



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1616—2013
代替 SN/T 1616—2005

非洲木薯花叶病毒检测方法

Detection of African cassava mosaic virus

2013-08-30 发布

2014-03-01 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。

本标准代替 SN/T 1616—2005《非洲木薯花叶病毒检测方法》。

本标准与 SN/T 1616—2005 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

——增加了常规 PCR 检测方法;

——增加了实时荧光 PCR 检测方法。

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李明福、冯黎霞、鲁洁、张永江、孔君、李桂芬、相宁、魏梅生、张成良。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1616—2005。

非洲木薯花叶病毒检测方法

1 范围

本标准规定了非洲木薯花叶病毒检测鉴定的基本原则和方法。

本标准适用于可能带有非洲木薯花叶病毒的所有进境木薯及苗木等的检验检疫检测和鉴定。

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 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

3 非洲木薯花叶病毒基本信息

学名:African cassava mosaic virus。

缩写:ACMV。

分类地位:双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)。

传播途径:主要通过木薯粉虱(*Bemisia tabaci*)、种薯及块茎等传播。

非洲木薯花叶病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据 ACMV 在鉴别寄主上的症状进行生物学检测;根据 ACMV 与抗体之间的特异性反应,对样品进行酶联免疫吸附检测;根据 ACMV 的粒体特性进行免疫电镜观察;根据 ACMV 核酸保守区的特异性进行常规 PCR 或实时荧光 PCR 检测,通过电泳条带大小或扩增曲线的变化进行结果判定。

5 仪器设备、用具及试剂

5.1 仪器设备

透射式电子显微镜、酶联检测仪、电子天平、水浴锅、PCR 扩增仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、台式高速冷冻离心机和凝胶成像系统等。

5.2 用具

可调移液器、移液器头、酶联板、离心管和研钵等。

5.3 试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。

检测试剂见附录 B、附录 C、附录 D。

6 实验室检测

木薯种于隔离温室中,待长出苗后取叶片做血清学检测;木薯试管苗及脱毒苗则直接对植株进行血清学检测(见附录 B)。血清学检测结果为阳性的再用生物学测定(见附录 C)或免疫电镜观察(SN/T 1840)或常规 PCR 检测(见附录 D)或实时荧光 PCR 检测(见附录 E)中的一种方法进行复查。

7 结果判定

检测结果符合以下五种方法结果中的两种,即可判定样品为非洲木薯花叶病毒阳性:

- 通过免疫电镜从样品中观察到的病毒粒体与 A.5 描述的相同;
- 样品血清学检测为阳性;
- 生物学测定鉴别寄主反应与 C.3 描述相吻合;
- 常规 PCR 检测为阳性;
- 实时荧光 PCR 检测为阳性。

8 样品保存与复核

8.1 样品保存

木薯繁殖材料样品妥善保存于 4℃ 冰箱中,试管苗保存于组培室中,以备复核。

8.2 复核

完整的实验记录要包括:样品的来源、种类、采样时间、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。生物学鉴定需有鉴别寄主的症状照片,电镜观察需有病毒粒体照片,血清学检测需有酶联板反应的照片,常规 PCR 检测需有电泳图片,实时荧光 PCR 检测需有扩增曲线图片。

附录 A

(资料性附录)

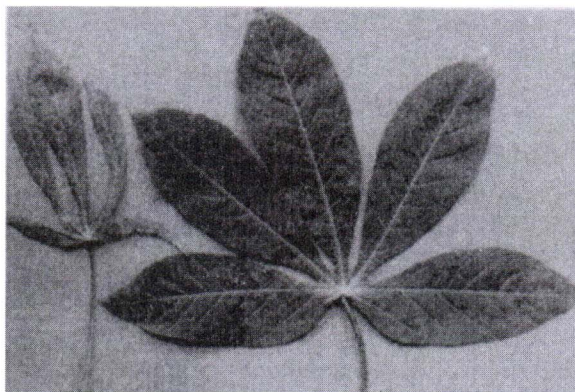
非洲木薯花叶病毒背景资料

A.1 寄主范围

自然寄主包括木薯(*Manihot esculenta*)、猪菜藤(*Hewittia sublobata*)、西阿拉橡胶树(*Manihot glaziovii*)及火焰桑叶麻(*Laportea aestuans*),人工接种可侵染瓜类及烟类等多种植物。

