



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.2—2017

基因条形码筛查方法 第2部分：检疫性黄单胞菌

DNA barcoding screening method—
Part 2: Quarantine *Xanthomonas* spp.

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

SN/T 4877《基因条形码筛查方法》共分为 3 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。

本部分为 SN/T 4877 的第 2 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。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：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、中华人民共和国云浮出入境检验检疫局、中华人民共和国满洲里出入境检验检疫局、中国农科院生物技术研究所。

本部分主要起草人：田茜、冯建军、何旭诺、刘玮琦、赵文军、李为民。

基因条形码筛查方法

第 2 部分：检疫性黄单胞菌

1 范围

SN/T 4877 的本部分规定了检疫性黄单胞菌 DNA 条形码筛查中序列的扩增、分析及结果判定等。本部分适用于检疫性黄单胞菌的筛查。

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 1400 甘蔗流胶病菌检疫鉴定方法
- SN/T 2372 水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的检测方法
- SN/T 3278 风信子黄腐病菌检疫鉴定方法
- SN/T 3431 香蕉坏死条纹病菌检疫鉴定方法
- SN/T 4073 芒果细菌性黑斑病菌快速检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 DNA 条形码

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。

3.2 16S rRNA 基因

原核生物核糖体 30S 小亚基的组成部分,16S rRNA 基因序列具有高度的保守性和特异性,是细菌种间鉴定的重要依据。

3.3 *cpn60* 基因

编码伴侣蛋白 60(*cpn60*,又叫热休克蛋白 60/Hsp60)的基因,为单拷贝基因,广泛存在于细菌及真核生物细胞中,是系统进化分析的有效分子标记。

4 黄单胞菌属基本信息

学名:*Xanthomonas*

分类地位:细菌界(Bacteria),变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria),黄单胞菌目(Xanthomonadales),黄单胞菌科(Xanthomonadaceae),黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

黄单胞菌属是最重要的植物病原细菌属,该属目前包括了 14 个进境植物检疫性有害生物:

1. 甘蔗白色条纹病菌(*Xanthomonas albilineans*);

2. 香蕉坏死条纹病菌(*Xanthomonas arboricola* pv.*celebensis*);
3. 胡椒叶斑病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv.*betlicola*);
4. 柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*);
5. 木薯细菌性萎蔫病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv.*manihotis*);
6. 甘蔗流胶病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv.*vasculorum*);
7. 芒果黑斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv.*mangiferaeindicae*);
8. 香蕉细菌性萎蔫病菌(*Xanthomonas campestris* pv.*musacearum*);
9. 木薯细菌性叶斑病菌(*Xanthomonas cassavae*);
10. 草莓角斑病菌(*Xanthomonas fragariae*);
11. 风信子黄腐病菌(*Xanthomonas hyacinthi*);
12. 水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae*);
13. 水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzicola*);
14. 杨树细菌性溃疡病菌(*Xanthomonas populi*)。

5 方法原理

根据细菌核糖体 16S rRNA 基因序列分析确定目标细菌是否为黄单胞菌,然后根据 *cpn60* 基因序列分析对目标细菌进行筛查。

6 仪器设备和主要试剂

6.1 仪器设备

生物安全柜、高压灭菌锅、生化培养箱、离心机、微量分光光度仪、PCR 仪、电泳设备、凝胶成像系统、冰箱等。

6.2 主要试剂

细菌 DNA 提取试剂盒、PCR Premix、超纯水、DNA marker。

7 筛查鉴定方法

7.1 DNA 制备

对细菌进行液体培养或平板培养,利用商品化细菌 DNA 提取试剂盒制备细菌总 DNA,测定 DNA 浓度及纯度后,保存于 -20℃ 冰箱备用。

7.2 16S rRNA 基因序列扩增测序

利用通用引物进行 16S rRNA 基因扩增测序(具体步骤见附录 A),将序列在 Genbank 数据库或中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库中进行比对,若与数据库中黄单胞菌 16S rRNA 基因序列相似性大于 97%,则进行 7.3 操作。

7.3 *cpn60* 基因序列扩增

利用通用引物进行 *cpn60* 基因序列扩增测序(具体步骤见附录 B)。

7.4 序列分析

将 *cpn60* 基因序列在中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库中比对分析,采用邻接法构建基于 *cpn60* 基因序列的 NJ 树。

8 结果判定

16S rRNA 基因序列长度大于 1 200 bp,在 Genbank 数据库或中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库中进行比对分析,若与数据库中黄单胞菌 16S rRNA 基因序列相似性大于 97%,则判定该菌为黄单胞菌。

cpn60 基因序列长度大于 540 bp,在中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库中进行比对分析,若与数据库中某黄单胞菌的 *cpn60* 基因序列同源性大于 98%,且在 NJ 树中聚在同一分支,则初步判定为该黄单胞菌。

若判定为目标检疫性黄单胞菌,有相应标准的需要根据标准方法(SN/T 3431 或 SN/T 1400 或 SN/T 4073 或 SN/T 3278 或 SN/T 2372)进行最终鉴定,无相应标准的需要按照常规细菌鉴定方法进行最终鉴定。

9 样品保存

9.1 样品保存

分离并最终鉴定为检疫性目标细菌的菌株应转接到试管斜面上,经登记和经手人签字后置于 4 ℃ 低温冰箱中保存,定期(30 天~60 天)转接,必要时冻干后长期保存。

9.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片,序列需要保存电子文件。

附 录 A
(规范性附录)
16S rRNA 基因扩增程序

A.1 引物序列

16sF-LYP-3;5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

16sR-LYP-3;5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGAGACGGGCGGTGTGTRCA-3'

