



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4405—2015

## 黄瓜花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Cucumber mosaic virus*

2015-12-04 发布

2016-07-01 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郑耘、卢小雨、张伟锋、向才玉、王红英、龙海、潘广、胡运发、李彬、孔德英。

# 黄瓜花叶病毒检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了黄瓜花叶病毒的生物学测定、血清学检测、免疫电镜、RT-PCR 检疫鉴定方法。  
本标准适用于进出境植物种子苗木等繁殖材料和植物产品中黄瓜花叶病毒的检疫鉴定。

## 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 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

## 3 基本信息

学名:*Cucumber mosaic virus*

缩写:CMV

分类地位:雀麦花叶病毒科(Bromoviridae);黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)。

其他信息参见附录 A。

## 4 原理和方法

依据 CMV 鉴别寄主的症状、病毒形态、免疫学特性及分子生物学特性进行检测判定。

## 5 仪器设备、用具及设施

### 5.1 仪器设备

天平(感量,1/10 000 g)、pH 计、酶标仪、透射电子显微镜、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、恒温水浴锅、高速离心机、超低温冰箱等。

### 5.2 用具

微量移液器、研钵、离心管、花盆、消毒土等。

### 5.3 设施

植物隔离检疫温室。

## 6 试剂

DAS-ELISA 检测试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)、生物学测定试剂(见 8.4)。免疫

电镜检测试剂按照 SN/T 1840 的规定执行。

## 7 样品制备

### 7.1 种子类

抽样按照 SN/T 2122 的规定执行。

将种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,于 25℃左右生长并进行症状观察。待长出 3 片~4 片真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。

### 7.2 苗木类

抽样 SN/T 2122 规定抽样。

将苗木种植于隔离温室中,于 25℃左右生长并进行症状观察。有症状的苗木单独检测。没有症状的分组检测,分组方法同 7.1。

## 8 检测方法

### 8.1 DAS-ELISA 检测

方法见附录 B。

### 8.2 免疫电镜检测

按照 SN/T 1840 的规定执行。

### 8.3 RT-PCR 检测

方法见附录 C。

### 8.4 生物学测定

#### 8.4.1 接种

病叶加 1:1(质量:体积)的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2)于研钵中充分研碎,在待接种植物叶片表面均匀洒上硅藻土,用手指蘸取研磨好的汁液轻轻涂抹于叶片表面。

#### 8.4.2 鉴别寄主症状

苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*):褪绿或坏死斑,无系统症状。

黄瓜(*Cucumis sativus*):绿色或黄绿色系统花叶。

昆诺藜(*Chenopodium quinoa*):褪绿或坏死斑,无系统症状。

番茄(*Lycopersicon esculentum*):系统花叶,叶片变窄。

克利夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*):接种叶无症状,或形成褪绿斑或坏死斑;也可能形成绿色或黄绿色系统花叶或环斑。

心叶烟(*Nicotiana glutinosa*):接种叶无症状,或形成褪绿斑或坏死斑;也可能形成绿色或黄绿色系统花叶或环斑。

烟草(*Nicotiana tabacum*):接种叶无症状,或形成褪绿斑或坏死斑;也可能形成系统花叶或畸形。

菜豆(*Phaseolus vulgaris*):冬季表现细小的坏死斑,但夏季无症状表现;无系统症状。



## 9 结果判定

DAS-ELISA 检测为阳性后,RT-PCR,或免疫电镜检测结果为阳性可判定检出黄瓜花叶病毒。如果上述方法还不能判定检测结果,可进行生物学测定,并进行复验。若 DAS-ELISA 检测为阴性,则判定为未检出该病毒。

## 10 样品和记录保存

### 10.1 样品保存

经检测确定携带 CMV 的样品在合适的条件下保存。种子保存在 4℃,病株在-20℃或者-70℃冰箱中保存,提取的 RNA 样品若需长期保存应放置于-70℃冰箱。做好标记和登记工作。

### 10.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、登记时间、实验地点、检测方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。DAS-ELISA 检测需有试验的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳结果,免疫电镜观察需有病毒粒体照片,生物学测定需有鉴别寄主的症状照片。

