



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.13—2019

基因条形码筛查方法

第 13 部分：检疫性马铃薯 Y 病毒属病毒

DNA barcoding screening method—Part 13: Quarantine Potyviruses

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

SN/T 4877《基因条形码筛查方法》分为15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；
- 第4部分：检疫性茎点霉；
- 第5部分：检疫性拟茎点霉；
- 第6部分：检疫性嗜酸菌；
- 第7部分：检疫性轮枝菌；
- 第8部分：检疫性炭疽菌；
- 第9部分：检疫性腥黑粉菌；
- 第10部分：检疫性疫霉；
- 第11部分：检疫性异株菟亚属；
- 第12部分：黄瓜绿斑驳花叶病毒 ；
- 第13部分：检疫性马铃薯Y病毒属病毒；
- 第14部分：检疫性南方菜豆花叶病毒属病毒；
- 第15部分：检疫性叶点霉。

本部分为SN/T 4877的第13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。

本部分由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国北京海关、中华人民共和国青岛海关。

本部分主要起草人：邓丛良，刘兴亮、张丽杰、王英超、赵晓丽、骆卫峰、郑春生。

基因条形码筛查方法

第 13 部分：检疫性马铃薯 Y 病毒属病毒

1 范围

本部分规定了检疫性马铃薯 Y 病毒属病毒的基因条形码筛查方法中 RNA 提取、基因扩增、序列的比对分析及结果判定等。

本部分适用于寄主植物中马铃薯 Y 病毒属中检疫性病毒的筛查。

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，仅所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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

DNA 条形码(DNA barcode)

DNA 条形码是指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。

4 马铃薯 Y 病毒属基本信息

中文名称：马铃薯 Y 病毒属

学 名：*genus Potyvirus*

马铃薯 Y 病毒属属于马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*)，是已知最大的植物病毒属之一，占到已知植物病毒的 20% 以上，其代表种是马铃薯 Y 病毒(*Patato virus Y*，PVY)。该属病毒包括香蕉苞片花叶病毒(*Banana bract mosaic virus*，BBrMV)、李痘病毒(*Plum pox virus*，PPV)、马铃薯 A 病毒(*Potato virus A*，PVA)和马铃薯 V 病毒(*Potato virus A*，PVV)4 种检疫性植物病毒。有关该病毒属的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

以马铃薯 Y 病毒属病毒的基因组序列中的保守区域设计合成简并引物，建立该病毒属病毒基因条形码筛查方法；并对 PCR 产物进行序列测定，通过序列分析确定病毒种类。因此，马铃薯 Y 病毒属的分子生物学特征是制定本检测鉴定方法的主要依据。

6 仪器设备与试剂

6.1 仪器设备与用具

研磨仪,微量天平(感量:0.001 g),PCR 仪,电泳仪,水平电泳槽,凝胶成像仪,高速冷冻台式离心机,水浴槽或恒温孵育器,pH 计,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) 等。

6.2 试剂

试剂见附录 B。

7 筛查鉴定方法

7.1 抽样检查

按照 SN/T 2122 给出的方法进行抽样、取样。

7.2 RT-PCR 方法

按附录 B 给出的方法,进行通用 RT-PCR 检测。用已知病毒分离物作阳性对照,健康植物组织作阴性对照,并设置空白对照。

7.3 序列测定与分析

将 PCR 产物回收后,进行克隆、测序,或者 PCR 产物直接测序(序列测定可由专业的生物公司完成)。把测定的核苷酸序列及翻译后的氨基酸序列与已知马铃薯 Y 病毒属的病毒序列(参见附录 C)进行比对。采用邻接法(或者利用 MEGA6 的 NJ 算法)构建系统发育树。

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/>

8 结果判定

8.1 RT-PCR 方法检测结果为阴性,则判定未检出马铃薯 Y 病毒属病毒。

8.2 RT-PCR 方法检测结果为阳性,则进行序列测定与分析:

- a) 如果翻译后氨基酸序列与马铃薯 Y 病毒属已知病毒氨基酸序列同源性最高且大于 80%,则判定检出马铃薯 Y 病毒属病毒(具体病毒种类还需采用其他方法进一步鉴定)。
- b) 如果翻译后氨基酸序列与马铃薯 Y 病毒属已知病毒序列同源性小于 80%:
 - 如果系统发育分析表明与马铃薯 Y 病毒属病毒聚为一群,则判定检出马铃薯 Y 病毒属病毒(具体病毒种类还需采用其他方法进一步鉴定);

