SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.3—2017

基因条形码筛查方法 第3部分:检疫性植原体

DNA barcoding screening method—
Part 3:Quarantine phytoplasma

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

SN/T 4877《基因条形码筛查方法》共分为3个部分：

——第1部分：检疫性棒形杆菌；

——第2部分：检疫性黄单胞菌；

——第3部分：检疫性植原体。

本部分为SN/T 4877的第3部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中国农业科学院生物技术研究所、中华人民共和国广西出入境检验检疫局、福建省农业科学院、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：赵文军、李为民、杜智新、谢丽雪、田茜、廖芳。

基因条形码筛查方法 第3部分:检疫性植原体

1 范围

SN/T 4877的本部分规定了检疫性植原体DNA条形码筛查方法中DNA提取、基因扩增、序列的比对分析及结果判定等。

本部分适用于检疫性植原体的筛查鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1 DNA条形码

生物体内能够代表该物种的,标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段。

2.2 16S rRNA基因

原核生物核糖体30S小亚基的组成部分。在细菌的进化过程中,16S rRNA基因的进化相对保守,被认为是衡量生命进化历史最理想的标尺,16S rRNA基因序列具有高度的保守性和特异性,在植原体的分类鉴定中广泛应用。

2.3 *tuf* 基因

延伸因子基因,是植原体转录过程中的关键因子,为单拷贝,序列相对保守,常用于植原体的分类鉴定。

3 植原体基本信息

为软壁菌门(Tenderricutes),柔膜菌纲(Mollicuteria),菌原体目(Mycoplasmatales),非醇原体科(Acholeplasmataceae),植原体候选属(*Candidatus* phytoplasma)。检疫性植原体的具体信息参见附录A。

4 方法原理

16S rRNA基因序列、虚拟的RFLP图谱及 *tuf* 基因序列是本部分中检疫性植原体筛查鉴定的主要依据。依据DNA序列分析结果与生物学信息进行最终结果判定。

5 仪器用具及试剂

5.1 仪器用具

PCR仪、超净工作台、灭菌锅、制冰机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机,台式小型离心机、冰箱、

旋涡震荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统。

5.2 试剂

植物 DNA 提取试剂盒、PCR Premix、超纯水、DNA marker。

核酸提取研磨液(100 mL):$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,2.17 g;KH_2PO_4,0.41 g;蔗糖,10 g;BSA(FractionV),0.15 g;PVP-10,2 g。pH 7.6 高温灭菌,4 ℃保存。

DNA 提取液:Tris-HCl,100 mmol/L;EDTA,100 mmol/L;NaCl,250 mmol/L;调 pH 至 8.0。

50×TAE:2.0 mmol/L Tris,1.0 mmol/L NaAc,50 mmol/L EDTA,pH 8.0。

6 筛查鉴定方法

6.1 16S rRNA 基因序列扩增测序

利用通用引物进行 16S rRNA 基因序列扩增测序(具体步骤见附录 B),将序列在 Genbank 数据库或中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定数据库中进行 blast 比对。

6.2 虚拟 RFLP 指纹图谱分析

见附录 B。

6.3 *tuf* 基因序列扩增分析

见附录 C。

7 结果判定

根据 16S rRNA 基因序列 blast 比对结果进行初步判定。如果相似度高于 97.5%,初步判定为一个候选种或组。

根据 iPhyclassifier 在线分析软件或 DNA-FP Cluster 软件分析结果进行判定。相似度达到 0.85 时,判定为同一个组,0.85~0.97 之间为不同亚组,然后根据名录中检疫性植原体对应的组或亚组进行判定。也可以利用 *tuf* 基因序列在欧盟检疫性有害生物鉴定数据库(QBOL)或中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定数据库中比对判定,NJ 树聚在同一支上为同一组或亚组。

筛查鉴定结果需结合寄主、症状及病原形态等生物学信息进行最终判定。

8 样品保存与复核

8.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出植原体的样品应保存于－20 ℃冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后需经高压灭菌后方可处理。

8.2 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,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片,测定序列需要保存电子文件。

附 录 A
（资料性附录）
检疫性植原体相关信息

A.1 植原体分类鉴定信息

目前植原体有两种分类鉴定系统，一种为基于 16S rRNA 基因序列相似度进行分种，相似度高于 97.5%，并结合生物学信息，认为是同一个候选种（*Candidatus* phytoplasma sp.）。另一种为基于 16Sr RNA基因序列 RFLP 电子指纹图谱的相似性进行分组，相似性高于 0.85 为同一组，相似性在 0.85～0.97之间为不同亚组，该套分类方法更具有实用性。候选种大部分与组或亚组相对应。