附录 A  
(资料性附录)  
生物学特性

### A.1 粒体形态

黄瓜花叶病毒粒子为等轴对称的 20 面体的球状结构,无包膜,直径约 29.3 nm。

### A.2 基因组

基因组由三条线形正义单链 RNA 组成, RNA 1 和 RNA 2 编码病毒的非结构蛋白,与病毒的复制有关, RNA 3 编码病毒的运动蛋白和外壳蛋白,基因组大小分别为 3 357 nt、3 050 nt 和 2 218 nt,沉降系数 98 S,  $A_{260/280}$  的比值为 1.65, RNA 占粒体重的 18%。一些 CMV 株系可以携带卫星 RNA。

### A.3 寄主范围

CMV 寄主范围广泛,可侵染 85 科 365 属 1 000 多种双子叶植物和单子叶植物,是禾谷类作物、牧草、木本和草本观赏植物、蔬菜及果树上发生最广,危害最大的病毒。

### A.4 病害症状

CMV 幼苗期染病,子叶变黄枯萎,真叶表现出叶色深浅相间的花叶症状。成株期染病,症状在新出幼叶上表现最为明显,老熟叶片症状不明显。表现为在新出叶片上出现黄绿相间的花叶症状,叶片成熟后叶小,皱缩,边缘卷曲。果实上表现为瓜条出现深浅绿色相间的花斑,染病后瓜条生长缓慢甚至停止,果表畸形。发病严重时,植株矮小,茎节间缩短,使植株萎蔫。CMV 侵染黄瓜后,表现深绿与浅绿相间疣状斑块,果面凹凸不平或畸形;重病株节间短缩,簇生小叶,不结瓜,最后萎缩枯死;CMV 侵染辣椒后产生花叶、蕨叶、环斑或全株矮化等症状。

### A.5 分布地区

CMV 属世界性分布,尤其是在温带地区。

### A.6 传播方式

#### A.6.1 近距离传播

CMV 在田间主要通过蚜虫以非持久性传毒方式传播该病毒,机械摩擦、种子、菟丝子传播也能传播该病毒。

#### A.6.2 远距离传播

CMV 通过带毒种子、苗木、组培苗等繁殖材料的运输发生远距离传播。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
**DAS-ELISA 检测**

**B.1 试剂****B.1.1 包被缓冲液(pH 9.6)**

将碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )1.59 g、碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )2.93 g、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g 定容于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 9.6,并储存于 4℃。

**B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)**

将氯化钠( $\text{NaCl}$ )8 g、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.2 g、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.15 g、氯化钾(KCl)0.2 g、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g 溶解于 900 mL 蒸馏水,用浓 HCl 调节 pH 值到 7.4,加水定容至 1 L。

**B.1.3 PBST 缓冲液**

将氯化钠( $\text{NaCl}$ )8 g、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.2 g、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.15 g、氯化钾(KCl)0.2 g、吐温 20(Tween-20)5 mL 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。

**B.1.4 样品提取缓冲液(pH 7.4)**

将亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )1.3 g、聚乙烯基吡咯烷酮(MW 24~4 000,PVP)20 g、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g、吐温 20(Tween-20)20 mL 溶解于 1 000 mL PBST,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 7.4,并储存于 4℃。

**B.1.5 酶标结合物缓冲液**

将 PBST 缓冲液 800 mL、小牛血清白蛋白(BSA)2 g、PVP(MW 24~4 000,PVP)20 g、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g,加蒸馏水定容至 1 000 mL,并储存于 4℃。

**B.1.6 底物缓冲液**

将二乙醇胺 97 mL、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调整 pH 至 9.8,并储存于 4℃。

**B.2 操作步骤****B.2.1 包被**

按照检测试剂盒说明操作。或用包被缓冲液稀释 CMV 抗体(如 1:200),向微孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  包被抗体溶液,37℃下孵育 2 h~4 h 或 4℃下包被过夜。

**B.2.2 捕获抗原**

弃去孔中的抗体包被溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次。加入 100  $\mu\text{L}$  样品提取液到酶标板的孔中,每个样品重复 2 个。并设置阳性和阴性对照。37℃下孵育 2 h 或 4℃下孵育过夜。

