

### 水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒 多重 RT-PCR 检测方法

Multiplex RT-PCR Method of *Narcissus yellow stripe virus*, *Narcissus mosaic virus* and  
*Narcissus latent virus*

地方标准信息服务平台

2016 - 04 - 06 发布

2016 - 07 - 06 实施

---



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》给出的规则编写。

本标准由福建出入境检验检疫局提出并归口。

本标准起草单位：福建出入境检验检疫局、福建农林大学。

本标准主要起草人：沈建国、高芳銮、金晶、李敏、虞赟、陈细红、陈寿铃。

地方标准信息服务平台



# 水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒 多重 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒的多重RT-PCR检测方法。  
本标准适用于水仙鳞球茎、植株中水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒的多重RT-PCR检测。

## 2 规范性文件

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方法

SN/T 2964 植物病毒检测规范

SN/T 3457 植物病毒分子生物学检测规范

## 3 有害生物基本信息

参见附录A。

## 4 原理

水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒分子生物学特性是多重RT-PCR检测的主要依据。

## 5 仪器设备和主要试剂

### 5.1 仪器设备

高速冷冻离心机、电子天平（1/1000 g）、PCR仪、电泳仪、水平电泳槽、-20 ℃低温冰箱和-80 ℃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、超净工作台等。

### 5.2 主要试剂

多重RT-PCR检测试剂见附录B。

## 6 抽样和样品制备

### 6.1 抽样

抽样方法按照SN/T 2122中规定执行，尽可能抽取有病毒危害症状的材料，水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒的危害症状描述参见附录A。

## 6.2 样品制备

分别按照有症状和无症状进行样品制备，具体方法按照SN/T 2964和SN/T 3457中规定执行。

## 7 多重 RT-PCR

具体方法见附录B。

## 8 序列测定

PCR产物纯化、回收后，进行克隆、测序，或者直接测序。利用美国国立生物技术信息中心（NCBI）网站上的BLAST软件把测序所得到的核苷酸序列与已知的相应病毒序列进行比对，同源性达到95%以上，则判定为该病毒序列。

## 9 结果判定

- 9.1 当 RT-PCR 检测结果呈阳性，测定的序列为水仙黄条病毒序列，则判定为检出水仙黄条病毒。
- 9.2 当 RT-PCR 检测结果呈阳性，测定的序列为水仙花叶病毒序列，则判定为检出水仙花叶病毒。
- 9.3 当 RT-PCR 检测结果呈阳性，测定的序列为水仙潜隐病毒序列，则判定为检出水仙潜隐病毒。
- 9.4 当 RT-PCR 检测结果呈阴性，则判定为未检出对应目的条带大小的病毒。

## 10 结果判样品保存

经检测，结果判定为阳性的样品应保存在-20 ℃或-80 ℃冰箱中，并作好登记和标记工作，以备复核用。

## 11 记录

记录好各项实验数据，包括样品来源、种类、时间，实验的时间、地点、方法和结果等，并要有经手人和实验人员的签字。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。

## 附录 A (资料性附录)

### 水仙黄条病毒、水仙花叶病毒、水仙潜隐病毒的背景资料

#### A.1 分类地位

水仙黄条病毒:

学名: *Narcissus yellow stripe virus*, 缩写: NYSV。

分类地位: 马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)、马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*)。

水仙花叶病毒:

学名: *Narcissus mosaic virus*, 缩写: NMV。

分类地位: 线性病毒科 (*Flexiviridae*)、马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*)。

水仙潜隐病毒:

学名: *Narcissus latent virus*, 缩写: NLV。

分类地位: 马铃薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)、柘橙病毒属 (*MacIuravirus*)。

#### A.2 寄主范围

NYSV: 自然寄主目前已报道的主要为水仙属 (*Narcissus* spp.) 的水仙。

NMV: 自然寄主目前已报道的主要为黄水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*)。

NLV: 自然寄主目前已报道的主要为黄水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*)、鸢尾 (*Iris xiphium*)、剑兰 (*Gladiolus hybrids*)、根希百合 (*Nerine sarniensis*)。

#### A.3 病害症状

NYSV: 典型症状为沿叶脉产生褪绿黄色条斑, 系统花叶, 病叶表面有凸起, 花梗产生褪绿斑, 病株花朵着色不均, 最后导致鳞茎变小、植株矮化, 直至提前枯萎。

NMV: 初期无症状或叶片上部仅有轻微的不规则褪绿小斑, 但随着病情加重, 病斑表现明显的花叶, 并扩展为较大的斑块。发病严重时, 引起叶片扭曲、黄化, 植株矮小畸形, 鳞茎变小, 种球退化。

NLV: 单独侵染水仙后引起叶片顶端产生褪绿黄色条斑, 与其他病毒复合侵染时导致水仙植株出现花叶、斑驳、黄化、坏死、花箭减少、香味变淡以及矮化畸形等症状。

#### A.4 分布地区

NYSV: 主要分布于英国、荷兰、立陶宛、美国、新西兰、中国。

NMV: 主要分布于英国、荷兰、中国。

NLV: 主要分布于英国、荷兰、德国、意大利、以色列、澳大利亚、中国。

#### A.5 传播途径

NYSV: 汁液接触、蚜虫传播。

NMV: 汁液接触。

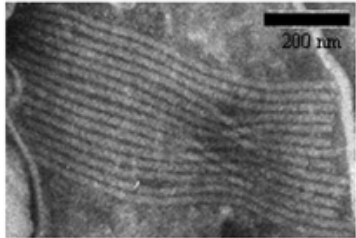
NLV: 汁液接触、蚜虫传播。

### A.6 粒体形态

NYSV: 病毒粒体为线条状, 大小约 755 nm×12 nm, 粒体形态见图 A.1。

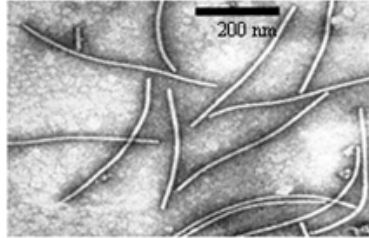
NMV: 病毒粒体为线条状, 大小约 550 nm×13 nm, 粒体形态见图 A.2。

