

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4632—2016

小西葫芦黄花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Zucchini yellow mosaic virus*

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布



中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
小西葫芦黄花叶病毒检疫鉴定方法
SN/T 4632—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 26 千字
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 • 2-32378 定价 21.00 元

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：中华人民共和国河南出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、广西大学、中国农业科学院郑州果树研究所。

本标准起草人：赵忠懿、韩英、李萌、宋南、廖富荣、朱英芝、彭发青、代玉华、吴会杰。

小西葫芦黄花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了小西葫芦黄花叶病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境种子、苗木、组培苗等植物性繁殖材料及新鲜或保鲜瓜果中小西葫芦黄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方法

3 小西葫芦黄花叶病毒基本信息

学名:*Zucchini yellow mosaic virus*

缩写:ZYMV

分类地位:马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)、马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)

其他信息参见附录 A。

4 方法原理

小西葫芦黄花叶病毒的血清学特性和分子生物学特性是检疫鉴定的主要依据。

5 仪器设备和主要试剂

5.1 仪器设备

酶联检测仪、天平(感量:1/10 000 g)、pH 计(测量精度:±0.05 pH)、微量榨汁机、高速冷冻离心机、植物光照培养箱(温度可调范围 0℃~50℃)、隔离温室、透射电子显微镜(放大倍数:20 万倍)、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、恒温水浴锅、低温冰箱等。

5.2 用具

微量移液器(2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)、酶联板、研钵、eppendorf 管、铜网(400 目)、滴管、尖头小镊子、Whatman 滤纸、塑料培养皿、洁净玻璃片、Parafilm、花盆、灭菌土等。

5.3 主要试剂

酶联免疫吸附测定试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)。

SN/T 4632—2016

6 抽样与样品制备

6.1 抽样

按照 SN/T 2122 的规定执行。

6.2 样品制备

6.2.1 种子样品

将种子播于灭菌土中,于 25℃ 生长并进行症状观察。待长出 3 片~4 片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。采集叶片进行酶联免疫吸附测定及 RT-PCR 检测。

6.2.2 苗木样品

将苗木种植于隔离温室中,于 25℃ 生长并进行症状观察。有症状的苗木或种薯单独检测。没有症状的分组检测,分组方法和检测方法同 6.2.1。

6.2.3 组培苗样品

直接取组培苗进行分组和检测,方法同 6.2.1。

6.2.4 瓜果样品

直接取新鲜或保鲜瓜果样品(重点选取带有畸形、变色等病毒病症状的样品)进行分组和检测,方法同 6.2.1。

7 检测方法

7.1 酶联免疫吸附测定

见附录 B。

7.2 免疫电镜检测

按照 SN/T 1840 的规定执行。

7.3 RT-PCR 检测

见附录 C。

8 结果判定

酶联免疫吸附测定或免疫电镜检测为阳性,RT-PCR 检测亦为阳性,可判定待检样品带有小西葫芦黄花叶病毒。

9 样品保存

9.1 样品保存

经检验确定携带小西葫芦黄花叶病毒的种子保存在 4℃,病株在 -20℃ 或者 -80℃ 冰箱中保存,

做好标记和登记工作。

9.2 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、时间、实验时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。酶联测定需有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳结果图片。

SN/T 4632—2016

附 录 A

(资料性附录)

