SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2343—2009

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

Quarantine identification of bean pod mottle virus

2009-07-07 发布　　2010-01-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准的附录B、附录C、附录D为规范性附录，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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：廖富荣、陈青、沈建国、郑耘、林石明、陈红运、郭琼霞、黄蓬英、王宏毅、吴媛、游源浅、虞赟。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定的程序和方法。

本标准适用于可能携带菜豆荚斑驳病毒的大豆、菜豆等种子、苗木等植物繁殖材料的检疫鉴定，也适用于介体昆虫中该病毒的检疫鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

菜豆荚斑驳病毒(Bean pod mottle virus)属于豇豆花叶病毒科(Comoviridae)、豇豆花叶病毒属(Comovirus)的成员。可以分为亚组Ⅰ和亚组Ⅱ两个亚组。相关资料参见附录A。

英文缩写：BPMV

2.2 血清学特性

BPMV具有很强的免疫原性，制备的多克隆抗体可以检测大豆叶片、种子、草本寄主植物和介体昆虫中的病毒。

2.3 分子生物学特性

BPMV是一种正链RNA病毒，其基因组由两条正链RNA-1(约3.6 kb)和RNA-2(约6.0 kb)组成，分别包裹在两个直径为28 nm的等轴多面体粒体中。RNA-1编码5个复制所需的蛋白，RNA-2编码一个推导的细胞间运动蛋白和两个外壳蛋白。根据其基因组序列可以设计用于分子检测的特异性引物和探针，用来该病毒的特异性检测。

BPMV所在的豇豆花叶病毒属的种划分标准是：

a) 大外壳蛋白(Coat protein，CP)的氨基酸序列同源性小于75%；

b) 聚合蛋白酶的氨基酸序列同源性小于75%；

c) 在可能的成分间没有假重组；

d) 抗原反应有差异。

3 主要仪器设备与试剂

3.1 主要仪器设备和用具

——微量研磨仪；

——酶标仪；

——洗板机；

——微量天平(感量：0.001 g)；

——PCR仪；

——电泳仪；

——水平电泳槽；

——凝胶成像仪；

——高速冷冻台式离心机；

——水浴槽；

——pH计；

——各种量程的可调移液器(1 000 μL、200 μL、20 μL、2 μL)；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

——各种吸头(1 000 μL、200 μL、20 μL、2 μL)；

——96 孔酶标板；

——离心管(1.5 mL、0.6 mL、0.2 mL)。

3.2 主要试剂

主要试剂和缓冲液见附录 B 和附录 C。

4 检测样品的制备

4.1 检测样品

将送检样品制备为血清学或分子生物学检测鉴定的检测分样品。对每批送检样品进行症状检查，挑选具有褐色或黑色斑驳症状的种子(从种脐开始)，或者选取具有斑驳、皱缩、褪绿等症状的叶片。

4.2 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测样品的制备

种子样品：选取一定量的种皮作为检测分样品(如 0.5 g～1.0 g)，在液氮中充分研磨，回温后按比例加入样品提取缓冲液继续研磨[通常 1∶(5～10)]。

叶片样品：选取一定量的叶片作为检测分样品(如 0.5 g～1.0 g)，在液氮中充分研磨，回温后按比例加入样品提取缓冲液继续研磨(通常 1∶10)。

把研磨后的样品转移到 5 mL 离心管中，8 000 r/min 离心 5 min，上清液作为 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测提取液。

注：提取液在 3 h 内使用，否则保存在 4 ℃中。

4.3 RT-PCR 检测样品的制备

称取表现症状的 0.1 g 叶片、种子等样品在液氮中充分研磨后，提取 RNA。

5 检测与鉴定

5.1 DAS-ELISA 检测

DAS-ELISA 检测应设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照，用样品提取缓冲液作空白对照。其中，阴性对照的种类和材料(如种子或叶片)应该尽量与所检测样品相一致。

具体操作过程见附录 B。当使用商业性检测试剂盒时，参照试剂盒说明进行操作。

5.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测应设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照，用 ddH_2O 作空白对照。