注: 所检测到的病毒可能属于基因组序列尚未测定的已知病毒或尚未报道的新的病毒种类。

——如果系统发育分析表明与马铃薯 Y 病毒属病毒未聚为一群,则判定未检出马铃薯 Y 病毒属病毒。

- c) 如果测定的基因组序列与马铃薯 Y 病毒属中的 PPV、PVA、PPV 和 BBrMV 中植物病毒基因组序列同源性最高,则判定筛查出检疫性植物病毒,需要根据具体病毒的检疫鉴定标准方法进行最终鉴定到种。

9 结果记录

记录样品信息和检测数据,包括样品来源、植物种类、取样时间与地点,检测时间、方法和结果以及人员签字。RT-PCR 凝胶电泳检测应保存电泳照片,测序结果保存测序报告图。

10 样品保存

检出马铃薯 Y 病毒属的样品应妥善保存在超低温冰箱中,或冻干后低温保存,并作好登记和标识,以备复核。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯 Y 病毒属基本信息

A.1 病毒粒体形态

马铃薯 Y 病毒属的病毒粒体为线状粒子,通常长约 680~900 nm,直径 12~15 nm,螺旋对称结构,螺距约 3.4 nm。该属病毒外壳蛋白由一种多肽组成,分子量为 28~38 kDa,占整个病毒粒体 95% 的重量(图 A.1)。

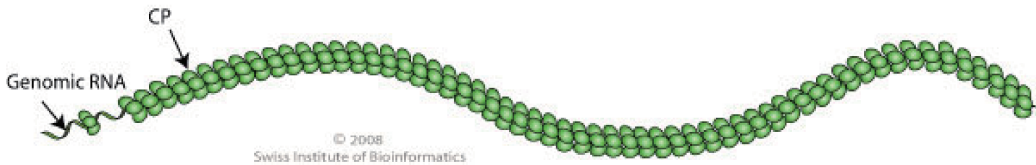


图 A.1 马铃薯 Y 病毒属病毒的粒体结构

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)

A.2 病毒的基因组结构与功能

马铃薯 Y 病毒属病毒为单分体正单链 RNA 病毒,全长约 10 Kb,在 RNA 基因组的 5'末端共价连接一个蛋白质,称 VPg(Viral protein, genome-linked),约 24kDa,3'末端具有一个 poly(A)尾,5'和 3'末端各有一段非翻译区(UTR);整个基因组的第一个可读框编码一个大的多聚蛋白(polyprotein),经过翻译加工成具有不同功能的蛋白。加工后的成熟蛋白从 N 端到 C 端依次为:P1 蛋白、HC-Pro 蛋白、P3 蛋白、6K1 蛋白、CI 蛋白、6K2 蛋白、VPg 蛋白、NIa 蛋白、NIb 蛋白和外壳蛋白 CP(Hari, 1981; Dougherty and Carrington, 1988; Murphy et al., 1995)。其中三个病毒基因组自身编码的蛋白(P1、HC-Pro 和 NIa 蛋白)为具有自我切割和切割其他蛋白能力的蛋白酶,且其切割位点具有一定的特异性(Dougherty and Semler, 1993)。最新研究表明,马铃薯 Y 病毒科病毒还编码一个短的可读框,位于 P3 顺反子中,它由 +2 读框翻译,其编码产物被称为 PIPO(Pretty Interesting *Potyviridae* ORF)蛋白(Chung et al., 2008)。马铃薯 Y 病毒属基因组结构特征见图 A.2。