SN/T 4405—2015

### B.2.3 加入酶标抗体

按照检测试剂盒说明操作。用酶标抗体缓冲液按比例稀释相应的酶标抗体(如 1 : 200)。弃去孔中的检测样品提取液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔。每孔加入 100  $\mu$ L 酶标抗体溶液。在室温下孵育 2 h。

### B.2.4 加底物

加入底物缓冲液将硝基苯磷酸二钠盐(p-Nitrophenyl Phosphate, pNPP)配制成浓度为 1 mg/mL 的底物溶液。弃去酶标抗体溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次。每孔加入 100  $\mu$ L 新配制的底物溶液。室温下避光放置 30 min~60 min,待阳性对照孔显色。

### B.2.5 吸光值的测定

用酶标仪在 405 nm 处读取吸光值。

## B.3 结果判定

通过酶标仪上 405 nm 的 OD 值来判定。

对照孔的  $OD_{405}$  值(空白对照、阴性对照及阳性对照)应该在质量控制范围内,即:空白对照和阴性对照的  $OD_{405}$  值 $\leq$ 0.15,当阴性对照孔的  $OD_{405}$  值 $\leq$ 0.05 时,按 0.05 计算。阳性对照有的颜色反应;孔的重复性基本一致。在满足了该要求后,结果原则上可判断如下:

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值 $\geq$ 2,判为阳性。

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值 $\leq$ 2,判为阴性。

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值在阈值附近,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证。



附 录 C  
(规范性附录)  
RT-PCR 检测<sup>1)</sup>

C.1 试剂

C.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol 试剂、氯仿、异丙醇、70%乙醇。

C.1.2 50×TAE

Tris 242 g  
冰醋酸 52.1 mL  
Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 37.2 g  
加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

C.1.3 6×加样缓冲液

溴酚蓝 0.25%  
蔗糖水溶液 40%(质量分数)

C.2 试验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取样品 0.1 g,液氮充分研磨。加入 1 mL TRIzol,混匀,倒入 1.5 mL 离心管中。加入 0.2 mL 氯仿,剧烈震荡 15 s,4℃条件下 12 000 g 离心 10 min,小心吸取上层水相至新离心管中。加入等体积异丙醇,混匀,-20℃静止 10 min,4℃条件下 12 000 g 离心 15 min,弃上层水相。加入 1 mL 75%乙醇,重悬沉淀,4℃条件下 8 000 g 离心 10 min,弃上层乙醇相,干燥沉淀。加入 30 μL DEPC-H<sub>2</sub>O,置于 50℃条件下 5 min 溶解沉淀,存于-70℃条件下备用。或按照供应商推荐的试剂盒抽提 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应

C.2.2.1 引物

CMV 的特异性引物及其序列见表 C.1,位于 RNA2 的 CP 基因上,预计扩增产物大小为 540 bp。

表 C.1 RT-PCR 的引物和序列

引物名称	引物序列	在 KC527756.1* 上的位置
CMV-F	5'-GTAGACATCTGTGACGCGA-3'	1042-1060
CMV-R	5'-GCGCGAAACAAGCTTCTTATC-3'	1554-1574
注:检测引物“CMV-F”和“CMV-R”引自 Blas <i>et al.</i> ,1994。 * 在 GenBank 上的基因序列登录号。		

1) 该方法采用 Kouassi N 等(2010)的黄瓜花叶病毒 RT-PCR 检测方法。

## C.2.2.2 cDNA 合成

按表 C.2 列出的组分制备 RT 反应混合液 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:25  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min,42  $^{\circ}\text{C}$  反转录 1 h,95  $^{\circ}\text{C}$  处理 2 min~3 min。

表 C.2 cDNA 合成反应体系

试剂名称	加样量
模板 RNA	2 $\mu\text{L}$
反向引物(20 $\mu\text{mol/L}$ )	1 $\mu\text{L}$
5 $\times$ AMV 缓冲液	4 $\mu\text{L}$
dNTP(10 mmol/L)	2 $\mu\text{L}$
AMV 反转录酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
DEPC 处理过的 $\text{H}_2\text{O}$	9 $\mu\text{L}$

