



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2343—2009

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

Quarantine identification of bean pod mottle virus

2009-07-07 发布

2010-01-16 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

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

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、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:廖富荣、陈青、沈建国、郑耘、林石明、陈红运、郭琼霞、黄蓬英、王宏毅、吴媛、游源浅、虞赞。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定的程序和方法。

本标准适用于可能携带菜豆荚斑驳病毒的大豆、菜豆等种子、苗木等植物繁殖材料的检疫鉴定,也适用于介体昆虫中该病毒的检疫鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

菜豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus)属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)、豇豆花叶病毒属(Comovirus)的成员。可以分为亚组Ⅰ和亚组Ⅱ两个亚组。相关资料参见附录A。

英文缩写:BPMV

2.2 血清学特性

BPMV 具有很强的免疫原性,制备的多克隆抗体可以检测大豆叶片、种子、草本寄主植物和介体昆虫中的病毒。

2.3 分子生物学特性

BPMV 是一种正链 RNA 病毒,其基因组由两条正链 RNA-1(约 3.6 kb)和 RNA-2(约 6.0 kb)组成,分别包裹在两个直径为 28 nm 的等轴多面体粒体中。RNA-1 编码 5 个复制所需的蛋白,RNA-2 编码一个推导的细胞间运动蛋白和两个外壳蛋白。根据其基因组序列可以设计用于分子检测的特异性引物和探针,用来该病毒的特异性检测。

BPMV 所在的豇豆花叶病毒属的种划分标准是:

- 大外壳蛋白(Coat protein, CP)的氨基酸序列同源性小于 75%;
- 聚合蛋白酶的氨基酸序列同源性小于 75%;
- 在可能的成分间没有假重组;
- 抗原反应有差异。

3 主要仪器设备与试剂

3.1 主要仪器设备和用具

- 微量研磨仪;
- 酶标仪;
- 洗板机;
- 微量天平(感量:0.001 g);
- PCR 仪;
- 电泳仪;
- 水平电泳槽;
- 凝胶成像仪;
- 高速冷冻台式离心机;
- 水浴槽;
- pH 计;
- 各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、20 μ L、2 μ L);

- 各种吸头(1 000 μ L、200 μ L、20 μ L、2 μ L);
- 96 孔酶标板;
- 离心管(1.5 mL、0.6 mL、0.2 mL)。

3.2 主要试剂

主要试剂和缓冲液见附录 B 和附录 C。

4 检测样品的制备

4.1 检测样品

将送检样品制备为血清学或分子生物学检测鉴定的检测分样品。对每批送检样品进行症状检查,挑选具有褐色或黑色斑驳症状的种子(从种脐开始),或者选取具有斑驳、皱缩、褪绿等症状的叶片。

4.2 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测样品的制备

种子样品:选取一定量的种皮作为检测分样品(如 0.5 g~1.0 g),在液氮中充分研磨,回温后按比例加入样品提取缓冲液继续研磨[通常 1:(5~10)]。

叶片样品:选取一定量的叶片作为检测分样品(如 0.5 g~1.0 g),在液氮中充分研磨,回温后按比例加入样品提取缓冲液继续研磨(通常 1:10)。

把研磨后的样品转移到 5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,上清液作为 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测提取液。

注:提取液在 3 h 内使用,否则保存在 4 $^{\circ}$ C 中。

4.3 RT-PCR 检测样品的制备

称取表现症状的 0.1 g 叶片、种子等样品在液氮中充分研磨后,提取 RNA。

5 检测与鉴定

5.1 DAS-ELISA 检测

DAS-ELISA 检测应设置对照,用健康的植物组织作阴性对照,用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照,用样品提取缓冲液作空白对照。其中,阴性对照的种类和材料(如种子或叶片)应该尽量与所检测样品相一致。

具体操作过程见附录 B。当使用商业性检测试剂盒时,参照试剂盒说明进行操作。

5.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测应设置对照,用健康的植物组织作阴性对照,用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照,用 ddH₂O 作空白对照。

具体操作过程见附录 C。

5.3 IC-RT-PCR 检测

IC-RT-PCR 检测应设置对照,用健康的植物组织作阴性对照,用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照,用 ddH₂O 作空白对照。

具体操作过程见附录 D。

5.4 序列测定

将 PCR 产物回收后,进行克隆、测序,或者直接测序,测序可由生物公司完成。把测序所得到的核苷酸序列与已知的 BPMV 相应序列进行比对,如果与已知的 BPMV 相应序列相一致则判定为 BPMV,不一致则判定为非 BPMV。

6 结果判定与记录

6.1 结果判定

- 当 DAS-ELISA 检测结果呈阳性、同时 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果呈阳性时,则判定为检出 BPMV;

——当 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果呈阳性、同时序列测定结果为 BPMV 序列时,则判定为检出 BPMV。

