



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3296—2012

植物病原细菌分子生物学检测规范

Criterion on detection of plant pathogenic bacteria by molecular biology

2012-10-23 发布

2013-05-01 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、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：邵秀玲、王有福、尼秀媚、厉艳、甘琴华、李鑫、刘卉秋、王晓明。

植物病原细菌分子生物学检测规范

1 范围

本标准规定了植物病原细菌分子生物学检测规范。

本标准适用于植物及其产品的细菌病害、分离纯化的植物病原细菌分子检疫鉴定。

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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 2601 植物病原细菌常规检测规范

3 原理

根据不同植物病原细菌基因组中的特异序列,利用分子生物学方法对病原菌进行鉴定。

根据病原细菌侵染植物的发病程度及检测目标病原细菌的生物学特性及与近缘种区分难易程度不同,选择不同的分子生物学方法进行鉴定。

4 试剂与耗材

4.1 试剂

植物基因组提取试剂盒、细菌 DNA 提取试剂盒、ddH₂O、*Taq* 酶、dNTP、常用荧光抗体、尿素、去离子甲酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、琼脂糖、生理盐水等;常用细菌分离培养的培养基配方参见附录 A。除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

4.2 耗材

培养皿、试管、三角瓶、研钵、离心管(1.5 mL、1.0 mL)、PCR 管(0.2 μL)、量筒、烧杯、剪刀、消毒缸等。

5 仪器设备

5.1 常规设备

植物培养箱、恒温培养箱、恒温振荡培养箱、高压灭菌器、超净工作台、生物显微镜(具照相系统)、高速冷冻离心机(12 000 r/min)、小型离心机、纯水仪、恒温水浴锅、低温冰箱、电动搅拌器等。

5.2 PCR 方法主要设备

PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、电泳仪、变性梯度凝胶电泳仪、电泳槽、毛细管电泳仪、凝胶成像分析

仪、电子天平(感量 0.000 1 g)、恒温水浴锅等。

6 实验室检测

6.1 总则

实验室总体要求与质控应符合 SN/T 1193;分子生物学方法的选择可参照以下原则:

- a) 对于有针对病原细菌鉴定的特异性引物,并能很好地将病原细菌与其他近似种区分开来的检测目标,可采用普通 PCR 法、巢氏 PCR 法,或环介导等温基因扩增法等;
- b) 对于较难区分鉴定的病原菌可采用基因组重复序列 PCR、实时荧光定量 PCR、分子标记法等;
- c) 有标准明确规定的分子生物学检测方法推荐参照标准方法。

6.2 样品制备

对于病灶明显的植物样本,可分离纯化疑似发病植物组织中的细菌,细菌分离与培养可按照 SN/T 2601 进行。对于病症不明显的植物样本,利用基因组提取试剂盒提取植物组织总 DNA 作为 PCR 的模版,提取方法可见基因组提取试剂盒说明。样品制备时,每个样品都应取至少 2 个平行样,进行重复性实验。

6.3 质量控制

6.3.1 总 DNA 样品质量控制

6.3.1.1 琼脂糖凝胶电泳检测基因组的完整性

将提取的基因组 DNA 取 2 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测,基因组完整性较好的 DNA 样品电泳后将显现出一条明显而清晰的条带。如果在指示前沿溴酚蓝前有弥散的荧光区出现,则表明样品中存在 RNA 杂质,若所提总 DNA 样品在 0.5% 琼脂糖凝胶上不能形成清晰的条带,而是弥散一片,则表明总 DNA 样品已严重降解。

6.3.1.2 分光光度(紫外吸收)法检测 DNA 的浓度和纯度

将待测 DNA 样品按适当倍数进行稀释,在紫外分光光度计上分别读出 260 nm 和 280 nm 的光密度值及其比值,根据 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的值比较所提取的总 DNA 的纯度。DNA 浓度计算公式:DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)= $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{核酸稀释倍数}$ 。在紫外分光光度计下检查,纯的总 DNA 样品溶液的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值约为 1.8。若 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值在 1.8~2.0 时,表明 DNA 的纯度较好。若 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值大于 2.0 时,表明有 RNA 污染;若 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值小于 1.8 时表明有蛋白质或酚污染。通过计算调整 DNA 的浓度,调整后用于 PCR 扩增的 DNA 模板浓度范围一般为 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~50 $\text{ng}/\mu\text{L}$;若提取的总 DNA 样品浓度较低,可以在后续过程中通过加大模板量,增加反应次数,或者采用二次 PCR 等方法来完成分子生物学检测。

