

T/GXSES

团 体 标 准

T/GXSES XXXX—2026

甘蔗梢腐病双模式生物传感检测技术规范

Technical specification for dual-mode biosensor detection of sugarcane
top rot disease

(征求意见稿)

2026 - XX - XX 发布

2026 - XX - XX 实施

广西环境科学学会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西壮族自治区产品质量检验研究院提出。

本文件由广西环境科学学会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西民族大学、广西大学、中国质量检验检测科学研究院、广西益谱科技有限公司。

本文件主要起草人：

甘蔗梢腐病双模式生物传感检测技术规范

1 范围

本文件规定了甘蔗梢腐病双模式生物传感检测的术语和定义、基本要求、样品采集与预处理、多模式生物传感检测技术、质量控制、结果判定与报告、注意事项及质量监督要求。

本文件适用于广西壮族自治区内，由Fusarium verticillioides病菌引发的甘蔗梢腐病，其覆盖田间病害快速筛查、实验室精准检测、制糖企业原料蔗入场检验、农业技术推广机构防控监测四大场景。

本文件可供制糖企业、农业技术推广机构、生态环境与质量监管部门、第三方检测机构使用，国内其他甘蔗种植区域的梢腐病检测可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 28165 植物病原微生物检测 核酸探针杂交技术规范
- GB/T 35901 生物传感器 性能表征导则
- HJ 1224 植物检疫实验室检测规范 通用要求
- SN/T 4543 出口植物源性食品中病原菌快速检测 实时荧光PCR法
- NY/T 1488 农作物种质资源鉴定技术规程 甘蔗
- NY/T 2290 甘蔗黑穗病病原菌检测技术规范
- DB45/T 2418 甘蔗梢腐病诊断技术规程
- ASTM D8478 便携式植物病害传感检测仪器操作指南（美国材料与试验协会）
- EN 17842 生物传感器在植物病害检测中的应用指南（欧盟）
- ISO 20813 分子生物标志物分析 核酸提取与纯化通用要求（国际标准化组织）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

双模式生物传感检测 dual-mode biosensing detection

比色模式和光热模式结合的两种不同原理的生物传感技术。并通过生物传感技术对甘蔗梢腐病病原菌进行特异性识别与信号转换，结合双信号相互印证实现检测结果精准判定的技术手段。

3.2

判定阈值 decision threshold

区分甘蔗梢腐病检测结果阳性与阴性的临界值，包括生物传感技术的信号强度阈值、本文件阈值基于广西本土病原菌株系检测数据制定。

3.3

平行样 parallel sample

在相同检测条件下，对同一甘蔗样品（同一病株、同一病害部位）进行重复检测的样品，用于验证检测结果的精密度和稳定性。

3.4

基质干扰 matrix interference

甘蔗侵染蔗梢、嫩叶鞘和根系组织中含有的高糖、高纤维、多酚等成分对病原菌核酸/蛋白提取、生物传感信号识别产生的非特异性干扰，本文件规定针对性净化措施消除该影响。

3.5

阳性对照 positive control

已知含甘蔗梢腐病病原菌的标准样品，用于验证检测方法的有效性和判定阈值的合理性。

3.6

阴性对照 negative control

不含甘蔗梢腐病病原菌的健康甘蔗组织提取液/无菌水，用于排除检测过程中的污染干扰。

4 基本要求

4.1 总体原则

4.1.1 精准性：检测方法对镰孢菌复合种的特异性识别率 $\geq 85\%$ ，假阳性、假阴性率均 $\leq 15\%$ 。

4.1.2 快速性：田间快速筛查场景 8 小时内完成检测，实验室精准检测 12 小时内完成检测并出具初步结果。

4.1.3 标准化：统一样品采集、预处理、检测操作的全流程技术参数，确保不同检测单位、不同检测场景的结果具有可比性。

4.1.4 可操作性：检测方法适配田间现场快速检测需求，仪器设备便携化、操作步骤简化，基层检测人员经专项培训后可独立完成操作。

4.1.5 安全性：检测过程符合实验室生物安全及田间操作安全要求，废液废渣需无害化处理，避免病原菌扩散。

4.2 仪器设备要求

多模式生物传感检测核心仪器设备及技术参数需符合表1要求，所有仪器设备需经校准合格并在有效期内使用，田间便携式仪器每次使用前需进行现场校准。

表 1 核心仪器设备及技术参数要求表

仪器设备名称	核心技术参数	适用场景
双模式生物传感器	溶液颜色变化 ΔRGB Bule $\geq XX$; 温度变化 Δ temperature $\geq XX$ 支持现场数据导出	流动车间、实验室检测
便携式样品研磨仪	适配甘蔗蔗梢组织研磨；可无菌操作；研磨时间 0 s~60 s 可调；转速 ≥ 8000 r/min	田间/实验室样品预处理
高速冷冻离心机	转速 ≥ 10000 r/min；温控范围 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；适配 1.5 mL/2 mL 离心管	流动车间、实验室样品预处理

