

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.3—2016

代替 SN/T 1135.3—2003

马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato mop-top virus*

2016-12-12 发布

2017-07-01 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

SN/T 1135 系列标准共分为 13 部分:

- 第 1 部分:马铃薯癌肿病检疫鉴定方法;
- 第 2 部分:马铃薯黄化矮缩病毒检疫鉴定方法;
- 第 3 部分:马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法;
- 第 4 部分:马铃薯黑粉病菌检疫鉴定方法;
- 第 5 部分:马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法;
- 第 6 部分:马铃薯维腐病菌检疫鉴定方法;
- 第 7 部分:马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法;
- 第 8 部分:马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法;
- 第 9 部分:马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法;
- 第 10 部分:马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法;
- 第 11 部分:马铃薯皮斑病菌检疫鉴定方法;
- 第 12 部分:马铃薯 M 病毒检疫鉴定方法;
- 第 13 部分:马铃薯 Y 病毒检疫鉴定方法。

本部分为 SN/T 1135 的第 3 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 1135.3—2003《马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法》。

本部分与 SN/T 1135.3—2003 相比,主要技术性差异如下:

- 删除了“引言”;
- 删除了“术语和定义”一章;
- 增加了“马铃薯帚顶病毒基本信息”一章;
- 删除了“现场检疫与抽样”一章;
- 增加了“检测方法”一节;
- 修改了 RT-PCR 检测方法。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布结构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人:李明福、张永江、丁小兰、相宁、李桂芬、魏梅生、陈枝楠、黄文胜、张成良。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1135.3—2003。

马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本部分规定了马铃薯帚顶病毒检疫鉴定的基本原则和方法。

本部分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帚顶病毒的检疫鉴定以及马铃薯帚顶病毒引起病害的田间调查。

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 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 马铃薯帚顶病毒基本信息

中文名:马铃薯帚顶病毒

学名:*Potato mop-top virus*

缩写:PMTV

分类地位:帚状病毒科(Virgaviridae)马铃薯帚顶病毒属(*Pomovirus*)。

马铃薯帚顶病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

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

5 仪器设备、用具及试剂

5.1 仪器设备

电子分析天平(0.000 1 g)、小型离心机、台式冷冻离心机、恒温水浴锅、酶标仪、普通 PCR 仪、电泳系统、pH 计、凝胶成像系统、4℃冰箱、超净工作台、-80℃超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、涡旋振荡器、微波炉、电子透射显微镜等。

5.2 用具

可调移液器(2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL、5 000 μL)及相应的无 RNase 吸头、无 RNase 离心管、PCR 管、研钵、样品袋、标签等。

5.3 试剂

有特殊说明除外,所有实验用试剂均为分析纯。

三抗体酶联免疫吸附测定试剂(见附录 B)、RT-PCR 检测试剂(见附录 C)。

6 样品制备

抽样按照 SN/T 2122 的规定进行。

将马铃薯块茎种植在隔离温室中,于 25 ℃ 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。采集的叶片进行三抗体酶联免疫吸附测定、RT-PCR、免疫电镜检测或生物学测定。

7 检测方法

7.1 三抗体酶联免疫吸附测定

见附录 B,其他有效的酶联免疫吸附测定检测方法可参照试剂说明书操作。

7.2 RT-PCR 检测

见附录 C。

7.3 免疫电镜检测

按照 SN/T 1840 中的方法进行电镜观察,参照附录 A 病毒粒体形态判定免疫电镜检测结果。

7.4 生物学测定

见附录 D。

8 结果判定

7.1、7.2、7.3 和 7.4 中的两种检测结果为阳性,即可判定检出马铃薯帚顶病毒。

9 样品保存与记录结果

9.1 样品保存

经检验确定携带马铃薯帚顶病毒的样品应在合适的条件下保存,马铃薯病薯块及叶片样品在-20 ℃ 或-80 ℃ 冰箱中保存,试管苗保存于组培室中,做好标记和登记工作。保存期满后,需经灭活处理。

9.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录要包括: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。三抗体酶联免疫吸附测定检测应有酶联板反应的原始数据,RT-PCR 检测应有电泳图片,免疫电镜检测应有病毒粒体照片,生物学测定应有鉴别寄主的症状照片。

附录 A

(资料性附录)

马铃薯帚顶病毒背景资料

A.1 寄主范围

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是它唯一重要的自然寄主。在人工接种的情况下还可侵染茄科、藜科的 26 种植物。

