

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1150—2015
代替 SN/T 1150—2002

南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Arabis mosaic virus*

2015-12-04 发布

2016-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1150—2002《南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法》。与 SN/T 1150—2002 相比,主要技术变化如下:

——增加了 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法的内容。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴际云、陈枝楠、郑耘、张伟锋、卢小雨、冯建军、王红英、龙海、李芳荣、胡运发、邓琼、邓丛良。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1150—2002。

南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了南芥菜花叶病毒的生物学测定、血清学检测、免疫电镜、RT-PCR 检疫鉴定方法。本标准适用于进出境植物种子苗木等繁殖材料和植物产品中南芥菜花叶病毒的检疫鉴定。

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。

GB/T 28073 南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法

SN/T 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 基本信息

学名:*Arabis mosaic virus*

缩写:ArMV

分类地位:豇豆花叶病毒科(*Comoviridae*),线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)。其他信息参见附录 A。

4 原理和方法

依据 ArMV 鉴别寄主的症状、病毒形态、免疫学特性及分子生物学特性进行检测判定。

5 仪器设备用具及设施

5.1 仪器设备

天平(感量 1/10 000 g)、pH 计、酶标仪、透射电子显微镜、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、恒温水浴锅、离心机、超低温冰箱等。

5.2 用具

微量移液器、研钵、离心管、花盆、消毒土等。

5.3 设施

植物隔离检疫温室。

6 试剂

DAS-ELISA 检测试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)、生物学测定试剂(见 8.5)。免疫

电镜检测试剂按照 SN/T 1840 的规定执行,实时荧光 RT-PCR 检测试剂按照 GB/T 28073 的规定执行。

7 样品制备

7.1 种子类

抽样按照 SN/T 2122 的规定执行。

将种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,于 25 ℃左右生长并进行症状观察。待长出 3 片~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。

7.2 苗木类

抽样按照 SN/T 2122 的规定执行。

将苗木种植于隔离温室内,于 25 ℃左右生长并进行症状观察。有症状的苗木单独检测。没有症状的分组检测,分组方法同 7.1。

8 检测方法

8.1 DAS-ELISA 检测

方法见附录 B。

8.2 免疫电镜检测

按照 SN/T 1840 的规定执行。

8.3 RT-PCR 检测

方法见附录 C。

8.4 实时荧光 RT-PCR 检测

按照 GB/T 28073 的规定执行。

8.5 生物学测定

8.5.1 接种

病叶加 1:1(质量:体积)的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)于研钵中充分研碎,在待接种植物叶片表面均匀洒上硅藻土,用手指蘸取研磨好的汁液轻轻涂抹于叶片表面。

8.5.2 鉴别寄主症状

对经 DAS-ELISA 检测出的阳性样品植株,采其叶片,加入适量样品提取缓冲液研磨后的汁液,在室温(20 ℃~25 ℃)条件下,用摩擦接种法接种栽种于检疫隔离温、网室中的昆诺藜或苋色藜、黄瓜、“Prince”菜豆、矮牵牛和番杏等鉴别寄主植物。

昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)或苋色藜(*C. amaranticolor*):接种后 4 d~6 d 接种叶出现局部褪绿斑,然后出现系统褪绿斑驳。

黄瓜(*Cucumis sativus*):接种子叶 5 d~7 d 后出现局部褪绿斑或小型坏死环斑或黄斑,后出现系统环线脉,畸形。

“Prince”菜豆(*Phaseolus vulgaris* cv.Prince):接种5 d~7 d后表现为局部褪绿、坏死或畸形。

矮牵牛(*Petunia hybrida*):接种叶出现局部枯斑或坏死环斑,接着表现系统褪绿环斑或线纹或明脉。

番杏(*Tetragonia expansa*):接种3 d~7 d后接种叶出现细轮纹,后表现环斑。

9 结果判定

DAS-ELISA 检测为阳性后,RT-PCR 或免疫电镜检测结果为阳性可判定检出黄瓜花叶病毒。如果上述方法还不能判定检测结果,可进行生物学测定,并进行复验。若 DAS-ELISA 检测为阴性,则判定为未检出该病毒。

10 样品和档案保存

10.1 样品保存

经检测确定携带 ArMV 的样品在合适的条件下保存。种子保存在 4 °C,病株在 -20 °C 或者 -70 °C 冰箱中保存,提取的 RNA 样品若需长期保存应放置于 -70 °C 冰箱。做好标记和登记工作。

