

D.6 结果判定

在阳性对照扩增出预期的 1 375 bp 大小的条带,阴性对照和空白对照没有扩增到预期大小条带的条件下:

- 如果检测样品扩增到与阳性对照大小相一致的条带,则 PCR 检测结果为阳性;
- 如果检测样品没有扩增到与阳性对照大小相一致的条带,则 PCR 检测结果为阴性。



中华人民共和国国家标准

GB/T 28075—2011

萨氏假单胞杆菌菜豆生致病型 检疫鉴定方法

Detection and identification of *Pseudomonas savastanoi* pv.
phaseolicola (Burkholder) Gardan et al.



GB/T 28075—2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44631

定价: 18.00 元

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 D
(规范性附录)
PCR 方法

D.1 PCR 模板的制备**D.1.1 菌悬液 PCR 模板的制备**

取 3 μL 的 10^8 CFU/mL ($\text{OD}_{600}=0.1$) 的菌体悬浮液,转入装有 100 μL 无菌双蒸水的 1.5 μL 离心管中,在 99 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,10 000g 离心 10 min,冷却后,取上清液作为 PCR 反应模板。

D.1.2 DNA 的提取

取 1 mL 在 NB 培养基中振荡培养过夜的菌液,10 000 g 离心 2 min,提取沉淀的 DNA;或者取 0.1 g 的发病植物组织,研磨后,提取植物总 DNA。具体提取步骤根据所采用的 DNA 提取试剂盒。

D.2 引物

用于检测 PspH 的特异性引物及其序列见表 D.1,可由有关生物公司合成和纯化。

表 D.1 用于 PCR 检测的引物及其序列

引物名称	引物序列	扩增片断大小
HB14F	5'-CAACTCCGACACCAGCGACCGAGC-3'	1 375 bp
HB14R	5'-CCGGTCTGCTCGACATCGTGCCAC-3'	

D.3 PCR 反应体系

50 μL 反应体系中加入:10 \times PCR 缓冲液(含 MgCl_2)5.0 μL ,10 mmol/L 的 dNTP 混合物 1.0 μL ,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.5 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下引物各 2.0 μL ,DNA 模板 3 μL ,去离子水补足至 50 μL 。

D.4 反应条件

在 PCR 仪上完成以下程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 35 个循环;最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 10 min。

D.5 电泳分析

取 5 μL 扩增产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,在 1 \times TBE 缓冲液配制的 1.5%琼脂糖凝胶中,50 V 电泳 45 min,用荧光染料或溴化乙锭(EB)染色后在成像系统中观察,拍照并保存。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
萨氏假单胞杆菌菜豆生致病型
检疫鉴定方法

GB/T 28075—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 \times 1230 1/16 印张 1 字数 22 千字

2012 年 4 月第一版 2012 年 4 月第一次印刷

*

书号:155066·1-44631 定价 18.00 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

附 录 C
(规范性附录)
DAS-ELISA 方法

C.1 检测样品制备

以种子浸出液可作为检测样品(制备方法见 6.1)。

将可疑菌落的纯培养物可配制成 10^4 CFU/mL 的菌体悬浮液作为检测样品。

C.2 包被

根据 DAS-ELISA 检测试剂盒说明,用碳酸钠缓冲液稀释抗体溶液(如 1:200),在微孔板中每孔加入 100 μ L 包被抗体溶液。在室温下孵育 2 h~4 h 或 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。

C.3 捕获抗原

倒去孔中的抗体包被溶液,用 PBST 洗 3 次(可在洗板机上完成)。加入样品提取物,每孔 100 μ L,每个样品 2 个孔(重复 1 次)。并设置阳性/阴性和空白对照。在室温下孵育 2 h 或 4 $^{\circ}$ C 下过夜。

C.4 加入酶标抗体

根据说明用酶标抗体缓冲液稀释相应的酶标抗体(如 1:200)。倒去孔中的样品提取液,用 PBST 洗 3 次(可在洗板机上完成)。每孔加入 100 μ L 酶标抗体溶液。在室温下孵育 2 h。

C.5 加底物

用二乙醇胺缓冲液(pH9.8)配制 1 mg/mL 的对硝基苯磷酸酯的底物溶液。倒去酶标抗体溶液,用 PBST 洗 3 次(可在洗板机上完成)。每孔加入 100 μ L 新鲜配制的底物溶液。室温下避光放置,直至阳性对照孔明显显色(约 30 min~60 min)。

在准备底物溶液的过程中,不要接触药剂或暴露在强光中,避免在阴性对照孔中出现背景颜色。

C.6 结果判定

C.6.1 对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值 <0.15 ;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 >2 ;同一样品的 OD_{405} 值应基本一致。

C.6.2 在满足了 C.6.1 质量要求后,结果原则上可判断如下:

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 >2 ,判为阳性;

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近,判为可疑样品,需重做一次或用其他方法验证;

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 <2 ,判为阴性。

C.6.3 若满足不了 C.6.1 质量要求,则不能进行结果判断。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准使用重新起草法参考国际种子检验协会(International Seed Testing Association, ISTA)的 Seed Health Testing Methods 第 7-023 号标准《豌豆中萨氏假单胞杆菌菜豆生致病型的检测》编制,与 7-023:2008 标准的一致性程度为非等效。

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:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:林石明、陈青、黄蓬英、易建平、廖富荣、吴媛、陈红运、王宏毅。