A.2 病害症状

木薯植株不同生长时期都可以被侵染致病,幼龄植株更易感染,典型症状为系统花叶。感病植株首先在叶片上呈褪绿小斑,逐步扩大,褪绿斑愈合与正常绿色形成花叶。有时受侵叶片背面可见突起。症状严重程度随季节、栽培品种不同而异。在潮湿凉爽雨季症状表现得最严重,而夏季通常隐症或浅花叶。见图 A.1。



注: 引自 <http://www.agripests.cn/> 中国农业有害生物信息系统, 中国农业科学院植物保护研究所。

图 A.1 木薯花叶病(左为病叶)

A.3 分布地区

肯尼亚、南非、安哥拉、刚果、喀麦隆、贝宁、尼日利亚、中非、加纳、科特迪瓦、布基纳法索、卢旺达、坦桑尼亚、乌干达、塞舌尔、塞内加尔、印度、印度尼西亚(爪哇)、斯里兰卡、巴西及委内瑞拉等。

A.4 传播方式

木薯粉虱(*Bemisia tabaci*)为传毒介体,以持久方式传播,并可以保持侵染能力 9 d,大约 10% 的传毒由单头成虫完成。病毒存在于口器中,脱皮仍保留病毒,但不能通过卵传给下一代。嫁接可以传毒,种子不传毒。汁液可以传毒,但传给木薯困难。

该病毒通过染病种薯、块茎、组培苗的运输等人为途径进行传播。

A.5 粒体形态

病毒粒体为双生球状($30\text{ nm}\times 20\text{ nm}$),长轴中心线上有一明显的“腰”,每一面都有一明显的五角形,偶尔可见三联体病毒。

A.6 基因组

单链环状 DNA,二分体,DNA-A 长 2.779 kb ,DNA-B 长 2.724 kb 。

附 录 B
(规范性附录)
三抗体夹心酶联免疫吸附实验

B.1 试剂**B.1.1 包被缓冲液(pH9.6)**

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
叠氮化钠	0.20 g

溶于 900mL 蒸馏水中,用盐酸调至 pH9.6,再用蒸馏水补足 1 L。

B.1.2 PBS 磷酸盐缓冲液(pH7.4)

氯化钠	8.00 g
磷酸二氢钾	0.20 g
磷酸钠	1.15 g
氯化钾	0.20 g
叠氮化钠	0.20 g

溶于 900 mL 蒸馏水中,用氢氧化钠调至 pH7.4,再用蒸馏水补足 1 L。

B.1.3 洗涤缓冲液(PBST)

PBS	1 L
吐温-20	0.5 mL

B.1.4 样品抽提缓冲液

0.05 mol/L Tris 缓冲液(含 0.06 mol/L 亚硫酸钠,pH 8.5)

