



中华人民共和国国家标准

GB/T 31806—2015

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato virus V*

2015-07-03 发布

2015-11-27 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李桂芬、李旻、马洁、鲁洁、张永江、孔君、魏梅生。

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中马铃薯 V 病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于马铃薯块茎、组培苗等繁殖材料中马铃薯 V 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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 仪器设备及试剂

3.1 仪器设备

酶标仪、天平(感量 1/10 000 g)、pH 计、微量榨汁机、PCR 仪、实时荧光 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 μL , 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL , 1 000 μL)、酶联板、研钵、离心管、花盆、灭菌土等。

3.2 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, 实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 D, 生物学测定试剂参见附录 E。

4 抽样与样品制备

4.1 抽样

抽样按照 SN/T 2122 的规定进行。

4.2 马铃薯块茎样品的制备

将马铃薯块茎播于灭菌土中,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 生长并进行症状观察。待长出约 10 片叶后将表现症状的植株编号,未表现症状的植株分组(10 株为一组)并编号。采集叶片用于酶联免疫测定、RT-PCR 检测、实时荧光 RT-PCR 检测及生物学测定。

4.3 组培苗样品制备

将每瓶组培苗中的每个植株都进行采样,每瓶组培苗所采样品作为一个加样样品用于酶联免疫测定、RT-PCR 检测、实时荧光 RT-PCR 检测及生物学测定。

5 检测方法

5.1 酶联免疫吸附测定

见附录 B。

5.2 RT-PCR 检测

见附录 C。

5.3 实时荧光 RT-PCR 检测方法

见附录 D。

5.4 生物学测定

参见附录 E。

6 结果判定

样品经酶联免疫吸附测定为阴性或 RT-PCR 检测为阴性或实时荧光 RT-PCR 检测为阴性,判断待检样品不携带马铃薯 V 病毒。

样品经酶联免疫吸附测定为阳性,RT-PCR 检测或实时荧光 RT-PCR 检测为阳性,即可判断待检样品携带马铃薯 V 病毒。必要时可进行生物学测定。

7 样品保存与结果记录

7.1 样品保存

经检测确定携带马铃薯 V 病毒的样品应在合适的条件下保存,块茎可在 4 ℃ 保存 6 个月,组培苗可在 -20 ℃ 或 -80 ℃ 冰箱中保存 1 年,做好标记和登记工作。

7.2 结果记录

完整的记录包括:样品的来源、时间、地点、方法和结果等,并应有经手人和实验人员的签字。酶联测定应有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测应有电泳结果图片,实时荧光 RT-PCR 检测应有反应原始数据,生物学测定应有鉴别寄主的症状照片。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯 V 病毒相关资料

A.1 背景资料

A.1.1 基本信息

学名: *Potato virus V*, 缩写: PVV。

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

A.1.2 方法原理

根据马铃薯 V 病毒与抗体之间的特异性反应, 对植物样品进行 ELISA 检测; 根据该病毒核酸的序列进行 PCR 特异性检测, 通过电泳条带大小进行结果判定; 根据该病毒核酸序列设计特异性引物和荧光探针, 通过检测的荧光信号进行结果判定。条件允许的情况下, 根据马铃薯 V 病毒侵染寄主的症状特点, 进行生物学检测。

A.2 寄主范围

马铃薯 V 病毒自然侵染仅限马铃薯。

A.3 病害症状

侵染的植株叶片灰白, 新生叶变小, 轻度扭曲, 可能发展为花叶和坏死斑。

A.4 分布地区

分布于秘鲁、法国、荷兰和英国。

A.5 传播方式

蚜虫传播, 传播马铃薯 V 病毒的蚜虫种类为 *Myzus persicae*、*Brachycaudus helichrysi*、*Macrosiphum euphorbiae*、*Rhopalosiphoninus latysiphon*。

A.6 粒体形态

线状粒体, 直径 11 nm~13 nm, 主体长度为 760 nm。

附 录 B
(规范性附录)
酶联免疫吸附测定

B.1 试剂**B.1.1 抗体**

DAS-ELISA 方法:包被抗体为多克隆抗体,检测抗体为多克隆抗体(酶标抗体)。

B.1.2 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.3 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
叠氮钠(NaN_3)	0.20 g

