



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28982—2012

GB/T 28982—2012

## 番茄斑萎病毒 PCR 检测方法

Detection of tomato spotted wilt virus by PCR

中华人民共和国  
国家标准  
番茄斑萎病毒 PCR 检测方法  
GB/T 28982—2012

\*

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

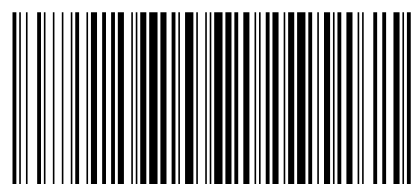
\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字  
2013年4月第一版 2013年4月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-46391 定价 21.00 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



GB/T 28982-2012

2012-12-31 发布

2013-06-01 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:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、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:于翠、杨翠云、廖富荣、易建平、邓丛良、戚龙君。

表 E.1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂	贮备液浓度	终浓度	加样量 μL
PCR 缓冲液	10×	1×	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	3.0 mmol/L	3
dNTP	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.5
TSWV-CP-17F	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.3
TSWV-CP-100R	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.2
WFT-RNA-25F	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.2
WFT-RNA-93R	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.2
TSWV-CP-73T(FAM 标记)	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.2
WFT-RNA-48T(VIC 标记)	20 μmol/L	0.15 μmol/L	0.2
Taq 酶	5 U/μL	0.04 U/μL	0.2
cDNA	—	—	2
补水至	—	—	25

## E.5 结果判定

E.5.1 阈值设定: 阈值设定根据仪器噪音情况进行调整, 或以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点, 结果显示阴性为准。

E.5.2 待测样品的 Ct 值为 40 或无 Ct 值时, 则判定未检测到番茄斑萎病毒。

E.5.3 待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时, 则判定检测到番茄斑萎病毒。

## 番茄斑萎病毒 PCR 检测方法

### 1 范围

本标准规定了番茄斑萎病毒的 RT-PCR、免疫磁珠 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于包括种子、苗木和无性繁殖材料的活体植物材料及传毒介体中携带的番茄斑萎病毒的检测。

### 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。

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

### 3 番茄斑萎病毒基本信息

中文名: 番茄斑萎病毒

英文名: tomato spotted wilt virus

缩写: TSWV

分类地位: 布尼亚病毒科(Bunyaviridae), 番茄斑萎病毒属(*Tospovirus*)

番茄斑萎病毒其他信息参见附录 A。

### 4 方法原理

用特异性抗体修饰的磁珠吸附待测样品中的病毒粒子后经高温裂解释放出病毒 RNA, 或直接从待测样品材料中提取植物总 RNA, 然后在逆转录酶的作用下合成 cDNA, 以 cDNA 为模板再通过普通 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 进行检测。分析 PCR 结果即可明确材料中是否含有病毒核酸成分。

### 5 仪器、用具及试剂

#### 5.1 仪器设备

PCR 仪, 实时荧光 PCR 仪, 旋转孵育器, 电泳仪, 凝胶分析成像系统, 水浴锅, 高速冷冻离心机, 高压灭菌锅, 微波炉, 涡旋振荡器, 电子天平(感量 0.001 g), 超低温冰箱(−80 °C)等。

#### 5.2 用具

磁力架, 可调式微量移液器, 无 RNase 吸头, 无 RNase 离心管, PCR 管, 研钵等。

#### 5.3 试剂

除有特殊说明外, 所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。试剂配制见附录 B。

番茄斑萎病毒抗体, 磁珠(具有超顺磁性的聚苯乙烯珠子, 直径 280 nm, 表面标记有甲苯磺酰基),