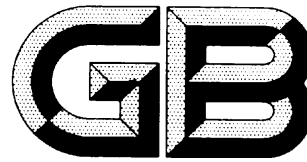


ICS

点击此处添加中国标准文献分类号



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

燕麦嗜酸菌西瓜亚种溯源检测方法

Traceability detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2020-12-20)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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/TC271）提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳海关、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：高瑞芳、章桂明、李娜、龙海、张丹丹。

燕麦嗜酸菌西瓜亚种溯源检测方法

1 范围

本标准规定了应用生物信息学分析方法对燕麦嗜酸菌西瓜亚种进行溯源检测的方法。
本标准适用于燕麦嗜酸菌西瓜亚种相关寄主中携带的燕麦嗜酸菌西瓜亚种的溯源检测。

2 病菌的基本信息

中文名：燕麦嗜酸菌西瓜亚种

学名：*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

分类地位：原核生物界（Prokaryotae），薄壁菌门（Gracilicutes），暗细菌纲（Scotobacteria），假单胞菌科（Pseudomonadaceae），噬酸菌属（*Acidovorax*）。

3 方法原理

溯源是利用对物种有进化和溯源价值的基因片段将核酸序列信息与来源地、寄主等来源信息进行相关性归类。

检测过程是应用生物信息学的分析手段筛选有效区分种内差异并且有效归类的基因片段或分子标记，获得这些基因片段或分子标记的核酸序列，应用统计学手段完成核酸序列与来源地、寄主信息的主成分分析，完成不同来源地、寄主个体的群体分子系统进化关系和群体结构分析，构建网络进化图。

溯源检测的原理是通过对物种具有溯源价值和意义的基因片段的扩增，利用已完成的核酸序列与系统进化和网络进化图对物种进行归类鉴定。

4 仪器用具

4.1 仪器用具

保湿培养箱、超净工作台、灭菌箱、-80℃低温冰箱、PCR扩增仪、冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、电泳仪、凝胶成像系统、高压灭菌锅。

4.2 试剂盒培养基

试剂：4%次氯酸钠、70%酒精、CTAB、PCR *Taq*酶、PCR *Taq*缓冲液、dNTP、DNA标记、无菌超纯水。

培养基：营养琼脂培养基（NA），金氏B培养基。

4.3 试验用具

解剖刀、离心管、镊子、移液器、冻存管、培养皿、酒精灯、接种针

5 溯源检测方法

5.1 DNA 提取与纯化

对细菌进行培养，CTAB法对基因组DNA的提取方法详见附录A，测定DNA浓度及纯度后，保存于-20℃冰箱备用。

5.2 基因片段或分子标记的扩增与测序

对适用于作为溯源分析的基因片段或分子片段进行PCR扩增（具体步骤见附录B），Sanger测序。测序结果利用BioEdit等生物信息学软件进行剪接编辑，比对峰图和正反向测序结果是否有误，去掉两端引物部分序列。

5.3 分子系统进化分析

将拼接的序列导入Mega软件，同时导入燕麦嗜酸菌西瓜亚种溯源序列排列文件mas格式或meg格式（见附录C），对全部序列进行排列。

对排列后的mas格式文件，基于Neighbor-joining Tree构建分子系统进化树。Phylogeny Test选择Bootstrap 1000 replicates，其他参数选择默认参数。

5.4 网络进化分析

将拼接的序列导入Mega7.0软件或者PAUP 4.0软件，同时导入燕麦嗜酸菌西瓜亚种溯源序列排列文件mas格式或meg格式（见附录C），将全部序列进行网络构建，选择系统默认参数。

6 结果判断

根据待分析序列在系统进化树上与已溯源燕麦嗜酸菌西瓜亚种的分支聚集结果进行判定。

----如果序列与已溯源菌株序列聚为一支，且重复率为100%，即可判定该物种序列与已知溯源信息序列具有相同的来源地、宿主信息。

----如果序列与已溯源菌株序列未与任一物种序列聚为一支，需结合网络进化图做出判定。

在构建的网络进化图中寻找待分析序列的进化分支起源点和方向，确认突变衍化历史，如同一分支起源点的其他方向分支信息具有相关性，则可判定待分析个体与同一起源点不同个体的来源地和寄主信息具有相关性。