具体操作过程见附录 C。

5.3 IC-RT-PCR 检测

IC-RT-PCR 检测应设置对照，用健康的植物组织作阴性对照，用感染 BPMV 的植物组织作阳性对照，用 ddH_2O 作空白对照。

具体操作过程见附录 D。

5.4 序列测定

将 PCR 产物回收后，进行克隆、测序，或者直接测序，测序可由生物公司完成。把测序所得到的核苷酸序列与已知的 BPMV 相应序列进行比对，如果与已知的 BPMV 相应序列相一致则判定为 BPMV，不一致则判定为非 BPMV。

6 结果判定与记录

6.1 结果判定

——当 DAS-ELISA 检测结果呈阳性、同时 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果呈阳性时，则判定为检出 BPMV；

食品伙伴网http://www.foodmate.net

——当 IC-RT-PCR 或 RT-PCR 检测结果呈阳性、同时序列测定结果为 BPMV 序列时，则判定为检出 BPMV。

6.2 结果记录

记录各项实验数据，包括样品种类、来源，检测时间、地点、方法和结果等。血清学检测结果保留吸光值的数据报告，分子生物学检测结果保留电泳照片，序列测定结果保留测序报告图。

7 样品的保存

经检测携带 BPMV 的样品保存在－80 ℃超低温冰箱中，并作好登记和标记工作。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）
菜豆荚斑驳病毒相关资料

A.1 分布地区

北美洲：美国、加拿大。
中南美洲：巴西、厄瓜多尔、秘鲁。
亚洲：伊朗等。

A.2 形态特征

病毒粒子形态为等轴多面体病毒，无包膜，直径为 28 nm。

A.3 寄主范围与症状

BPMV 的寄主局限于豆科植物，主要是大豆（*Glycine max*）和菜豆（*Phaseolus* spp.），山蚂蝗（*Desmodium paniculatum*）是其多年生寄主。

在实验植物上的症状：

大豆（*G. max*）：表现为严重的系统症状，叶片斑驳、皱缩、荚和种子斑驳，甚至坏死、植株死亡。该病毒还能延迟大豆茎杆成熟，引起“绿茎”现象。

菜豆（*Phaseolus vulgaris*）Tendergreen 品种：起初出现褪绿斑，后发展为严重的系统褪绿，叶片畸形，豆荚严重斑驳，深绿色，豆荚短、畸形、扭曲、变得粗糙有疣状突起。

菜豆（*P. vulgaris*）Pinto 品种：无系统症状，接种后约 3 d～4 d 出现散生的红色局部枯斑，接种叶有时叶脉坏死。

菜豆（*P. vulgaris*）Bountiful 品种：无系统症状，接种后约 3 d～4 d 出现大的淡黄色局部病斑。

A.4 传播途径

BPMV 可以通过昆虫介体传播，主要是大豆叶甲（*Cerotoma trifurcata*），而玉米根叶甲（*Diabrotica virgifera*）、带斑黄瓜叶甲（*D. balteata*）、点斑黄瓜叶甲（*D. undecimpunctata howardii*）、葡萄甲虫（*Colaspis flavida*）、甲虫（*C. lata*）、曲条豆芫菁（*Epicauta vittata*）、墨西哥叶甲（*Epilachna varivestis*）和大豆潜叶虫（*Odontota horni*[*Xenochalepus horni*]）也是该病毒的传播介体。

该病毒另外还可以机械传播、嫁接传播，以及通过种子进行远距离传播。从感染 BPMV 植株上收获的种子，其种传率为 0.10%，种传率相对较低。与大豆花叶病毒（Soybean mosaic virus，SMV）一起感染，种传率可以达到 39%。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（规范性附录）
DAS-ELISA 检测操作步骤

