

GB

中国

国家

标准

汇编

523

GB 28062~28108

(2011年制定)

中国国家标准汇编

523

GB 28062~28108

(2011 年制定)

中国标准出版社 编

中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

中国国家标准汇编:2011 年制定. 523:
GB 28062~28108/中国标准出版社编. —北京:中国
标准出版社,2012
ISBN 978-7-5066-6978-8

I. ①中… II. ①中… III. ①国家标准-汇编-中国
-2011 IV. ①T-652.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 197810 号

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 39.5 字数 1 192 千字
2012 年 10 月第一版 2012 年 10 月第一次印刷

*
定价 220.00 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

出版说明

1. 《中国国家标准汇编》是一部大型综合性国家标准全集。自 1983 年起,按国家标准顺序号以精装本、平装本两种装帧形式陆续分册汇编出版。它在一定程度上反映了我国建国以来标准化事业发展的基本情况和主要成就,是各级标准化管理机构,工矿企事业单位,农林牧副渔系统,科研、设计、教学等部门必不可少的工具书。

2. 《中国国家标准汇编》收入我国每年正式发布的全部国家标准,分为“制定”卷和“修订”卷两种编辑版本。

“制定”卷收入上一年度我国发布的、新制定的国家标准,顺延前年度标准编号分成若干分册,封面和书脊上注明“20××年制定”字样及分册号,分册号一直连续。各分册中的标准是按照标准编号顺序连续排列的,如有标准顺序号缺号的,除特殊情况注明外,暂为空号。

“修订”卷收入上一年度我国发布的、被修订的国家标准,视篇幅分设若干分册,但与“制定”卷分册号无关联,仅在封面和书脊上注明“20××年修订-1,-2,-3,……”字样。“修订”卷各分册中的标准,仍按标准编号顺序排列(但不连续);如有遗漏的,均在当年最后一分册中补齐。需提请读者注意的是,个别非顺延前年度标准编号的新制定的国家标准没有收入在“制定”卷中,而是收入在“修订”卷中。

读者配套购买《中国国家标准汇编》“制定”卷和“修订”卷则可收齐由我社出版的上一年度我国制定和修订的全部国家标准。

3. 由于读者需求的变化,自 1996 年起,《中国国家标准汇编》仅出版精装本。

4. 2011 年我国制修订国家标准共 1 989 项。本分册为“2011 年制定”卷第 523 分册,收入国家标准 GB 28062~28108 的最新版本。

中国标准出版社

2012 年 8 月

目 录

GB/T 28062—2011	柑桔黄龙病菌实时荧光 PCR 检测方法	1
GB/T 28063—2011	菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法	21
GB/T 28064—2011	蚕豆染色病毒检疫鉴定方法	33
GB/T 28065—2011	地中海实蝇生物芯片检测方法	43
GB/T 28066—2011	丁香假单胞杆菌豌豆致病型检疫鉴定方法	53
GB/T 28067—2011	甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法	65
GB/T 28068—2011	柑桔溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法	73
GB/T 28069—2011	根螨检疫鉴定方法	89
GB/T 28070—2011	黑麦草腥黑粉菌检疫鉴定方法	107
GB/T 28071—2011	黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法	127
GB/T 28072—2011	梨黑斑病菌检疫鉴定方法	141
GB/T 28073—2011	南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法	151
GB/T 28074—2011	苹果蠹蛾检疫鉴定方法	163
GB/T 28075—2011	萨氏假单胞杆菌菜豆生致病型检疫鉴定方法	173
GB/T 28076—2011	三叶斑潜蝇检疫鉴定方法	187
GB/T 28077—2011	双棘长蠹检疫鉴定方法	197
GB/T 28078—2011	水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌检疫鉴定方法	207
GB/T 28079—2011	水稻稻粒黑粉病菌检疫鉴定方法	227
GB/T 28080—2011	小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定方法	235
GB/T 28081—2011	烟草环斑病毒检疫鉴定方法	255
GB/T 28082—2011	榆枯萎病菌检疫鉴定方法	271
GB/T 28083—2011	栎枯萎病菌检疫鉴定方法	283
GB/T 28084—2011	棉花黄萎病菌检疫检测与鉴定	293
GB/T 28085—2011	苍耳(属)(非中国种)检疫鉴定方法	303
GB/T 28086—2011	长针线虫属(传毒种类)检疫鉴定方法	315
GB/T 28087—2011	刺茄检疫鉴定方法	347
GB/T 28088—2011	刺萼龙葵检疫鉴定方法	357
GB/T 28089—2011	葱类黑粉病菌检疫鉴定方法	371
GB/T 28090—2011	假苍耳检疫鉴定方法	381
GB/T 28091—2011	剑线虫属(传毒种类)检疫鉴定方法	391
GB/T 28092—2011	落叶松枯梢病菌检疫鉴定方法	419
GB/T 28093—2011	马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法	427
GB/T 28094—2011	芒果细菌性黑斑病菌检疫鉴定方法	435
GB/T 28095—2011	木层孔褐根腐病菌检疫鉴定方法	443
GB/T 28096—2011	木薯细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法	459
GB/T 28097—2011	苹果黑星病菌检疫鉴定方法	469
GB/T 28098—2011	青杨脊虎天牛检疫鉴定方法	479
GB/T 28099—2011	水稻细菌性条斑病菌的检疫鉴定方法	491

