



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3964—2014

---

## 番茄严重曲叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Tomato severe leaf curl 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、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、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张永江、邓丛良、沈建国、廖富荣、栗智平、鲁洁、朱水芳、李明福、李桂芬、魏梅生。

# 番茄严重曲叶病毒检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了番茄严重曲叶病毒的免疫学及分子生物学等检疫鉴定方法。

本标准适用于可能携带番茄严重曲叶病毒的寄主植物及其产品的检疫鉴定。

## 2 番茄严重曲叶病毒基本信息

学名: *Tomato severe leaf curl virus*

缩写: ToSLCV

分类地位: 双生病毒科 (*Geminiviridae*), 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*)。

传播途径: 主要通过烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传播, 也可通过嫁接传播。

番茄严重曲叶病毒的其他信息参见附录 A。

## 3 原理

根据番茄严重曲叶病毒与抗体之间的特异性反应, 对样品进行双抗体夹心酶联免疫吸附 (DAS-ELISA) 检测; 根据该病毒 DNA 保守区的特异性进行常规 PCR 或实时荧光 PCR 检测, 通过电泳条带大小或扩增曲线的变化进行结果判定。

## 4 仪器设备、用具及试剂

### 4.1 仪器设备

酶标仪、普通 PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、多功能电泳仪、高速冷冻离心机、凝胶成像系统、4 °C 冰箱、电子分析天平 (0.001 g)、恒温水浴锅、-80 °C 超低温冰箱、高压灭菌锅及制冰机等。

### 4.2 主要用具

可调移液器 (2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、离心管、PCR 管、酶标板及研钵等。

### 4.3 主要试剂

除有特殊说明外, 所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。

双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (DAS-ELISA) 试剂见附录 B, 常规 PCR 检测试剂见附录 C。

## 5 检疫鉴定方法

### 5.1 检测样品的制备

5.1.1 苗木: 有症状 (如植株矮化、叶片畸形、卷曲、皱缩等) 的苗木单独编号, 每株采集症状叶片 5 g 用于后续检测; 无症状的植株每 10 株分为 1 组并编号, 混合采集植株顶部叶片 5 g 用于后续检测。

5.1.2 植物产品:有症状的植物产品单独编号,取症状部位 0.5 g 用于后续检测;无症状或无法观察症状的植物产品,分组编号后混合采样 0.5 g 用于后续检测。

## 5.2 双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

具体操作步骤见附录 B。

## 5.3 常规 PCR 检测

提取样品 DNA,设置阳性对照、阴性对照和空白对照,进行常规特异引物 PCR 检测或常规通用引物 PCR 检测。具体操作步骤见附录 C。

## 5.4 实时荧光 PCR 检测

提取样品 DNA,设置阳性对照、阴性对照和空白对照,进行实时荧光 PCR 检测。具体操作步骤见附录 D。

# 6 结果判断

同时符合双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)和常规特异引物 PCR 检测结果为阳性的,判定待检测样品携带番茄严重曲叶病毒。

采用常规通用引物 PCR 进行检测,当检测结果为阳性时,则进行序列测定,测定序列经比对分析为番茄严重曲叶病毒的,判定待检测样品携带番茄严重曲叶病毒。

实时荧光 PCR 检测结果为阳性的,判定待检测样品携带番茄严重曲叶病毒。

# 7 样品保存与记录结果

## 7.1 样品保存

检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在-80℃冰箱中,并作好登记和标记,以备复核用。

## 7.2 结果记录

包括样品来源、种类、取样人员、检测原始记录、照片等文档按有关规定作好登记、标记和存档,以便必要时复核。



## 附 录 A

(资料性附录)

### 番茄严重曲叶病毒背景资料

#### A.1 寄主范围

寄主植物包括番茄属(*Lycopersicon* spp.)、辣椒属(*Capsicum* spp.)、茄属(*Solanum* spp.)、藜属(*Chenopodium* spp.)、蓼属(*Polygonum* spp.)、滨藜属(*Atriplex* spp.)、*Halogetum* 属、烟草属(*Nicotiana* spp.)、独行菜属(*Lepidium* spp.)、拟漆姑属(*Spergularia* spp.)、苋属(*Amaranthus* spp.)及锦葵属(*Malva* spp.)。

#### A.2 病害症状

侵染寄主植物导致植株矮化及叶片卷曲或皱缩(图 A.1)。



图 A.1 受侵染番茄症状

#### A.3 分布地区

中美洲。

#### A.4 粒体形态

病毒粒子为双联体结构,颗粒大小为 18 nm×30 nm,无包膜,由两个不完整的二十面体组成。

SN/T 3964—2014

#### A.5 基因组特性

为单组份病毒,基因组 DNA 大小为 2.5 kb~2.6 kb,包含 AR1、AL1、AL2、AL3 及 AL4 等 5 个阅读框,分别编码外壳蛋白、复制相关蛋白、转录激活蛋白、复制增强蛋白及 C4 蛋白。