如果同一分支起源点无其他方向分支，则无法判定待分析个体的来源地和寄主信息。

7 样品与原始数据集保存

7.1 样品保存

分离得到的菌种转移到LB液体培养基中，28℃培养至对数生长期，加入20%灭菌甘油，置于-80℃条件下保存至少12个月，以备复验、谈判和仲裁。

7.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括：样品的来源、种类、时间，实验的时间、地点、方法和结果等，并要有实验人员和审核人员签字。PCR凝胶电泳检测需有电泳结果照片，序列需要保存电子文件。

附 录 A
(资料性附录)
基因组 DNA 制备

A.1 DNA制备

- 1、将菌株接种于金氏B斜面培养基，28℃培养48 h。
- 2、在每一试管中加入0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液10 mL洗下菌体。
- 3、将细菌悬浮液转移至灭菌的离心管中，12000 r/min 离心15 min，弃去上清液。
- 4、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1 h。
- 5、加入等体积的三氯甲烷/异戊醇（24:1），混匀，10000 r/min 离心5 min，将上清液转移至新的灭菌离心管中。
- 6、加入等体积的酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）混匀，10000 r/min 离心5 min，将上清液转移至新的灭菌离心管中。
- 7、加入0.6倍体积的异丙醇，轻轻混合至DNA沉淀下来，10000 r/min 离心5 min，弃去上清液。
- 6、沉淀用1 mL的70%乙醇洗涤后，离心弃乙醇，在洁净工作台中晾干，加入 50 μL TE缓冲液溶解DNA沉淀，-20℃可长期保存。

A.2 DNA浓度及纯度测定

用核酸蛋白分析仪测定DNA的纯度与浓度，分别取得260 nm和280 nm处的吸收值，计算核酸的纯度和浓度，计算公式如下：

$$\text{DNA纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{DNA浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} \mu\text{g/mL}$$

PCR级DNA溶液的OD₂₆₀ /OD₂₈₀比值为1.7~1.9。

附录 B
(资料性附录)
溯源基因片段扩增流程

B.1.1 PCR

反应条件为：94℃预变性4min；94℃变性30s，56℃复性20s，72℃延伸30s，40个循环；72℃延伸7min

B.1.2 引物序列

基因位点	基因	引物	片段长度/bp
Aave_0305	gmc		543
Aava_0609	ugpB		452
Aave_0637	pilT		404
Aave_1193	lepA		489
Aave_1215	trpB		439
Aave_2199	gltA		489
Aave_2477	phaC		431

B.1.3 扩增体系及条件

扩增反应的组成成分为：

10×PCR缓冲液 5 μL
 2.5 mmol/L dNTPs..... 4 μL
 前向引物(10 μ M)..... 2.5 μL
 后向引物(10 μ M) 2.5 μL
 5 U/μL *Taq*酶..... 0.4 μL
 模板DNA10 ng

补无菌水至.....50 μL

反应用双蒸水作空白对照，阳性对照采用含有燕麦嗜酸菌西瓜亚种的DNA作为模板，每个样品重复2次。

扩增反应程序为：

B.2 测序与序列处理

扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离，经DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化，采用核酸蛋白分析仪对DNA进行定量检测。测序引物与PCR扩增引物相同，进行Sanger测序。

B.3 序列分析

利用BioEdit和Clustral X软件对待测样本的7个基因序列进行比对分析。每个基因位点的等位基因序列被赋予数字代码，待测样本特性通过一系列基因位点的等位基因赋予的数字代码来表示，从而确定其序列分型。

附 录 C

(资料性附录)

已鉴定燕麦嗜酸菌西瓜亚种溯源序列排列结果