A.2 检疫性植原体分类信息

检疫性植原体分类信息见表 A.1。

表 A.1 检疫性植原体分类信息

中文名称	通用名	分组	候选种
桤树黄化植原体	Alder yellows	Ⅴ-C	
苹果丛生植原体	Apple proliferation	Ⅹ-A	*Ca*.Phytoplasma mali
杏褪绿卷叶植原体	Apricot chlorotic leafroll	Ⅰ-F	
白蜡树黄化植原体	Ash yellows	Ⅶ-A	*Ca*.Phytoplasma fraxini
蓝莓矮化植原体	Blueberry stunt	Ⅰ-E/Ⅸ-E	
澳大利亚植原体候选种	*Candidatus* Phytoplasma australiense	XⅡ-B	*Ca*.Phytoplasma pruni
椰子致死黄化植原体	Coconut lethal yellowing	Ⅳ	
榆韧皮部坏死植原体	Elm phloem necrosis	Ⅴ	
葡萄金黄化植原体	Grapevine flavescence dorée	Ⅴ-C Ⅴ-D	
来檬丛枝植原体	Lime witches'broom	Ⅱ-B	*Ca*.Phytoplasma aurantifolia
桃 X 病植原体	Peach X-disease	Ⅲ-A	
梨衰退植原体	Pear decline	Ⅹ-C	*Ca*.Phytoplasma pyri
马铃薯丛枝植原体	Potato witches'broom	Ⅵ-A	
草莓簇生植原体	Strawberry multiplier	Ⅰ-K	

附 录 B
（规范性附录）
16S rRNA 基因扩增及虚拟 RFLP 指纹图谱分析

B.1 DNA 制备

DNA 制备方法如下：

a) 取所选新鲜材料的韧皮部及叶中脉 0.3 g，或干材料 0.1 g，取适量液氮研磨，再加入研磨液 2 mL充分研磨，4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min，弃上清液。
b) 加入 500 μL DNA 提取液，20 μL 蛋白酶 K(5 mg/mL)，轻轻混匀，加入 80 μL 10%十二烷肌氨酸钠，混匀，55 ℃温育 1 h～2 h，4 ℃ 6 000 r/min，10 min，取上清液。
c) 加入 2/3 体积异丙醇，混匀，—20 ℃保持至少 30 min，4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min，弃上清液。
d) 加入 600 μL TE 缓冲液，30 μL SDS，12 μL 蛋白酶 K(5 mg/mL)，混匀，37 ℃温育 30 min～60 min。
e) 加 100 μL 5 mol/L NaCl 混匀，再加入 84 μL CTAB/NaCl 溶液混匀，65 ℃温育 10 min。
f) 加入等体积氯仿：异戊醇(24：1)混匀，4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min，重复直至无中间白色层。
g) 上清液加入 2/3 体积异丙醇，混匀，—20 ℃保持至少 30 min，4 ℃ 12 000 r/min 10 min，弃上清液。
h) 加入 1 mL 70%乙醇洗涤，12 000 r/min 1 min，洗涤两次。
i) 加入 30 μL TE 缓冲液混匀溶解，—20 ℃冰冻保存。

注：也可采用商品试剂盒提取，但通常上述方法提取的核酸质量更优。

B.2 引物序列

采用巢式 PCR 进行植原体 16S rRNA 基因序列的扩增。

第一对通用引物：

P1：5′-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3′

P7：5′-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3′

扩增片段长度 1 800 bp 左右。

第二对通用引物：

R16F2n：5′-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3′

R16R2：5′-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3′

扩增片段长度 1 250 bp 左右。

B.3 PCR 反应体系及参数

利用商品化 PCR Premix 进行扩增，最终引物浓度均为 200 nmol/L，用引物 P1/P7 进行第 1 轮 PCR，模板量为 10 ng～100 ng。反应条件为：94 ℃/5 min；94 ℃/30 s，53 ℃/30 s，72 ℃/1 min，35 个循环；72 ℃/10 min。第 1 轮 PCR 产物用灭菌双蒸水 1：50(体积比)稀释，取 1 μL 为模板利用通用引物 R16F2n/R16R2 进行第 2 轮 PCR 反应，反应条件为：94 ℃/5 min；94 ℃/30 s，60 ℃/30 s，72 ℃/1 min，35 个循环；72 ℃/10 min。

