



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2462—2010

棉花曲叶病毒检疫鉴定方法

Identification of cotton leaf curl Begomovirus

2010-01-10 发布

2010-07-16 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

本标准的附录 A 为资料性附录。

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：中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、浙江大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：张祥林、周雪平、朱水芳、王翀、吴卫、余永杰。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

棉花曲叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl Begomovirus,简称 CLCuV)的检疫鉴定方法。
本标准适用于可能带有棉花曲叶病毒的活体寄主植物的检疫鉴定。

2 原理

棉花曲叶病毒的分类地位属于双生病毒科(Geminiviridae)、菜豆金色花叶病毒属(Begomovirus)。该病毒的生物学特性、血清学特性和分子生物学特征是制定本标准的主要依据(参见附录 A)。

3 仪器设备和用具

3.1 仪器设备

电子天平(感量 1/1 000 g)、超净工作台、高速冷冻离心机、小型低速离心机、pH 计、恒温水浴锅、微量榨汁机、超低温冰箱、高压灭菌器、酶标仪、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析仪等。

3.2 用具

研钵、培养皿、可调式微量移液器(2 μ L、10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)及相应的移液器头、96 孔酶联反应板、离心管(1.5 mL、10 mL)、PCR 管(0.2 mL)、量筒、烧杯、镊子。

4 试剂、缓冲液及溶液

4.1 10×PBST 缓冲液

氯化钾(KCl)2 g、氯化钠(NaCl)80 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)2 g、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)11.5 g、吐温 20(Tween-20)5 mL,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4,加蒸馏水定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.2 样品提取缓冲液

亚硫酸钠(Na_2SO_3)1.3 g、聚乙烯基吡咯烷酮(MW 24 000~40 000,PVP)20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g、吐温 20(Tween-20)20 mL 溶解于 800 mL 1×PBST 中,用盐酸调节 pH 至 7.4,加 1×PBST 定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.3 包被缓冲液

碳酸钠(Na_2CO_3)1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2.93 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.6,加蒸馏水定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.4 洗涤缓冲液

将 1×PBST 缓冲液用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.5 酶标抗体缓冲液

1×PBST 缓冲液 800 mL、小牛血清白蛋白(BSA)2 g、聚乙烯基吡咯烷酮 20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,用无菌蒸馏水定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.6 底物(PNPP)缓冲液

二乙醇胺 97 mL、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.8,用无菌蒸馏水定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存。

4.7 底物(PNPP)溶液

将 4-硝基酚磷酸钠盐(PNPP)100 mg 溶解于 PNPP 底物缓冲液 100 mL 中,现配现用。

4.8 终止反应液

氢氧化钠(NaOH)40 g,用无菌蒸馏水定容至1 000 mL。

4.9 提取缓冲液 A

葡萄糖 60 g、NaDIECA 23 g、聚乙烯基吡咯烷酮 20 g、巯基乙醇 0.8 mL,溶解于1 000 mL 蒸馏水中,常温下贮存。

4.10 提取缓冲液 B

10 mmol/L Tris-盐酸、20 mmol/L EDTA、0.5mol/L 氯化钠、1.5%SDS,pH8.0。

4.11 10×PCR 缓冲液

10 mmol/L Tris-盐酸,10 mmol/L 氯化钾。

4.12 TAE 电泳缓冲液

40 mmol/L Tris-Ac,2 mmol/L Na₂EDTA。

4.13 其他试剂

液氮、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、琼脂糖(电泳用)、SYBR Green I。

也可采用棉花曲叶病毒检测试剂盒。

5 检疫鉴定方法

5.1 双抗体夹心法(DAS-ELISA)

5.1.1 样品制备

取同一批次表现症状的寄主植株叶片和无症状叶片进行混合取样,用微量榨汁机或研钵研磨样品,其中加入样品提取缓冲液,植株叶片质量与样品提取缓冲液为1:5(g/mL)。将榨出的汁液分别盛装于Eppendorf管中,4 000 r/min 离心5 min后吸取上清液待用。

5.1.2 操作步骤

5.1.2.1 根据检测需要设计96孔酶联板点样孔。包括2个阳性对照孔、2个阴性对照孔、2个~4个空白对照孔和多个待检测样品孔,待检测样品孔各重复两次。

5.1.2.2 每孔加入200 μL的CLCuV包被抗体溶液,用封口膜包好,37℃孵育2 h~4 h(或4℃冰箱过夜)。

5.1.2.3 空干酶标板中的溶液,每孔加200 μL的1×PBST洗涤液洗涤酶标板3次,每次3 min。

5.1.2.4 每孔加入200 μL待检样品液,用封口膜包好,37℃孵育2 h(或4℃冰箱过夜)。

5.1.2.5 空干酶标板中的溶液,按5.1.2.3的方法洗涤。

5.1.2.6 用酶标抗体缓冲液按要求稀释酶标抗体,每孔加入200 μL酶标抗体溶液,用封口膜包好,37℃孵育2 h(或4℃冰箱过夜)。

5.1.2.7 洗涤酶标板,步骤同5.1.2.3。

5.1.2.8 每孔加200 μL现配的底物溶液,室温避光孵育0.5 h~1 h。

5.1.2.9 必要时,每孔加入3 mol/L氢氧化钠溶液50 μL中止反应(若立即检测OD值则不需要)。

5.1.2.10 肉眼观察判断酶标板颜色反应结果,并用酶标仪检测各样品孔和对照孔在A₄₀₅ nm处的吸收值(OD值)。

5.2 PCR 法

5.2.1 核酸提取

取寄主植物病叶30 mg,加入100 μL提取缓冲液A,研磨后,10 000 r/min离心10 min,沉淀加入200 μL提取缓冲液B,混匀后将离心管置于65℃恒温水浴中30 min~60 min,加入200 μL三氯甲烷:异戊醇:乙醇(80:4:16),颠倒混匀,室温静置5 min~10 min后,室温下5 000 r/min离心5 min,上清液加入2倍体积的乙醇,-20℃放置1 h,12 000 r/min离心10 min,沉淀用100 μL的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.0)溶解,贮存于-20℃冰箱中备用。

