

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3436—2012

藜草花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of sowbane mosaic virus

2012-12-12 发布

2013-07-01 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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。
本标准主要起草人：陈青、李桂芬、黄峰、陈红运、廖富荣、林石明。

藜草花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了藜草花叶病毒检疫鉴定的血清学和分子生物学检测方法。
本标准适用于可能带有藜草花叶病毒的植物的种子、苗木及植物产品的检疫鉴定。

2 原理

学名:sowbane mosaic virus
缩写:SoMV
分类地位:南方菜豆花叶病毒属(sobemovirus)成员。
抗原特性和基因组特征是检疫鉴定的主要依据。
详细资料参见附录 A。

3 仪器、设备与试剂

3.1 仪器设备和用具

微量研磨仪、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、水浴槽、pH 计、可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、20 μ L、2 μ L)、96 孔酶标板、研钵等;防虫温室。

3.2 试剂

主要试剂和缓冲液见附录 B 和附录 C。

4 检测样品的制备

4.1 种子样品制备

挑取畸形、不成熟种子播于灭菌土中,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,采集的叶片分成 2 份,根据需要分别用于酶联测定和分子生物学检测。
也可以挑取畸形、不成熟的种子直接进行酶联测定和分子生物学检测。

4.2 苗木

有症状(如叶片畸形、花叶、斑驳等)的苗木编号单独检测。没有症状的分组并编号检测,分组方法和检测方法同 4.1。

4.3 植物产品

植物产品有症状的部分(如:叶片畸形、花叶、斑驳等)单独编号检测。没有症状或无法观察症状的植物产品,应按比例取样,分组编号,分组方法和检测方法同 4.1。

5 检测与鉴定

5.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定

把制备的样品上清液加入已包被 SoMV 抗体的 96 孔酶联板中,进行 DAS-ELISA 检测。每个样品平行加到两个孔中。设阴性对照和阳性对照(健康的植物组织作阴性对照,感染了 SoMV 的植物组织作阳性对照),样品提取缓冲液作空白对照,其中阴性对照种类和材料(如种子或叶片)应尽量与检测样品一致。不同的检测试剂或试剂盒根据试剂或试剂盒的说明操作。具体操作见附录 B。

5.2 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。健康的植物组织作阴性对照,感染 SoMV 的植物组织作阳性对照,用超纯水作空白对照。具体操作见附录 C。

6 结果判定

如果 2 种方法检测结果为阳性,即可判定该样品携带藜草花叶病毒。一般是酶联测定为阳性后,RT-PCR 检测为阳性即可判断为样品携带藜草花叶病毒。如果是种子直接检测,出现阳性结果时,需进行生物接种试验。

7 结果记录与样品保存

7.1 结果记录

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,PCR 检测需有电泳结果照片。

7.2 样品保存

经检验确定携带 SoMV 的样品应在合适条件下保存,种子保存在 4℃,病叶冻干保存在-20℃或者-80℃冰箱中,做好标记和登记工作。

附 录 A
(资料性附录)
藜草花叶病毒相关资料

A.1 藜草花叶病毒学名和分类地位

学名:sowbane mosaic virus
缩写:SoMV
分类地位:南方菜豆花叶病毒属(sobemovirus)成员

A.2 抗原特性

SoMV 抗原性强。

A.3 粒体形态

藜草花叶病毒粒体为球形,直径约为 30 nm。

A.4 基因组

该病毒粒体包含 20%核酸和 80%的蛋白。基因组为 ssRNA,长 4.2 kb,含有 26%的 G,23.2%的 A,27.2%的 C,23.2%的 U,Sobemovirus 病毒基因组为单分体基因组,病毒 RNA 的 3'端既无 poly-A 结构,也无 tRNA 结构,其 RNA 的 5'端有一个 VPg,可能是侵染所必需的。

A.5 寄主范围

藜草花叶病毒寄主范围有限,自然寄主为藜科(Chenopodiaceae)植物,但是欧洲也发现很多果树和葡萄也感染藜草花叶病毒。有实验证明葡萄的分离物可经实验方法侵染其他科植物。

A.6 病害症状

昆诺藜:系统侵染,叶片斑驳、褪绿斑点,畸形,植株矮化。
苋色藜:系统侵染,叶片斑驳、褪绿斑点,畸形,植株矮化。
菠菜:系统隐症侵染。
墙生藜:斑驳。
甜菜:局部隐症侵染。

A.7 分布

SoMV 是 1952 年在加利福尼亚河边甜菜田里墙生藜(*Chenopodium murale*)上首次发现的,目前 SoMV 广泛分布于南美、中美、北美、南非、澳大利亚、保加利亚、加拿大、前捷克斯洛伐克、意大利、日本、

美国和前南斯拉夫南。

A.8 传播途径

SoMV 具有高度的传染性,易于机械传播,在温室中极易污染用作指示植物的藜科植物。可以通过汁液传播、昆虫传播和花粉、种子传播,可通过豌豆潜叶蝇、蚜虫、叶蝉等昆虫介体非持久性传毒;通过墙生藜(*Chenopodium murale*)种传,种传率可高达 70%,也可通过昆诺藜及(*Atriplex pacifica*)和灰藜种传,在昆诺藜上的种传率高达 60%,SoMV 还可通过菠菜(*Spinacia oleracea*)种子传播,病株上的花通过粉或者表面污染病毒的花粉都可作为侵染源。

