

辣椒轻斑驳病毒检验检测技术规程

Technical Regulations for Detection of *Pepper mild mottle virus*

地方标准信息服务平台

2013-05-27 发布

2013-06-15 实施

河北省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由河北农业大学提出。

本标准起草单位：河北农业大学。

本标准主要起草人：王亚南、曹克强、王树桐、胡同乐、杨军玉、冀志蕊。

地方标准信息服务平台

辣椒轻斑驳病毒检验检测技术规程

1 范围

本标准规定了辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 的检验检测与鉴定方法。本标准适用于可能带有辣椒轻斑驳病毒的甜 (辣) 椒种子和苗木的检验检测工作。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

辣椒轻斑驳病毒病

是由辣椒轻斑驳病毒危害辣椒属植物引起的一种病毒病害, 在甜 (辣) 椒上表现为不同程度的叶片或 (和) 果实的变色、斑驳、畸形或坏死条斑甚至植株矮化等症状。

2.2

辣椒轻斑驳病毒

是危害辣椒属植物的一种烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*) 病原病毒, 学名为 *Pepper mild mottle virus*, 简写PMMoV。病毒粒体直杆状, 基因组为正单链RNA, 由6357个核苷酸组成。

3 原理

依据PMMoV具有很强的免疫原性, 可采用ELISA或免疫胶体金试纸条方法进行检测; 依据PMMoV基因组序列的特异性, 可采用RT-PCR方法进行检测。PMMoV病原特性见附录A。

4 材料、仪器、用具及药品

4.1 材料

甜 (辣) 椒种子、叶片或果实。

4.2 仪器、用具

超低温冰箱 (箱内温度可达-80℃以下);
高速冷冻台式离心机 (最高转速在12000 r/min以上);
PCR仪 (常规配置);
凝胶成像系统 (常规配置);
电泳仪 (常规配置);
水平电泳槽 (常规配置);
酶标仪 (常规配置);

各种量程的可调移液器（1000 μL 、200 μL 、20 μL 、10 μL 、5 μL ）；
各种吸头（1000 μL 、200 μL 、20 μL 、10 μL 、5 μL ）；
离心管（1.5 mL、0.6 mL、0.2 mL）；
量筒（1000 mL）。

4.3 主要试剂

主要试剂和缓冲液见附录C、D、E。

5 调查与取样

5.1 田间调查

在甜（辣）椒生长期进行调查，带有附录B记述的PMMoV为害症状的植株为疑似病株。

5.2 种子取样

在11月~翌年2月份对市场销售的甜（辣）椒种子进行扦样（数量以满足检测鉴定所需为限），然后进行检测与鉴定。

5.3 田间样品采集与保存

选取疑似病株上症状明显的叶片或果实（其数量以满足检测鉴定所需为限），装入聚乙烯塑料袋中密封，放入带有冰块的采集箱中带回实验室。采集袋标签应注明采集时间、地点、采集人等信息。采集的样品应放入超低温冰箱中（-80℃）保存，要尽早进行检测与鉴定。

6 检测与鉴定

6.1 免疫胶体金试纸条测定

将疑似病株少量发病叶片或果实预先研磨成汁液，利用免疫胶体金试纸条进行检测。具体操作见附录C。

6.2 双抗体夹心酶联免疫吸附测定（DAS-ELISA）

将样品粗提液加入已包被PMMoV抗体（市售）的酶联板中，进行DAS-ELISA检测。每个样品平行加到两个孔中。设无病组织阴性对照、染病组织阳性对照和提取缓冲液空白对照，其中阴性对照种类和材料应尽量与检测样品一致。具体操作见附录D。

6.3 反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）

分别提取各样品总RNA，反转录合成cDNA，进行PCR扩增。设无病组织阴性对照、染病组织阳性对照和超纯水空白对照。具体操作见附录E。

7 结果判定与记录

免疫胶体金试纸条适用于田间快速诊断，DAS-ELISA适合于样品批量检测，RT-PCR技术适用于病毒精准鉴定。在需要田间现场快速检测的情况下可选择免疫胶体金试纸条方法，检测为阳性，可判定为检出PMMoV，检测为阴性，初步判断为未检出PMMoV，若需准确鉴定，应采用RT-PCR复检；样品批量检测选

