



中华人民共和国国家标准

GB/T 28081—2011

烟草环斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of tobacco ringspot virus

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)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、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈青、林石明、杨翠云、张毅、陈红运、廖富荣、郑云、李斌。

烟草环斑病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了烟草环斑病毒检疫鉴定的基本原则和方法。

本标准适用于可能携带烟草环斑病毒的种子、苗木、鳞球茎、组培苗等繁殖材料及其产品的检疫鉴定。

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。

SN/T 1146 植物检疫 烟草环斑病毒检疫鉴定方法。

3 烟草环斑病毒基本信息

中文名:烟草环斑病毒。

学名:tobacco ringspot virus。

缩写:TRSV。

属豇豆花叶病毒科 Comoviridae,线虫传多面体病毒属 *Nepovirus* 病毒。

TRSV 的传播途径多样,可以通过种子、嫁接、机械接种和介体传播。

烟草环斑病毒其他信息参见附录 A。

4 方法原理

利用基于抗原抗体反应的双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)、体外反转录和体外 DNA 合成技术的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行检测鉴定。

5 仪器设备、用具及试剂

5.1 仪器设备

洗板机、酶联检测仪、高速冷冻离心机、电子天平(感量 0.001 g)、超净工作台、旋涡混合仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、紫外透射仪、榨汁机、水浴锅。

5.2 用具

微量移液器(0.5 μL , 2 μL , 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL , 1 000 μL)、化学 PCR 反应管和(或)96 孔光化学 PCR 反应板、酶联板、研钵。

5.3 试剂

双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂(见 B.1)。

反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测试剂(见 C.1)。

实时荧光 RT-PCR 检测试剂(见 D.1)。

IC-RT-PCR 检测试剂(见 E.1)。

6 种苗的检测鉴定

6.1 种子检测鉴定

挑取 500 粒种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,待长出 3 片~4 片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,分别用于酶联测定和分子生物学检测。

也可以挑取畸形、不成熟的种子直接进行酶联测定和分子生物学检测。

6.2 苗木、组培苗检测鉴定

有症状的苗木单独检测。没有症状的分组检测,分组方法和检测方法同 6.1。

6.3 鳞球茎检测鉴定

取鳞球茎的小芽或鳞片进行酶联测定和分子生物学检测。

6.4 植物产品的检测鉴定

植物产品有症状的部分单独检测。没有症状或无法的观察症状的植物产品,应按比例取样,检测方法为酶联测定和分子生物学检测。

7 检测

7.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定

把制备的样品上清液加入已包被 TRSV 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 TRSV 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)应尽量与检测样品相一致。

具体操作见附录 B。

7.2 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 TRSV 的植物组织作阳性对照,超纯水作空白对照。

具体操作见附录 C。

7.3 实时荧光 PCR 检测

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

具体操作见附录 D。

7.4 IC-RT-PCR 检测

把制备的样品上清液加入已包被 TRSV 抗体的离心管中,然后进行 IC-RT-PCR 扩增。健康的植

物组织作阴性对照,感染 TRSV 的植物组织作阳性对照,超纯水作空白对照。

具体操作见附录 E。

8 结果判定

7.1、7.2、7.3、7.4 中如果两种方法的检测结果为阳性,即可判断该批种苗携带烟草环斑病毒。一般是酶联测定为阳性后,分子生物学检测为阳性即可判断为携带有烟草环斑病毒。必要时可进行生物接种试验,具体操作按照 SN/T 1146 规定的方法执行。

9 样品保存、结果记录与资料保存

9.1 样品保存

经检验确定携带烟草环斑病毒的样品应在合适的条件下保存,种子保存在 4℃,病株在-20℃或者-80℃冰箱中保存,做好标记和登记工作。

9.2 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)
烟草环斑病毒简介

A.1 寄主范围

TRSV 自然寄主范围非常广泛,可侵染 54 科 300 多种植物,主要的经济作物有:大豆(*Glycine max*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、甘薯(*Ipomoea batatas*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、甜瓜(*cucumis melo*)、胡萝卜(*Daucus carota*)、唐菖蒲(*Gladiolus communis*)、李属(*Prunus L.*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等。

A.2 病害症状

因寄主不同可产生不同的症状,一般在生长季节初始,幼嫩植株上的症状较严重,而在生长季节后期不太明显。TRSV 造成叶片系统褪绿斑、坏死环斑,茎顶枯,根腐烂,危害严重时导致植株矮化,结果少和果实变小畸形。有的症状在后期可恢复,表现为无症带毒。

