



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4406—2015

竹花叶病毒的检疫鉴定方法

Detection and identification of *Bamboo 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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、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、福建农林大学。

本标准主要起草人：沈建国、廖富荣、蔡伟、林双庆、陈雅菁、李敏、张永江、金晶、高芳銮、吴祖建。

竹花叶病毒的检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了竹花叶病毒检测的程序和方法。
本标准适用于进出境竹子上竹花叶病毒的检测。

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 原理

中文名称:竹花叶病毒

学名:*Bamboo mosaic virus*,缩写:BaMV

分类地位:线形病毒科(*Alphaflexiviridae*),马铃薯X病毒属(*Potexvirus*)。

竹花叶病毒的血清学、分子生物学特性是制定本检疫鉴定方法的主要依据。竹花叶病毒的寄主范围、病害症状、分布地区、传播途径、粒体形态、基因组等其他信息参见附录A。

4 仪器设备、用具及试剂

4.1 仪器设备

高速冷冻离心机、PCR仪、酶标仪、凝胶成像分析系统等。

4.2 用具

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、Eppendorf离心管(1.5 mL)、研钵等。

4.3 试剂

间接ELISA试剂见附录B、RT-PCR试剂见附录C。

5 检测与鉴定

5.1 抽样

抽样方法按照SN/T 2122中规定执行。

5.2 间接ELISA

具体方法见附录B。

5.3 RT-PCR

具体方法见附录 C。

6 结果判定与记录

6.1 结果判定

结果判定如下：

- 当间接 ELISA 检测结果为阳性,且 RT-PCR 检测结果为阳性时,则判定为检出 BaMV,否则判定为未检出 BaMV。
- 当 RT-PCR 检测结果呈阳性,且测定的序列为 BaMV 序列,则判定为检出 BaMV,否则判定为未检出 BaMV。

6.2 结果记录

记录各项实验数据,包括样品来源、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。血清学检测结果保留吸光值的数据报告,分子生物学检测结果保留电泳照片,序列测定结果保留测序报告图。

7 样品的保存

经检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在 -80°C 超低温冰箱中,并作好登记和标记工作,以备复核用。

附 录 A
(资料性附录)
竹花叶病毒的背景资料

A.1 寄主范围

已报道的自然寄主为竹子,包括绿竹、蓬莱竹、长枝竹、泰山竹、麻竹、孟宗竹、箭竹等。

A.2 病害症状

BaMV 侵染竹子均为系统性感染,一般在叶片引起黄化或褐化的条斑症状,以嫩叶上尤为明显,在竹笋与竹茎横剖面上可观察到褐色到黑色的斑点,上下延伸后在纵剖面上则呈现短钉状病斑,导致竹笋组织硬化,感病后期或数年后,造成竹笋产量显著减少。

A.3 分布地区

主要分布于中国台湾、巴西、澳大利亚及夏威夷。

A.4 传播途径

主要通过机械传播。可通过带毒竹子种苗进行远距离传播。

A.5 粒体形态

病毒粒体为长丝状,大小约 $490\text{ nm} \times 15\text{ nm}$,如图 A.1。

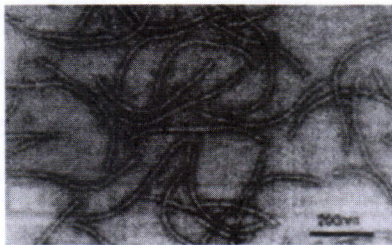


图 A.1 BaMV 病毒粒体(Lapierre H 和 Signoret P,2004)

A.6 病毒基因组

基因组为正义单链 RNA,全长约 6 366 bp。

SN/T 4406—2015

附 录 B
(规范性附录)
间接 ELISA

B.1 试剂

B.1.1 包被缓冲液(pH9.6)

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

加入蒸馏水 900 mL,用 HCl 调节 pH 值到 9.6,然后加蒸馏水至 1 L,4 ℃ 储存。

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4)

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 值到 7.4,然后加水至 1 L。

B.1.3 PBST

每升 PBS 中加入 0.5 mL 的吐温-20。

B.1.4 酶标抗体稀释缓冲液

1×PBST 缓冲液	800.0 mL
牛血清白蛋白(BSA)	2.0 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)	20.0 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g

