



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4404—2015

菜豆金色花叶病毒属病毒 PCR 筛查方法

Screening protocol for *Begomovirus* by PCR

2015-12-04 发布

2016-07-01 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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、云南省烟草农业科学研究院、沈阳大学、中国检验检疫科学研究院、福建农林大学。

本标准主要起草人：沈建国、于文涛、李敏、方敦煌、杨彩霞、林春滢、蔡伟、张永江、高芳銮、吴祖建。

菜豆金色花叶病毒属病毒 PCR 筛查方法

1 范围

本标准规定了菜豆金色花叶病毒属病毒 PCR 筛查方法。

本标准适用于寄主植物中菜豆金色花叶病毒属病毒的检测鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 菜豆金色花叶病毒属基本信息

中文名称:菜豆金色花叶病毒属

英文名称:*Begomovirus*

分类地位:双生病毒科(*Geminiviridae*)。

其他信息参见附录 A。

4 方法原理

Begomovirus 病毒的分子生物学特性是制定本检疫鉴定方法的主要依据。根据 *Begomovirus* 病毒的 DNA 保守区域设计特异性引物,建立该属病毒的分子生物学筛查方法。

5 主要仪器设备

高速冷冻离心机、PCR 仪、凝胶成像分析系统等。

6 检测与鉴定

6.1 抽样

抽样方法按照 SN/T 2122 中规定执行。

6.2 PCR 检测方法

按照附录 B 给出的方法,进行 PCR 检测。

6.3 序列测定与分析

将 PCR 产物回收后,进行克隆、测序,测定的核苷酸序列与已知 *Begomovirus* 病毒序列进行比对。如果与已知的 *Begomovirus* 病毒序列同源性大于 89%,则判定为 *Begomovirus* 病毒;同源性小于 89%

则初步判定为 *Begomovirus* 属病毒的新种,若需进一步鉴定到具体病毒种类,应结合病毒生物学特性。

注:序列比对可利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行,网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>。

7 结果判定

7.1 采用 PCR 方法检测,如果阳性对照、阴性对照和空白对照正常,待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为未检出。

7.2 采用 PCR 方法检测,如果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,且测定的序列为 *Begomovirus* 病毒,则判定为检出。

8 结果记录

记录样品信息和检测数据,包括样品来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果以及实验人员签字。PCR 检测方法应保存电泳照片,测序结果保存测序报告图。

9 样品保存

检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中,并作好登记和标记,以备复核用。保存期满后,需经灭活处理。

附 录 A
(资料性附录)

Begomovirus 病毒基本信息

A.1 分类地位

双生病毒科(Geminiviridae)。该病毒属所在的双生病毒科的组成结构见表 A.1。

表 A.1 双生病毒科的组成结构

双生病毒科	属 (Genus)	代表种 (Type species)
	玉米线条病毒 <i>Mastrevirus</i>	玉米线条病毒 <i>Maize streak virus</i>
	曲顶病毒 <i>Curtovirus</i>	甜菜曲顶病毒 <i>Beet curly top virus</i>
	伪曲顶病毒 <i>Topocuvirus</i>	番茄伪曲顶病毒 <i>Tomato pseudo-curly top virus</i>
	菜豆金色花叶病毒 <i>Begomovirus</i>	菜豆金色花叶病毒 <i>Bean golden yellow mosaic virus</i>

A.2 寄主范围

寄主广泛,主要侵染双子叶植物,包括烟草、番茄、辣椒、棉花、甜瓜、木瓜、南瓜、西瓜、豇豆、巴豆、利马豆、大翼豆、绿豆、菜豆、苘麻、木薯、藿香蓟等。

A.3 分布地区

该属病毒主要分布于热带、亚热带及温带地区。

A.4 传播途径

自然传播介体为烟粉虱(*Bemisia tabaci*),以持久性方式传播。远距离传播主要通过带毒苗木传播。

A.5 病毒粒体形态

双联体结构,无包膜,由两个不完整的二十面体组成。

A.6 病毒的基因组结构

人多数 *Begomovirus* 包含 2 个单链环状 DNA(ssDNA)组分,长度相似,每条为 2.5 kb~2.6 kb。少数病毒为单个组分,已发现单组分病毒常常含有环状卫星 ssDNA(DNA-β)。

SN/T 4404—2015

附 录 B
(规范性附录)
PCR 检测方法

B.1 主要试剂

- B.1.1 CTAB 提取缓冲液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCL,20 mmol/LEDTA (pH 8.0)。
- B.1.2 CTAB/NaCl:称取 10 g CTAB、4.1 g NaCl,用 ddH₂O 溶解并定容至 100 mL。
- B.1.3 氯仿。
- B.1.4 异丙醇。
- B.1.5 异戊醇。
- B.1.6 无水乙醇。
- B.1.7 引物序列:
Begomo-F:5'-CCKGTGYGTGHRAATCC-3'
Begomo-R:5'-CCRARCWTYCAGSGSAGCT-3'
PCR 扩增片段大小约 900 bp。

B.2 检测

B.2.1 DNA 提取

称取病叶 100 mg(加 15%PVP),液氮充分研磨后立即加入 750 μL(65℃预热)2%CTAB 抽提液,再加入 16 μL2-巯基乙醇。CTAB 抽提液稍溶化后,用研棒将 CTAB 抽提液与磨碎的样品混匀,转入 1.5 mL 离心管。65℃水浴加热 1 h,每 10 min~20 min 摇动一次离心管。加入等体积(约 750 μL)24:1 的氯仿/异戊醇抽提,轻摇混匀,4℃13 000 r/min 离心 20 min。回收水相,将上清(约 750 μL)小心地转入另一 1.5 mL 离心管。加入 1/10 体积(约 75 μL)65℃预热的 CTAB/NaCl,混匀。加入等体积(约 750 μL),氯仿/异戊醇二次抽提,4℃13 000 r/min 离心 20 min。回收水相,将上清(约 750 μL)小心地转入另一 1.5 mL 离心管。加入 1/10 体积(约 75 μL)3 mol/L NaAC,混匀。加入等体积(约 750 μL) -20℃预冷的异丙醇。 -20℃放置 1 h。4℃13 000 r/min 离心 15 min。弃上清,沉淀用 75%乙醇(预冷)洗涤 2 次,每次 12 000 r/min 离心 2 min,干燥后溶解于 30 μL~50 μL ddH₂O 中, -20℃保存。

注:DNA 提取也可采用商业化的试剂盒。

B.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 B.1,每个反应设置 2 个重复。检测时以含有病毒目标片段的质粒或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℃预变性 5 min,然后 94℃变性 1 min、50℃退火 1 min、72℃延伸 1.5 min,35 个循环,最后一个循环结束后 72℃继续延伸 10 min。

