



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3963—2014

---

## 桃丛簇花叶病毒检测方法

*Detection of Peach rosette mosaic 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：马云霞、张明哲、郭京泽、闻伟刚、李明福、朱水芳。

## 桃丛簇花叶病毒检测方法

### 1 范围

本标准规定了桃丛簇花叶病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于桃树、葡萄等植物材料中桃丛簇花叶病毒的检疫和鉴定。

### 2 原理

桃丛簇花叶病毒学名:*Peach rosette mosaic virus*,缩写:PRMV。该病毒外壳蛋白的特异性及其基因组核酸序列的特殊性是本标准制定的主要依据。相关资料参见附录 A。

### 3 仪器设备、用具及试剂

#### 3.1 仪器设备

酶标检测仪、实时荧光 PCR 仪、低温冰箱、恒温箱、高压灭菌锅、电子分析天平、台式高速冷冻离心机、恒温水浴锅、制冰机等。

#### 3.2 用具

微量可调移液器(量程分别为 2.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$  和 1 mL)及灭菌的吸头、1.5 mL 离心管、研钵、酶联板、0.2 mL PCR 管、96 孔 PCR 反应板及盖子等。

#### 3.3 试剂

主要试剂、缓冲液、引物和探针序列等见附录 B 和附录 C。

### 4 检测与鉴定

#### 4.1 血清学(双抗体夹心酶联免疫吸附测定)

##### 4.1.1 包被抗体

将 PRMV 的抗体用包被缓冲液稀释至工作浓度,加入酶联板中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。将酶联板加盖(或用保鲜膜密封后)放入保湿盒中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中温育 2 h(或 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜)。之后每孔加入 300  $\mu\text{L}$  PBST 洗板 3 次,每次 3 min。

##### 4.1.2 样品制备

称取待检植物叶片 0.2 g,加入 2 mL 样品抽提缓冲液,充分研磨后,转入 1.5 mL 的离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,即为 1:10 稀释的样品粗提液。

##### 4.1.3 加样

将样品粗提液加入已包被抗体的酶联板中,每孔加 100  $\mu\text{L}$ 。加缓冲液的孔作为空白对照,同时设

置阴性对照、阳性对照。每个处理设置一个重复。然后将酶联板加盖或用保鲜膜密封后放入保湿盒中，置于 37 ℃ 恒温箱中温育 2 h(或 4 ℃ 冰箱过夜)。之后用 PBST 洗板 3 次，方法同 4.1.1。

#### 4.1.4 加酶标抗体

用 ECL 缓冲液将碱性磷酸酯酶标记的 PRMV 酶标抗体稀释至工作浓度，加入酶联板孔中，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。置于 37 ℃ 条件下保温 2 h，之后用 PBST 洗板 3 次，每次 3 min。

#### 4.1.5 加底物显色

用新鲜配制的底物缓冲液配制质量浓度为 1 mg/mL 的 pNPP 溶液，加入酶联板，每孔 100  $\mu\text{L}$ 。室温避光显色 30 min~60 min。

#### 4.1.6 终止反应

待阳性对照孔颜色反应较充分而阴性对照孔尚未有非特异反应出现时，每孔中加入 33  $\mu\text{L}$  3 mol/L NaOH 中止反应。

#### 4.1.7 读数

用酶标读数仪测定  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值，记录实验结果。

### 4.2 PRMV 的实时荧光 PCR 检测方法

#### 4.2.1 样品制备和植物总 RNA 的提取

取 0.1 g 待检的植物叶片，剪成小段，用液氮研磨成粉末状，移入灭菌的 1.5 mL 离心管中，然后加入 1 mL 的 Trizol，剧烈振荡摇匀；4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min 以除去不溶的成分，将上清液转入一新的 1.5 mL 离心管中，室温下放置 5 min；加入 0.2 mL 三氯甲烷，剧烈振荡 30 s，在室温下保持 10 min~15 min 后，4 ℃，12 000 r/min 离心 15 min；将上层水相转移到新的 1.5 mL 离心管中，加 0.5 mL 异丙醇，上下颠倒混匀，室温下保持 15 min；4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min，RNA 就会在管的侧壁和底部形成沉淀；弃去上清液，加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀，然后 4 ℃，7 500 r/min 离心 5 min，吸取上清液；沉淀于室温下充分干燥后，溶于 30  $\mu\text{L}$  去离子水(DEPC 处理)中，-20 ℃ 保存备用。

