



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3438—2012

南方菜豆花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of southern bean mosaic virus

2012-12-12 发布

2013-07-01 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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈青、陈岩、李旻、刘忠梅、陈红运、廖富荣、林石明。

南方菜豆花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了南方菜豆花叶病毒的血清学和分子生物学检测方法。
本标准适用于可能携带南方菜豆花叶病毒的豆科种子的检疫鉴定。

2 原理

南方菜豆花叶病毒(southern bean mosaic virus, SBMV)为南方菜豆花叶病毒属(sobemovirus)的典型成员。抗原特性和基因组特征(参见附录 A)是检疫鉴定的主要依据。

3 仪器、设施及试剂

3.1 仪器与设施

酶联检测仪、电子天平(感量 0.000 1 g)、定性 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、恒温水浴、低温冰箱、普通冰箱、离心机等;微量移液器(2.5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L);酶联板、研钵等;防虫温室。

3.2 试剂

酶联检测试剂(见附录 B), RT-PCR 检测试剂(见附录 C)。

4 检疫与鉴定

4.1 制样

挑取畸形、不成熟的种子播于灭菌土中,待长出 3~4 片真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。采集的叶片分成两份,分别用于酶联检测和分子生物学检测。

4.2 检测

4.2.1 双抗体夹心酶联免疫吸附检测

把制备的样品上清液加入已包被 SBMV 抗体的 96 孔酶联板中,进行 DAS-ELISA 检测。每个样品平行加到两个孔中。健康的植物组织作阴性对照,感染 SBMV 的植物组织作阳性对照,样品提取缓冲液作空白对照,其中阴性对照种类和材料(如:种子或叶片)应尽量与检测样品一致。不同的检测试剂或试剂盒根据试剂或试剂盒的说明操作。

具体操作见附录 B。

4.2.2 RT-PCR 检测

分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。健康的植物组织作阴性对照,感染 SBMV 的植物组织作阳性对照,用超纯水作空白对照。

具体操作见附录 C。

5 结果判定

酶联检测阳性,使用 SBMV 特异性引物进行 RT-PCR 检测,扩增出目的条带,判定样品是携带 SBMV,否则不携带。

样品酶联检测阳性,使用 SBMV 特异性引物未扩增出目的条带,可用南方豇豆花叶病毒的特异引物对该样品进行 RT-PCR 检测(参见附录 A)。

6 样品保存、结果记录与资料保存

6.1 样品保存

经检测确定携带 SBMV 的样品应在合适条件下保存,种子保存在 4℃,病叶冻干保存在-20℃或者-80℃冰箱中,做好标记和登记工作。

6.2 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、检测时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和检测人员的签字。酶联测定应有酶联板反应原始数据,RT-PCR 检测应有扩增结果图片,生物学接种应有症状照片。

附 录 A
(资料性附录)
南方菜豆花叶病毒简介

A.1 分类信息

学名:southern bean mosaic virus

缩写:SBMV

分类地位:南方菜豆花叶病毒属(sobemovirus)

SBMV 是南方菜豆花叶病毒属的典型成员,与同属的南方豇豆花叶病毒(southern cowpea mosaic virus,SCPMV)在基因组结构、病毒粒子稳定性和抗原特性等方面极为相似,SCPMV 一度被划分为 SBMV 的 C 株系,直至病毒基因组全序列测定后,才将两者准确区分。

A.2 主要寄主

菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、大豆(*Glycine max*)、黑绿豆(*Vigna mungo*)、绿豆(*Vigna radiata*)、豇豆(*Vigna sinensis*)。

A.3 病害症状

菜豆(*Phaseolus vulgaris*):随品种不同产生很多不同症状,坏死或系统花叶,或褪绿斑驳花叶,或皱缩和沿脉变色。

利马豆(*Phaseolus lunatus*):仅小粒品种对 SBMV 敏感,表现为小的坏死斑。

大豆(*Glycine max*):轻微所系统性斑驳症状,症状随品种而异。

绿豆(*Vigna radiata*):被黑绿豆分离物感染后出现系统花叶。

千日红(*Gomphrena globosa*):Ivory Coast 分离物引起千日红出现系统症状。无记录显示对其他分离物敏感。

A.4 分布地区

SBMV 的发生地包括:前苏联、法国、印度、巴基斯坦、贝宁、科特迪瓦、加纳、摩洛哥、尼日利亚、塞内加尔、多哥、哥斯达黎加、尼加拉瓜、墨西哥、美国、巴西、哥伦比亚、委内瑞拉。SBMV 在美国分布较为广泛,阿肯色、加利福尼亚、佛罗里达等 11 个州都有该病毒发生的报道。

A.5 传播途径

SBMV 和 SCPMV 主要通过种子传播,菜豆种传率 1%~5%,豇豆种传率 5%~40%。

A.6 抗原特性

SBMV 抗原性强,容易制备高滴度的特异抗体。

SN/T 3438—2012

A.7 粒体形态

病毒粒体为等轴对称的二十面体($T=3$),无包膜,直径约 30 nm。

A.8 基因组

SBMV 基因组为 ssRNA,全长约 4 136 nt,编码 4 个蛋白;病毒基因组 5'和 3'端分别含有一段非编码区。SCPMV 基因组结构与 SBMV 相同,全长约 4 194 nt。