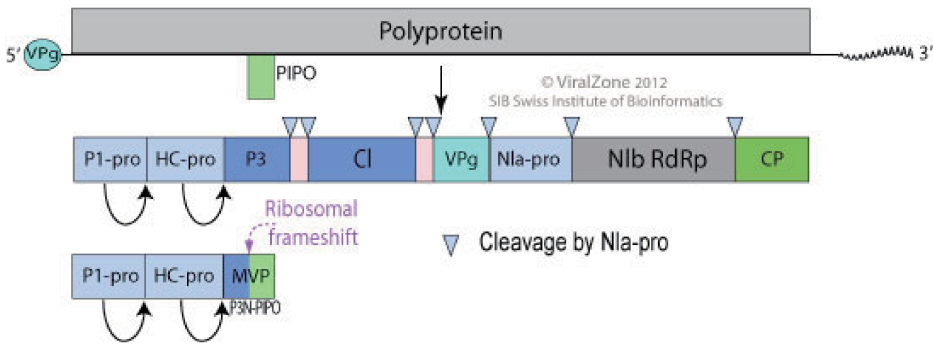


图 A.2 马铃薯 Y 病毒属基因组结构特征(来源同图 A.1)

A.3 马铃薯 Y 病毒属的部分病毒种类

马铃薯 Y 病毒属的部分病毒种类见表 A.1。

表 A.1 马铃薯 Y 病毒属的部分病毒种类

编号	中文名	学名
1	山姜花叶病毒	<i>Alpinia mosaic virus</i> (AIpMV)
2	六出花花叶病毒	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (AIMV)
3	莧叶斑驳病毒	<i>Amaranthus leaf mottle virus</i> (AmLMV)
4	萝藦花叶病毒	<i>Araujia mosaic virus</i> (ArjMV)
5	菊芋潜隐病毒	<i>Artichoke latent virus</i> (ArLV)
6	天门冬病毒 1 号	<i>Asparagus virus 1</i> (AV-1)
7	香蕉苞片花叶病毒	<i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)
8	菜豆普通花叶坏死病毒	<i>Bean common mosaic necrosis virus</i> (BCMNV)
9	菜豆普通花叶病毒	<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)
10	菜豆黄花叶病毒	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)
11	甜菜花叶病毒	<i>Beet mosaic virus</i> (BtMV)
12	鬼针草斑驳病毒	<i>Bidens mottle virus</i> (BiMoV)
13	虾脊兰轻型花叶病毒	<i>Calanthe mild mosaic virus</i> (CaIMMV)
14	豆蔻花叶病毒	<i>Cardamom mosaic virus</i> (CdMV)
15	麝香石竹脉斑驳病毒	<i>Carnation vein mottle virus</i> (CVMoV)
16	胡萝卜细叶病毒	<i>Carrot thin leaf virus</i> (CTLV)
17	芹菜花叶病毒	<i>Celery mosaic virus</i> (CeMV)
18	Ceratobium 花叶病毒	<i>Ceratobium mosaic virus</i> (CerMV)
19	南美红辣椒脉斑驳病毒	<i>Chilli veinal mottle virus</i> (ChiVMV)
20	三叶草黄脉病毒	<i>Clover yellow vein virus</i> (CIYVV)
21	鸭茅线条病毒	<i>Cocksfoot streak virus</i> (CSV)
22	哥伦比亚曼陀罗病毒	<i>Colombian datura virus</i> (CDV)
23	鸭跖草花叶病毒	<i>Commelina mosaic virus</i> (ComMV)
24	豇豆蚜传花叶病毒	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)
25	豇豆绿色脉带病毒	<i>Cowpea green vein banding virus</i> (CGVBV)
26	芋花叶病毒	<i>Dasheen mosaic virus</i> (DsMV)
27	曼陀罗带化病毒	<i>Datura shoestring virus</i> (DSSV)
28	苣荬菜坏死花叶病毒	<i>Endive necrotic mosaic virus</i> (ENMV)
29	香雪兰花叶病毒	<i>Freesia mosaic virus</i> (FreMV)
30	嘉兰条斑花叶病毒	<i>Gloriosa stripe mosaic virus</i> (GSMV)
31	花生眼斑病毒	<i>Groundnut eyespot virus</i> (GEV)
32	羊草花叶病毒	<i>Guinea grass mosaic virus</i> (GGMV)
33	堆心菊 Y 病毒	<i>Helenium virus Y</i> (HVY)

