



中华人民共和国国家标准

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

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 发布
中国国家标准化管理委员会

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。

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。

3.7

柑桔溃疡病菌重组质粒

利用特异性引物扩增柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)基因组模板,获得的柑桔溃疡病菌特异性 DNA 扩增序列构建重组质粒,将该重组质粒转导到大肠杆菌 JM 109 菌株中繁殖培养后,重新提取出获得的质粒 DNA。用于作为柑桔溃疡病菌检测的阳性对照。

4 柑桔溃疡病菌基本信息

拉丁学名:柑桔黄单胞菌柑桔亚种 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Gabriel et. al (1989)。

病害名称:柑桔溃疡病 citrus cancer disease。

分类地位:假单胞菌科 Pseudomonaceae、黄单胞菌属 *Xanthomonas*,柑桔黄单胞 *Xanthomonas citri* [Gabriel et. al (1989)]。

主要分布于亚洲的中国,印度和东南亚,美洲的美国、巴西、乌拉圭、巴拉圭和阿根廷等国家和地区。葡萄柚、甜橙、柠檬、莱檬、柑桔和枳等柑桔种和品种。带菌种苗、接穗及商品果实是远距离传播的主要途径;田间则主要由夹风雨和农事操作传播。

柑桔溃疡病菌其他信息参见附录 A。

利用柑桔溃疡病菌亚种通用引物对 XccF05/XccR05,以常规 PCR 方法可以检测出柑桔材料中柑桔黄单胞柑桔亚种(A 菌系)和褐色黄单胞莱檬亚种(BC/D 菌系)(检测引物、检测方法及结果判定参见附录 B)。

5 方法原理

本标准采用的实时荧光 PCR 检测包括了荧光染料法和荧光探针法两种检测方法。其原理是,利用病菌特有 DNA 序列设计引物,在 PCR 扩增时加入荧光染料,荧光染料与扩增形成的产物-DNA 双链结合而发出荧光被检测器实时检测(荧光染料法),或在合成特异性引物的同时合成一条特异性的荧光双标记探针,探针 5'端和 3'端分别标记荧光素报告基团和淬灭基团,如果反应体系中存在待测目标 DNA 模板,引物和探针则与模板上的序列配对而特异性结合,当 PCR 扩增延伸到探针结合部位时, *Taq* DNA 聚合酶将探针水解成单核苷酸,使标记在探针上的报告基团游离出来并发出荧光信号被检测器实时检测(荧光探针法)。由于初始模板量的不同,反应管内的荧光物质达到设定的可检测阈值时所经历的 C_t 值不同,因此 C_t 值可以用于判定检测样品的初始菌量。

6 实验室设置

柑桔溃疡病菌 PCR 检测实验室主要参照 GB/T 19495.2 设置与管理。检测实验室应至少分为三个相对独立的工作区域:样本制备区、反应试剂配制区和检测区;每个工作区域应有明确标记,避免不同工作区域内的设备、物品混用。

7 材料与试剂

7.1 仪器与器材

7.1.1 实时荧光 PCR 仪。

7.1.2 高速台式离心机。

7.1.3 生物安全柜或超净工作台。

- 7.1.4 冰箱(冷藏室 4℃和冷冻室-20℃)。
- 7.1.5 涡旋混匀仪。
- 7.1.6 紫外灭菌灯。
- 7.1.7 微量可调移液器(0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1 000 μL)。
- 7.1.8 带滤芯 Tip 头。
- 7.1.9 PCR 反应管(0.2 mL 八联管)。
- 7.1.10 微滤柱。
- 7.1.11 高压灭菌锅。

7.2 试剂

- 7.2.1 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 7.2.2 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)。
- 7.2.3 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 7.2.4 乙二胺四乙酸(EDTA)。
- 7.2.5 实时荧光 PCR 混合试剂(Real-time PCR Master Mix)。

8 采样及样品处理

8.1 采样及样品处理工具

- 8.1.1 样品袋:牛皮纸袋或信封(一次性使用)。
- 8.1.2 枝剪。
- 8.1.3 剪刀,镊子。
- 8.1.4 塑料离心管(1.5 mL, 50 mL)。

8.1.2~8.1.4 的取(制)样工具应经 121℃±2℃, 15 min 高压蒸汽灭菌。田间取样每个样品采集后或实验室处理每个不同样品后,工具应用 70%酒精棉球擦拭 2 次以上,以避免样品间相互污染。

