



中华人民共和国国家标准

GB/T 28063—2011

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of bean pod mottle 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、沈建国、郑耘、陈青、林石明、陈红运、黄莲英、吴媛。

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血清学和分子生物学的检测鉴定方法。

本标准适用于可能携带该病毒的豆科作物的种子、苗木等植物繁殖材料的检测鉴定,也适用于传播该病毒介体昆虫的检测鉴定。

2 菜豆荚斑驳病毒基本信息

中文名:菜豆荚斑驳病毒。

英文名:bean pod mottle virus。

异名:bean pod mottle comovirus(菜豆荚斑驳病毒),pod mottle virus(荚斑驳病毒),desmodium virus(金钱草病毒)。

英文缩写:BPMV。

属豇豆花叶病毒科 Comoviridae、豇豆花叶病毒属 *Comovirus*。

菜豆荚斑驳病毒的其他信息参见附录 A。

3 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)、反转录和体外 DNA 扩增技术的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行检测鉴定。

4 主要仪器设备

本标准的检测鉴定方法主要使用以下仪器设备:

微量榨汁机、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、PCR 仪、荧光 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 计和各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、2 μ L)。

5 检测样品的制备

5.1 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测样品的制备

对每批送检样品进行症状检查,优先选取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。

种子样品:称取 0.5 g~1.0 g 的种皮作为检测样品,在液氮中充分研磨,回温后按 1:10 比例加入样品提取缓冲液继续研磨。

叶片样品:称取 0.5 g~1.0 g 的叶片作为检测样品,在研钵中研磨或在液氮中研磨,按 1:10 比例加入样品提取缓冲液继续研磨。

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(见附录 B)和 IC-RT-PCR(见附录 C)检测提取液。

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

5.2 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,利用 TRIzol 方法提取 RNA。(见附录 D 中的 D.3)

6 检测与鉴定

6.1 检测鉴定流程

通常,初筛时采用 DAS-ELISA 检测方法。当 DAS-ELISA 产生阳性结果时,再采用 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 等方法进行验证。

当首先采用 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 方法检测时,如果产生阳性结果,则通过实时荧光 RT-PCR 方法或序列测定等方法验证。

6.2 DAS-ELISA 检测

把制备的样品上清液加入已包被 BPMV 抗体的在 96 微孔板中,进行 DAS-ELISA 检测,每个样品平行加到两个孔中。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。

6.3 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。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,用超纯水作空白对照。

具体操作过程见附录 D。

6.4 IC-RT-PCR 检测

把制备的样品上清液加入已包被 BPMV 抗体的离心管中,然后进行 RT-PCR 扩增。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,用超纯水作空白对照。

具体操作过程见附录 C。

6.5 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翻译成氨基酸后与已知的 BPMV 相应序列进行比对,如果与已知的 BPMV 相应序列同源性大于 75%则判定为 BPMV 序列,同源性小于 75%则判定为非 BPMV 序列。

注:序列比对可利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行,网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

7 结果判定与报告

7.1 结果判定

当产生以下检测结果时,则判定为检出 BPMV:

——当 DAS-ELISA 检测、IC-RT-PCR(或 RT-PCR)检测、其中两种方法的检测结果呈阳性时,则判定为检出 BPMV;

——当 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果呈阳性,测定的序列为 BPMV 序列时,则判定为检出 BPMV。

7.2 结果记录与保存

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。DAS-ELISA 检测结果保存吸光值的数据报告,IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果保存电泳照片,序列测定结果保存测序报告图。

附 录 A
(资料性附录)
菜豆荚斑驳病毒简介

A.1 分布地区

北美洲:美国、加拿大。

南美洲:巴西、厄瓜多尔、秘鲁。

亚洲:伊朗。

A.2 形态特征

病毒粒子形态为等轴对称二十面体,无包膜,直径为 28 nm。

A.3 寄主范围及症状

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。

在鉴别寄主植物上的症状:

大豆(*Glycine 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。在种子上产生褐色、黑色的斑驳症状,症状从种脐开始,因而称为“种脐渗色”。

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、豆荚变短、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%。

A.5 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。

A.6 分子生物学特性

BPMV 是正链 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。

A.7 豇豆花叶病毒属种间区分依据

A.7.1 大外壳蛋白(Large coat protein, LCP)的氨基酸序列同源性小于 75%。

A.7.2 聚合蛋白酶的氨基酸序列同源性小于 75%。

A.7.3 在可能的成分间没有假重组。

A.7.4 抗原反应有差异。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测操作步骤

B.1 DAS-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 蒸馏水溶解,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 蒸馏水溶解,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 (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。

