

ICS XX. XXX. XX

CCS X XX

T/JSHS

团 体 标 准

T/JSHS X-202X

菜豆普通花叶病毒检测鉴定方法

Detection and identification of bean common mosaic virus

202X—XX—XX 发布

202X—XX—XX 实施

江苏省园艺学会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 试剂、仪器设备及用具.....	1
6 样品准备.....	2
7 检测鉴定方法.....	2
8 结果记录与样品保存.....	5
附录 A（资料性附录）菜豆普通花叶病毒其他信息.....	8
附录 B（资料性附录）PCR 检测.....	9
附录 C（资料性附录）双抗体夹心酶联免疫吸附测定（DAS-ELISA）.....	10

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省园艺学会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院 中国农业科学院植物保护研究所。

本文件主要起草人：崔晓艳、陈新、李方方、袁星星。

菜豆普通花叶病毒检测鉴定方法

1 范围

本文件规定了菜豆普通花叶病毒的分子生物学和血清学检测方法。

本文件适用于豆科等植物材料及种子中含有菜豆普通花叶病毒的检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 菜豆普通花叶病毒

菜豆普通花叶病毒（Bean common mosaic virus, BCMV）属于马铃薯 Y 病毒科（Potyviridae），马铃薯 Y 病毒属（Potyvirus）病毒，是一种在世界范围豆科植物上广泛发生的植物病毒，可侵染藜科、茄科、苋科、豆科、番杏科等 9 科 44 属的约 100 多种植物。近年来，受 BCMV 侵染引发的植物病害已经在中国浙江、山东、济南和南京等多地的经济作物上频繁发生，对我国广泛种植的豆科作物如大豆、菜豆、豇豆等的规模化生产造成了严重威胁。关于菜豆普通花叶病毒（BCMV）的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

菜豆普通花叶病毒的基因组特征和血清学特性是该病毒检测鉴定方法建立的依据。根据菜豆普通花叶病毒的基因组特征建立特异 PCR；依据菜豆普通花叶病毒与抗体之间的特异性反应，对植物样品进行双抗体夹心酶联免疫吸附测定（Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA）；通过这些方法的有效组合，判断样品中是否带有菜豆普通花叶病毒。

5 试剂、仪器设备及用具

5.1 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682-2008 中相关规定。
PCR 试剂符合附录 B 中的 B.1；
DAS-ELISA 试剂符合附录 C 中的 C.1。

5.2 仪器设备

高速冷冻离心机、电子天平、PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、水平电泳系统、-20 °C 低温冰箱和 -80 °C 超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH 计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、分光光度计、酶标仪等。

5.3 用具

可调移液枪（2.5 μL，10 μL，20 μL，100 μL，200 μL，1000 μL）、移液枪吸头、1.5 mL 离心管、研钵、酶联板等。

6 样品准备

6.1 植物材料制样

待测样品为植物材料（新鲜植物叶片、茎秆、侧枝、叶柄、或豆荚）时，挑选有疑似症状的部位单独取样编号，症状描述见附录 A；未表现症状的植物材料分组（2-3 份植物材料为 1 组）编号，采集的每组样品进行单独标注。相关材料根据所使用的鉴定方法 8.1-8.3 进行样品制备。

6.2 种子制样

待检测样品为种子时，随机取 0.5g-2 g 种子，研磨成粉末后加入 TrizoL 试剂，充分浸泡后离心取上清液，用于后续检测。

7 检测鉴定方法

7.1 PCR 检测

PCR 检测设置阴性和阳性对照：健康的植物组织作为阴性对照，感染菜豆普通花叶病毒的植物组织作为阳性对照，灭菌双蒸水（ddH₂O）作为空白对照。分别提取样品和对照的总 DNA 后进行 PCR 检测，具体操作步骤如下：

7.1.1 样品 RNA 提取

称取 0.1g 样品加液氮研磨成粉末状，迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 的 TrizoL 试剂，剧烈振荡 3 min；4 °C 12000r/min 离心 10min，将上清液移入一新离心管中，加入 0.5mL 三氯甲烷，剧烈振荡 15s；4 °C 12000r/min 离心 15min；小心吸取上层无色水

相到新离心管中;加入等体积异丙醇,混匀;室温静置 10min;4 °C 12000r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 75% 的冷乙醇洗涤沉淀,4 °C 10000r/min 离心 10min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后溶于 30 μ l ~100 μ l RNase-freeH₂O 中,-80 °C 保存备用。或者按照商品化 RNA 提取试剂盒进行操作。