GB/T 28100—2011	香石竹细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法	501
GB/T 28101—2011	城市公共休闲服务与管理 基础术语	513
GB/T 28102—2011	城市公共休闲服务与管理导则	529
GB/T 28103—2011	小麦线条花叶病毒检疫鉴定方法	555
GB/T 28104—2011	小楹白蚁检疫鉴定方法	565
GB/T 28105—2011	榆蛎蚧检疫鉴定方法	577
GB/T 28106—2011	郁金香黄色疱斑病菌检疫鉴定方法	591
GB/T 28107—2011	枣大球蚧检疫鉴定方法	599
GB/T 28108—2011	匍匐矢车菊检疫鉴定方法	613



中华人民共和国国家标准

GB/T 28062—2011

柑桔黄龙病菌实时荧光 PCR 检测方法

Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* 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
中国国家标准化管理委员会

发布

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:殷幼平、王中康、王玉玺、高文娜、夏玉先、曹月青、彭国雄、李正国。

柑桔黄龙病菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)实时荧光 PCR 检测的样品制备、检测操作方法及结果判定标准。

本标准适用于对芸香科和非芸香科植物罹病植株和传播媒介柑桔木虱中黄龙病亚洲韧皮杆菌的检测和病害鉴定。

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

柑桔黄龙病 Citrus Huanglongbing

一种由韧皮杆菌引起的植物检疫性病害。主要侵染柑桔属、金柑属和枳属等柑桔类植株。由带菌种苗远距离传播,田间主要由柑桔木虱取食传播。典型受害植株叶片斑驳不均匀黄化,枝梢黄化,果实畸形,种子败育,严重时可引起植株死亡。

3.2

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或荧光物质与扩增产物结合并被实时检测而能够快速、灵敏地检出模板 DNA 的存在。

3.3

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。

3.4

扩增模板 templet

DNA 体外扩增中所用的待扩增的靶标序列。

3.5

Ct 值 cycle threshold value

实时荧光 PCR 反应中每个反应管内荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

3.6

亚洲韧皮杆菌重组质粒 DNA recombinant plasmid DNA

利用特异性引物扩增柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌基因组模板,获得的亚洲韧皮杆菌特异性 DNA 扩

增序列,经构建重组质粒、转入大肠杆菌 JM109 菌株中繁殖培养后,重新提取获得的质粒 DNA。用于作为柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌实时荧光 PCR 检测的阳性对照。

4 柑桔黄龙病菌基本信息

学名:亚洲韧皮杆菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus*。

病害名称:柑桔黄龙病,常用英文名:Citrus Huanglongbing。

分类地位: α -朊细菌亚纲、根瘤细菌目(Rhizobiales),根瘤细菌科(Rhizobiaceae),韧皮杆菌属 *Liberibacter* 的 G⁻ 细菌。是一种难培养细菌。

引起柑桔黄龙病的韧皮杆菌根据其核糖体基因序列的差异可以分为 3 种,即分布于非洲的柑桔黄龙病非洲韧皮杆菌 *Candidatus Liberibacter africanus*, 分布于南美洲的柑桔黄龙病美洲韧皮杆菌 *Candidatus Liberibacter americanus* 和分布于亚洲及北美的柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* Jagoueix et al。

柑桔黄龙病菌其他信息参见附录 A。

本标准规定了对亚洲韧皮杆菌的检疫鉴定方法。对来自于非洲的柑桔材料的检疫检验,可参见附录 B 检测柑桔黄龙病非洲韧皮杆菌;对来自美洲的柑桔材料,除利用本标准检测柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌外,可参见附录 C 检测柑桔黄龙病美洲韧皮杆菌。

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 Ct 值不同,因此 Ct 值可以用于判定检测样品的初始菌量。

6 实验室设置

参照 GB/T 19495.2。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 主要仪器设备和试剂

7.1 仪器设备

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 次氯酸钠(NaClO_3)。
- 7.2.2 十二烷基硫酸钠(SDS)。
- 7.2.3 蛋白酶 K (Proteinase K)。
- 7.2.4 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 7.2.5 乙二胺四乙酸(EDTA)。
- 7.2.6 盐酸胍(Guanidine HCl)。
- 7.2.7 无水乙醇(ethanol)。
- 7.2.8 实时荧光 PCR 混合试剂(Real-time PCR Master Mix)。

