



中华人民共和国国家标准

GB/T 35342—2017

松材线虫分子检测鉴定技术规程

Technical regulation for molecular detection of *Bursaphelenchus xylophilus*
(Steiner and Buhrer) Nickle

2017-12-29 发布

2018-07-01 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

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 5.1.2 和 5.3.2 中有关松材线虫分子检测引物的相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:叶建仁

地址:南京市龙蟠路 159 号,南京林业大学(210037)

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

松材线虫分子检测鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了松材线虫分子检测鉴定的技术规程。

本标准适用于进出境植物检疫、国内植物检疫以及林业有害生物调查中松材线虫及其寄主植物和制品携带松材线虫的分子检测鉴定工作。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

松材线虫 **pine wood nematode** [*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle]

一种无脊椎动物,属于线虫门(Nematoda)、侧尾腺纲(Secernentea)、滑刃目(Aphelenchida)、滑刃总科(Aphelenchoidoidea)、滑刃科(Aphelenchoididae)、伞滑刃亚科(Bursaphelenchinae)、伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)的植物寄生线虫。

2.2

松材线虫病 **pine wilt disease caused by pine wood nematode**

又名松树萎蔫病,是由松材线虫寄生在松树体内所引起的一种松树毁灭性森林病害。

2.3

分子检测 **molecular detection**

以功能基因、核糖体 ITS 等区域为靶标,采用分子生物学的方法在基因水平上对物种进行鉴定。

2.4

寄主植物及其制品 **pine wood and wood products**

松材线虫寄主植物及其原木、锯材和用于承载、包装、铺垫、支撑、加固货物的木质材料,如木板箱、木条箱、木托盘、木框、木桶、木轴、木楔、垫木、枕木和衬木等。经人工合成或经加热、加压等深度加工的包装木质材料,如胶合板、纤维板等除外。

2.5

引物 **primer**

一段短核苷酸序列。其功能是作为核苷酸聚合作用的起始点,在聚合反应时,引导合成一条与模板互补的 DNA 的序列。

2.6

TaqMan 探针 **TaqMan probe**

一段寡核苷酸序列,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,荧光信号与扩增的拷贝数具有一一对应的关系。

2.7

循环阈值 **Cycle threshold value**

循环阈值(Ct 值)的含义是指在 PCR 扩增过程中,荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点

所对应的循环次数。Ct 值是实时荧光 PCR 检测结果判读的依据。

2.8

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction; PCR

在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,通过变性、退火、延伸等步骤,体外复制出与母链模板 DNA 互补的子链 DNA 的过程。是一项 DNA 体外合成放大技术,能快速特异地在体外扩增目的 DNA 片段。

2.9

实时荧光 PCR real-time PCR

PCR 反应时,加入一对特异引物与荧光探针。利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每个循环扩增产物量的变化,通过对 Ct 值和标准曲线的分析从而对起始模板进行定量分析。

2.10

交叉引物恒温扩增技术 crossing priming amplification; CPA

一种新的核酸恒温扩增技术。针对目的基因设计特异性引物(包括扩增引物和交叉引物),利用具有链置换功能的 *Bst* DNA 聚合酶,在等温条件下高效、快速、高特异地扩增靶序列。

2.11

反应体系 reaction volumes

一个 PCR 反应的总体积(μL)以及所包含的各种反应成分的浓度。包含 $10\times$ 扩增缓冲液、4 种 dNTP 混合物、引物、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、双蒸水等,实时荧光定量 PCR 还包含探针的浓度。

2.12

反应程序 reaction procedures

PCR 反应过程中,变性、退火(复性)、延伸三个基本反应步骤、循环开始前的预变性、循环结束后的延伸等各个反应步骤需要的温度以及在该温度条件下所持续的时间,还包含循环的数量。

