



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4179—2015

水仙退化病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Narcissus degeneration virus

2015-02-09 发布

2015-09-01 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林石明、沈建国、廖富荣、方志鹏、吴媛、陈青、陈红运、黄蓬英。

水仙退化病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了水仙退化病毒血清学、分子生物学检疫鉴定方法。
本标准适用于石蒜科等寄主植物中水仙退化病毒的检疫鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 水仙退化病毒基本信息

中文名称:水仙退化病毒

学名:*Narcissus degeneration virus*

缩写:NDV

属于马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae),马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)成员。

传播途径:种球传播、机械传播。

NDV 的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

水仙退化病毒的血清学、分子生物学特性是制定本检疫鉴定方法的主要依据。

5 仪器设备及用具

电子天平(1/1 000 g)、高速冷冻离心机、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像分析系统、pH 计、各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L)、PCR 反应管、无 RNase Eppendorf 离心管(1.5 mL)、研钵、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、低温冰箱和超低温冰箱等。

6 检测与鉴定

6.1 抽样检查

按照 SN/T 2122 给出的方法进行抽样、取样。

6.2 捕获抗原酶联免疫吸附测试(PTA-ELISA)

按附录 B 给出的方法进行 PTA-ELISA 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,样品提取缓冲液作空白对照。

6.3 RT-PCR 检测

按附录 C 给出的方法进行 RT-PCR 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,并设置空白对照。

6.4 序列测定与分析

将 PCR 产物回收后,进行克隆、测序,或者 PCR 产物直接测序(序列测定可由专业的生物公司完成)。把测定的核苷酸序列(或翻译后的氨基酸序列)与已知的 NDV 相应序列进行比对。

注:序列比对可利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行,网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>。

7 结果判定

7.1 当 PTA-ELISA 和 RT-PCR 检测结果均为阳性时,则判定为检出水仙退化病毒(NDV)。

7.2 当 RT-PCR 检测结果为阳性、测定的序列为 NDV 序列时,则判定为检出水仙退化病毒(NDV)。

注:根据国际病毒分类委员会(ICTV)第 9 次分类报告中马铃薯 Y 病毒科病毒种类的分类标准,其中关于基因组序列的判定依据为:CP 氨基酸序列一致性小于 80%,或者 CP 基因或整个基因组的核苷酸序列一致性小于 76%;并且聚合蛋白的剪切位点不相同。

8 结果记录

记录样品信息及各项检测数据,包括样品来源、种类,检测时间、地点、方法和结果等,以及检测人员签字。血清学检测结果保留吸光值的数据,分子生物学检测结果保留电泳照片及测序峰图等。

9 样品保存

阳性的样品应妥善保存在低温或超低温冰箱中,并做好登记和标识,以备复核。

附 录 A
(资料性附录)
水仙退化病毒基本信息

A.1 寄主范围

石蒜科(Amaryllidaceae)的中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)、红口水仙(*N. poeticus*)、喇叭水仙(*N. pseudonarcissus*)和石蒜(*Lycoris radiata*)等。

A.2 病害症状

在水仙上表现为叶片褪绿条纹、斑驳,花杂色、畸形,以及植株矮化等症状。

A.3 分布地区

主要分布于英国、新西兰、中国等国家。

A.4 传播途径

鳞茎种球等繁殖材料是远距离扩散的主要途径;自然条件下机械传播。

A.5 粒体形态

病毒粒体为线条状,长 750 nm~770 nm(参见图 A.1)。

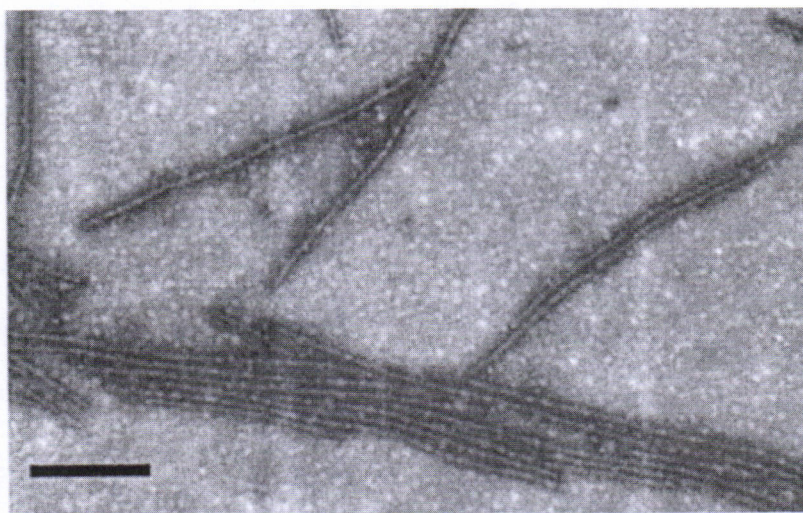


图 A.1 病毒的粒体(标尺为 200 nm;Chen, et al., 2007)

