



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3581—2013

美澳型核果褐腐病菌实时荧光 PCR 检测方法

Detection and identification of *Monilinia fructicola* (Winter) Honey
with real-time fluorescence PCR

2013-03-01 发布

2013-09-16 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布结构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：程颖慧、王颖、章桂明、汪莹。

美澳型核果褐腐病菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了美澳型核果褐腐病菌[*Monilinia fructicola* (Winter) Honey]的应用 TaqMan MGB 探针进行实时荧光 PCR 的检测方法。

本标准适用于美澳型核果褐腐病菌的寄主包括核果类水果,以及木瓜属、山楂属、枇杷属等传带美澳型核果褐腐病菌的寄主上的该病菌的分子检测。

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 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1871 美澳型核果褐腐病菌检疫鉴定方法

3 原理

3.1 病菌分类地位及形态特征

按照 SN/T 1871。

3.2 鉴定原理

根据美澳型核果褐腐病菌与其近似种包括核果褐腐病菌和欧洲仁果褐腐病菌的内间隔转录区基因的不同,设计特异性的引物和探针,应用相关仪器,包括实时荧光 PCR 仪等对美澳型核果褐腐病菌进行实时荧光 PCR 鉴定。

4 主要仪器用具和试剂

4.1 主要仪器及用具

烘箱、高压灭菌锅、天平(感量 1/100,1/10 000)、研钵、摇床、水浴锅、制冰机、纯水仪、旋涡振荡器、台式离心机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、真空抽干仪、冰箱、超净工作台、实时荧光 PCR 仪、微量移液器(0.5 μ L, 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、离心管(0.2 mL, 1.5 mL, 2.0 mL)、Tip 头(0.1 μ L ~ 10 μ L, 5 μ L ~ 200 μ L, 100 μ L ~ 1 000 μ L)、试管。

4.2 试剂

CTAB 提取液、Tris 饱和酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、RNA 酶、液氮、实时荧光 PCR 反应缓冲液。

注：除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5 检疫鉴定

5.1 病原菌的分离培养

病原菌的分离培养按照 SN/T 1871 进行。

5.2 样品核酸的提取

收集分离培养得到的菌丝或者直接取疑似罹病果实发病部位组织，于研钵中液氮冷冻后研磨，采用 CTAB 法提取病原菌总 DNA。具体方法如下：

- 将液氮研磨处理的菌丝或组织转至 2 mL 离心管，加入 65 °C 预热的 CTAB 提取液 700 μ L，置于水浴锅中 65 °C 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 °C 放置 30 min；
- 加入等体积的 Tris 饱和酚，充分摇匀，在 16 000 g 下离心 15 min；
- 取上清液，加入 1 : 1 三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)，在 16 000 g 下离心 15 min；
- 再取上清液，加入 1 : 1 三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)，在 12 000 g 下离心 15 min；
- 加入等体积预冷的异丙醇，轻轻摇晃，置于 -20 °C 冰箱静置 30 min，在 16 000 g 下离心 15 min；
- 弃上清液，加入 70% 乙醇 500 μ L，16 000 g 下离心 3 min，去上清液，重复 2 次；
- 得到 DNA 沉淀，用冷冻干燥仪进行干燥，加入 50 μ L ~ 100 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 °C 冰箱中保存。

注：也可使用试剂盒进行 DNA 提取，具体方法按照试剂盒说明书操作。

5.3 实时荧光 PCR 检测

5.3.1 引物及探针序列

- 引物及探针序列为：
 - 正向引物 SZMfc-F: 5'-CCTTCGGGCCTTGTATGCT-3'；
 - 反向引物 SZMfc-R: 5'-CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT-3'；
 - 探针 SZMfc-Pb: 5'-FAM-CCAGAGGATAATTAAAC-MGB-3'。
- 引物及探针序列为：
 - 正向引物 Mon139F: 5'-CACCTTGTGTATYATTACTTTGTTGCTT-3'；
 - 反向引物 Mon139R: 5'-CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAA-3'；
 - 探针 P_fc: 5'-FAM-TATGCTCGCCAGAGGATAATT-MGBNFQ-3'。

5.3.2 扩增条件

5.3.2.1 5.3.1 中 SZMfc 的引物和探针的扩增体系

反应体系总体积为 10 μ L，各成分分别为：实时荧光反应缓冲液 5 μ L，引物和探针终浓度分别为 0.1 μ mol/L，去离子水 3 μ L，DNA 1 μ L(10 ng~100 ng)。将反应体系混匀后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应。

5.3.2.2 5.3.1 中 Mon139 的引物和 P_fc 探针的扩增体系。

反应体系总体积为 25 μ L，各成分分别为：实时荧光反应缓冲液 12.5 μ L，引物和探针终浓度分别为 0.2 μ mol/L，DNA 5 μ L(10 ng~100 ng)，补足去离子水。将反应体系混匀后置于实时荧光 PCR 仪中

进行反应。

以灭菌去离子水作空白对照,以美澳型核果褐腐病菌的 DNA 模板为阳性对照,以非美澳型核果褐腐病菌的其他 DNA 模板为阴性对照,每个样品重复 2 次。

5.3.2.3 反应条件

设置扩增反应条件为:50℃预热 2 min;95℃变性 10 min;然后进入 40 个循环,95℃ 15 s,60℃ 1 min。

实验室质量控制按照 GB/T 6682 和 SN/T 1193 进行。

6 结果判定与表述

MGB 探针实时荧光 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

- 检测 Ct 值小于或等于 36,判定美澳型核果褐腐病菌检测结果呈阳性;
- 检测 Ct 值大于或等于 40,判定美澳型核果褐腐病菌检测结果呈阴性;
- 检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR,再次扩增后,如 Ct 值小于或等于 36 或者 Ct 值大于或等于 40,判定同上;如果检测 Ct 值仍在 36~40 之间,则需要参照 SN/T 1871 进行形态学鉴定。

7 样品、菌种与原始数据保存

7.1 样品、菌种保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现美澳型核果褐腐病菌,分离到的菌种进行斜面保存,样品应保存 1 年,以备复验,如涉及贸易纠纷则应保存到纠纷解决完毕。保存期满后,需经灭菌处理。

7.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

参 考 文 献

- [1] 程颖慧,章桂明,王颖,等. 应用 *TaqMan* MGB 探针检测美澳型核果褐腐病菌. 广东农业科学,2009,232(7):196-198.
- [2] van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ & Jeger MJ. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *Monilia fructigena*. *Mycological Research* 2002,106, 444 - 451.
-