附 录 B  
(规范性附录)  
双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

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

特异性的番茄严重曲叶病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的番茄严重曲叶病毒抗体。

B.1.4 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.5 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.15 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
加入 900 mL 蒸馏水溶解,调节 pH 到 7.4,加蒸馏水定容至 1 L。	

B.1.6 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

亚硫酸钠(Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	1.3 g
聚乙烯吡咯烷酮(PVP,MW 24 000~40 000)	20.0 g
叠氮化钠(NaN <sub>3</sub> )	0.2 g
PBST 定容至 1 L,4 ℃ 储存。	

B.1.7 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	2.93 g
叠氮化钠(NaN <sub>3</sub> )	0.2 g
蒸馏水定容至 1 L,4 ℃ 储存。	

B.1.8 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

牛血清白蛋白(BSA)或脱脂奶粉	2.0 g
------------------	-------

## SN/T 3964—2014

聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW 24 000~40 000)	20.0 g
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.2 g

PBST 定容至 1 L; 4 °C 储存。

**B.1.9 底物(pNPP)缓冲液(pH 9.8)**

氯化钾(KCl)	0.1 g
叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )	0.2 g
二乙醇胺( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$ )	97 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 °C 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  $\mu\text{L}$ /孔, 37 °C 孵育 2 h, 清空孔中溶液, PBST 洗涤 3 次。

**B.2.2 样品制备**

待测样品按 1 : 10(质量体积比)加入抽提缓冲液, 用研钵研磨成浆, 7 500 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; 空白对照为样品抽提缓冲液。

**B.2.3 加样**

根据检测需要设计 96 孔(或 48 孔)酶联板, 包括 2 个阴性对照孔、2 个阳性对照孔、2 个空白对照孔和多个待测样品孔。加样量为 100  $\mu\text{L}$ /孔, 每个样品设 1 个重复。4 °C 冰箱孵育过夜, 酶联板用 PBST 洗涤 3 次。

**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, 并加入到酶联板中, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 37 °C 孵育 4 h, PBST 洗涤 3 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  $\mu\text{L}$ /孔, 加入到酶联板中, 室温避光孵育。

**B.2.6 读数**

用酶标仪在 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读 OD 值。

注: 实际检测时, PBST 洗涤次数和显色读数时间按照检测抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

**B.3 结果判断**

**B.3.1** 对照孔的  $\text{OD}_{405}$  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, 即:

- a) 阴性对照孔的  $\text{OD}_{405}$  值  $< 0.15$ ;
- b) 阳性对照  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值  $> 2$ ;



c) 同一样品的  $OD_{405}$  值应基本一致。

**B.3.2** 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判断如下:

- a) 样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值  $> 2$ , 判为阳性;
- b) 样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值接近阈值, 判为可疑样品, 需重做一次或用其他方法验证;
- c) 样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值  $< 2$ , 判为阴性。

**B.3.3** 若满足不了 B.3.1 质量要求, 则不能进行结果判断。

注: 质量控制标准和结果判定需按照检测抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

附 录 C  
(规范性附录)  
常规 PCR 检测

### C.1 试剂

#### C.1.1 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)DNA 提取缓冲液

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)	4 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 0.5 mol/L)	8 mL
氯化钠(NaCl)	16.4 g
1 mol/L Tris-HCl	20 mL
2-ME( $\beta$ -巯基乙醇)	4 mL
加水定容至 200 mL, 调 pH 至 8.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。	

#### C.1.2 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)沉淀液

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)	10 g
氯化钠(NaCl)	4.1 g
加水定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min。	

#### C.1.3 高盐 TE 缓冲液

乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 0.5 mol/L)	0.02 mL
氯化钠(NaCl)	5.85 g
1 mol/L Tris-HCl	1 mL
加水定容至 100 mL, 调 pH 至 8.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。	

#### C.1.4 电泳缓冲液 TBE(5×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	27 g
硼酸(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	13.75 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	1.86 g
加双蒸水定容至 500 mL, 用时加蒸馏水稀释至 0.5×TBE。	

#### C.1.5 溴化乙锭(EB)溶液(10 $\mu$ g/ $\mu$ L)

溴化乙锭	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

### C.2 引物

常规特异 PCR 检测引物序列如下:

ToSLCVf; 5'-ATGCCTAAGCGTGATGCCCCAT-3'

ToSLCVr; 5'-CTGTTMGTGTGGTTCTTCARCTTGATGT-3'

(M=C/A; R=A/G)

扩增片段长度约 386 bp。

常规通用 PCR 检测引物序列如下:

PA:5'-TAATATTACCKGWKGVCCSC-3'

PB:5'-TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA-3'

(B=C/T/G; K=G/T; R=A/G; S=C/G; V=A/C/G; W=A/T; Y=C/T)