6.2 结果记录

记录各项实验数据,包括样品种类、来源,检测时间、地点、方法和结果等。血清学检测结果保留吸光值的数据报告,分子生物学检测结果保留电泳照片,序列测定结果保留测序报告图。

7 样品的保存

经检测携带 BPMV 的样品保存在 -80°C 超低温冰箱中,并作好登记和标记工作。

附 录 A
(资料性附录)
菜豆荚斑驳病毒相关资料

A.1 分布地区

北美洲:美国、加拿大。

中南美洲:巴西、厄瓜多尔、秘鲁。

亚洲:伊朗等。

A.2 形态特征

病毒粒子形态为等轴多面体病毒,无包膜,直径为 28 nm。

A.3 寄主范围与症状

BPMV 的寄主局限于豆科植物,主要是大豆(*Glycine max*)和菜豆(*Phaseolus* spp.),山蚂蝗(*Desmodium paniculatum*)是其多年生寄主。

在实验植物上的症状:

大豆(*G. max*):表现为严重的系统症状,叶片斑驳、皱缩、荚和种子斑驳,甚至坏死、植株死亡。该病毒还能延迟大豆茎秆成熟,引起“绿茎”现象。

菜豆(*Phaseolus vulgaris*)Tendergreen 品种:起初出现褪绿斑,后发展为严重的系统褪绿,叶片畸形,豆荚严重斑驳,深绿色,豆荚短、畸形、扭曲、变得粗糙有疣状突起。

菜豆(*P. vulgaris*)Pinto 品种:无系统症状,接种后约 3 d~4 d 出现散生的红色局部枯斑,接种叶有时叶脉坏死。

菜豆(*P. vulgaris*)Bountiful 品种:无系统症状,接种后约 3 d~4 d 出现大的淡黄色局部病斑。

A.4 传播途径

BPMV 可以通过昆虫介体传播,主要是大豆叶甲(*Cerotoma trifurcata*),而玉米根叶甲(*Diabrotica virgifera*)、带斑黄瓜叶甲(*D. balteata*)、点斑黄瓜叶甲(*D. undecimpunctata howardii*)、葡萄甲虫(*Colaspis flavida*)、甲虫(*C. lata*)、曲条豆芎菁(*Epicauta vittata*)、墨西哥叶甲(*Epilachna varivestis*)和大豆潜叶虫(*Odontota horni*[*Xenochalepus horni*])也是该病毒的传播介体。

该病毒另外还可以机械传播、嫁接传播,以及通过种子进行远距离传播。从感染 BPMV 植株上收获的种子,其种传率为 0.10%,种传率相对较低。与大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)一起感染,种传率可以达到 39%。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测操作步骤

B.1 ELISA 所采用的试剂**B.1.1 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
叠氮化钠(NaN_3)	0.20 g

加入 900 mL 水溶解,用 HCl 调节 pH 值到 9.6,然后加水至 1 L。

B.1.2 磷酸盐缓冲液(PBS,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
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

加入 900 mL 水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4,然后加水至 1 L。

B.1.3 PBST

每升 PBS 中加入 0.5 mL 的 Tween 20。

B.1.4 样品提取缓冲液(pH7.4)

PBST+2%PVP(Sigma PVP-40 聚乙烯基吡咯烷酮)。

B.1.5 酶标抗体稀释缓冲液

PBST+2%PVP+0.2%卵白蛋白(Sigma A-5253)。

B.1.6 底物缓冲液

二乙醇胺	97 mL
水	600 mL
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

用盐酸调整 pH 至 9.8,然后加水到 1 L。

注:缓冲液可以储存在 4℃~10℃中至少 2 个月,使用前回温至室温。

B.1.7 抗体

BPMV 抗体、碱性磷酸酯酶标记的 BPMV 抗体。

B.2 操作步骤**B.2.1 包被**

根据检测试剂盒说明,用包被缓冲液稀释 BPMV 抗体(如 1:200),在微孔板中每孔加入 100 μL 包被抗体溶液。在室温下孵育 2 h~4 h 或 4℃下包被过夜。

B.2.2 加样

倒去孔中的抗体包被溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。加入 100 μL 检测样品提取液到酶标板的孔中,每个样品至少 2 个孔。并设置阳性、空白和阴性对照。在室温下孵育 2 h 或 4℃下过夜。

B.2.3 加入酶标抗体

根据试剂盒说明,用酶标抗体缓冲液稀释相应的酶标抗体(如 1:200)。倒去孔中的检测样品提取液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。每孔加入 100 μ L 酶标抗体溶液。在室温下孵育 2 h。

B.2.4 加底物

用底物缓冲液配制 1 mg/mL 的底物溶液。倒去酶标抗体溶液,用 PBST 洗 4 次~5 次孔(可在洗板机上完成)。每孔加入 100 μ L 新鲜配制的底物溶液。室温下避光放置(约 30 min~60 min),至阳性对照孔明显显色。