编号	中文名	学名
34	天仙子花叶病毒	<i>Henbane mosaic virus</i> (HMV)
35	朱顶红花叶病毒	<i>Hippeastrum mosaic virus</i> (HiMV)
36	风信子花叶病毒	<i>Hyacinth mosaic virus</i> (HyaMV)
37	暗黄鸢尾花叶病毒	<i>Iris fulva mosaic virus</i> (IFMV)
38	鸢尾轻型花叶病毒	<i>Iris mild mosaic virus</i> (IMMV)
39	鸢尾重型花叶病毒	<i>Iris severe mosaic virus</i> (ISMV)
40	石茅高粱花叶病毒	<i>Johnsongrass mosaic virus</i> (JGMV)
41	伽蓝菜花叶病毒	<i>Kalanchoe mosaic virus</i> (KMV)
42	魔芋花叶病毒	<i>Konjac mosaic virus</i> (KoMV)
43	韭葱黄条病毒	<i>Leek yellow stripe virus</i> (LYSV)
44	李痘病毒	<i>Plum pox virus</i> (PPV)
45	马铃薯 A 病毒	<i>Potato virus A</i> (PVA)
46	马铃薯 V 病毒	<i>Potato virus V</i> (PVV)
47	马铃薯 Y 病毒	<i>Potato virus Y</i> (PVY)

附 录 B

(规范性附录)

通用 RT-PCR 检测方法

B.1 主要试剂

B.1.1 RNA 提取试剂

TRIzol reagent、氯仿、异丙醇、70%乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水。

B.1.2 RT-PCR 试剂

5×RT 缓冲液、dNTP 混合液(各 10 mmol/L)、M-MuLV 反转录酶(200 U/μL)、RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+})、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)。

B.1.3 10×TBE 缓冲液 (Tris-Borate-EDTA)

Tris 碱 108 g

硼酸 55 g

Na_4 EDTA 9.3 g

加双蒸水溶解,定容到 1 L。

B.1.4 电泳试剂

琼脂糖、0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液、10×TBE 缓冲液。

B.2 引物序列与合成

设计的上游引物 PotyCP-F 和下游引物 PotyCP-R 位于 CP 段,上游引物 PotyCP-F: 5' - ATGGT HTGGT GYATH GARAA YGG-3',下游引物 PotyCP-R: 5' - TGCTG CKGCY TTCAT YTG -3', H = A/T/C, Y = C/T, R = A/G, K = T/G, 片段约 330 bp。

B.3 总 RNA 的提取

采用 TRIzol Reagent 方法提取病叶总 RNA,具体操作如下:

——取 0.1 g 的病叶放入研钵中,加入 1 mL 的 TRIzol Reagent 充分研磨,15℃~30℃下静置 5 min。

——在 2℃~8℃下 12 000×g 离心 10 min;把上清液转移到一新管中,并加入 0.2 mL 氯仿,盖好管盖,剧烈振荡 15 sec,15℃~30℃放置 3 min。

——4℃ 12 000×g 离心 15 min,取上层无色水相(约 600 μL)转移到新管中。

——在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,15℃~30℃静置 10 min。

——2℃~8℃下 12 000×g 离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀。

——2℃~8℃下 7 500×g 离心 3 min,弃尽上清液。

——室温放置晾干,待乙醇挥发完毕,加入 100 μL 无 RNase 双蒸水,充分溶解 RNA,置于-20℃保存备用。

注:在能够保证总 RNA 质量的情况下,也可以采用其他植物总 RNA 提取方法。

B.4 反转录(cDNA 合成)

反转录方法:在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 3'端引物(10 $\mu\text{mol/L}$),于 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中处理 7 min,然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5 $\times$ 反转录缓冲液 2.5 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MuLV 反转录酶 0.5 μL 、核糖核酸酶抑制剂 RNasin 0.5 μL 、无 RNase 的双蒸水 4.5 μL 。然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,自然冷却至室温,作为后续 PCR 的模板。