4.3 试剂材料要求

4.3.1 检测所用生物传感试剂（特异性电化学探针）需针对广西本土镰孢菌（*Fusarium verticillioides*）质粒基因序列。药品保存则需严格按照药品瓶壁标注条件进行保存。

4.3.2 样品预处理和基质净化剂选用商用快速/常规提取盒中的试剂，确保病原菌提取效率 $\geq 80\%$ ，试剂无浑浊、沉淀、变色等变质现象。

4.3.3 阳性对照为经鉴定的镰孢菌质粒基因悬浮液，阴性对照为健康甘蔗组织提取液或无菌去离子水，对照样品需现配现用或低温冻存，避免反复冻融。

4.3.4 所有耗材（离心管、研磨管、移液枪头、检测试纸条等）需为无菌一次性耗材，符合实验室生物安全或田间检测卫生要求。

5 样品采集与预处理

5.1 样品采集

5.1.1 通则

根据各检测方法的技术特性及适用场景，明确以下权重分配方案。

5.1.2 样品采集总体要求

样品采集为检测关键环节，需保证样品的代表性和完整性，严格遵循无菌原则，采样操作需在发病植株未倒伏、未腐烂前完成。

5.1.3 采样原则

采用随机采样与典型症状采样相结合的方式，原料蔗入场检验按批次随机采样，疑似病株单独采样并标记。

5.1.4 采样部位

针对梢腐病主要侵染蔗梢、嫩叶鞘的发病特点，统一采集甘蔗顶端嫩梢（长度10~15cm）作为检测样品，优先采集病健交界处组织（病害症状边缘），确保样品含病原菌靶标。

5.1.5 采样时间

田间采样选择晴天上午9:00~11:00，避免雨天、露水未干时采样。

5.1.6 采样数量

田间筛查：每块甘蔗地块（≤10亩）采样不少于20株，每株采集1份样品，混合为5个复合样品（每份4株）；地块面积>10亩，每增加5亩增采10株。

疑似病株检测：单株单独采样，1株1份，确保样品代表性。

5.1.7 采样方法

使用无菌剪刀采集蔗梢样品，立即放入无菌密封研磨管中，做好样品标记（样品编号、甘蔗品种、采样地点、经纬度、采样时间、采样人），田间样品采集后30分钟内完成预处理，无法及时处理的样品置于4℃冰盒中运输保存。

5.2 样品预处理

5.2.1 通则

样品预处理需遵循统一流程、消除基质干扰、提升病原菌提取效率的原则，操作步骤简单、快速，适配田间与实验室不同场景。具体流程应符合5.2.2~5.2.4的规定。

5.2.2 样品保存

新鲜样品需在4小时内完成预处理；需运输的样品采用4℃冰盒低温运输，保存时间不超过24h，冷冻保存-20℃以下时间不超过1月内，严禁反复冻融（避免病原菌核酸/蛋白降解）。

5.2.3 研磨、提取和纯化

研磨、提取和纯化过程严格按照真菌DNA提取提取盒进行（现场检测使用真菌DNA快速提取提取盒；实验室检测使用真菌DNA提取提取盒）。

5.2.4 质量要求

纯化后的检测液需无明显浑浊、沉淀，确保生物传感探的特异性识别效率。

6 双模式生物传感检测技术

6.1 双模式生物传感检测（核心方法）

6.1.1 总体要求

双模式检测黑穗病和梢腐病病菌过程中，除核苷酸序列不同外操作方法均一致，将检测物质统称为提取样品进行检测。并采用比色光热双模式生物传感技术对检测液进行同步检测，双信号相互印证，避免单一方法的检测误差。具体操作步骤应符合6.1.2~6.1.5的规定。

