



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3962—2014

---

## 水仙迟季黄化病毒的检疫鉴定方法

Detection and identification of *Narcissus late season yellows virus*

2014-04-09 发布

2014-11-01 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、马克争、蔡伟、李敏、张志灯、闫诚、张永江、高芳銮、吴祖建。

## 水仙迟季黄化病毒的检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了水仙迟季黄化病毒检测的程序和方法。

本标准适用于进出境水仙中水仙迟季黄化病毒的检测。

### 2 原理

水仙迟季黄化病毒的血清学和分子生物学特性是制定本检疫鉴定方法的主要依据。水仙迟季黄化病毒的分类地位、寄主范围、病害症状、分布地区、传播途径、粒体形态、基因组等参见附录 A。

### 3 仪器设备、用具及试剂

#### 3.1 仪器设备

高速冷冻离心机、电子天平(1/1 000 g)、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、-20 ℃低温冰箱和-80 ℃超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH 计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、酶标仪等。

#### 3.2 用具

各种量程的可调移液器(1 000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L、10  $\mu$ L、2  $\mu$ L)、PCR 反应管、无 RNase 离心管(1.5 mL)、研钵、酶联板等。

#### 3.3 试剂

酶联板捕获抗原酶联免疫吸附测定法(plate-trapped antigen ELISA, PTA-ELISA)试剂见附录 B, 巢式 RT-PCR 试剂见附录 C。

### 4 检测与鉴定

#### 4.1 PTA-ELISA

具体方法见附录 B。

#### 4.2 巢式 RT-PCR

具体方法见附录 C。

### 5 结果判定与记录

#### 5.1 结果判定

当水仙迟季黄化病毒 PTA-ELISA 检测结果为阳性,且巢式 RT-PCR 检测结果也为阳性时,则判

定为检出水仙迟季黄化病毒。

当水仙迟季黄化病毒 PTA-ELISA 检测结果为阴性,且巢式 RT-PCR 检测结果也为阴性时,则判定为未检出水仙迟季黄化病毒。

若水仙迟季黄化病毒仅 PTA-ELISA 或 RT-PCR 为阳性,则需进一步采用电镜鉴定或 PCR 产物序列测定等方法进行鉴定。

## 5.2 结果记录

记录好各项实验数据,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。

## 6 样品的保存

经检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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)

### 水仙迟季黄化病毒的背景资料

#### A.1 分类地位

中文名:水仙迟季黄化病毒

学名:*Narcissus late season yellows virus*

缩写:NLSYV

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

#### A.2 寄主范围

寄主范围较窄,已报道的寄主为水仙。

#### A.3 病害症状

侵染水仙后引起叶片、花茎上出现窄长的褪绿条纹或椭圆状斑块等症状(见图 A.1)。



图 A.1 NLSYV 侵染水仙后引起的症状

#### A.4 分布地区

主要分布于英国、荷兰、新西兰等国家。

#### A.5 传播途径

主要由桃蚜(*Myzus persicae*)传播。

#### A.6 粒体形态

病毒粒体为线条状,大小约为 750 nm×12 nm。

#### A.7 病毒基因组

正义单链 RNA 病毒,全长约 9 651 bp。

附 录 B  
(规范性附录)  
PTA-ELISA

B.1 试剂

B.1.1 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	1.59 g
碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )	2.93 g
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.2 g
加入蒸馏水 900 mL,用 HCl 调节 pH 至 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( $\text{NaCl}$ )	8.0 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( $\text{KCl}$ )	0.2 g
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.2 g
加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 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 抗体稀释缓冲液/酶标抗体稀释缓冲液

三羟基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)	13.0 g
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	2.0 g
氯化钠( $\text{NaCl}$ )	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( $\text{MgCl}_2$ )	0.1 g
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.2 g
二乙醇胺[ $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH} \cdot \text{OH})_2$ ]	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:水仙迟季黄化病毒抗体。  
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)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、阳性对照做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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

将酶标抗体按说明稀释至工作浓度,加入到酶联板的孔中,100  $\mu$ 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,使终质量浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100  $\mu$ 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 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读取 OD 值。