B.1.6 底物缓冲液

二乙醇胺 97 mL

蒸馏水 600 mL

叠氮化钠(NaN_3) 0.2 g

用 HCl 调整 pH 至 9.8,然后加 H_2O 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 包被抗体、碱性磷酸酶标记的 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 $^{\circ}\text{C}$ 下包被过夜。

B.2.2 捕获抗原

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,每个样品至少两个孔。并设置阳性和阴性对照。在室温下孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 酶标抗体溶液。在室温下孵育 2 h。

B.2.4 加底物

用底物缓冲液把对硝基苯磷酸二钠盐(p-Nitrophenyl Phosphate, pNPP)配制成 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 μL 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。

B.2.5 吸光值的测定

用酶标仪在 405 nm 处读取吸光值。

B.2.6 结果判定

通过酶标仪上 405 nm 的 OD 值来判定。

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。阳性对照有明显的颜色反应;孔的重复性基本一致。在满足了该要求后,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} 值明显 < 2 ,判为阴性;
- 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。

附 录 C
(规范性附录)
IC-RT-PCR 检测操作步骤

C.1 主要试剂

BPMV 抗体、包被缓冲液和 PBST 试剂见 B.1; RT-PCR 试剂见 D.1。

C.2 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),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。

C.3 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。

C.4 cDNA 合成

在上述离心管中加入 1 μL 的 BPM4 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-MLV 反转录酶 0.5 μL 、RNase Inhibitor 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。

C.5 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中:2.5 μL 的 10 $\times$ PCR buffer(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺),dNTP(每种各 10 mmol/L) 0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.5 μL ,BPM3 和 BPM4 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL (引物见表 D.1),加入上述 DNA 模板 10 μL ,ddH₂O 补足体积。

与 D.5 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。

C.6 结果判定

阴性对照和空白对照没有产生条带、阳性对照产生预期大小(约 228 bp)的条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品未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)
RT-PCR 检测操作步骤

D.1 主要试剂

D.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol reagent、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

D.1.2 反转录试剂

M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L)、5 $\times$ 反应缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl pH8.3 25 $^{\circ}$ C、375 mmol/L KCl、15 mmol/L $MgCl_2$ 、50 mmol/L DTT)、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、RNase Inhibitor (40 U/ μ L)。

D.1.3 PCR 试剂

10 $\times$ PCR 缓冲液(含 15 mmol/L 的 Mg^{2+})、Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)。

D.2 引物序列

本方法的特异性引物序列见表 D.1。其中 BPM3 为正向引物,BPM4 为反向引物,扩增区域在大外壳蛋白基因上,扩增大小为 228 bp。引物由生物公司合成与纯化。

表 D.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
BPM3	5'-CATAGCATTTGGAAATTTGGCTG-3'	2 587~2 609
BPM4	5'-TCACCTGGTATTGTRGACAC-3' ^b	2 795~2 814
注:也可以采用根据 BPMV 基因组序列合成的其他特异性引物。		
^a 在 GenBank 上的基因序列登录号。		
^b 序列中的 R=G 或 A。		

D.3 总 RNA 的提取

取 0.05 g~0.1 g 样品,加入 1 mL TRIzol reagent 充分研磨,室温放置 5 min;12 000 g 离心 5 min,取上清液到另一离心管中;加入三氯甲烷 200 μ L,充分振荡 15 s,室温放置 3 min;12 000 g,4 $^{\circ}$ C 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;12 000 g,4 $^{\circ}$ C,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 μ L 溶解即可。

注:本方法是根据 TRIzol reagent 方法提取总 RNA,在保证总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他总 RNA 提取方法。

D.4 cDNA 合成

在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 BPM4 引物(10 $\mu\text{mol/L}$),于 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 7 min,然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μL 、dNTP 混合物(10 mmol/L) 0.5 μL 、M-MLV 反转录酶(200 U/ μL) 0.5 μL 、RNase Inhibitor 0.5 μL 、经 DEPC 处理的 ddH₂O 4.5 μL 。然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,自然冷却至室温,−20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

D.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 、BPM3 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL 、BPM4 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。

D.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。

D.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生条带、阳性对照产生预期大小(约 228 bp)的条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品未出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。