蒸馏水定容至 1 L, 4 ℃ 储存。

B.1.4 PBST 缓冲液(pH 7.4)

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
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g

蒸馏水定容至 1 L。

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
叠氮钠(NaN_3)	0.20 g

4 ℃ 储存。

B.1.6 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
BSA(牛血清白蛋白)	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g

4 ℃ 储存。

B.1.7 底物缓冲液(pH 9.8)

二乙醇胺 97 mL

氯化镁(MgCl_2) 0.1 g

叠氮钠(NaN_3) 0.2 g

溶于 800 mL 蒸馏水,用盐酸调 pH 值至 9.8,然后用蒸馏水定容至 1 L。4 ℃ 储存。

B.2 试验步骤**B.2.1 包被抗体**

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 ℃ 孵育 2 h。清空孔中溶液,用 PBST 加满各孔,3 min 后倒掉孔中溶液,在吸水纸上拍干。再重复 2 次上述洗板过程。

B.2.2 样品制备与加样

待测样品按 1:10(质量:体积)加入抽提缓冲液,在研钵中研磨,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、阳性对照作相应处理或按说明书进行。加入制备好的检测样品、阴性对照、阳性对照,100 μL /孔,酶联板加盖或用保鲜膜包好,放在 4 ℃ 孵育过夜。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.3 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 μL /孔,酶联板加盖或用保鲜膜包好,37 ℃,4 h。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.4 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),100 μL /孔加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.5 读数

在不同的时间内如 30 min、60 min、90 min、120 min 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值。

B.3 结果判定

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 OD_{405} 值 / 阴性对照 OD_{405} 值 > 5 ;同一样品的重复性基本一致。

在满足了上述的质量要求后,结果原则上可判断如下:样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 > 2 ,判为阳性;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值在 2 左右,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 < 2 ,判为阴性。

若满足不了上述的质量要求,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 核酸提取试剂

核酸提取试剂为 TRIzol 试剂。

C.1.2 50×TAE

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	52.1 mL
乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2H ₂ O)	37.2 g

加蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

C.1.3 6×加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝;
40%(质量分数)蔗糖水溶液。

C.2 试验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

取 0.1 g 样品,加入 1 mL TRIzol 试剂充分研磨,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 500 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,加入等体积异丙醇;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。

C.2.2 引物序列

根据马铃薯 V 病毒的 CP 基因序列(GeneBank 序列号:X61279.1)设计引物对如下:
PVV-CP-F:5'-CGT ATG AAG TCA GAC ATC AAG CAA A-3'(位置 1 219 nt~1 243 nt)
PVV-CP-R:5'-AAA GCT AGT ACG AAG AAA AGC CAA AC-3'(位置 2 107 nt~2 132 nt)
预期扩增大小为 914 bp。

C.2.3 反转录

反转录体系 20 μ L。DEPC-H₂O 10 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,20 μ mol/L 下游引物 2 μ L,RNA 模板 1 μ L,70 $^{\circ}$ C 反应 5 min,冰上放置 5 min,加入反转录酶 5 倍缓冲液 4 μ L,200 U/ μ L 反转录酶 1 μ L,40 U/ μ L RNA 酶抑制剂 1 μ L,42 $^{\circ}$ C 反应 1 h。

C.2.4 PCR 扩增

反应体系 20 μ L。上述反转录产物 2 μ L,10 倍 PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)2 μ L,10 mmol/L dNTP

0.5 μL ,上游引物 0.5 μL ,下游引物 0.5 μL ,2 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 1 μL 和 DEPC 水 13.5 μL 。检测时以含 PVV 的植物材料的 DNA 或含有 PVV 目标片段的质粒作为阳性对照,以健康植物材料作为阴性对照,以水代替 DNA 模板作为空白对照。

反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

C.2.5 琼脂糖凝胶检测

用 1 $\times$ TAE 配制 1%琼脂糖凝胶,加热溶化后冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右。将凝胶倒入凝胶槽中,插上样品梳子。冷却凝固后拔掉梳子,在电泳槽内加入 1 $\times$ TAE,缓冲液要没过凝胶表面约 1 mm。