B.1.5 酶标抗体稀释缓冲液

PBST	1 L
聚乙烯吡咯烷酮(PVP)	20 g
牛清白蛋白	2 g

B.1.6 底物缓冲液

二乙醇胺	97 mL
水	600 mL
叠氮化钠	0.2 g

用盐酸调至 pH9.8,加水至 1 L。

B.2 实验步骤

- B.2.1 按要求的浓度¹⁾用包被缓冲液稀释包被抗体,每孔加 200 μL 。
- B.2.2 将酶联板放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h~4 h。
- B.2.3 用 PBST 加满各孔,然后倒掉,孔向下在滤纸上拍干,再重复两次。
- B.2.4 取 1 g 待检组织研碎,加入 2 mL~10 mL 的抽提缓冲液,过滤得到待检测样品液。
- B.2.5 分别将稀释到适当浓度的阳性对照、阴性对照和待检样品各 200 μL 加入已包被的孔中,为保证实验的准确性,建议每个样品再设一个重复。
- B.2.6 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
- B.2.7 同步骤 B.2.3 洗板。
- B.2.8 用稀释缓冲液将抗体(单克隆抗体)稀释到适当浓度,每孔加 100 μL 。
- B.2.9 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。
- B.2.10 同步骤 B.2.3 洗板。
- B.2.11 用结合缓冲液将标有碱性磷酸酶的兔抗鼠 IgG 稀释到适当浓度,每孔加 200 μL 。
- B.2.12 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。
- B.2.13 同步骤 B.2.3 洗板,以确定所有未结合的抗体都被洗掉。
- B.2.14 按 1 mg/mL 的浓度将对硝基苯磷酸钠溶于底物缓冲液中(使用前配制并注意避光以防变色),制成底物溶液。
- B.2.15 每孔加 100 μL 底物溶液。
- B.2.16 室温下孵育 30 min~60 min。
- B.2.17 在酶联仪 405 nm 波长下检查各孔的吸收值 OD_{405} 。

B.3 结果判断

- B.3.1 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} 值小于 0.15,当阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值大于 5;孔的重复性一致。
- B.3.2 在满足了 B.3.1 的质量要求后,结果可判定如下:当样品 OD_{405} /阴性对照 $OD_{405} \geq 2$ 时,判定结果为阳性;如果是试剂盒,根据试剂盒的说明来判定。

1) 不同批次的抗体浓度、阴性对照和阳性对照浓度是不一样的,稀释倍数要根据当时批次而定。如果是检测试剂盒,则根据试剂盒的要求而定。

附录 C

(规范性附录)

生物学测定(鉴别寄主及其症状)

C.1 试材

C.1.1 鉴别寄主:采用本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、克利夫兰烟(*Nicotiana clevelandii*)和曼陀罗(*Datura stramonium*)。先种于隔离温室(30℃左右)大花盆中育苗,出苗后移栽至小盆中,长到3~4片叶时用于接种鉴定。

C.1.2 磷酸盐缓冲液(pH=7.4)、硅藻土。

C.2 方法

C.2.1 病样加1:1的磷酸盐缓冲液,在研钵中研碎。

C.2.2 叶面预先撒上少量硅藻土,将病汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶表面。

C.2.3 自来水冲洗叶表。

C.2.4 做好标签,置于隔离温室中。

C.2.5 每天观察记载寄主反应。

C.3 鉴别寄主的症状表现

C.3.1 本氏烟:逐渐扩大的褪绿斑,然后是系统卷叶、畸形和泡斑。

C.3.2 克利夫兰烟:褪绿局部斑,然后表现为严重的畸形、不规则的黄脉带和泡斑。

C.3.3 曼陀罗:表现为局部的褪绿和坏死斑,然后发展为系统脉带、卷叶和畸形。

附 录 D

(规范性附录)

常规 PCR 检测方法

D.1 试剂

D.1.1 CTAB DNA 提取缓冲液(pH 8.0)

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)	4 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA 0.5 mol/L)	8 mL
氯化钠(NaCl)	16.4 g
1 mol/L Tris-HCl	20 mL
2-ME(β -巯基乙醇)	4 mL
加水定容至 200 mL,调 pH 至 8.0,121 °C 高压灭菌 30 min。	

D.1.2 DNA 提取其他试剂

三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、70%乙醇、双蒸水。

D.1.3 PCR 试剂

Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTPs(10 mmol/L)、10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、ddH₂O。

D.1.4 TBE 缓冲液(5 $\times$)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	27 g
硼酸(H ₃ BO ₃)	13.75 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	1.86 g
加双蒸水定容至 500 mL	
用时加蒸馏水稀释至 0.5 $\times$ TBE。	

D.1.5 溴化乙锭(EB)溶液(10 μ g/ μ L)