SN/T 4179—2015

A.6 病毒基因组

正义、单链 RNA 病毒,基因组全序列大小为 9 816 个核苷酸(不包含 polyA 尾),具有马铃薯 Y 病毒属的典型基因组结构特征(参见图 A.2)。

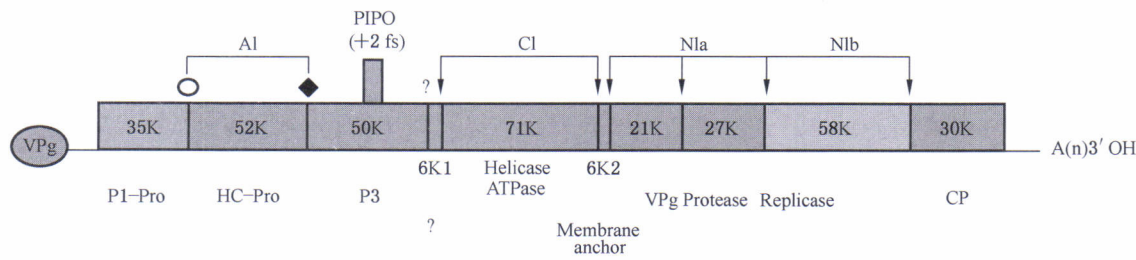


图 A.2 马铃薯 Y 病毒属基因组结构示意图(以烟草蚀纹病毒为例,King,et al.,2012)

附 录 B
(规范性附录)
PTA-ELISA 检测方法

B.1 试剂**B.1.1 间接样品提取缓冲液(pH 9.6)**

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW24~40 000)	20.0 g
加入蒸馏水 900 mL,用 HCl 调节 pH 到 9.6,然后加蒸馏水至 1 L,4 ℃ 储存。	

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 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
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 到 7.4,然后加水至 1 L。	

B.1.3 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液)

每升 PBS 中加入 0.5 mL 的吐温-20。

B.1.4 抗体稀释缓冲液/酶标抗体稀释缓冲液

三羟基氨甲烷盐酸盐(Tris-HCl)	13.0 g
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	2.0 g
氯化钠(NaCl)	9.0 g
吐温-20(Tween-20)	25.0 mL
脱脂奶粉	50.0 g
加入蒸馏水定容至 1 L,4 ℃ 储存。	

B.1.5 底物(pNPP)缓冲液(pH 9.8)

氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺 $[\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2]$	97.0 mL
溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调 pH 至 9.8,蒸馏水定容至 1 L,4 ℃ 储存。	

B.1.6 抗体

病毒抗体:水仙退化病毒抗体。

SN/T 4179—2015

酶标抗体:碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG。

B.2 程序

B.2.1 样品制备

称取一定量的待测样品(种球取芽上的幼叶或取外部鳞片、植株取叶片,每株取约 0.1 g,10 株混合成约 0.5 g~1.0 g 的样品),按 1:10(质量体积比)比例加入包被缓冲液,用研钵研磨成浆,8 000×g 离心 5 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说明书进行。

B.2.2 包被抗原

加入制备好的检测样品,同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。每个处理至少设 2 个重复。100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h 或 4℃ 冰箱孵育过夜,倒去酶联板孔中溶液,用 PBST 洗涤 4 次~6 次。

B.2.3 加病毒抗体

将病毒抗体按说明稀释至工作浓度,加入到酶联板的孔中,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h,倒去酶联板孔中溶液,用 PBST 洗涤 4 次~6 次。

B.2.4 加酶标抗体

将酶标抗体按说明稀释至工作浓度,加入到酶联板的孔中,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h,倒去酶联板孔中溶液,用 PBST 洗涤 4 次~6 次。

B.2.5 加底物

将底物对硝基苯磷酸脂(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.2.6 吸光值的测定

室温下避光静置至阳性对照孔明显显色。用酶标仪在 405 nm 处读取吸光值。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 值(空白对照、阴性对照及阳性对照孔)质量控制应该满足以下条件:

- 空白对照和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.15(如果阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.05 时,按 0.05 计算);
- 阳性对照 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD₄₀₅ 之比值>5;
- 同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判断如下:

- 样品 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD₄₀₅ 之比值>2,判为阳性;
- 样品 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD₄₀₅ 之比值接近阈值,判为可疑样品,需重新检测;
- 样品 OD₄₀₅ 值与阴性对照 OD₄₀₅ 之比值<2,判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量控制要求,需要重新检测,或用其他方法加以验证。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测方法

C.1 主要试剂

C.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水。

C.1.2 RT-PCR 试剂

5×RT 缓冲液、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺)、Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

C.1.3 10×TBE 缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱 108 g
硼酸 55 g
Na₄EDTA 9.3 g
加 H₂O 溶解,定容至 1 L。

C.1.4 电泳试剂

琼脂糖、0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液、10×TBE 缓冲液。

C.1.5 引物序列与合成

根据已报道的 NDV 基因组序列设计一对用于特异性的引物(见表 C.1),由生物公司合成。

表 C.1 引物序列及其位置

引物名称	引物序列(5'-3')	基因名称 ^a	位置 ^b	片段大小
NDV-F	ACCGTTGGCATCACTAAG	NIb	7992-8009	623 bp
NDV-R	ACTGGTTCCACGCTCCTA	NIb	8614-8597	
^a 核内含体蛋白 b(large nuclear inclusion proteins, NIb)。				
^b 为 GenBank 的 JQ395041 序列相对位置。				

C.2 总 RNA 的提取

取约 0.1 g 样品组织置于研钵中,加入 1 mL PBST 缓冲液研磨,4 ℃,10 000×g 离心 5 min,取上清并将上清液迅速转移至灭菌的 1.5 mL 离心管中,并加入 1 mL TRIzol 试剂,剧烈振荡后,室温静置 5 min;4 ℃,12 000×g 离心 10 min,取上清;加入三氯甲烷 300 μL,剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,4 ℃,12 000×g 离心 15 min,取上层水相;加入等体积的异丙醇,颠倒混匀后室温下静置 15 min,4 ℃,12 000×g 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 75%的乙醇洗涤沉淀 2 次,每次 4 ℃,7 500×g 离心 3 min,

弃上清;RNA 沉淀干燥后,用 20 μL ~40 μL 经 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的双蒸水溶解,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注:在能够保证总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

C.3 cDNA 合成

在 0.6 mL 离心管中加入 2 μL 总 RNA、1 μL 下游引物(NDV-R)、双蒸水 5 μL ,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,迅速冰浴 5 min,再加入下列试剂:5 \times RT 缓冲液 2.5 μL 、dNTPs(10 mmol/L)1 μL 、M-MLVRT (200 U/ μL)0.5 μL 、RNasin(40 U/ μL)0.5 μL ;42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,自然冷却至室温,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

C.4 PCR 扩增

在 25 μL 体系中加入 3 μL 合成的 cDNA 模板,进行 PCR 扩增。即 2.5 μL 的 10 \times PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})、dNTP 0.5 μL (每种各 10 mmol/L)、*Taq* 聚合酶 0.5 μL (2.5 U/ μL)、上游引物 NDV-F 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、下游引物 NDV-R 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、cDNA 模板 3.0 μL ,用超纯水补足至 25 μL 。

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后延伸 7 min。

C.5 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 0.5 \times TBE 缓冲液的 1.5%琼脂糖凝胶孔中,然后在一定电压下(如 120 V)电泳。电泳结束后,放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

C.6 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照产生预期大小条带(约 623 bp)情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,RT-PCR 检测结果为阳性;
- 如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,RT-PCR 检测结果为阴性。

参 考 文 献

- [1] 梁艳,宋荣浩,杨翠云,等.上海崇明水仙病毒病病原种类鉴定[J].植物病理学报,2008,38(5):456-461.
- [2] 沈嘉乐.侵染百合和水仙的部分线状植物病毒外壳蛋白基因的原核表达、抗血清制备及检测应用[D].杭州:浙江大学,2006.
- [3] ICTVdB-The Universal Virus Database,version 4.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- [4] Chen J,Shi Y-H,Adams M J,Zheng H-Y,Qin B-X,Chen J-P.Characterisation of an isolate of *Narcissus degeneration virus* from Chinese narcissus(*Narcissus tazetta* var.*chinensis*) [J]. Arch Virol,2007,152:441-448.
- [5] King A M Q,Adams M J,Carstens E B,Lefkowitz I J.Virus Taxonomy:Classification and Nomenclature of Viruses:Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses San Diego:Academic Press,2012:1069-1078.
- [6] Ward L I,Veerakone S,Tang J and Clover G R G.First Report of *Narcissus degeneration virus*,*Narcissus late season yellows virus*,and Narcissus symptomless virus on *Narcissus* in New Zealand[J].Plant Disease,2009,93:964.
-