用DAS-ELISA方法,若DAS-ELISA检测为阳性,可判定为检出PMMoV, DAS-ELISA检测为阴性,应采用RT-PCR方法复检。

完整的实验记录包括:样品来源、品种、时间、地点、方法和结果等。PCR检测需要有电泳结果照片;酶联测定需要有酶联板反应的照片和原始数据;免疫胶体金试纸条测定需要有试纸条检测结果照片或妥善保存的试纸条。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
辣椒轻斑驳病毒病原特征

A.1 分类和命名

A.1.1 学名

Pepper mild mottle virus (PMMoV)。

A.1.2 分类地位

烟草花叶病毒属 (Tobamovirus)。

A.2 病原特征

A.2.1 病毒粒子

病毒粒体外无囊膜包被，螺旋对称结构，直杆状，大小为18nm×312nm。轴芯直径4nm，螺旋结构明显，螺距2.3nm。

A.2.2 核酸

单链RNA，分子量 2×10^6 。基因组RNA由6357个核苷酸组成，共有4个ORF。

A.2.3 蛋白

分子量17 kD。

A.2.4 致病型

针对烟草花叶病毒属病毒产生的过敏反应介导的抗性，在辣椒属栽培品种中已经发现有L₁、L_{1a}、L₂、L₃、L₄等抗性基因群。烟草花叶病毒属病毒能否克服L 基因介导的抗性能力由其自身的致病型决定，分为P₀、P₁、P_{1.2}、P_{1.2.3}、P_{1.2.3.4}等5种致病型。目前，在PMMoV 中已经先后发现P_{1.2}、P_{1.2.3}、P_{1.2.3.4}等3种致病型，分别能够侵染携带L₂、L₃、L₄抗性基因的辣椒品种。

附 录 B (资料性附录)

辣椒轻斑驳病毒的寄主范围、地理分布、生物学特性、为害症状、传播途径及鉴别寄主

B.1 寄主范围

B.1.1 自然寄主

辣椒属植物。

B.1.2 寄主范围

苋色藜、昆诺藜、曼陀罗、烟草、矮牵牛、罗勒、洋酸浆。

B.2 地理分布

目前, PMMoV 在世界已广泛分布, 阿根廷、澳大利亚、丹麦、法国、匈牙利、冰岛、意大利、日本、荷兰、西班牙、英国、美国及我国的新疆、山东、宁夏、北京、河北等省发生。

B.3 生物学特性

B.3.1 致死温度

辣椒轻斑驳病毒的致死温度95℃。

B.3.2 稀释限点

辣椒轻斑驳病毒的稀释限点为 10^{-6} mL/L~ 10^{-8} mL/L。

B.3.3 体外存活期

辣椒轻斑驳病毒体外存活期30d以上。

B.3.4 等电点

辣椒轻斑驳病毒粒子等电点pH为3.38~3.7。

B.4 为害症状

在不同品种的甜(辣)椒上症状略有变化, 但多数很相似。一般包括叶片不同程度的变色、叶片卷曲。果实的斑驳、扭曲畸形、变小或颜色的改变, 有时果实或叶片有明显的褐色坏死条斑。严重的造成植株生长缓慢, 矮化等症状。

B.5 传播方式

PMMoV有多种传播方式：1. 种子传播；2. 接触传染（包括植物间接触、农事操作、汁液）；3. 病残体或带有病残体的土壤；4. 其他（啮齿动物的粪便、栽培营养液、河水、灌溉水、被污染的包装容器、用作肥料的牛粪）。其中带毒种子是远距离传播主要途径，接触性传染是近距离传播主要途径。

B.6 鉴别寄主

B.6.1 白曼陀罗 (*Datura metel*)

局部坏死症状。

B.6.2 曼陀罗 (*Datura stramonium*)

局部枯斑症状，无系统侵染。

B.6.3 昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*)

局部斑驳症状，无系统侵染。

B.6.4 心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*)

局部枯斑症状，无系统侵染。

B.6.5 野生烟 (*Nicotiana sylvestris*)

局部枯斑症状，无系统侵染。

B.6.6 珊西烟 (*Nicotiana Xanthi-nc*)