8.2 取样方法

8.2.1 田间采集

田间实地取样参照 GB 5040。

取带有柑桔疑似溃疡病病斑的柑桔叶片、嫩梢和果实样品(柑桔溃疡病症状特征参见附录 A)。

8.2.2 口岸检疫及调运检疫抽样

种苗抽取显现疑似症状植株或随机抽取植株(无症材料)10 株,每株取叶片 5 片,共 50 片;接穗等材料则随机直接抽取 10 份材料;商品果采集带有疑似病斑的果实。

样品采集后立即装入样品袋。按规定编号密封后,做好相关记载,包括样品品种、目测症状、采样人、采集地、采集时间等。及时寄送检测实验室。

8.3 样品存放

采集的植物材料若需短暂保存,应置于 4℃条件下,可保存 1 周。检测后余下的植物材料应置于 4℃条件下保存 7 d,以备复测的需要。

8.4 样品 DNA 制备操作

样品 DNA 制备在检测实验室样品制备区进行。所制备的 DNA 样本在 4℃条件下保存应不超过

7 d,在-20℃冻存不超过30 d,避免反复冻融。

样品制备的具体操作过程见附录C。

9 PCR 检测操作

9.1 所用引物对与探针

荧光染料法 PCR 检测所用特异性引物对 CQUXcc F 02/CQUXcc R 02,序列为 CQUXcc F 02: 5'-ACGAGAAAGAACTTCGCCCC-3',CQUXcc R 02:5'-TCTG ACCACATCGCAT AGGA-3'。

荧光探针法 PCR 检测所用特异性引物对 CQUXcc F 06/CQUXcc R 06,序列为 CQUXcc F 06: 5'-GCGGCTATTGGCTGACTTCA-3'和 CQUXcc R 06:5'-GTAGGGCG GACCTT GGGAT-3'。

荧光标记探针 CQU XccP1,序列为 5'-TCCTCCATAACGAACTCGCAAGGCACG-3'。

9.2 扩增准备

PCR 扩增反应体系为 25 μ L。准备 PCR 扩增反应管,分别加入反应液 23 μ L,最后加入制备的待测样品 2 μ L。每个样品设置 3 次重复。每次 PCR 检测应设立相应的阳性对照、阴性对照和空白对照。

9.3 扩增过程

扩增过程中,设置每次循环的延伸阶段采集荧光。

荧光染料法检测应在扩增结束后立即进行熔解曲线分析,以验证扩增的特异性。熔解曲线的反应程序为:97℃,1 min;57℃,1 min;从 57℃开始每升高 0.5℃保持 10 s,连续升高 80 次(到 97℃为止)。

检测结束后,根据采集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

实时荧光 PCR 扩增的准备及扩增具体操作过程见附录 D(不同 PCR 仪具体程序参数可能稍有调整)。

推荐使用柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测试剂盒。试剂盒组成、功能及使用注意事项参见附录 E。

10 结果判定及描述

10.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况自动调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

10.2 质控标准

10.2.1 阴性对照及空白对照无 Ct 值并且无扩增曲线。否则,此次检验视为无效。

10.2.2 阳性对照的 Ct 值应 ≤ 28.0 ,并出现典型的上升扩增曲线。否则,此次检验视为无效。

10.3 阴性

测试样品检测无 Ct 值和扩增曲线,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,判定该样品为阴性,表示样品中无柑桔溃疡病菌。

10.4 阳性

测试样品检测 Ct 值 ≤ 35 ,出现典型的扩增曲线,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,判定

该样品为阳性,表示样品中存在柑桔溃疡病菌。

10.5 其他情况

Ct 值大于 36 的样品,建议重做实时荧光 PCR 扩增,扩增结果按上述标准判定。扩增结果 Ct 值若仍大于 36,结果判定为阴性。

附 录 A

(资料性附录)

柑桔溃疡病症状及病原菌的名称及鉴别特征比较

A.1 分类命名

A.1.1 概要

柑桔溃疡病是由柑桔黄单胞细菌引起的柑桔重要检疫性病害;主要随带菌苗木或接穗远距离传播,随夹风雨溅射在田间扩散。

近年来,柑桔溃疡病菌的分类地位和命名变动较大,原来的柑桔溃疡病菌的 A、B/C/D 和 E 菌系,依据 16S rRNA 基因、多基因分类新方法和培养特征等综合分类方法已经归入三个不同的细菌种下的三个亚种:柑桔黄单胞柑桔亚种(A 菌系)、褐色黄单胞莱檬亚种(BC/D 菌系)和苜蓿黄单胞枳柚亚种(E 菌系)。

