



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3447—2012

---

## 草莓簇生植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of strawberry multiplier phytoplasma

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

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

本标准主要起草人：栗智平、耿金培、张京宣、牟海青、鲁闽、栾晶、王颖。

# 草莓簇生植原体检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了草莓簇生植原体检疫鉴定的基本原则和分子生物学检测方法。  
本标准适用于草莓及草莓苗中草莓簇生植原体的检疫和鉴定。

## 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 1193 基因检验实验室技术要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**聚合酶链式反应** **polymerase chain reaction**

在聚合酶的作用下,以 DNA 为模板、dNTPs 为底物、两条反向的引物对为起点,根据碱基配对原则,按照 DNA 的核苷酸顺序,合成与模板互补的 DNA 链的过程。PCR 是一种体外基因扩增技术。

### 3.2

**SYBR Green 实时荧光 PCR** **SYBR Green realtime PCR**

SYBR Green 试剂中含有一种荧光染料,这种荧光染料可以与双链 DNA 结合而产生荧光,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程。随着 PCR 反应的进行,PCR 反应产物不断累计,荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环,收集一个荧光强度信号,就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化,从而得到一条荧光扩增曲线图。在整个 PCR 反应完成后,会生成一条熔解曲线,峰值的高低可以确定 PCR 产物的量,单峰表示 PCR 扩增的强特异性。SYBR Green 实时荧光 PCR 跟普通 PCR 引物一样,而不需要另外设计探针。

## 4 方法原理

### 4.1 分类地位

草莓簇生植原体(Strawberry multiplier phytoplasma)属于植原体 16Sr I-K 亚组。其他信息参见附录 A。

### 4.2 检测原理

本标准检测的主要依据是植原体的基因序列信息。首先,用根据植原体 16s RNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增,以确定检疫对象是否为植原体;然后,利用两对草莓簇生植原体的特异性引物,通过 SYBR Green 实时荧光 PCR 及电泳检测进行结果判定,确定检疫对象是否为草莓簇生植原体。

## 5 仪器设备、用具及试剂

### 5.1 主要仪器设备

高速冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、常规 PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像分析系统、天平(感量:0.001 g)、冷藏冷冻冰箱、旋涡振荡器、高温干燥箱、生物安全柜、水浴锅等。

### 5.2 主要用具

研钵和研棒、各种量程的可调移液器(2  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 000  $\mu$ L)、各种吸头(10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 000  $\mu$ L)、离心管(0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)等。

### 5.3 主要试剂

DNA 提取试剂详见附录 B;PCR 试剂详见附录 C;SYBR Green 实时荧光 PCR 试剂详见附录 D。

## 6 检测与鉴定

### 6.1 引物设计

根据草莓簇生植原体 16s rRNA 基因的保守序列,采用了一对植原体通用引物 P1,并设计了两对草莓簇生植原体特异性引物 P2 和 P3,具体序列及对应的基因片段长度如下:

P1F:5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

P1R:5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

P1F/P1R 对应的 PCR 产物长度为 1.24 kb。

P2F:5'-CGG CGC GCC TAA TAC ATG-3'

P2R:5'-TCC AGT CTT AGC AGT CAT TTC CAA C-3'

P2F/P2R 对应的 PCR 产物长度为 131 bp。

P3F:5'-AGA CTA TGA TGT GTA GCC GGA CTG-3'

P3R:5'-ACG TAC CGA AAT ACT TCA TCA TTC AC-3'

P3F/P3R 对应的 PCR 产物长度为 156 bp。

### 6.2 DNA 的提取

试剂及具体步骤详见附录 B。

### 6.3 通用引物的 PCR 扩增及电泳

试剂及操作详见附录 C。

### 6.4 SYBR Green 实时荧光 PCR 及电泳检测

若 6.3 中通用引物扩增出 1.24 kb 左右的 PCR 产物,则需要进一步的特异性 PCR 试验。试剂及具体操作详见附录 D。

若 SYBR Green 实时荧光 PCR 检测中结果呈阳性,则需将 PCR 产物进行进一步电泳观察。试剂及操作详见附录 C。

## 7 防污染措施

草莓簇生植原体检测过程的防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。制样用的研钵经过洗涤液清洗后,160 °C 干热处理 2 h。

