

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1146.2—2009

烟草环斑病毒分子生物学检测方法

Molecular detection of Tobacco ringspot virus

2009-09-02 发布

2010-03-16 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

本标准的附录 B、附录 C 和附录 D 均为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本标准由认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国上海出入境检验检疫局负责起草、中国检验检疫科学研究院参加起草。

本标准主要起草人:杨翠云、于翠、魏梅生、高辉、乔艳艳。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

烟草环斑病毒分子生物学检测方法

1 范围

本标准规定了烟草环斑病毒分子生物学检测的基本原则和方法。

本标准适用于无性繁殖材料、组培苗、鳞球茎和种子苗木中携带的烟草环斑病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

SN/T 1146 烟草环斑病毒检疫鉴定方法

3 原理

3.1 烟草环斑病毒学名及分类地位

中文名:烟草环斑病毒

英文名:Tobacco ringspot virus

缩写:TRSV

分类地位:豇豆花叶病毒科(Comoviridae),线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)。

3.2 烟草环斑病毒基因组

基因组含两条 ssRNA。RNA-1 长 7.514 kb;RNA-2 长 3.929 kb,外壳蛋白基因 1.548 kb。

其他资料参见附录 A。

4 仪器设备、用具和试剂

4.1 仪器设备

PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪、超净工作台、电子天平(1/10 000 g)、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、水浴锅、高速冷冻离心机、-80℃超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、漩涡振荡器。

4.2 用具

可调式微量移液器(2 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L、5 000 μ L)及相应的无 RNase 吸头、无 RNase 离心管、PCR 管和研钵等。

4.3 试剂

RT-PCR 试剂(见附录 B)、IC-RT-PCR 试剂(见附录 C)和实时荧光 RT-PCR 试剂(见附录 D)。

5 病毒检测

抽样与制样方法按照 SN/T 1146 规定的方法执行。

采用 RT-PCR(见附录 B)、IC-RT-PCR(见附录 C)和实时荧光 RT-PCR(见附录 D)进行病毒检测。

6 结果判定

样品经 RT-PCR、IC-RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 三种方法之一检测为阴性时,证明样品不携带烟草环斑病毒。

样品经 RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测为阳性,需要进行序列测定,如果序列测定结果证实与所检测

的烟草环斑病毒病毒一致,可判定样品携带烟草环斑病毒。

样品经实时荧光 RT-PCR 检测为阳性时,也可判定样品携带烟草环斑病毒。

7 样品保存和结果记录

7.1 样品保存

经检验确定携带烟草环斑病毒的样品,应在适合条件下妥善保存。如种子保存在干燥条件下,其他情况的取实验样品保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,有条件的保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中更好。做好登记和标记工作。

7.2 结果记录

记录包括:样品来源、种类、取样人员、实验的时间、地点、方法和结果、检验检疫员的签字等。RT-PCR 和 IC-RT-PCR 检测应有电泳结果照片及序列测定分析,实时荧光 RT-PCR 应有扩增曲线图片。

附 录 A
(资料性附录)
烟草环斑病毒简介

A.1 名称

中文名:烟草环斑病毒

英文名: Tobacco ringspot virus

缩写: TRSV

分类地位: 豇豆花叶病毒科(Comoviridae), 线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*)。

A.2 寄主范围

寄主范围很广,可侵染 54 科 246 种植物,自然侵染寄主有豆类、瓜类、薯类、花卉和果树等。常见的有大豆、马铃薯、甘薯、烟草、西瓜、黄瓜、甜瓜、西葫芦、胡萝卜、莴苣、菜豆、豇豆、茄子、菠菜、香石竹、唐菖蒲、百合、水仙花、鸢尾、天竺葵、李属、苹果、葡萄、甜樱桃、越桔、白蜡树等。

A.3 为害症状

TRSV 影响寄主植物的整个生长期。因寄主不同可产生不同的症状,造成叶片系统褪绿斑,坏死环斑,茎坏死条纹,危害严重时导致植株矮化,结果少和果实变小。有的症状在后期可恢复,无症带毒。

A.4 分布地区

欧洲:丹麦、前苏联、波兰、捷克、匈牙利、德国、奥地利、瑞士、荷兰、比利时、英国、爱尔兰、法国、西班牙、葡萄牙、意大利、前南斯拉夫、罗马尼亚、保加利亚、希腊、土耳其
非洲:摩洛哥、尼日利亚、扎伊尔、马拉维
美洲:美国、加拿大、古巴、多米尼加、巴西
亚洲:日本、印度尼西亚、伊朗、中国
大洋洲:澳大利亚、新西兰