6.3.1.3 核酸检测质控

使用内参照对核酸的扩增进行质控,用于检查提取 DNA 的质量,以避免实验过程中出现的假阴性。扩增检测的内参通常为细菌某个基因 DNA 片段。实验中一般采用能扩增所有供试材料的通用引物预防假阴性现象。当样品中存在扩增抑制物,或核酸提取中发生 DNA 降解,或 Taq 酶失活,内参照会表现为阴性结果。实验中应设有外加阴性对照、空白对照和阳性对照,阴性对照和空白对照用于检验实验过程中是否存在污染,阳性对照则用于检验试剂和实验操作上可能出现的问题。这些质控样本在检测过程中应使用与待测样品相同的反应混合液。

6.3.2 污染的分析及处理

细菌分子生物学检测中涉及的污染来源包括:样品间交叉污染、试剂污染、PCR 扩增产物污染、实验器具污染等等,对污染的预防和处理原则可按照 GB/T 27403 进行。

6.4 检测方法

6.4.1 普通 PCR 法

用细菌的保守序列如 16S rDNA、ITS、gyrB 基因的通用引物进行 PCR 检测,或者根据检测目标菌选取其特异性较强的序列设计特异性引物进行 PCR 检测。根据细菌 16S rDNA、ITS 和 gyrB 序列设计的通用引物及反应条件参见 B.1。普通 PCR 法的检测结果的分析有多种方法,普通检测是利用琼脂糖凝胶电泳,对于难以区分的 PCR 产物,可以采用毛细管电泳技术(参见 B.1)。对于检测到的扩增片断需进一步测序及比对才能进行阳性确认。

6.4.2 巢式 PCR 技术(nested PCR)

巢式 PCR 技术基本步骤如下:

- 根据病原细菌某段序列(根据试验要求,可选取不同区域)设计两套引物,分别称为外侧引物和内侧引物;
- 以提取的病原细菌或疑似发病的植物总 DNA 为模版,首先利用外侧引物进行 PCR;
- 将首次 PCR 的产物稀释 20~50 倍,作为第二次 PCR 的模版,利用内侧引物进行二次 PCR;
- 电泳检测。

6.4.3 实时荧光 PCR 法(Real-time fluorescent PCR)

实时荧光 PCR 法分为 SYBR Green I 检测与探针检测,其中探针检测最常用的是 Taq Man 探针检测,Taq Man 探针检测的基本步骤如下(具体反应体系参见 B.2):

- 根据病原细菌的保守序列设计上下游引物;
- 在引物对扩增片段区间找出病菌稳定性点突变区,应用引物和探针设计软件设计特异性探针;
- 探针采用化学合成标记方法。5'端标记荧光染料为 Carboxyfluorescein(FAM),3'端标记淬灭荧光染料为 Tetramethyl-carbo-xyrhodamine(TAMRA);
- 利用荧光定量 PCR 仪进行检测。

6.4.4 变性温度梯度凝胶电泳-PCR(PCR-TGGE/DEEG)

变性温度梯度凝胶电泳-PCR 基本步骤如下(具体操作步骤与条件参见 B.3):

- PCR 扩增;
- 变性梯度凝胶电泳;
- 凝胶染色与结果观察。

6.4.5 基因组重复序列 PCR 技术(rep-PCR)

基因组重复序列 PCR 技术基本步骤如下:

- 选取分别针对基因重复序列[常用的重复序列包括:REP(基因外重复回文系列)、ERIC(肠杆菌基因间重复一致序列)]和 BOX 对应的引物;
- 以基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增;

SN/T 3296—2012

- c) 扩增产物经琼脂糖凝胶检测；
- d) 利用软件分析进行聚类分析。

注：针对不同属种的细菌 REP 引物已有大量报道，可根据需要进行定向查找。

6.4.6 限制性长度多态性 PCR(PCR-RFLP)