局部枯斑症状，无系统侵染。

地方标准信息服务平台

附录 C

（规范性附录）

辣椒轻斑驳病毒免疫胶体金试纸条测定

C.1 检测样品处理

植物样品在检测前需加缓冲液研磨。植物叶片样品可使用配套制样袋进行样品处理，将样品叶片（半片至一片）放入制样袋中，用研磨棒在制样袋外侧充分研磨。

C.2 样品检测

使用前将试纸条恢复至室温（15℃~30℃）。从包装中取出试纸条，有“箭头”标记端为样品端。样品端垂直向下，插入准备好的样品液中。样品液不要超过胶体金试纸条上的MAX线。在检测过程中，检测条应一直浸在样品液中，直到检测液升至检测膜的中部，取出放平，阅读检测结果。

C.3 结果判定

阳性结果：质控线显粉红色，测试线也显粉红色，检测结果为阳性。

阴性结果：质控线显粉红色，测试线未显色，检测结果为阴性。

无效结果：质控线和测试点线均未显色，说明试纸条失效，检测结果无效。

C.4 注意事项

C.4.1 试纸条应在有效期内使用。

C.4.2 试纸条应在2℃~8℃冰箱内密封干燥保存。使用时注意未用的要密封。以免吸湿而失效。使用温度应在15℃~30℃。

C.4.3 样品制备对检测结果影响明显。如样品液中有大量组织块，会影响检测条吸取样品液；如样品液太稀，则易出现假阴性结果。

C.4.4 检测试纸条浸入样品液的深度：浸入深度不能超过“MAX”标记。如浸入太深，试纸条的一些有效成分会被稀释进入样品液中，而不是进入检测区实现检测反应，出现无效结果。如浸入太浅，则样品液扩散速度降低，甚至无法向上扩散，同样出现无效结果。

C.4.5 检测试纸条不能回收或重复使用。

附录 D
(规范性附录)

辣椒轻斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫吸附测定

D.1 试材

D.1.1 包被抗体

特异性辣椒轻斑驳病毒抗体（市售）。

D.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的辣椒轻斑驳病毒抗体（市售）。

D.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠（pNPP）。

D.1.4 提取缓冲液（pH7.4）

PVP（MW24,000~40,000）20.0 g，亚硫酸钠1.3 g，叠氮化钠0.2 g，调整pH至7.4，溶解于1L 1×PBST中，4℃贮存。

D.1.5 包被缓冲液

碳酸钠1.59 g，碳酸氢钠2.93 g，叠氮化钠0.2 g，调整pH至9.6，蒸馏水定容至1 L，4℃贮存。

D.1.6 洗涤缓冲液（PBST）

磷酸氢二钠（无水）1.15 g或磷酸氢二钠（十二水）2.9 g，磷酸二氢钾（无水）0.2 g，氯化钠8.0 g，氯化钾 0.2 g，吐温-20 0.5 mL调整pH至7.4，蒸馏水定容至1 L，室温贮存。

D.1.7 酶标抗体稀释缓冲液

牛血清蛋白（BSA）或脱脂奶粉 2.0 g，PVP（MW24,000~40,000）20.0 g，叠氮化钠0.2 g，调整pH至7.4，溶解于1 L 1×PBST中，4℃贮存。

D.1.8 底物缓冲液

二乙醇胺97.0 mL，氯化镁0.1 g，叠氮化钠0.2 g，调整pH至9.8，蒸馏水定容至1 L，4℃贮存。

D.2 DAS-ELISA检测程序

D.2.1 包被抗体

将PMMoV抗体按试剂盒说明进行稀释，加入酶联板孔中，每孔加100 μL，放入保湿盒内，室温孵育4 h或4℃孵育过夜，PBST洗涤4~6次，然后倒扣酶联板在吸水纸上甩板，清空残留液体。

D.2.2 样品制备

取样品按1:10 (W/V) 加入提取缓冲液研磨匀浆。2000 r/min离心10 min, 取上清4 ℃保存备用。

D. 2.3 加样

在酶联板中加入待测样品, 同时加入阳性对照、阴性对照和空白对照, 每孔加100 μL, 放入保湿盒内, 室温孵育2 h或恒温箱中或4 ℃孵育过夜, PBST洗涤4~6次, 甩板, 清空残留液体。

D. 2.4 加入酶标抗体

将酶标抗体按照试剂盒说明用酶标抗体缓冲液稀释, 加入酶联板中, 于每孔100 μL, 放入保湿盒内, 室温孵育2 h。PBST洗涤4~6次, 甩板, 清空残留液体。

