

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1618—2005



李属坏死环斑病毒检测方法

Detection of prunus necrotic ringspot virus

2005-08-18 发布

2006-02-01 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

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C 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。

本标准由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所负责起草,中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国陕西出入境检验检疫局参加起草。

本标准主要起草人:李桂芬、李明福、魏梅生、相宁、张永江、韩丽娟、魏迪功。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

李属坏死环斑病毒检测方法

1 范围

本标准规定了李属坏死环斑病毒检测和鉴定的基本原则和方法。

本标准适用于可能带有李属坏死环斑病毒的所有进境的无性繁殖材料、组培苗、种子和果实的检测和鉴定。

2 原理

2.1 李属坏死环斑病毒学名、分类地位

学名: *Prunus necrotic ringspot virus*

缩写: PNRSV

分类地位: 雀麦花叶病毒科(Bromoviridae), 等轴不稳环斑病毒属(*Ilarvirus*)。

2.2 寄主范围

该病毒寄主范围广泛, 自然和实验接种侵染 21 科双子叶植物, 该病毒可侵染大多数李属植物、玫瑰、啤酒花。在人工接种的情况下还可侵染 180 余种植物。

2.3 病害症状

病害症状因分离物、栽培种和环境条件不同而不同。病毒的一些分离物不引起症状, 仅仅在接种指示植物或用血清学等方法检测时才能发现被侵染; 一些分离物在系统侵染的当年在幼叶上产生坏死斑和孔洞, 但在以后的年份里, 在叶子和果实上很少出现症状; 另一些分离物在侵染当年产生坏死反应, 随后是慢性的褪绿叶斑驳和坏死、叶子耳突、畸形、延迟水果成熟, 水果上有斑点症状。如在甜樱桃上出现了从无症状到严重皱缩花叶症状, 慢性症状包括叶子上的褪绿点、叶扭曲, 水果延迟成熟几天至几周, 症状因病毒分离物不同而不同。在玫瑰上无症状侵染很普遍, 症状有花叶、开花延迟、秋天落叶早、产生更多不成形的花, 被侵染的植株通常无活力。在啤酒花上产生褪绿线和环斑。

2.4 分布地区

广泛分布在温带地区, 如欧洲各国和美国都有发生。

2.5 传播方式

机械接种传播、花粉传播、种子传播, 也可通过无性繁殖苗木、组培苗的运输等人为途径进行长距离传播。

2.6 粒体形态

李属坏死环斑病毒粒体为等轴对称球状体, 直径 23 nm~27 nm, 有些粒体为准等轴球状到短棒状(轴比为 1.01~1.5); 有些株系的病毒粒体呈明显的棒状(轴比大于 2.2); 有些棒状粒体达 70 nm。棒状粒体的有无及比例因株系而异。

2.7 病毒基因组

正单链 RNA, 3 分体基因组, RNA-1 长 3.662 kb, RNA-2 长 2.507 kb, RNA-3 长 1.887 kb。

3 仪器设备、用具及试剂

3.1 仪器设备

酶标检测仪、天平(1/10 000 g)、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、紫外透射仪、隔离温室、榨汁机、水浴锅等。

3.2 用具

可调移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、0 μL ~10 μL 、1 000 μL ~5 000 μL)、可调移液器头、酶联板、eppendorf 管、指型管、研钵等。

3.3 试剂

酶联检测试剂(见附录 A)、PCR 检测试剂(见附录 B)。

4 病毒检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(见附录 A)、生物学测定(见附录 C)、RT-PCR(见附录 B)检测方法进行检测。

5 结果判定

样品酶联检测为阳性,RT-PCR 检测为阳性或生物测定鉴别寄主反应与附录 C 描述相吻合,即可判断为李属坏死环斑病毒。

6 样品保存和复核

6.1 样品保存

鉴于李属坏死环斑病毒为检疫性有害生物,样品应保存在适合条件下以备复核。如组培苗应保存在组培室中,生长苗木应保存在隔离温室中,种子应保存在干燥条件下。

6.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录要包括:样品来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有经手人和实验人员的签字。生物学测定需有鉴别寄主的症状照片,双抗体夹心酶联免疫吸附测定法检测需有酶联板反应的照片,RT-PCR 检测需有电泳结果照片。

