

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1146—2010
代替 SN/T 1146—2002

烟草环斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of tobacco ringspot virus



2010-05-27 发布

2010-12-01 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 1146—2002《烟草环斑病毒检疫鉴定方法》。

本标准与 SN/T 1146—2002 相比,主要技术变化如下:

- 现场检疫抽样按照 SN/T 2122—2008《进出境植物及植物产品检疫抽样》执行(见 6.2);
- 删除了原标准规范性附录 A;
- 增加了“症状检查”一节(见 6.3);
- 免疫电镜方法按照 SN/T 1840—2006《植物病毒免疫电镜检测方法》标准(见 7.3)。

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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈枝楠、邓琼、郑耘、凌杏园、郑文华、王东勇。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1146—2002。

烟草环斑病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中对烟草环斑病毒的检疫鉴定方法。
本标准适用于进出境植物及其产品中烟草环斑病毒的检疫鉴定。

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。

SN/T 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样规则

3 原理

烟草环斑病毒(tobacco ringspot virus,简称 TRSV),异名为银莲花坏死病毒(anemone necrosis virus)、蓝莓坏死环斑病毒(blueberry necrotic ringspot virus)、烟草环斑病毒 1 号(tobacco ringspot virus 1)。该病毒为等轴多面体球状病毒,直径为 25 nm~29 nm,属线虫传多面体病毒属成员,可侵染 54 科、300 多种植物,其中主要的经济作物有豆类、马铃薯、甘薯、烟草、西瓜、黄瓜、甜瓜、胡萝卜、唐菖蒲、百合、鸢尾、李属、苹果、葡萄、甜樱桃等。受 TRSV 侵染的植株症状因寄主而异,通常叶片出现环状或线状纹、褪绿斑或斑驳、坏死斑;根腐烂、茎顶枯、所结的果畸形等。该病毒主要依靠线虫和种子进行传播,主要分布于北美洲、大洋洲、欧洲、非洲等地区,具有寄主广泛,危害症状明显、免疫原性强、容易制备高滴度、专化性强的病毒抗血清等特点(参见附录 A)。通过血清学双抗体夹心法(DAS-ELISA)结合鉴别寄主生物学鉴定方法或免疫电镜检测,作为检疫工作中鉴定该病毒的依据。

4 用具、设备、设施

研钵、微量榨汁机、酶标仪、低速离心机(转速为 4 000 r/min)、生物培养箱(具有光照,温度可调范围为 0℃~50℃)、酶联板(48 孔或 96 孔)、Eppendorf 管(体积为 1.5 mL)、单道移液器(10 μL、100 μL、1 000 μL)、8 道移液器(100 μL 或 200 μL)、恒温水浴锅或恒温培养箱、分析电子天平、pH 计、白瓷盘(40 cm×50 cm)、钝头镊子、隔离检疫温(网)室。

5 试剂

5.1 10×PBST 缓冲液

将氯化钠(NaCl)80 g、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)2 g、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)11.5 g、氯化钾(KCl)2 g、吐温-20(Tween-20)5 mL 溶于蒸馏水,定容至 1 000 mL。

5.2 样品提取缓冲液

将亚硫酸钠(Na₂SO₃)1.3 g、聚乙烯基吡咯烷酮(MW24 000~40 000,PVP)20 g、叠氮钠(NaN₃)

0.2 g、吐温-20(Tween-20)20 mL 溶解于 1 000 mL PBST 中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 7.4,并储存于 4 ℃。

5.3 包被缓冲液

将碳酸钠(Na_2CO_3)1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2.93 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 9.6,并储存于 4 ℃。

5.4 洗涤缓冲液

将 1×PBST 缓冲液用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 7.4,并储存于 4 ℃。

5.5 酶标结合物缓冲液

将 1×PBST 缓冲液 800 mL、小牛血清白蛋白(BSA)2 g、PVP(MW24 000~40 000)20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 用蒸馏水定容至 1 000 mL,并储存于 4 ℃。

5.6 pNPP 底物缓冲液

将二乙醇胺 97 mL、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 值至 9.8,并储存于 4 ℃。

5.7 pNPP 底物溶液

将 4-硝基酚磷酸钠盐(简称为 pNPP)100 mg 溶解于 pNPP 缓冲液 100 mL 中,现用现配制。

5.8 终止反应液

将氢氧化钠(NaOH)40 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。

5.9 种子表面消毒液

将 30%次氯酸钠 100 mL 溶解于 900 mL 蒸馏水中制成浓度为 3%的消毒液。

5.10 生物试剂

可采用商品化烟草环斑病毒检测试剂盒或认可指定单位生产的生物检测试剂。包括烟草环斑病毒抗体(IgG),碱性磷酸酶标记的烟草环斑病毒酶标抗体(IgG-Enzyme-Conjugated),阳性对照和阴性对照。

