



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3961—2014

美人蕉黄斑驳病毒的检疫鉴定方法

Detection and identification of *Canna yellow mottle virus*

2014-04-09 发布

2014-11-01 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、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、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、黄伙水、陈劲松、李敏、廖富荣、张永江、蔡伟、闫诚、翁瑞泉、吴祖建。

美人蕉黄斑驳病毒的检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了美人蕉黄斑驳病毒检测的程序和方法。

本标准适用于进出境植物及其产品中美人蕉黄斑驳病毒的检测。

2 原理

美人蕉黄斑驳病毒的基因组特征是制定本检疫鉴定方法的主要依据。美人蕉黄斑驳病毒的分类地位、寄主范围、病害症状、分布地区、传播途径、粒体形态、基因组等参见附录 A。

3 仪器设备、用具及试剂

3.1 仪器设备

高速冷冻离心机、电子天平(1/1 000 g)、实时荧光 PCR、PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、-20 ℃低温冰箱和-80 ℃超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH 计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台等。

3.2 用具

各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L)、PCR 反应管、离心管(1.5 mL)、研钵等。

3.3 试剂

巢式 PCR 试剂见附录 B,实时荧光 PCR 试剂见附录 C。

4 检测与鉴定

4.1 巢式 PCR

具体方法见附录 B。

4.2 实时荧光 PCR

具体方法见附录 C。

5 结果判定与记录

5.1 结果判定

——当巢式 PCR、实时荧光 PCR 两种检测方法的检测结果均呈阳性时,则判定为检出 CaYMV。

——当巢式 PCR、实时荧光 PCR 两种检测方法的检测结果均呈阴性时,则判定为未检出 CaYMV。

——若巢式 PCR 或实时荧光 PCR 为阳性,则需进一步采用电泳鉴定或 PCR 产物序列测定等方法进行鉴定。

5.2 结果记录

记录好各项实验数据,包括样品来源、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。分子生物学检测结果保留电泳照片,序列测定结果保留测序报告图。

6 样品的保存

经检测结果判定为阳性的样品应妥善保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中,并作好登记和标记工作,以备复核用。

附 录 A
(资料性附录)

美人蕉黄斑驳病毒的背景资料

A.1 分类地位

中文名:美人蕉黄斑驳病毒

学名:*Canna yellow mottle virus*

缩写:CaYMV

分类地位:花椰菜花叶病毒科(*Caulimoviridae*),杆状 DNA 病毒属(*Badnavirus*)。

A.2 寄主范围

已报道的自然寄主为美人蕉。

A.3 病害症状

侵染美人蕉后可以产生多种症状,典型症状包括叶脉黄化、叶片产生褪绿斑、茎秆和花上出现条斑(见图 A.1)。



图 A.1 CaYMV 典型症状

A.4 分布地区

主要分布于日本、美国、意大利、荷兰等国家。

A.5 传播途径

主要通过无性繁殖材料传播。该病毒的传播介体尚未明确。

SN/T 3961—2014

A.6 粒体形态

病毒粒体呈杆状,长约 120 nm~130 nm,直径约 28 nm。

A.7 病毒基因组

基因组为环状双链 DNA,含有 3 个 ORF。

附 录 B
(规范性附录)
巢式 PCR 检测方法

B.1 试剂

B.1.1 TES:100 mmol/L Tris(pH 8.0),10 mmol/L EDTA,2% SDS。

B.1.2 CTAB 提取缓冲液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,20 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

B.1.3 三氯甲烷。

B.1.4 异丙醇。

B.1.5 异戊醇。

B.1.6 无水乙醇。

B.1.7 70%乙醇。

B.1.8 蛋白酶 K。

B.1.9 引物序列:

根据已报道的 CaYMV 基因组序列设计 2 对用于特异性扩增的引物:

外侧引物 CaYMV 1:5'-TAGGGCAGTCAAGGATTAAGC-3'

外侧引物 CaYMV 2:5'-CAATCTTGGCGTAGAACGAG-3'

内侧引物 CaYMV 3:5'-ACTGCGTCAGTTTCTCGG-3'

内侧引物 CaYMV 4:5'-GGCCTGGATCTCAGCATCTA-3'