#### 4.2.2 实时荧光 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR 采用商品化的 RT-PCR 一步法试剂盒进行。

每个样品及对照设 2 个平行处理。检测时以感染 PRMV 的植物材料作为阳性对照；在没有感染 PRMV 的植物材料作为阳性对照的情况下，可以用人工构建的阳性参考质粒分子或者以通过体外转录得到的含有待检核酸序列的 RNA 作为阳性对照(见附录 C)。以健康的植物材料中提取的总 RNA 作为阴性对照；以水代替 RNA 作为空白对照。

实时荧光 RT-PCR 反应体系如下<sup>1)</sup>：

2× Master Mix 混合液(不含 UNG)	12.5 $\mu\text{L}$
40× MultiScribe 和 RNase 酶抑制剂(RNase Inhibitor)混合液	0.63 $\mu\text{L}$
正向引物 (10 $\mu\text{mol/l}$ )	1.25 $\mu\text{L}$
反向引物 (10 $\mu\text{mol/l}$ )	1.25 $\mu\text{L}$

1) 该反应体系针对 Taq Man® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems, Cat.No.4309169)给出，给出这一信息是为了方便本标准使用者，并不表示只认可该产品，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用等效产品。

TaqMan 探针(5 $\mu\text{mol/l}$ )	2.5 $\mu\text{L}$
RNA 样品	5.0 $\mu\text{L}$
水	1.87 $\mu\text{L}$
总体积	25.0 $\mu\text{L}$
实时荧光 RT-PCR 反应参数:48 $^{\circ}\text{C}$ ,30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ ,10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ ,15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ ,1 min,45 个循环。	

## 5 结果判定与记录

### 5.1 血清学结果判断

5.1.1 对照孔的  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值(空白对照孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:空白孔和阴性对照孔的  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值 $<0.15$ ,当阴性对照孔的  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值 $<0.05$  时,按 0.05 计算。阳性对照有明显的颜色反应;阳性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值 $>2$ ;孔的重复性基本一致。

5.1.2 在满足了 5.1.1 的质量要求后,结果原则上可判断如下:

阳性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值 $\geq 2$ ,判为阳性。

阳性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405\text{ nm}}$  值 $<2$ ,判为阴性。

5.1.3 若不能满足 5.1.1 的质量控制要求,则不能进行结果判断。

5.1.4 如果是商品试剂盒,则根据试剂盒的说明来判断。

### 5.2 实时荧光 RT-PCR 结果判断

5.2.1 实时荧光 RT-PCR 阴性对照和空白对照无荧光增幅现象,阳性对照有显著荧光增幅现象则表明反应体系运行正常。

5.2.2 在满足 5.2.1 的质量要求后,结果可判断如下:

——若待检测样品无荧光增幅现象,则判定样品未检出桃丛簇花叶病毒,判为阴性。

——若待检测样品有荧光增幅现象,且  $\text{Ct}$  值 $\leq 35$  时,则判断样品中检出桃丛簇花叶病毒,判为阳性。

——若待检测样品  $35 < \text{Ct}$  值 $< 40$  时,应重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。

——重新检测后在设定同一域值条件下,若  $\text{Ct}$  值 $\geq 40$  时,则判为阴性。重新检测后  $35 < \text{Ct}$  值 $< 40$ ,则判阳性。

