



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1612—2013
代替 SN/T 1612—2005

香石竹环斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Carnation ringspot virus

2013-11-06 发布

2014-06-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1612—2005《香石竹环斑病毒血清学检测方法》。

本标准与 SN/T 1612—2005 相比,主要技术变化如下:

- 增加了免疫捕获 RT-PCR 检测方法;
- 增加了免疫电镜检测方法;
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法;
- 增加了香石竹环斑病毒相关资料的附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国上海出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人:杨翠云、于翠、胡培龙、陶廷典、崔学慧、于子翔。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1612—2005。

香石竹环斑病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准主要规定了进境种苗中香石竹环斑病毒的 DAS-ELISA、免疫电镜、免疫捕获 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 等检疫鉴定方法。

本标准适用于进境种苗中香石竹环斑病毒的检疫鉴定。

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 香石竹环斑病毒基本信息

中文名:香石竹环斑病毒

英文名:Carnation ringspot virus

缩写:CRSV

分类地位:番茄丛矮病毒科(Tombusviridae),香石竹环斑病毒属(*Dianthovirus*)

传播途径:该病毒通过无性繁殖材料的运输进行长距离传播,近距离主要是由于植物间的接触、土壤污染和农事操作等引起病毒传播。

香石竹环斑病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

香石竹环斑病毒具有中等到强的免疫原性,易获得高质量的多抗血清,属内病毒之间有较弱的血清学交叉反应。

以香石竹环斑病毒的抗血清,采用 DAS-ELISA 或者免疫捕获 RT-PCR 进行病毒初筛,如果样品阳性,则采用实时荧光 RT-PCR、免疫电镜或者鉴别寄主反应,对阳性材料进行验证。两种及以上方法可进行病毒种类的检疫鉴定。

5 仪器设备、用具和试剂

5.1 仪器设备

酶标仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、超净工作台、电子天平(1/10 000 g)、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、水浴锅、高速冷冻离心机、-80℃超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、旋涡振荡器。

5.2 用具

可调式微量移液器(2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL、5 000 μL)及相应的无 RNase 吸头、无

RNase 离心管、PCR 管和研钵等。

5.3 主要试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯。CRSV 血清检测试剂、植物总 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子标记物、溴化乙锭、琼脂糖、溴酚蓝等。试剂配制见附录 B。

6 病毒检测

6.1 样品制备

将送检样品中有疑似病毒为害症状的植物组织放入研钵内研磨,并按重量和病毒抽提缓冲液1:10的比例稀释,制备的汁液分别盛装于 Eppendorf 管中,离心后吸取上清液作为待测样品。

症状描述参见附录 A。

6.2 双抗体酶联免疫吸附测定方法(DAS-ELISA)

按 6.1 方法进行样品制备获得的上清液用于 DAS-ELISA 检测。同时,设置阴性对照、阳性对照和空白对照,阴性对照的种类和材料应该尽量与所检测样品类型相一致。具体操作步骤见附录 C。

6.3 免疫捕获 RT-PCR 方法(IC-RT-PCR)

先用香石竹环斑病毒抗血清包被 PCR 管,洗涤后在 PCR 管中加入 6.1 制备的上清液,进行免疫捕获,然后反转录获得 cDNA,再进行 PCR 反应。具体操作步骤见附录 D。

6.4 实时荧光 RT-PCR 方法

采用 6.3 方法获得 cDNA,进行实时荧光 PCR 反应。也可按照植物总 RNA 提取试剂盒的规定提取样品中的 RNA,反转录后再进行实时荧光 PCR 反应。具体操作步骤见附录 E。

6.5 免疫电镜方法

利用香石竹环斑病毒抗血清富集植物材料中的病毒,在透视电子显微镜下观察病毒颗粒的形态特征,具体操作步骤按照 SN/T 1840 规定进行。如观察到直径为 34 nm 的球状病毒粒子,即可判定免疫电镜结果阳性。

7 结果判定

样品经 DAS-ELISA 或 IC-RT-PCR 检测为阴性时,可判定样品不携带香石竹环斑病毒。

样品经 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测为阳性时,且扩增产物序列与 CRSV 有高度同源性时,可判定样品携带香石竹环斑病毒。

样品经 DAS-ELISA 或 IC-RT-PCR 其中一种方法检测为阳性时,需要用实时荧光 RT-PCR、免疫电镜方法或者鉴别寄主反应其中的任何一种方法进行验证,如果实时荧光 RT-PCR 阳性、免疫电镜方法观察到病毒颗粒或者接种鉴别寄主表现相应症状时,可判定样品携带香石竹环斑病毒。