A.1.2 柑桔黄单胞柑桔亚种(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)

原称为 A 系的柑桔黄单胞柑桔亚种(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*),是依据 N. W. Schaad (2006) 和 J. M. Young (2008) 的黄单胞属最新分类命名的调整确认,是分布最广、危害最重的一种柑桔溃疡病的检疫性细菌,可以侵染芸香科柑桔属、枳属的大部分柑桔种类。病菌在血清学、DNA-DNA 复性测定、ITS 测序、rep-PCR 和培养特征等方面都不同于其他黄单胞属的细菌。

A.1.3 褐色黄单胞莱檬亚种(*X. fuscans* subsp. *aurantifolii*)

根据 DNA-DNA 复性测定和多基因测序的相似率,把仅引起南美的墨西哥莱檬、柠檬、酸橙和柚子溃疡病的原 B/C/D 菌系归入褐色黄单胞莱檬亚种(*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*)。

A.1.4 苜蓿黄单胞枳柚亚种(*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*)

原柑桔溃疡病菌 E 菌系,引起美国佛州柑桔苗圃的柑桔斑点病。现依据病害症状、同工酶谱带等不同于柑桔亚种的特征,归入到苜蓿黄单胞枳柚亚种(*X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*)。

A.2 柑桔溃疡病症状

A.2.1 主要症状

柑桔溃疡病菌可以侵染柑桔叶片、枝条和果实等地上部分。主要症状特征为产生两面木栓化病斑,中心突起呈火山口状。

A.2.2 叶片症状

叶片初始病斑呈圆形、微突起、半透明脓泡状;病斑两面隆起、圆形或近圆形,周围大多有黄色晕圈和油圈;老病斑木栓化,表面粗糙开裂呈火山口状,晕圈不明显;病斑单生,严重时愈合成片。在潜叶蛾危害的伤口处往往成片发生[图 A.1a)]。与柑桔疮痂病等叶部类似症状的区别在于受害叶片仅一面出现隆起的近圆锥形病斑,另一面凹陷。病斑较多时,叶片扭曲畸形,病斑周围仅有黄色晕圈而无油圈。

