



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3674—2013

---

## 凤仙花坏死斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Impatiens necrotic spot virus

2013-08-30 发布

2014-03-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 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：中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李旻、丁元明、张巧萍、寸东义、邓裕亮、曹云华、杜宇、刘忠善、和捷。

# 凤仙花坏死斑病毒检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了凤仙花坏死斑病毒检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境活体植物材料,包括无性繁殖材料、组培苗和苗木中凤仙花坏死斑病毒的检疫与鉴定。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 原理

中文名:凤仙花坏死斑病毒

学名:Impatiens necrotic spot virus

缩写:INSV

分类地位:布尼亚病毒科(Bunyaviridae),番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)。

INSV 的血清学特性和分子生物学特征(参见附录 A)是检疫鉴定该病毒的主要依据。

## 4 仪器设备、用具和试剂

### 4.1 仪器

电子天平(0.000 1 g)、高压灭菌锅、制冰机、涡旋振荡器、高速冷冻离心机、超低温冰箱、微波炉、酶标仪、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像系统、实时荧光 PCR 仪。

### 4.2 用具

可调式微量移液器(2  $\mu$ L、10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000 $\mu$ L)及相应的无 RNase 吸头、无 RNase 离心管、PCR 管、酶联板和研钵等。

### 4.3 试剂

去离子水或蒸馏水应符合 GB/T 6682 中的三级水的要求,超纯水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

所用试剂为 INSV DAS-ELISA 检测试剂盒、Trizol、DEPC、液氮、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、M-MLV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准、溴化乙锭、琼脂糖、溴酚蓝等。除有特殊说明外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。没有 INSV DAS-ELISA 检测试剂盒的,血清学试剂的配制方法见附录 B,分子生物学试剂配制见附录 C。

## 5 检疫鉴定方法

### 5.1 双抗夹心酶联免疫吸附检测(DAS-ELISA)

将制备的样品汁液用 INSV DAS-ELISA 试剂盒检测,每个样品设两个重复。同时设阴性对照、阳性对照和空白对照,阴性对照为同样处理的健康组织汁液,空白对照为样品抽提缓冲液。

具体操作步骤见附录 B。

### 5.2 分子生物学检测

注:实际检测中,可视实验室条件选用以下两种方法中任意一种进行。

#### 5.2.1 巢式 RT-PCR 检测

提取样品的总 RNA,以 RNA 为模板反转录合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,再将第一次 PCR 产物稀释后作为模板进行第二次 PCR,最后对二次 PCR 的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。同时设阴性对照、阳性对照和空白对照,阴性对照为同样处理的健康组织汁液,空白对照为超纯水。

具体操作步骤见附录 C。

#### 5.2.2 实时荧光 RT-PCR 检测

提取样品的总 RNA,以 RNA 为模板反转录合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行实时荧光 PCR 检测。同时设阴性对照、阳性对照和空白对照,阴性对照为同样处理的健康组织汁液,空白对照为超纯水。

具体操作步骤见附录 D。

## 6 结果记录与判定

### 6.1 结果记录

DAS-ELISA 检测记录各检测反应孔的光密度值,巢式 RT-PCR 检测有电泳结果照片,实时荧光 RT-PCR 应有扩增曲线等原始数据。

### 6.2 结果判定

6.2.1 样品经 DAS-ELISA 检测为阴性时,判定样品为凤仙花坏死斑病毒阴性。

6.2.2 样品经 DAS-ELISA 检测为阳性、巢式 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测结果为阴性时,判定样品不携带凤仙花坏死斑病毒。

6.2.3 样品经 DAS-ELISA 检测为阳性、巢式 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测结果为阳性时,判定样品携带凤仙花坏死斑病毒。

## 7 样品保存

经检验确定携带凤仙花坏死斑病毒的样品应保存在适合的条件以备复核。种子保存在干燥条件下,其他的组织样品(如叶片等)保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有条件的保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中更好。做好登记和标记工作。



## 附录 A

(资料性附录)