8 样品保存和结果记录

8.1 样品保存

经检测确定携带香石竹环斑病毒的样品,应妥善保存在 -80°C 冰箱中,并做好登记和标记工作。样品保存期限至少1年。

8.2 结果记录

记录包括:样品来源、种类、取样人员、实验的时间、地点、方法和结果、检疫人员的签字等。DAS-ELISA 检测应有酶联反应的数值,IC-RT-PCR 检测应有电泳照片及序列测定分析结果,实时荧光 RT-PCR 应有扩增图谱,免疫电镜检测需要有病毒颗粒图片,生物学测定应有鉴别寄主症状照片。

附录 A
(资料性附录)
香石竹环斑病毒简介

A.1 寄主范围

香石竹环斑病毒的实验寄主范围较自然寄主广,在自然条件下,CRSV 除侵染香石竹外,还可侵染多种果树如李树、梨树、苹果、葡萄、酸樱桃和甜樱桃树及果园里的杂草,如繁缕。

在实验条件下,CRSV 可侵染 25 科共 133 种植物,可系统侵染茄科、豆科和葫芦科的植物,非系统侵染的寄主范围更广。

A.2 为害症状

CRSV 侵染香石竹引起叶片环斑、斑驳,导致叶和花的扭曲及畸变,严重可致叶尖坏死。当 CRSV 与香石竹斑驳病毒(Carnation mottle virus)共同侵染时,症状加重。CRSV 侵染果树的症状较轻且很难发现。

CRSV 接种如下几种鉴别寄主可产生相应的症状,可用来作为该病毒的鉴定方法之一。

苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)和昆诺藜(*C. quinoa*):接种叶出现局部褪绿或坏死斑,通常无系统症状。

三生烟(*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN):接种叶出现褪绿环斑、枯斑及坏死斑,后期病斑连成一片。

豇豆(*Vigna unguiculata* ssp. *Sinensis*):接种叶产生局部坏死斑,接着系统感染叶产生斑驳、坏死斑、叶片卷曲或脉缩。

美国石竹(*Diathus barbatus*):接种叶产生环状病斑,接着为系统褪绿及坏死斑。

千日红(*Gomphrena globosa*):接种叶产生局部坏死环斑,接着系统感染叶产生病斑、斑驳和畸形。

菜豆(*Phaseolus vulgaris*):接种叶产生局部坏死斑,接着叶变白、坏死,产生不规则系统斑,坏死叶脉斑,最后无症带毒。



图 A.1 CRSV 接种昆诺藜



图 A.2 CRSV 接种苋色藜



图 A.3 CRSV 接种三生烟



图 A.4 CRSV 接种豇豆

A.3 分布地区

欧洲：丹麦、芬兰、法国、德国、意大利、立陶宛、荷兰、波兰和英国。

美洲：巴西、加拿大、哥伦比亚、墨西哥和美国。

大洋洲：澳大利亚、新西兰。

A.4 粒体形态

病毒粒体为直径 34 nm 的正二十面体($T=3$),由 180 个分子量为 38 kd 的蛋白亚基组成病毒粒子外壳。

A.5 基因组

基因组由 RNA-1 和 RNA-2 两条单链 RNA 分子组成,分别为 3.8 kb 和 1.4 kb。RNA-1 在缺少 RNA-2 时可单独在植物原生质体中进行复制,但侵染植物时需 RNA-1 和 RNA-2 的共同作用。

附录 B

(规范性附录)

试剂配制

B.1 10×PBST 缓冲液(pH7.4)

氯化钠(NaCl)	80 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	11.5 g
氯化钾(KCl)	2 g
吐湿 20(Tween-20)	5 mL
溶于 900 mL 的蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4,并定容至 1 000 mL。	

B.2 样品抽提缓冲液(pH7.4)

亚硫酸钠(Na ₂ SO ₃)	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)	20 g
叠氮化钠(NaN ₃)	0.2 g
吐温 20(Tween-20)	20 mL
溶于 900 mL 的 1×PBST 中,用 HCl 调节 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL。	

B.3 包被抗体缓冲液(pH9.6)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
溶解于 900 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.6,并定容至 1 000 mL。	

B.4 酶标抗体缓冲液(pH7.4)

1×PBST 缓冲液	800 mL
牛血清白蛋白(BSA)	2 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)	20 g
用无菌蒸馏水定容至 1 000 mL。	

B.5 底物(pNPP)缓冲液(pH9.8)

