

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2055—2016
代替 SN/T 2055—2008

豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Cowpea severe mosaic virus

2016-08-23 发布

2017-03-01 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。

本标准代替 SN/T 2055—2008《豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法》，与 SN/T 2055—2008 相比，主要变化如下：

- 增加了常规 RT-PCR 检测方法；
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李桂芬、孔君、李彬、马洁、陈青、魏梅生、张永江。

本标准所代替标准的历次发布情况为：

- SN/T 2055—2008。

豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法。

本标准适用于豆科繁殖材料(种子、植株)中豇豆重花叶病毒的检疫鉴定。

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 基本信息

学名: Cowpea severe mosaic virus

缩写: CPSMV

分类地位: 伴生豇豆病毒科 (Secoviridae), 豇豆花叶病毒亚科 (Comovirinae), 豇豆花叶病毒属 (Comovirus)。

该病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据豇豆重花叶病毒与抗体之间的特异性反应,对植物样品进行 ELISA 检测;根据该病毒核酸的序列进行 PCR 特异性检测,通过电泳条带大小进行结果判定;根据该病毒核酸序列设计特异性引物和荧光探针,通过检测的荧光信号进行结果判定。

5 仪器设备及试剂

5.1 仪器设备

酶标仪、天平(感量,1/10 000 g)、pH 计、微量榨汁机、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、隔离温室、恒温水浴、低温冰箱等。

微量移液器(2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、酶联板、研钵、离心管、花盆、消毒土等。

5.2 试剂

酶联免疫吸附测定试剂见附录 B 的 B.1、RT-PCR 检测试剂见附录 C 的 C.1、实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 D 的 D.1。

试验用水应符合 GB/T 6682 要求。

6 样品制备

6.1 种子

挑取畸形、不成熟种子及随机挑选的种子播于灭菌土中,待长出幼叶后,将表现症状的植株单独编

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2份,根据需要分别用于酶联测定和分子检测。

6.2 植株

有症状(如叶片畸形、花叶、斑驳等)的植株编号单独检测。没有症状的分组并编号检测,分组方法和检测方法同6.1。

7 检测方法

7.1 酶联免疫吸附测定

见附录B。

7.2 RT-PCR 检测方法

见附录C。

7.3 实时荧光 RT-PCR 检测方法

见附录D。

7.4 生物学测定

见附录E。

8 结果判定

样品检测时,检测流程及结果判定按下述原则进行:

先用 DAS-ELISA 方法进行检测。

若 DAS-ELISA 结果为阴性时,RT-PCR 的检测结果为阴性,则判定样品不携带 CPSMV;检测结果为阳性,则对产物进行测序,测定的序列为 CPSMV 序列,则判定样品携带 CPSMV;或用实时荧光 RT-PCR 进行检测,若检测结果为阴性,则判定样品不携带 CPSMV;若检测结果为阳性,则判定样品携带 CPSMV。

若 DAS-ELISA 结果为阳性时,RT-PCR 检测或实时荧光 RT-PCR 检测为阳性,即可判定待检样品携带 CPSMV。

9 样品保存与结果记录

9.1 样品保存

经检测确定携带豇豆重花叶病毒的样品应在合适的条件下保存,种子在室温干燥保存1年;植株-80℃保存1年,做好标记和登记工作。

9.2 结果记录

完整的记录包括:样品的来源、时间、地点、方法和结果等并要有经手人和实验人员的签字。酶联测定需有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳结果图片,实时荧光 RT-PCR 检测需要有反应原始数据,生物学测定需有鉴别寄主的症状照片。

附 录 A

(资料性附录)

豇豆重花叶病毒背景资料

A.1 寄主范围

A.1.1 自然寄主

毛蔓豆(*Calopogonium mucunoides*),直生刀豆(*Canavalia ensiformis*),距瓣豆(*Centrosema pubescens*),菽麻(*Crotalaria juncea*),*Desmodium canescens*,大豆(*Glycine max*),大翼豆(*Macroptilium lathyroides*),菜豆(*Phaseolus vulgaris*),四棱豆(*Psophocarpus tetragonolobus*),绿豆(*Vigna radiata*),豇豆(*Vigna unguiculata*),*Crotalaria paulinea*。

A.1.2 人工寄主

豆科:木豆(*Cajanus cajan*)、豌豆(*Pisum sativum*)、*Desmodium canescens*、*Sesbania exaltata*、绛车轴草(*Trifolium incarnatum*)、望江南(*Cassia occidentalis*)。