附 录 B
(规范性附录)
双抗体夹心酶联免疫吸附测定

B.1 试材

- B.1.1 酶联板。
- B.1.2 包被抗体:特异性的藜草花叶病毒抗体。
- B.1.3 酶标抗体:碱性磷酸酯酶标记的藜草花叶病毒抗体。
- B.1.4 底物:对硝基苯磷酸二钠(*p*NPP)。
- B.1.5 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH7.4)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
蒸馏水定容至 1 L。	

B.1.6 样品抽提缓冲液(pH7.4)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
PVP (MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g
PBST 定容至 1 L,4℃储存。	

B.1.7 包被缓冲液(pH9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
蒸馏水定容至 1 L,4℃储存。	

B.1.8 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

BSA(牛血清白蛋白)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g
PBST 定容至 1 L,4℃储存。	

B.1.9 底物(*p*NPP)缓冲液(pH9.8)

MgCl ₂	0.1 g
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 程序

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,37℃孵育 4 h,清空孔中溶液,

PBST 洗涤 3 次。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1 : 10(质量 : 体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,7 500g 离心 10 min,上清液即为制备好的待测样品。阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行;空白对照为样品抽提缓冲液。

B.2.3 加样

根据检测需要设计 96 孔(或 48 孔)酶联板,包括 2 个阴性对照孔、2 个阳性对照孔、2 个空白对照孔和多个待测样品孔。加样量为 100 μ L/孔,每个样品设 1 个重复。4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,酶联板用 PBST 洗涤 3 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 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBST 洗涤 3 次。

B.2.5 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),按 100 μ L/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

用酶标仪在 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读 OD 值。
注:实际检测时,孵育温度、PBST 洗涤次数和显色读数时间需按照酶标抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

B.3 结果判定

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 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:

- 阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值 < 0.15;
- 阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2;
- 同一样品的 OD₄₀₅ 值应基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判定如下:

- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2,判为阳性;
- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值接近阈值,判为可疑样品,需重做一次或用其他方法验证;
- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 < 2,判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判定。质量控制标准和结果判定需按照检测抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

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 裂解液、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇。

C.1.2 反转录试剂

M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L)、5 \times 反转录缓冲液、dNTP(10 mmol/L)、RNasin(40 U/ μ L)、DEPC 处理过的 ddH₂O。

C.1.3 PCR 试剂

10 \times PCR 缓冲液、dNTP(10 mmol/L)、Taq 酶(5 U/ μ L)

C.1.4 电泳试剂

C.1.4.1 50 \times TAE

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA \cdot 2H ₂ O	37.2 g

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1 \times TAE。

C.1.4.2 6 \times 加样缓冲液

0.25%溴酚蓝
40%(质量浓度)蔗糖水溶液

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 植物组织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,室温静置 3 min;4 $^{\circ}$ C,12 000g 离心 10 min,取上清液;加入 200 μ L 三氯甲烷,上下颠倒混匀,室温静置 3 min;4 $^{\circ}$ C,12 000g 离心 10 min,取上层水相;加等体积的异丙醇,颠倒混匀;4 $^{\circ}$ C,12 000g 离心 10 min,弃上清液;加 1 mL 75%的乙醇洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C,7 500g 离心 5 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 30 μ L 经 DEPC(焦炭酸二乙酯)处理的 ddH₂O,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

C.2.2 RT-PCR 反应

C.2.2.1 引物与产物

RT-PCR 检测引物见表 C.1。

表 C.1 PCR 引物序列、产物

引物名称	序列(5'-3')	扩增产物 bp
SoMV CP510f	TGTTATGGGCAGGGCTATG	510
SoMV CP510r	TGTAAATCGCAAGGGCAG	

C.2.3 cDNA 合成

反转录总体系为 12.5 μL 。在 PCR 管中依次加入 3 μL 总 RNA, 1 μL SoMV 下游引物(CP510r, 浓度为 20 pmol/ μL), 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 7 min, 然后, 冰浴 5 min, 瞬时离心, 再向 PCR 管中加入下列试剂: M-MLV RT(200 U/ μL)0.5 μL 、5 \times RT 缓冲液 2.5 μL 、dNTP(10 mmol/L)0.5 μL 、RNasin(40 U/ μL)0.5 μL 、DEPC 处理的 ddH₂O 4.5 μL 。反应参数: 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

C.2.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.2。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。

表 C.2 PCR 反应体系

试剂名称	加样量 μL
10 \times PCR 缓冲液	2.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
SoMV CP510f(20 pmol/ μL)	1.0
SoMV CP510r(20 pmol/ μL)	1.0
Taq 酶(5 U/ μL)	0.2
cDNA 模板	3.0
ddH ₂ O	补足反应总体积至 25 μL

C.2.5 琼脂糖电泳

C.2.5.1 制备凝胶

将 1 \times TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5%(质量浓度)配好, 在微波炉中熔化混匀, 冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

C.2.5.2 加溴化乙锭(EB)

加入溴化乙锭浓度为 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.2.5.3 加样

用 5 μL 样品 PCR 产物与加样缓冲液(6 \times)按规定比例混合, 然后将其和适合的 DNA 相对分子质量标准物分别加入到琼脂糖凝胶孔中。

C.2.5.4 电泳

接通电源,电压 120 V 下使 DNA 向阳极移动。当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时,关闭电源。将整个胶置于紫外透射仪上观察。

C.2.5.5 结果判断

阳性对照在 510 bp 左右处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,如果样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性;如果样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,判定结果为阴性。



中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
藜草花叶病毒检疫鉴定方法

SN/T 3436—2012

*

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 字数 20 千字
2013年6月第一版 2013年6月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-25286 定价 18.00 元



SN/T 3436-2012