

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.10—2013

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of potato virus V

2013-08-30 发布

2014-03-01 实施



中华人民共和国 发布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 1135 共分为 10 部分：

- 第 1 部分：马铃薯癌肿病检疫鉴定方法；
- 第 2 部分：马铃薯黄化矮缩病毒检疫鉴定方法；
- 第 3 部分：马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法；
- 第 4 部分：马铃薯黑粉病菌检疫鉴定方法；
- 第 5 部分：马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法；
- 第 6 部分：马铃薯维腐病菌检疫鉴定方法；
- 第 7 部分：马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法；
- 第 8 部分：马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法；
- 第 9 部分：马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法；
- 第 10 部分：马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法。

本部分为 SN/T 1135 的第 10 部分。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李彬、闻伟刚、栗智平、田永蕾、吴翠萍、栗寒、刘洪义、王秀芬、李明福。

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯 V 病毒检疫鉴定的基本原则和方法。

本标准适用于所有进出境种薯、商品用薯、组培苗和脱毒苗等马铃薯种质和番茄等茄科作物中可能带有马铃薯 V 病毒的检疫鉴定。

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 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

3 原理

3.1 马铃薯 V 病毒学名与分类地位

学名:Potato virus V

缩写:PVV

分类地位:马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)。

3.2 检疫鉴定依据

马铃薯 V 病毒的血清学特性、分子生物学特性和病毒粒体形态是检疫鉴定的主要依据。
该病毒的相关资料参见附录 A。

4 仪器设备、用具及试剂

4.1 主要仪器设备

酶联检测仪、洗板机、高速冷冻台式离心机、PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、电泳仪,水平电泳槽,凝胶成像仪、水浴槽、透射电子显微镜、天平(感量:0.001 g)等。

4.2 主要用具

研钵和研棒、各种量程的可调移液器(2 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ L)、各种吸头(10 μ L,200 μ L,1 000 μ L)、96 孔酶标板、离心管(0.2 mL,0.6 mL,1.5 mL)等。

4.3 主要试剂

主要酶联测定试剂见附录 B,反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测试剂见附录 C,实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 D,生物学测定试剂参见附录 E。

5 样品制备

将马铃薯块茎种植在隔离温室中,于 25 ℃生长并进行症状观察。待长出 3~4 片叶后将表现症状的植株编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。对采集的叶片进行酶联免疫吸附测定、RT-PCR 检测、实时荧光反转录 PCR 检测、免疫电镜观察或生物学测定。也可以对马铃薯块茎或其他植物材料直接进行检测。

6 检测与鉴定

6.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

将制备的样品上清液加入已包被 PVV 抗体的 96 孔酶联板中,进行 DAS-ELISA 检测。设置阳性对照、阴性对照和空白对照,其中以样品提取缓冲液为空白对照,阴性对照(如叶片或块茎等)为健康的植物组织,阳性对照为含有 PVV 的植物组织。检测中,每个样品和对照均需设置两次重复。具体操作见附录 B。

6.2 RT-PCR 检测

分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。设置阳性对照、阴性对照和空白对照,其中以超纯水为空白对照,阴性对照和阳性对照的设置见 6.1。具体操作见附录 C。

6.3 实时荧光 RT-PCR 检测

样品总 RNA 提取后,采用一步法进行实时荧光 RT-PCR 扩增,即反转录过程和实时荧光 PCR 在同一个 PCR 管中进行。阳性对照、阴性对照和空白对照的设置见 6.2。具体操作见附录 D。

6.4 免疫电子显微镜观察

见 SN/T 1840。

6.5 生物学测定

具体操作参见附录 E。

7 结果判定

DAS-ELISA 检测结果为阳性,RT-PCR 检测结果或实时荧光 RT-PCR 检测结果为阳性,可判定待检样品带有马铃薯 V 病毒。必要时,可采用免疫电子显微镜观察方法或生物学测定方法进行辅助鉴定。