7.1.2 cDNA 合成

使用 SuperScript™ III Reverse Transcriptase 体系进行,先把下列组分加到 PCR 管中: Oligo (dT)12-18 1 μ l, 总 RNA 4 μ g 10 mM dNTP Mix 1 μ l 加 DEPC 水到 13 μ l 65°C 保温 5min 至于冰上,后依次加入一下组分: 5X cDNA Synthesis Buffer 4 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, RNaseOUT (40 U/ μ l) 1 μ l, 超纯水 1 μ l, SuperScript™ III RT (200U/ μ l) 1 μ l 将混合物轻轻混匀 50°C 保温 60min,再 70°C 保温 15min,所获得的 cDNA 置于-20°C 备用。

7.1.3 设计引物序列

正向引物 BCMV-F: 5'- TGAAATGTGGTACAATGCTGTG -3';

反向引物 BCMV-R: 5'- CGACGCGAGATGCTAACTG -3'。

扩增片段长度约 575 bp。

7.1.4 PCR 扩增

检测时以含有菜豆普通花叶病毒的目标片段的质粒或含病毒材料作为阳性对照,以不含病毒的健康植物组织作阴性对照,同时以水代替模板作为空白对照。

PCR 反应体系为: PCR Master Mix 12.5 μ L; PCR 引物 F 1 μ L; PCR 引物 R 1 μ L; cDNA 模板 2 μ L; ddH₂O 8.5 μ L, 总体积 25 μ L,

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 重复 30 个循环; 72 °C 继续延伸 10 min。

7.1.5 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶,然后将 PCR 产物加入到样品孔中,同时加入 DNA 分子量标准物作分子量标记,进行电泳。电泳结束后在凝胶成像系统中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍照,并保存照片。

7.1.6 结果判定

如果阴性对照和空白对照未出现片段,阳性对照出现预期 575 bp 左右的片段,样品未出现预期大小的片段,判定结果为阴性。

如果阴性对照和空白对照未出现片段,阳性对照出现预期 575 bp 左右的片段,样品出现预期大小的片段,通过序列测定和 BLAST 分析对 PCR 产物进一步确认,确认为菜豆普通花叶病毒的序列相似性为 \geq 90%,判定结果为阳性。

7.2 DAS-ELISA 测定

把制备的样品上清液加入已包被菜豆普通花叶病毒抗体的酶联板中，进行 DAS-ELISA 检测。

每一个样品平行加到三个孔中。健康的植物组织作为阴性对照，感染菜豆普通花叶病毒的植物组织作为阳性对照，样品提取缓冲液作为空白对照；其中阴性对照的植物种类和材料（如健康的植物叶片）应尽量与检测样品相一致。具体操作步骤如下：

7.2.1 包被抗体

按要求的浓度和体积用包被缓冲液稀释包被抗体（一般用包被缓冲液以 1:5000 比例稀释抗体），每孔加 200 μL 。酶联板加盖或用保鲜膜包好，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。清空孔中溶液，用 1 \times PBST 缓冲液加满各孔，3 min 后倒掉孔中溶液，在吸水纸上拍干。再重复 2 次上述洗板过程。

7.2.2 样品制备与加样

待测样品在研钵中研磨后，与抽提缓冲液按 1:5~10 (W/V) 混合；3 000 r/min 离心 5 min，上清液即为制备好的待检样品。阴性对照、阳性对照、空白对照作相应处理或按说明书进行。按 200 μL /孔分别加入制备好的待检样品、阴性对照、阳性对照和空白对照；酶联板加盖或用保鲜膜包好，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。酶联板用 1 \times PBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 3 min。

7.2.3 加酶标抗体

按说明将酶标抗体稀释至工作浓度并加入到酶联板中，200 μL /孔，酶联板加盖或用保鲜膜包好，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。酶联板用水彻底冲洗，再用 1 \times PBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 3 min。

7.2.4 加底物

将底物对硝基苯磷酸二钠 (pNPP) 加入到底物缓冲液中，使终浓度为 1 mg/mL（现配现用），200 μL /孔加入到酶联板中，室温避光孵育 60 min 或按厂家说明书进行。

7.2.5 读数

根据实际情况选择不同的时间内如 30 min、60 min、90 min、120 min 或更长时间，用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值，或按厂家说明书进行。