## 凤仙花坏死斑病毒相关资料

## A.1 名称

中文名:凤仙花坏死斑病毒

学名: *Impatiens necrotic spot virus*

缩写: INSV

分类地位: 布尼亚病毒科 (Bunyaviridae), 番茄斑萎病毒属 (*Tospovirus*)。

## A.2 寄主范围

该病毒的寄主范围比较广,自然条件下 INSV 可侵染 50 个科 300 多种植物,其中观赏植物 39 个属 (包括乌头属 *Aconitum*、六出花属 *Alstroemeria*、银莲花属 *Anemone*、金鱼草属 *Antirrhinum*、秋海棠属 *Begonia*、寒丁子属 *Bouvardia*、翠菊属 *Callistephus*、凤仙花属 *Impatiens*、*Columnea*、大丽花属 *Dahlia*、菊花 *Dendranthema xgrandiflorum*、紫芳草 *Exacum affine*、八角金盘 *Fatsia japonica*、火石花属 *Gerbera*、唐菖蒲属 *Gladiolus*、补血草属 *Limonium*、半边莲属 *Lobelia*、海桐花属 *Pittosporum*、报春花属 *Primula*、毛茛属 *Ranunculus*、蝴蝶兰属 *Phalaenopsis*、石斛属 *Dendrobium*、鸟巢蕨 *Asplenium nidus*、仙客来 *Cyclamen persicum*、洋桔梗 *Eustoma grandiflorum*、瓜叶菊 *Senecio cruentus*、大岩桐 *Sinningia speciosa*、马蹄莲 *Zantedeschia aethiopica*、朱顶红 *Hippeastrum hortorum* 等),蔬菜 6 个种 (包括辣椒 *Capsicum annuum*、菊苣 *Cichorium endivia*、黄瓜 *Cucumis sativus*、莴苣 *Lactuca sativa*、罗勒 *Ocimum basilicum* 和野苣 *Valerianella olitoria* 等)。

## A.3 为害症状

INSV 引起的症状随寄主和侵染时期不同而变化,主要表现为矮化、环斑、叶片或茎部的褐色至紫色的斑点、茎部变褐(溃疡)、碎色花,甚至植株死亡。

## A.4 分布地区

欧洲:比利时、法国、德国、意大利、荷兰、波兰、葡萄牙、西班牙、英国、前南斯拉夫和捷克。

美洲:美国、加拿大、哥伦比亚、墨西哥、哥斯达黎加和阿根廷。

亚洲:伊朗、以色列、我国云南省和台湾地区。

## A.5 传播方式

## A.5.1 介体传播

INSV 主要由西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 传播。

SN/T 3674—2013

#### A.5.2 种苗传毒

该病毒可通过组培苗、块茎和苗木等无性繁殖材料远距离传播。

#### A.6 基因组

INSV 的基因组由含 3 条单链 RNA 组成,分别长 8 776 nt、4 972 nt 和 2 992 nt,共编码 5 个蛋白。

**附 录 B**  
(规范性附录)

**双抗夹心酶联免疫吸附检测(DAS-ELISA)**

**B.1 主要试剂配制**

**B.1.1 10×PBST 缓冲液(pH7.4)**

氯化钠(NaCl)	80.0 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.0 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11.5 g
氯化钾(KCl)	2.0 g
吐温-20(Tween-20)	5.0 mL
溶于 900 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL。	

**B.1.2 样品抽提缓冲液(pH7.4)**

10×PBST 缓冲液	100.0 mL
亚硫酸钠(Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)	20.0 g
叠氮钠(NaN <sub>3</sub> )	0.2 g
吐温-20	20.0 mL
溶于 800 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL。	

**B.1.3 包被缓冲液(pH9.6)**

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
溶于 900 mL 蒸馏水中,调节 pH 至 9.6,并定容至 1 000 mL。	

**B.1.4 酶标抗体缓冲液(pH7.4)**

10×PBST 缓冲液	100 mL
牛血清白蛋白(BSA)	2 g
PVP(MW 24 000~40 000)	20 g
溶于 800 mL 蒸馏水后定容至 1 000 mL。	

**B.1.5 底物对硝基苯磷酸二钠(PNPP)缓冲液(pH9.8)**

二乙醇胺	97.0 mL
NaN <sub>3</sub>	0.2 g
溶解于 600 mL 无菌蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.8,然后定容至 1 000 mL。	

**B.2 检测方法**

注:使用 INSV DAS-ELISA 试剂盒的,检测方法按说明书进行。不使用试剂盒进行检测的按以下步骤进行。

SN/T 3674—2013

### B.2.1 实验设计

根据检测需要设计酶联板点样孔的排布,包括阳性对照孔、阴性对照孔、空白对照孔和待测样品孔,各设2个相邻的重复。

### B.2.2 包被抗体

将包被抗体用包被缓冲液稀释至工作浓度,加入酶联板孔中,每孔中加入100 μL,加盖,37℃孵育2 h~4 h或4℃孵育至少12 h以上。将酶联板孔中溶液甩干,每孔加入200 μL的1×PBST洗涤,放置3 min,然后在滤纸上扣干,共洗涤5次。

### B.2.3 制备样品

将待测植物组织进行研磨,并按组织重量和抽提缓冲液体积1:10的比例稀释,制备的汁液移入1.5 mL离心管中,12 000g离心5 min~10 min后吸取上清液作为待测样品。健康组织同样处理,作为阴性对照,样品抽提缓冲液作为空白对照。