8 样品与结果记录保存

8.1 样品保存

经鉴定确定携带马铃薯 V 病毒的检测样品应在合适的条件下保存,病株在 -20 ℃或者超低温冰箱中保存,做好标记和登记工作,以备复核。

8.2 结果记录保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。酶联测定需有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳照片,实时荧光反转录 PCR 检测需有扩增曲线图谱,电镜观察需有病毒粒体照片,生物学测定需有鉴别寄主的症状照片。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯 V 病毒相关资料

A.1 分布地区

PVV 目前在欧洲的法国、荷兰、爱尔兰、英国以及南美洲的秘鲁均有分布。

A.2 寄主范围

马铃薯 V 病毒寄主范围较窄,仅限于茄科和一些藜科的植物,在自然界主要侵染马铃薯(*Solanum tuberosum*)。

A.3 病害症状

马铃薯 V 病毒自然侵染马铃薯后,有些品种表现为无症状侵染,嫩叶变小和轻微的叶片扭曲;也有些品种表现为花叶症状,下部叶片出现坏死斑点。人工接种马铃薯,多数品种会产生过敏反应,出现局部坏死斑和严重的系统坏死症状,但这些症状在田间很少发生。该病毒在马铃薯上为系统侵染,病毒能够传到薯块上,使薯块带毒。

A.4 传播途径

马铃薯 V 病毒侵染种薯后,可随种薯引进和调运进行远距离传播。在田间,PVV 可以通过介体蚜虫,如桃蚜(*Myzus persicae*)、杏圆尾蚜(*Brachycaudus helichrysi*)、马铃薯长管蚜(*Macrosiphum euphorbiae*)和马铃薯囊管蚜(*Rhopalosiphoninus latysiphon*)以非持久性方式传播。PVV 很容易经过汁液接种传播和嫁接传播,在田间扩散和蔓延,但未见有种子传播的报道。

A.5 血清学特性

马铃薯 V 病毒具有中等免疫原性,与马铃薯 A 病毒和一些野生的马铃薯花叶病毒在血清学上具有相关性,与马铃薯 Y 病毒(株系 O、N 和 C)血清学关系较远;但是,PVV 抗体在酶联免疫吸附测定中反应良好。

A.6 分子生物学特性

病毒基因组为正义单链 RNA,全长约 10 kb;病毒基因组 5'含有一段非编码区(5'-NTR),3'端具有 poly(A)结构。

A.7 病毒粒体形态

马铃薯 V 病毒粒体为线条状,长度约为 760 nm,宽为 11 nm~15 nm。PVV 在寄主细胞中可形成风轮状内含体。

附录 B
(规范性附录)

双抗体夹心酶联免疫吸附法测定

B.1 试材

B.1.1 酶联板的要求

使用质量有保证厂商生产的酶联板。

B.1.2 包被抗体

特异性的马铃薯 V 病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的马铃薯 V 病毒抗体。

B.1.4 底物

对硝基苯磷酸二钠(*p*-NPP- Na_2)

B.1.5 包被缓冲液(pH9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 HCl 调节 pH 值到 9.6,然后加蒸馏水至 1 L,4 ℃ 储存。

B.1.6 磷酸盐缓冲液(PBST pH7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温(Tween-20)	0.5 mL

加入 900 mL 蒸馏水溶解,调节 pH 值到 7.4,加蒸馏水定容至 1 L。

B.1.7 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP,MW24 000~40 000)	20 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

4 ℃ 储存。

B.1.8 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
牛血清白蛋白(BSA)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

4℃储存。

B.1.9 底物(*p*-NPP- Na_2)缓冲液(pH9.8)

氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺	97 mL

溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调 pH 值至 9.8,蒸馏水定容至 1 L,4℃储存。

B.2 操作流程

B.2.1 包被抗体

用包被缓冲液将抗体按说明稀释,加入酶联板的孔中,100 μL /孔,加盖,室温孵育 4 h 或 4℃冰箱孵育过夜,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次,1 min/次。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1:10(重量:体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,2 000 r/min,离心 10 min,上清即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行。