大豆:顶芽卷曲(芽枯萎),其他芽逐渐变褐色且易碎。在茎干和多数叶片的叶柄上产生褐色条纹,豆荚不发达且结实。在结荚后感染则可能产生黑色污点。

烟草:在叶片上产生环形及线状斑,植株矮化。

葫芦:植株矮化、叶片斑驳、果实畸形。

葡萄:新长出的枝条柔弱、稀疏,节间变短。叶小且扭曲,植株矮小、产果少且变形。

A.3 分布地区

TRSV 在日本、韩国、印度、中国台湾地区、美国、土耳其、加拿大、墨西哥、阿根廷、巴西、澳大利亚、新西兰等 50 多个国家和地区均有分布。

A.4 传播途径

TRSV 在大豆上的种传率有时可达到 100%。主要的传播介体为美洲剑线虫 *Xiphinema americanum*。此外在实验室条件下确定能传播 TRSV 的昆虫介体有许多,如烟蓟马 *Thrips tabaci* 和烟草跳甲 *Epitrix hirtipennis* 等。

A.5 血清学特性

TRSV 免疫原性强。

A.6 粒体形态

病毒粒体为等轴二十面体球状颗粒,直径约 28 nm。

A.7 基因组

病毒基因组含两条 ssRNA。RNA-1 长 7 514 nt, RNA-2 长 3 929 nt, 外壳蛋白基因 1 548 nt。

附录 B
(规范性附录)
双抗体夹心酶联免疫吸附测定

B.1 试剂

B.1.1 包被抗体

特异性的烟草环病毒抗体。

B.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的烟草环斑病毒抗体。

B.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)

B.1.4 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
Na ₂ SO ₃	1.3 g
PVP(MW24 000~40 000)	20 g
NaN ₃	0.2 g

用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4。4℃ 储存。

B.1.5 包被缓冲液(pH9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g

加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 HCl 调节 pH 值到 9.6,蒸馏定容至 1 L。4℃ 储存。

B.1.6 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
Tween-20	0.5 mL

加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4,蒸馏水定容至 1 L。
每升 PBS 中加入 0.5 mL 的 Tween-20。

B.1.7 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
BSA(牛血清白蛋白)或脱脂奶粉	2.0 g

PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.2 g

用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4, 4 °C 储存。

B.1.8 底物(pNPP)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 °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,加入酶联板的孔中,100 μL/孔,加盖,室温避光孵育 4 h 或 4 °C 冰箱孵育过夜,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4 次~6 次。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1:10(重量:体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,2 000 r/min,离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。样品提取缓冲液作空白对照,阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行。

B.2.3 加样

加入制备好的检测样品、空白对照、阴性对照、阳性对照,100 μL/孔,加盖,室温避光孵育 2 h 或 4 °C 冰箱孵育过夜,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4 次~6 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 μL/孔,加盖,室温避光孵育 2 h,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4 次~6 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 μL/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

用酶联检测仪在 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读 OD 值。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD₄₅₀ 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。

阳性对照有明显的颜色反应;阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2;孔的重复性基本一致。

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:

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 >2 , 判为阳性。

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近, 判为可疑样品, 需重新做一次, 或用其他方法加以验证。

样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 <2 , 判为阴性。

若满足不了 B. 3.1 质量要求, 则不能进行结果判断。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 TRIzol reagent、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

C.1.2 反转录试剂：M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L)、5×RT 反应缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl pH8.3 25℃、375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L DTT)、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、RNase Inhibitor(40 U/ μ L)。

C.1.3 PCR 试剂：10×PCR 缓冲液(含 15 mmol/L 的 Mg²⁺)、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)。

C.2 实验步骤

C.2.1 引物设计

根据已报道的 TRSV CP 基因的保守序列设计 1 对特异性引物：

引物序列为：TRSVF-1:5'-GATGCAAAGAAAGGAAAGC-3'

TRSVR-1:5'-AGATATGGACAACATGGAG-3'

扩增片段大小为 576 bp。

C.2.2 RNA 提取

C.2.2.1 取 0.1 g 样品，液氮研细，加入 1 mL TRIzol reagent，混匀，倒入 1.5 mL 离心管中，室温静置 3 min。

C.2.2.2 加入 0.2 mL 三氯甲烷，剧烈振荡 15 s，室温静置 3 min，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。

