

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4180—2015

线虫传多面体病毒属病毒 RT-PCR 筛查方法

Screening protocols for *Nepovirus* by universal RT-PCR

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。

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、云南省烟草农业科学研究院、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林石明、廖富荣、方敦煌、吴媛、方志鹏、陈青、陈红运、黄蓬英、邓丛良。

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及本标准第 6.2 条与 ZL201110087903.4 《一种豇豆花叶病毒亚科病毒通用 RT-PCR 检测用简并引物、检测方法及其应用》相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,其愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可通过以下联系方式获得:

专利发明人:廖富荣、黄蓬英、林石明

专利权人:厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址:福建省 厦门市 海沧区 建港路 2165 号

邮编:361026

联系电话:0592-3269916

邮箱地址:lfr005@163.com

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

线虫传多面体病毒属病毒 RT-PCR 筛查方法

1 范围

本标准规定了线虫传多面体病毒属病毒的通用 RT-PCR 检测鉴定方法。

本标准适用于寄主植物中线虫传多面体病毒的筛查检测。

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 线虫传多面体病毒属基本信息

中文名称:线虫传多面体病毒属

学名:genus *Nepovirus*

属于小 RNA 病毒目(*Picornavirales*),伴生豇豆病毒科(*Secoviridae*),豇豆花叶病毒亚科(*Comovirinae*)。该病毒属包括南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*, ArMV)、桃丛簇花叶病毒(*Peach rosette mosaic virus*, PRMV)、烟草环斑病毒(*Tobacco ringspot virus*, TRSV)、番茄黑环病毒(*Tomato black ring virus*, TBRV)、番茄环斑病毒(*Tomato ringspot virus*, ToRSV)等重要的检疫性植物病毒。有关该病毒属的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

以线虫传多面体病毒属病毒的基因组序列中的保守区域设计合成简并引物,建立该病毒属的通用 RT-PCR 检测方法;并对 PCR 产物进行序列测定,通过序列分析对病毒种类进行快速鉴定。因此,线虫传多面体病毒属的分子生物学特征是制定本检测鉴定方法的主要依据。

5 仪器设备与试剂

5.1 主要仪器设备与用具

主要使用以下仪器设备:研磨仪、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、水浴槽或恒温孵育器、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)等。

5.2 主要试剂

主要试剂见附录 B。

SN/T 4180—2015

6 检测和鉴定

6.1 抽样检查

按照 SN/T 2122 给出的方法进行抽样、取样。

6.2 通用 RT-PCR 检测方法

按附录 B 给出的方法,进行通用 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。

6.3 序列测定和分析

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及翻译后的氨基酸序列与已知线虫传多面体病毒属的病毒序列进行比对。

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 如果通用 RT-PCR 方法检测结果为阴性,则判定未检出线虫传多面体病毒属病毒。

7.2 如果通用 RT-PCR 方法检测结果为阳性,则进行序列测定与分析:

- a) 如果翻译后氨基酸序列与线虫传多面体病毒属已知病毒序列同源性大于 80%,则判定检出线虫传多面体病毒属病毒(具体病毒种类还需采用其他方法进一步鉴定)。
- b) 如果翻译后氨基酸序列与线虫传多面体病毒属已知病毒序列同源性小于 80%:
 - 如果系统发育分析表明与线虫传多面体病毒属病毒聚为一群,则判定检出线虫传多面体病毒属病毒(具体病毒种类还需采用其他方法进一步鉴定);