10.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、登记时间、实验地点、检测方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。DAS-ELISA 检测需有试验的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳结果,实时荧光 RT-PCR 需有数据和图片,免疫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)
生物学特性

A.1 粒体形态

ArMV 为等轴多面体球状病毒, 直径为 30 nm。

A.2 基因组

ArMV 为单链 RNA 病毒, 基因组由两条单链正义 RNA 组成, RNA1 为 7.3 kb, RNA2 为 3.8 kb, 多个分离物的基因组已被测序, 各分离物之间序列同源性很高。

A.3 寄主范围

ArMV 可侵染 174 属 215 种植物。主要为害的作物有大麻(*Cannabis sativa*)、啤酒花(*Humulus lupulus*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、草莓(*Fragaria ananassa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、香石竹(*Dianthus caryophyllus*)、水仙(*Narcissus tazetta*)、蔷薇(*Rosa multiflora*)、草木樨(*Melilotus suaveolens*)、郁金香(*Tulipa gesneriana*)、芹菜(*Apium graveolens*)、薄荷(*Mentha sppiperita*)、丁香(*Syringa oblata*)、大豆(*Glycine max*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、马铃薯(*Solanum tuberosm*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、番茄(*Lycopericon esculentum*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、蚕豆(*Vicia faba*)、豌豆(*Pisum scotwum*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、花椰菜(*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、胡萝卜(*Daucus carota*)等。

A.4 病害症状

ArMV 引起的最常见症状是叶片斑驳和脱落、植株矮化、严重畸型、耳突。症状随着寄主植物、病毒的分离物、栽培条件、季节和年份的不同而改变。有时候 ArMV 的侵染是隐症的, 并不会在寄主植物上表现症状。

ArMV 侵染不同寄主后表现的如下症状: 葡萄上表现“软皮”和茎沟槽症状; 草莓上表现花叶和黄化皱缩; 黄瓜上病叶表现黄色斑点, 绿色部分呈不正常的黑色; 莴苣表现为矮化、褪绿、坏死和心部退化; 啤酒花根部表现为不正常的黑色, 且叶子变小; 树番茄上早春表现为轻微褪绿环斑驳, 以后随着季节的延续逐渐消失, 果实症状为黄色褪绿斑驳; 欧洲白蜡树的叶子上表现为褪绿斑驳, 叶形呈锯齿状或栎树叶状; 烟草表现环斑, 叶片缺刻破损, 心叶卷曲。

A.5 分布地区

欧洲: 奥地利、白俄罗斯、比利时、保加利亚、塞浦路斯、捷克共和国、丹麦、芬兰、法国、德国、匈牙利、爱尔兰、意大利、拉脱维亚、立陶宛、卢森堡公国、摩尔多瓦、荷兰、挪威、波兰、罗马尼亚、俄罗斯、斯洛伐克、斯洛文尼亚、瑞典、瑞士、英国、乌克兰和南斯拉夫。

亚洲:日本、哈萨克斯坦、土耳其、伊朗。

非洲:南非。

北美洲:加拿大、美国。

大洋洲:澳大利亚、新西兰。

A.6 传播方式

ArMV 可通过汁液摩擦接种、种苗和介体线虫传播。通过种子传播的寄主:莴苣(*L. sativa*)、松草莓(*F. ananassa*)、大豆(*G. max*)、甜菜(*B. vulgaris* var. *saccharifera*)、番茄(*L. esculentum*)等;通过块茎传播的寄主:马铃薯(*S. tuberosm*)等;通过鳞球茎传播的寄主:水仙(*N. tazetta*)、郁金香(*Tulipa gesneriana*)、百合(*Lilium brownii* var. *colchesteri*)等;通过苗木传播的寄主:葡萄(*V. vinifera*)、草莓(*F. ananassa*)、啤酒花(*H. lupulus*)、香石竹(*D. caryophyllus*)、蔷薇(*R. multiflora*)等。传播介体主要为异尾剑线虫(*Xiphinema diversicaudatum*)。

附录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测

B.1 试剂

B.1.1 包被缓冲液(pH 9.6)

将碳酸钠(Na_2CO_3)1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2.93 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 9.6,并储存于 4 ℃。

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

将氯化钠(NaCl)8 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.2 g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.15 g、氯化钾(KCl)0.2 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 900 mL 蒸馏水,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值到 7.4,加水定容至 1 L。

B.1.3 PBST 缓冲液

将氯化钠(NaCl)8 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.2 g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.15 g、氯化钾(KCl)0.2 g、吐温-20(Tween-20)5 mL 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。