C.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，弃上清液。

C.2.2.4 加入 1 mL 70%冷乙醇，悬浮沉淀，4℃ 8 000 r/min 离心 10 min，干燥沉淀。

C.2.2.5 加入 30 μ L DEPC 处理的 ddH₂O，溶解沉淀(必要时，55℃~60℃水浴 10 min，加速溶解)，于-80℃保存备用。

注：也可按照商品 RNA 提取试剂盒进行操作。

C.2.3 反转录

利用提取的 RNA 在 PCR 管中进行反转录。先加入 2 μ L 的总 RNA、1 μ L 的 TRSVR-1 引物(10 μ mol/L)，于 95℃的水浴中 7 min，然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5×RT 缓冲液 2.5 μ L、dNTP 混合液(10 mmol/L)0.5 μ L、M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L)0.5 μ L、RNase Inhibitor 0.5 μ L、DEPC 处理的 ddH₂O 5.5 μ L。反应参数：37℃60 min，95℃10 min。合成的 cDNA 于-20℃冰箱保存备用。

C.2.4 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 C.1。反应条件：94℃ 4 min；94℃ 45 s、48℃ 45 s、72℃ 45 s，30 个循环；72℃ 延伸 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

名 称	加样量 μL
10×PCR 缓冲液(含 15 mmol/L 的 Mg^{2+})	2.5
dNTP 混合液(各 10 mmol/L)	1.0
TRSVF-1(20 pmol/ μL)	0.5
TRSVR-1(20 pmol/ μL)	0.5
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μL)	0.3
cDNA	3
—	补 ddH ₂ O 至 25 μL

C.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测

C.2.5.1 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，也可在电泳完成后用溴化乙锭染色。

C.2.5.2 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琼脂糖凝胶孔中。接通电源，以 3 V/cm~5 V/cm 电场强度进行电泳，约 0.5 h 后观察结果。

C.2.5.3 结果观察

电泳结束后，将琼脂糖凝胶放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色，然后在清水中清洗后，置于紫外透射仪上观察，拍照并保留结果。

C.3 结果判断

阳性对照在 576 bp 左右处有扩增片段，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，可判定为阳性。

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。

附录 D
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 检测

D.1 试剂

试剂见 C.1。

D.2 实验步骤**D.2.1 引物设计**

引物序列:

TRSV-5P;5'-TCCATGTTGTCCATATCTTA-3'

TRSV-3P;5'-AGAAGAAACACTCTTGACACT-3'

探针序列:

5'-FAM-CCGCTTATAGTGCCAGACCA-TAMARA-3'

D.2.2 RNA 提取及反转录

操作方法见 C.2.2。

D.2.3 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 ddH₂O 代替 DNA 模板作为空白对照。每个对照各做 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
TRSV-5P	20 μmol/L	0.24 μmol/L	0.6
TRSV-3P	20 μmol/L	0.24 μmol/L	0.6
Taq 酶	5 U/μL	2 U/test	0.4
探针	20 μmol/L	0.4 μmol/L	1
cDNA	—	—	4
ddH ₂ O	—	—	补 ddH ₂ O 至 50 μL

D.2.4 实时荧光 PCR 反应参数

反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 15 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 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 ΔR_n (荧光信号增加值)与循环数之间关系的图像。

D.3 结果判定

检测样品的 Ct 值大于或等于 40 时,则判定烟草环斑病毒阴性。

检测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,则判定烟草环斑病毒阳性。

检测样品的 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 值大于或等于 40 时,则判定烟草环斑病毒阴性;如果重新测试的 Ct 值小于 40,则判定烟草环斑病毒阳性。

附录 E
(规范性附录)
IC-RT-PCR 检测

E.1 试剂

- E.1.1 TRSV 抗体。
- E.1.2 样品抽提缓冲液(见 B.1.4)。
- E.1.3 包被缓冲液(见 B.1.5)。
- E.1.4 PBST 缓冲液(见 B.1.6)。
- E.1.5 反转录及 PCR 试剂(见 C.1.2、C.1.3)。
- E.1.6 AMV 反转录酶。

E.2 实验步骤**E.2.1 引物**

引物序列见 C.2.1。

E.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 包被离心管,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。

E.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 酶缓冲液,2 μL dNTP(10 mmol/L),11 μL DEPC- H_2O 。离心混匀后 95 $^{\circ}\text{C}$ 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。

E.2.4 PCR 扩增和琼脂糖凝胶检测

操作方法见 C.2.4、C.2.5。

E.3 结果判断

阳性对照在 576 bp 左右处有扩增片段,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,可判定为阳性。

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。