注:所检测到的病毒可能属于基因组序列尚未测定的已知病毒或尚未报道的新的病毒种类。

——如果系统发育分析表明与线虫传多面体病毒属病毒未聚为一群,则判定未检出线虫传多面体病毒属病毒。

8 结果记录

记录样品信息和检测数据,包括样品来源、植物种类、取样时间与地点,检测时间、方法和结果以及人员签字。RT-PCR 检测方法应保存电泳照片,测序结果保存测序报告图。

9 样品保存

检出线虫传多面体病毒属的样品应妥善保存在超低温冰箱中,或冻干后低温保存,并做好登记和标识,以备复核。

附 录 A
(资料性附录)
线虫传多面体病毒属基本信息

A.1 分类地位

线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)所在的伴生豇豆病毒科的分类结构见表 A.1。

表 A.1 伴生豇豆病毒科的分类结构

亚科(Subfamily) ^a	属(Genus)	代表种(Type species)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	豇豆花叶病毒属 <i>Comovirus</i>	豇豆花叶病毒 <i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	蚕豆病毒属 <i>Fabavirus</i>	蚕豆萎蔫病毒 2 <i>Broad bean wilt virus2</i> (BBWV2)
豇豆花叶病毒亚科 <i>Comovirinae</i>	线虫传多面体病毒属 <i>Nepovirus</i>	烟草环斑病毒 <i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)
N/A	伴生病毒属 <i>Sequivirus</i>	欧防风黄点病毒 <i>Parsnip yellow fleck virus</i> (PYFV)
N/A	矮化病毒属 <i>Waikavirus</i>	水稻东格鲁球状病毒 <i>Rice tungro spherical virus</i> (RTSV)
N/A	温州蜜柑矮缩病毒属 <i>Sadwavirus</i>	温州蜜柑矮缩病毒 <i>Satsuma dwarfvirus</i> (SDV)
N/A	樱桃锉叶病毒属 <i>Cheravirus</i>	樱桃锉叶病毒 <i>Cherry rasp leafvirus</i> (CRLV)
N/A	番茄灼烧病毒属 <i>Torradovirus</i>	番茄灼烧病毒 <i>Tomato torrado virus</i> (ToTV)
N/A	Unassigned	黑悬钩子坏死病毒 <i>Black raspberry necrosis virus</i> (BRNV)
N/A	Unassigned	草莓潜隐环斑病毒 <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)
N/A	Unassigned	草莓斑驳病毒 <i>Strawberry mottle virus</i> (SMoV)
^a N/A 为未归属成员。		

A.2 豇豆花叶病毒亚科成员

线虫传多面体病毒属是该病毒亚科种最大的一个病毒属,含有 34 个病毒成员,分为 3 个亚组。以南芥菜花叶病毒(ArMV)为代表的亚组 A 含有 10 种病毒,以番茄黑环病毒(TBRV)为代表的亚组 B 含有 9 种病毒,而以番茄环斑病毒(ToRSV)为代表的亚组 C 含有 15 种病毒(见表 A.2)。

表 A.2 线虫传多面体病毒属的病毒成员

亚组	中英文名称与缩写
亚组 A(Subgroup A)	南芥菜花叶病毒(<i>Arabis mosaic virus</i> , ArMV)
	滇芎 A 病毒(<i>Arracacha virus A</i> , A _{VA})
	爱琴海菊芋环斑病毒(<i>Artichoke Aegean ringspot virus</i> , AARSV)
	美洲木薯潜隐病毒(<i>Cassava American latent virus</i> , CsALV)
	葡萄畸形病毒(<i>Grapevine deformation virus</i> , GDefV)
	葡萄扇叶病毒(<i>Grapevine fanleaf virus</i> , GFLV)
	橄榄潜隐环斑病毒(<i>Olive latent ringspot virus</i> , OLRV)
	马铃薯黑环病毒(<i>Potato black ring virus</i> , PBRV)
	悬钩子环斑病毒(<i>Raspberry ringspot virus</i> , RRSV)
	烟草环斑病毒(<i>Tobacco ringspot virus</i> , TRSV)
亚组 B(Subgroup B)	意大利菊芋潜隐病毒(<i>Artichoke Italian latent virus</i> , AILV)
	甜菜环斑病毒(<i>Beet ringspot virus</i> , BRSV)
	可可坏死病毒(<i>Cocoa necrosis virus</i> , CoNV)
	绛三叶草潜隐病毒(<i>Crimson clover latent virus</i> , CCLV)
	苏铁坏死矮化病毒(<i>Cycas necrotic stunt virus</i> , CNSV)
	安纳托利亚葡萄环斑病毒(<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> , GARSV)
	葡萄铬黄花叶病毒(<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> , GCMV)
	桑环斑病毒(<i>Mulberry ringspot virus</i> , MRSV)
	番茄黑环病毒(<i>Tomato black ring virus</i> , TBRV)
亚组 C(Subgroup C)	杏树潜斑病毒(<i>Apricot latent ringspot virus</i> , ALRV)
	菊芋黄环斑病毒(<i>Artichoke yellow ringspot virus</i> , AYRSV)
	黑醋栗退化病毒(<i>Blackcurrant reversion virus</i> , BRV)
	乌饭树叶斑病毒(<i>Blueberry leaf mottle virus</i> , BLMoV)
	木薯绿斑病毒(<i>Cassava green mottle virus</i> , CsGMV)
	樱桃卷叶病毒(<i>Cherry leafroll virus</i> , CLRV)
	菊苣黄斑病毒(<i>Chicory yellow mottle virus</i> , ChYMV)
	葡萄保加利亚潜病毒(<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> , GBLV)
	葡萄突尼斯环斑病毒(<i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> , GTRSV)
	木槿潜斑病毒(<i>Hibiscus latent ringspot virus</i> , HLRSV)
	紫花苜蓿澳洲潜病毒(<i>Lucerne Australian latent virus</i> , LALV)
	樱桃李潜斑病毒(<i>Myrobalan latent ringspot virus</i> , MLRSV)
	桃丛簇花叶病毒(<i>Peach rosette mosaic virus</i> , PRMV)
	马铃薯 U 病毒(<i>Potato virus U</i> , PVU)
	番茄环斑病毒(<i>Tomato ringspot virus</i> , ToRSV)