用蒸馏水定容至 1 L,4 ℃ 条件下贮存。

B.1.5 底物(pNPP)缓冲液(pH9.8)

氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺	97.0 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.1.6 抗体

病毒抗体:BaMV 抗体。
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 0.5 g~1.0 g 待测样品,按 1:10(质量:体积)比例加入包被缓冲液,用研钵研磨成浆,8 000 r/min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 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 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 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 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

将酶标抗体按说明将稀释至工作浓度,加入到酶联板的孔中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 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 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 吸光值的测定

用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值。

B.3 结果判断

在满足阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.15、阳性对照孔的 OD₄₀₅ 值/阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值>5~10,孔的重复性基本一致的质量要求:

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<2,判为阴性。

样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 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。

SN/T 4406—2015

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测方法

C.1 试剂

C.1.1 TRIzol 裂解液

C.1.2 5×TBE 缓冲液

Tris 碱	54.0 g
硼酸(H_3BO_3)	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20 mL
补充蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 0.5×TBE。	

C.1.3 6×加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝
40% (质量: 体积) 蔗糖水溶液。

C.1.4 RNA 提取试剂

Trizol、氯仿、异丙醇、75% 乙醇、DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的 ddH₂O。

C.1.5 RT-PCR 试剂

RT 缓冲液、dNTPs(10 mmol/L)、M-MLVRT(200 U/ μL)、RNasin(40 U/ μL)、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)、PCR 缓冲液、MgCl₂(25 mmol/L)。

C.2 引物序列

根据已报道的 BaMV 基因序列设计一对用于特异性扩增的引物。

上游引物 BaMVf: 5'-TCTGGAAGTGGGAACGGGAAGT-3'

上游引物 BaMVr: 5'-GATTGTCTAATGGCGAACGTC-3'

RT-PCR 产物大小 437 bp。

C.3 总 RNA 提取

取 0.05 g~0.1 g 样品组织置于研钵中,液氮研细,加入 1 mL TRIzol 试剂充分研磨,15℃~30℃下静置 5 min;4℃,12 000 r/min 离心 10 min,取上清;加入氯仿 300 μL ,剧烈震荡 15 s,室温静置 5 min,4℃,12 000 r/min 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 r/min 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 r/min 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 ddH₂O 溶解,-80℃保存备用。

注: RNA 提取也可用商业化的试剂盒。

C.4 cDNA 合成

在 PCR 管中加入 3 μL 总 RNA,1 μL 下游引物 BaMVr(10 $\mu\text{mol/L}$),ddH₂O(DEPC 处理)4 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.5 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.1,每个反应设置 2 个重复。检测时以含有病毒目标片段的质粒或含病毒材料作为阳性对照,以不含病毒的健康植物组织作阴性对照,同时以水代替模板作为空白对照。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/ μL
cDNA	2.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.5
dNTPs(10 mmol/L)	0.5
10 \times PCR 缓冲液(Mg ²⁺ Free)	2.5
25 mmol/L MgCl ₂	2.0
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
ddH ₂ O	15.5
总体积	25.0
注: RT-PCR 反应体系中各种试剂的量可根据 ([具体情况 ([进行适当调整,也可采用商业化的 ([一步或两步法试剂盒。	

C.6 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶,对 PCR 产物进行电泳,电压 120 V,缓冲液 0.5 \times TBE。电泳结束后染色,再在凝胶成像系统中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍照并做记录。

C.7 结果判断

如果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,则判定为阳性。

如果阳性对照、阴性对照和空白对照正常,待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为阴性。

C.8 序列测定

PCR 产物纯化、回收后,进行克隆、测序,或者直接测序。把测序所得到的核苷酸序列与已知的 BaMV 相应序列进行比对(利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行比对,网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。若测定的核苷酸序列与已知的 BaMV 核苷酸序列同源性大于 72%(或氨基酸序列大于 80%),则判定为 BaMV 序列,否则为非 BaMV 序列。