6.3 复核

由国家质量监督检验检疫局指定的单位或人员负责,主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

附录 A
(规范性附录)

双抗体夹心酶联免疫吸附测定法

A.1 试剂

A.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
用蒸馏水定容至 1 L。	

A.1.2 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
Tween-20	0.5 mL
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
用蒸馏水定容至 1 L。	

A.1.3 样品抽提缓冲液

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP	20 g

A.1.4 酶标抗体稀释缓冲液

PBST	1 L
PVP	20 g
BSA	done 2.0 g

A.1.5 底物缓冲液

二乙醇胺	97 mL
蒸馏水	600 mL
用盐酸调 pH 值至 9.8,然后用蒸馏水定容至 1 L。	

A.2 实验步骤

A.2.1 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 μL 。酶联板加盖或用保鲜膜包好,放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。

A.2.2 清空酶联板孔中溶液,用 PBST 加满各孔,3 min 后倒掉孔中洗涤液,在吸水纸上拍干,再重复两次。

A.2.3 待检样品按 1:(2~10)(质量浓度)加入样品抽提缓冲液,在研钵中研磨,低速离心,吸取上清液 100 μL /孔,每个待检样品应设重复,设阳性对照、阴性对照、缓冲液对照。加盖或用保鲜膜包好,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。

A.2.4 清空孔中溶液,先在自来水下冲洗 3 次;然后用 PBST 加满各孔,3 min 后倒掉,在吸水纸上拍干,再重复 2 次。

A. 2.5 用酶标抗体稀释缓冲液按要求稀释酶标抗体,每孔加入 100 μL ,加盖或用保鲜膜包好,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。

A. 2.6 同步骤 A. 2.4 洗板

A. 2.7 按 1 mg/mL 的浓度将 ρ NPP(对硝基苯磷酸钠)溶于底物溶液中(使用前配制并注意避光以防变色),制成底物溶液。每孔加入 100 μL 底物溶液。加盖或用保鲜膜包好,室温避光孵育 30 min~60 min。

A. 2.8 酶联仪 405 nm 波长下检查各孔的吸收值。

A. 3 结果判断

A. 3.1 如果是商品试剂盒,根据试剂盒的说明来判断。

A. 3.2 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} 值小于 0.15,当阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算。

阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值大于 5~10;孔的重复性基本一致。

A. 3.3 在满足了 A. 3.2 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} 值明显大于 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} 值明显小于 2,判为阴性。

A. 3.4 若满足不了 A. 3.2 质量要求,则不能进行结果判断。

附 录 B
(资料性附录)
RT-PCR 检测方法

B.1 试剂**B.1.1 抽提缓冲液**

称取 6.05 g Tris, 溶于 800 mL 蒸馏水中, 分别加入 10 g SDS、5.64 g 氯化钠和 3.72 g EDTA, 用浓盐酸调至 pH7.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。使用前加入巯基乙醇(终浓度 0.2%)。

B.1.2 3 mol/L 醋酸钠(pH5.2)

称取 408.1 g 含 3 个分子结晶水的乙酸钠, 溶于 800 mL 蒸馏水中, 用冰乙酸调至 pH5.2, 定容至 1 L, 分装高压灭菌。

B.1.3 50×TAE

Tris	242 g
冰醋酸	52.1 mL
EDTA 钠·2H ₂ O	37.2 g

加蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

B.1.4 6×加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝

40%(质量浓度)蔗糖水溶液

B.2 实验步骤**B.2.1 样品处理**

B.2.1.1 将植物材料置于 eppendorf 管中, 液氮冷冻, 研碎。

B.2.1.2 按 1 g : 3 mL 比例悬浮于抽提缓冲液中, 继续研磨。

B.2.1.3 再加入等体积的水饱和酚 : 三氯甲烷 : 异戊醇(25 : 24 : 1), 混匀。

B.2.1.4 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。

B.2.1.5 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH5.2), 2.5 倍体积的无水乙醇, -80℃ 30 min 以上(或 -20℃ 过夜)。