限制性长度多态性 PCR 基本步骤如下：

- a) 利用细菌的通用引物进行 PCR(一般是 16S rDNA 引物)；
- b) PCR 产物进行纯化(DNA 纯化试剂盒)；
- c) 利用不同的限制性内切酶进行 PCR 产物酶切；
- d) 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物；
- e) 紫外成像仪拍照。

6.4.7 序列相关扩增多态性(SRAP)标记

序列相关扩增多态性标记技术流程的基本步骤如下(具体注意事项参见 B.4)：

- a) SRAP 标记的引物设计；
- b) SRAP-PCR 扩增 SRAP-PCR 扩增；
- c) 扩增产物检测与片段测序。

6.4.8 随机引物扩增多态性 PCR(RAPD-PCR)

随机引物扩增多态性 PCR 基本步骤如下：

- a) 选取病原菌的随机序列的寡核苷酸作引物，以病原细菌或疑似发病植物组织的基因组 DNA 为模板进行 PCR，随机序列通常为 10 个核苷酸；
- b) 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离；
- c) 凝胶染色与结果观察。

6.4.9 扩增片段长度多态性 PCR(PCR-AFLP)

扩增片段长度多态性 PCR 基本步骤如下：

- a) 选取特定的酶切割基因组 DNA；
- b) 利用细菌的通用引物进行 PCR 反应；
- c) PCR 产物进行纯化(DNA 纯化试剂盒)；
- d) 利用不同的内切酶进行 PCR 产物酶切；
- e) 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物；
- f) 紫外成像仪拍照。

6.4.10 环介导等温基因扩增技术(LAMP)

环介导等温基因扩增技术基本步骤如下(具体反应体系与反应条件参见 B.5)：

- a) 选取病原菌的特异序列；
- b) 登陆网站，根据网站上引物设计指导手册，利用 LAMP 引物自动设计软件进行引物设计；
- c) 根据网站上引物设计规定的引物设计原则进行引物的筛选；
- d) 在 60℃~65℃ 条件下，进行 LAMP 反应。

7 结果判定

7.1 普通 PCR

阴性对照和空白对照均未出现特征条带,阳性对照出现预期大小的特征条带,待测样品出现预期大小的特征条带,为疑似目标菌,需进一步确证(测序、比对);待测样品未出现预期大小的扩增条带,为阴性结果。毛细管电泳-PCR 判定结果以 PCR 产物与阳性对照出峰时间相同为阳性;如果样品 PCR 产物与阳性对照的出峰时间交叉重叠,则需对样品 PCR 产物进行测序,并在 NCBI 网站上比对确认。否则为阴性。

7.2 巢式 PCR

若样品 PCR 扩增产物电泳出现预计大小的条带,同时阳性对照扩增产物电泳后也出现目的片段,阴性对照和空白对照扩增产物电泳后没有出现目的片段,判定结果为可疑阳性,需进一步通过测序确证。PCR 扩增产物电泳无目的扩增条带,且阳性对照扩增产物电泳后出现目的片段,阴性对照和空白对照扩增产物电泳后没有出现目的片段,判定结果阴性。

7.3 实时荧光 PCR 法

Ct 值 ≥ 40 ,可判定样品结果为阴性,可直接报告未检出相对应致病菌;Ct 值 ≤ 35 ,可判定该样品结果为阳性; $40 > \text{Ct 值} > 35$,建议样本重做。重做结果 Ct 值 ≥ 40 者为阴性,否则为阳性。

7.4 变性温度梯度凝胶电泳-PCR

样品与阳性对照在梯度凝胶上的 DNA 迁移速率相同,空白对照及阴性对照无 DNA 条带为阳性;样品与阳性对照在梯度凝胶上的 DNA 迁移速率相似,但同步性有差异,则需进一步回收片段测序确定;以上两种情况之外的结果直接判为阴性。

7.5 基因组重复序列 PCR

样品与阳性对照具有同样的多态性条带,空白对照及阴性对照无条带,为疑似阳性,利用软件对样品进行聚类分析,与目标菌相似水平达到 98% 以上的相似性既为阳性,否则为阴性。

7.6 限制性长度多态性 PCR(PCR-RFLP)

