



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3756—2013

---

## 玉米细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法 PCR 方法

Detection and identification of *Pantoea stewartii* (Smith) Mergaert et al.—  
PCR method

2013-11-06 发布

2014-06-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考了 EPPO PM 7/60(1) Diagnostic protocol for *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*—PCR test。

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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、大连市产品质量监督检验院。

本标准主要起草人：王金玲、王有福、贾东、张莹、李俊环、李成镛、贾金生、李炎、刘文博、侯天亮。

# 玉米细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法

## PCR 方法

### 1 范围

本标准规定了进境玉米检疫中玉米细菌性枯萎病菌的常规 PCR 鉴定方法。

本标准适用于进境种用及其他用途玉米中玉米细菌性枯萎病菌的检疫和鉴定。

### 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1375 玉米细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法

### 3 玉米细菌性枯萎病菌分类地位

学名:*Pantoea stewartii* (Smith) Mergaert et al.

异名:*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*; *Xanthomonas stewartii*; *Aplanobacter stewartii*; *Bacillus stewartii*; *Bacterium stewartii*; *Phytomonas stewartii*; *Pseudobacterium stewartii*; *Pseudomonas stewartii*; *Erwinia stewartii*

分类地位:原核生物界(Prokaryotae),薄壁菌门(Gracilicutes),肠杆菌科(Enterobacteriaceae),泛菌属(*Pantoea*)。

### 4 方法原理

PCR 方法的原理:提取细菌基因组 DNA 后,利用特异性引物,通过 PCR 扩增得到特异性目的基因片段,所得产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,依据检测结果判定是否是目的细菌。

### 5 仪器设备

5.1 小型粉碎机。

5.2 恒温培养箱:30℃±1℃。

5.3 高压灭菌锅。

5.4 PCR 扩增仪。

5.5 PCR 超净工作台。

5.6 电泳仪。

5.7 核酸/蛋白分析仪。

5.8 凝胶成像系统。

5.9 台式冷冻离心机(最高转速 15 000 r/min)。

- 5.10 电子天平(感量 0.01 g)。
- 5.11 微量加样器(2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。
- 5.12 无菌涂布棒。
- 5.13 无菌培养皿:直径 90 mm。

## 6 试剂

- 6.1 实验用水(应符合 GB/T 6682 中一级水的规格)。
- 6.2 改良 W 氏培养基:见附录 A 中 A.1。
- 6.3 *Taq* DNA 聚合酶。
- 6.4 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 6.5 10 $\times$ PCR 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH8.4),500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>。
- 6.6 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) (pH 值 7.2):见 A.2。
- 6.7 TE 缓冲液(pH 值 8.0):见 A.3。
- 6.8 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 6.9 50 $\times$ TAE 缓冲液(pH 值 8.5):见 A.4。
- 6.10 琼脂糖。
- 6.11 溴化乙锭。
- 6.12 DNA 分子量标记:100 bp DNA ladder。

## 7 PCR 凝胶电泳检测

### 7.1 样品处理

从待检样品中挑选不成熟、皱缩、有穗轴及色泽较深的籽粒作为检验样品。每份检验样品应不少于 0.25 kg。待检样品在 0.25 kg 以上、1 kg 以下的,检验样品可适当减少,但不得低于 0.125 kg。

样品用 0.1% 升汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液表面消毒处理 1 min~2 min,或 3%~5% 的次氯酸钠(NaOCl)表面消毒处理 5 min~15 min,然后用无菌水冲洗 3 次,无菌条件下晾干。对于药剂拌种的样品,可用 95% 乙醇洗去表面药剂后,再用无菌水冲洗 3 次,无菌条件下晾干。

消毒后的种子样品用粉碎机粉碎,称取 20 g,加入 40 mL PBS 缓冲液(pH7.2)混匀,4  $^{\circ}$ C 过夜。

### 7.2 病菌分离

在无菌条件下取悬浊液 1 mL,用无菌生理盐水以十倍系列稀释法稀释到 1:10 000。取每个浓度的稀释液 100  $\mu$ L 于改良 W 氏培养基上,用灭菌 L 形玻璃棒均匀涂布于整个琼脂表面,共接种 5~10 个改良 W 氏培养基平板。将平板置于 30  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养 48 h~72 h,观察菌落的出现情况。从中选取淡黄色或黄色的、稍隆起、油质状、边缘整齐、生长迅速、半透明且有较大黏性的菌落。将剩下的浸泡液收集起来放入灭菌的容器中,将其保存在 4  $^{\circ}$ C 或放在冰上,当出现疑似结果时,以便进一步分离鉴定。对于有病症的样品,应该在浸泡后立即进行病菌分离试验。