B.2.3 加样

加入制备好的检测样品、阴性对照、阳性对照,100 μL /孔,加盖,室温孵育 2 h 或 4℃冰箱孵育过夜,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次,1 min/次。

B.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释缓冲液按说明将酶标抗体稀释至工作浓度,并加入到酶联板中,100 μL /孔,加盖,室温孵育 2 h,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次,1 min/次。

B.2.5 加底物

将底物 *p*NPP 加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100 μL /孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

在不同的时间内如 30 min、1 h 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值,或用肉眼观察显色情况。

注:也可以按试剂盒说明进行操作。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:

缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.15,当阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算;
阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值大于 5~10;同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判断如下:

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 < 2 ,判为阴性。

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 > 2 ,判为阳性。

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近,判为可疑样品,任选 6.2 和 6.3 之一的方法加以验证。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量控制要求,则不能进行结果判断。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 主要试剂

C.1.1 RNA 提取的主要试剂

TRIzol 裂解液、三氯甲烷(氯仿)、异丙醇、75%的乙醇。

C.1.2 50×TAE

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
加去离子水至 1 L,使用时加水稀释至 1×TAE。	

C.1.3 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25%
蔗糖水溶液	40%(质量浓度)

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取 0.5 g 样品加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,剧烈振荡摇匀 3 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加入氯仿,200 μL,上下颠倒混匀,室温静置 3 min,4℃,12 000 g 离心 10 min,取上层水相;加等体积的异丙醇,颠倒混匀;4℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清液;加 1 mL 75%的乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500 g 离心 5 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的 30 μL ddH₂O,−20℃保存备用。

注:也可以采用试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应

C.2.2.1 引物序列

根据已报道的 PVV 基因组序列,设计一对扩增部分外壳蛋白基因的寡核苷酸引物。

正向引物 PVV-434F;5'-CTAACGCAAGGGCAACTCAG-3'

反向引物 PVV-434R;5'-CAGTGCTGCTGCCTTCATCT-3'

RT-PCR 产物大小 434 bp。

C.2.2.2 cDNA 合成

反转录总体系为 20 μL 。在 PCR 管中依次加入总 RNA、PVV-434R 引物(20 pmol/ μL)0.5 μL 、dNTP(10 mmol/L)1 μL ,补水至 10 μL ,65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min,冰上急冷,瞬离,再向 PCR 管中加入下列试剂:反转录酶(200 U/ μL)1 μL 、5 \times 反转录缓冲液 4 μL 、RNasin(40 U/ μL)0.5 μL 、ddH₂O 4.5 μL 。在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应:42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,—20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

注:也可以采用试剂盒进行合成 cDNA。

C.2.2.3 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.1,反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	加样量(μL)
10 \times PCR 缓冲液(无镁离子)	3.0
氯化镁(20 mmol/L)	2.0
dNTP(10 mmol/L)	2.0
PVV-434F(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
PVV-434R(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.25
cDNA 模板	2.0
ddH ₂ O	19.75

C.2.3 琼脂糖电泳

C.2.3.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.2%(质量浓度)配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。加入溴化乙锭(EB)浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插上样品梳。待凝胶凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

C.2.3.2 加样

取 1 μL 6 \times 加样缓冲液与 5 μL 样品混合,加入到凝胶样品孔中,并设置合适的 DNA 标准分子量物质。

C.2.3.3 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统上观察、拍照并保留结果。

C.3 结果判断

阳性对照在 434 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,如果样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定 RT-PCR 检测结果为阴性;如果样品出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定 RT-PCR 检测结果为阳性。

附 录 D
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 检测

D.1 试剂

RT-PCR Kit 购自生物技术公司,也可以使用其他等效产品。

D.2 实验步骤

D.2.1 探针与引物的设计

根据 GenBank 中公布的 PVV CP 基因的保守系列,设计了如下 1 对引物和探针。
上游引物(PVV-TF):5'-GCTCGATATGCATTTGATTTCTATG-3'
下游引物(PVV-TR):5'-CCACCATCCAATCCAAACAAG-3'
探针序列(PVV-probe):5'-Fam-TCCCGCACATCCGTCCGAGC-Eclipse-3'