2.13

特征条带 characterized band

采用分子检测技术对物种进行检测鉴定时,因所用引物为该物种特异性引物而扩增出的物种特有的 DNA 片段。

2.14

阳性对照 positive control

试验的一个控制处理,用于检验试验本身的正确与否。即在用分子生物学技术手段对物种进行检测鉴定时,一个试验处理的模板为该物种的 DNA。

2.15

阴性对照 negative control

试验的一个控制处理,用于检验试验本身的正确与否。即在用分子生物学技术手段对物种进行检测鉴定时,一个试验处理的模板用无菌水替代。

2.16

结果判读 results judgement

对分子检测方法所获得结果的判断。交叉引物恒温扩增检测方法的判读依据是扩增产物中是否含有特征条带,实时荧光 PCR 检测方法的判读是根据反应结束后 Ct 值的有无以及大小综合判别。

3 检测鉴定对象

疑似松材线虫,或疑似带有松材线虫及其传播媒介昆虫活体的寄主植物(参见附录 A)及其制品。

4 检测鉴定对象的取样与制备

4.1 以线虫分离物为分子检测对象的样本制备

4.1.1 线虫分离方法

4.1.1.1 贝尔曼漏斗法

贝尔曼漏斗法分离线虫,参见 B.1。

4.1.1.2 化学信息诱引检测管法

化学信息诱引检测管法收集线虫,参见 B.2。

4.1.1.3 高压水流分离法

高压水流分离法分离线虫,参见 B.3。

4.1.2 线虫的取样

将贝尔曼漏斗法或高压水流分离法分离获得的线虫虫悬液,自然沉淀 30 min 或以 1 500 r/min 的转速离心 2 min,然后将移液器枪头插入离心管底部,吸取 20 μ L 的线虫虫悬液,置于另一编号的 1.5 mL 的离心管,用于提取线虫的 DNA。化学信息诱引检测管法收集的线虫,可直接加入 20 μ L 的灭菌双蒸水,用于提取线虫的 DNA。

4.1.3 线虫 DNA 提取

线虫 DNA 的提取方法参见附录 C。

4.1.4 阳性对照材料

以松材线虫的 DNA 作为检测的阳性对照材料。

4.1.5 阴性对照材料

以 dd H₂O 作为检测的阴性对照材料。

4.2 以寄主植物及其制品为分子检测对象的样本制备

4.2.1 取样

采用电钻取样(电钻钻头直径一般选用 8 mm~10 mm)。对每份送检寄主植物及其制品,用电钻钻取 3~5 个不同位置的碎木屑,混合。用于提取松木、疫木及其制品中所含线虫的 DNA。

4.2.2 寄主植物及其制品中线虫 DNA 提取

寄主植物及其制品中所含线虫的 DNA 提取方法参见附录 D。

4.2.3 阳性对照材料

以松材线虫的 DNA 作为检测的阳性对照材料。

4.2.4 阴性对照材料

以健康寄主植物的 DNA 作为检测的阴性对照材料。

5 分子检测鉴定技术方法

5.1 实时荧光 PCR 检测

5.1.1 检测用主要仪器

实时荧光 PCR 仪、高速冷冻离心机。

5.1.2 引物与探针

采用实时荧光 PCR 技术检测松材线虫的正向引物序列为 5'-GAGCAGAAACGCCGACTT-3', 反向引物序列为 5'-CGTAAAACAGATGGTGCCTA-3', TaqMan 探针序列为 5'-TGCACGTTGTGACAGTCGT-3', 探针 5'端标记发光基团为 6-carboxyfluorescein(FAM), 3'端标记的淬灭基团为 tetramethyl-carboxy-rhodamine(TAMRA)。

5.1.3 反应体系

反应总体积 20 μL , 包括 TaqMan 通用 PCR 预混液(TaqMan Universal PCR Master Mix)10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ TaqMan 探针 1.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物与反向引物各 0.5 μL , 模板 DNA 1.0 μL , dd H₂O 7.0 μL 。

5.1.4 反应程序

一般实时荧光 PCR 仪的检测程序为:

- a) 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下, 运行 10 min;
- b) 进入循环程序: 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下, 运行 15 s; 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下, 运行 35 s; 共 35 个循环。

5.1.5 结果判读

依据 Ct 值的有无及大小来判读检测样品中是否含有松材线虫。当检测样品的 Ct 值大于 12, 且小于或等于 30 时, 即可肯定地判断检测样品中含有松材线虫; 当检测样品的 Ct 值大于 35 或无 Ct 值时, 即可判断检测样品中不含有松材线虫; 当检测样品的 Ct 值大于 30, 小于或等于 35 时, 检测样品中可能出现假阳性, 应重新取样检测。