6.1.2 检测预准备

检测预准备应按以下步骤进行：

- a) MBs-S3 的制备：为将探针 DNA 连接至磁珠 (MBs)，向 500 μL 浓度为 2 μM 的 S3 溶液中加入 200 μL 含有 EDC/NHS (1 mg/mL) 的混合液。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 1 小时，以活化 DNA 上的羧基。随后，将活化后的 DNA 溶液加入至 100 μL 浓度为 5 mg/mL 的磁珠悬液中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 小时，促进酰胺键的形成。所得 MBs-S3 复合物经磁分离收集，并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
- b) S1/S2-Au@Cu₂O 的制备。巯基化 DNA 与 Au@Cu₂O 纳米颗粒的缀合分三步进行。首先，使用 TCEP 缓冲液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下还原 DNA 探针 (S1 和 S2) 的二硫键，处理 1 小时。接着，将 200 μL 还原后的 DNA 溶液 (各 2 μM) 与 200 μL Au@Cu₂O 溶液 (3 mg/mL) 混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 3 小时。最后，混合物在 8000 rpm 下离心 5 分钟，所得沉淀经洗涤后重新分散于 200 μL Tris-HCl 缓冲液中。
- c) 将 50 μL 浓度为 2 μM 的 Au@Cu₂O-S1、2 μM 的 Au@Cu₂O-S2 与 MBs-S3 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 小时，形成三元复合物。通过磁分离收集所得产物，并重新分散于 150 μL Tris-HCl 缓冲液中。

6.1.3 反应检测

取 50 μL 三元复合物与提取样品混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 小时以启动链置换反应，释放副产物 Au@Cu₂O-S1。接着，向体系中加入 50 μL 燃料链 F，继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 小时。此步骤生成 MBs-S3-F 复合物和副产物 Au@Cu₂O-S2。通过磁性分离，吸取上清液转移至含有 200 μL 5 mM TMB 和 400 μL 2 mM H₂O₂ 的体系中，随后放入便携式检测暗箱中，进行拍照比色分析。随后，用功率密度为 1 W/cm² 的 808 nm 红外激光照射该溶液 120 秒。通过蓝牙热成像仪与智能手机联用，实时监测并记录光热信号，从而实现双模式比色和光热检测。

6.1.4 信号读取

检测程序结束后，手机程序自动输出检测信号值，记录仪器显示的原始数据，不得擅自修改检测结果。

6.1.5 双模式结果初步印证

若两种生物传感技术的检测结果一致 (同阳/同阴)，完成初步一致性验证，可直接作为初步检测结果；若结果矛盾，需立即重新取平行样进行重复检测。

6.2 检测干扰排除

6.2.1 检测探针经过特异性验证，无交叉反应，可有效区分镰孢菌复合种与其他甘蔗病原菌 (如黑穗病病原菌、花叶病毒)。

6.2.2 甘蔗基质干扰已通过预处理的纯化步骤消除，若检测过程中出现信号异常，优先排查样品是否腐烂、试剂是否失效、仪器是否校准，而非病原菌本身干扰。

6.2.3 田间检测时的环境因素 (温度、湿度、强光) 干扰，需按照本文件 8.2 要求进行校正。

7 质量控制

7.1 空白试验

每次检测需设置至少 1 组空白对照 (无菌水替代检测液)，空白对照的生物传感比色信号强度需 RGB Bule < xx; 光热信号 temperature < xx，若空白对照出现阳性信号，判定本次检测结果无效，需排查污染因素 (样品交叉污染、试剂污染、仪器污染) 后重新检测。

7.2 平行样测定

7.2.1 每次检测需设置至少 2 组平行样，平行样的检测结果相对偏差 $\leq 15\%$ ，若偏差超出范围，需重新检测该样品。

7.2.2 田间快速筛查可适当减少平行样数量，但每批次检测需设置 1 组平行样，确保检测结果的可靠性。

7.2.3 平行样检测结果需与样品原始结果一同记录，纳入检测报告。

7.3 阳性对照验证

每次检测需设置1组阳性对照，阳性对照的生物传感比色信号RGB Bule>xx;光热信号temperature >xx，若阳性对照检测结果为阴性，判定本次检测试剂存在问题，需更换试剂后重新检测。

7.4 仪器与试剂质量控制

7.4.1 检测试剂需在规定的保存条件下存放，严格按照药品说明保存条件进行保存，避免反复冻融，开封后需在1个月内用完；每次使用前检查试剂的有效期和状态，变质、过期试剂严禁使用。

7.4.2 无菌耗材需在有效期内使用，开封后置于无菌环境中，避免污染

8 结果判定与报告

8.1 则单方法判定阈值

本文件规定的核心检测方法阈值基于实验室100组验证数据和广西主产区田间500组实测数据制定，具体阈值见表2。

表2 则单方法判定阈值表

检测方法	检测指标	阳性阈值	阴性阈值	疑似阈值范围
电化学生物传感	比色信号强度 (RGB Bule)	$\geq xx$	$< xx$	$xx \sim xx$
	光热信号强度 (°C)			

8.2 综合判定规则

甘蔗梢腐病检测结果分为阳性、阴性、疑似阳性三类，判定结合多模式生物传感核心结果和PCR辅助验证结果，优先采用金标准+核心方法的判定逻辑，疑似阳性结果需在48小时内完成复核，具体规则见表3。