A.3 病毒粒子形态

线虫传多面体病毒粒子无包膜、大小为 28 nm~30 nm、等轴对称二十面体的多面体病毒。基因组 RNA-1 和 RNA-2 分别被两个不同类型、大小相似的颗粒包裹(见图 A.1)。

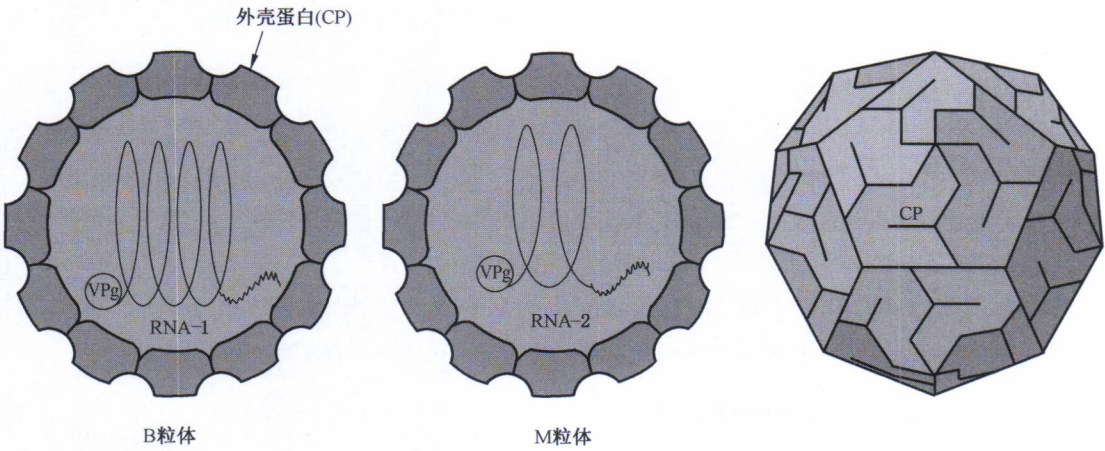


图 A.1 线虫传多面体病毒的病毒粒子

(引自 http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/300.html.)

A.4 病毒的基因组结构与功能

二分体基因组为线状的 ssRNA, RNA-1 长 7.2 kb~8.4 kb, RNA-2 长 3.9 kb~7.2 kb。病毒 RNA 的 3'端为 Poly(A), 5'端为 VPg, RNA-1 和 RNA-2 各产生一个多聚蛋白并经过一系列加工切割产生功能蛋白(见图 A.2)。RNA-2 加工成 3 个结构域, 在葡萄扇叶病毒(GFLV)中 P2A 参与 RNA-2 的复制, P2B 为含有典型“LPL”结构域的移动蛋白(MP), P2C 为含有两个保守结构域的外壳蛋白(CP)。

RNA-1 加工成 5 个结构域, P1A 的功能还未知, P1B 为含有序列结构域特征的结合 NTP 的解旋酶, P1C 为 VPg, P1D 为蛋白酶, P1E 为含有序列结构域特征的 RdRp。RNA-1 和 RNA-2 中 5'端和 3'端的 NTRs 序列同源, 但亚组 A 不同。亚组 B RNA-1 和 RNA-2 中 5'端序列同源, 而 3'-NTRs 相一致。亚组 C 的两个 NTRs 相一致或接近一致, 在 ToRSV 中含有部分聚合酶蛋白编码区, 但在 BRV 中没有。

