

附录 D
(资料性附录)
生物学测定

D.1 接种

病叶加 1 : 1(质量 : 体积)的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2)于研钵中充分研碎,在待接种植物叶片表面均匀洒上硅藻土,用手指蘸取研磨好的汁液轻轻涂抹于叶片表面。

D.2 寄主症状

D.2.1 鉴别寄主(diagnostic species)

菜豆:品种 Tendergreen 和 Canadian Wonder 表现褪绿局部斑和系统褪绿花叶。品种 Prince 仅为局部侵染,BBSV 不能侵染品种 Pinto、Idaho Refugee、Blue Lake 和 Tendercrop。

豌豆:BBSV 可侵染所有品种,产生系统褪绿斑驳症状,在冷凉气候下茎和叶片出现坏死。

蚕豆:BBSV 侵染品种“成胡 10 号”后表现花叶型,即接种叶片上有或无局部斑,新叶均呈褪绿条纹状、环状和块状花叶片上出现褪绿斑驳和花叶症状。

BBSV 不能侵染苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*), 千日红(*Gomphrena globosa*), 普通烟(*Nicotiana tabacum*)和克利夫兰烟(*N. clevelandii*)。

D.2.2 繁殖寄主(propagation species)

豌豆品种 Onward,菜豆品种 Tendergreen 和蚕豆品种“成胡 10 号”。

D.2.3 试验寄主(assay species)

BBSV 在菜豆品种 Tendergreen 上引起局部斑,在蚕豆上表现系统侵染。



中华人民共和国国家标准

GB/T 28064—2011

蚕豆染色病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of broad bean stain virus



GB/T 28064-2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44584

定价: 16.00 元

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

表 C.1 RT-PCR 检测的引物

检测基因	引物序列(5'-3')	
	上游引物	Tgg CAA gTC ACA gTT CgC
小外壳蛋白(SCP)	下游引物	CgC CTC TTT ggT TTC ACg

PCR 反应体系见表 C.2。反应参数:94 °C 5 min;94 °C 30 s,54 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 7 min。

表 C.2 PCR 反应体系

10×PCR Buffer(MgCl ₂ plus)	2.5
上游引物(20 μmol/L)	0.5
下游引物(20 μmol/L)	0.5
Taq 酶(5 U/μL)	0.2
cDNA 模板	2.0
去离子水	补足反应总体积为 25 μL

C.2.3 电泳

C.2.3.1 制备凝胶

配制 1.5%(质量:浓度)的琼脂糖凝胶。溴化乙锭可直接加入琼脂糖凝胶中(浓度为 0.5 μg/mL),也可在电泳完成后使用溴化乙锭染色。

C.2.3.2 电泳

用 1 μL 6×加样缓冲液与 5 μL 样品混合,然后将其和适合的 DNA 相对分子质量标准物分别加入到样品孔中。电泳结束后将琼脂糖凝胶置于紫外透射仪上观察,拍照并保留结果。

C.3 结果判断

C.3.1 阳性对照在 499 bp 处有扩增片段,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,可判定为阳性。

C.3.2 阳性对照、阴性对照和空白对照结果正确,且样品在 499 bp 处无扩增条带,判定结果为阴性。

中华人民共和国
国家标准
蚕豆染色病毒检疫鉴定方法

GB/T 28064—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2012 年 4 月第一版 2012 年 4 月第一次印刷

*

书号:155066·1-44584 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 Trizol 裂解液。

C.1.2 三氯甲烷。

C.1.3 异丙醇。

C.1.4 75%乙醇。

C.1.5 去离子水(DEPC处理)。

C.1.6 50×TAE

Tris 242 g

冰醋酸 52.1 mL

Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

C.1.7 6×加样缓冲液

0.25%溴酚蓝

40%(质量浓度)蔗糖水溶液

C.2 实验步骤**C.2.1 总 RNA 提取**

称取 0.1 g 植物组织加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,剧烈振荡摇匀后室温保持 5 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加入 0.2 mL 三氯甲烷并剧烈振荡混匀;4℃,12 000 g 离心 10 min,取上清液;加 0.6 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,室温保持 5 min;4℃,12 000 g 离心 10 min,弃上清液;加 75%的乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500 g 离心 2 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后,溶于 30 μL 去离子水(DEPC处理)中,-20℃保存备用。也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 RT-PCR 反应

RT-PCR 检测引物见表 C.1。cDNA 的合成:在 0.2 mL 反应管中,加入总 RNA 6 μL,1 μL 下游引物(20 μmol/L),去离子水 4 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,65℃水浴 5 min,取出后立即放在冰上,加入 5×First Strand Buffer 4 μL,40 U/μL RNase Block Ribonuclease Inhibitor 1 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,42℃水浴 2 min,然后再加入 200 U/μL Reverse Transcriptase 1 μL,混匀后 42℃水浴 50 min,70℃水浴 15 min,合成 cDNA。First Strand Buffer 和 Reverse Transcriptase 的用量需要依据反转录酶的品牌进行调整。也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行扩增。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位: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、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈红运、陈青、林石明、郑耘、赵文军、李一农、廖富荣、余芳平、朱水芳、陈枝楠。