

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.7—2009

马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法

Quarantine identification of Potato virus A



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、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。

本标准由中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院负责起草。

本标准主要起草人：王秀芬、李明福、刘伟、高志方、刘善斌、周铭。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中对马铃薯 A 病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于所有进境种薯、商品用薯、组培苗和脱毒苗等马铃薯种质中马铃薯 A 病毒的检疫鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 原理

3.1 学名与分类地位

学名:Potato virus A

缩写:PVA

分类地位:马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。

3.2 检疫鉴定依据

马铃薯 A 病毒的血清学特性、分子生物学特性和生物学特性是检疫鉴定的主要依据。

其他资料参见附录 A。

4 仪器设备、用具及试剂

4.1 仪器设备

酶联检测仪、天平(感量,1/10 000 g)、pH 计、微量榨汁机、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、隔离温室、恒温水浴、低温冰箱等。

微量移液器(2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、酶联板、研钵、eppendorf 管、花盆、消毒土等。

4.2 试剂

酶联免疫吸附测定试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)。

5 样品制备

抽样按照 SN/T 2122 的规定执行。

将马铃薯块茎种植在隔离温室中,于 25 $^{\circ}$ C 生长并进行症状观察。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。采集的叶片进行酶联免疫测定、RT-PCR 检测或生物学测定。

6 检测方法

6.1 酶联免疫吸附测定

见附录 B。

6.2 RT-PCR 检测

见附录 C。

6.3 生物学测定

见附录 D。

7 结果判定

酶联免疫吸附测定为阳性,RT-PCR 检测或生物学测定亦为阳性,可判定待检样品带有马铃薯 A 病毒。

8 样品保存

8.1 样品保存

经检验确定携带马铃薯 A 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。

8.2 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、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。酶联测定需有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测需有电泳结果图片,生物学测定需有鉴别寄主的症状照片。

附录 A
(资料性附录)
马铃薯 A 病毒相关资料

A.1 寄主范围

PVA 的自然寄主只有马铃薯(*Solanum tuberosum*)。

A.2 病害症状

初侵染和次生侵染症状无明显差异,有时可引起中度褪绿,黄或灰绿的不规则区域与深绿区域交织。斑驳区域形状不同,位于脉上和脉间。叶片常变亮,并有波状区,在日照充分的季节,其症状没有在冷凉气候下明显,有时甚至完全隐症。该病毒在田间的症状不明显,天气炎热、干旱季节,很难识别。

A.3 分布地区

日本、巴基斯坦、欧洲各国、美国、新西兰。

A.4 传播方式

汁液接种虽可传播病毒,但实际接种不易成功。马铃薯薯块可持久带毒。传毒介体蚜虫(*Aphis frangulae*、*A. nasturtii*、*Myzus persicae*)可作非持久传播。当毒源植物含有马铃薯 A 病毒时,介体蚜虫还可传播马铃薯奥古巴花叶病毒(*potato aucuba mosaic virus*)。

附录 B
(规范性附录)
双抗体夹心酶联免疫吸附测定

B.1 试材**B.1.1 酶联板的要求**

使用质量有保证厂商生产的酶联板。

B.1.2 包被抗体

特异性的马铃薯 A 病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的马铃薯 A 病毒抗体。

B.1.4 底物

对硝基苯磷酸二钠(*p*NPP)

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP(MW24 000~40 000)	20 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

4 °C 储存。

B.1.6 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)	0.2 g

蒸馏水定容至 1 L, 4 °C 储存。

B.1.7 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

蒸馏水定容至 1 L。

B.1.8 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
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

4 °C 储存。

B.1.9 底物(*p*NPP)缓冲液(pH9.8)

氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺	97 mL

溶于 800 mL 蒸馏水中,用盐酸(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 μ L/孔,加盖,37 °C 孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

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。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、阴性对照、阳性对照,100 μ L/孔,每一样品设一重复。加盖后于 4 °C 冰箱孵育过夜,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

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 μ L/孔,加盖,37 °C 孵育 4 h,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

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 μ L/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