溴化乙锭(EB)	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

D.1.6 引物

引物序列:ACMV-F:5'-GKCGAAGCGACCAGGAGAT-3'
 ACMV-R:5'-CCCTGYCTCCTGATGATTATA-3'
 K=G/T;Y=C/T

D.2 DNA 提取

取叶片样品 0.2 g 于液氮中磨碎,加入 600 μ L 的 CTAB DNA 提取缓冲液(65 °C 预热),混匀后转入 1.5 mL 离心管中,于 65 °C 温浴 30 min,不时混匀。用等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)抽提,4 °C

12 000 r/min 离心 10 min。回收上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇混匀,−70 ℃ 放置 30 min 后,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,用 70%乙醇液洗涤沉淀两次。37 ℃ 干燥后,溶于 100 μL 双蒸水中,−20 ℃ 保存备用²⁾。

D.3 PCR 扩增

PCR 反应体系:

见表 D.1,每个样品设 3 个平行处理。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。检测时以含 ACMV 的植物材料的 DNA 或含有 ACMV 目标片段的质粒作为阳性对照,以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属其他病毒的 DNA 作为阴性对照,以水代替 DNA 模板作为空白对照。

PCR 反应条件:

94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃ 5 min 延伸。

表 D.1 PCR 反应体系

名称	储存液浓度	加样量/μL	终浓度
PCR 缓冲液	10×	2.0	1×
dNTPs	10 μmol/L	0.5	2.5 mmol/L
ACMV-F	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
ACMV-R	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
Taq 酶	5 U/μL	0.5	0.15 U/μL
DNA 模板	—	2.0	—
补水至	—	20.0	—

D.4 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物用 0.5×TBE 缓冲液进行 1%琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后,将凝胶放入 10 μg/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。

D.5 结果判定

如果阳性对照出现约 655 bp 的条带,检测样品、阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 ACMV 阴性。

如果阳性对照及检测样品出现约 655 bp 的条带,阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 ACMV 阳性。

2) 或者按照商品 DNA 提取试剂盒进行操作。

附 录 E
(规范性附录)
实时荧光 PCR 检测方法

E.1 引物和探针设计

引物序列:ACMV-CP-F:5'-ACCTTGGTATCTGTAAGGTGATTAGTG-3'

ACMV-CP-R:5'-ATCACATTATTAGTGTGATT-3'

探针序列:ACMV-CP-P:5'-FAM-CGGAAAGAGGTTTTGTATCAAGTC-TAMRA-3'

E.2 DNA 提取

操作方法见 D.2。

E.3 实时荧光 PCR 反应体系³⁾

实时荧光 PCR 反应体系见表 E.1,每个样品及对照设 3 个平行处理。检测时以含 ACMV 的植物材料的 DNA 或含有 ACMV 目标片段的质粒作为阳性对照;以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属其他病毒的 DNA 作为阴性对照;以水代替 DNA 模板作为空白对照。

表 E.1 实时荧光 PCR 反应体系

名称	贮备液浓度	加样量/ μL	终浓度
PCR 缓冲液	10×	2.0	1×
dNTP _s	10 mmol/L	0.5	0.25 mmol/L
ACMV-CP-F	10 $\mu\text{mol/L}$	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
ACMV-CP-R	10 $\mu\text{mol/L}$	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
ACMV-CP-P	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$
Taq 酶	5 U/ μL	0.5	0.05 U/ μL
DNA 模板	—	2.0	—
补水至	—	20.0	—

E.4 实时荧光 PCR 反应

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 40 个循环。

点击运行,进行 PCR 反应,保存文件,打开分析软件,仪器自动分析试验结果,给出 ΔRn (荧光信号增加值)与循环数之间关系的图像。

3) 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,也可采用商业化的一步或两步法试剂盒。

E.5 结果判定

在阳性对照 Ct 值小于 30,水空白对照 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):

待测样品的 Ct 值为 40 时,则判定未检测到 ACMV。

等测样品的 Ct 值小于或等于 35 时,则判定检测到 ACMV。

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,则判定未检测到 ACMV;如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,则判定检测到 ACMV。

参 考 文 献

- [1] Olufemi J. Alabia, P. Lava Kumarb, Rayapati A. Naidu. Multiplex PCR for the detection of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in cassava[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154: 111-120.
-