

ICS 65.020.01
B 16



中华人民共和国国家标准

GB/T 31806—2015

GB/T 31806—2015

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato virus V*

中华人民共和国
国家标准
马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法
GB/T 31806—2015

*

中国标准出版社出版发行
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)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

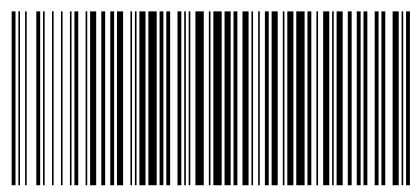
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2015 年 8 月第一版 2015 年 8 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-49516 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 31806—2015

2015-07-03 发布

2015-11-27 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

附录 E
(资料性附录)
生物学测定

E.1 试材

E.1.1 鉴别寄主

心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、克利夫兰烟(*N. clevelandii*)、本生烟(*N. benthamiana*)、德氏烟(*N. debneyi*)、白肋烟(*N. tabacum* cv. White Burley)。

接种叶龄:5~8片叶。

E.1.2 试剂

0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)。

E.2 方法

E.2.1 研磨

病样加1:5(质量:体积)的0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.0),在研钵中研碎。研碎后放入硅藻土或金刚砂,浓度为0.5%,与病汁液混匀。

E.2.2 接种

用手将病汁液轻轻涂抹于鉴别寄主叶表面。

E.2.3 冲洗

用自来水冲洗叶表面。

E.2.4 观察

每天观察记载寄主反应,连续观察1个月。

E.3 鉴别寄主症状

E.3.1 心叶烟:系统症状为明脉和花叶。

E.3.2 克利夫兰烟:系统花叶症状。

E.3.3 本生烟:顶部茎萎蔫和系统花叶症状。

E.3.4 德氏烟:接种叶症状为褪绿斑,系统症状为明脉、花叶、褪绿斑、褪绿环。

E.3.5 白肋烟:系统症状为明脉和花叶。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李桂芬、李旻、马洁、鲁洁、张永江、孔君、魏梅生。

附录 D
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 检测方法

D.1 主要试剂**D.1.1 RNA 提取试剂**

TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇。

D.1.2 实时荧光 RT-PCR 试剂

TaqMan One-step RT-PCR Mixture。

D.2 引物探针

根据马铃薯 V 病毒的 CP 基因序列(GeneBank 序列号:X61279.1)设计引物对如下:

PVV-F:5'-CGGTATGGTTTGGTGAGAAATTTGC-3' (位置 1 800 nt~1 824 nt)

PVV-R:5'-ACCATCCAATCCAACAAGCGAGT-3' (位置 1 941 nt~1 964 nt)

PVV-Probe:5'-FAM-TCCCGCACATCCGTCCGAGCAC-TAMRA-3' (位置 1 872 nt~1 893 nt)

D.3 核酸提取

取 0.1 g 样品,加入 1 mL TRIzol 试剂充分研磨,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 500 μ L,充分振荡 15 s,室温放置 3 min;12 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min;取上层水相加入另一离心管中,加入等体积异丙醇;12 000 g,4 $^{\circ}$ C 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 ddH₂O 40 μ L 溶解即可。

D.4 实时荧光 RT-PCR 反应

反应体系:0.2 mL 离心管中加入 2 \times One Step RT-PCR 缓冲液 III 10 μ L,Ex TaqHS(5 U/ μ L) 0.4 μ L,PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L,PVV-F(10 μ mol/L)0.4 μ L,PVV-R(10 μ mol/L) 0.4 μ L,PVV-Probe(10 μ mol/L)0.6 μ L,ROX Reference Dye II 0.4 μ L,模板 RNA 2 μ L,补 DEPC-H₂O 至 20 μ L。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:42 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40 循环。

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,也可采用商业化试剂盒。

D.5 结果判定

在阳性对照 Ct 值小于 30,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):

a) 待测样品的 Ct 值为 40 时,判定待测样品为 PVV 阴性。

马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中马铃薯 V 病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于马铃薯块茎、组培苗等繁殖材料中马铃薯 V 病毒的检疫鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 仪器设备及试剂**3.1 仪器设备**

酶标仪、天平(感量 1/10 000 g)、pH 计、微量榨汁机、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、隔离温室、恒温水浴、低温冰箱等。

微量移液器(2 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ L)、酶联板、研钵、离心管、花盆、灭菌土等。

3.2 试剂

酶联免疫吸附测定试剂见附录 B,RT-PCR 检测试剂见附录 C,实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 D,生物学测定试剂参见附录 E。

4 抽样与样品制备**4.1 抽样**

抽样按照 SN/T 2122 的规定进行。

4.2 马铃薯块茎样品的制备

将马铃薯块茎播于灭菌土中,于 25 $^{\circ}$ C 生长并进行症状观察。待长出约 10 片叶后将表现症状的植株编号,未表现症状的植株分组(10 株为一组)并编号。采集叶片用于酶联免疫测定、RT-PCR 检测、实时荧光 RT-PCR 检测及生物学测定。

4.3 组培苗样品制备

将每瓶组培苗中的每个植株都进行采样,每瓶组培苗所采样品作为一个加样样品用于酶联免疫测定、RT-PCR 检测、实时荧光 RT-PCR 检测及生物学测定。