注：下划线部分为测序引物，全部序列都要合成(R=G 或 A)。

A.2 PCR 体系及扩增程序

推荐用 50 μ L 体系，采用商品化的 PCR Premix 进行 PCR 扩增，反应体系中引物浓度为 200 nmol/L，DNA 模板量为 10 ng~100 ng。

PCR 反应程序：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 1 min，60 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min。

该引物为通用引物，每次做 PCR 应做空白对照，以确认是否污染。

A.3 电泳及测序

取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，PCR 产物大小：约 1 200 bp 左右。测序引物为 M13-47 及 RV-M(或 M13-48)。

附 录 B
(规范性附录)
cpn60 基因扩增程序

B.1 引物序列

先用 H1594/H1595 扩增,若效果不理想,再利用 H729/H730 扩增。

H1594/H1595

H1594:5'-CGCCAGGGTTTTCCTCAGTCACGACGACGTCGCCGGTGACGGCACCACCAC-3'

H1595:5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGACGACGGTCGCCGAAGCCCGGGGCCTT-3'

H729/H730

H729: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGAIHHCIGGIGAYGGIACIACIAC-3'

H730:5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAYKIYKITCICCRAAICCIGGIGC

注:下划线部分为测序引物,全部序列都要合成(I=次黄嘌呤,Y=C或T,R=G或A,K=G或T)。

B.2 PCR 体系及扩增程序

推荐用 50 μL 体系, 采用商品化的 PCR Premix 进行 PCR 扩增, 反应体系中引物浓度为 200 nmol/L, DNA 模板量为 10 ng~100 ng。

PCR 反应程序:

H1594/H1595:94 °C 5 min;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 10 min。

H729/H730: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

该引物为通用引物,每次做 PCR 应做空白对照,以确认是否污染。

B.3 电泳与测序

取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物大小: 555 bp, 由于添加了测序引物, 在电泳显示为 600 bp 左右。测序引物为 M13-47 及 RV-M(或 M13-48)。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
基因条形码筛查方法
第 2 部分：检疫性黄单胞菌
SN/T 4877.2—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

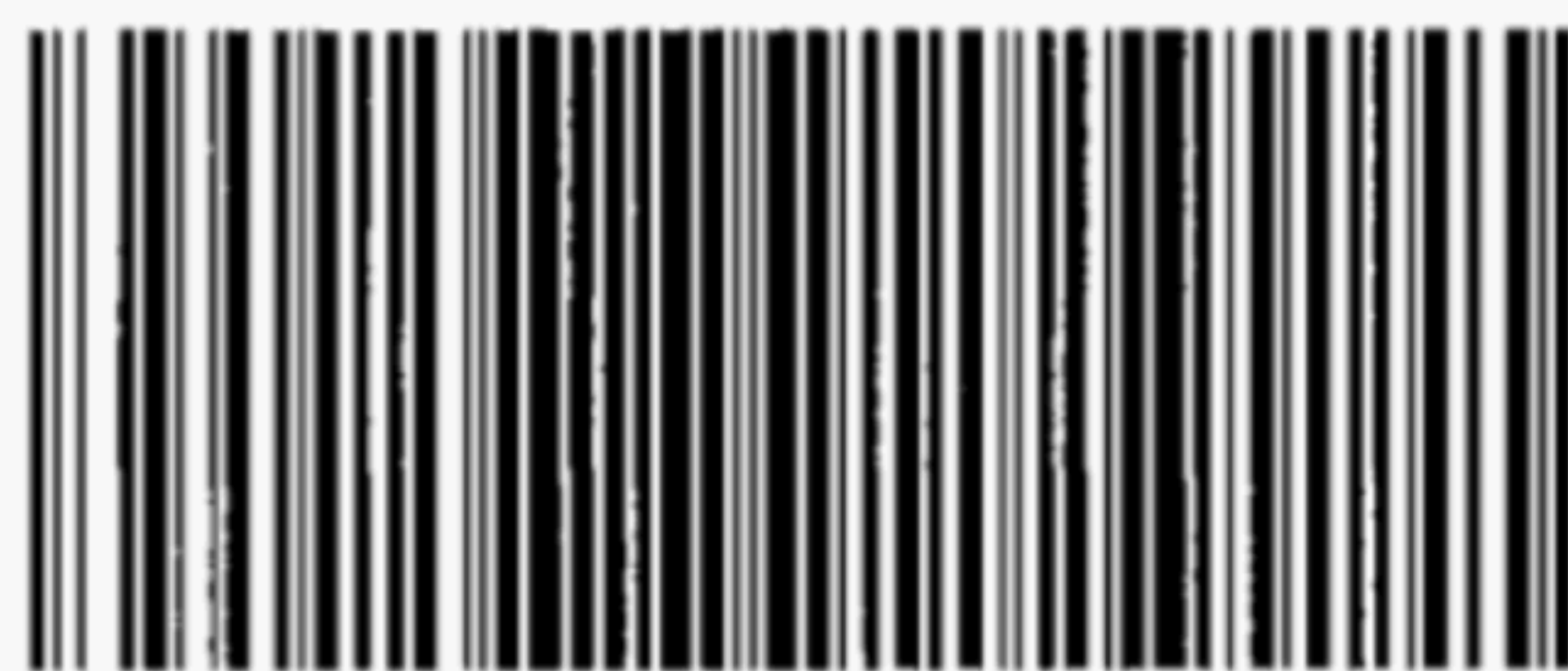
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2018 年 6 月第一版 2018 年 6 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-33388 定价 16.00 元



SN/T 4877.2—2017