



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2627—2010

马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of potato leafroll virus for quarantine

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：中华人民共和国四川出入境检验检疫局、四川省农业厅植物检疫站、四川农业大学。

本标准主要起草人：孟兴、宁红、张洪峰、张敏、谭家兴、郭迪金、吴婕。

马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中马铃薯卷叶病毒检测鉴定的程序。

本标准适用于马铃薯块茎、种苗等茄科植物感染马铃薯卷叶病毒的检验和鉴定。

2 原理

马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)。属马铃薯黄症病毒科,马铃薯卷叶病毒属。病毒粒体球状,粒体直径 23 nm~25 nm,是等轴对称病毒。致死温度 70 ℃,稀释限点约 10^{-4} 。引起马铃薯卷叶病毒病。马铃薯病毒病一般根据病害症状很难确定病毒种类,采用免疫学和分子生物学方法,可快速根据有关判断标准进行马铃薯卷叶病毒检疫鉴定。

3 试剂与材料

除非另有说明,在本标准中仅使用确认的分析纯试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

3.1 免疫学检验试剂

3.1.1 捕捉抗体(Capture antibody)马铃薯卷叶病毒免疫球蛋白,抗体稀释度按市售产品要求进行。储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.2 酶标抗体(Alkaline phosphatase enzyme conjugate):用碱性磷酸酶标记的马铃薯卷叶病毒的免疫球蛋白抗体。按市售产品要求进行稀释,储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.3 包被缓冲液(Coating buffer):取 2.93 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)、1.59 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、0.2 g 叠氮化钠(NaN_3),用 1 000 mL 蒸馏水溶解,并调 pH 值到 9.6,储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.4 洗涤液(PBST Buffer):取 1.15 g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.2 g 氯化钾(KCl)、0.2 g 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.5 g 吐温-20,用 1 000 mL 蒸馏水溶解,并调整 pH 值到 7.4。

3.1.5 样品提取液(GEB buffer):取 1.3 g 无水硫酸钠(Na_2SO_4)、20.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_{24\sim 40000}]$ 、0.2 g 叠氮化钠(NaN_3)、2.0 g II 级鸡蛋清白蛋白粉、20.0 g 吐温-20,用 1 000 mL 洗涤液溶解,并调整 pH 值到 7.4,储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.6 酶标抗体稀释缓冲液(ECI Buffer):取 0.2 g 牛血清白蛋白(或脱脂奶粉)、2.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n]$ 、0.02 g 叠氮化钠(NaN_3),用 100 mL 洗涤缓冲液溶解,并调整 pH 值到 7.4,储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.7 底物缓冲液(PNP Buffer):用 80 mL 灭菌蒸馏水将 0.01 g 氯化镁(MgCl_2)、0.02 g 叠氮化钠(NaN_3)、9.7 mL 二乙醇胺($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)溶解后,用盐酸调 pH 值到 9.8,定容到 100 mL,储藏于 4 ℃ 条件下备用。

3.1.8 底物溶液(PNP substate):将 5 mg 对硝基苯磷酸盐($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$)溶解于 5 mL 底物缓冲液中。底物溶液制备需在孵育结束前 15 min 内,避光条件下制备。

3.1.9 终止液:12 g 氢氧化钠(NaOH)溶于 100 mL 蒸馏水。

3.2 RT-PCR 检验试剂

- 3.2.1 莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(MMLV):100 U/ μ L。
- 3.2.2 1×TAE 缓冲液:40 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L 乙酸钠,2 mmol/L EDTA(用冰乙酸调 pH 至 8.0)。
- 3.2.3 5×RT 缓冲液(5×RT Buffer):50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,100 mmol/L 氯化钠,0.1 mmol/L EDTA,10 mmol/L DTT,0.01% NP-40,50% 甘油。
- 3.2.4 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl (pH8.3),500 mmol/L 氯化钾。
- 3.2.5 氯化镁:25 mmol/L。
- 3.2.6 RNA 酶抑制剂(RNasin):10 U/ μ L。
- 3.2.7 RT 增强剂(RT Enhancer)。
- 3.2.8 无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)。
- 3.2.9 RL 裂解液。
- 3.2.10 去蛋白液。
- 3.2.11 *Taq* 酶:2.5 U/ μ L。
- 3.2.12 dNTP Mixture 10 mmol/L。
- 3.2.13 漂洗液。
- 3.2.14 双蒸水(ddH_2O)。
- 3.2.15 2-巯基乙醇(MCE) $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ 。
- 3.2.16 液氮(N_2)。
- 3.2.17 引物:上游引物(P1)碱基序列:5'-AGGCGCGCTAACAGAGTTCA-3',下游引物(P2)碱基序列:5'-CTTGAATGCCGACAGTCTG-3',用双蒸水稀释至 20 μ mol/L。
- 3.2.18 100 bp DNA ladder ($\leq 1\ 500$ bp)。
- 3.2.19 溴酚蓝($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)。
- 3.2.20 琼脂糖凝胶:称取 1.5 g 琼脂糖缓缓倒入 250 mL 三角瓶内,加入 100 mL 1×TAE,在微波炉中加热 1 min 溶解后,再加入 5 μ L Goldview 的生物染料,倒入调平并安放适当梳齿的制胶板上,冷凝后小心拔出梳齿。

