

基因,分别设计了 BGF1-R1、BGF3-R3 两对引物,操作时可任选其中一对。

C.3.2 PCR 反应体系

C.3.2.1 检测水稻细菌性谷枯病菌采用的 PCR 引物序列见表 C.1。

表 C.1 检测水稻细菌性谷枯病菌的 PCR 引物

引物名称	引物序列	PCR 产物大小 bp
BGF1	正向引物:5'-ACACGGAACACCTGGGTA-3'	395
BGR1	反向引物:5'-TCGCTCTCCC GAAGAGAT-3'	
BGF3	正向引物:5'-GCAGCGGCAAGGAAGACG-3'	317
BGR3	反向引物:5'-GTCGTCGCCCGACGTCTC-3'	

C.3.2.2 检测水稻细菌性谷枯病菌采用的 PCR 反应体系见表 C.2。

表 C.2 检测水稻细菌性谷枯病菌的 PCR 反应体系

组 成	加样体积 μL
10×PCR 缓冲液(M^{2+} ffre)	2
氯化镁(25 mmol/ μL)	1.6
dNTP(10 mmol/ μL)	0.4
Taq DNA 聚合酶(1 U/ μL)	0.7
正向引物(10 pmol/ μL)	1.5
反向引物(10 pmol/ μL)	1.5
模板 DNA(1 ng/ μL ~10 ng/ μL)	5
双蒸水	7.3
总体积	20

C.3.3 PCR 反应循环参数

96 °C 预变性 5 min;96 °C,30 s;55 °C,30 s;72 °C,30 s,进行 30 个循环;72 °C 延伸 5 min;4 °C 保存。

C.3.4 PCR 扩增产物的检测

用 TAE 电泳缓冲液制备 2% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 产物,将混有上样缓冲液的 PCR 扩增产物加至样品孔中,用 DNA Maker 做相对分子质量的标记,进行电泳分析,电泳结束后,在凝胶成像分析仪下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍摄并记录实验结果。



中华人民共和国国家标准

GB/T 29396—2012

水稻细菌性谷枯病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Burkholderia glumae* (Kurita & Tabei) Urakami et al.



GB/T 29396—2012

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-46463

定价: 21.00 元

2012-12-31 发布

2013-06-01 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 C

(规范性附录)

水稻细菌性谷枯病菌的 PCR 检测方法

C.1 试剂及配方

C.1.1 DNA 抽提液配方

1 00 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0	100 mmol/L EDTA
250 mmol/L NaCl	100 μg/mL 蛋白酶 K

C.1.2 CTAB 沉淀液配方

1% CTAB(质量浓度)(十八烷基三乙基溴化铵)
50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0
10 mmol/L EDTA, pH 8.0

C.1.3 TE 缓冲液配方

10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0
1 mmol/L EDTA, pH 8.0

C.1.4 TAE 电泳缓冲液(pH 8.5)配方(50×)

Tris	242 g	冰乙酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.5 g	蒸馏水	1 000 mL

C.1.5 10×电泳上样缓冲液(pH 8.5)配方

20%(质量浓度)Ficoll 400	0.1 mol/L Na ₂ EDTA(pH 8.0)
1.9%(质量浓度)SDS	0.25%(质量浓度)溴酚蓝

C.2 细菌 DNA 的提取

将制备好的菌悬液移至一干净灭菌的离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。在沉淀中加入 TE 缓冲液 5 mL,10% SDS 溶液 300 μL。20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μL,混匀,37℃水浴孵育 1 h。加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),混匀。10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一个新离心管中。加入等体积酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一新离心管。加入 0.6 倍体积的异丙醇,轻轻混匀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,管中加入 70%乙醇洗涤沉淀,晾干,加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20℃长期保存。

注:此步骤可省略。可直接用培养的菌株稀释成 $\geq 10^5$ CFU/mL 的菌悬液做模板进行定性 PCR 检测。

C.3 定性 PCR 检测

C.3.1 引物信息

根据水稻细菌性谷枯病菌的 16S-23SrDNA 间隔区序列(ITS)以及编码 DNA 促旋酶 β 亚基的 gyrB

中华人民共和国
国家标准
水稻细菌性谷枯病菌检疫鉴定方法
GB/T 29396—2012

*

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 33 千字
2013 年 4 月第一版 2013 年 4 月第一次印刷

*

书号:155066·1-46463 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

蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g
溴百里酚蓝(0.2%)	4.0 mL
糖类	10.0 g
琼脂	4.0~6.0 g
水	1 000 mL

B. 15.2 配制方法

加水溶解,调至 pH 7.0±0.2 后,再加入溴百里酚蓝和糖,分装成小试管,于 121 °C 灭菌 15 min。

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:中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:朱金国、莫瑾、朱水芳、赵文军、李芳荣、李一农、彭梓、钟文英。