### 5.3 血清学检测结果与实时荧光 RT-PCR 结果的综合判断

若同一样品的血清学检测结果与实时荧光 RT-PCR 检测结果均为阳性,则判断该样品为 PRMV 阳性。

若同一样品的血清学检测结果与实时荧光 RT-PCR 检测结果均为阴性,则判断该样品为 PRMV 阴性。

若同一样品的血清学检测结果为阴性,而实时荧光 RT-PCR 的  $\text{Ct}$  值 $\leq 35$  时,则判断该样品为 PRMV 阳性。

若同一样品的血清学检测结果为阳性,而实时荧光 RT-PCR 的检测结果为阴性,则需要分别重复血清学检测、实时荧光 RT-PCR 实验。如果再次重复实验后,血清学检测结果与实时荧光 RT-PCR 检测结果均为阳性,则判定该样品为 PRMV 阳性。如果再次重复实验的结果仍与最初结果相同,则需要结合其他的鉴定方法如症状、普通 PCR 等检测方法,慎重做出结论。

### 5.4 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

SN/T 3963—2014

和实验人员的签字。

## 6 样品的保存

检测结果判定为阳性的植物样品,经液氮冷冻后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。保存样品做好登记和标记工作。

## 附录 A

(资料性附录)

### 桃丛簇花叶病毒的相关资料

#### A.1 学名和分类地位

学名:*Peach rosette mosaic virus*

分类地位:伴生豇豆病毒科(*Secoviridae*),线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)。

#### A.2 病毒粒体形态及基因组组成

病毒粒子为球形,直径约 28 nm,病毒的基因组由两个正义、单链 RNA 组成。

#### A.3 寄主范围和症状

该病毒的主要自然寄主是桃和葡萄。在桃树上引起的症状为枝条的末端表现为丛簇状、叶片花叶、植株矮化。在葡萄上引起枝条节间变短、弯曲,叶片畸形以及茎基部扁平状等症状。

#### A.4 传播方式

该病毒自然条件下可由矛线虫科(*Dorylamidae*)美洲剑线虫(*Xiphinema americanum*)、折环长针线虫(*Longidorus diadecturus*)传播。也可以通过机械接种、嫁接传播。但不能通过植物间的接触传播。该病毒可以种传。

#### A.5 地理分布

该病毒分布于加拿大的安大略省和美国的密执安地区。

#### A.6 鉴别寄主

昆诺藜(*Chenopodium quinoa*):褪绿局部斑、茎尖坏死以及表现为偏上性生长等症状。

苋色藜(*C. amaranticolor*):较轻微的系统斑驳。

SN/T 3963—2014

附 录 B  
(规范性附录)

双抗体夹心酶联免疫吸附测定法主要试剂、溶液配制

B.1 试剂

无水亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(MW20 000~40 000)、叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )、卵清白蛋白(Albumin egg)、吐温-20(Tween-20)、氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )、二乙醇胺(diethanolamine)、无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化钾(KCl)、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、磷酸氢二钠(无水)( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、对硝基苯磷酸二钠(pNPP)、PRMV 抗体、碱性磷酸酯酶标记的 PRMV 抗体等。

B.2 溶液配制

B.2.1 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)

无水碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
叠氮钠	0.2 g
溶于蒸馏水中至 1 000 mL(pH 9.6), 4 ℃ 保存。	

B.2.2 PBST 缓冲液

氯化钠	8.0 g
磷酸氢二钠(无水)	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g
氯化钾	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
溶于蒸馏水中至 1 000 mL(pH 7.4), 4 ℃ 保存。	

B.2.3 样品抽提缓冲液

无水亚硫酸钠	1.3 g
聚乙烯吡咯烷酮 (MW20 000~40 000)	20.0 g
叠氮钠	0.2 g
卵清白蛋白	2.0 g
吐温-20	20.0 g
溶于 1 000 mL 1×PBST (pH 7.4), 4 ℃ 保存。	

B.2.4 ECL 缓冲液

牛血清白蛋白	2.0 g
聚乙烯吡咯烷酮	20.0 g
叠氮钠	0.2 g



溶于 1 000 mL 1×PBST (pH 7.4), 4 ℃ 保存。

#### B.2.5 底物缓冲液

氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.1 g
叠氮钠	0.2 g
二乙醇胺	97.0 mL

