



中华人民共和国国家标准

GB/T 28068—2011

GB/T 28068—2011

柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法

Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using the real-time
fluorescent PCR

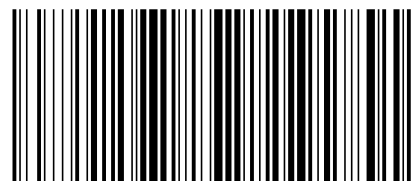
中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法
GB/T 28068—2011

*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字
2012年5月第一版 2012年5月第一次印刷

*
书号: 155066·1-44580 定价 21.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 28068-2011

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

附录 E
(资料性附录)

柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测试剂盒组成及使用说明

E.1 检测试剂盒组成

每个试剂盒最多可检测 48 个样品,包括以下成分:

——样品制备液	30 mL×4 瓶
——固相试剂恢复液	50 μ L×4 支
——阳性对照(无害化 Xacc 特异序列重组质粒 DNA)	20 ng×5 支
——阴性对照(健康柑桔植株 DNA)	20 ng×5 支
——同相化试剂检测管	8 联管×6 条

E.2 说明

E.2.1 样品制备液的主要成分为磷酸缓冲液。

E.2.2 恢复液用于溶解荧光 PCR 固相化混合试剂。

E.2.3 用于荧光染料法检测的固相试剂管中包含除待测样品 DNA 外的所有 PCR 扩增反应试剂及荧光染料,用于荧光探针检测的固相化试剂反应管中包含除待测模板 DNA 外的所有 PCR 反应试剂及荧光探针。

E.3 功能

所列试剂盒可用于柑桔溃疡病叶片、枝条和果实等组织材料样品中柑桔溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测和病害鉴定。具体操作按使用说明进行。

E.4 使用注意事项

E.4.1 发生褐变的柑桔组织材料不宜作为 PCR 检测样品。

E.4.2 在制样及检测过程中,应严格防范不同样品间的交叉污染,所有用具应彻底清洗并消毒;移液器头尖应一次性使用,并且转移每个样品时都应更换,以免交叉污染。

E.4.3 上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器,反应管内避免产生气泡。

E.4.4 全部检测过程可在室温(23 $^{\circ}$ C)下进行,PCR 固相化试剂盒可以在室温条件下置于干燥器内密封保存,使用时取出所需数量,剩余部分立即放回干燥器中。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:重庆大学、农业部农业技术推广服务中心、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:王中康、殷幼平、王福祥、高文娜、夏玉先、李正国、曹月青。

附录 D
(规范性附录)

柑桔溃疡病菌 PCR 检测操作程序

D.1 扩增试剂配制(在反应试剂配制区进行)

D.1.1 用无菌超纯水配制 25 $\mu\text{mol/L}$ 柑桔溃疡病菌特异性引物对母液(用于荧光染料法,引物序列为 CQUXcc F02: 5'-ACGAGAAAGAACTTCGCC-3', CQUXcc R02: 5'-TCTGACCACATCGCAT-AGGA-3', 扩增柑桔溃疡病菌特异性基因序列为 278 bp)。

D.1.2 用无菌超纯水配制 25 $\mu\text{mol/L}$ 柑桔溃疡病菌特异性引物对 CQUXcc F 06/CQUXcc R 06 母液(用于荧光探针法,引物序列为 CQUXcc F06: 5'-GCGGCT ATTGGCTGACTTCA-3' 和 CQUXcc R 06: 5'-GTAGGGCG GACCTT GGGAT-3', 扩增柑桔溃疡病菌特异性基因序列为 119 bp)。

D.1.3 以无菌超纯水配制 25 $\mu\text{mol/L}$ 荧光标记探针 CQU XccP1 母液(序列为 5'-TCCTCCATAAC-GAACTCGCAAGGCACG-3')。

D.2 加样(反应体系为 25 μL)

D.2.1 方法 1 试剂盒方法(推荐方法)

从固相化试剂盒中取出 0.2 mL PCR 固相化试剂检测管,管中分别加入 23 μL 样品恢复液,再在不同管中分别加入 2 μL 待测样品 DNA 液、阳性对照、阴性对照、空白对照(灭菌超纯水),盖紧管盖,转移至 PCR 反应区。

D.2.2 方法 2 自配试剂方法

D.2.2.1 荧光染料法

D.2.2.1.1 加入引物对 CQUXcc F02/CQUXcc R02 母液到荧光 PCR Master Mix(含 dNTPs、 Mg^{2+} 、热启动 DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、SYBR Green I 荧光染料)中,加灭菌超纯水使反应液中引物终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$,1 \times PCR Master Mix,混匀。

D.2.2.1.2 取 0.2 mL PCR 反应管,编号后每管中加入 23 μL 上步所配反应液。

D.2.2.1.3 分别加入待测样品液 2 μL /每管;以新鲜制备的阴性对照、阳性对照和空白对照 2 μL /每管代替待测模板作为对照。盖紧管盖,3 000 g 瞬时离心,以混匀并去除气泡。

D.2.2.1.4 转移至 PCR 反应区。

D.2.2.2 荧光探针法

D.2.2.2.1 在避光条件下加入荧光标记探针 CQU XccP1 母液和引物对 CQUXcc F 06/CQUXccR06 母液到 PCR Master Mix(含 dNTPs、 Mg^{2+} 、热启动 DNA 聚合酶、PCR 缓冲液)中,使引物终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$,探针浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$,1 \times PCR Master Mix,混匀。

D.2.2.2.2 分别加入待测样品液 2 μL /每管;以新鲜制备的阴性对照、阳性对照和空白对照 2 μL /每管代替待测样品作为对照,盖紧管盖,3 000 g 瞬时离心,以混匀并去除气泡。

D.2.2.2.3 转移至 PCR 检测区。

柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Xcc)的实时荧光 PCR 检测的样品制备、检测技术、操作方法及结果判定标准。

本标准适用于柑桔植物材料中柑桔溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测和病害鉴定。

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 5040 柑桔苗木产地检疫规程

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

柑桔溃疡病 citrus canker disease

由柑桔溃疡病菌引起的国内外柑桔检疫性细菌病害。症状特征表现为柑桔叶片、枝条和果实表面出现隆起的木栓化溃疡病斑,造成柑桔落叶落果、树势衰弱,严重影响柑桔产量与果品外观质量。

3.2

柑桔溃疡病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

指引起亚洲型柑桔溃疡病的病原细菌,为黄单胞菌属的柑桔黄单胞柑桔亚种新组合(Schaad 2006; Young 2008)。

3.3

实时荧光 PCR real-time fluorescent PCR

实时荧光聚合酶链式反应,一种在体外扩增微量的特殊 DNA 片段的方法,在扩增过程中由于荧光物质的释放并被实时检测而能够快速、灵敏地检出模板 DNA 的存在。

3.4

扩增引物 primer

人工合成的寡核苷酸序列,其序列与待扩增的目标 DNA 序列中的一段相同,用于引导 DNA 体外扩增。

3.5

扩增模板 templet

DNA 体外扩增中所用的待扩增的靶标序列。

3.6

Ct 值 cycle threshold value

实时荧光 PCR 反应中每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。