4 仪器及用具

- 4.1 聚乙烯微量滴定板:根据样品数量选用 40 孔和 96 孔两种规格。
- 4.2 微量可调进样器:2 μ L~10 μ L、10 μ L~50 μ L、10 μ L~200 μ L、200 μ L~1 000 μ L 和 1 mL~5 mL 五种规格及配套吸头。
- 4.3 天平 1/100 g,1/1 000 g。
- 4.4 培养箱。
- 4.5 台式高速离心机。
- 4.6 酶联免疫检测仪。
- 4.7 水平电泳仪。
- 4.8 凝胶成像系统。
- 4.9 PCR 扩增仪。
- 4.10 EP 管。
- 4.11 研钵:内径 60 mm~80 mm。
- 4.12 剪刀。

- 4.13 冰箱。
- 4.14 过滤柱:CS 过滤柱,CR 吸附柱。
- 4.15 涡旋混匀器。

5 检测与鉴定

在实施检疫时,应仔细检查马铃薯块茎、种苗有无病变症状,如发现块茎横切面有网状坏死,或马铃薯萌发后产生纤细芽,或植株叶片呈褪绿、卷叶,背面变为紫红色及是否有矮小黄化植株等症状,应取样送实验室作进一步鉴定。

6 实验室检验

6.1 DAS-ELISA

检验方法见附录 A。如采用认可的试剂盒,按说明操作。

6.2 RT-PCR

样品的制备与检验方法见附录 B。如采用认可的试剂盒,按说明操作。

7 结果判定

7.1 DAS-ELISA

在阴性对照 OD 值 ≤ 0.1 ,且阳性对照 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍的前提下,样品孔 OD 值大于阴性对照 OD 值 2 倍时,判定为阳性反应,即样品带 PLRV;否则判定为阴性反应,即样品不带 PLRV。

7.2 RT-PCR

在阴性对照无扩增条带,且阳性对照出现 222 bp 目标条带的前提下,样品 RT-PCR 产物电泳结果在 222 bp 处出现目标条带,判定为阳性反应,即样品带 PLRV;否则判定为阴性反应,即样品不带 PLRV。

8 样品保存

经检疫鉴定后的样品,应在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}\sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月,以备复验、谈判和仲裁,保存期满后,需进行灭活处理。

附录 A

(规范性附录)

马铃薯卷叶病毒 DAS-ELISA 检验程序

A.1 包被抗体

A.1.1 包被

向酶联反应板每孔加入 100 μL 用包被缓冲液稀释的捕捉抗体,将酶联反应板置于保湿容器中,室温孵育 4 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

A.1.2 洗板

向每个反应孔中加入 200 μL 洗涤液,迅速倒出,重复 2 次。洗板完成后将酶联板倒置于吸水纸上,吸干反应孔中残留液体。

A.2 点样

A.2.1 样品制备

将待测样品剪碎,取 0.3 g 于研钵中,加入 1 mL 样品提取液充分研磨后,再加入 2 mL 样品提取液充分研磨至均匀。剩余样品于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备查,在制样时应注意防止样品的交叉污染。

A.2.2 点样

用微量进样器将制备好的样品加入酶联反应板孔内,每个样品 3 次重复,每孔 100 μL 。设置阳性对照、马铃薯健康组织研磨液阴性对照和包被缓冲液空白对照。加样完成后将酶联反应板置于保湿容器中,室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 12 h。