溶于蒸馏水中,用盐酸调节 pH 至 9.8,定容到 1 000 mL,4 ℃ 保存。

#### B.2.6 3 mol/L NaOH

12 g NaOH 溶于 100 mL 蒸馏水中。

附 录 C  
(规范性附录)  
实时荧光 RT-PCR 检测法

C.1 试材、试剂

Trizol RNA 提取试剂盒、无水乙醇、异丙醇、三氯甲烷( $\text{CHCl}_3$ )、一步法 RT-PCR 试剂盒等。

含桃丛簇花叶病毒检测目的片段的参考质粒分子,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。植物样品于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

所有实验用试剂均为分析纯;除特别说明外,实验用水为蒸馏水或去离子水。

C.2 引物、探针设计

设计引物和探针如下(扩增片断对应于 PRMV RNA1 的第 1 022~1 105 位碱基):

PRMV-F(正向引物):  $5'\text{-CGACGTATTGCAGATGGTATTTCC-}3'$

PRMV-R(反向引物):  $5'\text{-ACCAACATTCTTCACTGCATCAAG-}3'$

PRMV-P(探针):  $5'\text{-(FAM) CCATTCTTCCTCAGCATCGGGTTGT (Eclipse)-}3'$

C.3 含有待检核酸序列的 RNA 分子的制备

C.3.1 构建含有 PRMV 实时荧光 RT-PCR 检测目标片断的参考质粒分子

人工合成对应于 PRMV RNA1 的第 993~1 130 位碱基的一段长为 138 nt 的 DNA 片段,并将其连入载体 pGH 上。

C.3.2 PCR 扩增得到进行体外转录所需要的 DNA 模板

以人工合成的含有对应于 PRMV 的第 993~1 130 nt 的参考质粒分子作为模板,用引物 PRMV-T7-5F 和 PRMV-T7-3R 进行 PCR 扩增,PCR 产物经胶回收纯化后作为体外转录模板的 DNA 片段。

PRMV-T7-5F(正向):

$5'\text{-TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTAGTGGCATGCGTTTAGCAC-}3'$

PRMV-T7-3R(反向):

$5'\text{-GGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACG-}3'$

C.3.3 体外转录得到进行实时荧光 RT-PCR 检测 PRMV 的阳性 RNA 对照的方法

以 C.3.2 中得到的纯化的 PCR 产物作为模板,进行体外转录,得到进行实时荧光 RT-PCR 检测 PRMV 的阳性 RNA 对照。方法如下:

在室温条件下,严格按照以下顺序在微量离心管中配制以下反应体系:

$5\times\text{T}_7$ 转录缓冲液(Transcription Optimized buffer)	4.0 $\mu\text{L}$
0.1 mol/L DTT	2.0 $\mu\text{L}$
RNase 抑制剂(RNase Inhibitor)混合液(40 U/ $\mu\text{L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
$5\times\text{NTP}$	4.0 $\mu\text{L}$

线性化的 DNA 模板 (Linearized DNA template)	1.0 $\mu\text{L}$
DEPC $\text{H}_2\text{O}$	7.2 $\mu\text{L}$
总体积	19.2 $\mu\text{L}$

然后,加入 0.8  $\mu\text{L}$  T7 RNA Polymerase, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h。反应结束后电泳检测体外转录是否成功。

取 8  $\mu\text{L}$  体外转录产物,加入 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ DNase I 缓冲液,1  $\mu\text{L}$  DNase I (无 RNase 污染;1 U/ $\mu\text{L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min,然后加入 1  $\mu\text{L}$  DNase 终止液 (DNase Stop Solution) 终止反应,再在 65  $^{\circ}\text{C}$  下水浴 10 min 以失活 DNase。至此,得到的反应产物即可作为实时荧光 RT-PCR 检测 PRMV 的阳性对照 RNA。

注:本反应体系中所用的酶与试剂均购自 Promega 公司。如用其他公司的酶与试剂,需根据说明做相应的调整。

参 考 文 献

[1] Klos, E.J.; Fronek, F.; Knierem, J.A.; Cation, D.1966. Peach rosette mosaic transmission and control.Michigan Agricultural Experimental Station Quarterly Bulletin,49:287-293.

[2] Lammers, A.H., Allison, R.F., Ramsdell, D.C.1999.Cloning and sequencing of peach rosette mosaic virus RNA1.Virus Research,65:57-73.

---