5.11 2%乙酸铀染液

将 2 g 乙酸铀溶解于 98 mL 蒸馏水中,定容至 100 mL,现配现用。

注:本标准未作特殊说明,所使用试剂均为分析纯。

6 现场检疫

6.1 抽查

按货物批量总件数的 5%~20%随机抽查,最低抽查件数 10 件,不够最低检查数量件数的全部检查。

6.2 抽样

按 SN/T 2122 的要求抽样。

6.3 症状检查

现场检疫时,应根据该病毒在不同应检植物或其产品上表现的特有症状进行检查。发现可疑症状的或带毒症状的样品应立即采样或整株植物送检。

7 检疫鉴定

7.1 双抗体夹心法(DAS-ELISA)

7.1.1 样品制备

7.1.1.1 种子类

随机抽取 100 粒种子经 3% 次氯酸钠表面消毒 10 min 后,用无菌水洗涤三次,将种子置于铺有吸水纸的白瓷盘中,分五组将种子分列其中,在适宜的发芽温度(20 ℃~28 ℃)条件下催芽,直至长出第一对真叶。随机抽取 20 株苗叶片,每株叶片约 1 g(3 片/株~4 片/株),用微量榨汁机(或每克组织加入 4 mL 样品缓冲液研磨)榨出汁液分别盛装于 Eppendorf 管中,加入 1/2~1/3 Eppendorf 管体积样品提取缓冲液(如选用商品检测试剂盒则按照试剂盒要求进行)制备成一个样品。

7.1.1.2 鳞球(块)茎类

将至少 20 个(头)鳞球茎或块茎芽眼(处于休眠状态的还要打破休眠)在生物培养箱(20 ℃~28 ℃)中催芽,直至长出叶片。随机抽取 1 g 叶片(3 片/株~4 片/株),鳞球茎也可直接用解剖刀切取 2 g~4 g 组织,用微量榨汁机(或每克组织加入 4 mL 样品缓冲液研磨)榨出汁液分别盛装于 Eppendorf 管中,加入 1/2~1/3 Eppendorf 管体积样品提取缓冲液(如选用商品检测试剂盒则按照试剂盒要求进行)制备成一个样品。

7.1.1.3 种苗类

取 1 g(3 片/株~4 片/株)表现症状植株叶片和无症状表现叶片,用微量榨汁机(或每克组织加入 4 mL 样品缓冲液研磨)榨出汁液分别盛装于 Eppendorf 管中,加入 1/2~1/3 Eppendorf 管体积样品提取缓冲液(如选用商品检测试剂盒则按照试剂盒要求进行)制备成一个样品。

7.1.2 操作步骤

7.1.2.1 根据检测需要设计 96 孔(或 48 孔)酶联板点样孔。包括 2 个阳性对照孔、2 个阴性对照孔、2 个~4 个空白对照孔和多个待检测样品孔。待测样品设两次重复。

7.1.2.2 每孔加入 200 μL 抗 TRSV IgG 溶液,37 ℃ 孵育 2 h~4 h(或 4 ℃ 冰箱过夜)。

7.1.2.3 空干后用 1×PBST 洗涤液洗涤酶联板 3 次或 3 次以上,每次 3 min。

7.1.2.4 每孔加入 200 μL 待检测样品液,37 ℃ 孵育 2 h~3 h(或 4 ℃ 冰箱过夜)。

7.1.2.5 洗涤与 7.1.2.3 的要求相同。

7.1.2.6 每孔加入 200 μL 酶标抗体溶液,37 ℃ 孵育 2 h~4 h(或 4 ℃ 冰箱过夜)。

7.1.2.7 洗涤与 7.1.2.3 的要求相同。

7.1.2.8 每孔加入 200 μL pNPP 底物溶液,室温孵育 0.5 h~2 h。

7.1.2.9 必要时每孔加入 50 μL 1 mol/L NaOH 溶液终止反应(若立即检测 OD_{405} 值则不需要)。

7.1.2.10 用肉眼观察判断酶标板颜色反应结果或者用酶标仪分别在 0.5 h、1 h 和 2 h 检测 OD_{405} 值。

7.1.3 其他

若采用商品化烟草环斑病毒检测试剂盒则可按照试剂盒检测指导说明进行操作。

7.2 鉴别寄主生物学检测方法

对经 DAS-ELISA 检测出阳性的样品,采其适量叶片,加入适量样品提取缓冲液,研磨后用摩擦接种法接种栽于室温(20℃~25℃)检疫隔离温、网室中的昆诺藜、黄瓜、白肋烟、长豇豆和菜豆“Pinto”等鉴别寄主植物上。

- 昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)接种叶出现坏死斑或局部褪绿斑;
- 黄瓜(*Cucumis sativus*):接种 5 d~7 d 后,接种叶局部褪绿斑,后出现系统环斑,10 d 后植株扭曲变形;
- 白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv. White Burley)接种后 4 d~7 d,接种叶出现局部褪绿斑或坏死斑,约 15 d 后发展为系统褪绿或坏死斑,后期或温度超过 30℃时新长叶无症状;
- 长豇豆(*Vigna sesquipedalis*)接种 4 d~7 d,接种叶出现褐色的坏死斑或环斑,约 10 d~15 d 生长点坏死,最后全株枯死;
- “Pinto”菜豆(*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto):接种 5 d~7 d 后,接种叶出现局部坏死环斑,10 d~15 d 后系统环斑,生长点坏死。