## 8 结果判定

### 8.1 判断依据

8.1.1 P1 引物的 PCR 产物长度为 1.24 kb。

8.1.2 P2、P3 引物 SYBR Green 实时荧光 PCR 时有标准扩增曲线,且它们的 CT 极为接近;P2 熔解曲线峰值  $T_m=83.5\text{ }^{\circ}\text{C}(\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C})$ ,P3 熔解曲线峰值  $T_m=87.0\text{ }^{\circ}\text{C}(\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C})$ 。

8.1.3 P2 引物的 PCR 产物长度为 131 bp;P3 引物的 PCR 产物长度为 156 bp。

### 8.2 结果判定

若检测结果同时满足 8.1 的三个条件,则判定为阳性;否则判定为阴性。

## 9 样品保存与复核

### 9.1 样品保存与处理

经鉴定,确定携带草莓簇生植原体的病株样品应在 -20 °C 冰箱保存,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌处理方可丢弃。

### 9.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、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。SYBR Green 实时荧光 PCR 结果需要有 PCR 扩增曲线图和熔解曲线图;PCR 凝胶电泳需要有电泳结果图。结果记录与资料保存期限至少 1 年。



附 录 A  
(资料性附录)  
草莓簇生植原体其他相关信息

A.1 名称及简介

中文名:草莓簇生植原体

英文名:Strawberry multiplier phytoplasma

A.2 寄主范围

目前只发现草莓(Strawberry)植物为其自然寄主。寄主在我国的种植和分布范围都很大,容易定殖。

A.3 分布地区

该病原物主要分布于美国和加拿大,在我国尚未见发生,是我国新颁布的进境植物检疫性有害生物。

A.4 传播方式

主要通过带病的果苗和介体昆虫传播。易通过进口贸易运输传入。

A.5 经济影响

草莓是我国重要的水果作物,而该病由于病菌是由昆虫介体传播且速度相当快,因此一旦该病害传入具有较大的风险性。

附 录 B  
(规范性附录)  
DNA 提取试剂与方法

**B.1 主要试剂****B.1.1 CTAB 抽提液**

2%(质量浓度)CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)

100 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0

20 mmol/L EDTA, pH 8.0

1.4 mol/L NaCl

于室温保存(可在几年内保持稳定)

**B.1.2 CTAB/NaCl 溶液**(10% CTAB/0.7 mol/L NaCl):在 80 mL H<sub>2</sub>O 中溶解 4.1 g NaCl,缓慢加入 10 g CTAB(十六烷基三乙基溴化铵),同时加热并搅拌。如果需要,可加热至 65 ℃溶解。定容终体积至 100 mL。

**B.1.3 CTAB 沉淀液**

1%(质量浓度)CTAB

50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0

10 mmol/L EDTA, pH 8.0

于室温保存(可在几年内保持稳定)

**B.1.4 TE 缓冲液**

10 mmol/L Tris-Cl, pH 7.4, 7.5, 或 8.0

1 mmol/L EDTA, pH 8.0

pH 7.4, 7.5, 或 8.0

**B.1.5 巯基乙醇。****B.1.6 异丙醇。****B.1.7 70%酒精。****B.2 DNA 提取步骤**

**B.2.1** 取所选新鲜材料的韧皮部及叶中脉 0.3 g,取适量液氮研磨成粉状后转移至 2.0 mL 离心管,加入 CTAB 抽提缓冲液 900  $\mu$ L 和 18  $\mu$ L(2%体积)巯基乙醇,再加入 9  $\mu$ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀(振荡),在 65 ℃水浴 30 min~60 min。