注：DNA 模板的取量根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节。不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

B.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:以健康的植株叶片 DNA 为模板。

阳性对照:以携带有植原体 16S rDNA 序列的质粒为模板。

空白对照:以无菌水代替 DNA 模板。

B.5 电泳及测序

取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,测序结果利用生物信息学软件进行剪接编辑校对,然后在 Genbank 数据库或检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统进行初步分析。

B.6 虚拟 RFLP 指纹图谱分析

利用 *i*Phyclassifier 在线分析软件或 DNA-FP Cluster 软件将测得的植原体 16S rDNA 序列(R16F2n/R16R2)进行虚拟酶切,选用 17 种限制性内切酶(*Alu* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Bfa* Ⅰ、*Bst* UⅠ、*Dra* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Hae* Ⅲ、*Hha* Ⅰ、*Hin*f Ⅰ、*Hpa* Ⅰ、*Hpa* Ⅱ、*Kpn* Ⅰ、*Mbo* Ⅰ、*Mse* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*Ssp* Ⅰ、*Taq* Ⅰ)。酶切后 RFLP 图谱如图 B.1(以苹果丛生植原体 RFLP 图谱为例)。此外,使用 *i*Phyclassifier 的组(亚组)划分功能(16Sr group/subgroup classification based on similarity coefficient),对目标植原体进行组与亚组的分类。