7.3 免疫电镜

取经 DAS-ELISA 检测后样品呈阳性反应的植株叶片,用微量榨汁机制备样品提取汁液,经离心取上清液。具体方法见 SN/T 1840。

8 结果判定

8.1 血清学检测结果判定

当阳性样品孔有颜色反应,阴性对照孔无颜色反应,且阴性对照孔 OD_{405} 值小于 0.15,如果小于 0.05 按 0.05 计算,且重复检测样品 OD_{405} 值平行允许率(p)小于 20%时则判定检测结果有效。计算待测样品 OD_{405} 值和阴性对照 OD_{405} 值之比(P/N)。若 P/N 大于 2,双抗体夹心法(DAS-ELISA)血清学检测结果判定为阳性。若 P/N 值接近 2,需重复检测可疑样品(如果选用商品检测试剂盒,则按照试剂盒的判定标准执行)。

样品 OD_{405} 值的平行允许率按式(1)进行计算:

$$p = \frac{OD_1 - OD_2}{(OD_1 + OD_2) \times 1/2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- p ——平行允许率;
- OD_1 ——重复样品 1;
- OD_2 ——重复样品 2。

8.2 鉴别寄主谱生物学检测结果判定

经 DAS-ELISA 检测为阳性的样品接种 TRSV 鉴别寄主表现的典型症状符合 7.2 的描述,生物学检测结果进一步确定检测样品带有 TRSV。

8.3 免疫电镜结果判定

经 ELISA 检测和鉴别寄主谱检测都表现阳性的样品,在免疫电镜下可见粒体外包被一层电子云,

病毒粒体为等轴多面体。

8.4 结果综合判定

同时符合 8.1 与 8.2 或 8.1 与 8.3 两项结果判定的,可判定待检测样品带有 TRSV 病毒。若需进一步鉴定该病毒,可采用枯斑分离、生物学检测或 PCR 等分子生物学检测方法进行全面鉴定。

9 样品的保存与复核

种子类样品保存 6 个月,发现烟草环斑病毒时样品保存 1 年。其他繁殖材料发现烟草环斑病毒的采病叶经液氮干燥后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。检测原始记录、照片等文档按有关规定作好登记、标记和存档,以便必要时复核。

附录 A
(资料性附录)
生物学特性

A.1 典型症状

受 TRSV 侵染的植株症状因寄主而异。豆类(大豆、菜豆、豇豆)生长点坏死,产生顶枯和芽枯。大豆田间病株常晚熟,健株衰老黄化时病株仍为绿色,豆荚发育不良有褐色斑,病株矮化。西瓜植株矮化,节间缩短,束顶,叶片产生坏死斑,瓜呈丘疹状。芹菜幼叶和中部叶产生环状褪绿斑,后变枯黄色坏死斑,老叶产生坏死黄斑。茄子叶片除产生花叶、斑驳外,还产生褪绿环斑。结果少,果实变小,上有环斑。葡萄植株矮化,叶片产生褪绿斑和斑驳,结果少,茎干木质部有凹陷的孔和沟,韧皮部增厚,并呈海绵状。苹果嫁接结合处变形或分离,叶片稀疏,叶片的症状为褪绿和斑驳。白蜡树植株矮化,新叶上产生线条状褪绿斑。唐菖蒲叶片产生斑驳,植株矮化。接种鉴别寄主,白肋烟接种后 4 d~7 d,接种叶出现局部褪绿斑或坏死斑,约半个月后发展为系统褪绿或坏死环斑,后期或温度超过 30 ℃时新长叶无症带毒。豇豆黑种三尺(*Vigna sesquipedalis* cv.)接种 4 d~7 d,接种叶出现褐色的坏死斑或环斑,约 10 d~15 d 生长点坏死,最后全株枯死。昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*)接种叶局部坏死斑,一般无系统反应。番杏(*Tetragonia expansa*)接种叶局部褪绿斑后发展为系统褪绿斑,叶小,株矮。

A.2 传播方式

TRSV 的传播途径多样,可通过介体、种子、嫁接和机械接种等方式传播。美洲剑线虫(*Xiphinema americanum sensu lato*)以持久性方式传播 TRSV。研究发现该病毒粒体存在于线虫的口针周围内腔和食管中,存活时间相当长,传毒能力可保持数周或数月,但蜕皮后不能传毒,病毒在介体中不增殖。种传寄主较多,包括大豆、甜瓜、千日红、莴苣、豇豆、蒲公英、欧洲千里光、马铃薯、百日菊和天竺葵等均经种子传毒。汁液接种易传毒。