二乙醇胺	97 mL
叠氮化钠(NaN ₃)	0.2 g
溶解于 600 mL 的无菌蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.8,然后用蒸馏水定容至 1 000 mL。	

B.6 反应终止液

氢氧化钠(NaOH)120 g 溶于 1 000 mL 的无菌蒸馏水中,浓度 3 mol/L。

B.7 电泳缓冲液 TAE(50×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	52.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸钠(EDTA)	100 mL

用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

附录 C (规范性附录)

双抗体酶联免疫吸附测定方法(DAS-ELISA)

C.1 检测

C.1.1 根据检测需要将适量的孔条放于酶联板架上,包括 2 个阳性对照孔,2 个阴性对照孔,2 个空白对照孔和多个待检测样品孔。每个待测样品重复一次。

C.1.2 每孔加入 100 μL 用包被抗体缓冲液稀释至工作浓度的 CRSV 抗体溶液,封口膜包好,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h~4 h(或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜)。

C.1.3 清空孔中溶液,用 200 μL 的 1 \times PBST 洗涤酶联板 3 次,每次 3 min,然后在干净滤纸上扣干。

C.1.4 将 100 μL 制备的待测样品溶液加入到设计的待检测孔中,对照孔中也各加入 100 μL 相应的阴性对照、阳性对照和空白对照。封口膜包好,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h(或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜)。

C.1.5 洗涤,步骤同 C.1.3。

C.1.6 每孔加入 100 μL 用酶标抗体缓冲液稀释至工作浓度的 CRSV 酶标抗体溶液,封口膜包好,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。

C.1.7 洗涤,步骤同 C.1.3。

C.1.8 将 pNPP 溶于底物缓冲液中,使最终浓度为 1 mg/mL。每孔加入 100 μL 配好的底物溶液,室温孵育 0.5 h~2 h。必要时每孔加入 50 μL 3 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应。

C.1.9 酶标仪 405 nm 波长下检测各孔的吸收值并记录。

C.2 质量控制和结果判定

C.2.1 质量控制要求

缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.15,阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算。阳性对照有明显的颜色反应,孔的重复性以样品 OD 值的平行允许率控制,按照式(C.1)进行计算:

$$P = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{(\text{OD}_1 + \text{OD}_2) \times 1/2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{C.1})$$

式中:

P ——平行允许率;

OD_1 ——重复样品 1;

OD_2 ——重复样品 2。

当重复检测样品 OD 值平行允许率(P)小于 20%时,判定检测结果有效。

C.2.2 结果判定

若满足不了 C.2.1 的质量要求,则不能进行结果判定。

在满足了 C.2.1 的质量要求后,则按如下原则作出判定:

——样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值大于 2,结果判定为阳性。

- 样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近,判为可疑样品,需重做一次或者用其他方法进行验证。
- 样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值小于 2,判为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
免疫捕获 RT-PCR 方法

D.1 引物序列

上游引物:CRSV-F;5'-CCGATGTGCCCAAGTATGT-3'

下游引物:CRSV-R;5'-GGCTATGACGCGTGAAT-3'

扩增片段大小为 406 bp。

D.2 抗体吸附

将 CRSV 抗体用包被缓冲液作适量稀释,吸取 200 μL 包被 PCR 管,37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 2 h;用 PBST 洗 3 次,吸取 100 μL 按照 6.1 方法制备的样品上清液包被 PCR 管,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(或 37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 2 h);PBST 洗 3 次,DEPC- H_2O 洗 1 次,每次洗涤时间 1 min,短暂离心后吸去管底余液。

D.3 反转录

直接在吸附了病毒的 PCR 管中进行反转录。反转录体系总体积 20 μL ,其中 1 μL 下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$),4 μL 5 \times AMV 酶缓冲液,2 μL dNTPs(10 mmol/L),1 μL AMV 反转录酶(5U/ μL),1 μL RNA 酶抑制剂(40U/ μL),补足 DEPC- H_2O 至 20 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h(不同的反转录酶产品按规定的温度条件进行操作)。

D.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 D.1,每个样品设 2 个平行处理。检测时以含香石竹环斑病毒材料的 cDNA 或含有香石竹环斑病毒目标片段的质粒作为阳性对照,以健康植物材料作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照。

PCR 反应条件设置如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 延伸。

表 D.1 PCR 反应体系

名称	储存液浓度	终浓度	加样量/ μL
PCR 缓冲液	10 \times	1 \times	2.5
dNTP	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L	2
MgCl ₂	25 mmol/L	2.0 mmol/L	2
上游引物	25 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.2
下游引物	25 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.2
Taq 酶	5 U/ μL	0.06 U/ μL	0.3