A.2 分布

亚洲:日本、中国台湾、以色列。

欧洲:爱尔兰、英国(苏格兰)、荷兰、芬兰、前捷克斯洛伐克、瑞典、丹麦和挪威。

南美洲:玻利维亚、秘鲁、智利。

A.3 病害症状

症状随季节的变化而不同,在马铃薯植株上一般表现为矮化(帚顶),叶片有褪绿和坏死的 V 型斑纹,薯块开裂,在较凉的环境下(15℃)薯块上有贝壳状的坏死层。

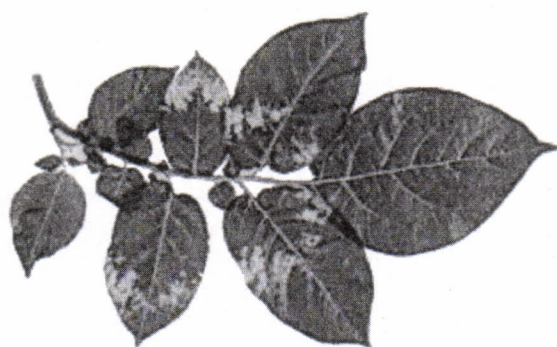


图 A.1 感染 PMTV 马铃薯植株

A.4 传播途径

主要靠土壤中的马铃薯粉痂菌 *Spongospora subterranea* 传播,汁液接种也能传毒。病薯块或组培苗可通过运输远距离传播。

A.5 粒体形态

马铃薯帚顶病毒粒子为直杆状,长度为 65 nm~80 nm、150 nm~160 nm 和 290 nm~310 nm,宽为 18 nm~20 nm。

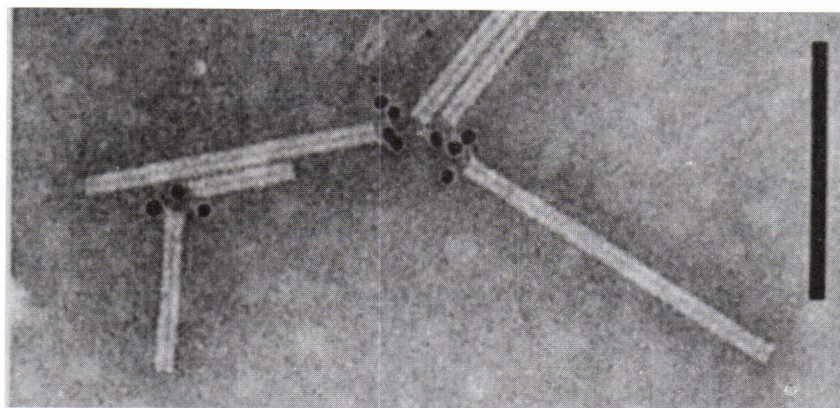


图 A.2 PMTV 病毒粒体

A.6 基因组特征

该病毒的基因组为三组分,正义单链 RNA,分别为 6.0 kb,3.0 kb~3.5 kb 和 2.5 kb~3.0 kb。

附 录 B

(规范性附录)

三抗体酶联免疫吸附测定(TAS-ELISA)

B.1 试剂

B.1.1 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
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

用蒸馏水溶解并定容至 1 L, 4 °C 储存。

B.1.2 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($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
氯化钾	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

用蒸馏水溶解并定容至 1 L。

B.1.3 样品抽提缓冲液

亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

用 PBST 缓冲液溶解并定容至 1 L, 4 °C 储存。

B.1.4 单克隆抗体稀释缓冲液/酶标抗体稀释缓冲液

小牛血清	0.2 g
PBST	100 mL

B.1.5 底物

对硝基苯磷酸二钠($p\text{NPP}$)

B.1.6 底物缓冲液

二乙醇胺	97.0 mL
氯化镁(MgCl_2)	0.1 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g

溶于 0.8 L 蒸馏水中, 用 HCl 调 pH 至 9.8, 再加蒸馏水到 1 L, 4 °C 贮存。

B.2 实验步骤

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 μL /孔,加盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 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(g/mL)加入样品抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,7 500 g 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,空白对照为样品抽提缓冲液。

B.2.3 加样

根据检测需要设计 96 孔(或 48 孔)酶联板,包括 2 个阴性对照孔、2 个阳性对照孔、2 个空白对照孔和多个待测样品孔。加样量为 100 μL /孔,每个样品设一个重复。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,酶联板用 PBST 洗涤 3 次。