在不同的时间内如 30 min、1 h、2 h、或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值,或用肉眼观察显色情况。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 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 值小于 0.15,当阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值小于 0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值大于 5~10;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 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值大于 2,判为阳性;样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值接近阈值,判为可疑样品,需重新做一次,或者任选 6.2 和 6.3 中的一种方法加以验证;样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值明显小于 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

C.1 试剂

C.1.1 提取液

Tris-HCl	0.1 mol/L, pH7.4
氯化镁(MgCl ₂)	2.5 mmol/L
无核酸酶的脱氧核酸酶 I	6 U

C.1.2 50×TAE

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

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

C.1.3 6×加样缓冲液

溴酚蓝	0.25%
蔗糖水溶液	40%(质量浓度)

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

马铃薯样品经液氮研磨,取 150 μL 样品液,加入 300 μL 提取液,37 °C 温育 10 min;加入 200 g 蛋白酶 K、1% SDS,混匀后 65 °C 温育 10 min;加入等体积酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),15 000 r/min 离心 10 min;上清液加 1 倍体积异丙醇,0.1 倍体积 3 mol/L 乙酸钠,-20 °C 过夜,4 °C 离心 15 min (12 000 r/min)沉淀 RNA;沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次,自然干燥,加入 100 μL(块茎)或 1 000 μL(叶片)无核酸酶的超纯水溶解,于-70 °C 下保存。

注:也可采用试剂盒提取。

C.2.2 RT-PCR 反应

C.2.2.1 引物

根据马铃薯 A 病毒 P1 基因序列设计特异性引物对:
PVA-FP;5'-GTTGGAGAATTCAAGATCCTGG-3'
PVA-RP;5'-TTTCTCTGCCACCTCATCG-3'。

C.2.2.2 cDNA 合成

按下列组分(见表 C.1)制备 RT 反应混合液 20 μL。反应条件:25 °C 温育 20 min,42 °C 反转录 1.5 h,95 °C 灭活 2 min~3 min。

表 C.1

试剂名称	浓度
核酸	1.0 μL
Tris-HCl(pH8.3)	50 mmol/L
氯化钾(KCl)	75 mmol/L

表 C.1 (续)

试剂名称	浓度
DTT	10 mmol/L
氯化镁(MgCl ₂)	3.0 mmol/L
dNTP	0.5 μmol/L
RNasin	20 U
PVA-RP 引物	0.3 mol/L
M-MLV 反转录酶	200 U

C.2.2.3 在冰上依次将下列组分(见表 C.2)加入 PCR 反应管中。充分混匀后进行下列热循环:94 °C 变性 1 min,60 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 10 min。

表 C.2

试剂名称	浓度
RT prep	5 μL
特异性引物对	0.3 mol/L
Tris-HCl(pH8.3)	10 mmol/L
KCl	50 mmol/L
MgCl ₂	1.5 mmol/L
dNTP	200 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	1.25 U
加水至	50 μL

C.2.3 琼脂糖电泳

C.2.3.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5%(质量浓度)配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 °C 左右。

C.2.3.2 加溴化乙锭

加入溴化乙锭浓度为 0.5 μg/mL,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插上样品梳。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 TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

C.2.3.3 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 分子量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统观察并保留结果。

C.3 结果判断

C.3.1 阳性对照在 255 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

C.3.2 结果达到质控要求,且样品在 255 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
生物学测定

D.1 接种

病叶加 1 : 1(质量 : 体积)的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH7.2)于研钵中充分研碎,在待接种植物叶片表面均匀洒上硅藻土,用手指蘸取研磨好的汁液轻轻涂抹于叶片表面,自来水冲洗叶表。

D.2 寄主症状

鉴别寄主	症状表现	备注
马铃薯 A6(<i>Solanum demissum</i> × <i>S. tuberosum</i> cv. Aquila)(离体叶片)	黑色星状小斑点。	18 ℃, 1 000 lx
直房丛生番茄(<i>Lycopersicon pimpinelli folium</i>)	局部和系统枯斑	
大千生(<i>Nicandra physalodes</i>)	系统斑驳坏死	
普通烟(白勒烟)(<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley)	明脉、脉带	
普通烟(Samsun)(<i>N. tabacum</i> cv. Samsun)	明脉、弥散状斑驳	