注:在准备底物溶液的过程中,不要接触药剂或暴露在强光中,以避免在阴性对照孔中出现背景颜色。

B.2.5 吸光值的测定

用酶标仪在 405 nm 处读取吸光值。

B.3 结果判定

B.3.1 对照孔的 OD_{405} 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 OD_{405} 值 <0.15 ,当阴性对照孔的 OD_{405} 值 <0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 $>5\sim10$;同一样品的重复性基本一致。

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 >2 ,判为阳性;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值接近阈值,判为可疑样品,需重新做一次;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 <2 ,判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判断。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测操作步骤

C.1 主要试剂

C.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol reagent、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的 ddH₂O。

C.1.2 RT-PCR 试剂

5×RT 缓冲液、dNTP 混合物(10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺)、Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

C.1.3 10×TBE 缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱 108 g
硼酸 55 g
Na₄EDTA 9.3 g
加水溶解,定容到 1 L。

C.1.4 电泳试剂

琼脂糖、0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液、10×TBE 缓冲液。

C.2 引物序列与合成

设计了一对用于特异性扩增的引物,序列及其相对位置见表 C.1。其中 BPM1 为正向引物,BPM2 为反向引物,扩增大小为 228 bp,扩增区域在大外壳蛋白基因上。由生物公司合成引物。

表 C.1 所使用的引物序列

引物名称	引物序列	在 NC_003495 ^a 上的位置
BPM1	5'-CATAGCATTGGAATTTGGCTG-3'	2587-2609
BPM2	5'-TCACCTGGTATTGTG(A)GACAC-3'	2795-2814
^a 在 GenBank 上的基因序列登录号		

C.3 总 RNA 的提取

取 0.05 g~0.1 g 粉末,加入 1 mL TRIzol reagent 充分研磨,室温放置 5 min;12 000g 离心 5 min,取上清液到另一离心管中;加入三氯甲烷 200 μL,充分振荡 15 s,室温放置 3 min;12 000g,4℃离心 15 min;取上层水相加入另一离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇;12 000g,4℃,离心 10 min,弃去上清液;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:本方法是根据 TRIzol reagent 说明并略有改动,在保证能够得到满意的总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

C.4 cDNA 合成

在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 BPM2 引物(10 μmol/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 μL、dNTP 混合物(10 mmol/L)0.5 μL、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)0.5 μL、RNasin 0.5 μL、经 DEPC 处理的 ddH₂O 4.5 μL。然后 37℃水浴 1 h,95℃水浴 10 min,自然冷却至室温,-20℃冰箱中保存。

C.5 PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。在 PCR 的薄壁管中分别加入以下试剂(25 μL 体系): $10\times$ PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})2.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.5 μL 、dNTP 混合物(每种各含 10 mmol/L)0.5 μL 、BPM1 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL 、BPM2 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL 、cDNA 3.0 μL 、ddH₂O 16.5 μL 。

反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,进行 35 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 7 min。

C.6 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 $6\times$ 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 $0.5\times$ TBE 缓冲液的 1.5%琼脂糖凝胶孔中,然后在 120 V 下电泳。电泳结束后,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,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

C.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照在 228 bp 位置产生预期大小条带情况下,如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
IC-RT-PCR 检测操作步骤

D.1 包被抗体

根据检测试剂说明,将包被抗体用包被缓冲液稀释(如 1:200 倍),取 50 μL ~100 μL 稀释好的包被溶液于 0.6 mL 的离心管中。25 $^{\circ}\text{C}$ 中放置 3 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次~5 次,去除残留溶液。

D.2 抗原捕捉

向每个已包被抗体的离心管中加入检测样品上清液 100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h~3 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置过夜;加入 PBST 缓冲液洗涤 3 次~5 次,双蒸水洗涤 1 次,去除残留溶液。

注:如果是用于验证 DAS-ELISA 的检测结果,可直接使用血清学检测样品的剩余提取液。

D.3 cDNA 合成

在上述离心管中加入 1 μL 的 BPM2 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、37.5 μL 的 ddH₂O(经 DEPC 处理),于 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中处理 7 min,然后迅速冰浴 5 min;继续加入 5 $\times$ RT 缓冲液 10 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MuLV 反转录酶 0.5 μL 、RNasin 0.5 μL ;然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,冷却后作为 PCR 扩增模板。

D.4 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中:2.5 μL 的 10 $\times$ PC 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}),dNTP(每种各 10 mmol/L)0.5 μL ,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.5 μL ,BPM1 和 BPM2 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL (引物序列与附录 C 的表 C.1 相同),加入上述 DNA 模板 10 μL ,ddH₂O 补足体积。

与附录 C 中的第 C.5 章反应程序相同,反应完成后,取 5 μL 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,然后用 EB 染色,在凝胶成像系统上观察。

D.5 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照在 228 bp 位置产生预期大小条带情况下,如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。