**B.2.2** 加入等体积 Tris-苯酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),12 000 r/min 离心 5min。取上清液,加入等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1),直至上清液和下层有机溶液分层清晰为止。

**B.2.3** 取上清液,加入 1/10 体积 CTAB/NaCl(65 ℃预热),及等体积三氯甲烷:异戊醇(24:1),12 000 r/min 离心 5 min,重复直至分层清晰。

- B.2.4 取上清液,加入等体积 CTAB 沉淀液,颠倒混匀。
- B.2.5 加入 0.65 倍体积异丙醇,混匀后,12 000 r/min 离心 10 min。
- B.2.6 去上清液,保留沉淀,用 80%乙醇洗涤沉淀物 2~3 次,在超净工作台中晾干。
- B.2.7 灭菌双蒸水或 TE 缓冲液重悬沉淀物,−20 ℃保存备用。



附 录 C  
(规范性附录)  
PCR 凝胶电泳试剂与方法

C.1 PCR 试剂与方法

C.1.1 PCR 试剂

见表 C.1。

表 C.1 PCR 试剂

试剂名称	加样量 $\mu\text{L}$
5×PCR 缓冲液(含镁离子)	12.5
dNTP(10 mmol/L)	1.0
上游引物(15 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
下游引物(15 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
<i>Taq</i> 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
DNA 模板	1.0
ddH <sub>2</sub> O	补足反应总体积为 25.0 $\mu\text{L}$

C.1.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:健康的草莓叶片 DNA。  
阳性对照:草莓簇生植原体 DNA。  
阴性质控:灭菌双蒸水。

C.1.3 PCR 反应参数

94 °C/2 min;94 °C/1 min,60 °C/30 s,72 °C/1 min,35 个循环;72 °C 10 min。

C.2 琼脂糖凝胶电泳试剂及方法

C.2.1 电泳试剂

琼脂糖,50×TAE,6×加样缓冲液,溴化乙锭(EB),相对分子质量标记物 Marker(DL2000)。

C.2.2 电泳方法

C.2.2.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.0%(质量浓度)配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 °C 左右。

#### C.2.2.2 加溴化乙锭(EB)

加入溴化乙锭浓度为  $0.5 \mu\text{g/mL}$ , 混匀, 倒入已封好的凝胶平台上, 插上样品梳。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  $1\times\text{TAE}$  (缓冲液没过凝胶表面约  $1 \text{ mm}$ )。

#### C.2.2.3 加样

用适量  $6\times$  加样缓冲液分别与  $8 \mu\text{L}$  样品混合, 然后将其和适合的 DNA 相对分子质量标准物分别加入到点样孔中。

#### C.2.2.4 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动。当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时, 关闭电源。

#### C.2.2.5 结果观察

将整个胶置于紫外透射仪上观察。



附 录 D  
(规范性附录)

SYBR Green 实时荧光 PCR 试剂与方法

D.1 试剂和反应体系

SYBR Green 实时试剂和反应体系如表 D.1 所示：

表 D.1 试剂和反应体系

试剂名称	加样量 $\mu\text{L}$
2×Power SYBR Green PCR Master mix(主要包括 <i>Taq</i> DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、UDG 荧光染料等)	12.5
上游引物(15 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
下游引物(15 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
DNA 模板(10 ng/L~50 ng/L)	1.0
ddH <sub>2</sub> O	补足反应总体积为 25.0 $\mu\text{L}$

D.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照：健康的草莓叶片 DNA。  
阳性对照：草莓簇生植原体 DNA。  
阴性质控：灭菌双蒸水。

D.3 SYBR Green 实时 PCR 反应参数

反应条件为：50  $^{\circ}\text{C}$ /2 min；95  $^{\circ}\text{C}$ /2 min；95  $^{\circ}\text{C}$ /15 s；60  $^{\circ}\text{C}$ /60 s，40 个循环。