B.2.1.6 13 000 r/min 离心 15 min, 留沉淀。

B.2.1.7 加入适量的 75% 酒精洗涤。13 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 重复一次, 风干得到样品。

B.2.2 引物合成

序列为: C537 5'-ACGCGCAAAGTGTCGAAATCTAAA-3'

H83 5'-TGGTCCCACTCAGAGCTCAACAAAG-3'

RT-PCR 产物大小为 455bp。

B.2.3 反转录 PCR(RT-PCR)**B.2.3.1 DNA 的合成**

待检测核酸 2 μL, 20 pM 引物 C537 1 μL, 双蒸水 7 μL, 88℃ 水浴 10 min, 置于冰上, 加入 10 mmol/L dNTP 1 μL, 40 U/μL RNAsin 0.5 μL, 5 倍 M-MLV 反转录酶缓冲液 4 μL, 100 mmol/L DTT 2 μL, 200 U/μL M-MLV 反转录酶 1 μL, 混匀, 42℃ 水浴 1 h, 合成 cDNA。

B.2.3.2 PCR 扩增

10 mmol/L dNTP 1 μL, 20 pmol/L 引物 C537 1 μL, 20 pmol/L 引物 H83 1 μL, 10 倍 PCR 缓冲液

5 μL , cDNA 2 μL , 双蒸水 39 μL , 88 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 加 2 U/ μL *Taq* 酶 1 μL , 进行如下热循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 1 次循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 次循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖电泳分离-溴化乙锭染色。

B. 2. 4 琼脂糖电泳

B. 2. 4. 1 制备凝胶

将 1 \times TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5% 配好, 在水浴中熔化混匀, 冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

B. 2. 4. 2 加溴化乙锭

溴化乙锭浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与制备的凝胶混匀, 倒入已封好的凝胶平台上, 插上样品梳。

B. 2. 4. 3 加电泳液

待凝胶凝固后, 从制胶平台上除去封带, 拔出梳子, 加入足够量的 1 \times TAE (缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

B. 2. 4. 4 加样

用适量的 (约 2 μL ~3 μL) 6 \times 加样缓冲液分别与 10 μL 样品混合, 然后分别将制备好的加样样品和适合的 DNA 分子量标准物加入样品孔中。

B. 2. 4. 5 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动, 电压 75 V, 电泳时间为 1.5 h。

B. 2. 4. 6 结果观察

电泳结束后, 将整个胶置于紫外透射仪上观察。

B. 3 结果判断

通过观察, 若在 455bp 左右处有条带出现, 即可判断为阳性。

附录 C
(资料性附录)
生物学测定

C.1 试材

C.1.1 鉴别寄主

采用黄瓜(*Cucumis sativus*)、胶苦瓜(*Momordica balsamina*)、瓜豆(*Cyamopsis tetragonoloba*)、日本樱花(*Prunus nipponica shirofugen* 品种)、昆诺阿藜(*Chenopodium quinoa*)为鉴别寄主。

C.1.2 试剂

1%磷酸盐缓冲液(pH7.4)、硅藻土。

C.2 方法

C.2.1 研磨

病样加1:1的磷酸盐缓冲液,在研钵中研碎。研碎后放入硅藻土,浓度为0.5%,与病汁液混匀。

C.2.2 接种

用手将病汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶表面。

C.2.3 冲洗

用自来水冲洗叶表面。

C.2.4 标记

做好标签,置于隔离温室中。

C.2.5 观察

每天观察记载寄主反应。

C.3 鉴别寄主症状

黄瓜:侵染初期具有清晰的褪绿病斑,系统死顶,继而严重矮缩和密生腋芽。

胶苦瓜:初期产生坏死斑,偶见系统坏死。

瓜豆:黑色的大病斑,系统叶脉坏死。

日本樱花 SHIROFUGEN 品种:嫁接了带毒的芽之后,出现局部坏死和流胶症。

昆诺阿藜:接种4 d~5 d,接种叶出现褪绿斑驳,新生叶系统斑驳死顶。