样品与阳性对照 PCR 产物酶切结果具有同样的多态性,空白对照及阴性对照无条带为阳性,否则为阴性。

7.7 序列相关扩增多态性(SRAP)

样品 PCR 产物测序,测序结果在 Genbank 上进行基因序列比对,确定检测对象种类。

7.8 随机引物扩增多态性 PCR(RAPD-PCR)

样品与阳性对照 PCR 产物具有同样的多态性,空白对照及阴性对照无条带为阳性,否则为阴性。

7.9 扩增片段长度多态性 PCR(PCR-AFLP)

样品与阳性对照 PCR 结果具有同样的多态性,空白对照及阴性对照无条带为阳性,否则为阴性。

7.10 环介导等温基因扩增技术

判定结果以空白对照及阴性对照无条带,反应产物琼脂糖凝胶电泳为梯状条带为阳性,如果出现条带但条带单一,则需优化电泳条件进一步确认,直至出现梯状条带,否则为阴性。

8 检测结果的综合判定与复核

对于用一种分子生物学方法检测结果为阳性的样品应用第二种方法进行验证,两种方法都为阳性可判定检测结果为阳性。对首次检出的病原细菌必要时需经专家进行复核。

9 样品处理与菌株保存

验余样品 121 ℃ 高压灭菌 15 min, 然后弃掉。将从检测样品中分离到的阳性病原细菌菌株转接到试管斜面上,适宜的温度培养。然后置于 4 ℃ 冰箱中保存,定期(30 d~60 d)转接,防止病菌死亡;或在菌悬液中加入 15%~30% 的甘油于 -80 ℃ 下保存;必要时将菌株用真空冷冻干燥机制成冻干粉, -80 ℃ 下长期保存。

附 录 A
(资料性附录)
常用培养基配方

A.1 523 培养基

蔗糖	10.0 g
酵母膏	4.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g
蛋白胨	8.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
琼脂	16.0 g
调整 pH 值至 7.0~7.1, 121 °C 湿热灭菌 15 min~20 min。	

A.2 NA 营养琼脂

牛肉浸膏	1.0 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	17.0 g
酵母膏	2.0 g
NaCl	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
调整 pH 值至 7.4, 121 °C 湿热灭菌 15 min~20 min。	

A.3 LB 培养基

胰蛋白胨	10.0 g
酵母粉	5.0 g
NaCl	10.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
调整 pH 值至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 15 min~20 min。	

附 录 B

(资料性附录)

部分分子生物学方法反应的体系、条件和操作步骤

B.1 普通 PCR

B.1.1 细菌 16S rDNA 序列引物

上游引物 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAC-3';

下游引物 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3';

反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环,72℃ 10 min,4℃ 保存。

B.1.2 细菌 ITS 序列引物

上游引物 5'-AGTGGTAACAAGGTAGCCGT-3';

下游引物 5'-GTGCCAAGGCATCCACC-3';

反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环,72℃ 10 min,4℃ 保存。

B.1.3 细菌促旋酶 *gyrB* 基因的通用引物

上游引物 5'-ATGACNCARYTNCAYGCNGGN-3';

下游引物 5'-SAYGATCTTGTKRTASCGMAAYTT-3';

反应条件:94℃ 5 min,94℃ 1 min,56.1℃ 1.5 min,72℃ 2 min,35 个循环,72℃ 7 min,4℃ 保存。

B.1.4 毛细管电泳技术

毛细管电泳技术检测 PCR 产物基本步骤如下:

a) PCR 扩增靶 DNA;

b) 将特异的 PCR 扩增产物与含有高纯甲酰胺混合(混合比例一般为 1:10)加入毛细管电泳仪中,同时设立阳性对照,进行电泳。

注:具体电泳操作及注意事项可根据毛细管电泳仪的使用说明进行。

B.2 荧光定量 PCR 反应体系

PCR 体系为 25 μ L,其中 2X PCR MasterMix 12.5 μ L,引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,探针(10 μ mol/L) 1 μ L,模板 1 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。