B.1 ELISA 所采用的试剂

B.1.1 包被缓冲液（pH9.6）

碳酸钠（Na_2CO_3）	1.59 g
碳酸氢钠（$NaHCO_3$）	2.93 g
叠氮化钠（NaN_3）	0.20 g

加入 900 mL 水溶解，用 HCl 调节 pH 值到 9.6，然后加水至 1 L。

B.1.2 磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）

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
叠氮化钠（NaN_3）	0.2 g

加入 900 mL 水溶解，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4，然后加水至 1 L。

B.1.3 PBST

每升 PBS 中加入 0.5 mL 的 Tween 20。

B.1.4 样品提取缓冲液（pH7.4）

PBST＋2%PVP（Sigma PVP-40 聚乙烯基吡咯烷酮）。

B.1.5 酶标抗体稀释缓冲液

PBST＋2%PVP＋0.2%卵白蛋白（Sigma A-5253）。

B.1.6 底物缓冲液

二乙醇胺	97 mL
水	600 mL
叠氮化钠（NaN_3）	0.2 g

用盐酸调整 pH 至 9.8，然后加水到 1 L。

注：缓冲液可以储存在 4 ℃～10 ℃中至少 2 个月，使用前回温至室温。

B.1.7 抗体

BPMV 抗体、碱性磷酸酯酶标记的 BPMV 抗体。

B.2 操作步骤

B.2.1 包被

根据检测试剂盒说明，用包被缓冲液稀释 BPMV 抗体（如 1∶200），在微孔板中每孔加入 100 μL 包被抗体溶液。在室温下孵育 2 h～4 h 或 4 ℃下包被过夜。

B.2.2 加样

倒去孔中的抗体包被溶液，用 PBST 洗 4 次～5 次孔（可在洗板机上完成）。加入 100 μL 检测样品提取液到酶标板的孔中，每个样品至少 2 个孔。并设置阳性、空白和阴性对照。在室温下孵育 2 h 或 4 ℃下过夜。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.2.3 加入酶标抗体

根据试剂盒说明，用酶标抗体缓冲液稀释相应的酶标抗体（如1∶200）。倒去孔中的检测样品提取液，用PBST洗4次～5次孔（可在洗板机上完成）。每孔加入100 μL酶标抗体溶液。在室温下孵育2 h。

B.2.4 加底物

用底物缓冲液配制1 mg/mL的底物溶液。倒去酶标抗体溶液，用PBST洗4次～5次孔（可在洗板机上完成）。每孔加入100 μL新鲜配制的底物溶液。室温下避光放置（约30 min～60 min），至阳性对照孔明显显色。

注：在准备底物溶液的过程中，不要接触药剂或暴露在强光中，以避免在阴性对照孔中出现背景颜色。

B.2.5 吸光值的测定

用酶标仪在405 nm处读取吸光值。

B.3 结果判定

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＜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＞5～10；同一样品的重复性基本一致。

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OD_{405}值/阴性对照OD_{405}值＞2，判为阳性；样品OD_{405}值/阴性对照OD_{405}值接近阈值，判为可疑样品，需重新做一次；样品OD_{405}值/阴性对照OD_{405}值＜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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 C
（规范性附录）
RT-PCR 检测操作步骤

C.1 主要试剂

C.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol reagent、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的 ddH_2O。

C.1.2 RT-PCR 试剂

5×RT 缓冲液、dNTP 混合物(10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(RNasin)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

C.1.3 10×TBE 缓冲液(Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱	108 g
硼酸	55 g
Na_4EDTA	9.3 g

加水溶解，定容到 1 L。

C.1.4 电泳试剂

琼脂糖、0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液、10×TBE 缓冲液。

C.2 引物序列与合成

设计了一对用于特异性扩增的引物，序列及其相对位置见表 C.1。其中 BPM1 为正向引物，BPM2 为反向引物，扩增大小为 228 bp，扩增区域在大外壳蛋白基因上。由生物公司合成引物。

表 C.1 所使用的引物序列

引物名称	引物序列	在 NC_003495[a] 上的位置
BPM1	5′-CATAGCATTTGGAAATTTGGCTG-3′	2587-2609
BPM2	5′-TCACCTGGTATTGTG(A)GACAC-3′	2795-2814
[a] 在 GenBank 上的基因序列登录号		

C.3 总 RNA 的提取

取 0.05 g～0.1 g 粉末，加入 1 mL TRIzol reagent 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 200 μL，充分振荡 15 s，室温放置 3 min；12 000*g*，4 ℃离心 15 min；取上层水相加入另一离心管中，加入 0.5 mL 异丙醇；12 000*g*，4 ℃，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 ddH_2O 40 μL 溶解即可。