### B.2.4 加入样品

将100 μL待测样品溶液加入到待检测孔中,对照孔中也各加入100 μL相应的阴性对照、阳性对照和空白对照,加盖,37℃孵育2 h~4 h或4℃孵育至少12 h以上。将酶联板孔中溶液甩干,每孔用200 μL的1×PBST洗涤,洗涤5次。

### B.2.5 加酶标抗体

将酶标抗体用酶标抗体稀释缓冲液稀释至工作浓度,每孔加入100 μL酶标抗体溶液,加盖,37℃孵育2 h~4 h或4℃孵育至少12 h以上。将酶联板孔中溶液甩干,每孔用200 μL的1×PBST洗涤,洗涤5次。

### B.2.6 加底物

将底物PNPP溶于底物缓冲液中,使最终浓度为1 mg/mL(现配现用),每孔加入100 μL配好的底物溶液,室温下避光放置0.5 h~2 h,直至阳性对照出现明显的颜色反应,而阴性对照和空白对照无颜色变化。

### B.2.7 记录结果

用酶标仪检测在405 nm波长下各孔的光密度值并记录。

## B.3 结果计算和判定

### B.3.1 平行允许率计算

空白对照和阴性对照的光密度值小于0.15,当阴性对照孔的光密度值小于0.05时,按0.05计算。阳性对照有明显的颜色反应,且阳性对照的光密度值/阴性对照的光密度值应大于2。达到这一要求时应进行平行允许率计算;达不到要求时应重新检测。

孔的重复性以样品光密度值的平行允许率控制,按照以下公式进行计算:

$$P = \frac{[D(405)_1 - D(405)_2] \times 2}{[D(405)_1 + D(405)_2]} \times 100\%$$



式中：

$P$  ——平行允许率；

$D(405)_1$  ——样品重复 1 的光密度值；

$D(405)_2$  ——样品重复 2 的光密度值。

### B.3.2 结果判定

**B.3.2.1** 当样品两个重复的光密度值平行允许率( $P$ )大于 20%时,应重新进行检测。

**B.3.2.2** 当样品两个重复的光密度值平行允许率( $P$ )小于 20%时,按如下原则做出判定：

样品  $D(405)$ /阴性对照  $D(405)$ 值大于 2,判定为阳性；

样品  $D(405)$ /阴性对照  $D(405)$ 值为 2,判为可疑样品,需重做一次或者用其他方法进行验证；

样品  $D(405)$ /阴性对照  $D(405)$ 值小于 2,判为阴性。

## 附 录 C

### (规范性附录)

### 巢式 RT-PCR 检测

#### C.1 主要试剂配制

##### C.1.1 电泳缓冲液 50×TAE

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0 g
冰乙酸	52.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA, pH8.0)	100 mL
溶解于 800 mL 蒸馏水中,定容至 1 000 mL。使用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。	

##### C.1.2 溴化乙锭溶液(1 mg/mL)

溴化乙锭 20 mg 溶解于灭菌超纯水并定容至 20 mL。

##### C.1.3 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40.0 g
溶于超纯水中,定容至 100 mL。	

#### C.2 检测方法

##### C.2.1 总 RNA 提取

取 0.1 g 待测样品组织,用液氮研磨成粉末状,迅速加入 1 mL Trizol 试剂盖住样品,待溶解后继续研磨至混匀,移入 1.5 mL 离心管中,室温静置 3 min;加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,室温静置 3 min;4  $^{\circ}$ C,12 000g 离心 10 min,小心吸取上层无色水相到新离心管中;加入等体积异丙醇,颠倒混匀;4  $^{\circ}$ C,12 000g 离心 20 min,弃上清液;加入 1 mL 75%冷乙醇洗涤沉淀,4  $^{\circ}$ C,12 000g 离心 5 min,弃乙醇,充分干燥沉淀;加入 50  $\mu$ L DEPC 处理的超纯水或无 RNase 的超纯水,溶解沉淀,存于-80  $^{\circ}$ C 备用。也可使用 RNA 提取试剂盒,参照使用说明进行提取。

##### C.2.2 引物序列

###### C.2.2.1 第一次 PCR 反应引物

正向引物 INSV-1F:5'-GTTTAGCCTTACCAAT-3';  
反向引物 INSV-2R:5'-TACCAACAACCGTGAA-3'。  
扩增片段长度约 539 bp。

###### C.2.2.2 第二次 PCR 反应引物

正向引物 INSV-3F:5'-CTAAGAGAACACCCAAGACA-3';