5.2.2 引物设计

根据已报道的 CLCuV 基因组 DNA 的保守序列设计特异性引物,该对引物序列为:

CL1/F:5'-GTCGCAGGATTATTACCG-3'(对应于 CLCuV 分离物 26 的基因组 DNA-A 的 201-219 位);

CL3a/R:5'-GTTGCTAGCGTGAGTACAA-3'(对应于 CLCuV 分离物 26 的基因组 DNA-A 的 991-973 位)。

预期扩增产物大小为 791 bp。

5.2.3 PCR 扩增

检测棉花曲叶病毒的 PCR 反应体系见表 1。

表 1 检测棉花曲叶病毒的 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/ μL
10 $\times$ PCR Buffer	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2
dNTP (10 mmol/L)	0.5
CL1/F (10 pmol/ μL)	0.2
CL3a/R (10 pmol/ μL)	0.2
<i>Taq</i> 酶 (5 U/ μL)	0.3
cDNA 模板	3.0
ddH ₂ O	补充至 25 μL

反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,36 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

在 PCR 检测中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照各 2 个。

5.2.4 琼脂糖电泳检测

用 1 $\times$ TAE 缓冲液配制 1.5% 琼脂糖,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中溶化混匀,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右后倒入水平电泳槽中,插上样品梳,待冷却凝固后拔掉梳子,在电泳槽中加入 1 $\times$ TAE 缓冲液,使液面淹没凝胶表面约 1 mm。

将加样缓冲液分别与样品混合后,加入 10% 的 SYBR Green I 染色剂,然后逐一加入样品孔,用 DNA Maker 做分子量标准物。

接通电泳仪的电源,设置电压为 120 V,电泳时间为 0.5 h~1 h。电泳结束后,小心取下凝胶置于凝胶成像分析仪上观察,拍摄并记录实验结果。

6 鉴定标准

6.1 DAS-ELISA 法

当待检样品孔和阳性样品孔有颜色反应,阴性对照孔和空白对照孔无颜色反应,且酶标仪检测阴性对照的 OD 值小于 0.15,则判定检测结果有效。计算待测样品 OD 值(P)与阴性对照 OD 值(N)之比值,若 P/N 大于 2,则检测结果判定为阳性;若 P/N 小于 2,则检测结果判定为阴性。

6.2 PCR 法

观察 PCR 产物的电泳结果时,若供试样品和阳性对照在 791 bp 处有条带出现,阴性对照和空白对照无条带出现,即可判定供试样品为阳性,即供试样品中携带棉花曲叶病毒;否则为阴性。

7 结果判定

如果在 DAS-ELISA 法检测中,待测样品的检测结果为阴性,且 PCR 检测结果为阴性,则可判定该

样品不携带 CLCuV。

如果在 DAS-ELISA 法检测中,待测样品的检测结果为阳性,且 PCR 检测结果为阴性,则可判定该样品不携带 CLCuV。

如果在 DAS-ELISA 法检测中,待测样品的检测结果为阴性,且 PCR 检测结果为阳性,则可判定该样品携带 CLCuV。

如果在 DAS-ELISA 法检测中,待测样品的检测结果为阳性,且 PCR 检测结果为阳性,则可判定该样品携带 CLCuV。

8 样品保存

经检验确定携带棉花曲叶病毒的样品应保存在低温冰箱(—40℃以上)中以备复核,保存时间半年以上,保存的样品应做好登记和标记工作。

附 录 A

(资料性附录)

棉花曲叶病毒的背景资料

A.1 寄主范围

该病毒可侵染的寄主有:棉花(*Gossypium hirsutum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、秋葵(*Hibiscus esculentus*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、扶桑(*Hibiscus rosasinensis*)、苘麻(*Abutilon theophrasti*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、百日草(*Zinnia elegans*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)、曼陀罗(*Dature Stramonium*)等。

A.2 分布

该病毒现主要分布在以下国家:巴基斯坦、印度、苏丹、尼日利亚、埃及、墨西哥、美国等。

A.3 病害症状

棉花植株受侵染后,早期表现新叶卷曲、叶脉膨大,后期在叶背面的主脉上形成耳突,植株矮化,结实率下降或不结实。

A.4 传播方式

烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播、苗木嫁接传播。

A.5 粒体形态

棉花曲叶病毒具有典型的双联体颗粒形态,大小为(18 nm~20 nm)×30 nm。

A.6 基因组特征

该病毒的基因组含有2个大小相近的环状ssDNA组分,大小为2.5 kb~3.0 kb。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
棉花曲叶病毒检疫鉴定方法
SN/T 2462—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字
2010年4月第一版 2010年4月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-20703 定价 16.00 元



SN/T 2462-2010