注：本方法是根据 TRIzol reagent 说明并略有改动，在保证能够得到满意的总 RNA 质量的情况下，也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

C.4 cDNA 合成

在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 BPM2 引物(10 μmol/L)，于 95 ℃的水浴中 7 min，然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5×RT 缓冲液 2.5 μL、dNTP 混合物(10 mmol/L)0.5 μL、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)0.5 μL、RNasin 0.5 μL、经 DEPC 处理的 ddH_2O 4.5 μL。然后 37 ℃水浴 1 h，95 ℃水浴 10 min，自然冷却至室温，－20 ℃冰箱中保存。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

C.5 PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。在 PCR 的薄壁管中分别加入以下试剂(25 μL 体系)：10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})2.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.5 μL、dNTP 混合物(每种各含 10 mmol/L)0.5 μL、BPM1 引物(10 μmol/L)1.0 μL、BPM2 引物(10 μmol/L)1.0 μL、cDNA 3.0 μL、ddH_2O 16.5 μL。

反应条件：94 ℃预变性 3 min，然后 94 ℃变性 50 s、60 ℃退火 50 s、72 ℃延伸 30 s，进行 35 个循环，最后一个循环结束后 72 ℃继续延伸 7 min。

C.6 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6×上样缓冲液混合均匀，并加到置于 0.5×TBE 缓冲液的 1.5%琼脂糖凝胶孔中，然后在 120 V 下电泳。电泳结束后，放入装有 0.5 μg/μL 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色，然后在清水中清洗后，在凝胶成像系统中观察，拍照，并保存照片。

C.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照在 228 bp 位置产生预期大小条带情况下，如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带，则为阳性；如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带，则为阴性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 D
（规范性附录）
IC-RT-PCR 检测操作步骤

D.1 包被抗体

根据检测试剂说明，将包被抗体用包被缓冲液稀释（如 1∶200 倍），取 50 μL～100 μL 稀释好的包被溶液于 0.6 mL 的离心管中。25 ℃中放置 3 h 或 4 ℃冰箱中过夜，然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次～5 次，去除残留溶液。

D.2 抗原捕捉

向每个已包被抗体的离心管中加入检测样品上清液 100 μL，25 ℃下放置 2 h～3 h 或 4 ℃冰箱中放置过夜；加入 PBST 缓冲液洗涤 3 次～5 次，双蒸水洗涤 1 次，去除残留溶液。

注：如果是用于验证 DAS-ELISA 的检测结果，可直接使用血清学检测样品的剩余提取液。

D.3 cDNA 合成

在上述离心管中加入 1 μL 的 BPM2 引物（10 μmol/L）、37.5 μL 的 ddH_2O（经 DEPC 处理），于 95 ℃的水浴中处理 7 min，然后迅速冰浴 5 min；继续加入 5×RT 缓冲液 10 μL、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL、M-MuLV 反转录酶 0.5 μL、RNasin 0.5 μL；然后 37 ℃水浴 1 h，95 ℃水浴 10 min，冷却后作为 PCR 扩增模板。

D.4 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中：2.5 μL 的 10×PC 缓冲液（含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}），dNTP（每种各 10 mmol/L）0.5 μL，*Taq* DNA 聚合酶（2.5 U/μL）0.5 μL，BPM1 和 BPM2 引物（10 μmol/L）各1.0 μL（引物序列与附录 C 的表 C.1 相同），加入上述 DNA 模板 10 μL，ddH_2O 补足体积。

与附录 C 中的第 C.5 章反应程序相同，反应完成后，取 5 μL 扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳，然后用 EB 染色，在凝胶成像系统上观察。

D.5 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照在 228 bp 位置产生预期大小条带情况下，如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带，则为阳性；如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带，则为阴性。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法
SN/T 2343—2009
*
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 1 字数 16 千字
2009 年 10 月第一版 2009 年 10 月第一次印刷
印数 1—2 000
*
书号:155066·2-19949 定价 18.00 元

SN/T 2343-2009

食品伙伴网http://www.foodmate.net