B.3 温度梯度 PCR 引物及检测方法

B.3.1 引物序列

基于细菌 16S rDNA 基因 V3 可变区所设计的特异性引物 F357GC 和 R518,它们的序列分别为: F357:(5'-CC TAC GGG AGG CAG CAG-3');R518(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3');GC 发卡结构(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3')。

B.3.2 扩增条件

PCR 反应同普通 PCR 操作方法。对于 F357GC 和 R518 引物对应的 PCR 扩增条件:95 °C 预变性 4 min,前 20 个循环为 95 °C 40 s、58 °C 40 s 和 72 °C 1.5 min,后 10 个循环为 94 °C 40 s、55 °C 40 s 和 72 °C 1.5 min。最后在 72 °C 下延伸 10 min。其中上游引物加 40 bp[GC]发夹结构序列。

B.3.3 变性梯度凝胶电泳

变性梯度凝胶电泳分为:

- a) 垂直变性梯度凝胶电泳:变性梯度递增的方向与电泳方向垂直。所使用的胶为 6%聚丙烯酰胺凝胶,变性浓度为 0%~100%。其中,含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的胶为 100% 变性,不含尿素和去离子甲酰胺的胶为 0% 变性。垂直变性梯度凝胶电泳主要是检测引物的最适解链条件(即变性浓度);PCR 产物加上样缓冲液后上样,每孔 300 μ L~400 μ L,电压 150 V,温度 60 °C,时间 2 h~4 h;
- b) 平行变性梯度凝胶电泳:变性梯度递增的方向与电泳方向平行。根据垂直变性梯度凝胶电泳检测的解链区域的变性浓度,制备相应变性浓度的平行变性梯度凝胶,检测各标本是否存在突变;

PCR 产物加上样缓冲液后,每孔 25 μ L~30 μ L,电压 150 V,温度 60 °C,时间 3 h~6 h。

B.3.4 结果观察

染色 5 min,凝胶成像仪分析结果。

B.4 SRAP 标记操作步骤

B.4.1 SRAP 标记的引物设计

SRAP 标记分析中共有两套引物,长为 17 bp 的正向引物和长为 18 bp 的反向引物,也有用 19 bp 反向引物的。这些是由 Li 等在发展 SRAP 流程时对引物大小进行实验发现的。引物设计时有一个原则,就是引物之间不能形成发夹结构或其他的二级结构,GC 的含量在 40%~50%之间,正向和反向引物的填充序列在组成上应不同,长度为 10 bp~11 bp。试验表明,用单引物扩增只能扩增几条大约 0.5 bp~1 bp 的片段;使用较短引物,10 bp RAPD 引物,及含有 SRAP 引物核心序列的 14 bp~15 bp 大小的引物,这些引物组合可得到多种扩增片段,但是扩增产物不稳定,特异性不强;20 bp~22 bp 引物放射自显影的结果背景太强;合适的引物大小在 17 bp~18 bp。

B.4.2 SRAP-PCR 扩增

采用复性变温法,扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,然后,先按 94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min 的顺序,进行 5 个循环;然后将退火温度升至 50 °C,其他温度仍然不变,再进行 30~35 个循环;最后,72 °C 再延伸 5 min。即前 5 个循环复性温度 35 °C,后 35 个循环复性温度采用 50 °C。扩增开始时采用低的退火温度有利于两引物与 DNA 靶位点的结合,随后循环中采用较高复性温度可保证产物以指数方式扩增。

B.4.3 扩增产物检测与片段测序

扩增产物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离后,从胶上割下获得 SRAP 标记差异片段,回收后,用相应引物直接测序,必要时可采用克隆测序。由于 SRAP 产生高强带,很少有重叠,而且引物较长,故比传统方法更易测序。

B.5 LAMP 反应体系与条件

反应体系: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8); 10 mmol/L KCl; 8 mmol/L MgSO₄; 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄; 0.8 mmol/L Betain; 1.4 mmol/L dNTP; 1.6 μmol/L FIP; 1.6 μmol/L BIP; 0.2 μmol/L F3; 0.2 μmol/L F3; 0.1% Triton X-100; 8 UBst polymase;

反应条件: 95 °C 5 min, 冰浴迅速降温, 加入 8 U Bst DNA polymerase, 60 °C ~ 65 °C 1 h, 80 °C 10 min。