5.2 松材线虫自动化分子检测

5.2.1 检测用仪器

松材线虫自动化分子检测系统、高速冷冻离心机。

5.2.2 引物与探针

参见 5.1.2。

5.2.3 反应体系

总体积 10 μL , 包括 TaqMan 通用 PCR 预混液(TaqMan Universal PCR Master Mix)5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ TaqMan 探针 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物与反向引物各 0.5 μL , 模板 DNA 3.5 μL 。

5.2.4 反应程序

松材线虫自动化分子检测的反应程序选择仪器中的自动检测程序。

5.2.5 结果判读

松材线虫自动化分子检测系统采用自动程序判读检测结果(参见附录 E)。

5.3 交叉引物恒温扩增检测

5.3.1 检测用仪器

金属恒温浴或水浴锅、离心机、核酸防污染检测装置(含松材线虫特异条带试纸)。

5.3.2 引物

采用恒温扩增技术检测松材线虫的引物有 3 对,分别如下:

正向外围引物序列为 5'-TCCTCACCTGGCTCTTCG-3';

反向外围引物序列为 5'-CTAAACTCCCCATCTCAGTC-3';

正向交叉引物序列为 5'-CGACGTCGCATGTAGCCG;

反向交叉引物序列为 5'-CGGTCTTTTCGGCCACACCA-CTGTGGTCGAGAACCGG;

正向 5'端 Biotin 标记探针序列为 5'-biotin-GTCTTTTCGGCCACACCA;

正向 5'端异硫氰酸荧光素(FitC)标记探针序列为 5'-FITC-GAGGCGTTCACCAGTTGG。

5.3.3 反应体系

反应总体积 20 μL 。其中,正向外围引物、反向外围引物各 0.1 $\mu\text{mol/L}$,正向交叉引物、反向交叉引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$,正向探针、反向探针各 0.3 $\mu\text{mol/L}$, MgSO_4 3 mmol/L ,dNTPs 0.4 mmol/L ,*Bst* DNA 聚合酶 10 U,10 $\times$ Thermol buffer 2 μL ,模板 DNA 4 μL 。

5.3.4 反应程序

63 $^{\circ}\text{C}$ 进行扩增,反应 60 min。

5.3.5 结果判读

将反应后的 PCR 管放置到专用的核酸防污染检测装置中进行检测,15 min 后判读结果。当试纸条的检测线上呈阳性时(参见附录 F),检测样本中含有松材线虫。

5.4 分子检测方法的选用

依据检测设备的配置情况采用相应的分子检测方法。

6 样品保存

送检样品如为寄主植物及其制品,在取样进行分子检测后,剩余样品可放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存(至少 6 个月),以备复检;样品如为线虫虫体,在取样分子检测后,剩余样品可进行人工单异活体(真菌)培养(若不具备培养条件,可将剩余线虫虫体采用 FG(福尔马林+甘油)双倍固定液固定),并 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存(至少 6 个月),以备复检。

附 录 A
(资料性附录)
松材线虫寄主植物

松材线虫可寄生的寄主植物属名如下：

- a) 松属(*Pinus*)植物；
- b) 雪松属(*Cedrus*)植物；
- c) 冷杉属(*Abies*)植物；
- d) 云杉属(*Picea*)植物；
- e) 落叶松属(*Larix*)植物；
- f) 黄杉属(*Pseudotsuga*)植物；
- g) 铁杉属(*Tsuga*)植物。

附录 B
(资料性附录)
贝尔曼漏斗法分离线虫

B.1 贝尔曼漏斗法

在直径 10 cm~15 cm 的漏斗末端接一段长约 10 cm 的乳胶管后置于漏斗架上,并在乳胶管上装一止水夹。向漏斗内注入清水至漏斗体积的四分之三。注入清水后,乳胶管内不得有气泡。

将送检样木去皮后劈成长约 3 cm~4 cm,直径 2 mm~3 mm 的细条,约取 15 g~20 g 置于面巾纸(双层)上,将面巾纸四角向中间盖上分离材料,放入漏斗内。再向漏斗内缓慢注入清水,至浸没分离材料,如图 B.1。