表 D.1 (续)

名称	储存液浓度	终浓度	加样量/ μL
cDNA	—	—	2
补水至	—	—	25

D.5 琼脂糖凝胶电泳检测

用电泳缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖凝胶 (55 $^{\circ}\text{C}$ ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 时加入溴化乙锭至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 也可在电泳后进行染色)。在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面刚刚没过凝胶。将 9 μL PCR 扩增产物, 加 1 μL 10 \times 上样缓冲液上样。恒压 5 V/cm ~ 6 V/cm 电泳 40 min ~ 50 min。凝胶成像系统中观察电泳结果, 拍照并记录结果。

D.6 结果判断

通过观察, 阳性对照出现 406 bp 条带, 阴性和空白对照不会出现相应条带, 此时如果检测样品呈现相应条带应被判为阳性, 否则应被判为阴性。

如果是阳性可通过测序的方式进一步确认。如果 PCR 产物序列与香石竹环斑病毒的序列同源, 则可判定样品为香石竹环斑病毒阳性, 若序列不同源, 则判定样品为香石竹环斑病毒阴性。

附 录 E
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 方法

E.1 实验步骤

E.1.1 引物和探针序列

引物序列:上游引物:CRSV-F-163:5'-TTACCTGGCGCGCACTATT-3'

下游引物:CRSV-R-163:5'-GCTCTTGAGTATGAGAGCAAG-3'

探针序列:FAM-5'CAGCAACCAGAACCG 3'-TAQMAN-MGB

E.1.2 反转录获得 cDNA

抗体吸附和反转录的操作步骤,见附录 D。

也可按照植物总 RNA 提取试剂盒的规定提取样品 RNA,再反转录获得 cDNA。反转录操作步骤见附录 D。

E.1.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 E.1,每个样品设 2 个平行处理。并设阳性对照、阴性对照和空白对照,以含有香石竹环斑病毒的 cDNA 为阳性对照;以健康植物材料作为阴性对照;以水代替 DNA 模板作为空白对照。每种对照各做 2 个平行管。

表 E.1 实时荧光 PCR 反应体系

名称	储存液浓度	终浓度	加样量/ μL
PCR 缓冲液	10×	1×	2.5
dNTP	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.5
MgCl ₂	25 mmol/L	3.0 mmol/L	3.0
上游引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.5
下游引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.5
Taq 酶	5 U/ μL	0.04 U/ μL	0.2
探针	20 $\mu\text{mol/L}$	0.24 $\mu\text{mol/L}$	0.3
cDNA	—	—	1 μL
补水至	—	—	25 μL

E.1.4 实时荧光 PCR 反应参数

反应条件:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 共 40 个循环。操作方法按照仪器的使用说明进行,反应结束后保存各项数据和图像。

注:本反应条件适用于 ABI7500 型荧光 PCR 仪,也可使用其他荧光 PCR 仪,可根据仪器性能进行适当调整。

E.2 结果判定

E.2.1 阈值设定

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正常阴性对照扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准。

E.2.2 结果判定

在阳性样品和阴性样品 Ct 值正确的情况下,进行以下判定:

- 待测样品的 Ct 值为 40 或无 Ct 值时,则判定结果阴性。
- 待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,则判定结果阳性。
- 待测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,应重新进行测试,如果重新测试的 Ct 值为 40 时,则判定结果阴性。如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,则判定结果阳性。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
香石竹环斑病毒检疫鉴定方法
SN/T 1612—2013

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
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

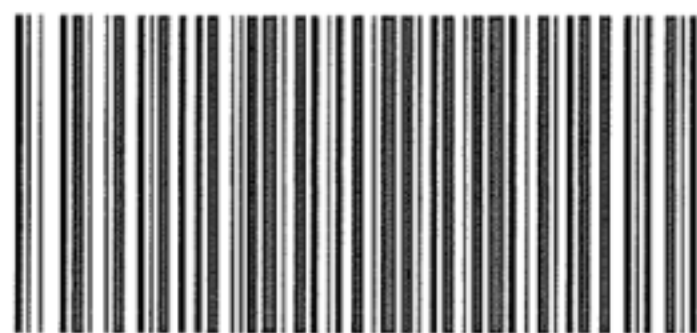
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 28 千字
2014年4月第一版 2014年4月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 • 2-26915 定价 24.00 元



SN/T 1612-2013