A.5 传播方式

A.5.1 介体传播

传毒介体主要是美洲剑线虫(*Xiphinema americanum*),另外烟蓟马(*Thrips tabaci*)、叶螨(*Tetranychus* sp.)、墨西哥黑蝗(*Melanophus mexicanus*)、赤胫黑蝗(*Melanophus femurrubrum*)、烟草跳甲(*Epitrix hirtipennis*)和桃蚜(*Myzus persicae*)也可以传毒。

A.5.2 种子传毒

种传寄主很多,如大豆、甜瓜、莴苣、豇豆、千日红、马铃薯和天竺葵等都可种传,其中大豆种传率高达 40%~100%,甜瓜 3%~7%,豇豆 82%。

A.5.3 无性繁殖材料传毒

通过无性繁殖材料的运输进行长距离传播。

A.6 粒体形态

病毒粒体为等轴多面体球状颗粒,直径约 28 nm。

A.7 基因组

病毒基因组含两条 ssRNA。RNA-1 长 7.514 kb;RNA-2 长 3.929 kb,外壳蛋白基因 1.548 kb。

附录 B

(规范性附录)

RT-PCR 方法

B.1 试剂

B.1.1 核酸提取试剂为商品化 Trizol 试剂。

B.1.2 50×TAE

Tris 242 g
冰乙酸 52.1 mL
0.5 mol/L EDTA 100 mL
用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

B.2 实验步骤

B.2.1 引物设计

根据已报道的 TRSV CP 基因的保守序列设计 2 对特异性引物:

第一对序列为: TRSV F-1; 5'-GATGCAAAGAAAGGAAAGC-3'

TRSV R-1; 5'-AGATATGGACAACATGGAG-3'

扩增片段大小为 576 bp。

第二对序列为: TRSV F-2; 5'-ATGTGTGCTGTGACAGTTG-3'

TRSV R-2; 5'-TTAAAACAAAGTGGCGGAGCG-3'

扩增片段大小为 1 548 bp (CP 基因全长)。

B.2.2 RNA 提取

B.2.2.1 取 0.1 g 样品, 液氮研细, 加入 1 mL Trizol, 混匀, 倒入 1.5 mL 离心管中。

B.2.2.2 加入 0.2 mL 三氯甲烷, 剧烈震荡 15 s, 4℃ 11 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上层无色水相到新离心管中。

B.2.2.3 加入等体积异丙醇, 混匀, -20℃ 静置 10 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 保留沉淀。

B.2.2.4 加入 1 mL 75% 冷乙醇, 悬浮沉淀, 4℃ 8 000 r/min 离心 10 min, 干燥沉淀。

B.2.2.5 加入 30 μL DEPC-H₂O, 溶解沉淀 (必要时, 55℃~60℃ 水浴 10 min, 加速溶解), 存于 -80℃ 备用。

B.2.3 反转录

利用提取的 RNA 在 PCR 管中进行反转录。反转录体系 20 μL, 其中 2 μL 模板 RNA, 1 μL 反向引物 (20 μmol/L), 4 μL 5×AMV 酶 buffer 2 μL dNTP (10 mmol/L), 1 μL AMV 反转录酶 (5 U/μL), 1 μL RNA 酶抑制剂 (40 U/μL), 9 μL DEPC-H₂O。42℃ 反应 1 h。

B.2.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 B.1, 每个样品设 2 个平行处理。检测时以含烟草环斑病毒材料的 cDNA 或含有烟草环斑病毒目标片段的质粒作为阳性对照, 以健康植物材料作为阴性对照, 以水代替模板作为空白对照。PCR 反应条件设置如下:

第一对引物: 94℃ 4 min; 94℃ 45 s, 48℃ 45 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 10 min 延伸。

第二对引物: 94℃ 4 min; 94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min 延伸。

注: 为了提高检测 TRSV 的灵敏度, 可以利用两对引物进行巢式 RT-PCR, 首先用长片段引物第一轮扩增 15 个循环后, 取 PCR 产物稀释 500 倍~1 000 倍, 用短片段引物进行第二轮扩增 30 个循环。

表 B.1 PCR 反应体系

名 称	贮备液浓度	终 浓 度	加样量/ μL
PCR 缓冲液	10 $\times$	1 $\times$	2.5
氯化镁(MgCl_2)	25 mmol/L	2.0 mmol/L	2
dNTP	10 mmol/L	0.4 mmol/L	1
正向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
反向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.25
<i>Taq</i> 酶	5 U/ μL	1.5 U/test	0.3
cDNA			3
补水至			25

B.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测**B.2.5.1 制备凝胶**

用 1 $\times$ TAE 配制 1.5% 琼脂糖凝胶, 加热溶化后冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

B.2.5.2 加溴化乙锭

将溴化乙锭(EB)加入到配制好的凝胶中, EB 终浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。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。

