



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3449—2012

昆虫介体中植原体检疫鉴定方法

Detection and identification of candidatus phytoplasma in insect vector

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

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、中华人民共和国宁夏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵文军、陈岩、杨毅、杨旭光、牟海青、朱水芳。

昆虫介体中植原体检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了昆虫介体中植原体的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境及国内监测中同翅目和半翅目(具刺吸式口器)昆虫体内植原体的检疫和鉴定。

2 原理

根据传播植原体的昆虫介体种类(参见附录 A)及植原体的分子生物学特性进行鉴定。

3 仪器和试剂

3.1 仪器设备

PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、制冰机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、台式小型离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、移液器、电泳仪、凝胶成像系统。

3.2 主要试剂

甘油、75%乙醇、无水乙醇、冰醋酸、三氯甲烷、卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸:三氯甲烷=6:1:3)、昆虫保存液(75%乙醇,1%甘油)、PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、TAE 电泳缓冲液、DNA 相对分子质量标准、SYBR Green I 等。

4 检测鉴定方法

4.1 昆虫的前处理

昆虫饥饿处理 12 h,以防止昆虫肠道内食物 DNA 的污染。

4.2 昆虫体内植原体基因组 DNA 提取

昆虫体内植原体基因组 DNA 的提取方法(见附录 B)。

4.3 巢式 PCR 扩增及凝胶电泳检测

用两对植原体扩增通用引物进行巢式 PCR 扩增并进行凝胶电泳检测(见附录 C)。

4.4 虚拟 RFLP 指纹图谱检测

见附录 D。

5 结果判定

5.1 在 4.3 检测中,若用通用引物 R16F2n/R16R2 进行第二轮 PCR 后,PCR 扩增产物经凝胶电泳检