



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.6—2017

基因条形码筛查方法 第 6 部分：检疫性嗜酸菌

DNA barcoding screening method—Part 6: Quarantine *Acidovorax* spp.

2017-08-29 发布

2018-04-01 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

SN/T 4877《基因条形码筛查方法》分为 10 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。

本部分为 SN/T 4877 的第 6 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中国检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人：冯建军、赵文军、田茜、汪莹、龙海、程颖慧、郑耘、章桂明、陈枝楠。

基因条形码筛查方法

第6部分:检疫性嗜酸菌

1 范围

SN/T 4877 的本部分规定了 *Acidovorax citrulli*、*Acidovorax cattleyae* 和 *Acidovorax konjaci* 三种检疫性嗜酸菌的 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 *Acidovorax citrulli*、*Acidovorax cattleyae* 和 *Acidovorax konjaci* 三种检疫性嗜酸菌的筛查。

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 1465 西瓜细菌性果斑病菌检疫鉴定方法

SN/T 3681 魔芋细菌性叶斑病菌检疫鉴定方法

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 DNA barcode

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

内部转录间隔区 internal transcribed spacer; ITS

在 rDNA 基因中,位于保守 16S 和 23S rDNA 间隔区之间的序列,包括部分 tRNA 基因和一些非编码区,由于进化选择压力较小,ITS 序列比 16S 和 23S rDNA 序列本身的变异性更大,因此,ITS 适合用于细菌种下不同群体的特异性检测与鉴定。

4 嗜酸菌的基本信息

学名: *Acidovorax*

分类地位: 细菌界 (bacteria), 薄壁菌门 (Gracilicutes) 假单胞菌科 (Pseudomonaceae) 嗜酸菌属 (*Acidovorax*), 属 rRNA 组 I。目前植物性嗜酸菌有 5 个种,其中前 3 个为进境植物检疫性有害生物。

瓜类细菌性果斑病菌 *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.1978) Schaad et al.2008

兰花褐斑病菌 *Acidovorax cattleyae* (Pavarino 1911) Schaad et al.2008

魔芋细菌性叶斑病菌 *Acidovorax konjaci* (Willems et al.1992)

燕麦嗜酸菌 *Acidovorax avenae* (Manns 1909) Willems et al.1992, Schaad et al.2008

水稻褐条病菌 *Acidovorax oryzae* (Schaad et al.2008)

5 方法原理

根据嗜酸菌属 16S-23S rDNA 的 ITS 序列分析对检疫性嗜酸菌进行 DNA 条形码筛查。

6 仪器、用具及试剂

6.1 仪器

PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、制冰机、微量分光光度仪、台式小型离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、电泳仪、凝胶成像系统。

6.2 用具

可调移液器(最大量程为 20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)及相关吸头、离心管(2 mL)、PCR 管、量筒、烧杯、酒精灯、镊子等。

6.3 培养基和试剂

营养肉胨液体培养基(NB)配方为 3 g 牛肉浸膏(Beef extract), 5 g 蛋白胨(Peptone), 1 000 mL 蒸馏水, pH 值为 7.0~7.2, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min。若是需要固体平板培养基, 加入 15 g 琼脂粉(Agar)灭菌后倒入培养皿中即可配制成 NA 培养基。

所有试剂见附录 A、附录 B。

7 筛查方法

7.1 DNA 制备

对拟筛查的分离物进行液体培养或平板培养, 利用 CTAB 法或商品化细菌 DNA 提取试剂盒提取制备 DNA, 测定 DNA 浓度及纯度测定后, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。具体步骤见附录 A。

7.2 ITS 扩增及测序

利用引物进行 ITS 序列扩增, 然后将扩增 PCR 产物测序, 具体步骤见附录 B。

7.3 序列分析

将测序结果进行整理拼接, 去除两端测序引物部分序列, 然后将序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)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, 三种检疫性嗜酸菌的 DNA 条形码见附录 C。

8 结果判定

若 PCR 扩增产物电泳结果为阳性, 且产物大小约 550bp 时, 可以初步判定该分离物为嗜酸菌; 若 PCR 扩增产物电泳结果为阴性, 可以初步判定该分离物不属于嗜酸菌。