小西葫芦黄花叶病毒其他相关信息

A.1 寄主范围

ZYMV 主要侵染葫芦科植物,也可侵染苋科、豆科、菊科、藜科、唇形科、伞形科、玄参科、毛茛科和番杏科等 9 个科的部分植物。

A.2 病害症状

被 ZYMV 侵染的葫芦科植物,叶片大多黄化并带有严重花叶、畸形等症状,果实常表现为颜色改变或严重畸形(图 A.1)。

ZYMV 在特定寄主上引起的症状与病毒株系密切相关,不同株系病毒在寄主植物上引起的症状、发病症状程度均有差异。ZYMV 引起症状类型还与环境条件相关。

A.3 分布

国外:意大利、法国、德国、西班牙、英国、美国、日本及澳大利亚等 50 多个国家和地区。

国内:新疆、河南、陕西、河北、山西、北京、广州、浙江及广西等省市。

A.4 传播方式

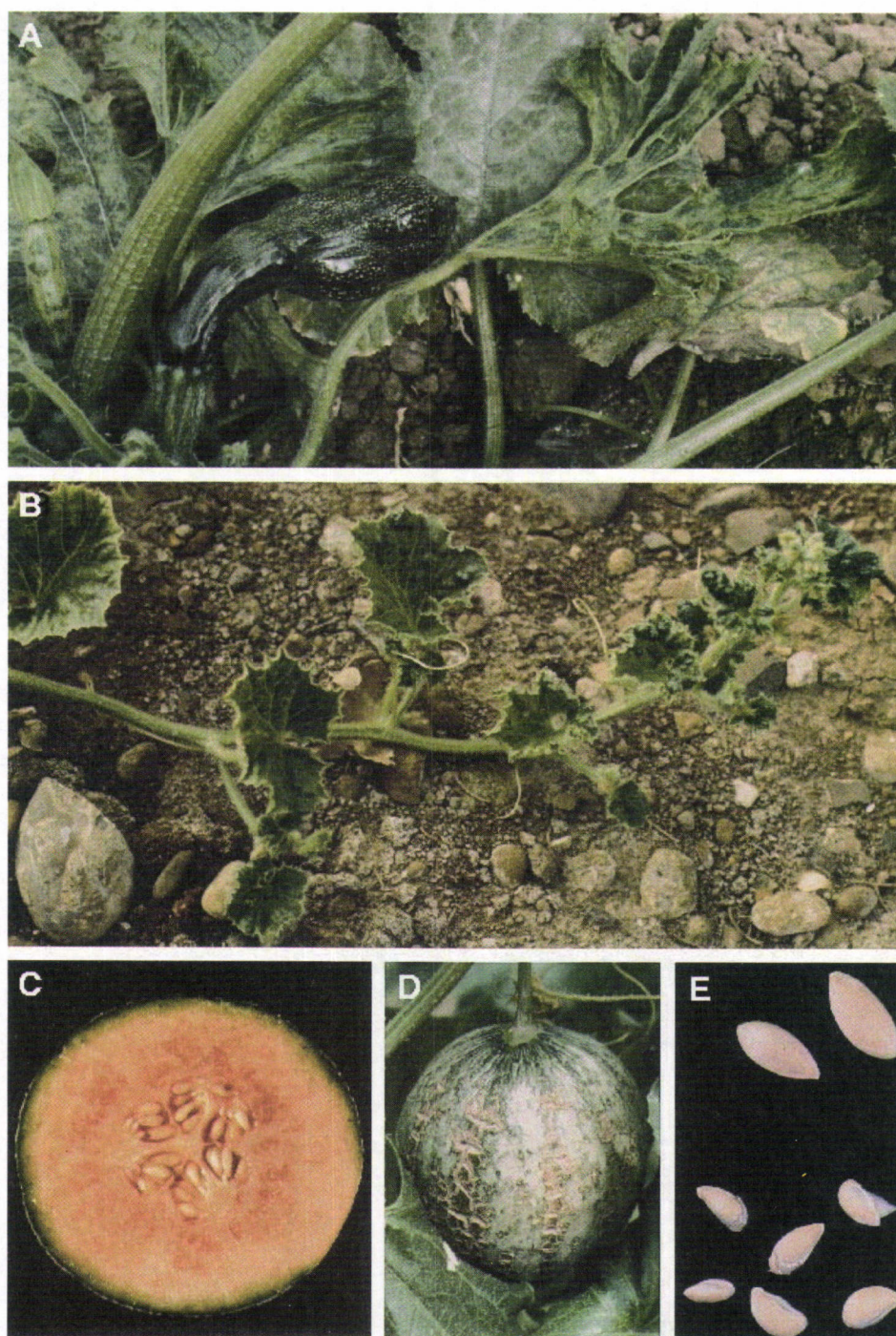
主要通过蚜虫以非持久性方式传播,通过种子、苗木等繁殖材料及果实进行远距离传播。

A.5 粒子形态

线状,长约 750 nm。

A.6 基因组

ZYMV 的基因组为一条由 9593 个核苷酸组成的正义单链 RNA,基因组翻译的起始位点始于第 140 位核苷酸,结束于第 9379 位核苷酸,编码一个大的多聚蛋白。ZYMV 的外壳蛋白由 837 个核苷酸编码,核苷酸位点始于第 8546 位核苷酸,结束于 9382 位核苷酸。



说明：

A —— 西葫芦叶片和果实畸形；

B~E——ZYMV 在甜瓜上引起的症状；

B —— 叶片畸形、褪色，节间缩短；

C —— 果肉硬化；

D —— 果皮开裂；

E —— 种子畸形(上部为健康种子)。

注：引自 plant pathology(1997)46,809-829。

图 A.1 ZYMV 在瓜类作物上引起的症状

SN/T 4632—2016

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 酶联板的要求

使用质量有保证厂商生产的酶联板。

B.1.2 包被抗体

特异性的小西葫芦黄花叶病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的小西葫芦黄花叶病毒抗体。

B.1.4 底物溶液

对硝基苯磷酸二钠(PNPP)。

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2CO_3)	1.3 g
PVP(MW24 000~40 000)	20 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
4 ℃ 储存。	

B.1.6 包被缓冲液(pH9.6)

Na_2CO_3	1.59 g
NaHCO_3	2.93 g
NaN_3	0.2 g
蒸馏水定容至 1 000 mL, 4 ℃ 保存。	

B.1.7 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
蒸馏水定容至 1 L。	

B.1.8 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
------	-----

BSA(牛血清白蛋白)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
4℃储存。	

B.1.9 底物(PNPP)缓冲液(pH9.8)

氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺	97 mL
溶于 800 mL 蒸馏水中,用盐酸(HCl)调 pH 值至 9.8,蒸馏水定容至 1 L,4℃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,加入酶联板孔中,100 μL /孔,加盖,37℃孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1:10(重量:体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,2 000 r/min 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。

