaat af na toevoegen van het RNA.
7. Draai de plaat 30 seconden af in minicentrifuge om reagentia te centreren.
8. Run de TaqMan RT-PCR’s volgens onderstaand programma (Tabel 4).

Tabel 3a. PCR mix PSTVd, TCDVd, TPMVd (FAM), PCFVd (VIC) en DLVd spike (Texas Red)

PCR mix	1 reactie	
RNase-vrij water	11,75	µl
UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x) (Quanta Biosciences)	6,25	µl
Pospi A primer/probemix (#89)	1	µl
Subtotaal	19,0	µl
Monster (RNA)	6,0	µl
Totaal	25,0	µl

Tabel 3b. PCR mix CEVd, CLVd (FAM) en DLVd (spike)(Texas Red)

PCR mix	1 reactie	
RNase-vrij water	11,75	µl
UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x) (Quanta Biosciences)	6,25	µl
Pospi B primer/probemix (#90)	1	µl
Subtotaal	19,0	µl
Monster (RNA)	6,0	µl
Totaal	25,0	µl

Tabel 3c. PCR mix TPMVd (FAM) en Nad5 (Texas Red)

PCR mix	1 reactie	
RNase-vrij water	11,75	µl
UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x) (Quanta Biosciences)	6,25	µl
Pospi C primer/probemix (#91)	1	µl
Subtotaal	19,0	µl
Monster (RNA)	6,0	µl
Totaal	25,0	µl

Tabel 3d. PCR mix TASVd (FAM)

PCR mix	1 reactie	
RNase-vrij water	11,75	µl
UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x) (Quanta Biosciences)	6,25	µl
Pospi D primer/probemix (#92)	1	µl
Subtotaal	19,0	µl
Monster (RNA)	6,0	µl
Totaal	25,0	µl

Tabel 4. TaqMan RT-PCR programma CFX96 (versie 2 of hoger) voor mix A-D

	temperatuur	tijd
hold	50°C	10' 00"
hold	95°C	3' 00"
40 cycli	95°C	0' 10"
	60°C + plate read	1' 00"

6. Beoordeling en interpretatie

6.1 Beoordeling toetsresultaat

- Zet via “view/edit plate” voor alle 96 wells zowel het FAM, VIC als TR signaal aan.
- Gebruik single threshold instelling (RFU 200).
- Controleer voor positieve monsters of vorm van curve correct (S-vormig verloop) is. Vergelijk zo nodig met PIC zaad.
- Let op atypische curves en/of curves die net boven de drempel waarde uitkomen. Overleg met eindverantwoordelijke om na te gaan of het signaal of ruis is.
- Houd performance van PC’s bij in de tijd om een overzicht te houden van de betrouwbaarheid van de toets.
- Zie beslissingsmatrix (Tabel 5a, b, c en d) voor interpretatie van uitslagen van monsters. Op basis van signaal in verschillende kanalen kan een indicatie gekregen worden van identiteit van viroïde.

6.2 Geldig verklaring van toetsresultaat

- Toetsuitslagen zijn geldig indien de Ct waarden van de spike DLVd $\leq$32, tenzij Ct PSTVd/TCDVd/TPMVd of CEVd/CLVd $\leq$32. Nad5 Ct >32 is acceptabel onder voorwaarde dat de spike DLVd $\leq$32. (overleg in dit geval met eindverantwoordelijke over de uitslag/vervolg actie).
- Toetsuitslagen mogen alleen worden afgegeven indien de positieve controles (Ct PIC en PAC een duidelijk signaal geven).
- Toetsuitslagen mogen alleen worden afgegeven indien er geen zwak positief signaal in de negatieve controlemonsters wordt waargenomen (Ct moet >35 zijn).
- Neem contact op met de eindverantwoordelijke wanneer de resultaten afwijken van het verwachtingspatroon.

6.3 Beslissingsmatrix (submonster niveau)

Tabel 5a. Beslissingsmatrix voor mix Tabel 3a. PCR mix PSTVd, TCDVd, TPMVd (FAM), PCFVd (VIC) en DLVd (spike)(TR)

Ct FAM	Ct VIC	Ct TR	
>32	>32	≤32	PSTVd, TCDVd en TPMVd (deel isolaten) [a] niet aangetoond PCFVd niet aangetoond
>32	≤32	≤32	PSTVd, TCDVd en TPMVd niet aangetoond PCFVd aangetoond
≤32	>32	≤32	PSTVd en/of TCDVd en/of TPMVd aangetoond PCFVd niet aangetoond
≤32	≤32	≤32	PSTVd en/of TCDVd en/of TPMVd aangetoond PCFVd aangetoond[b]
>32	>32	>32	Ongeldig/herhalen

Tabel 5b. Beslissingsmatrix voor mix Tabel 3b. PCR mix CEVd, CLVd (FAM) en DLVd (spike)(TR)

Ct FAM	Ct TR	
>32	≤32	CEVd en CLVd niet aangetoond
≤32	n.v.t.	CEVd en/of CLVd aangetoond
>32	>32	Ongeldig/ herhalen

Tabel 5c. Beslissingsmatrix voor mix Tabel 3c.PCR mix TPMVd (FAM) en Nad5 (TR)

Ct FAM	Ct TR	
>32	≤32	TPMVd (deel isolaten) niet aangetoond[a]
≤32	n.v.t.	TPMVd aangetoond
>32	>32	Ongeldig/herhalen. Overleg met eindverantwoordelijke.