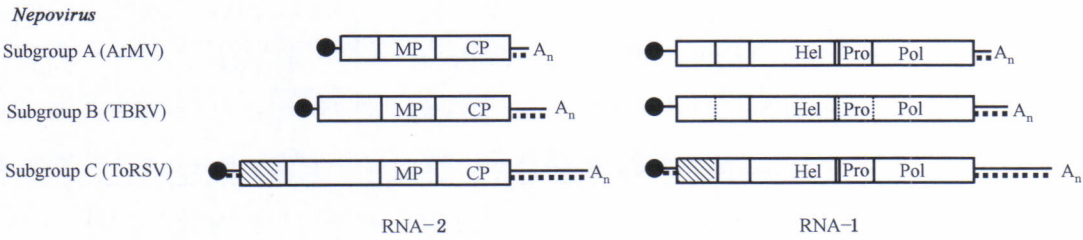


图 A.2 线虫传多面体病毒属基因组结构特征

SN/T 4180—2015

附 录 B
(规范性附录)
通用 RT-PCR 检测方法

B.1 主要试剂

B.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol reagent、氯仿、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水。

B.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(40 U/μL)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺)、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

B.1.3 10×TBE 缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱 108 g
硼酸 55 g
Na₄EDTA 9.3 g
加双蒸水溶解,定容到 1 L。

B.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。

B.2 引物序列与合成

设计的上下游简并引物均位于 RNA-1 上的 RdRp 基因区域,约 450 bp,额外加入测序引物或非互补序列后,扩增的片段长度约为 500 bp(见表 B.1)。

表 B.1 线虫传多面体病毒属简并引物

引物名称	序列(5'-3') ^{a, b}	位置
NepF5	<u>GAGCGGATAACAATTT</u> CACACAGGTGTGAYTAYWVNVTNTTYGATGG	RdRp 基因
NepR5	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACYTTRTCHBTVCCATCVGTAAT	RdRp 基因
NepF3	AATAAATCATAATGTGAYTAYWVNVTNTTYGATGG	RdRp 基因
NepR3	AATAAATCATAAYTTTRTCHBTVCCATCVGTAAT	RdRp 基因
^a M=A/C, W=A/T, H=A/T/C, V=G/A/C, D=G/A/T, Y=C/T, K=G/T, S=G/C, B=G/T/C, N=A/G/C/T, R=A/G。		
^b NepF5 和 NepR5 下划线序列分别为引入的 BCABEST™ Sequencing Primer RV-M 和 M13-47 测序引物; NepF3 和 NepR3 为额外引入的一段非互补序列。		

B.3 总 RNA 的提取

采用 TRIzol Reagent 方法提取病叶总 RNA,具体操作步骤如下:

- 取 0.1 g 的病叶放入研钵中,加入 1 mL 的 TRIzol Reagent 充分研磨,15 ℃~30 ℃下静置 5 min;
- 在 2 ℃~8 ℃下 $12\,000\times g$ 离心 10 min;把上清液转移到一新管中,并加入 0.2 mL 氯仿,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,15 ℃~30 ℃放置 3 min;
- 4 ℃ $12\,000\times g$ 离心 15 min,取上层无色水相(约 600 μL)转移到新管中;
- 在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,15 ℃~30 ℃静置 10 min;
- 2 ℃~8 ℃下 $12\,000\times g$ 离心 10 min。弃上清液,加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀;
- 2 ℃~8 ℃下 $7\,500\times g$ 离心 3 min,弃尽上清液;
- 室温放置晾干,待乙醇挥发完毕,加入 100 μL 无 RNase 双蒸水,充分溶解 RNA,置于 -20 ℃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。

B.4 反转录(cDNA 合成)

反转录方法:在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 3'端引物(10 $\mu\text{mol/L}$),于 95 ℃的水浴中处理 7 min,然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5 \times 反转录缓冲液 2.5 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MuLV 反转录酶 0.5 μL 、核糖核酸酶抑制剂 RNasin 0.5 μL 、无 RNase 的双蒸水 4.5 μL 。然后 37 ℃水浴处理 1 h,95 ℃水浴 10 min,自然冷却至室温,作为后续 PCR 的模板。

B.5 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中: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* DNA 聚合酶 0.5 μL (5 U/ μL),上下游引物各 2.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),DNA 模板 2 μL ,双蒸水补足体积。

PCR 扩增条件:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 50 s,45 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 1 min,5 个循环;接着 94 ℃变性 50 s,55 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 7 min。

B.6 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。

B.7 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情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,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,PCR 检测结果为阴性。

参 考 文 献

- [1] http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/300.html.
 - [2] 洪健,李德葆,周雪平.植物病毒分类图谱.北京:科学出版社,2001.
 - [3] 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,pp1069-1078,2012.
 - [4] Sanfacon H.,Wellink J.,Gall O.L.,Karasev A.,van der Vlugt R.and Wetzel T.Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*.Arch Virol,154:899-907,2009.
 - [5] Chen J.,Adams M.J.A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family.Arch Virol,146:757-766,2001.
-