表3 甘蔗梢腐病多模式检测综合判定规则

检测结果类型	多模式生物传感结果	判定结论	检测结果类型
阳性	两种模式均为阳性	存在梢腐病病原菌，判定为阳性	阳性
阳性	任一生物传感模式为阳性	存在梢腐病病原菌，判定为阳性	阳性
阴性	两种模式均为阴性	未检出梢腐病病原菌，判定为阴性	阴性
阴性	单一生物传感模式为疑似	未检出梢腐病病原菌，判定为阴性	阴性
疑似阳性	两种模式结果矛盾	需重新采样并采用现场复测，后续邮寄到实验室检测	疑似阳性
疑似阳性	检测结果接近单方法判定阈值	增加平行样数量 (≥ 3 个)，重新检测复核	疑似阳性

8.3 检测报告

检测报告需统一格式，内容详实、数据准确、可追溯，电子档和纸质档均需存档，保存期限不少于5年，检测单位需对报告的真实性和准确性负责。报告至少包含以下核心内容：

- 样品信息：样品编号、甘蔗品种、采样点位（经纬度）、种植地块、采样时间、采样人、样品状态（新鲜/冷藏）、病害表现症状描述；
- 检测结果：各单一方法的原始检测数据（信号强度、Ct值、显色结果）、平行样偏差、质量控制结果（空白/阳性对照）、综合判定结论；
- 判定依据：本文件的具体条款、引用的国家标准/行业标准/地方标准；

——签字盖章：检测人员、复核人员、技术负责人签字，检测单位公章，报告出具日期。

9 注意事项

9.1 样品运输与保存

9.1.1 田间采样后的样品需置于4℃冰盒中密封运输，严禁常温暴晒，尽快运输带指定地点进行检测，避免样品变质和病原菌降解。

9.1.2 无法及时检测的样品可置于-20℃冰箱中短时间冷冻保存，解冻后需一次性完成检测，严禁反复冻融。

9.1.3 检测后的样品需进行无害化处理，严禁带回甘蔗种植区，避免病原菌扩散。

9.2 环境因素影响及校正

9.2.1 温度：为保证检测温度光线条件的一致性，田间检测须在流动车间进行。

9.2.2 湿度：雨天或环境湿度>80%时，禁止进行采样检测。

9.3 仪器操作安全

9.3.1 电气类仪器设备（便携式样品研磨仪、离心机、红外激光发射仪）需在额定电压下使用，田间检测使用便携式电源时，做好防漏电、防短路保护。

9.3.2 无菌操作时，检测人员需佩戴一次性手套、口罩、护目镜，使用后的无菌耗材需密封收集，不得随意丢弃。

9.3.3 研磨、离心等操作需按照仪器操作规程进行，避免样品飞溅造成病原菌污染或人员伤害。

9.4 废液废渣处理

9.4.1 检测后收集废液统一送往危险废液处理厂进行处理。

9.4.2 检测后的固体废渣（甘蔗样品残渣、一次性耗材、研磨珠）需密封收集，采用高温焚烧（温度≥400℃）或深埋（深度≥1m）的方式无害化处理，避免病原菌扩散。

9.4.3 废液废渣的处理记录需存档保存，包含处理时间、处理方式、处理人等信息。

9.5 质量控制

9.5.1 检测单位需建立完善的质量保证体系，每月开展1次内部质控考核，考核内容包括：盲样测试、平行样比对、异常结果处理演练，考核合格率需≥85%，考核不合格的人员需重新培训并考核，合格后方可上岗。

9.5.2 每季度对检测数据进行统计分析，识别检测过程中的薄弱环节（如样品预处理、仪器操作、结果判定），制定针对性的改进措施并落实，改进效果需验证。

9.5.3 所有检测原始数据、仪器校准记录、质控考核记录、报告存档记录均需实现全流程可追溯，电子档加密备份，纸质档装订成册。

附 录 A
(规范性)
甘蔗病害多模式检测结果判定记录表

甘蔗病害多模式检测结果判定记录表见表A.1。

表 A.1 甘蔗病害多模式检测结果判定记录表

样品采集记录表	检测原始数据记录表	仪器校准记录表
样品编号	检测日期	仪器名称
甘蔗品种	样品编号	型号
种植地块	仪器型号	校准日期
采样经纬度	试剂批次	校准项目
采样时间	各方法检测数据	校准结果
采样人	平行样偏差	校准人员
样品状态	空白/阳性对照结果	下次校准日期
病害症状描述	检测人员	备注
备注	备注	/