



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1618—2017
代替 SN/T 1618—2005

李属坏死环斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Prunus necrotic ringspot virus*

2017-07-21 发布

2018-03-01 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 1618—2005《李属坏死环斑病毒检测方法》。

本标准与 SN/T 1618—2005 相比,主要技术变化如下:

——增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法。

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:中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:李桂芬、魏梅生、张永江、马洁、孔君。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1618—2005。

李属坏死环斑病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中李属坏死环斑病毒检疫鉴定方法。
本标准适用于植物材料中李属坏死环斑病毒的检疫鉴定。

2 基本信息

学名:*Prunus necrotic ringspot virus*
缩写:PNRSV
分类地位:雀麦花叶病毒科(*Bromovirus*),等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)。
该病毒的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

根据李属坏死环斑病毒与抗体之间的特异性反应,对植物样品进行 ELISA 检测;根据该病毒核酸序列进行 PCR 特异性检测,通过电泳条带大小进行结果判定;根据该病毒核酸序列设计特异性引物和荧光探针,通过检测荧光信号进行结果判定。

4 仪器设备及试剂

4.1 仪器设备

酶标仪、天平(感量,1/10 000 g)、pH 计、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、隔离温室、恒温水浴、低温冰箱等。
微量移液器(2 μ L、10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、酶联板、研钵、离心管、花盆、消毒土等。

4.2 试剂

酶联免疫吸附测定试剂见附录 B 中 B.1,RT-PCR 检测试剂见附录 C 中 C.1,实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 D 中 D.1。

5 样品制备

木本寄主植物选其幼叶、果肉组织和花,草本植物选其叶子。有症状的样品编号单独检测,没有症状的样品分组(10~15 为 1 组)并编号检测。

6 检测方法

6.1 酶联免疫吸附测定

见附录 B。

6.2 RT-PCR 检测

见附录 C。

6.3 实时荧光 RT-PCR 检测

见附录 D。

7 结果判定

样品检测时,检测流程及结果判定按下述原则进行:

首先采用 DAS-ELISA 进行初步筛检。

——若 DAS-ELISA 检测结果为阳性时,

RT-PCR 的检测结果为阳性,则判定样品携带 PNRSV;

或采用实时荧光 RT-PCR 进行检测,若检测结果为阳性,则判定样品携带 PNRSV。

——若 DAS-ELISA 检测结果为阴性时,

RT-PCR 的检测结果为阴性,则判定样品不携带 PNRSV;检测结果为阳性,则对产物进行测序,测定的序列为 PNRSV 序列,则判定样品携带 PNRSV。

8 样品保存

经检测确定携带李属坏死环斑病毒的样品(叶片、花、果实) -80℃ 保存一年,做好标记和登记工作。

9 结果记录与资料保存

完整的记录包括:样品的来源、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 检测需有电泳结果图片,实时荧光 RT-PCR 检测需要有反应原始数据。

附录 A (资料性附录)

李属坏死环斑病毒背景资料

A.1 寄主范围

李属坏死环斑病毒病寄主范围十分广泛，自然和人工条件下，病毒可侵染的寄主达 21 科双子叶植物，其中可侵染的木本植物有：李属的欧洲李(*Prunus domestica*)、桃属的桃(*Amygdalus persica*)、樱属的欧洲甜樱桃(*Cerasus avium*)、樱属的欧洲酸樱桃(*Cerasus vulgaris*)、杏属的杏(*Armeniaca vulgaris*)、苹果属的苹果(*Malus pumila*)、蔷薇属的月季花(*Rosa chinensis*)、悬钩子属的椭圆悬钩子(*Rubus ellipticus*)、秋海棠属的秋海棠(*Begonia grandis*)；侵染的草本植物有啤酒花(*Humulus lupulus*)、烟草(*Nicotianu tabacum*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、豌豆(*Pisum sativum*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、草木犀(*Melilotus officinalis*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、百合(*Lilium brownii*)等。