若将该产物序列在 NCBI 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, 与数据库中某种检疫性嗜酸菌 ITS 基因序列同源性 $\geq 99\%$, 则初步判定该菌为对应检疫性嗜酸菌。

若进一步判定为目标检疫性嗜酸菌, 需要根据标准方法(SN/T 1465 或 SN/T 3681)进行最终鉴

定,无相应标准的按照常规细菌鉴定方法进行最终鉴定。

9 样品保存与复核

9.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出检疫性嗜酸菌的样品应保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后须经高压灭菌后方可处理。

9.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为检疫性嗜酸菌的菌株,将菌体挑到30%的甘油中混匀, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。

9.3 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图。

附 录 A
(规范性附录)
DNA 提取

A.1 试剂

十二烷基肌氨酸钠(*N*-Lauroylsarcosine sodium salt, NLS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(EDTA)、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、磷酸氢二钾(K₂HPO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、牛血清蛋白(BSA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸(HCl)、氯化钠(NaCl)、苯酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇等。

A.2 溶液

A.2.1 DNA 抽提液

CTAB	20 g/L
Tris-HCl	100 mmol/L(pH 8.0)
EDTA	20 mmol/L(pH 8.0)
NaCl	1.4 mol/L

A.2.2 10% NLS 液

十二烷基肌氨酸钠	10 g
无菌水	1 mL

A.2.3 TE 缓冲液

Tris	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L(pH 8.0)

A.2.4 CTAB/NaCl 溶液

10%CTAB
0.7 mol/L NaCl

A.2.5 蛋白酶 K

蛋白酶 K	20 mg
无菌水	1 mL

37 ℃ 水浴 1 h 后分装成单次使用的小份,于-20 ℃ 备用。

A.3 DNA 提取

挑取少量纯培养菌株的菌落到 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 无菌水混匀后,10 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加入 500 μL DNA 抽提液、20 μL 蛋白酶 K、80 μL 10% NLS 混合后,55 ℃ 水浴 1 h~

2 h,然后 4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min;取上清,加入 400 μ L 异丙醇,−20 ℃ 保持 30 min 后,4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min;弃上清,加入 600 μ L TE 缓冲液、30 μ L 10% SDS、12 μ L 蛋白酶 K,37 ℃ 温育 30 min~60 min;加 100 μ L 5 mol/L NaCl 混匀,84 μ L CTAB-NaCl 溶液在 65 ℃ 水浴 10 min;加等体积 氯仿-异戊醇,8 000 r/min 离心 5 min,取上清,再加等体积苯酚/氯仿/异戊醇抽提,8 000 r/min 离心 5 min;取上清,加 2 倍体积无水乙醇于−20 ℃ 沉淀核酸,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加 500 μ L 70%乙醇洗涤,4 ℃ 6 000 r/min 离心 10 min,弃上清,真空干燥 DNA,加适量 TE 悬浮,−20 ℃ 短期贮存或−80 ℃ 长期贮存备用。

基因组 DNA 提取也可采用等效商品 DNA 提取试剂盒。

附 录 B
(规范性附录)
ITS 序列扩增及测序

B.1 引物序列

ITS3F:5’-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACTTGAACGCCCACACTTATCGG-3’

ITS3R:5’-AGCGGATAACAATTTCACACAGGAGACTTGCGAGGTCTTTTCACCT-3’

注：下划线部分为测序引物 M13F-47 和 M13R-48,全部序列都要合成。

B.2 PCR 扩增体系

PCR 扩增体系见表 B.1。

表 B.1

试剂名称	加样量/ μ L
10 \times PCR 缓冲液	5.0
2.5 mmol/L dNTP	4.0
10 μ mol/L ITS3F	5.0
10 μ mol/L ITS3R	5.0
5U/ μ L <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.5
10 ng/ μ L 模板 DNA	2.0
加双蒸水至	50.0
DNA 模板的取量应根据 DNA 的浓度和纯度而调节;反应体系也可以采用等效商品化试剂盒。	

B.3 PCR 扩增条件

ITSF3/ITSR3 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预扩增 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

B.4 电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分析,电泳结束后在凝胶成像仪观察并记录结果,PCR 产物大小:约 550 bp。

B.5 测序

取 20 μL ~30 μL PCR 产物送测序公司测序,利用测序引物 M13F-47 和 M13R-48 进行双向测序。

附录 C

(规范性附录)

