



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3287—2012

棉花皱叶病毒分子检疫鉴定方法

Molecular detection and identification of cotton leaf crumple virus

2012-10-23 发布

2013-05-01 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张永江、张明哲、李明福、冯黎霞、李桂芬。

棉花皱叶病毒分子检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了棉花皱叶病毒(参见附录 A)核酸的提取、PCR 及实时荧光 PCR 检测的方法。
本标准适用于进出境植物检疫中棉花皱叶病毒的检疫鉴定。

2 方法原理

棉花皱叶病毒学名:Cotton leaf crumple virus,缩写:CLCrV。该病毒的分子生物学特征是本标准制定的主要依据。

3 仪器设备、用具及试剂

3.1 仪器设备

PCR 仪、电泳系统、高速冷冻离心机、凝胶成像系统、振荡器、4℃冰箱、电子分析天平(0.001 g)、超净工作台、水浴锅、-80℃超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉。

3.2 用具

可调移液器(2.5 μL,10 μL,20 μL,100 μL,1 000 μL)及灭菌的吸头、离心管、PCR 管和研钵等。

3.3 试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。

实时荧光 PCR 试剂、三氯甲烷、异戊醇、乙醇、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子标记、溴化乙锭、琼脂糖等。

试剂配制见附录 B。

4 检疫鉴定方法

4.1 常规 PCR 检测

提取样品 DNA,设置阳性对照、阴性对照和空白对照,进行常规 PCR 扩增。具体操作步骤见附录 C。

4.2 实时荧光 PCR 检测

提取样品 DNA,设置阳性对照、阴性对照和空白对照,进行实时荧光 PCR 扩增。具体操作步骤见附录 D。

5 结果判断

样品经 PCR 及实时荧光 PCR 检测为阴性时,判定样品不携带 CLCrV。

样品经 PCR 检测为阳性,再经实时荧光 PCR 检测确认为阳性时,可判定样品携带 CLCrV。

6 样品保存与记录结果

6.1 样品保存

检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中,并作好登记和标记,以备复核用。

6.2 结果记录

包括样品来源、种类、取样人员、检测原始记录、照片等文档存档,以便必要时复核。

附 录 A
(资料性附录)
棉花皱叶病毒背景资料

A.1 分类地位

该病毒属于双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)。

A.2 寄主范围

包括棉属(*Gossypium*)、苘麻属(*Abutilon*)、蜀葵属(*Althaea*)、木槿属(*Hibiscus*)、锦葵属(*Malva*)、栗豆树属(*Castanospermum*)、大豆属(*Glycine*)、菜豆属(*Phaseolus*)及巢菜属(*Vicia*)的一些植物。

A.3 地理分布

该病毒主要分布在印度、墨西哥、美国、危地马拉及中东地区。

A.4 传播途径

烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播。

A.5 病害症状

该病毒侵染棉花造成叶中脉组织增生、叶脉坏死或脉明,叶脉组织的叶肉部分偶尔出现红色小点,有时形成分散的泡斑;苞叶和花常畸形;叶柄弯曲,叶片向下卷曲并有明显的花叶(参见图 A.1)。

A.6 病毒粒体特性

病毒粒体双生,无包膜,直径为 17 nm~20 nm,二聚体长 30nm~32 nm。

A.7 基因组特性

该病毒具有 *Begomovirus* 病毒典型的基因组,含有 2 条大小均为 2.5 kb~3.0 kb 的单链闭合环状 DNA 分子,即 DNA-A 和 DNA-B;两者是棉花皱叶系统感染必需的。A 和 B 共同区(commen rignon, CR)的序列同源性相对较低。

SN/T 3287—2012



图 A.1 棉花皱叶病毒侵染棉花叶片症状

(引自 <http://cals.arizona.edu/PLP/plpext/diseases/agronomic/cotton/cotlcrumple.htm>)

附 录 B
(规范性附录)
试 剂 配 制

B.1 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)DNA 提取缓冲液

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)	4 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA 0.5 mol/L)	8 mL
氯化钠(NaCl)	16.4 g
1 mol/L Tris-HCl	20 mL
2-ME(β -巯基乙醇)	4 mL
加水定容至 200 mL,调 pH 至 8.0,121 °C 高压灭菌 30 min	

B.2 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)沉淀液

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)	10 g
氯化钠(NaCl)	4.1 g
加水定容至 100 mL,121 °C 高压灭菌 30 min	

B.3 高盐 TE 缓冲液

乙二胺四乙酸二钠(EDTA 0.5 mol/L)	0.02 mL
氯化钠(NaCl)	5.85 g
1 mol/L Tris-HCl	1 mL
加水定容至 100 mL,调 pH 至 8.0,121 °C 高压灭菌 30 min	

B.4 电泳缓冲液 TBE(5×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	27 g
硼酸(H_3BO_3)	13.75 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	1.86 g
加双蒸水定容至 500 mL	
用时加蒸馏水稀释至 0.5×TAE	

B.5 溴化乙锭(EB)溶液(10 μ g/ μ L)

溴化乙锭	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

附 录 C
(规范性附录)
常规 PCR 检测

C.1 引物

正向引物 prAV1154:5'-CT(G/C)AA(C/T)TTC(A/C)AAGT(C/T)TGGACG-3'
反向引物 prAV2644:5'-ATTACCGGATGGCCGC-3'
扩增片段长度约 1 100 bp。
注：引自文献[1]。