D.2.2 RNA 提取

操作方法见附录 C.2.1。

D.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-PCR 一步法反应体系见表 D.1。

表 D.1 实时荧光 RT-PCR 一步法反应体系

试 剂 名 称	加样量/ μ L
2 \times 一步法 RT-PCR 缓冲液	10.0
PVV-TF(20 μ mol/L)	0.6
PVV-TR(20 μ mol/L)	0.6
PVV-probe(20 μ mol/L)	0.6
50 \times ROX 染料	0.4
反转录酶	0.4
RNA 模板	1.0
ddH ₂ O	6.4

D.2.4 实时荧光 RT-PCR 反应参数

反转录 42 $^{\circ}$ C 5 min;预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。反应结束后保存各项数据和图像。

注:本反应条件适用于 ABI 7000 型荧光 PCR 仪,如使用其他荧光 PCR 仪,可以根据仪器性能进行适当调整。

D.3 结果判定

D.3.1 荧光阈值设定

荧光阈值设定根据仪器噪音情况进行调整,或以阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。

D.3.2 质量控制

阳性对照的 Ct 值应小于 30.0 并出现典型的扩增曲线,阴性对照和空白对照无明显荧光信号增加值。如果不能满足上述要求,则不能进行结果判定。

D.3.3 结果判定

在满足 D.3.2 质量控制的条件下,对实时荧光 RT-PCR 检测的结果可判定如下:

样品无明显荧光信号增加值且无扩增曲线,判定为阴性。

样品 Ct 值 \leq 35.0,且出现典型的扩增曲线,判定为阳性。

样品 Ct 值在 35.0~40.0 之间时,应重新提取样品总 RNA 进行检测,如果结果仍无明显荧光信号增加值,则判为阴性;如果 Ct 值仍在 35.0~40.0 之间,则判为阳性。

附录 E

(资料性附录)

生物学测定

E.1 鉴别寄主及试剂

E.1.1 鉴别寄主

克利夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*)、心叶烟(*N. glutinosa*)、德伯纳(*N. debneyi*)、西方烟(*N. occidentalis*)、普通烟(*N. tabacum*) White Burley 品种、马铃薯(*Solanum tuberosum*) Estima、Desiree、Maris Piper 和 Pentland Crown 品种。

E.1.2 试剂

0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。

E.2 实验步骤

E.2.1 育苗

先将鉴别寄主种植于隔离温室(25℃)中,出苗后转移至小盆中,长出3~4片叶子时用于接种鉴定。

E.2.2 接种

接种前先将鉴别寄主放在暗室24 h,以提高接种的成功率。病样加1:1(质量:体积)预冷的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)在研钵中充分研磨,制备成病汁液。在接种的叶片上撒上少量硅藻土,将病汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶片表面。接种结束后,用水冲洗干净接种叶片。做好标记,置于隔离温室(25℃)中进行培养。每天观察记载寄主反应。

E.3 鉴别寄主的症状表现

克利夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*)和心叶烟(*N. glutinosa*):系统性脉明,脉带及花叶。

德伯纳(*N. debneyi*):在接种叶片上形成分散的褪绿斑,系统性脉明,脉带,花叶及褪绿斑和环斑。

西方烟(*N. occidentalis*):系统性脉明,脉带及花叶。

普通烟(*N. tabacum*) White Burley 品种:轻微的系统性脉明,褪绿斑,花叶及脉带。

马铃薯(*Solanum tuberosum*) Estima 品种:轻微的花叶症状。

马铃薯(*Solanum tuberosum*) Desiree 品种:轻微的斑驳症状。

马铃薯(*Solanum tuberosum*) Maris Piper 和 Pentland Crown 品种:在接种叶片上形成坏死斑,以及严重的系统坏死。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法
SN/T 1135.10—2013

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)64275323

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 28 千字
2014 年 3 月第一版 2014 年 3 月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 • 2-26582 定价 21.00 元



SN/T 1135.10-2013