Tabel 5d. Beslissingsmatrix voor mix Tabel 3d.PCR mix TASVd (FAM)

Ct FAM	
>32	TASVd niet aangetoond
≤32	TASVd aangetoond

[a] TPMVd niet aangetoond als zowel mix A als mix C negatief zijn.
[b] Signaal kan lekken van VIC naar FAM kanaal bij hoge PCFVd concentratie. Gebruik singleplex Boonham om te bevestigen of PSTVd/TCDVd en/of TPMVd aanwezig is (SPN-V003)

6.4 Afgeven uitslag van toetsresultaat

-

7. Naslagwerk en referenties

Literatuur:

- Bakker, D., Bruinsma, M., Dekter, R.W., Toonen, M.A.J., Verhoeven, J. Th. J. and Koenraadt, H.M.S. 2015. Detection of PSTVd and TCDVd in seeds of tomato using real-time RT-PCR. EPPO Bulletin. Volume 45, Issue 1, pages 14–21,
- Boonham, N., L. González-Pérez, ,M.S. Mendez, E. Lilia Peralta, A. Blockley, K. Walsh, I. Barker & R.A. Mumford, 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. Journal of Virological Methods 116:139-146.
- Botermans, M., van de Vossenberg, B. T. L. H., Verhoeven, J. Th. J.,Roenhorst, J. W., Hooftman, M., Dekter, R. & Meekes, E. T. M. (2013). Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. J Virol Methods 187, 43–50.
- Koenraadt, H., Jodlowska, A., van Vliet, A. & Verhoeven, K. 2009. Detection of TCDVd and PSTVd in seeds of tomato. Phytopathology 99, S66.
- Harrie Koenraadt, Agata Jodlowska, Maaike Bruinsma, Michel Ebskamp, Ko Verhoeven and Annelien Roenhorst. (2017) Biological relevance of the detection of pospiviroids on pepper and tomato seeds (poster at APS, San Antonio, Tx)
- Menzel, W., Jelkmann, W., and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. Virol. Methods 99: 81-92.
- Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Marn, M.V., Plesko, I.M., Molinero-Demilly,V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M., Papayiannis, L., Perez-Egusquiza, Z., Mehle, N., Jansen, C., Nielsen, S.L., 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. Journal of Virological Methods 169, 207–210.
- Mumford, R.A., A.L. Skelton, N. Boonham, K.I. Posthuma, M.J. Kirby, & A.N. Adams, 2001. The Improved Detection of Strawberry Crinkle Virus Using Real-Time RT-PCR (TaqMan®). Acta Horticulturae 656: 81-86.

Handleidingen:

- Sbeadex maxi plant Kit (LCG genomics)
- UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4x)

8. Historie en revisiebeleid

- 20-12-2013 versie 1.0
  ~~Protocol op basis van ISO17025 geaccrediteerde PSTVd/TCDVd zadentoets (SPN-V003, versie 3.1) voor tomaat.~~ Overnacht vóórweken ingeperkt van overnacht tot 30 minuten i.v.m. beperking viroïdeafbraak tijdens imbibitie van zaden. Gebruik van DLVd spike als interne proces controle (IPC) in multiplex RT TaqMan i.p.v endogene NAD5 target omdat hoeveelheid NAD5 RNA extreem variabel (14-40) is in de matrix zaad. Gebruik van GH+ extractriebuffer i.p.v. PN1 extractiebuffer (LGC) omdat afbraak RNA in GH+ extractiebuffer veel minder is dan in PN1 extractiebuffer. Hierdoor is toets voor PSTVd significant (ca. factor 10) gevoeliger dan toets op basis van PN1 extractiebuffer. Specificatie van methode voor het aanleveren van RNA aan nVWA. RNeasy opgezuiverd RNA kan wel gebruikt worden voor sequentieanalyse i.t.t. SBEADEX opgezuiverd RNA. Gebruik van verschillende nieuwe multiplex RT TaqMans om extra pospiviroiden zoals CEVd, CLVd, PCFVd, TASVd en TPMVd te kunnen aantonen naast PSTVd, TCDVd en MPVd.
- 03-02-2014 versie 1.1
  Correctie nummering primersets in bijlagen. 201d i.p.v. 201c, 349 a t/m c i.p.v. 249 a t/m c en 350a, 350b i.p.v. 250a, 250b.
- 21-04-2015 versie 1.2 - 5.2.1: Specificatie van spike: “10 µl DLVd/100 ml GH+ buffer”.
- 15-02-2017 versie 2.0
  Terminologie; “IAC” vervangen door “spike”. Toevoeging DTT aan zaadextract, aanpassing Kingfisher programma, vervanging PCR mix, aanpassing PCR programma, naamgeving viroïden veranderd tav MPVd (vervallen) en een aantal tekstuele wijzigingen.
  Specificatie van spike verwijderd.
- 31-10-2017 v2.1 - Correctie literatuur referenties in primer tabel in bijlage.
- 05-03-2019 v2.2 - Diverse tekstuele wijzigingen; Wijziging TaqMan in 1 µl mixen.