7.3 结果判定

7.3.1 质量控制要求

对照孔的 OD₄₀₅ 值（缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔）应在质量控制范围内，即：缓冲液孔和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值 < 0.10，当阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值 < 0.05 时，按 0.05 计算；阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 5；同一样品的重复性基本一致。对照孔的 OD₄₀₅ 值不满足质量控制范围内的，应重新进行检测。

7.3.2 结果判定

在满足 D.3.1 的质量控制要求后，结果原则上可判断如下：样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 > 2，判为阳性；样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值为 2 时，判为可疑样品，可重做一次或用 PCR 或荧光定量 PCR 验证；样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值 < 2，判为阴性。若不满足 D.3.1 的质量控制要求，则不能进行结果判断。

8 结果记录与样品保存

8.1 结果记录

结果记录参考下表：菜豆普通花叶病毒（BCMV）检测结果记录样表。具体信息包括样品的种类（大豆或其他植物）、样品类型（新鲜植物叶片、茎秆、侧枝、叶柄、豆荚或种子）、样品来源（采集地点、时间、采集人）、检测信息（检测时间、地点、方法、检测人员）和检测结果（阳性、阴性、应重测等）。PCR 检测结果应有电泳图片；DAS-ELISA 检测结果应有酶联反应数值。

菜豆普通花叶病毒（BCMV）检测结果记录样表

记录编号：S-2020-001

1. 样品基本信息

项目	内容
样品编号	S001
样品种类	<input type="checkbox"/> 大豆 <input type="checkbox"/> 其他（请注明）：_____
样品类型	<input type="checkbox"/> 新鲜叶片 <input type="checkbox"/> 茎秆 <input type="checkbox"/> 侧枝 <input type="checkbox"/> 叶柄 <input type="checkbox"/> 豆荚 <input type="checkbox"/> 种子
样品来源	采集地点：XX 省 XX 市 XX 县/区（具体田间地块） 采集时间：YYYY-MM-DD 采集人：姓名

2. 检测信息

项目	内容
检测项目	菜豆普通花叶病毒 (BCMV) 检测
检测方法	<input type="checkbox"/> 常规 PCR <input type="checkbox"/> 荧光定量 PCR <input type="checkbox"/> DAS-ELISA <input type="checkbox"/> 其他
检测单位/地点	XX 实验室
检测时间	YYYY-MM-DD
检测人员	姓名

3. 检测结果与记录

请根据所选检测方法，填写相应部分：

A. 常规 PCR 检测

检测结果	<input type="checkbox"/> 阳性 <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 需重测
电泳图片编号/附件	例如：Gel_S001.jpg
备注	例如：条带大小是否符合预期等

B. DAS-ELISA 检测

检测结果	<input type="checkbox"/> 阳性 <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 需重测
酶联反应吸光度值 (OD405nm)	例如：0.85
阴性对照值	例如：0.02
阳性/阴性判断标准 (P/N 值)	例如：样品 OD 值 / 阴性对照 OD 值 ≥ 2.1 判为阳性
备注	重复孔间变异等

4. 结果审核

项目	内容
结论	该样品经检测，结果为： <input type="checkbox"/> 菜豆普通花叶病毒阳性 <input type="checkbox"/> 阴性 <input type="checkbox"/> 结果无效（需重测）
审核人	姓名
审核日期	YYYY-MM-DD

8.2 样品保存

阳性样品直接放于-80℃超低温冰箱或冷冻干燥后放于-80℃超低温冰箱，至少保存一年。保存的样品要做好标记和登记工作，以备复验、谈判和仲裁。保存期满后，应经灭活处理。

附录 A

(资料性)

菜豆普通花叶病毒其他信息

A.1 寄主范围

可侵染藜科、茄科、苋科、豆科、番杏科等 9 科 44 属的约 100 多种植物。自然寄主主要为大豆 (*Glycine max*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、蚕豆 (*Vicia faba* L.)、豌豆 (*Pisum sativum*)、大豆 (*Glycine max*)、小豆 (*V. angularis*) 等豆科植物。

