

附录 C
(规范性附录)
培养基制作方法

C.1 CTA 培养基

3.0 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4), 1.0 g 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4), 0.3 g 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1.0 g 氯化铵(NH_4Cl), 9.0 g D(+)-海藻糖, 1.0 g D(+)-葡萄糖, 1.0 g 酵母粉, 14.0 g 琼脂, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 7.2。103.43 kPa (121 °C) 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却至 50 °C 下加入 0.025 g 头孢菌素, 0.001 2 g 林可霉素, 0.002 5 g 磷霉素, 0.25 g 放线菌酮。

C.2 LPG 培养基

5.0 g 葡萄糖, 5.0 g 酵母膏, 5.0 g 蛋白胨, 15.0 g 琼脂, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 7.1。103.43 kPa (121 °C) 高压灭菌 15 min。

GB/T 28096—2011



中华人民共和国国家标准

GB/T 28096—2011

木薯细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*
(Bondar) Vauterin et al.



GB/T 28096-2011

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 1-44652

定价: 16.00 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

表 B.1) 20 μmol/L 各 1.0 μL, 0.15 mmol/L 的 dNTP 混合物 2.0 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 μL 1.5 mmol/L MgCl₂ 溶液, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.2 μL, 超纯水 14.8 μL。

表 B.1 PCR 检测的引物序列及扩增产物

引物	引物序列	扩增产物
1	5'-TTC GGC AAC GGC AGT GAC CAC C-3'	898 bp
2	5'-TCA ATC GGA GAT TAC CTG AGC G-3'	

反应条件: 95 °C 预变性 5 min(提纯核酸则为 2 min), 然后进行 30 个循环(95 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s), 最后一个循环结束后 72 °C 继续延伸 5 min。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6×上样缓冲液混匀, 并加到置于 1×TAE 缓冲液的 1.5% 琼脂糖凝胶孔中, 然后在 120 V 下电泳。电泳结束后, 放入装有 0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液的容器中染色, 然后在清水中清洗后, 在凝胶成像系统中观察, 拍照, 并保存照片。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
木薯细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法

GB/T 28096—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 0.75 字数 17 千字
2012 年 4 月第一版 2012 年 4 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44652 定价 16.00 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 B
(资料性附录)

木薯细菌性萎蔫病菌 PCR 检测方法

B.1 试剂制备(或使用商品化的试剂盒)

B.1.1 总核酸抽提缓冲液

100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)pH 8.0、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、2% 十二烷基硫酸钠(SDS)、100 μg/mL 蛋白酶 K、1% 聚乙烯吡咯烷酮。

B.1.2 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0
0.1 mmol/L EDTA。

B.1.3 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL

B.1.4 6×上样缓冲液

0.25% 溴酚蓝、40% 蔗糖。

B.1.5 其他试剂

3 mol/L 氯化钠、三氯甲烷:异戊醇(24:1)、异丙醇、相对分子质量标准、溴化乙锭。

B.1.6 PCR 反应试剂

10×PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖。

B.2 总核酸提取

将种子 1 g(约 15 粒)或叶片 1 g 或种茎 1 g 放入灭菌研钵中,加入液氮用研杵研成粉状,取粉末移入 1.5 mL 离心管中,加入 1 000 μL 抽提取缓冲液,在 65 ℃ 水浴孵育 30 min;室温 14 000 g 离心 15 min;取上清液加入等体积的三氯甲烷和异戊醇(24:1)混合溶液,混匀,放置 15 min,14 000 g 离心 15 min;取上清液加入等体积的三氯甲烷和异戊醇(24:1)溶液混匀,放置 15 min,14 000 g 离心 15 min;取上清液加入 0.6 倍的异丙醇混匀,14 000 g 离心 30 min;弃上清液,用 70% 乙醇洗涤两次,无水乙醇洗涤两次,并倒置离心管 1 min;加入 100 μL TE 缓冲液悬浮总核酸,置于 -20 ℃ 下保存备用。

B.3 PCR 检测

在 PCR 薄壁管中分别加入以下试剂(25 μL 体系):1 μL 的悬浮液或样品总核酸,每对引物(见

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:中华人民共和国海南出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李伟东、封立平、刘福秀、韩玉春、周先超、粟寒、吴翠萍、王英超。