A.2 病害症状

病害症状因分离物、栽培种和环境条件不同而不同。病毒的一些分离物不引起症状，仅仅在接种指示植物或用血清学等方法检测时才能发现被侵染；一些分离物在系统侵染的当年在幼叶上产生坏死斑和孔洞，但在以后的年份里，在叶子和果实上很少出现症状；另一些分离物在侵染当年产生坏死反应，随后是慢性的褪绿、斑驳和坏死、叶子耳突、畸形、延迟水果成熟，水果上有斑点症状。如在甜樱桃上出现了从无症状到严重皱缩花叶症状，慢性症状包括叶子上的褪绿点、叶扭曲，水果延迟成熟几天至几周，症状因病毒分离物不同而不同。在月季上无症状侵染很普遍，症状有花叶、开花延迟、秋天落叶早、产生更多不成形的花，被侵染的植株通常无活力。在啤酒花上产生褪绿线和环斑。

A.3 分布地区

分布地区广泛，如欧洲各国和美国都有发生。

A.4 传播方式

机械接种传播、花粉传播、种子传播，也可通过无性繁殖的苗木、组培苗等的运输进行长距离传播。

A.5 粒体形态

等轴对称球状体，直径 23 nm~27 nm，有些粒体为准等轴球状到短棒状(轴比为 1.01~1.5)；有些株系的粒体呈明显的棒状(轴比大于 2.2)；有些棒状粒体达 70 nm。棒状粒体的有无及比例因株系而异。

A.6 基因组

正单链 RNA,3 分体基因组,RNA-1 长 3.662 kb,RNA-2 长 2.507 kb,RNA-3 长 1.887 kb。

附 录 B
(规范性附录)

双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

B.1 试剂

B.1.1 包被抗体

特异性的李属坏死环斑病毒抗体。

B.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的李属坏死环斑病毒抗体。

B.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.4 1×PBST 缓冲液(pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.15 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
溶于 900 mL 蒸馏水中,并定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。	

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

亚硫酸钠(Na ₂ SO ₃)	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP,MW24 000~40 000)	20.0 g
溶于 900 mL 的 1×PBST 中,并用 1×PBST 定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。	

B.1.6 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
溶于 900 mL 蒸馏水中,并定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。	

B.1.7 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

牛血清白蛋白(BSA)	2.0 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP,MW24 000~40 000)	20.0 g
溶于 900 mL 1×PBST 中,并用 1×PBST 定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。	

B.1.8 底物缓冲液(pH 9.8)

二乙醇胺	97 mL
------	-------

氯化镁(MgCl_2)

0.1 g

溶于 800 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调 pH 至 9.8,定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。

B.2 实验步骤

B.2.1 包被抗体

按要求的浓度和需要的体积用包被缓冲液稀释包被抗体,加入到酶联板孔中,每孔 100 μL 。酶联板加盖或用保鲜膜包好,37 ℃ 孵育 2 h。清空孔中溶液,用 1×PBST 加满各孔,3 min 后倒掉孔中溶液,在吸水纸上拍干。再重复 2 次上述洗板过程。

B.2.2 样品制备与加样

待测样品按 1 : 10 加入样品抽提缓冲液,在研钵中研磨;2 000 r/min 离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照做相应处理或按说明书进行。按 100 μL /孔分别加入制备好的检测样品、阴性对照和阳性对照;酶联板加盖或用保鲜膜包好,4 ℃ 孵育过夜。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 1×PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.3 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,酶联板加盖或用保鲜膜包好,37 ℃ 孵育 4 h。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 1×PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.4 加底物

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

B.2.5 读数

在不同的时间内如 30 min、60 min、90 min、120 min 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值。

B.3 结果判定

B.3.1 质量控制要求

对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔)应在质量控制范围内,即:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值 < 0.15 ,当阴性对照孔的 OD_{405} 值 < 0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 > 5 ;同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 结果判定

在满足 B.3.1 的质量控制要求后,结果原则上可判定如下: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 2 左右,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 < 2 ,判为阴性。

若不满足 B.3.1 的质量控制要求,则不能进行结果判定。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 核酸提取试剂

Trizol 或合格的 RNA 提取试剂盒。

C.1.2 电泳缓冲液 TAE(50×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸(C ₂ H ₄ O ₂)	57.1 mL
乙二胺四乙酸二钠(Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	37.2 g
双蒸水定容至 1 000 mL,用时稀释至 1×TAE。	