B.1.4 样品提取缓冲液(pH 7.4)

将亚硫酸钠(Na_2SO_3)1.3 g、聚乙烯基吡咯烷酮(MW 24~4 000,PVP)20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g、吐温-20(Tween-20)20 mL 溶解于 1 000 mL PBST,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 7.4,并储存于 4 ℃。

B.1.5 酶标结合物缓冲液

将 PBST 缓冲液 800 mL、小牛血清白蛋白(BSA)2 g、PVP(MW 24~4 000,PVP)20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,加蒸馏水定容至 1 000 mL,并储存于 4 ℃。

B.1.6 底物缓冲液

将二乙醇胺 97 mL、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调整 pH 值至 9.8,并储存于 4 ℃。

B.2 操作步骤

B.2.1 包被

按照检测试剂盒说明操作。或用包被缓冲液稀释 ArMV 抗体(如 1:200),向微孔板中每孔加入 100 μL 包被抗体溶液,37 ℃下孵育 2 h~4 h 或 4 ℃下包被过夜。

B.2.2 捕获抗原

弃去孔中的抗体包被溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次。加入 100 μL 样品提取液到酶标板的孔中,每个样品重复 2 个,并设置阳性和阴性对照。37 ℃下孵育 2 h 或 4 ℃下孵育过夜。

B.2.3 加入酶标抗体

按照检测试剂盒说明操作。用酶标抗体缓冲液按比例稀释相应的酶标抗体(如1:200)。弃去孔中的检测样品提取液,用PBST洗4次~5次孔。每孔加入100 μL酶标抗体溶液。在室温下孵育2 h。

B.2.4 加底物

加入底物缓冲液将硝基苯磷酸二钠盐(*p*-nitrophenyl Phosphate,pNPP)配制浓 度为1 mg/mL的底物溶液。弃去酶标抗体溶液,用PBST洗4次~5次。每孔加入100 μL新配制的底物溶液。室温下避光放置30 min~60 min,待阳性对照孔明显显色。

B.2.5 吸光值的测定

用酶标仪在405 nm处读取吸光值。

B.3 结果判定

通过酶标仪上405 nm的OD值来判定。

对照孔的OD₄₀₅值(空白对照、阴性对照及阳性对照)应该在质量控制范围内,即:空白对照和阴性对照的OD₄₀₅值<0.15,当阴性对照孔的OD₄₀₅值<0.05时,按0.05计算。阳性对照有明显的颜色反应;孔的重复性基本一致。在满足了该要求后,结果原则上可判断如下:

样品OD₄₀₅值/阴性对照OD₄₀₅值明显>2,判为阳性。

样品OD₄₀₅值/阴性对照OD₄₀₅值明显<2,判为阴性。

样品OD₄₀₅值/阴性对照OD₄₀₅值在阈值附近,判为可疑样品,应重新做一次,或用其他方法加以验证。

附录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂**C.1.1 RNA 提取试剂**

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

C.1.2 50×TAE

Tris	242 g
冰醋酸	52.1 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 g

加去离子水定容至 1 L。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	400 g/L

C.2 试验步骤**C.2.1 总 RNA 提取**

称取样品 0.1 g, 液氮充分研磨。加入 1 mL Trizol, 混匀, 倒入 1.5 mL 离心管中。加入 0.2 mL 三氯甲烷, 剧烈振荡 15 s, 4 °C 条件下 12 000g 离心 10 min, 小心吸取上层水相至新离心管中。加入等体积异丙醇, 混匀, -20 °C 静止 10 min, 4 °C 条件下 12 000g 离心 15 min, 弃上层水相。加入 1 mL 75% 乙醇, 重悬沉淀, 4 °C 条件下 8 000g 离心 10 min, 弃上层乙醇相, 干燥沉淀。加入 30 μL DEPC-H₂O, 置于 50 °C 条件下 5 min 溶解沉淀, 存于 -80 °C 条件下备用。或按照供应商推荐的试剂盒抽提 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应**C.2.2.1 引物**

ArMV 的特异性引物及其序列见表 C.1, 位于 RNA2 的 CP 基因上, 预计扩增产物大小为 694 bp。

表 C.1 RT-PCR 的引物和序列

引物名称	引物序列	在 AB279740.2 ^a 上的位置
ArMV-F	5'-CAAGTTCTGACTATCCCACC-3'	2534-2554
ArMV-R	5'-TTCCAAATCCCACATTACCT-3'	3208-3227