- 02-01-2020 v2.3 - Wijziging Quarantainestatus; opmerking: "Indien aangetoond dan afhandeling volgens Werkinstructie vondst en melding (mogelijk) quarantaine organisme (WI)" verwijderd. In omschrijving doel "mogelijke" verwijderd.
- 15-05-2020 v2.4 - Tabel 5a: “verdacht ” vervangen door “aangetoond”, zin: “[b] PSTVd verdachte extracten worden doorgestuurd naar de NVWA voor identificatie d.m.v. sequentieanalyse” verwijderd. Correctie 5.2.1-3 grenswaarde NIC >35. 6.2 “Neem contact op met eindverantwoordelijke wanneer er een zaadmonster verdacht is” verwijderd.
- 10-11-2020 v2.5 – Correctie in Historie & Revisie versie 1.0; eerste zin doorgehaald.
- 20-04-2021 v2.6 – diverse tekstuele wijzigingen.

9. Bijlagen

GH+ extractiebuffer (6M)	aanvullen tot 1 liter met demiwater	
guanidine-hydrochloride	573	g
NaAC-buffer (4M)	50	ml
EDTA (di-natrium)	9.3	g
PVP-10 (schadelijk)	25	g

NaAc buffer (4M)	aanvullen tot 1 liter met demiwater	
NaAC (CH_3COONa)	328	g
Controleer / stel pH 5,2		

Primer	**No. Naktuinbouw primer**	**Sequence**	**Lit. ref.**	**Eind concentratie (nM)**
PSTV-231F1	201a	GCCCCCTTTGCGCTGT	1	300
PSTV-296R	201b	AAGCGGTTCTCGGGAGCTT	1	300
PSTV-251T-	201d	6FAM-CAGTTGTTTCCACCGGGTAGTAGCCGA-BHQ1	1	200
DaVd1-FT	320a	GCTCCGCTCCTTGTAGCTTT	2	300
DaVd1-RT	320b	AGGAGGTGGAGACCTCTTGG	2	300
DaVd1-P	320c	Texas red-CTGACTCGAGGACGCGACCG-BHQ2	2	200
TPMVd-F1	350a	AAAAAAGAATTGCGGCCAAA	3	300
TPMVd-R	350b	GCGACTCCTTCGCCAGTTC	3	300
pUCCR2	307i	6FAM-CCGGGGAAACCTGGA-NFQ-MGB	4	200
CLVd-F	279a	GGTTCACACCTGACCCTGCAG	5	300
CLVd-F2	279b	AAACTCGTGGTTCCTGTGGTT	5	300
CLVd-R	279c	CGCTCGGTCTGAGTTGCC	5	300
CLVd-P	279d	6FAM-AGCGGTCTCAGGAGCCCCGG-BHQ1	5	200
CEVd-F2-	280a	CTCCACATCCGRTCGTCGCTGA	5	300
CEVd-R2-	280b	TGGGGTTGAAGCTTCAGTTGT	5	300
CEVd-P2-	280c	6FAM-CCCTCGCCCGGAGCTTCTCTCTG-BHQ1	5	200
TASVd-F2-	281a	CKGGTTTCCWTCCTCTCGC	5	300
TASVd-R2-	281b	CGGGTAGTCTCCAGAGAGAAG	5	300
TASVd-P2-	281c	6FAM-TCTTCGGCCCTCGCCCGR-BHQ	5	200
PCFVd-F	349a	TCTTCTAAGGGTGCCTGTGG	6	300
PCFVd-R	349b	GCTTGCTTCCCCTTTCTTTT	6	300
PCFVd-	349c	VIC-CTCCCCCGAAGCCCGCTTAG-BHQ1	6	200
nad5 F	151a	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	7	300
nad5 R	151b	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	7	300
nad5-Probe	151d	Texas red-AGGATCCGCATAGCCCTCGATTTATGTG-BHQ2	4	200

1: Boonham et al. (2004), 2: door Naktuinbouw, 3: door Naktuinbouw, 4: Botermans et al. (2013), 5: Monger et al. (2010), 6: door Naktuinbouw, 7: Menzel et al (2002) en Monger et al. (2010).

Samenstelling primer en probe mixen A, B, C en D		
Mix 89	Pospi primer/probe mix A	201a, 201b, 349a, 349b, 320a, 320b, 201d, 349c, 320c
Mix 90	Pospi primer/probe mix B	280a, 280b, 279a, 279b, 279c, 320a, 320b 280c, 279d, 320c
Mix 91	Pospi primer/probe mix C	350a, 350b, 151a, 151b, 307i, 151d
Mix 92	Pospi primer/probe mix D	281a, 281b, 281c