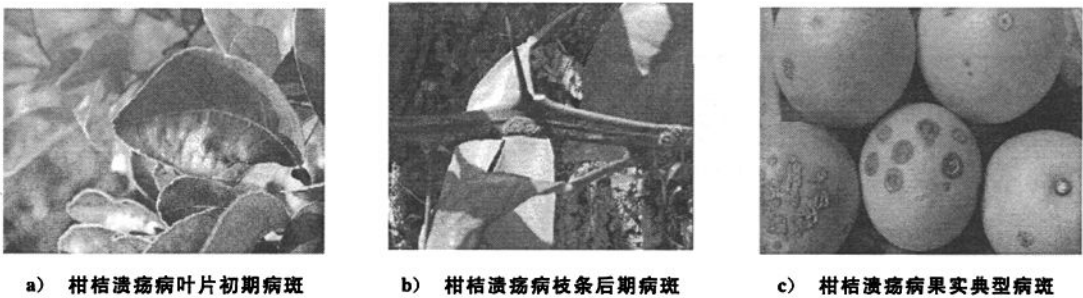


图 A.1 柑桔溃疡病寄主植株典型症状

A.2.3 枝条症状

在嫩枝上,产生坏死扁平的病斑,有时具有油浸状的边缘,没有黄色晕圈[图 A.1b)]。

A.2.4 果实症状

在幼果的病斑有黄色晕圈,果实上的火山口开裂更加明显,严重时愈合成片。疮痂病罹病果实病斑呈散生或群生的瘤状突起,可以剥落[图 A.1c)]。

A.3 鉴别特征比较

柑桔溃疡病菌及其类似病原菌的鉴别特征比较见表 A.1。

表 A.1 柑桔溃疡病菌及其类似病原菌的鉴别特征比较

病害名称	柑桔溃疡病 citrus bacterial canker		柑桔斑点病(CBS)
	A 型溃疡病	B 型/C 型/D 型溃疡病	
新订学名 (拉丁名)	柑桔黄单胞柑桔亚种 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i> Gabriel et. al (1989)	棕色黄单胞莱檬亚种 <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> Gabriel et. al. ,(1989)	苜蓿黄单胞枳柚亚种 <i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>Citromelonis</i> Gabriel et. al. ,(1989)
地理分布	亚洲、非洲、南美各国	阿根廷、巴拉圭、乌拉圭;巴 西、墨西哥	美国佛罗里达州
寄主范围	葡萄柚、甜橙、柚、柠檬、枳属	柠檬、酸橙、墨西哥莱檬	橙、桔、柚等多种柑桔 幼苗
病害症状	初期形成突起小疱斑;后期形 成本栓化粗糙,两面隆起病斑, 有时病斑边缘釉圈明显,外围呈 水渍状	初期形成小的疱斑;后期形成 木栓化粗糙,隆起病斑,后期病 斑隆起,病斑边缘呈水渍状	叶片病斑扁平或下陷,病 斑边缘水渍状明显
培养特性	在 YDC 上,28℃~30℃培养 40 h~44 h 形成单菌落;不产生 水溶性褐色素	在 YDC 上,28℃~30℃培养 56 h~60 h 形成单菌落,可产生 水溶性褐色素	在 YDC 上,28℃~30℃ 培养 30 h~34 h 形成单菌 落,可产生水溶性褐色素

表 A.1 (续)

病害名称	柑桔溃疡病 citrus bacterial canker		柑桔斑点病(CBS)
	A 型溃疡病	B 型/C 型/D 型溃疡病	
鉴别特征	利用麦芽糖,阿拉伯糖,不能利用菊糖;可碱性水解石蕊牛乳,可水解酪朊	不能利用麦芽糖,可沉淀石蕊牛乳,不能水解酪朊	能利用菊糖,使纤维二糖、甘露醇产酸
	对 CP1、CP2 噬菌体敏感	对 CP1、CP2 噬菌体不敏感	对 CP1、CP2 噬菌体不敏感
	血清学反应呈阳性	与柑桔亚种抗体血清学反应有差异	与柑桔亚种抗体血清学反应呈阴性

附 录 B

(资料性附录)

柑桔溃疡病菌柑桔亚种和褐色亚种的常规 PCR 检测

B.1 采样及样品制备

同柑桔溃疡病实时荧光 PCR。

B.2 PCR 扩增

B.2.1 扩增引物

根据柑桔溃疡病菌专有的保守蛋白基因设计通用引物对 XccF05/XccR05, 序列分别为 5'-TTC GGC GTC AAC AAC CTG-3'/5'-AAC TCC AGC ACA TAC GGG TC-3' (扩增柑桔溃疡病菌保守蛋白基因序列 413 bp)。用无菌超纯水配制 25 $\mu\text{mol/L}$ 母液。

B.2.2 扩增体系

配制常规 PCR 反应液, 25 μL 反应体系, 各种成分终浓度为:

Mg^{2+}	2 mmol/L
dNTP	200 $\mu\text{mol/L}$
<i>Taq</i> 酶	1 U/25 μL
引物各	0.5 μmol
PCR 缓冲液(pH9.1)	1×

B.2.3 加样

取 PCR 反应管, 每管中加入 PCR 反应液 23 μL , 再分别加入 2 μL 待测样品浸出液。同时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 000g 瞬时离心, 以混匀并去除气泡; 转移至 PCR, 扩增区。

B.2.4 PCR 扩增

设置好各反应管在定量 PCR 仪上的孔位并做好标记记录, 按照预设孔位将各检测样品及对照放入常规 PCR 检测仪内进行 PCR 扩增。

扩增程序为(不同 PCR 仪可能稍有差异)

95 $^{\circ}\text{C}$ 裂解变性	4 min	} 35 次循环
94 $^{\circ}\text{C}$ DNA 变性	30 s	
58 $^{\circ}\text{C}$ 退火	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸	7 min	

B.3 扩增产物检测

PCR 反应结束后, 各反应管取 10 μL 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 另一泳道加 DNA Marker

(100 bp DNA Ladder)。100 V 电压下电泳 30 min。

电泳后的凝胶经 Gold Viewer 荧光染料染色后,在凝胶成像系统上观察分析并拍照电泳结果。

B.4 结果判定

B.4.1 质控标准

阳性凝胶图像阳性对照出现 413 bp 左右特征性扩增条带,阴性对照、空白对照无此条带。

B.4.2 阳性

凝胶图像样品泳道中出现 413 bp 左右特征性扩增条带,阳性对照、阴性对照、空白对照正常,判定样品为阳性,表示样品中带有柑桔溃疡病柑桔亚种或褐色亚种。

B.4.3 阴性

凝胶图像样品泳道中没有特异扩增条带,阳性对照、阴性对照、空白对照正常,判定样品为阴性,表示样品中不带可检出的柑桔溃疡病柑桔亚种和褐色亚种。

附 录 C (规范性附录)