C.2 检测步骤

C.2.1 核酸提取

称取 0.1 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,剧烈震荡 3 min;4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;将上清液移入一新离心管中,加入 0.5 mL 三氯甲烷,猛烈震荡 15 s;4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min;小心吸取上层无色水相到新离心管中;加入等体积异丙醇,混匀;室温静置 10 min;4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 75%的冷乙醇洗涤沉淀;4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后溶于 30 μL DEPC-H₂O 中, -20 ℃ 保存备用。

注:此处以 0.1 g 样品为例进行核酸提取,实际检测时如样品量有变化,加入的试剂可按比例调整;或者按照商品化 RNA 提取试剂盒进行操作。

C.2.2 引物序列

上游引物 H83:5'-TGGTCCCCTCAGAGCTCAACAAAG-3'
下游引物 C537:5'-ACGCGCAAAAGTGTCGAAATCTAAA-3'
预期扩增产物大小:455 bp

C.2.3 反转录

反应体系:20 μL;在 0.2 mL PCR 管中加入总 RNA 1 μL,dNTPs(10 mmol/L)1 μL,DEPC-H₂O 10 μL,引物 C537(20 μmol/L)2 μL,70 ℃ 保温 5 min;冰上放置 5 min;再加入 5×反转录缓冲液 4 μL,RNasin(40 U/μL)1 μL,M-MLV(200 U/μL)1 μL,42 ℃ 保温 1 h,得到 cDNA 后用作 PCR 的模板。

C.2.4 PCR 扩增

反应体系:20 μL;在 0.2 mL PCR 管中加入 10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)2 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.6 μL,正向引物及反向引物(均为 20 μmol/L)各 0.5 μL,Taq 酶(2 U/μL)1 μL,模板 2 μL 和 DEPC-H₂O 13.4 μL。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:94 ℃ 40 s,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 次循环,72 ℃ 10 min。

注:如采用商品化一步法 RT-PCR 检测试剂盒,可按照说明书进行操作,将步骤 C.2.3 和 C.2.4 合并进行。

C.2.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,进行电泳。电泳结束后在凝胶成像仪中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

C.3 结果判定

阳性对照在 455 bp 左右处有条带,阴性对照和空白对照无特异性条带,待测样品出现与阳性对照一致的条带,判定为阳性。

阳性对照在 455 bp 左右处有条带,阴性对照、空白对照及待测样品无特异性条带,判定结果为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 检测

D.1 试剂

核酸提取试剂同 C.1.1。

TaqMan One-step RT-PCR Mixture。

D.2 引物探针

上游引物 PNRSV-F: 5'-AATGCCCTGTCTAGGAAGGGGTT-3'

下游引物 PNRSV-R: 5'-CGCAAAAGTGTCGAAATCTAAATC-3'

探针 PNRSV-Probe: 5'-FAM-GGTTCTTGAAGGACCAACCGAGAGG-TAMRA-3'

D.3 核酸提取

方法同 C.2.1。

D.4 实时荧光 RT-PCR 反应

反应体系: 0.2 mL 离心管中加入 2×One Step RT-PCR 缓冲液Ⅲ 10 μL, Ex TaqHS(5 U/μL) 0.4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅱ 0.4 μL, PNRSV-F(10 μmol/L) 0.4 μL, PNRSV-R(10 μmol/L) 0.4 μL, PNRSV-Probe(10 μmol/L) 0.6 μL, ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL, 模板 RNA 2 μL, 补 DEPC-H₂O 至 20 μL。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序: 42 °C 10 min; 95 °C 10 s; 95 °C 15 s, 62 °C 1 min, 共 45 个循环。

D.5 结果判定

在空白对照及阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线、阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现典型扩增曲线的条件下:

待测样品的 Ct 值 ≥ 40 时, 判定 PNRSV 阴性。

待测样品的 Ct 值 ≤ 35 时, 判定 PNRSV 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 ≥ 40, 判定 PNRSV 阴性; 如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35, 且分离曲线明显时, 则判定结果为阳性。