## B.3 结果判断

在满足阴性对照孔的  $OD_{405}$  值 $<0.15$ 、阳性对照孔的  $OD_{405}$  值/阴性对照孔的  $OD_{405}$  值 $>5\sim10$ ,孔的重复性基本一致的质量要求后,样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值 $>2$ ,判为阳性。样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值在阈值附近,判为可疑样品,应重新做一次,或用其他方法加以验证。样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值明显 $<2$ ,判为阴性。

**附 录 C**  
(规范性附录)  
**巢式 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 <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	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 三氯甲烷。

C.1.4 异丙醇。

C.1.5 75%乙醇。

C.1.6 无水乙醇。

C.1.7 RT 缓冲液。

C.1.8 dNTPs:10 mmol/L。

C.1.9 M-MLVRT:200 U/μL。

C.1.10 RNasin:40 U/μL。

C.1.11 *Taq* DNA 聚合酶。

C.1.12 PCR 缓冲液。

C.1.13 MgCl<sub>2</sub>:25 mmol/L。

C.1.14 引物序列

根据已报道的 NLSYV 基因组序列设计 2 对用于特异性扩增的引物：

外侧引物 NLSYVf:5'-CCACTTGAAGTCTATCACCA-3'

外侧引物 NLSYVr:5'-CCAAACTAGCATCCTTGTGT-3'

内侧引物 NLSYV1:5'-ATCACATACACACCACGACA-3'

内侧引物 NLSYV2:5'-GTGTGTCTCTCCGTGTTCTC-3'

外侧引物 PCR 产物大小 938 bp,内侧引物 PCR 产物大小 539 bp。

**C.2 巢式 RT-PCR 检测****C.2.1 总 RNA 提取**

取 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,取上清液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,取上清液;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,弃上清液;加入 1 mL 75%的乙醇洗涤沉淀 2 次,每次 4℃,7 500 g 离心 3 min,弃上清液;RNA 沉淀干燥后,用 20 μL~40 μL 经 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的 ddH<sub>2</sub>O 溶解,-20℃保存备用。



C.2.2 cDNA 合成

在 PCR 管中加入 2 μL 总 RNA,1 μL 下游引物(NLSYVr),ddH<sub>2</sub>O 5 μL,70 ℃水浴 10 min,迅速冰浴 5 min,再加入下列试剂:5 × 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 ℃水浴 60 min,70 ℃水浴 10 min,自然冷却至室温,−20 ℃保存备用。

C.2.3 PCR 扩增

第一次 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为阴性对照,同时以水代替模板作为空白对照。

第一次 PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 30 s、56 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 1 min,35 个循环,最后一个循环结束后 72 ℃继续延伸 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	加样量
cDNA	3 μL
Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)	0.5 μL
dNTPs (10 mmol/L)	0.5 μL
10×PCR 缓冲液 (不含 Mg <sup>2+</sup> )	2.5 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	2 μL
NLSYVf (10 μmol/L)	1 μL
NLSYVr (10 μmol/L)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	14.5 μL
总体积	25 μL

第二次 PCR 反应体系见表 C.2,取第一次 PCR 反应产物作为模板。

第二次 PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃变性 30 s、58 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 1 min,30 个循环,最后一个循环结束后 72 ℃继续延伸 10 min。

表 C.2 第二次 PCR 反应体系

试剂名称	加样量
第一次 PCR 反应产物	0.1 μL
Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/μL)	0.5 μL
dNTPs (10 mmol/L)	0.5 μL
10×PCR 缓冲液 (不含 Mg <sup>2+</sup> )	2.5 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	2 μL
NLSYV1 (10 μmol/L)	1 μL
NLSYV2 (10 μmol/L)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	17.4 μL
总体积	25 μL

#### C.2.4 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。电泳结束后,在溴化乙锭(EB,浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ )溶液中染色 10 min,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.2.5 结果判断

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 539 bp 大小处有扩增条带,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为阳性。

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 539 bp 大小处有扩增条带,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。

---