A.2 症状

该病在感染的植物中诱发多种症状，包括花叶、脉带、叶片皱缩、卷曲、畸形和植物发育迟缓等。

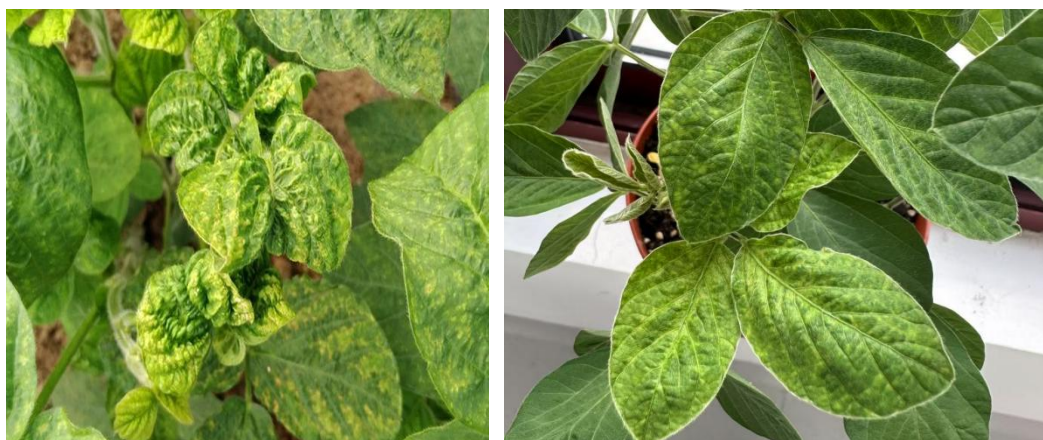


图 A.1 菜豆普通花叶病毒侵染大豆引起的症状

A.4 传播途径

主要由种子、蚜虫、机械摩擦进行传播。

A.5 粒体形态

病毒颗粒弯曲线状，无包膜，长约 650~900 nm，直径约 11~15 nm。基

A.6 基因组

正义单链 RNA，长约 10kb

附录 B
(规范性)
PCR 检测

B.1 试剂

B.1.1 核酸提取及扩增试剂

核酸提取试剂:TrizoL 或其他核酸提取试剂。

RT-PCR 扩增试剂:一步 RT-PCR 扩增试剂或反转录、PCR 扩增试剂。

B.1.2 电泳缓冲液 TAE (50×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242g

冰乙酸(C₂H₄O₂) 57.1ml

乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA • 2H₂O) 37.2g

灭菌双蒸水定容至 1000ml,用时稀释至 1×TAE。

注:等效产品同等使用。

附录 C
(规范性)
双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (DAS-ELISA)

C.1 试剂

C.1.1 包被抗体

特异性的菜豆普通花叶病毒衣壳抗体 (建议使用单克隆抗体); 抗体使用时的稀释比例按说明书要求稀释。

C.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的菜豆普通花叶病毒抗体。

C.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠 (pNPP)。

C.1.4 1×PBST 缓冲液 (pH7.4)

氯化钠 (NaCl) 8.0g

磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 0.2g

磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄) 1.15g

氯化钾 (KCl) 0.2g

吐温-20 (Tween-20) 0.5mL

叠氮钠 (NaN₃) 0.2g

溶于900mL灭菌双蒸水中,并用灭菌双蒸水定容至1000mL,4℃储存。

C.1.5 样品抽提缓冲液 (pH7.4)

亚硫酸钠 (Na₂SO₃) 1.3g

聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP, MW24000~40000) 20.0g

溶于900mL灭菌双蒸水中,并用灭菌双蒸水定容至1000mL,4℃储存。

C.1.6 包被缓冲液 (pH9.6)

碳酸钠 (Na₂CO₃) 1.59g

碳酸氢钠 (NaHCO₃) 2.93g

叠氮钠(NaN₃) 0.2g

溶于900mL灭菌双蒸水中,并用灭菌双蒸水定容至1000mL,4℃储存。

C. 1. 7 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

牛血清白蛋白(BSA) 2.0g

聚乙烯基吡咯烷酮(PVP, MW24000~40000) 20.0g

溶于1000mL1×PBST 缓冲液中,4℃储存。

C. 1. 8 底物缓冲液(pH9.8)

二乙醇胺 97mL

GB/T45587—2025氯化镁(MgCl₂) 0.1g

叠氮钠(NaN₃) 0.2g

溶于800mL灭菌双蒸水,用浓盐酸(HCl)调pH 至9.8,定容至1000mL,4℃储存。注:等效产品同等使用。

江苏省园艺学会团体标准
《菜豆普通花叶病毒检测鉴定方法》

版权专有 不得翻印