A.9 SCPMV 分子检测

A.9.1 SCPMV 的特异性引物和 RT-PCR

SCPMV 的特异性引物见表 A.1。

表 A.1 引物序列、位置和产物

引物名称	序列(5'-3')	位置	扩增产物 bp
SCPMV _f	ATGTCCGGTCTATTCCATC	3 217~3 235	978
SCPMV _r	CCATTTCGATAGCGCTC	4 178~4 194	

RNA 提取见 C.2.1、RT-PCR 反应体系和条件 C.2.2,电泳步骤见 C.2.3。

A.9.2 SCPMV 结果判定

SCPMV 阳性对照经 SCPMV 特异引物扩增后在 978 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定该样品携带 SCPMV;阳性对照、阴性对照和空白对照正确,样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,判定样品不携带 SCPMV。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测步骤

B.1 试材**B.1.1 酶联板。****B.1.2 包被抗体:**特异性的 SBMV 抗体。**B.1.3 酶标抗体:**碱性磷酸酯酶标记的 SBMV 抗体。**B.1.4 底物:**对硝基苯磷酸二钠(*p* NPP)。**B.1.5 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH7.4)**

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
蒸馏水定容至 1 L。	

B.1.6 样品抽提缓冲液(pH7.4)

Na ₂ SO ₃	1.3 g
PVP(MW 24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g
PBST 定容至 1 L, 4℃ 储存。	

B.1.7 包被缓冲液(pH9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	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(pH7.4)

BSA(牛血清白蛋白)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW 24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

PBST 定容至 1 L。4℃ 储存。

B.1.9 底物(*p* NPP)缓冲液(pH9.8)

MgCl ₂	0.1 g
NaN ₃	0.2 g
二乙醇胺	97 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.2 程序**B.2.1 包被抗体**

用包被缓冲液将抗体按说明稀释,加入酶联板的孔中,100 μL/孔,25℃ 孵育 4 h,清空孔中溶液,

SN/T 3438—2012

PBST 洗涤 6~8 次。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1:10(质量:体积)加入样品抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,7 500 g 离心 10 min,上清液即为制备好的待测样品。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 μ L/孔,每个样品设 1 个重复。4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,酶联板用 PBST 洗涤 6~8 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 μ L/孔,25 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBST 洗涤 6~8 次。

B.2.5 加底物

将底物 *p* NPP 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 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,孵育温度、PBST 洗涤次数和显色读数时间需按照检测抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

B.3 结果判定

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 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:

- 阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值 \leq 0.15;
- 阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 \geq 2;
- 同一样品的 OD₄₀₅ 值应基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判定如下:

- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 \geq 2,判为阳性;
- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值接近阈值,判为可疑样品,需重做一次或用其他方法验证;
- 样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 \leq 2,判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判定。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)
RT-PCR 检测步骤

C.1 试剂

C.1.1 Trizol 裂解液。

C.1.2 三氯甲烷。

C.1.3 异丙醇。

C.1.4 75%乙醇。

C.1.5 去离子水(DEPC 处理)。

C.1.6 50×TAE

Tris 242 g

冰醋酸 57.1 ml

Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

C.1.7 6×加样缓冲液

0.25%溴酚蓝

40%(质量浓度)蔗糖水溶液

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 植物组织加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,剧烈振荡摇匀后室温保持 5 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加入 0.2 mL 三氯甲烷并剧烈振荡混匀;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加 0.6 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,室温保持 5 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清液;加 75%的乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500 g 离心 2 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 30 μL 去离子水(DEPC 处理)中,-20℃保存备用。也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应

RT-PCR 检测引物见表 C.1。cDNA 合成反应体系 20 μL:在 0.2 mL 反应管中加入总 RNA 6 μL,1 μL 下游引物(20 μmol/L),去离子水 4 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,65℃水浴 5 min,取出后立即放在冰上,加入 5×First Strand 缓冲液 4 μL,40 U/μL RNase Block Ribonuclease Inhibitor 1 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,42℃水浴 2 min,然后再加入 200 U/μL Reverse Transcriptase 1 μL,混匀后 42℃水浴 50 min,70℃水浴 15 min,合成 cDNA。First Strand 缓冲液和 Reverse Transcriptase 的用量需要依据反转录酶的品牌进行调整。也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。

表 C.1 引物序列、位置和产物

引物名称	序列(5'-3')	位置	扩增产物 bp
SBMV _f	ATGGCGAAGAGGTTGAC	3 207~3 223	930
SBMV _r	ACTTTTGGATTACGCTCCATC	4 116~4 136	

PCR 反应体系见表 C.2。反应参数:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。

表 C.2 PCR 反应体系

组分	体积 μL
10×PCR 缓冲液	2.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
上游引物(20 pmol/μL)	0.5
下游引物(20 pmol/μL)	0.5
Taq 酶(5 U/μL)	0.2
cDNA 模板	3.0
ddH ₂ O	补足反应总体积至 25 μL

C.2.3 电泳

C.2.3.1 制备凝胶

配制 1.5%(质量浓度)的琼脂糖凝胶。溴化乙锭可直接加入琼脂糖凝胶中(浓度为 0.5 μg/mL),也可在电泳完成后使用溴化乙锭染色。

C.2.3.2 电泳

用 1 μL 6×加样缓冲液与 5 μL 样品混合,然后将其和适合的 DNA 相对分子质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紫外透射仪上观察,拍照并保留结果。

C.3 结果判断

SBMV 阳性对照经 SBMV 特异引物扩增后在 930 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定该样品 SBMV 阳性;阳性对照、阴性对照和空白对照正确,样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,判定结果为阴性。