



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.8—2017

基因条形码筛查方法 第 8 部分：检疫性炭疽菌

DNA barcoding screening method—Part 8: Quarantine colletotrichum kahawae

2017-08-29 发布

2018-04-01 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》分为 10 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。

本部分为 SN/T 4877 的第 8 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、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：程颖慧、章桂明、高瑞芳、王颖、史亚千、汪莹、段维军、向才玉、潘广、王红英、谢晓露。

基因条形码筛查方法

第 8 部分:检疫性炭疽菌

1 范围

SN/T 4877 的本部分规定了咖啡浆果炭疽病菌 *Colletotrichum kahawae* DNA 条形码筛查中序列的扩增、分析及结果判定等。

本部分适用于进境植物及植物产品中咖啡浆果炭疽病菌的 DNA 条形码的筛查。

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 3679 咖啡浆果炭疽病菌检疫鉴定方法

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

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH

糖酵解反应中的一个酶,分子量 146 kDa,为管家基因,几乎在所有组织中都高水平表达。在同种细胞或者组织中的蛋白质表达量一般是恒定的,且不受含有的部分识别位点、佛波脂等的诱导物质的影响而保持恒定。

4 咖啡浆果炭疽病菌的基本信息

英文名: pathogen of coffee berry disease

学名: *Colletotrichum kahawae* J.M.Waller et Bridge

异名: *Colletotrichum coffeanum* var. *virulans* (Rayner, 1952)

分类学地位: 真菌界(Fungi), 无性型真菌(Anamorphic fungi), 炭疽菌属(*Colletotrichum*)。

5 方法原理

使用 GAPDH 基因作为咖啡浆果炭疽病菌的 DNA 条码基因,通过对检测对象的 DNA 进行 PCR 扩增及产物测序后,利用 NCBI 核酸数据库比对,根据序列相似度筛查物种。

6 仪器设备和试剂

6.1 仪器设备

超净工作台、摇床、烘箱、高压灭菌锅、-20℃低温冰箱、PCR扩增仪、冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、琼脂糖电泳仪、凝胶成像系统、纯水器。

6.2 试剂

氯仿、异戊醇、异丙醇、醋酸钠、甲酰胺、70%乙醇、无水乙醇、Tris 饱和酚、*Taq* DNA 聚合酶、明胶、溴化乙锭、DNA 片段标记物、DNA 裂解液、PCR 缓冲液、电泳缓冲液、上样缓冲液、dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)。

7 筛查鉴定方法

7.1 DNA 制备

DNA 制备方法见附录 A。

7.2 DNA 条形码片段 PCR 扩增

利用 GAPDH 基因的通用引物进行 GAPDH 基因序列扩增,具体步骤见附录 B,测序。

7.3 序列分析

测序结果利用序列拼接软件进行拼接编辑,比对峰图,判断序列方向,去除测序引物序列,去除两段测序质量 Q 值小于 20 的序列。利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 在线数据库中比对 GAPDH 基因序列 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

8 结果判定

序列长度约为 280 bp,序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中 (FJ972584.1) 比对相似度大于 99% 时,即可筛查初步判定为咖啡浆果炭疽病菌,咖啡浆果炭疽病菌的 GAPDH 基因参考序列参见附录 C。进一步鉴定按 SN/T 3679 进行。

9 菌种保存

9.1 样品保存

分离到的咖啡浆果炭疽病菌菌种,转入麦芽提取物琼脂 (MEA) 试管斜面培养基上,置于 4℃ 黑暗条件下保存至少 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。

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)
DNA 制备

A.1 核酸制备

称取 0.1 g 培养物,放在无菌的多层滤纸上,吸去水分,置于无菌的研钵中,用液氮冷冻,用研磨棒将它们研成粉末;立即转移到 2 mL 的离心管中,加入 65 ℃ 预热的 DNA 裂解液(SDS)提取液 700 μ L,置于水浴锅中 65 ℃ 水浴 30 min,期间不断混匀;加入 5 μ L 10 mg/mL RNA 酶,充分混匀,在 37 ℃ 放置 30 min;加入等体积的 Tris 饱和酚,充分摇匀,在 12 000 r/min 下离心 15 min;取上清液,加入 1 : 1 氯仿-异戊醇(24 : 1),在 12 000 r/min 下离心 15 min;再取上清液,加入 1 : 1 氯仿-异戊醇(24 : 1),在 12 000 r/min 下离心 15 min;加入等体积预冷的异丙醇,轻轻摇晃,置于 -20 ℃ 冰箱静置 30 min,在 12 000 r/min 下离心 15 min;弃上清,加入 70% 乙醇 500 μ L,12 000 r/min 下离心 3 min,去上清,重复 2 次;得到 DNA 沉淀,用冷冻干燥仪进行干燥,加入 30 μ L~50 μ L TE 或无菌去离子水,充分溶解后,测量 DNA 的纯度和浓度后置于 -20 ℃ 冰箱中保存。

注:该核酸制备也可采用 DNA 提取试剂盒法或 CTAB 法等。

A.2 DNA 浓度及纯度测定

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核酸的纯度和浓度,计算公式如下:

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} (\mu\text{g/mL})$$

PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 比值为 1.7~1.9。

附 录 B
(规范性附录)
扩增程序

B.1 引物序列

GDF:5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3'

GDR:5'-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3'

B.2 扩增体系及条件

扩增反应的组成成分为:10×PCR 缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTPS 0.25 μL,10 μmol/L 前后向引物各 2.5 μL,5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL,模板 DNA 5 μL,补充去离子水至 50 μL。将反应体系混匀后置于 PCR 仪中进行反应。

反应用双蒸水作空白对照,阳性对照采用含有咖啡浆果炭疽菌的 DNA 作为模板,阴性对照以不含咖啡浆果炭疽菌的 DNA 作为模板,每个样品重复 2 次。

扩增反应程序为:95 ℃ 预热 5 min,进入循环反应:95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,共循环 35 次,循环后 72 ℃ 延伸 7 min。

B.3 琼脂糖凝胶电泳

每个样品取 3 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6×上样缓冲液混合均匀,并加到含有溴化乙锭(0.5 μg/mL)的 1.2%琼脂糖凝胶的点样孔中,在 120 V 下进行电泳。电泳结束后在凝胶成像系统中观察、拍照,并保存照片。

附 录 C
(资料性附录)
GAPDH 片段参考序列

序列号(FJ972584.1)
GCCGTCAACGCCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTATCACCCCACCTACCCCTCCA
AACTCGTCATGACTCTCATCCACCACCAACACCACCGCTGTCATCCACACCTCGCCGCCTGCA
TCTGGTAGACAAGAAGGTTATCTTGACTTGATGTGAATTGAAATCATGGGCCGGGACGGCG
GGACACATGCTATCACTCACAGCAGACCCATCTGTACATTTACTGACTCGCTCTTCACAGG
CCTACATGCTCAAGAG



参 考 文 献

- [1] G.Tao, K.D.Hyde and L.Cail, 2012, Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. *Journal of Applied Microbiology*, v.114, p.828-835.
- [2] Gunjan Sharma & Navinder Kumar & Bevan S.Weir & Kevin D.Hyde & Belle Damodara Shenoy, 2009, The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*; *Fungal Diversity*, DOI 10.1007/s13225-013-0247-4.
- [3] Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J. Z., Yang, Y.L. et al. 2009, A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* 39, 183-204.
- [4] Crouch, J., Clarke, B. and Hillman, B. (2009) What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematic and species diagnosis? A case study using the falcatespored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101, 648-656.
-