A.2.3 洗板

在每个反应孔加满洗涤液,迅速倒出,再加满洗涤液,静置 3 min 后将洗涤液迅速倒出。重复 3 次。洗板完成后将酶联板倒置于吸水纸上,吸干反应孔中残留液体。

A.3 结合酶标抗体

A.3.1 加酶标抗体

向酶联反应板每孔加入 100 μL 用酶标抗体稀释缓冲液按比例稀释的酶标抗体溶液。置于保湿容器中室温孵育 2 h。

A.3.2 洗板

同 A.2.3。

A.4 显色

每孔加入 100 μL 底物溶液。25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min~60 min,至阳性对照显色。

A.5 终止反应

显色后在每孔中加入 50 μL 终止液。记录检测结果,存档备查。

A.6 结果测定和记录

用酶联检测仪测定并记录光密度值(OD 值)。

附录 B

(规范性附录)

马铃薯卷叶病毒的 RT-PCR 检验程序

B.1 PLRV 模板 RNA 的制备

采用 TIANGEN RNAprep Plant Kit 试剂盒¹⁾提取马铃薯卷叶病毒 RNA。称取 50 mg~100 mg 的马铃薯叶片或茎秆(薯块需经发芽后切取幼芽),在液氮中迅速研磨成粉末状,转移粉末至预冷的 1.5 mL 的 EP 管中,加入 500 μ L 的 RL 裂解液(使用前按 RL 裂解液 1 mL,加入 2-巯基乙醇 10 μ L),涡旋剧烈振荡 5 min 使其混匀。将匀浆液转移至 CS 过滤柱上,12 000 r/min 离心 2 min~5 min,小心吸取上清液至无 RNA 酶(RNase-free)的离心管中,吸头尽量避免接触收集管中的细胞碎片沉淀。缓慢加入上清 0.5 倍体积无水乙醇,混匀,得到的溶液和沉淀一起转入 CR 吸附柱中,12 000 r/min 离心 1 min,弃掉收集管中的废液,将吸附柱放回收集管中。向吸附柱 CR 中加入 700 μ L 去蛋白液 RW1,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液,将吸附柱放回收集管中。向吸附柱 CR 中加入 500 μ L 漂洗液 RW,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液,将吸附柱放回收集管中,重复漂洗一次。漂洗完后,将吸附柱在 12 000 r/min 离心 2 min,去除残余液体,并在室温下放置片刻。将吸附柱放入一个新的 RNase-free 离心管中,向膜中央加入 50 μ L~100 μ L 无 RNA 酶的双蒸水,室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 2 min,得到 RNA 溶液。

B.2 RT-PCR 扩增

B.2.1 反转录

B.2.1.1 反应体系

RT 反应体系见表 B.1。

表 B.1 马铃薯卷叶病毒 RT 反应体系

反应物	模板 RNA	P2	RNasin	RT Enhancer	5 $\times$ RT buffer	dNTP	MMLV	无 RNA 酶的 ddH ₂ O
加入量/ μ L	2.5	0.5	0.5	0.5	4	1	0.5	10.5

B.2.1.2 程序

反转录程序为:42 $^{\circ}$ C,50 min;94 $^{\circ}$ C,5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

B.2.2 PCR 反应

B.2.2.1 反应体系

PCR 反应体系见表 B.2。

1) 给出该试剂盒信息是为了方便标准使用者,如果等效产品具有相同效果,则可使用这些等效产品。

表 B.2 PCR 反应体系

反应物	10×PCR Buffer	dNTP	P1	P2	cDNA	<i>Taq</i> DNA 聚合酶	氯化镁	无 RNA 酶的 ddH ₂ O
加入量/ μ L	2.5	0.5	1	1	4	0.5	1.5	14

B.2.2.2 反应程序

反应程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,30 次循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。

B.3 扩增产物检测

B.3.1 琼脂糖凝胶电泳

将制胶板同制好的琼脂糖凝胶一放入水平电泳槽,取 5 μ L 扩增反应物加 0.5 μ L 的溴酚蓝上样缓冲液混匀后,小心点入样孔内。电泳缓冲液 1×TAE 适量,100 V,电泳 30 min。

B.3.2 结果观察和记录

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,放入凝胶成像系统中,观察并记录 DNA 条带有无和片段大小。