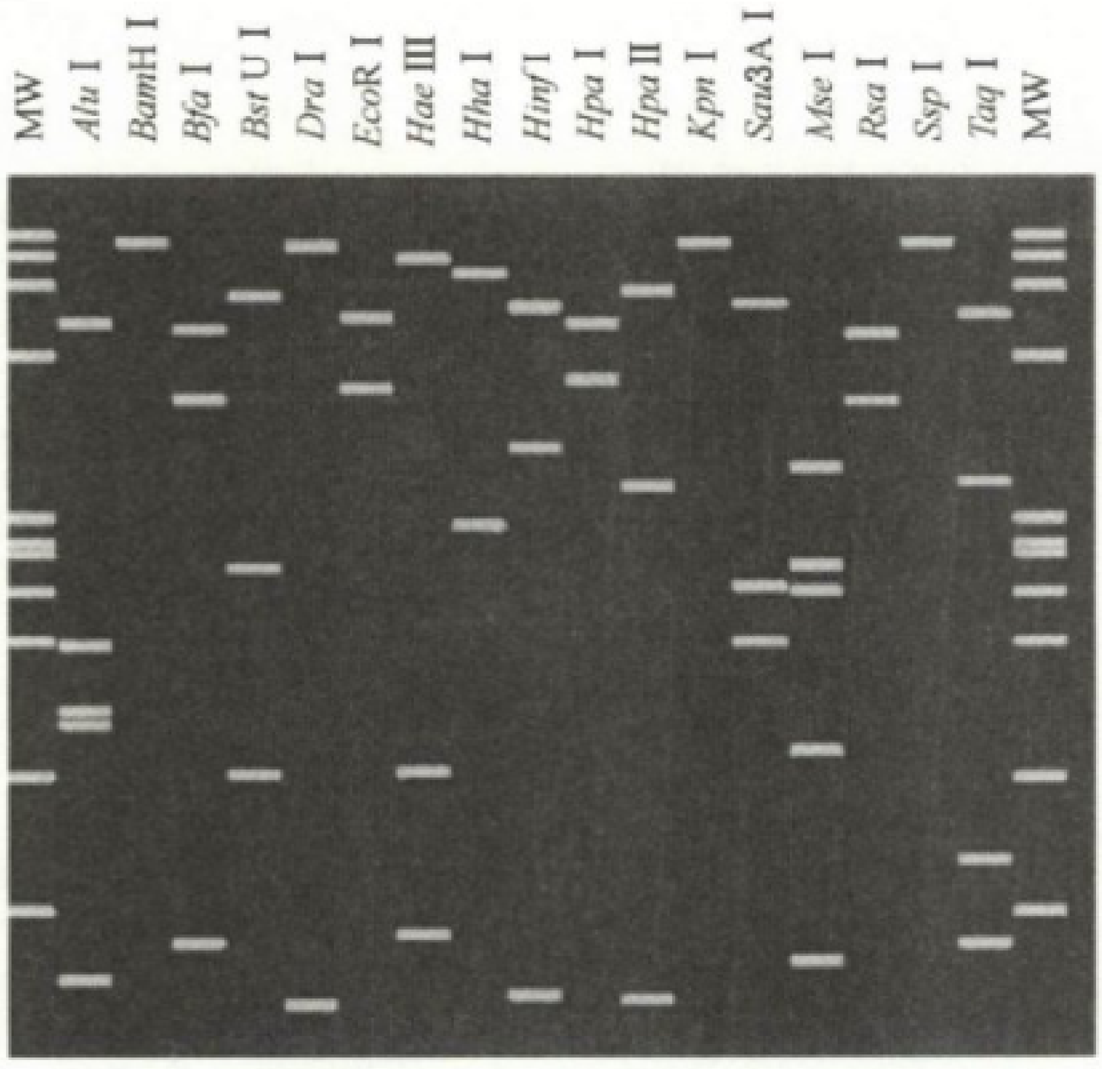

图 B.1 苹果丛生植原体 RFLP 指纹图谱

附 录 C
（规范性附录）
tuf 基因的扩增与分析

C.1 引物序列

采用巢式 PCR 进行植原体 *tuf* 基因扩增。

第一次扩增引物：

正向引物：

Tuf340a：5′-GCTCCTGAAGAAARAGAACGTGG-3′

Tuf340b：5′-ACTAAAGAAGAAAAAGAACGTGG-3′

反向引物：

Tuf890ra：5′-ACTTGDCCTCTTTCKACTCTACCAGT-3′

Tuf890rb：5′-ATTTGTCCTCTTTCWACACGTCCTGT-3′

Tuf890rc：5′-ACCATTCCTCTTTCAACACGTCCAGT-3′

扩增片段长度 550 bp 左右。

第二次扩增引物：

正向引物：

Tuf400a：5′-<u>GTAAAACGACGGCCAGTG</u>AAACAGAAAAACGTCAYTATGCTCA-3′

Tuf400b：5′-<u>GTAAAACGACGGCCAGTG</u>AAACTTCTAAAAGACATTACGCTCA-3′

Tuf400c：5′-<u>GTAAAACGACGGCCAGTG</u>AAACATCAAAAAGACAYTATGCTCA-3′

Tuf400d：5′-<u>GTAAAACGACGGCCAGTG</u>AAACAGAAAAAAGACAYTATGCTCA-3′

Tuf400e：5′-<u>GTAAAACGACGGCCAGTG</u>AAACAGCTAAAAGACATTATYCTCA-3′

反向引物：

Tuf835ra：5′-<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>AACATCTTCWACHGGCATTAAGAAAGG-3′

Tuf835rb：5′-<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>AACACCTTCAATAGGCATTAAAAAWGG-3′

Tuf835rc： 5′-<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>AACATCTTCTATAGGTAATAAAAAAGG-3′

扩增片段长度 430 bp 左右。

C.2 PCR 反应体系及参数

利用商品化 PCR Premix 进行 PCR 扩增，采用 25 μL 反应体系。利用引物 Tuf340/Tuf890r 进行第 1 轮 PCR，取 1 μL DNA（浓度为 10 nmol/L～100 nmol/L）为模板。反应条件为：94 ℃/5 min；94 ℃/30 s，54 ℃/30 s，72 ℃/1 min，35 个循环；72 ℃/7 min。第 1 轮 PCR 产物用灭菌双蒸水 1∶30（体积比）稀释，取 1 μL 为模板利用通用引物 Tuf400/Tuf835r 进行第 2 轮 PCR 反应，PCR 反应条件同上。

上述两次 PCR 反应所用不同引物按等比例混合，配制引物浓度均为 10 μmol/L，取 1 μL 用于 PCR 反应。

注：DNA 模板的取量根据 DNA 的提取浓度、纯度而调节。不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

C.3 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照：以健康的植株叶片 DNA 为模板。

阳性对照：以携带有植原体 *tuf* 序列的质粒为模板。

空白对照：以无菌水代替 DNA 模板。

C.4 电泳及测序

用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳分析，凝胶成像仪观察并记录结果。扩增片段为 420 bp～440 bp 之间。采用 M13 和 T7 为测序引物进行测序，利用生物信息学软件对序列进行剪接编辑校对。

C.5 结果分析

在欧盟检疫性有害生物数据库(http://www.q-bank.eu/Phytoplasmas/)或中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统进行分析并做 NJ 树。