C.2 DNA 提取

取待测样品 0.5 g 于液氮中磨碎,加入 1.5 mL 65 ℃预热的 2-ME/CTAB DNA 抽提液,混匀后转入 2 mL 离心管中,于 65 ℃温浴 1 h,不时混匀;用等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)抽提,室温下 10 000 r/min离心 10 min;回收上清液,加入等体积的 CTAB 沉淀液,颠倒混匀,于 65 ℃温浴 1 h: 10 000 r/min离心 5 min,移出上清液,用 1.5 mL 高盐 TE 缓冲液重悬沉淀,加 2 倍体积无水乙醇沉淀核酸;12 000r/min 离心 15 min,70%乙醇洗涤;37 ℃干燥后,溶于 100 μL 双蒸水中,-20 ℃保存备用。
注：或者按照商品 DNA 提取试剂盒进行操作。

C.3 PCR 扩增

PCR 反应体系:见表 C.1,每个样品设 2 个平行处理。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。检测时以含 CLCrV 的植物材料的 DNA 或含有 CLCrV 目标片段的质粒作为阳性对照,以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属其它病毒的 DNA 作为阴性对照,以水代替 DNA 模板作为空白对照。
PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min 延伸。

表 C.1 PCR 反应体系

名 称	储存液浓度	加样量/μL	终浓度
PCR 缓冲液(含 MgCl ₂)	10×	2.0	1×
dNTP	10 μmol/L	0.5	2.5 mmol/L
上游引物	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
下游引物	20 μmol/L	0.5	0.5 μmol/L
Taq 酶	5 U/ μL	0.5	0.15 U/μL
DNA	—	2.0	—
补水至	—	20.0	—

C.4 琼脂糖凝胶电泳检测

用 $0.5\times$ TBE 配制 1% 琼脂糖凝胶,加热溶化后冷却至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。将凝胶倒入凝胶槽中,插上样品梳子。冷却凝固后拔掉梳子,在电泳槽内加入 $0.5\times$ TBE,缓冲液要没过凝胶表面约 1 mm。

将加样缓冲液与样品混合后加入样品孔,同时设计 PCR 的阴性对照和阳性对照,并加入相对分子质量标准物(Marker)。接通电源,以 $3\text{ V/cm}\sim 5\text{ V/cm}$ 电场强度进行电泳,0.5 h 后观察结果。

电泳结束后,将凝胶放入 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭(EB)染色液中染色 10 min \sim 15 min。将整个凝胶置于凝胶成像系统上观察,记录结果。

C.5 结果判定

如果阳性对照出现约 1 100 bp 的条带,检测样品、阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 CLCrV 阴性。

如果阳性对照及检测样品出现约 1 100 bp 的条带,阴性对照和空白对照未出现条带,可判定样品为 CLCrV 阳性。

结果可通过实时荧光 PCR 方法进一步确认。

附 录 D

(规范性附录)

实时荧光 PCR 检测

D.1 引物和探针设计

根据 GenBank 中公布的 CLCrVCP 基因的保守序列,设计引物和探针如下:

引物序列:CLCrV-F:5'-GCACGCCTATGGACTTTGGT-3'

CLCrV-R:5'-CATGACCTGGAACCTATCTCTGAGA-3'

探针序列:CLCrV-P:5'-FAM-TTTGACAATGAGCCCAGTACTGCCACTG-TAMRA-3'

D.2 DNA 提取

操作方法见 C.2。

D.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 D.1,每个样品及对照设 2 个平行处理。检测时以含 CLCrV 的植物材料的 DNA 或含有 CLCrV 目标片段的质粒作为阳性对照;以健康植物材料或菜豆金色花叶病毒属其他病毒的 DNA 作为阴性对照;以水代替 DNA 模板作为空白对照。

表 D.1 实时荧光 PCR 反应体系

名称	贮备液浓度	终浓度	加样量/ μL
PCR 缓冲液	10×	1×	2.0
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
dNTP	10 mmol/L	0.25 mmol/L	0.5
CLCrV-F	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8
CLCrV-R	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8
Taq 酶	5 U/ μL	0.05 U/ μL	0.2
CLCrV-P	10 $\mu\text{mol/L}$	0.15 $\mu\text{mol/L}$	0.3
DNA 模板	—	—	2.0

注: PCR 反应体系中各种试剂的量可根据 ([具体情况 ([进行适当调整,也可采用商业化的 ([一步或两步法试剂盒。

D.4 实时荧光 PCR 反应

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 8 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,共 40 个循环。

点击运行,进行 PCR 反应,保存文件,打开分析软件,仪器自动分析试验结果,给出 ΔRn (荧光信号增加值)与循环数之间关系的图像。

D.5 结果判定

在阳性对照 Ct 值小于 30, 水空白对照 Ct 值等于 40 的条件下(若不满足该两项条件, 此次检测无效, 应重做荧光 PCR 扩增):

- 待测样品的 Ct 值为 40 时, 则判定未检测到 CLCrV;
- 待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时, 则判定检测到 CLCrV 目标;
- 待测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35 时, 应重新进行测试, 如果重新测试的 Ct 值为 40 时, 则判定未检测到 CLCrV 目标。如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35 时, 则判定检测到 CLCrV 目标。

参 考 文 献

- [1] Idris, A. M. , and Brown, J. K. 1998. Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: Biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. *Phytopathology* 88:548-557.
-