柑桔溃疡病菌检测试剂配制和样品制备

C.1 样品制备试剂

C.1.1 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2) PBS 缓冲液

A 液:0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g, 溶于蒸馏水中, 定容至 1 000 mL。

B 液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g, (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g, 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g) 加蒸馏水溶解, 定容至 1 000 mL。

将 0.2 mol/L A 液 14 mL 与 0.2 mol/L B 液 36 mL 混合均匀即成 0.01 mol/L 磷酸缓冲液。

C.1.2 TE 缓冲液

取 0.1 mol/L Tris-HCl (pH7.4) 20 mL, 加入 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 40 mL, 用灭菌超纯水定容至 200 mL, 4℃ 保存。

C.2 样品制备

C.2.1 工作台及操作者消毒灭菌

样品处理在超净工作台或生物安全柜中进行。工作台和操作者双手应消毒灭菌。

C.2.2 疑似症状柑桔样品制备

切取柑桔组织表面的溃疡病疑似病斑, 放入 1.5 mL 微量离心管中, 加入 PBS 液 500 μL , 室温条件下浸泡 20 min, 经 8 000 g 离心 5 min, 弃去上清液, 以试管底部残液(约 100 μL) 直接作为待测模板。

C.2.3 无症状柑桔样品制备

对需检测的无症状材料, 取植物组织 5 g~10 g, 用 10 mL~20 mL PBS 液浸泡, 150 r/min 富集振荡培养 1 h~1.5 h, 10 000 g 离心 5 min, 弃去上清液, 以试管底部残存液(约 500 μL) 经微滤柱过滤, 以 200 μL TE 缓冲液再次洗涤离心, 去滤液。最后以 100 μL TE 缓冲液将滤膜上的菌体洗脱, 洗脱液作为待测模板。

C.2.4 阳性对照配制

按照 C.2.2 方法以典型柑桔溃疡病病斑制备浸出液、或经致病性验证的柑桔溃疡病菌纯培养、或以柑桔溃疡病菌特异 DNA 序列无害化重组质粒 DNA 作为阳性对照。

C.2.5 阴性对照

按照 C.2.3 方法制备健康柑桔植株叶片浸出液作为阴性对照。

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'-ACGAGAAAGAACTTCGCCCC-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。

D.3 实时荧光 PCR 扩增(在检测区进行)

D.3.1 荧光染料法 PCR 扩增

D.3.1.1 扩增程序

在 iCycler™(Bio-Rad, USA)实时荧光 PCR 仪上进行的扩增程序为(其他型号 PCR 仪扩增程序参数可能稍有变化):

- 95 ℃裂解 & 酶活性热启动 4 min, 一个循环(×1);
- 94 ℃变性 15 s, 61 ℃退火, 72 ℃延伸 30 s, 共 40 个循环(×40), 在每个循环的延伸阶段72 ℃时采集荧光 10 s;
- 末次延伸 72 ℃, 7 min。

D.3.1.2 熔解曲线分析

PCR 扩增结束后立即进行熔解曲线分析, 以验证扩增的特异性。熔解曲线反应程序为: 97 ℃, 1 min; 57 ℃, 1 min; 从 57 ℃开始每升高 0.5 ℃保持 10 s, 升高到 97 ℃止。

验证检测结束后, 设备自动记录并生成报告。根据仪器采集荧光曲线和 Ct 值判定结果。

D.3.2 荧光探针法 PCR 扩增

在 iCycler™(Bio-Rad, USA)实时荧光 PCR 仪上进行的扩增程序为(其他型号 PCR 仪扩增程序参数可能稍有变化):

- 95 ℃变性 & 酶活性热启动 4 min, 1 个循环;
- 94 ℃变性 15 s, 61 ℃退火, 72 ℃延伸 30 s, 共计 40 个循环(×40), 在每个循环的延伸阶段(72 ℃)同步采集荧光;
- 末次延伸 72 ℃, 7 min。

检测结束后, 设备自动记录并生成报告。根据仪器采集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

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。