夹竹桃科:长春花(*Catharanthus roseus*)。

藜科:藜(*Chenopodium album*)、苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、*Chenopodium capitatum*、昆藜(*Chenopodium quinoa*)。

茄科:曼陀罗(*Datura stramonium*)、克里夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)、普通烟(*Nicotiana tabacum*)、心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)。

苋科:千日红(*Gomphrena globosa*)。

A.2 病害症状

几乎所有的寄主在接种叶上形成褪绿斑或坏死斑,系统症状为斑驳或花叶,幼叶通常形成明显疱状突起、畸形。一些寄主表现系统坏死。在巴西,受感染的大豆出现植株矮化、芽枯、结荚数减少、产量降低。毛蔓豆出现严重花叶和疱状突起;距瓣豆出现腿绿和花叶症状;菽麻叶片出现褪绿斑驳和畸形或褪绿斑症状;绿豆叶片出现轻花叶和坏死斑症状;豇豆叶片出现褪绿花叶和严重畸形。

A.3 地理分布

美国、特立尼达(特立尼达和多巴哥共和国)、波多黎各岛、萨尔瓦多、哥斯达黎加、委内瑞拉、苏里南、巴西、秘鲁、墨西哥。

A.4 传播途径

机械传播;花粉、种子传播;甲虫传播,主要是叶甲科甲虫传播,大约有 10 种,其中 *Cerotomaruficornis*、*C.trifurcata* 是最重要的传播介体。

SN/T 2055—2016

A.5 粒体形态

豇豆重花叶病毒粒体为等轴对称球状体,无包膜,直径 25nm,如图 A.1 所示。

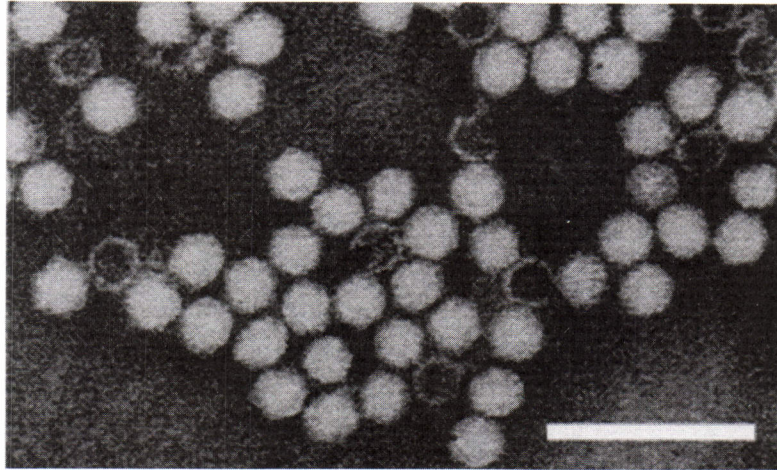


图 A.1 豇豆重花叶病毒电镜照片(图中标尺 100 nm)

A.6 基因组

CPSMV 基因组有 2 条 RNA 组成, RNA-1 长 5957 nt; RNA-2 长 3732 nt。

附 录 B

(规范性附录)

酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

B.1 试剂

B.1.1 抗体

DAS-ELISA 方法:包被抗体为多克隆抗体,检测抗体为多克隆抗体(酶标抗体)。

B.1.2 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.3 包被缓冲液(pH9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3) 1.59 g

碳酸氢钠(NaHCO_3) 2.93 g

蒸馏水定容至 1 L, 4 °C 储存。

B.1.4 PBST 缓冲液(pH7.4)

氯化钠(NaCl) 8.0 g

磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.2 g

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.15 g

氯化钾(KCl) 0.2 g

吐温-20(Tween-20) 0.5 mL

蒸馏水定容至 1 L。

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST 1 L

亚硫酸钠(Na_2SO_3) 1.3 g

PVP(MV24000-40000) 20.0 g

4 °C 储存。

B.1.6 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

PBST 1 L

BSA(牛血清白蛋白) 2.0 g

PVP(MV24000~40000) 20.0 g

4 °C 储存。

B.1.7 底物缓冲液(pH9.8)

二乙醇胺 97 mL

氯化镁(MgCl_2) 0.1 g

SN/T 2055—2016

溶于 800 mL 蒸馏水,用盐酸调 pH 值至 9.8,然后用蒸馏水定容至 1 L。4℃ 储存。

B.2 实验步骤

B.2.1 包被抗体

按要求的浓度和需要的体积用包被缓冲液稀释包被抗体,每孔加 100 μ L。酶联板加盖或用保鲜膜包好,放在 37℃ 孵育 2 h。清空孔中溶液,用 PBST 加满各孔,3 min 后倒掉孔中溶液,在吸水纸上拍干。再重复 2 次上述洗板过程。