外侧引物 PCR 产物大小 540 bp,内侧引物 PCR 产物大小 352 bp。

B.2 检测**B.2.1 DNA 提取**

取病叶 50 mg~100 mg,用液氮充分研磨后,转置 1.5 mL 离心管,加入 500 μ L TES,50 μ g~100 μ g 蛋白酶 K,56 $^{\circ}$ C 温育 0.5 h~1 h,期间轻轻摇动混匀;加入一定体积 10 mol/L NaCl(使之终浓度为 1.4 mol/L),1/10 倍体积 10%CTAB,65 $^{\circ}$ C 温育 10 min;加入 1 倍体积三氯甲烷/异戊醇(24:1),轻摇混匀,置冰上 30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 225 μ L NH_4AC (5 mol/L),混匀,放置冰上 1 h,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加 3 μ L Rnase,37 $^{\circ}$ C 温育 15 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加 0.5 倍体积异丙醇,置冰上 15 min~30 min,4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,沉淀用 70%乙醇(预冷)洗涤 2 次,干燥后溶解于 50 μ L TE 中,-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存备用。

B.2.2 PCR 扩增

第一次 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含病毒材料作为阳性对照,以不含病毒的健康植物组织作为阴性对照,同时以水代替模板作为空白对照。

第一次 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、53 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。

表 B.1 第一次 PCR 反应体系

试剂名称	加样量
DNA	4 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)	0.5 μL
dNTPs(10 mmol/L)	0.5 μL
10 \times PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})	2.5 μL
MgCl_2 (25 mmol/L)	2 μL
CaYMV 1(10 $\mu\text{mol/L}$)	2 μL
CaYMV 2(10 $\mu\text{mol/L}$)	2 μL
ddH ₂ O	11.5 μL
总体积	25 μL

第二次 PCR 反应体系见表 B.2,取第一次 PCR 反应产物作为模板。

第二次 PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min。

表 B.2 第二次 PCR 反应体系

试剂名称	加样量
第一次 PCR 反应产物	0.2 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)	0.5 μL
dNTPs(10 mmol/L)	0.5 μL
10 \times PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})	2.5 μL
MgCl_2 (25 mmol/L)	2 μL
CaYMV3(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
CaYMV4(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
ddH ₂ O	17.3 μL
总体积	25 μL

B.2.3 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5% 的琼脂糖凝胶,对 PCR 产物进行电泳。电泳结束后,在溴化乙锭(EB,浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$)溶液染色 10 min,再在凝胶成像系统中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍照并做记录。

B.2.4 结果判断

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 352 bp 大小处有扩增条带,待测样品出现与

阳性对照一致的扩增条带,则判定为阳性。

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增,阳性对照在 352 bp 大小处有扩增条带,待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,则判定为阴性。

B.2.5 序列测定

PCR 产物纯化、回收后,进行克隆、测序,或者直接测序。把测序所得到的核苷酸序列与已知的 CaYMV 相应序列进行比对(利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行比对,网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

附 录 C
(规范性附录)
实时荧光 PCR 检测方法

C.1 引物和探针

引物序列:CaYMV-F 5'-TGCGAACCTGCCTGAAATG-3'
 CaYMV-R 5'-ATACATCCGTCTGTTTCAAGTACCAT-3'
探针序列:CaYMV-probe 5'-FAM-AATTACCCCCAGGGACGCCG-TAMRA-3'

C.2 实时荧光 PCR 检测

DNA 提取见 B.2.1, 然后进行实时荧光 PCR 检测。在 25 μL 的反应体系中加入: 12.5 μL 2 \times Premix Ex Taq、0.75 μL CaYMV-F(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.75 μL CaYMV-R(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL CaYMV-Probe(10 $\mu\text{mol/L}$)、3 μL DNA、7.5 μL ddH₂O。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。

C.3 实时荧光 PCR 结果判定

如果阳性对照 Ct 值 < 35 , 且出现典型的扩增曲线, 阴性对照和空白对照的 Ct 值 ≥ 40 , 且无扩增曲线:

- 待测样品 Ct 值 ≤ 35 时, 且出现典型的扩增曲线, 则判定为阳性;
 - 待测样品 $35 < \text{Ct 值} < 40$ 时, 应重新进行测试, 若重新测试 $35 < \text{Ct 值} < 40$, 且出现典型的扩增曲线, 则判定为阳性; 若重新测试的 Ct 值 = 40, 则判定为阴性。
-