B.2.3 加样

加入制备好的检测样品、阴性对照、阳性对照,100 μL /孔,每一样品设一重复。加盖后于 4℃冰箱孵育过夜,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

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,并加入到酶标板中,100 μL /孔,加盖,37℃孵育 4 h,酶标板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

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 μL /孔,加入到酶标板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

在不同的时间内如 30 min、1 h、2 h 或更长时间,用酶标仪在 405 nm 处读 OD 值,或用肉眼观察显色情况。

B.3 结果判断

B.3.1 质量控制

对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔)应该在质量控制范围内:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.15,当阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值为 5~10;同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 结果判断

若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判断。

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值大于 2,判为阳性;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值接近阈值,判为可疑样品,需重新做一次,或者任选 7.2、7.3 中的一种方法加以验证;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显小于 2,判为阴性。

若采用商品化试剂盒,按照试剂盒说明操作并判定结果。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测方法

C.1 试剂**C.1.1 50×TAE**

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

C.1.2 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25%
蔗糖水溶液	40%(质量浓度)

C.2 实验步骤**C.2.1 总 RNA 提取**

取 50 mg~100 mg 植物叶片或果实组织,在液氮中研磨至粉末状,迅速转移到预冷的 1.5 mL EP 管中;组织样品按 50 mg/mL~100 mg/mL trizol 加入 trizol,迅速混匀,室温静置 10 min;按 200 μL 氯仿/mL trizol 加入氯仿,振荡混匀 15 min,室温放置 15 min;4℃ 12 000 r/min 离心 15 min;将上清转移到一个新的无 RNase 的 EP 管内,按 0.5 mL 异丙醇/mL trizol 加入异丙醇混匀,室温放置 15 min;4℃ 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,75%乙醇洗 2 次;室温中晾干 10 min,加入 20 μL DEPC 处理水,轻轻敲打,溶解总 RNA。获得的 RNA 溶液置于-80℃冰箱中保存。

也可采用商业试剂盒等方法提取 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应**C.2.2.1 引物序列**

根据 ZYMV CP 基因上下游保守区域序列,设计特异性引物如下:

ZYMV(+):GGG GAG CGG AGA CAA GTG AAC TG

ZYMV(-):GAC TAC GGC ACT CCT GGA CCA C

预期扩增产物大小为 1 074 bp。

C.2.2.2 cDNA 合成

用分光光度计测定所提的总 RNA 浓度,取 0.1 μg~5 μg 总 RNA,按表 C.1 组分制备 RT 反应混合液 12 μL,轻轻混匀,短暂离心,置于 65℃中温浴 5 min,然后迅速置于冰上。

表 C.1 各组分用量

模板(总 RNA)	0.1 μg ~5 μg
DEPC 水	至 12 μL

按表 C.2 加入其他成分,轻轻混匀混合物,并短暂离心,将所有液体收集到管底。置 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,随后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 终止反应,最后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中保存。

表 C.2 各组分用量

5 \times Reation Buffer	4 μL
RiboLock TM Rnase Inhibitor(20 u/ μL)	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RevertAid M-MuL V Reverse Transcriptase(200 u/ μL)	1 μL

C.2.2.3 PCR 反应

按照表 C.3 配制反应体系,充分混匀后进行下列热循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

表 C.3 各组分用量

模板(合成的第一链 cDNA)	1 μL
dNTP(2.5 mM Mix)	2 μL
上下游特异性引物(10 μm)	各 1 μL
10 \times PCR Buffer	2.5 μL
Taq 聚合酶	0.5 μL
ddH ₂ O	17 μL
总体积	25 μL

C.2.3 琼脂糖电泳

C.2.3.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5%(质量浓度)配好,在微波炉中融化混匀,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

C.2.3.2 加 DNA 染料

加入溴化乙锭(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或其他 DNA 染料至凝胶中,混匀,倒入已封好的胶模,插上样品梳。待凝胶凝固后拔出梳子。

C.2.3.3 电泳

用 1 μL 6 \times 加样缓冲液与 5 μL 样品混合,然后将其和适合的 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观察并保留结果。

C.3 结果判断

C.3.1 阳性对照在 1 074 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 结果达到质控要求,且样品在 1 074 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

参 考 文 献

- [1] 朱英芝,陈保善,蒙姣荣.罗汉果种子传播小西葫芦黄化花叶病毒的检测[J].基因组学与应用生物学,2011,30(6):678-681.
- [2] 朱英芝,韩英,蒙姣荣,等.小西葫芦黄化花叶病毒罗汉果分离株抗血清的制备和应用[J].热带作物学报,2011,32(9):1683-1686.
- [3] Lisa V, Boccardo G, D'Agotino G, et al. Characterization of potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology*, 1981, 71(7): 667-672.
- [4] Desbiez C, Lecoq H. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 1997, 46(6): 809-829.
-



SN/T 4632-2016

书号:155066 • 2-32378

定价: 21.00 元