8 取样及样品处理

8.1 取样用具

- 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,打孔器。
- 8.1.4 研钵。
- 8.1.5 塑料离心管(1.5 mL)。

8.1.2~8.1.5 的取(制)样用具应经 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min 高压蒸汽灭菌。田间采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 实地取样

产地检疫田间实地取样参照 GB 5040。

8.2.2 叶片样品

疑似病树按树冠东南西北四方采集,每点取中下部成熟叶片各 5 片,每棵树共采集叶片 20 张。

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,每株取中下部成熟叶片 5 片,共 50 片。

接穗等繁殖材料按规程规定的比例抽取样品。

黄龙病病害症状及疑似症状详见附件 D。

8.2.3 果实样品

幼果期采样,切取果柄和果蒂,每样品采集 4 份;商品鲜果每批果实随机抽取 10 个果实,切取果柄和果蒂。

8.2.4 传病媒介柑桔木虱

在柑桔新梢抽发期,每株树采集1头~10头成虫,每园采集50头以上;口岸或调运种苗、接穗等材料中发现的木虱则直接收集。用75%乙醇浸泡固定30 min。放入1.5 mL离心管封装。

样品采集后立即装入样品袋(木虱用75%乙醇杀死固定后装入微量离心管),并按照要求填写采样记录,记载样品来源、样品品种、目测症状、采样人、采样地、采样时间等,及时送指定检测实验室。

8.3 样品贮运与保存

采集的植株样品按上面要求用样品袋分装,乙醇固定的柑桔木虱控干乙醇后用塑料离心管分装,与采集记录一并寄送指定实验室检测。检测后余下的植物材料可置于4℃条件下保存7 d,以备复测的需要。不需保存的样品应立即进行无害化灭菌处理以防止病害扩散。

8.4 样品DNA制备操作(在检测实验室样品制备区进行)

样品DNA制备在检测实验室样品制备区进行。制备好的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DNA制备的具体操作过程见附录E。

9 PCR扩增

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DNA 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。

扩增过程中,设置在每次循环的延伸阶段采集荧光。

荧光染料法检测须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:95℃,1 min;55℃,1 min;然后从55℃开始每升高0.5℃保持10 s,连续升高80次(到95℃为止)。

检测结束后,根据采集的荧光曲线和Ct值判定结果。

PCR扩增的准备及扩增具体操作过程见附录F(使用不同PCR仪具体扩增程序参数可能稍有调整)。

推荐使用柑桔黄龙病菌亚洲种实时荧光PCR检测试剂盒。试剂盒组成、功能及使用注意事项参见附录G。

10 结果判定与表述

10.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。检测阈值设定应根据仪器噪声情况进行调整,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应无Ct值并且无扩增曲线。否则,此次检测视为无效。

10.2.2 阳性对照的Ct值应 ≤ 28.0 ,并出现典型的扩增曲线。否则,此次检测视为无效。

10.3 结果判定

10.3.1 阴性反应

测试样品检测 Ct 值 ≥ 40 或者无 Ct 值并且无扩增曲线,且阴性对照、阳性对照、空白对照结果正常,判定该样品为阴性,表示该样品中不带可检出的柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌。

10.3.2 阳性反应

荧光探针法检测时,样品 Ct 值 ≤ 35 ,出现典型的扩增曲线,且阴性对照、阳性对照、空白对照结果正常,判定该样品为阳性,表示该样品中存在柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌。

荧光染料法检测时,Ct 值 ≤ 35 ,出现典型的扩增曲线,且阴性对照、阳性对照、空白对照结果正常;熔解曲线为单峰,并且熔解曲线与预期目标扩增产物熔解曲线一致,或熔解曲线出现双峰,其中一个峰为引物二聚体,另一个峰的熔解曲线与预期目标产物熔解曲线一致,则判定该样品为阳性,表示该样品中存在柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌。

10.3.3 特殊情况

实时荧光 PCR 检测样品 Ct 值大于 35 的样品但小于 40,建议用同一样品模板量加倍(相应减少加入灭菌超纯水量)进行实时荧光 PCR 复测。复测的结果按上述判定标准判定是否带柑桔黄龙病菌;如果 Ct 值仍大于 35,判定为阴性。

附 录 A
(资料性附录)
柑桔黄龙病菌其他信息

A.1 寄主及分布

主要分布在亚洲地区的印度、日本、菲律宾等东南亚国家以及中国的部分地区。寄主为柑桔类植物,柑桔属、金柑属和枳属植物受害严重。也可低度浸染芸香科的九里香、黄皮,特殊情况下也可侵染长春花等非芸香科植物。

