

后,吸取第一个反应阶段的混合液加到相应的第二阶段混合液管内,确保这个混合液分散到每个管的底部;将荧光 PCR 管放到实时荧光 PCR 仪中。

反应程序:48 ℃ 30 min;95 ℃,10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。

表 D.1 实时荧光 PCR 反应体系

组 分	加 样 量/ $\mu\text{L}$
10×PE TaqGold 缓冲液 A	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	5.5
dNTPs(6.25 mmol/L)	2.0
PSTV-231F(7.5 mmol/L)	1.0
PSTV-251T(7.5 mmol/L)	0.5
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.125
M-MLV Rtase(200 $\mu\text{mol/L}$ )	0.05
灭菌 DEPC 水	8.325
总体积	20

### D.3 结果判定

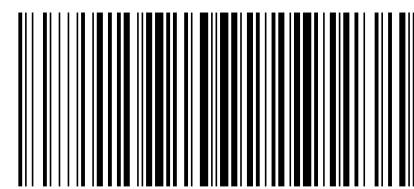
#### D.3.1 基线的设置

实时荧光 RT-PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。基线范围选择在 3 个~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。

#### D.3.2 结果的判定

在空白对照及阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线、阳性对照 Ct 值 $\leq 30$  并出现典型扩增曲线的条件下:

- 待测样品的 Ct 值 $\geq 40$  时,判定 PSTVd 阴性。
- 待测样品的 Ct 值 $\leq 35$  时,判定 PSTVd 阳性。
- 待测样品的  $35 \leq \text{Ct 值} \leq 40$  时,应重新进行测试;如果重新测试的 Ct 值 $\geq 40$  时,判定 PSTVd 阴性;如果重新测试的 Ct 值 $< 40$ ,则判定 PSTVd 阳性。



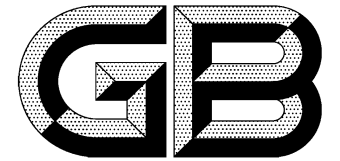
GB/T 31790-2015

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·1-49510

定价: 18.00 元



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 31790—2015

## 马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato spindle tuber viroid*

2015-07-03 发布

2015-11-27 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

**附录 D**  
(规范性附录)  
**实时荧光 RT-PCR 检测方法**

**D.1 试剂****D.1.1 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)提取缓冲液**

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB) 20 g, 100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0), 20 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 氯化钠(NaCl) 81.8 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min, 室温储存。

**D.1.2 1% 十二烷基磺酸钠(SDS)三羟甲基氨基甲烷(Tris)乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )(SDS-TE) 缓冲液**

10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1% 十二烷基磺酸钠(SDS)。

**D.2 试验步骤****D.2.1 核酸提取**

称取 100 mg~200 mg 样品组织于研钵中, 液氮研磨后加 1 mL~2 mL CTAB 提取缓冲液(现用现加上新的 1%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2% PVP-40)。将汁液移到 1.5 mL 离心管中, 65 °C 温浴 30 min; 室温 13 000 r/min 离心 5 min。取 700  $\mu\text{L}$  上清液, 加 700  $\mu\text{L}$  三氯甲烷: 乙酸异戊酯(24:1), 颠倒混匀; 13 000 r/min 离心 5 min。取 500  $\mu\text{L}$  上清液, 加 500  $\mu\text{L}$  三氯甲烷: 乙酸异戊酯(24:1), 颠倒混匀; 13 000 r/min 离心 5 min。取上清液, 加 0.5 倍体积的 5 mol/L NaCl 和等体积预冷的异丙醇, 混匀, -20 °C 过夜; 13 000 r/min 离心 10 min, 沉淀核酸。用 200  $\mu\text{L}$  1% SDS TE 缓冲液悬浮沉淀; 加 100  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaCl 和 300  $\mu\text{L}$  预冷异丙醇, 混匀, -20 °C 放置 30 min; 13 000 r/min 离心 10 min; 用 400  $\mu\text{L}$  乙醇洗沉淀, 离心 4 min; 留沉淀, 干燥; 用 100  $\mu\text{L}$  DEPC 水重悬沉淀, -20 °C 保存。

**D.2.2 引物探针合成**

PSTVd-231F: 5'-GCC CCC TTT GCG CTG T-3'  
PSTVd-296R: 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3'  
PSTVd-251T: 5'-FAM-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-TAMRA-3'

**D.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应**

取两个离心管, 分别配制第一阶段主要混合液(7.5  $\mu\text{mol/L}$  PSTV-296R 1.0  $\mu\text{L}$ , DEPC 水 3.0  $\mu\text{L}$ ) 和第二阶段主要混合液(见表 D.1)。每个反应一式两份, 一个 RNA 阳性对照, 一个空白对照, 一个无感染 RNA 阴性对照。按上面规定的顺序和数量加试剂, 冰浴。准备 0.2 mL PCR 管。向每个管里加 1  $\mu\text{L}$  总 RNA 或对照材料, 加 4  $\mu\text{L}$  第一阶段的反应液, 把管放到 PCR 仪上。反应程序: 95 °C 3 min, 1 个循环; 离心管 4 °C 冷却 5 min~10 min; 同时向荧光 PCR 管加 20  $\mu\text{L}$  第二阶段的反应液; 变性完成

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
**马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法**  
GB/T 31790—2015  
\*  
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(100029)  
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)  
网址 www.spc.net.cn  
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238  
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 字数 26 千字  
2015 年 8 月第一版 2015 年 8 月第一次印刷  
\*  
书号: 155066·1-49510 定价 18.00 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

表 C.1 (续)

组 分	体 积/ $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1.32
dNTPs (1 mmol/L)	4.4
上游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$ )	1.1
下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$ )	1.1
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.11
cDNA 模板	2.2
总体积	22

### C.2.5 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,进行电泳分析。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

### C.3 结果判定

**C.3.1** 阳性对照在 359 bp 左右处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

**C.3.2** 阳性对照在 359 bp 左右处有扩增片段,阴性对照、空白对照及待测样品无特异性扩增,可判定结果为阴性。

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所、中华人民共和国甘肃出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张永江、刘洪义、刘忠梅、辛言言、陈慧、陈红运、马洁、吕典秋、沈建国、廖富荣、文朝慧、张成标、吴兴海。