扩增片段长度约 500 bp。

### C.3 DNA 提取

取待测样品 0.5 g 于液氮中磨碎,加入 1.5 mL 65 °C 预热的 2-ME/CTAB DNA 抽提液,混匀后转入 2 mL 离心管中,于 65 °C 温浴 1 h,不时混匀;用等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)抽提,室温下 10 000 r/min 离心 10 min;回收上清液,加入等体积的 CTAB 沉淀液,颠倒混匀,于 65 °C 温浴 1 h;10 000 r/min 离心 5 min,移出上清液,用 1.5 mL 高盐 TE 缓冲液重悬沉淀,加 2 倍体积无水乙醇沉淀核酸;12 000 r/min 离心 15 min,70%乙醇洗涤;37 °C 干燥后,溶于 100 μL 双蒸水中,-20 °C 保存备用。

注:或者按照商品 DNA 提取试剂盒进行操作。

### C.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.1,每个样品设 2 个平行处理。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。检测时以含番茄严重曲叶病毒的材料作为阳性对照,以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属的其他病毒材料作为阴性对照,以水代替 DNA 模板作为空白对照。

常规特异 PCR 检测反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。

常规通用 PCR 检测反应条件:95 °C 5 min;94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

名 称	储存液浓度	加样量/μL	终浓度
PCR 缓冲液(含 MgCl <sub>2</sub> )	10×	2.0	1×
dNTP	10 μmol/L	0.5	2.5 mmol/L
ToSLCVf 或 PA	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
ToSLCVr 或 PB	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	5 U/μL	0.5	0.15 U/μL
DNA	—	2.0	—
补水至	—	20.0	—

### C.5 琼脂糖凝胶电泳检测

制备 1% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,进行电泳分析。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA

条带,并拍摄记录。

## C.6 结果判定

### C.6.1 常规特异 PCR 检测

如果阳性对照出现约 386 bp 的条带,检测样品、阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 ToSLCV 阴性。

如果阳性对照及检测样品出现约 386 bp 的条带,阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 ToSLCV 阳性。

### C.6.2 常规通用 PCR 检测

如果阳性对照出现约 500 bp 的条带,检测样品、阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 ToSLCV 阴性。

如果阳性对照及检测样品出现约 500 bp 的条带,阴性对照和空白对照未出现条带,则对样品条带进行序列测定,测定的序列比对结果为 ToSLCV 的,判定样品为 ToSLCV 阳性。

**附 录 D**  
(规范性附录)  
**实时荧光 PCR 检测**

**D.1 引物和探针设计**

引物序列:ToSLCV-F: 5'-GTTGGTAAACGTTTCTGCGTTAAGTC-3'

ToSLCV-R: 5'-GTGTGGTTCTTCAGCTTGATGTT-3'

探针序列:ToSLCV-P: 5'-FAM-ATATTAGGAAGATCTGGAT-TAMRA-3'

**D.2 DNA 提取**

操作方法见 C.3。

**D.3 实时荧光 PCR 反应体系**

实时荧光 PCR 反应体系见表 D.1,每个样品及对照设 2 个平行处理。检测时以含 ToSLCV 的材料作为阳性对照;以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属的其他病毒材料作为阴性对照;以水代替 DNA 模板作为空白对照。

**表 D.1 实时荧光 PCR 反应体系**

名 称	贮备液浓度	终浓度	加样量/ $\mu\text{L}$
PCR 缓冲液	10×	1×	2.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
dNTP	10 mmol/L	0.25 mmol/L	0.5
ToSLCV-F	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8
ToSLCV-R	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.05 U/ $\mu\text{L}$	0.2
ToSLCV-P	10 $\mu\text{mol/L}$	0.15 $\mu\text{mol/L}$	0.3
DNA 模板			2.0

注: 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,也可采用商品化试剂盒。

**D.4 实时荧光 PCR 反应**

反应条件:95 ℃ 10 min,(95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s)×40 个循环。

点击运行,进行 PCR 反应,保存文件,打开分析软件,仪器自动分析试验结果,给出  $\Delta R_n$ (荧光信号增加值)与循环数之间关系的图像。



#### D.5 结果判定

在阳性对照 Ct 值小于 30,水空白对照 Ct 值等于 40 的条件下(若不满足该两项条件,此次检测无效,应重做荧光 PCR 扩增):

- 待测样品的 Ct 值为 40 时,则判定未检测到 ToSLCV。
- 待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,则判定检测到 ToSLCV 目标。
- 待测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,应重新进行测试,如果重新测试的 Ct 值为 40 时,则判定未检测到 ToSLCV 目标。如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,则判定检测到 ToSLCV 目标。

## 参 考 文 献

[1] Ala-Poikela M., Svensson E., Rojas A., Horko T., Paulin L., Valkonen J.P.T. & Kvarnheden A. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*, 2005, 54: 448-459.

[2] Holguín-Peña R.J. & Vázquez Juárez R. First report of a geminivirus associated with leaf curl in Baja California Peninsula tomato fields. *Plant Disease*, 2003, 87(11): 1397.

[3] Mauricio-Castillo J.A. & Argüello-Astorga G.R. First report of tomato severe leaf curl virus in México. *Plant Disease*, 2006, 90, (8): 1116.

---