A.2 传播方式

带菌种苗、接穗及其上附着的传播媒介昆虫柑桔木虱(*Diaphorina citri* Kuwayamd)是远距离传播的主要途径,田间则主要由柑桔木虱取食传播以及嫁接传播。

附录 B

(资料性附录)

柑桔黄龙病非洲韧皮杆菌常规 PCR 检测(Hocquellet, 1999)

B.1 采样及样品制备

同柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌 PCR 检测。

B.2 PCR 扩增

B.2.1 引物名称及序列

Laf A2: 5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3'

Laf J5: 5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'

B.2.2 PCR 反应体系

PCR 反应体积为每管 25 μ L。25 μ L 的反应体系中含有终浓度为 1 $\times$ PCR 缓冲液、1 μ mol/L 引物对 Laf A2/Laf J5(序列见 B.2.1)以及适量模板进行 PCR 扩增。预期扩增片段大小为 669 bp。

B.2.3 PCR 反应程序

预变性 94 $^{\circ}$ C/5 min;然后 92 $^{\circ}$ C 变性 20 s,62 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 扩增结束后,以 2%的琼脂糖凝胶电泳,然后通过紫外成像系统成像。保存成像图片作为结果判定依据。

B.3 结果判定与描述

B.3.1 质控标准

扩增结果经电泳在阴性对照和空白对照泳道无扩增条带,阳性对照泳道有 669 bp 大小的预期片段,结果视为有效。否则检测无效,应重新进行检测。

B.3.2 阴性反应

在电泳图片中样品泳道不出现 669 bp 大小的预期扩增片段,阴性对照、阳性对照和空白对照正常,判定为阴性,表示样品中无可检出的柑桔黄龙病非洲韧皮杆菌。

B.3.3 阳性反应

在电泳图片中样品泳道有 669 bp 大小的预期扩增片段,阴性对照、阳性对照和空白对照正常,判定为阳性,表示样品中存在柑桔黄龙病非洲韧皮杆菌。

附 录 C
(资料性附录)

柑桔黄龙病美洲韧皮杆菌实时荧光 PCR 检测

C.1 采样及样品制备

同柑桔黄龙病亚洲韧皮杆菌实时荧光 PCR 检测。

C.2 PCR 扩增

C.2.1 引物和探针(依据美洲韧皮杆菌 16S rRNA 基因特异序列设计的引物对及探针)

C.2.1.1 引物名称及序列

HLBLamF:5'-GAGCGAGTACGCAAGTACTAG-3'
HLBLamR:5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3'

C.2.1.2 探针名称及序列

HLBLamP:5'FAM/AGACGGGTGAGTAACGCG/BHQ-3'

C.2.2 PCR 反应体系

PCR 反应体积为每管 25 μ L。25 μ L 的反应体系中含有终浓度为 $1\times$ PCR Master Mix、0.6 μ mol/L 引物对 HLBLam F/HLBLam R、探针 HLBLam P 0.3 μ mol/L 以及适量模板。

C.2.3 PCR 反应程序

预变性 95 $^{\circ}$ C/20 s;然后 95 $^{\circ}$ C 变性 1 s,58 $^{\circ}$ C 退火 40 s,共 40 个循环,仪器设置在每个循环的退火延伸阶段自动采集荧光。验证检测结束后,根据采集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

C.3 结果判定

C.3.1 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进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

C.3.2 质控标准

C.3.2.1 阴性对照和空白对照无 Ct 值并且无扩增曲线。检测结果有效,否则此次实验视为无效。

C.3.2.2 阳性对照的 Ct 值 <28 ,并出现典型的扩增曲线。否则,此次实验视为无效。

C.3.3 结果判定及描述

C.3.3.1 阴性反应

样品无 Ct 值并且无扩增曲线,且阳性对照、阴性对照和空白对照结果正常,判定为阴性,表示样品中无可检出的柑桔黄龙病美洲韧皮杆菌(*Candidatus Liberibacter americanus*, Lam)。

C.3.3.2 阳性反应

Ct 值 ≤ 35 ,并出现典型的扩增曲线,且阳性对照、阴性对照和空白对照结果正常,判定为阳性,表示样品中存在柑桔黄龙病美洲韧皮杆菌(*Candidatus Liberibacter americanus*, Lam)。

C.3.3.3 其他情况

若实时荧光 PCR 检测的 Ct 值大于 35,建议同一样品加大样品量(加倍)重新进行荧光 PCR。复测的结果按上述标准判定,若 Ct 值仍大于 35,判定为阴性。