B.2.5.3 加样

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(Marker)。

B.2.5.4 电泳

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。

B.2.6 结果观察

电泳结束后, 将整个凝胶置于凝胶成像系统上观察, 记录结果。

B.3 结果判断

通过观察, 在 576 bp 和 1 548 bp 两个位点上, 阳性对照应出现相应条带, 阴性和空白对照不会出现相应条带, 此时如果检测样品在上述两个位点上呈现出条带应被判为阳性, 否则应被判为阴性。

如果是阳性可通过测序的方式进一步确认。如果 PCR 产物序列与烟草环斑病毒的序列同源, 则可判定样品为烟草环斑病毒阳性, 若序列不同源, 则可判定样品为烟草环斑病毒阴性。

附 录 C
(规范性附录)
IC-RT-PCR 方法

C.1 试剂

C.1.1 TRSV 抗体

C.1.2 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
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
溶于蒸馏水中,并用蒸馏水定容至 1 L。	

C.1.3 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
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
吐温 20(Tween-20)	0.5 mL
溶于蒸馏水中,并用蒸馏水定容至 1 L。	

C.1.4 样品抽提缓冲液(pH7.4)

亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)	20 g
溶于 PBST 中,并用 PBST 定容至 1 L。	

C.2 实验步骤

C.2.1 引物设计

见附录 B。

C.2.2 抗体吸附

将 TRSV 抗体用包被缓冲液作适量稀释,吸取 200 μL 包被 PCR 管,37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 2 h;用 PBST 洗 3 次,取样品 50 mg,加入样品抽提缓冲液进行研磨,吸取 100 μL 包被 PCR 管,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(或 37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 2 h);PBST 洗 3 次,DEPC- H_2O 洗 1 次,短暂离心后吸去管底余液。

C.2.3 反转录

直接在吸附了病毒的 PCR 管中进行反转录。反转录体系总体积 20 μL ,其中 1 μL 反向引物(20 $\mu\text{mol/L}$),4 μL 5 $\times$ AMV 酶 buffer,2 μL dNTP(10 mmol/L),11 μL DEPC- H_2O ,稍离心混匀后,置 85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速置冰上 2 min~3 min,然后加入 1 μL AMV 反转录酶(5 U/ μL),1 μL RNA 酶抑制剂(40 U/ μL),42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。

C.2.4 PCR 扩增和琼脂糖凝胶检测

操作方法见附录 B。

C.3 结果判断

通过观察,在 576 bp 和 1 548 bp 两个位点上,阳性对照应出现相应条带,阴性和空白对照不会出现相应条带,此时如果检测样品在上述两个位点上呈现出条带应被判为阳性,否则应被判为阴性。

如果是阳性可通过测序的方式进一步确认。如果 PCR 产物序列与烟草环斑病毒的序列同源,则可判定样品为烟草环斑病毒阳性,若序列不同源,则可判定样品为烟草环斑病毒阴性。

附 录 D
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 方法

D.1 实验步骤

D.1.1 引物设计

根据国际基因库中已公布的 TRSV CP 基因的保守序列,设计了 1 对特异性引物和探针,

引物序列:

TRSV-5P:5'-TCCATGTTGTCCATATCTTA-3'

TRSV-3P:5'-AGAAGAAACACTCTTGACACT-3'

探针序列:

5'-Fam-CCGCTTATAGTGCCAGACCA-Tamra-3'

D.1.2 RNA 提取及反转录

操作方法见附录 B。

D.1.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 D.1,每个样品设 2 个平行处理。并设阳性对照、阴性对照和空白对照,以含有烟草环斑病毒的 cDNA 为阳性对照;以健康植物材料或线虫传多面体病毒属其他病毒的 cDNA 作为阴性对照;以水代替 DNA 模板作为空白对照。每种对照各做 2 个平行管。

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/ μL
PCR 缓冲液	10×	1×	5
氯化镁(MgCl_2)	25 mmol/L	3.0 mmol/L	6
dNTP	10 mmol/L	0.2 mmol/L	1
正向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.24 $\mu\text{mol/L}$	0.6
反向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	0.24 $\mu\text{mol/L}$	0.6
Taq 酶	5 U/ μL	2 U/test	0.4
探针	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
cDNA			4 μL
补水至			50 μL

D.1.4 实时荧光 PCR 反应参数

反应条件:预变性 94 °C 5 min,94 °C 15 s,55 °C 40 s,72 °C 40 s,共 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 ΔRn (荧光信号增加值)与循环数之间关系的图像。

D.2 结果判定

待测样品的 Ct 值为 40 时,则判定未检测到烟草环斑病毒。

待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,则判定检测到烟草环斑病毒。

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,则判定未检测到烟草环斑病毒。如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,则判定检测到烟草环斑病毒。