B.2.2 样品制备与加样

待测样品按 1:10(重量:体积)加入抽提缓冲液,在研钵中研磨,2 000 r/min 离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照做相应处理或按说明书进行。加入制备好的检测样品、阴性对照、阳性对照,100 μ L/孔,酶联板加盖或用保鲜膜包好,放在 4℃ 孵育过夜。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.3 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,酶联板加盖或用保鲜膜包好,37℃,4 h。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.4 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),100 μ L/孔加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.5 读数

在不同的时间内如 30 min、60 min、90 min、120 min 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值。

B.3 结果判定

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:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.15,当阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值>5;同一样品的重复性基本一致。

在满足了上述的质量要求后,结果原则上可判定如下:样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值>2,判为阳性;样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值在 2 左右,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证;样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值<2,判为阴性。

若满足不了上述的质量要求,则不能进行结果判定。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测方法

C.1 试剂

C.1.1 核酸提取试剂

核酸提取试剂为商品化 TRIzol 试剂。

C.1.2 50×TAE

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	52.1 mL
乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2H ₂ O)	37.2 g

加蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

C.1.3 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

取 0.1 g 样品,加入 1 mL TRIzol 试剂充分研磨,室温放置 5 min;12 000 g 离心 5 min,取上清到另一离心管中;加入三氯甲烷 500 μL,充分震荡 15 s,室温放置 3 min;12 000 g,4℃离心 15 min;取上层水相加入另一离心管中,加入等体积异丙醇;12 000 g,4℃离心 10 min,弃去上清;加入 1 mL 70%乙醇洗涤;RNA 沉淀干燥后,加经过焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的 ddH₂O 40 μL 溶解即可。

注:或者按照等效 RNA 提取试剂盒进行操作。

C.2.2 引物序列

根据豇豆重花叶病毒的 CP 基因序列(GeneBank 序列号:NC003544、M83309、GQ229416)和标准毒株(ATCC PV-273 和 DSMZ PV-0050)CP 基因序列设计一对简并引物如下:

CPSMV-CP-F:5'-ACA CAR GTI MGI CCI GAT AC-3',其中 R=A/G,I=IMP(次黄嘌呤核苷酸),M=C/A。

CPSMV-CP-R:5'-GCT ACI GGA CTR CTR CTC A-3',其中 I=IMP(次黄嘌呤核苷酸),R=A/G。

预期扩增大小为 356 bp。

C.2.3 反转录

反转录总体系为 12.5 μL。在 PCR 管中依次加入 3 μL 总 RNA,1 μL 下游引物 CPSMV-CP-R(浓度为 20 pmol/μL),65℃温浴 7 min,然后冰浴 5 min,瞬时离心,再向 PCR 管中加入下列试剂:M-

MLVRT(200U/ μL)0.5 μL 、5 \times RT 缓冲液 2.5 μL 、dNTP(10 mmol/L)0.5 μL 、RNasin(40U/ μL)0.5 μL 、DEPC 处理的 ddH₂O 4.5 μL 。

反应参数:42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。合成的 cDNA 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

C.2.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.1。反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/ μL
10 \times PCR Buffer	2.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
CPSMV-CP-F(20 pmol/ μL)	1.0
CPSMV-CP-R(20 pmol/ μL)	1.0
<i>Taq</i> 酶(5U/ μL)	0.2
cDNA 模板	3.0
ddH ₂ O	补足反应总体积至 25 μL

C.2.5 琼脂糖凝胶检测

用 1 \times TAE 配制 1%琼脂糖凝胶,加热溶化后冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。将凝胶倒入凝胶槽中,插上样品梳子。冷却凝固后拔掉梳子,在电泳槽内加入 1 \times TAE,缓冲液要没过凝胶表面约 1 mm。

将加样缓冲液与样品混合后加入样品孔,同时设计 PCR 的阴性对照和阳性对照,并加入分子量标准物。接通电源,以 3 V/cm~5 V/cm 电场强度进行电泳,0.5 h 后观察结果。

电泳结束后,将凝胶放入 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭(EB)染色液中染色 10 min~15 min。将整个凝胶置于凝胶成像系统上观察,记录结果。

C.3 结果判断

阳性对照在 356 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

阳性对照在 356 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,且待测样品在 356 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 D

(规范性附录)

实时荧光 RT-PCR 检测方法

D.1 主要试剂

D.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

D.1.2 实时荧光 RT-PCR 试剂

Realtime PCR Master Mix(2×)。

D.2 引物探针

根据豇豆重花叶病毒标准毒株(ATCC PV-273 和 DSMZ PV-0050)CP 基因序列设计一对引物及 Taqman 探针如下:

CPSMV-F:5'-GGT CAA TCC CGG CAT TAT TG-3';

CPSMV-R:5'-GGC TTC TGC AGG TGT TCC AA-3';

CPSMV-Probe:5'(FAM)-TGT AGC ACA ATC AGG GCA AAC ACA GCA-(TAMRA)3'。

D.3 核酸提取

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 TRIzol 试剂充分研磨,室温放置 5 min;12 000g 离心 5 min,取上清到另一离心管中;加入三氯甲烷 500 μ L,充分震荡 15 s,室温放置 3 min;12 000g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min;取上层水相加入另一离心管中,加入等体积异丙醇;12 000g,4 $^{\circ}$ C,离心 10 min,弃去上清;加入 1 mL 70%乙醇洗涤;RNA 沉淀干燥后,加经过焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的 ddH₂O 40 μ L 溶解即可。

注:或者按照等效 RNA 提取试剂盒进行操作。

D.4 cDNA 合成

反转录总体系为 13 μ L。特异性下游引物 CPSMV-R(20 μ mol/L)0.5 μ L、RNA 模板 1 μ L、无 RNA 酶 ddH₂O 7.5 μ L,在 PCR 仪上 65 $^{\circ}$ C 处理 5 min,迅速冷却后,再向 PCR 管中加入下列试剂:M-MLVRT(200U/ μ L)0.5 μ L、5×RT 缓冲液 2.5 μ L、dNTP(10 mmol/L)0.5 μ L、RNasin(40 U/ μ L)0.5 μ L。

反应参数:42 $^{\circ}$ C 60 min,95 $^{\circ}$ C 10 min。

D.5 实时荧光 RT-PCR 反应

实时荧光 PCR 反应体系见表 D.1。

表 D.1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/ μL
Realtime PCR Master Mix($2\times$)	10.0
cDNA	2.0
CPSMV-F($20\ \mu\text{mol/L}$)	0.4
CPSMV-R($20\ \mu\text{mol/L}$)	0.4
CPSMV-Probe($20\ \mu\text{mol/L}$)	0.1
DEPC 处理水	补足反应总体积至 $20\ \mu\text{L}$

设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序: $94\ ^\circ\text{C}$ 3 min; $94\ ^\circ\text{C}$ 15 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 60 s, 45 个循环。

D.6 结果判定

检测样品的 C_t 值大于或等于 40 时, 则判定豇豆重花叶病毒阴性。

检测样品的 C_t 值小于或等于 35 时, 则判定豇豆重花叶病毒阳性。

检测样品的 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 值大于或等于 40 时, 则判定豇豆重花叶病毒阴性; 如果重新测试的 C_t 值小于 40, 则判定豇豆重花叶病毒阳性。

附录 E
(规范性附录)
生物学测定

E.1 试材

E.1.1 寄主

苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)品种 Pinto、豇豆(*Vigna unguiculata*)品种 Blackeye Early Ramshorn。

E.1.2 试剂

0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.2)、硅藻土。

E.2 方法

E.2.1 研磨

样品按 1:(2~10)(质量体积比)加入研磨缓冲液,在研钵中研碎。研碎后放入硅藻土(浓度为 0.5%)并与病汁液混匀。

E.2.2 接种

苋色藜接种苗龄:4~6 片真叶。菜豆(*Phaseolus vulgaris*)品种 Pinto 接种苗龄:子叶期或第一片真叶出现。豇豆(*Vigna unguiculata*)品种 Blackeye Early Ramshorn 接种苗龄:子叶期或第一片真叶出现。先将要接种的植株叶片用牙签等穿孔作为接种叶片的标记,然后用手将样品汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶片上表面。用蒸馏水冲洗叶表面。

E.2.3 隔离温室条件控制

在自然光照下,温度控制在 20℃~30℃。

E.2.4 观察

及时观察记载寄主反应,连续观察一个月。

E.3 寄主症状

苋色藜:接种叶出现坏死斑症状,没有系统症状。

菜豆(品种 Pinto):接种叶出现坏死斑症状,没有系统症状。

豇豆(品种 Blackeye Early Ramshorn):接种叶出现褪绿斑症状,并且通常有红色坏死斑,有的主要叶脉变成红色和坏死,系统症状为花叶、黄脉、畸形、坏死。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法
SN/T 2055—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2018年1月第一版 2018年1月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32309 定价 18.00 元



SN/T 2055-2016