分离时,环境温度保持在 20 °C~30 °C(室内温度达不到上述温度范围,可将分离装置置于 20 °C~30 °C 的培养箱内)。经 12 h~24 h 后,轻轻打开止水夹,用 1.5 mL 离心管接取分离液 1 mL,自然沉淀 30 min 或以 1 500 r/min 的转速离心 2 min,收集线虫供检测。

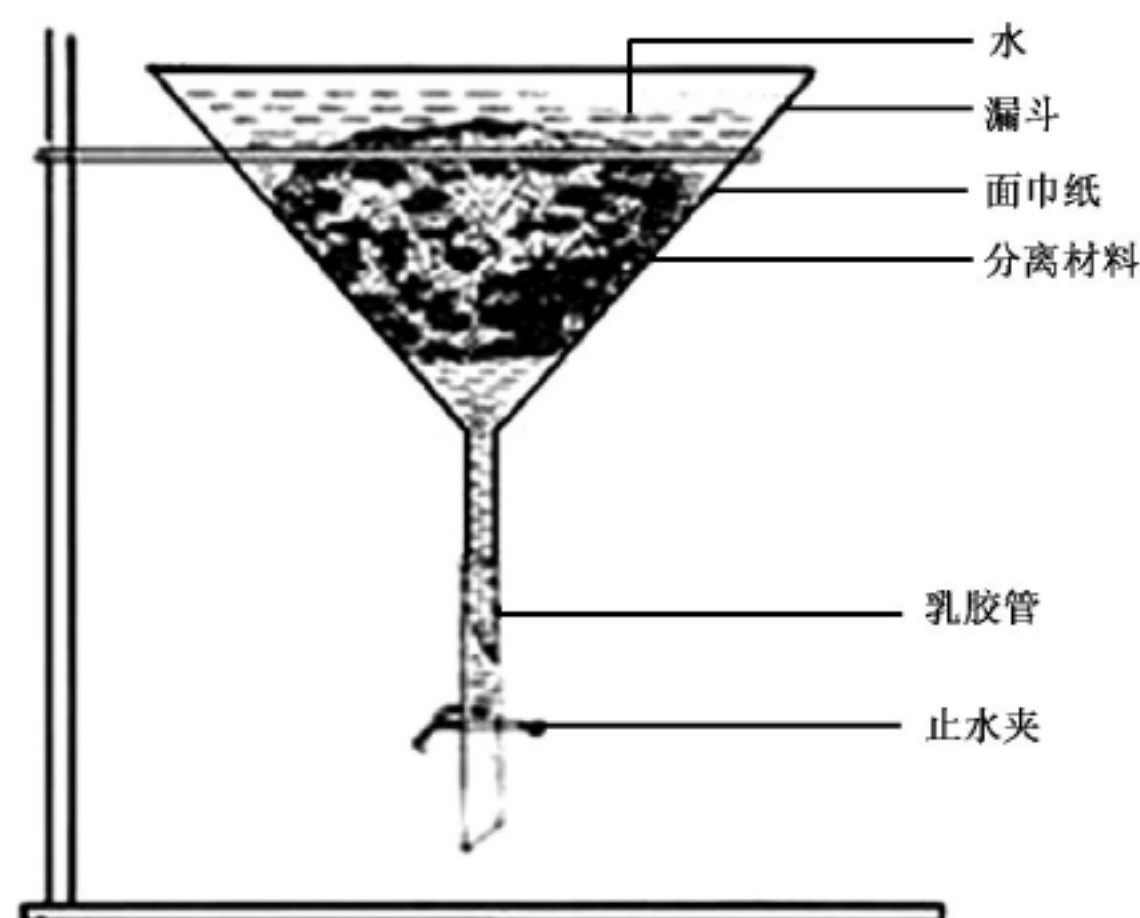


图 B.1 贝尔曼漏斗法分离线虫装置图

B.2 化学信息诱引检测管法

B.2.1 寄主植物线虫收集

在寄主植物的南面,用电钻(选取 1 cm 直径的钻头)垂直向树髓芯钻入,形成深 2 cm,直径 1 cm 的取样孔。钻孔时在钻头附近喷洒水以降钻头操作时引起的高温并增加取样孔内的湿度。将含有化学信息诱引剂的取样管插入取样孔,放置 2 h~4 h 后拔出,收集线虫供检测鉴定。