## C.2.2.3 反应程序

将表 C.3 列出的组分加入 PCR 反应管中,充分混匀后进行 PCR 反应:94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

表 C.3 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	终浓度	加样量/ $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	10 $\times$	1 $\times$	2.5
氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )	25 mmol/L	2.0 mmol/L	2
dNTP	10 mmol/L	0.4 mmol/L	1
CMV-F1	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
CMV-R1	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ $\mu\text{L}$	1.5 U/test	0.3
cDNA			3
补加水至总体积			25

## C.2.3 琼脂糖电泳

## C.2.3.1 制备凝胶

加入 TAE 配制质量浓度为 1% 的琼脂糖,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55  $^{\circ}\text{C}$  左右。

## C.2.3.2 加入溴化乙锭

加入浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的溴化乙锭,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插入样品梳。待凝胶凝固后,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液盖过凝胶表面约 1 mm)。



### C.2.3.3 电泳

吸取 10  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物,加入 2  $\mu\text{L}$  6 $\times$  加样缓冲液混合均匀,将其和适合的 DNA 分子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凝胶成像系统下观察并保留结果。

### C.3 结果判断

阳性对照在 540 bp 处有扩增条带,阴性对照和空白对照无特异性扩增条带,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。若结果达到质控要求,且待测样品在 540 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。



## 参 考 文 献

- [1] Blas, C.D., Borja, M.J., Saiz, M. and Romero, J., (1994). Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 141:323-329.
- [2] Kouassi N, Wendy M, Boonham N et al., Development of a Diagnostic Protocol for Cucumber Mosaic Virus for Screening Banana (*Musa* spp.) Planting Material in Ivory Coast. *Proc. IC on Banana & Plantain in Africa*, Eds.: T. Dubois et al. *Acta Hort.* 879, ISHS 2010.
- [3] Jun-Li FENG, Shao-Ning CHEN, Xiang-Shan TANG. 2006. Quantitative Determination of Cucumber Mosaic Virus Genome RNAs in Virions by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *ISSN 1672-9145 Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38(10):669-676.
- [4] Neena Mitter, Emy Sulistyowati, and Ralf G. Dietzgen. 2003. Cucumber mosaic virus Infection Transiently Breaks dsRNA-Induced Transgenic Immunity to Potato virus Y in Tobacco. *MPMI* Vol. 16, (10), 936-944. Publication no. M-2003-0730-01R. The American Phytopathological Society
- [5] Ting Wei, Bénédicte Lebas, Jason Shiller. 2009. *Viruses of Dormant Bulbs*. Investigation and Diagnostic Centre-Plant Health & Environment Laboratory Tamaki, Auckland. MAF Biosecurity New Zealand.
- [6] Zora Singh. 1995. Identification of Cucumber Mosaic Virus Subgroup I Isolates from Banana Plants Affected by Infectious Chlorosis Disease Using RT-PCR. *Plant Disease*. 79(7):713-716.
- [7] 李华平, 胡晋生, 范怀忠. 黄瓜花叶病毒的株系鉴定研究进展[J]. *中国病毒学*, 1994, 9(3): 187-194.
- [8] 侯伟娜, 周晓阳. 黄瓜花叶病毒卫星 RNA 研究进展[J], *山东林业科技*, 2010, 6(191):86-88.
- [9] 覃瑞, 程旺元. 黄瓜花叶病毒研究进展[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2004, 23(2): 33-37.
- [10] 宋荣浩, 张永兴, 袁贤溶. 香蕉黄瓜花叶病毒的鉴定[J]. *上海农业学报*, 1990, 6(3):82-84.
- [11] 席德慧, 林宏辉, 向本春. 黄瓜花叶病毒 2 个分离物的亚组鉴定及株系分化研究[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(3):232-237.
- [12] 杨洪一, 孙立娜, 张杰. 黄瓜花叶病毒分子变异分析[J]. *黑龙江农业科学*(1), 2011, 19-21.
- [13] 明艳林. 侵染大丽花的黄瓜花叶病毒分离物的鉴定[J]. *福建农业学报*, 2004, 19(3):149-151.