三种检疫性嗜酸菌基因条形码

C.1 *Acidovorax citrulli* 基因条形码

```

1   TTGAACGCCC ACACTTATCG GTTGTTGGAA GAAGTCGGTG CTAACCGACA
51  TGGGTCTGTA GCTCAGCTGG TTAGAGCACC GTCTTGATAA GCGGGGGGTC
101 GTTGGTTTCGA GCCCAACTAG ACCCACCAAA TCTTCCGAAC ATAAGATGCG
151 AGGATCAGTG GGGGATTAGC TCAGCTGGGA GAGCACCTGC TTTGCAAGCA
201 GGGGGTCGTC GGTTCGATCC CGTCATCCTC CACCAACCAA TACGCTCTGC
251 GGTAGGGCGA AGAAACCAAC ACCAAAGCGG CTTCGCGAGA GGCCTCTTTG
301 TTGTTGGTCC GGTATAGACC GGATCAATCG GCTGTTCTTT AAAAATTCAT
351 AGAGTCGAAT CAGCGTTGCC GCGGAAAGC AGGAAACTGC ACCGTGCCGC
401 CGGTGACAAA AATTTGATTGCGTCAAAACG AATATTCAAT TGAGCGAAAG
451 CTTGTTGAAA TTCAGTAATG ACGAATTGTT CTCTAGGTAG CAATACCGAA
501 GAAGAATTCA CATTACGGCA TAACGCGCGA GGTGAAAGAC CTCGCAAGTC

```

C.2 *Acidovorax cattleyae* 基因条形码

```

1   TTGAACGCCC ACACTTATCG GTTGTTGGAA GAGTCGGTGC TAACCGACAT
51  GGGTCTGTAG CTCAGCTGGT TAGAGCACCG TCTTGATAAG GCGGGGGGTCG
101 TTGGTTTCGAG CCCAACTAGA CCCACCAAAT CTTCCGAACA TAAGATGCGA
151 GGATCAGTGG GGGATTAGCT CAGCTGGGAG AGCACCTGCT TTGCAAGCAG
201 GGGGTCGTCG GTTCGATCCC GTCATCCTCC ACCAAACGAT ATGCTCCGCG
251 GTAGGGCGAA GAAACTAACA CCAAAGCGGC TTCGCAAGAG GCCTCTTTGT
301 TGTTGGTCCG GTATAGACCG GGTCAATCGG CTGTTCTTTA AAAATTCATA
351 GAGTCGAATC AGCGTTGCCG GCGGAAAGCA GGAAACTGCA CCGTGCCGTC
401 GGCAACAATA ATTTGATTGC GTCAAAACGA ATGTTCAATT CAGCGAAAGC
451 TGATTGAAAT TCAGTAATGACGAATTGTTC TCGAGGTAGC AATACCGAAG
501 AAGAATTAC ATTACGGCAT AACGCGCGAG GTGAAAGACC TCGCAAGTC

```

C.3 *Acidovorax konjaci* 基因条形码

```

1   TTGAACGCCC ACACTTATCG GTTGTTGGAA GAAGTCGGTG CAACCGACAT
51  GGGTCTGTAG CTCAGCTGGT TAGAGCACCG TCTTGATAAG GCGGGGGGTCG
101 TTGGTTTCGAG CCCAACTAGA CCCACCAAAT ACTTCCAAAC ATCAGATACG
151 GGGAATGAAG GGGGATTAGC TCAGCTGGGA GAGCACCTGC TTTGCAAGCA
201 GGGGGTCGTC GGTTCGATCC CGTCATCCTC CACCAAACAA TTGAAGATAG
251 AAATCAACAC CAAAGAGGCT TTGTAAAAGG CTTCTTTGTT GTTGACCGGT
301 ATTGACCGGA TCAATCGGCT GTTCTTTAAA AATTCATAGA GTCGAATCAG

```


351 CGTTGTCGGC GGAAAGCAGG AAAGTGCACC GTGCCGCCGA CAACTAATTT
401 GATTGCGTCA AAACGAATTA AGGCTTTGCT TTATTTCAAG TAATGACGAA
451 TTGTTCTCGA GGTAGCGATA CCGAAGAAAC ATTCACATTA CGGCATAACG
501 CGCGAGGTGA AAGACCTCGC AAGTC