B.5 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中:2.5 μL 的 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg^{2+}),dNTP 0.5 μL (每种各 10 mmol/L),*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL (5 U/ μL),上下游引物各 2.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),DNA 模板 2 μL ,双蒸水补足体积。

PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min

B.6 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6 $\times$ 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 0.5 $\times$ TBE 缓冲液的 1.5%琼脂糖凝胶孔中,然后在一定电压下(如 120 V)电泳。电泳结束后,放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

B.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照产生预期大小条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,PCR 检测结果为阳性;
- 如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,PCR 检测结果为阴性。

附 录 C
(资料性附录)

检疫性马铃薯 Y 病毒属病毒基因参考序列

> Plum pox virus (NC_001445.1)

ATGGTTTGGTGCATAGAGAATGGAACATCCCCGAATATCAATGGAATGTGGGTGATGATG
GATGGGGAAACACAAGTGGAGTATCCAATAAAGCCATTGTTGGATCATGCGAAACCCACT
TTTAGACAAATTATGGCACATTTTCAGTAACGTGGCTGAAGCGTATATTGAAAAACGAAAT
TATGAAAAAGCATACATGCCAAGGTATGGAATTCAGCGCAACCTGACAGACTACAGCCTC
GCCAGATATGCCTTTGATTTTTTACGAAATGACTTCAACGACACCCGTACGGGCACGTGAAG
CTCATATCCAAATGAAGGCAGCAGCA

> Banana bract mosaic virus (NC_009745.1)

ATGGTGTGGTGCATAGAGAATGGGACATCACCAAATTTAAATGGTACATGGAGTATGATG
GACAAGGGTGAGCAACTAGTCTACCAGTTAAAGCCCATTTATTGAGAACGCTCAGCCTACTT
TTCGGCAAATTATGGCACATTTTTCTGATGCCGCTGAGGCATACATAACAATGCGTAATG
TCACGGAGAGATATATGCCTAGGTGGGGAGCACTTAGAGGATTGAATGACATAAGCTTAG
CCCGATATGCATTTGATTTTTTACGTAGTCACATCAAAAACCTACGAACAGGGCTAGAGAAG
CACACACGCAGATGAAAGCTGCAGCT

> Potato virus A (NC_004039.1)

ATGGTATGGTGCATTGAGAATGGAACCTCTCCAGACATTAATGGAGTTTGGACCATGATG
GATAATGAGGAACAAGTGTCATATCCATTAAAACCCATGCTTGACCATGCAAAGCCTTCT
TTAAGGCAAATTATGAGACATTTTCAGCGCACTCGCAGAGGCGTACATTGAGATGAGAAGT
CGTGAGAAACCATACATGCCCAGGTATGGTCTTCAACGCAACCTGAGAGATCAAAGTTTG
GCAAGGTATGCTTTTGTATTTCTATGAGATCACTGCAACCACTCCGATCAGAGCCAAAGAG
GCGCATCTGCAGATGAAAGCAGCAGCG

> Potato virus V (NC_004010.1)

ATGGTTTGGTGCATCGAGAATGGAACATCACCGAATGTGAATGGAGTTTGGACAATGATG
GATGGTGAGGAACAAGTGGAGTTTCCCCTAAAACCGGTGATCGAAAATGCGAAGCCTACT
TTTAGGCAGATAATGGCACATTTTTCTGATGTGGCTGAGGCGTACATAGAGATGCGTAAC
AAGAGTGAACCATACATGCCACGGTATGGTTTGGTGAGAAATTTGCGGGATATGAGTTTG
GCTCGATATGCATTTGATTTCTATGAGATCACATCCCGCACATCCGTCCGAGCACGAGAGG
CTCACATCCAGATGAAGGCAGCAGCA

参 考 文 献

Berger PH, Adams MJ, Barnett OW, Brunt AA, Hammond J, Hill JH, Jordan RL, Kashiwazaki S, Rybicki E, Spence N, Stenger DC, Ohki ST, Uyeda I, van Zaayen A, Valkonen J, Vetten HJ (2005) *Potyviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy, 8th Report of the ICTV. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 819-841