NLV: 病毒粒体为线状, 大小约 650 nm×13 nm, 粒体形态见图 A.3。



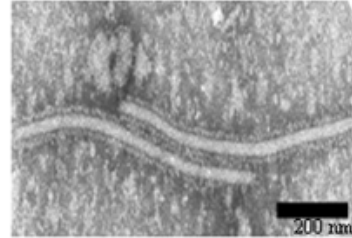
注: 引自<http://www.dpvweb.net>

图A.1 NYSV 病毒粒体



注: 引自<http://www.dpvweb.net>

图 A.2 NMV 病毒粒体



注: 引自<http://www.dpvweb.net>

图 A.3 NLV 病毒粒体

### A.7 病毒基因组

NYSV: 正义单链 RNA 病毒, 全长约 9650 bp。

NMV: 正义单链 RNA 病毒, 全长约 6955 bp。

NLV: 正义单链 RNA 病毒, 全长尚未见报道。

地方标准信息服务平台



附录 B  
(规范性附录)  
多重 RT-PCR 检测方法

## B.1 试剂

## B.1.1 Trizol 裂解液

## B.1.2 5xTBE 缓冲液

Tris碱 54.0 g  
硼酸 27.5 g  
0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 20 mL  
补充蒸馏水至 1 L

## B.2 实验步骤

## B.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 待检样品, 用液氮研磨成粉末状, 迅速转移至灭菌的 1.5 mL 离心管中, 并加入 1 mL Trizol 裂解液, 剧烈振荡后, 室温静置 5 min; 4 °C, 12000 g 离心 10 min, 取上清; 加入氯仿 200 μL, 剧烈震荡 15 s, 室温静置 3 min, 4 °C, 12000 g 离心 15 min, 取上层水相; 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀后室温下静置 5 min, 4 °C, 12000 g 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次, 每次 4 °C, 7500 g 离心 5 min, 弃上清; RNA 沉淀干燥后, 用 20 μL~40 μL 经 DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理过的双蒸水 (ddH<sub>2</sub>O) 溶解, -20 °C 保存备用。

## B.2.2 RT-PCR 反应

## B.2.2.1 引物序列

表 B.1 引物序列

病毒名称	引物序列	目的条带大小
水仙黄条病毒	NYSV-f: 5'-AAGCAAAGTGTGCCAGTG-3' NYSV-r: 5'-CCATCCAGCCCAAATAAG-3'	668 bp
水仙花叶病毒	NMV-f: 5'-CGCTCGACAGTTTACGT-3' NMV-r: 5'-TCTGGAGGTGCTTCAATG-3'	372 bp
水仙潜隐病毒	NLV-f: 5'-GATGCGACTGCTCAAGGC-3' NLV-r: 5'-CAGGCTGTCAATTGCTTACC-3'	554 bp

## B.2.2.2 cDNA 合成

在PCR管中加入3  $\mu\text{L}$ 总RNA, 0.5  $\mu\text{L}$  各病毒下游引物, 95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴7 min, 迅速冰浴5 min, 再加入5 $\times$ RT 缓冲液2.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ 、M-MLVRT(200 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNasin(40 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ 和ddH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴60 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min, 自然冷却至室温, -20  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### B. 2. 2. 3 PCR扩增

PCR反应体系见表B. 2, 每个反应设置2个重复。检测时以含有各病毒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反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 然后94  $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s、50  $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s、72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s, 35个循环, 最后一个循环结束后72  $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸10 min。

表 B. 2 PCR 反应体系

名称	加样量/ $\mu\text{L}$
反转录产物	3.0
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5
dNTPs (10 mmol/L)	0.5
10 $\times$ PCR 缓冲液 (Mg <sup>2+</sup> Free)	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1.5
NYSV-f (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	1.2
NYSV-r (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	1.2
NMV-f (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	0.8
NMV-r (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	0.8
NLV-f (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	0.5
NLV-r (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )	0.5
ddH <sub>2</sub> O	12.0
总体积	25

### B. 2. 3 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照: 不含病毒的健康植物组织; 阳性对照: 含有水仙黄条病毒、水仙花叶病毒、水仙潜隐病毒的植物组织; 空白对照: ddH<sub>2</sub>O。

### B. 2. 4 琼脂糖凝胶电泳

制备1.5%的琼脂糖凝胶, 然后将PCR产物与上样缓冲液按比例混合均匀, 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。当溴酚蓝移动到离底部约0.5 cm时, 停止电泳, 在装有

浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭（EB）溶液的容器中染色，然后在清水中清洗，再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。

### B.3 结果判断

如果阳性对照有特异性条带，阴性对照和空白对照无特异性扩增，待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带，则判定为阳性。

如果阳性对照、阴性对照和空白对照正确，待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带，则判定为阴性。

---

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台

福建省地方标准

水仙黄条病毒、水仙花叶病毒和水仙潜隐病毒  
多重 RT-PCR 检测方法

DB35/T 1555—2016

\*

2016年9月第一版 2016年9月第一次印刷