### 7.3 模板 DNA 提取

收集具有 7.2 中典型特征的菌落,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书提取模板 DNA,所提取的模板 DNA 溶于 50  $\mu$ L TE 中。剩余菌保存在 4  $^{\circ}$ C 条件下,以备确证试验使用。

DNA 提取和纯化过程应设置核酸提取空白对照。



#### 7.4 DNA 质量检测

将提取的 DNA 用 1.0% 含溴化乙锭(或等效染料)的琼脂糖凝胶进行检测。然后用核酸/蛋白分析仪分别在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值,用于 PCR 反应的 DNA 纯度一般为  $1.6 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$ 。

#### 7.5 PCR 扩增

##### 7.5.1 引物序列

引物序列及扩增片段长度见表 1。

表 1 引物序列及扩增片段长度

PCR 扩增	引物来源	引物序列(5'-3')	扩增片段大小
常规 PCR	16S-23S	5'-GCG AAC TTGGCA GAG AT-3' 5'-GCG CTT GCGTGT TAT GAG-3'	920 bp

##### 7.5.2 反应体系

反应体系见表 2。

表 2 PCR 反应体系

试剂名称	PCR 反应体系
10×PCR 缓冲液(含 $Mg^{2+}$ )	2.5 $\mu$ L
dNTP(2.5 mmol/L)	2 $\mu$ L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
正向引物和反向引物(25 pmol/ $\mu$ L)	各 1.0 $\mu$ L
DNA 模板(50 ng~200 ng)	3.0 $\mu$ L
双蒸水	补至 25 $\mu$ L
注 1:反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。 注 2:每个反应体系应设置两个平行反应。	

##### 7.5.3 反应条件

94 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 15 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,进行 25 个循环;72 °C 延伸 5 min。使用不同 PCR 仪,可对参数作适当调整。

##### 7.5.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:非玉米细菌性枯萎病菌 DNA 为模板。

阳性对照:已知玉米细菌性枯萎病菌的 DNA 或含有待测基因序列的质粒为模板。

空白对照:设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以  $H_2O$  代替样品);二是 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

SN/T 3756—2013

### 7.5.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液  $1\times$ TAE 制备 1.5% 琼脂糖凝胶 (55℃~60℃ 时加入溴化乙锭或等效染料至终浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 也可在电泳后进行染色)。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物, 和 1  $\mu\text{L}$  上样缓冲液混合, 进行点样, 用 DNA 分子量标记物做参照。1.5 V/cm 恒压电泳, 电泳 30 min, 电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

## 8 结果判定和报告

### 8.1 对照结果

阳性对照: 出现 920 bp 的扩增条带。

阴性对照: 未出现特征条带。

空白对照: 未出现特征条带。

### 8.2 检测结果

8.2.1 对照实验结果正常, 待测样品未出现 920 bp 扩增条带, 则可判定该样品结果为阴性, 报告未检出玉米细菌性枯萎病菌。

8.2.2 对照实验结果正常, 待测样品出现 920 bp 扩增条带, 则可初步判定该样品结果为阳性, 可依据 SN/T 1375 对该病菌进行进一步确认, 最终结果以后者的检疫结果为准, 报告检出 (或未检出) 玉米细菌性枯萎病菌。

8.2.3 对照实验结果异常, 本次待测样品的结果无效, 应重新做实验, 并排除污染因素。

## 9 样品的保存

保存样品应不少于 1 kg, 船运散装玉米样品的保存应按舱别、层次、品种、等级分别存放; 种用玉米样品的保存按批号或品种分别存放。保存样品经登记和经手人签字后置于低温干燥、防虫防鼠处妥善保存 2 个月。检出玉米细菌性枯萎病菌的样品至少要保存 6 个月, 以备复验、谈判和仲裁。保存期满后, 需经灭菌处理。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

A.1 改良 W 氏培养基

A.1.1 成分

蔗糖( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	10 g
蛋白胨	5 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	0.5 g
硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.25 g
琼脂	18 g
抗坏血酸	1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 7.2~7.4,120 °C 高压灭菌 20 min。

A.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.2)

A.2.1 成分

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ )	1.44 g
磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )	0.24 g
蒸馏水	800.0 mL

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 7.2,用蒸馏水定容到 1 L,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min,保存于室温或 4 °C 冰箱中。

A.3 TE 缓冲液(pH8.0)

A.3.1 成分

1 mol/L Tris-盐酸(pH8.0)	10 mL
500 mmol/L EDTA(pH8.0)	2 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

SN/T 3756—2013

#### A.4 50×TAE 缓冲液(pH8.5)

##### A.4.1 成分

2 mol/L Tris	242 g
100 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.2 g
蒸馏水	800.0 mL

##### A.4.2 制法

充分搅拌溶解,加入 57.1 mL 的醋酸,充分搅拌,用水定容到 1 L 后,室温保存。

---