B.2.4 加单克隆抗体

洗板,步骤同 B.2.2;用稀释缓冲液按说明将单克隆抗体稀释到工作浓度,并加入到酶联板中,100 μL /孔,加盖,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.5 加碱性磷酸酯酶标记的抗体

用稀释缓冲液将标有碱性磷酸酯酶的兔抗鼠 IgG 按说明稀释到工作浓度,每孔加 100 μL ,同步步骤 B.2.1 包好,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 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.2.6 加底物

将底物 pNPP 加入到底物缓冲液使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100 μL /孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.7 读数

用酶标仪在 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读 OD 值。

注:实际检测时,孵育温度、PBST 洗涤次数和显色读数时间需按照检测抗体或试剂盒中说明书的规定执行。

B.3 结果判定

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;同一样品的重复性一致。

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/阴性对照 OD₄₀₅ > 2,判为阳性;样品 OD₄₀₅/阴性对照值接近阈值,判为可疑样品,需重新做一次,或者用其他方法进行验证;样品 OD₄₀₅/阴性对照 OD₄₀₅ < 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 50×TAE 电泳缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
Na ₂ 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.1.2 6×加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝
40%(质量浓度)蔗糖水溶液

C.2 引物

上游引物 PMTV-F:5'-CTATGCACCAGCCCAGCGTAACC-3'
下游引物 PMTV-R:5'-CATGAAGGCTGCCGTGAGGAAGT-3'。
预计扩增片段长度为 460 bp。

C.3 实验步骤

C.3.1 核酸提取

称取 0.1 g 植物组织加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol,剧烈震荡混匀;4℃,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液移入新的离心管中,除去不溶成分;在室温下,静置 5 min 后加入 200 μL 三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,在室温下放置 10 min;4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液水相放入新的离心管中;加入与上清液水相等体积异丙醇,颠倒混匀,在-20℃下,放置 30 min 以上;4℃,12 000 r/min 离心 10 min,RNA 在侧壁或管底沉淀;弃上清液,加入 1 mL 70%的冷乙醇,12 000 r/min 离心 2 min,弃乙醇,重复 3 次;沉淀放于超净台无菌风吹干 15 min~20 min,干燥后加入 20 μL~30 μL 的 RNase-free water,溶解沉淀,缓慢摇匀后,置于-80℃保存备用。

注:或者按照等效 RNA 提取试剂盒进行操作。

C.3.2 RT-PCR 扩增

cDNA 的合成:在 0.2 mL PCR 管中,加入总 RNA 3 μL,1 μL 下游引物(10 μmol/L),1 μL 10 mmol/L dNTP,9 μL RNase free H₂O,70℃,5 min,冰上放置 5 min,加入 4 μL 5×M-MLV RT Buffer,1 μL M-MLV 反转录酶(200 U/μL),1 μL RNasin® RNA 酶抑制剂(40 U/μL),42℃水浴 1 h,合成 cDNA。

PCR 扩增:在 0.2 mL PCR 管中,加入 2.5 μL 10×PCR 缓冲液,1 μL cDNA,0.5 μL 10 mmol/L dNTP,1.0 μL 上、下游引物(10 μmol/L),0.5 μL Ex Taq 聚合酶(5 U/μL),用无菌水补足到 25 μL。

设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应条件:94 ℃,5 min;94 ℃,30 s,62 ℃,30 s,72 ℃,40 s,30 cycles;72 ℃,5 min。

C.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用电泳缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖凝胶,将 5 μ L PCR 扩增产物与 1 μ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合,然后将其和 DNA 分子量标记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.4 结果判定

C.4.1 阳性对照在 460 bp 处有扩增条带,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.4.2 结果达到质控要求,且样品在 460 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。做好标签,置于隔离温室中。每天观察记载寄主反应。

D.2 鉴别寄主症状

- 德伯纳依烟(*Nicotiana debneyi*):接种叶表现为坏死斑,坏死或褪绿环斑。第一片系统侵染的叶片表现为坏死或褪绿脉叶纹。
 - 苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*):在 13 ℃~16 ℃下,接种一周或一周以上,接种叶出现坏死环斑,单个的坏死斑可以发展到覆盖半个叶片,没有系统侵染。
 - 珊西烟(*Nicotiana tabacum* var *Xanthi nc*)或三生烟(*Nicotiana tabacum* Sumson):在低于 20 ℃情况下,接种叶出现坏死或褪绿环斑,但在较高温度下通常不显症。冬季系统侵染占优势,造成坏死或褪绿脉叶纹。
-

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法
SN/T 1135.3—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-32386 定价 18.00 元



SN/T 1135.3-2016