^a 在 GenBank 上的基因序列登录号。

C.2.2.2 cDNA 合成

按表 C.2 列出的组分制备 RT 反应混合液 20 μL。反应条件为：25 °C 温育 10 min, 42 °C 反转录 1 h, 95 °C 处理 2 min~3 min。

表 C.2 cDNA 合成反应体系

试剂名称	加样量/μL
模板 RNA	2
反向引物(20 μmol/L)	1
5×AMV 缓冲液	4
dNTP(10 mmol/L)	2
AMV 反转录酶(5 U/μL)	1
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	1
DEPC 处理过的 H ₂ O	9

C.2.2.3 反应程序

将表 C.3 列出的组分加入 PCR 反应管中，充分混匀后进行 PCR 反应：94 °C 变性 30 s, 57 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。

表 C.3 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	终浓度	加样量/μL
10×PCR 反应缓冲液	10×	1×	2.5
氯化镁(MgCl ₂)	25 mmol/L	2.0 mmol/L	2
dNTP	10 mmol/L	0.4 mmol/L	1
ArMV-F	20 μmol/L	0.2 μmol/L	0.25
ArMV-R	20 μmol/L	0.2 μmol/L	0.25
Taq 酶	5 U/μL	0.06 U/μL	0.3
cDNA			3
补加水至总体积			25

C.2.3 琼脂糖电泳

C.2.3.1 制备凝胶

加入 TAE 配制质量浓度为 10 g/L 的琼脂糖，在微波炉中熔化混匀，冷却至 55 °C 左右。

C.2.3.2 加入溴化乙锭

加入浓度为 0.5 μg/mL 的溴化乙锭，混匀，倒入已封好的凝胶平台上，插入样品梳。待凝胶凝固后，拔出梳子，加入足够量的 TAE(缓冲液盖过凝胶表面约 1 mm)。

C.2.3.3 电泳

吸取 $10 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物, 加入 $2 \mu\text{L}$ $6\times$ 加样缓冲液混合均匀, 将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统下观察并保留结果。

C.3 结果判断

阳性对照在 694 bp 处有扩增条带, 阴性对照和空白对照无特异性扩增条带, 待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带, 可判定为阳性。结果达到质控要求, 且待测样品在 694 bp 处无扩增条带, 判定结果为阴性。

参 考 文 献

- [1] Davies D L, Clark M F, 1983. A satellite nucleic acid of arabis mosaic virus associated with hop nettlehead disease. *Annals of Applied Biology* 103, 439-448.
- [2] Davies D, Clark M, 1989. The detection and occurrence of additional nucleic acid species associated with hop isolates of arabis mosaic virus. In: *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauschholzhausen 1988* (Ed. by Eppler, A.), pp. 61-68. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- [3] Elkmann W, Maiss E, Breyel M, 1988. Production and use of cDNA clones from arabis mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 113, 483-491.
- [4] Kulshrestha S, Hallan V, Raikhy G, 2005. Reverse transcription polymerase chain reaction-based detection of *Arabis* mosaic virus and *Strawberry latent ringspot virus* in vector nematodes [J]. *Research Communications*, 89(10): 1759-1762.
- [5] Murant F, 1970. *Arabis* mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 16. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
- [6] Tirry L, Welvaert W, 1989. Differentiation of the hop strain from other *arabis* mosaic virus isolates by polyclonal and monoclonal antibodies. In: *Proceedings of the International Workshop on Hop Virus Diseases, Rauschholzhausen 1988* (Ed. by Eppler, A.), pp. 55-60. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- [7] Wetzel T, Beck A, Wegener U, 2004. Complete nucleotide sequence of the RNA1 of a grapevine isolate of *Arabis* m osaic virus. *Archives of virology*, 149: 989~995.
- [8] Wetzel T, Fuchs M, Bobko M, 2002. Size and sequence variability of the *Arabis* mosaic virus protein 2A[J]. *Arch. Virol.* 147(8): 1643-1653.
- [9] Wetzel T, Jardak R, Meunier L, 2002. Simultaneous RT-PCR detection and differentiation of *arabis* mosaic and grapevine leaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *J Virol Methods*, 101(1-2): 63-73.
- [10] 张有才, 陈宪斌, 焦慧燕, 1994. 南芥菜花叶病毒. *植物检疫*. 8(5): 284-285.
- [11] 郑耘, 陈枝楠, 陈富华, 2010. 侵染唐菖蒲和百合 3 种病毒的多重 RT-PCR 检测方法. *植物检疫*, 24(3): 19-22.