



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3439—2012

小西葫芦绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of zucchini green mottle 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、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈青、陈红运、陈岩、廖富荣、李旻、林石明。

小西葫芦绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了小西葫芦绿斑驳花叶病毒检疫鉴定的血清学和分子生物学检测方法。
本标准适用于可能携带小西葫芦绿斑驳花叶病毒的葫芦科作物种子和种苗的检疫。

2 原理

2.1 分类地位

学名:zucchini green mottle mosaic virus

缩写:ZGMMV

分类:烟草花叶病毒属(Tobamovirus)

2.2 检疫鉴定依据

抗原特性和基因组特征是检疫鉴定的依据。生物学特性和基因组特征参见附录 A。

3 仪器、设施及试剂

3.1 仪器与设施

酶联检测仪、电子天平(感量 0.000 1 g)、定性 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、恒温水浴、低温冰箱、普通冰箱、离心机等;微量移液器(2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L);酶联板、研钵等;防虫温室。

3.2 试剂

酶联免疫吸附测定试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)。

4 检测样品的制备

4.1 种子样品制备

挑取畸形不成熟的种子播于灭菌土中,置于防虫温室,待长出 3~4 片真叶后将表现症状的植株编号单独检测,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免疫测定和分子检测。

4.2 种苗样品制备

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

4.3 检测

4.3.1 酶联免疫吸附测定

把制备好的样品上清液加入已包被 ZGMMV 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。健康的植物组织作阴性对照,感染 ZGMMV 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。

4.3.2 PT-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 ZGMMV 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。

5 结果判定与记录

5.1 结果判定

酶联测定为阴性后,RT-PCR 检测结果呈阴性,判定未检出 ZGMMV。

酶联测定为阳性后,RT-PCR 检测结果呈阳性,判定检出 ZGMMV。

直接进行 RT-PCR 检测时,检测结果呈阳性并经序列测定验证后,判定检出 ZGMMV。

5.2 结果记录

记录包括:样品来源、种类、取样人员、原始记录和检测结果等。酶联测定应有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测应有电泳结果图片。

6 样品保存

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

附录 A (资料性附录)

ZGMMV 生物学和基因组特性

A.1 生物学特性

ZGMMV 的寄主包括西葫芦(*Cucurbita pepo*)、西瓜(*Citrullus vulgaris*)、甜瓜(*cucumis melo*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、葫芦(*Iagenaria siceraria*)。ZGMMV 侵染后可引起褪绿斑、花叶、斑驳、畸形症状。ZGMMV 主要通过葫芦科种子传播。

A.2 基因组特性

ZGMMV 基因组为正单链 RNA,全长约 6.4 kb,编码 4 个蛋白;病毒基因组 5'和 3'端分别含有一段非编码区。

A.3 抗原特性

ZGMMV 抗原性强,容易制备高滴度的特异抗体。

A.4 PCR 产物序列(486 bp)

```
ATGCCTTACT CTACCAGCGG TATTCGTTTCG CTCCTGCTT TTTCTAAGTC TTTTTTCCCT
TATTTGGAGT TGTATAATTT ATTAATAACA AATCAAGGGG CGGCTCTGCA GACGCAAAAT
GGTAAAGACA TTTTGCGTGA GTCGCTCGTT GGTTTGCTGT CTTCTGTTGC GTCACCCACT
TCACAGTTTC CTTCCGGTGT GTTTTATGTG TGGTCTCGTG AGTCGCGCAT TGCTGCTTTG
ATCGATTCTC TCTTCGGTGC TTTGGATTCA AGAAATAGGG CTATTGAAGT TGAAAACCCCT
TCTAATCCAT CGACTGGCGA AGCTTTGAAC GCGGTTAAGC GCAATGACGA CGCGTCTACA
GCCGCTCACA ACGACATTCC TCAGATTTTA TCTGCTCTGA ATGAAGGTGC GGGCGTTTTT
GATAGAGCGT CTTTTGAATC TGCTTTTGGT CTCGTGTGGA CCGCAGGTTC GTCTACCTCG
TCTTGA
```


SN/T 3439—2012

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 ZGMMV 抗体。

B.1.3 酶标抗体:碱性磷酸酯酶标记的 ZGMMV 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。

D.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 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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 μ L/孔,37 °C 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) 加入样品抽提缓冲液, 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; 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 1 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检测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 (空白对照孔、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。

注: 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。

SN/T 3439—2012

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

- C.1.1 Trizol 裂解液。
- C.1.2 三氯甲烷。
- C.1.3 异丙醇。
- C.1.4 75%乙醇。
- C.1.5 去离子水(DEPC 处理)。
- C.1.6 50×TAE

Tris 242 g
冰醋酸 57.1 mL
Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g
加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

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,剧烈振荡摇匀后室温保持 5 min;4℃,12 000g 离心 10 min,取上清液;加入 0.2 mL 三氯甲烷并剧烈振荡混匀;4℃,12 000g 离心 10 min,取上清液;加 0.6 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,室温保持 5 min;4℃,12 000g 离心 10 min,弃上清液;加 75%的乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500g 离心 2 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 30 μL 去离子水(DEPC 处理)中,-20℃保存备用。也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应

RT-PCR 检测引物见表 C.1。cDNA 合成体系 20 μL:在 0.2 mL 反应管中加入总 RNA 6 μL,1 μL 下游引物(20 μmol/L),去离子水 4 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,65℃水浴 5 min,取出后立即放在冰上,加入 5×First Strand 缓冲液 4 μL,40 U/μL RNase Block Ribonuclease Inhibitor 1 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,42℃水浴 2 min,然后再加入 200 U/μL Reverse Transcriptase 1 μL,混匀后 42℃水浴 50 min,70℃水浴 15 min,合成 cDNA。First Strand 缓冲液和 Reverse Transcriptase 的用量需要依据反转录酶的品牌进行调整。也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。

表 C.1 RT-PCR 检测的引物

检测基因	引物序列(5'-3')	
外壳蛋白	上游引物	ATgCCTTACTCTACCAgCg
	下游引物	CAAgACgAggTAgACgAAC

PCR 反应体系见表 C.2。反应参数:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 7 min。

表 C.2 PCR 反应体系

组 分	体 积 μL
10×PCR 缓冲液(MgCl ₂ plus)	2.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
上游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
Taq 酶(5 U/ μL)	0.2
cDNA 模板	2.0
去离子水	补足反应总体积为 25 μL

C.2.3 电泳

C.2.3.1 制备凝胶

配制 1.5%(质量浓度)的琼脂糖凝胶。溴化乙锭可直接加入琼脂糖凝胶中(浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$),也可在电泳完成后使用溴化乙锭染色。

C.2.3.2 电泳

用 1 μL 6×加样缓冲液与 5 μL 样品混合,然后将其和适合的 DNA 相对分子质量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于紫外透射仪上观察,拍照并保留结果。

C.3 结果判定

C.3.1 阳性对照在 486 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

C.3.2 阳性对照、阴性对照和空白对照结果正确,待测样品在 486 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