B.2.2 寄主植物制品线虫收集

在木材年轮间隔较宽的一面或木制品上,随机选取 3~5 个点进行打孔,形成深 2 cm,直径 1 cm 的取样孔。将含有化学信息诱引剂的取样管插入取样孔,放置 2 h~4 h 后拔出,收集线虫供检测鉴定。

B.3 高压水流分离法

将处理好的样品放入松材线虫快速分离器,联通电源开关,样品中的线虫即通过水流压力进入线虫收集器。5 min~10 min 后关闭电源,收集线虫供检测鉴定。

附 录 C
(资料性附录)
线虫 DNA 提取

线虫 DNA 的提取步骤如下：

- a) 在 20 μL 的线虫虫悬液中,加入 18 μL 预冷的线虫裂解液(含 2.5 mmol/L DDT,1.125% Tween20,0.025% Gelatin,2.5 倍 PCR Buffer);
- b) 加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 Proteinase K 液 2 μL ;
- c) 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h;
- d) 95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min;
- e) 以 12 000 r/min 的转速离心 1 min,上清液即含有线虫 DNA。取上清液 3.5 μL 用于分子检测。

附 录 D

(资料性附录)

寄主植物及其制品中线虫 DNA 提取

寄主植物及其制品中线虫 DNA 的提取方法如下：

- a) 取木屑 1 g~2 g 于 50 mL 的离心管内,使木屑集中在离心管底部;
- b) 加入 6 mL 的线虫裂解液(含 2.5 mmol/L DDT,1.125% Tween20,0.025% Gelatin,2.5 倍 PCR Buffer),使木屑处于液体浸泡状态;
- c) 加入 Proteinase K 5 μ L;
- d) 将离心管置于 68 $^{\circ}$ C 条件下 45 min;
- e) 然后置于 95 $^{\circ}$ C 条件下 10 min;
- f) 取 1.5 mL 离心管,向其中加入 900 μ L 无菌双蒸水,然后加入 100 μ L 裂解后溶液;
- g) 以 12 000 r/min 的转速离心 3 min,上层液体即为线虫 DNA 扩增模板,于 4 $^{\circ}$ C 保存或用于扩增。

附录 E

(资料性附录)

松材线虫自动化分子检测结果判读

采用松材线虫自动化分子检测系统,当检测程序完成后,电脑显示屏上自动显示检测结果(如图 E.1 所示)。

文件(F) 样本信息(S) 系统参数(P) 帮助(H)					
运行程序 结果分析					
☒ 全部显示 ☐ 全部隐藏					
序号	颜色	组别	样品来源	Ct值	判定结果
A1		1	广东省	25.83	含松材线虫
A2		1	浙江省	20.23	含松材线虫
A3		1	福建省	28.47	含松材线虫
A4		1	安徽省	23.19	含松材线虫
A5		1	江苏省	27.38	含松材线虫
A6		1	江苏省	21.28	含松材线虫
A7		1	阳性对照	16.65	含松材线虫
A8		1	阴性对照		不含松材线虫

图 E.1 松材线虫自动化检测结果

附 录 F
(资料性附录)

松材线虫交叉引物恒温扩增检测结果判读

采用恒温扩增技术检测松材线虫,当检测程序完成后,1 号待测样品与 3 号阳性对照均出现阳性信号,说明 1 号待测样品含有松材线虫。2 号待测样品与 4 号阴性对照未出现阳性信号,说明 2 号待测样品不含有松材线虫。其结果如图 F.1 所示。