反向引物 INSV-4F:5'-TACCAACAACCGTGAAAAGA-3'。

扩增片段长度约 338 bp。

### C.2.3 反转录合成 cDNA

在 PCR 管中分别加入 20  $\mu\text{mol/L}$  INSV-2R 引物 1  $\mu\text{L}$  和总 RNA 5  $\mu\text{L}$ , 在 70  $^{\circ}\text{C}$  温育 5 min, 然后立即置于冰上; 放置 5 min 后, 再加入 DEPC 处理的超纯水或无 RNase 的超纯水 7  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$  反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ 、40 U/ $\mu\text{L}$  RNA 酶抑制剂 0.5  $\mu\text{L}$  和 200 U/ $\mu\text{L}$  M-MLV 反转录酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。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。

反应参数: 42  $^{\circ}\text{C}$ , 45 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min。合成的 cDNA 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

也可采用 RT-PCR 一步法试剂盒, 操作步骤按使用说明进行。

### C.2.4 PCR 扩增

第一次 PCR 反应以 cDNA 为模板进行扩增, 第二次 PCR 反应以稀释 50 $\times$  的第一次 PCR 反应产物为模板进行扩增。每个样品设 2 个平行处理。以灭菌超纯水为空白对照。

PCR 反应体系: 10 $\times$  反应缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  2.5  $\mu\text{L}$  (反应缓冲液中已含有的可不加入)、5 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ 、20 mmol/L 正向引物 0.5  $\mu\text{L}$ 、20 mmol/L 反向引物 0.5  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$  和模板 1  $\mu\text{L}$ , 用灭菌超纯水补足反应体积至 25  $\mu\text{L}$ 。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。

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min。按照 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、52  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s 的程序运行 35 个循环。72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增产物可直接用于下一步 PCR 扩增、电泳检测或放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  待用。

### C.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测

用 1 $\times$  TAE 配制 1.0% 琼脂糖凝胶, 加热溶化后冷却至 55  $^{\circ}\text{C}$  左右。将 1 mg/mL 溴化乙锭加入到配制好的凝胶中, 其终浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 混匀。也可使用其他核酸染色剂, 按使用说明操作。将凝胶倒入制胶槽中, 插上样品梳。待凝胶冷却凝固后拔出梳子, 取出凝胶放入水平电泳槽, 在电泳槽内加入足量 1 $\times$  TAE, 使缓冲液至少没过凝胶表面约 1 mm。

取 1.5  $\mu\text{L}$  6 $\times$  加样缓冲液与 8  $\mu\text{L}$  第二次 PCR 产物混合后加入样品孔, 并在同一块胶上加入分子量标准物。将电泳槽接通电源, 使 DNA 从负极向正极移动; 恒压电泳, 达到每厘米 3 V~5 V 电压 (按两极之间的距离计算)。当加样缓冲液中溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时, 关闭电源。

电泳结束后, 将整个凝胶置于凝胶成像系统上拍照, 记录结果。

## C.3 结果判定

如果阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现预期 338 bp 的条带, 样品未出现预期大小的条带, 则可判定为 INSV 阴性。

如果阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现预期 338 bp 的条带, 样品出现与阳性样品相同大小的条带, 则可判定为 INSV 阳性。

附 录 D  
(规范性附录)  
实时荧光 RT-PCR 检测

D.1 引物和探针设计

引物序列:INSV-QP-F	5'-AATGGATCTGCCCTGACTGAAG-3'
INSV-QP-R	5'-GCACAGATGCTATCAGAGGAAGACT-3'
探针序列:INSV-probe	5'-FAM-TCACCCTCTGATTGCCTCATATGGTCTTG-TAMRA-3'

D.2 RNA 提取及反转录

操作方法执行附录 C。也可采用 RT-PCR 一步法试剂盒,操作步骤按使用说明进行。

D.3 实时荧光 PCR 反应体系

设计样品在上机时的排列,每个样品、阳性对照、阴性对照和空白对照均设 2 个平行孔,以灭菌超纯水作为空白对照。

使用市售的实时荧光 PCR 试剂盒进行反应,参照试剂盒说明加入试剂,使引物和探针的终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ,且 20  $\mu\text{L}$  反应体系中加入 cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。

反应参数:预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min,按照 95  $^{\circ}\text{C}$  变性,30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s 的程序运行 40 个循环。

保存文件,点击运行开始 PCR 反应。

反应结束后,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.4 结果判定

空白对照和阴性对照的  $C_t$  值没有显示或者显示为 40,则实验有效;否则,实验无效,应重新进行实验。

待测样品的  $C_t$  值没有显示或者显示为 40 时,则判定未检测到凤仙花坏死斑病毒。

待测样品的  $C_t$  值小于或等于 35 时,则判定检测到凤仙花坏死斑病毒。

待测样品的  $C_t$  值小于 40 而大于 35 时,应重新进行测试。如果重新测试的  $C_t$  值为 40 时,则判定未检测到凤仙花坏死斑病毒。如果重新测试的  $C_t$  值小于 40 而大于 35 时,则判定检测到凤仙花坏死斑病毒。