

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1618—2005

SN/T 1618—2005

### 李属坏死环斑病毒检测方法

Detection of prunus necrotic ringspot virus

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
李属坏死环斑病毒检测方法  
SN/T 1618—2005

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.bzcb.com](http://www.bzcb.com)

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 13 千字

2005年11月第一版 2005年11月第一次印刷

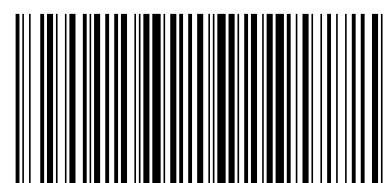
\*

书号: 155066·2-16464 定价 8.00 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)68533533



SN/T 1618-2005

2005-08-18 发布

2006-02-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

5  $\mu\text{L}$ , cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 39  $\mu\text{L}$ , 88 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 加 2 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* 酶 1  $\mu\text{L}$ , 进行如下热循环: 94 $^{\circ}\text{C}$  3 min, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 1 次循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 次循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖电泳分离-溴化乙锭染色。

#### B.2.4 琼脂糖电泳

##### B.2.4.1 制备凝胶

将 1 $\times$ TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5% 配好, 在水浴中熔化混匀, 冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$  左右。

##### B.2.4.2 加溴化乙锭

溴化乙锭浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 与制备的凝胶混匀, 倒入已封好的凝胶平台上, 插上样品梳。

##### B.2.4.3 加电泳液

待凝胶凝固后, 从制胶平台上除去封带, 拔出梳子, 加入足够量的 1 $\times$ TAE (缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

##### B.2.4.4 加样

用适量的 (约 2  $\mu\text{L}$ ~3  $\mu\text{L}$ ) 6 $\times$  加样缓冲液分别与 10  $\mu\text{L}$  样品混合, 然后分别将制备好的加样样品和适合的 DNA 分子量标准物加入样品孔中。

##### B.2.4.5 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动, 电压 75 V, 电泳时间为 1.5 h。

##### B.2.4.6 结果观察

电泳结束后, 将整个胶置于紫外透射仪上观察。

#### B.3 结果判断

通过观察, 若在 455bp 左右处有条带出现, 即可判断为阳性。

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录, 附录 B、附录 C 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。

本标准由中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所负责起草, 中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国陕西出入境检验检疫局参加起草。

本标准主要起草人: 李桂芬、李明福、魏梅生、相宁、张永江、韩丽娟、魏迪功。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

A.2.5 用酶标抗体稀释缓冲液按要求稀释酶标抗体,每孔加入 100  $\mu$ L,加盖或用保鲜膜包好,37℃ 孵育 4 h。

A.2.6 同步步骤 A.2.4 洗板

A.2.7 按 1 mg/mL 的浓度将  $\rho$  NPP(对硝基苯磷酸钠)溶于底物溶液中(使用前配制并注意避光以防变色),制成底物溶液。每孔加入 100  $\mu$ L 底物溶液。加盖或用保鲜膜包好,室温避光孵育 30 min~60 min。

A.2.8 酶联仪 405 nm 波长下检查各孔的吸收值。

### A.3 结果判断

A.3.1 如果是商品试剂盒,根据试剂盒的说明来判断。

A.3.2 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 5~10;孔的重复性基本一致。

A.3.3 在满足了 A.3.2 质量要求后,结果原则上可判断如下:

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值明显大于 2,判为阳性。

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值在阈值附近,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证。

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值明显小于 2,判为阴性。

A.3.4 若满足不了 A.3.2 质量要求,则不能进行结果判断。

## 李属坏死环斑病毒检测方法

### 1 范围

本标准规定了李属坏死环斑病毒检测和鉴定的基本原则和方法。

本标准适用于可能带有李属坏死环斑病毒的所有进境的无性繁殖材料、组培苗、种子和果实的检测和鉴定。

### 2 原理

#### 2.1 李属坏死环斑病毒学名、分类地位

学名:Prunus necrotic ringspot virus

缩写:PNRSV

分类地位:雀麦花叶病毒科(Bromoviridae),等轴不稳环斑病毒属(*Illarvirus*)。

#### 2.2 寄主范围

该病毒寄主范围广泛,自然和实验接种侵染 21 科双子叶植物,该病毒可侵染大多数李属植物、玫瑰、啤酒花。在人工接种的情况下还可侵染 180 余种植物。

#### 2.3 病害症状

病害症状因分离物、栽培种和环境条件不同而不同。病毒的一些分离物不引起症状,仅仅在接种指示植物或用血清学等方法检测时才能发现被侵染;一些分离物在系统侵染的当年在幼叶上产生坏死斑和孔洞,但在以后的年份里,在叶子和果实上很少出现症状;另一些分离物在侵染当年产生坏死反应,随后是慢性的褪绿叶斑驳和坏死、叶子耳突、畸形、延迟水果成熟,水果上有斑点症状。如在甜樱桃上出现了从无症状到严重皱缩花叶症状,慢性症状包括叶子上的褪绿点、叶扭曲,水果延迟成熟几天至几周,症状因病毒分离物不同而不同。在玫瑰上无症状侵染很普遍,症状有花叶、开花延迟、秋天落叶早、产生更多不成形的花,被侵染的植株通常无活力。在啤酒花上产生褪绿线和环斑。

#### 2.4 分布地区

广泛分布在温带地区,如欧洲各国和美国都有发生。

#### 2.5 传播方式

机械接种传播、花粉传播、种子传播,也可通过无性繁殖苗木、组培苗的运输等人为途径进行长距离传播。

#### 2.6 粒体形态

李属坏死环斑病毒粒体为等轴对称球状体,直径 23 nm~27 nm,有些粒体为准等轴球状到短棒状(轴比为 1.01~1.5);有些株系的病毒粒体呈明显的棒状(轴比大于 2.2);有些棒状粒体达 70 nm。棒状粒体的有无及比例因株系而异。

#### 2.7 病毒基因组

正单链 RNA,3 分体基因组,RNA-1 长 3.662 kb,RNA-2 长 2.507 kb,RNA-3 长 1.887 kb。

### 3 仪器设备、用具及试剂

#### 3.1 仪器设备

酶标检测仪、天平(1/10 000 g)、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、紫外透射仪、隔离温室、榨汁机、水浴锅等。