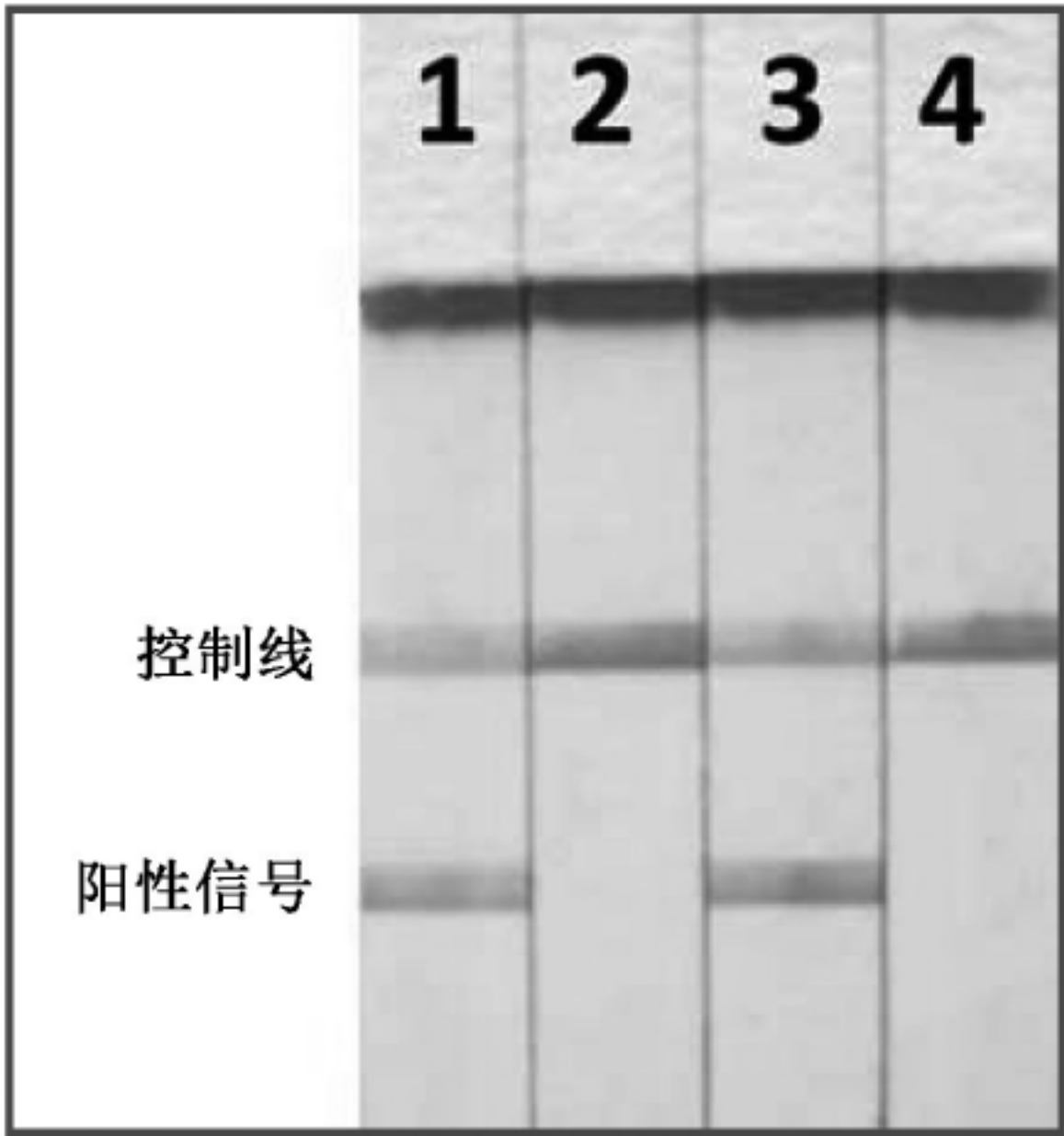


图 F.1 松材线虫恒温扩增结果

参 考 文 献

- [1] LY/T 2107—2013 化学信息诱引松材线虫快速取样技术规程
 - [2] 陈凤毛,叶建仁,吴小芹.松材线虫实时 PCR 检测技术[J].南京林业大学学报,2007,31(4): 121~124.
 - [3] 陈凤毛,叶建仁,吴小芹,谈家金,黄麟.松材线虫两种实用分子检测技术[J].北京林业大学学报,2011,33(4):149~152.
 - [4] 周成龙.松木携带松材线虫时间动态规律及快速诊断技术研究[D].南京林业大学,2012.
-