D. 2.5 加底物

将pNPP加入底物缓冲液使终浓度为1mg/mL (现配现用), 混合均匀, 加入酶联板, 每孔100 μL。放入保湿盒, 室温避光显色30min~60min。

D. 2.6 终止反应

每孔中加入50 μL终止液, 终止反应。

D. 2.7 读数

酶标仪在405 nm下读取光密度值 (OD值)。

D. 3 结果评定

根据试剂盒提供的方法和标准。对照孔的 OD_{405} 应在质量控制范围之内, 即: 空白对照和阴性对照 OD_{405} 值应小于 0.15, 当阴性对照 OD_{405} 值小于 0.05 按 0.05 计算; 孔的重复性基本一致。

以微孔中阴性对照的2倍为标准, 大于这个数值的样品为阳性结果, 小于这个数值为阴性结果, 在阈值附近, 判定为可疑样品, 需重复试验或用其它方法验证。

地方标准信息服务平台

附 录 E (规范性附录)

辣椒轻斑驳病毒反转录聚合酶链式反应检测 (RT-PCR)

E.1 试剂

E.1.1 RNA 提取试剂

Trizol Reagent购自Invitrogen公司、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇。

E.1.2 反转录试剂

M-MLV反转录酶购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; dNTP和RNA酶抑制剂购自宝生物工程(大连)有限公司。

E.1.3 PCR 试剂

rTaq DNA 聚合酶、dNTP购自宝生物工程(大连)有限公司。
其他试剂: 液氮、氯仿、异丙醇、乙醇、琼脂糖、溴化乙锭。

E.2 检疫程序

E.2.1 总RNA的提取

植株叶片组织0.1g, 加入1ml Trizol裂解液充分研磨, 室温放置5 min; 加入氯仿200 μ L, 充分振荡15 sec, 室温放置2 min~3 min; 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C离心15 min; 取上层水相至新管中, 加入2/3体积的异丙醇, 室温放置40 min; 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C离心15min, 弃上清液, 加1 mL 75%乙醇(含0.1%DEPC)洗涤沉淀; 干燥RNA沉淀, 加DEPC H₂O 40 μ L溶解RNA, 55 $^{\circ}$ C孵育10 min。

E.2.2 RT-PCR反应体系

E.2.2.1 引物序列

上游引物(5'-引物): 5'-atttgccttcaaattgatcccg-3';
下游引物(3'-引物): 5'-tacatgtgtgacgtgtatttgcga-3'。

E.2.2.2 RT-PCR实验步骤

cDNA合成

DEPC H ₂ O:	4 μ L
病毒RNA :	2 μ L
下游引物:	1 μ L
5 \times MMLV Buffer:	4 μ L
	11 μ L

充分混合, 90 $^{\circ}$ C下变性1min, 立即置于冰上, 放置2min。

DEPC H₂O : 5.5 μ L

dNTPs (每种10 mmol/L)	2 μ L
Rnasin (40 U/ μ L)	0.5 μ L
MMLV反转录酶 (10 U/ μ L)	1 μ L
	<hr/>
	20 μ L

37℃孵育1 h, 70℃灭活10 min。

PCR扩增体系及程序

50 μ L体系中加入以下试剂:

反转录产物	2 μ L
5'-引物 (20 pmol/ μ L)	1 μ L
3'-引物 (20 pmol/ μ L)	1 μ L
dNTPs (每种10 mmol/L)	4 μ L
10 \times Taq酶反应缓冲液	5 μ L
ddH ₂ O	36.7 μ L
Taq酶 (5U/ μ L)	0.3 μ L
	<hr/>
	50 μ L

反应程序: 94℃预变性4 min; 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min。35个循环, 72℃延伸10 min。

E.2.2.3 凝胶电泳检测

取8 μ L 扩增产物加6 \times loading buffer混匀, 与适合的DNA分子量标准物一起加入到琼脂糖凝胶 (1.0%, 含0.5 μ g/mL溴化乙锭) 孔中, 进行电泳, 通过紫外透射仪观察电泳结果, 在凝胶成像系统上照相。

E.3 结果评定

阳性对照在1044 bp左右处有扩增片段, 阴性对照和空白对照无特异性扩增, 样品若出现与阳性对照相同大小的片段, 则判断样品携带辣椒轻斑驳病毒, 否则为阴性。