将加样缓冲液与样品混合后加入样品孔,同时设计 PCR 的阴性对照和阳性对照,并加入 DNA 相对分子质量标准物。接通电源,以 3 V/cm~5 V/cm 电场强度进行电泳,0.5 h 后观察结果。

电泳结束后,将凝胶放入 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭(EB)染色液中染色 10 min~15 min。将整个凝胶置于凝胶成像系统上观察,记录结果。

C.3 结果判定

阳性对照在 914 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。

阳性对照在 914 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,且待测样品在 914 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 D

(规范性附录)

实时荧光 RT-PCR 检测方法

D.1 主要试剂

D.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

D.1.2 实时荧光 RT-PCR 试剂

TaqMan One-step RT-PCR Mixture。

D.2 引物探针

根据马铃薯 V 病毒的 CP 基因序列(GeneBank 序列号:X61279.1)设计引物对如下:

PVV-F:5'-CGGTATGGTTTGGTGAGAAATTTGC-3' (位置 1 800 nt~1 824 nt)

PVV-R:5'-ACCATCCAATCCAAACAAGCGAGT-3' (位置 1 941 nt~1 964 nt)

PVV-Probe:5'-FAM-TCCCGCACATCCGTCCGAGCAC-TAMRA-3' (位置 1 872 nt~1 893 nt)

D.3 核酸提取

取 0.1 g 样品,加入 1 mL TRIzol 试剂充分研磨,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 500 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,加入等体积异丙醇;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。

D.4 实时荧光 RT-PCR 反应

反应体系:0.2 mL 离心管中加入 2 $\times$ One Step RT-PCR 缓冲液 III 10 μ L,Ex TaqHS(5 U/ μ L) 0.4 μ L,PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L,PVV-F(10 μ mol/L)0.4 μ L,PVV-R(10 μ mol/L) 0.4 μ L,PVV-Probe(10 μ mol/L)0.6 μ L,ROX Reference Dye II 0.4 μ L,模板 RNA 2 μ L,补 DEPC-H₂O 至 20 μ L。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:42 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40 循环。

PCR 反应体系中各种试剂的量可根据具体情况进行适当调整,也可采用商业化试剂盒。

D.5 结果判定

在阳性对照 Ct 值小于 30,空白对照 Ct 值等于 40 的条件下(若不满足该两项条件,此次检测无效,应重做荧光 PCR 扩增):

a) 待测样品的 Ct 值为 40 时,判定待测样品为 PVV 阴性。

- b) 待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,判定待测样品为 PVV 阳性。
- c) 待测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,应重新进行测试;如果重新测试的 Ct 值为 40 时,判定 PVV 阴性;如果重新测试的 Ct 值小于 40,则判定 PVV 阳性。

附 录 E
(资料性附录)
生物学测定

E.1 试材

E.1.1 鉴别寄主

心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、克利夫兰烟(*N. clevelandii*)、本生烟(*N. benthamiana*)、德氏烟(*N. debneyi*)、白肋烟(*N. tabacum* cv. White Burley)。

接种叶龄:5~8片叶。

E.1.2 试剂

0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 8.0)。

E.2 方法

E.2.1 研磨

病样加 1:5(质量:体积)的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0),在研钵中研碎。研碎后放入硅藻土或金刚砂,浓度为 0.5%,与病汁液混匀。

E.2.2 接种

用手将病汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶表面。

E.2.3 冲洗

用自来水冲洗叶表面。

E.2.4 观察

每天观察记载寄主反应,连续观察 1 个月。

E.3 鉴别寄主症状

E.3.1 心叶烟:系统症状为明脉和花叶。

E.3.2 克利夫兰烟:系统花叶症状。

E.3.3 本生烟:顶部茎萎蔫和系统花叶症状。

E.3.4 德氏烟:接种叶症状为褪绿斑,系统症状为明脉、花叶、褪绿斑、褪绿环。

E.3.5 白肋烟:系统症状为明脉和花叶。
