



中华人民共和国国家标准

GB/T 28976—2012

GB/T 28976—2012

草莓潜隐环斑病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of strawberry latent ringspot virus

中华人民共和国
国家标准
草莓潜隐环斑病毒检疫鉴定方法

GB/T 28976—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

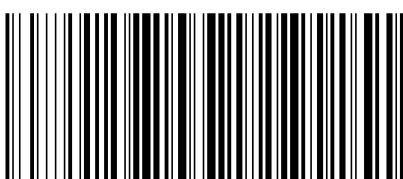
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字
2013年3月第一版 2013年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-46398 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 28976-2012

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、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:杨翠云、于翠、闻伟刚、郑建中、印丽萍、李彬。

附录 E
(规范性附录)
实时荧光 RT-PCR 方法

E. 1 实验步骤**E. 1. 1 引物和探针设计**

引物序列:SLRSV-FP:5'-AGATGGCCTCAGTACCAACCAGA-3',
 SLRSV-RP:5'-CCCCAAAGTGTTCCCTTCACA-3'
 探针序列:SLRSV-MGB-PROBE:FAM-5'-CTCACCAAGTATGCTGCTT-3'-MGB

E. 1. 2 RNA 提取及反转录

操作方法见附录 D。

E. 1. 3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 E. 1, 每个样品设 2 个平行处理。并设阳性对照、阴性对照和空白对照, 以含有草莓潜隐环斑病毒的 cDNA 为阳性对照; 以健康植物材料的 cDNA 作为阴性对照; 以水代替 DNA 模板作为空白对照。每种对照各做 2 个平行管。

表 E. 1 实时荧光 PCR 反应体系

| 名称 | 贮备液浓度 | 终浓度 | 加样量/ μL |
|-------------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| PCR 缓冲液 | 10× | 1× | 2.5 |
| MgCl ₂ | 25 mmol/L | 3.0 mmol/L | 3 |
| dNTP | 10 mmol/L | 0.2 mmol/L | 0.5 |
| 正向引物 | 20 $\mu\text{mol/L}$ | 0.24 $\mu\text{mol/L}$ | 0.3 |
| 反向引物 | 20 $\mu\text{mol/L}$ | 0.24 $\mu\text{mol/L}$ | 0.3 |
| Taq DNA 聚合酶 | 5 U/ μL | 0.04 U/ μL | 0.2 |
| 探针 | 20 $\mu\text{mol/L}$ | 0.4 $\mu\text{mol/L}$ | 0.5 |
| cDNA | — | — | 2 |
| 补水至 | — | — | 25 |

E. 1. 4 实时荧光 PCR 反应参数

反应条件:预变性 94 °C 10 min, 94 °C 15 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共 40 个循环。本反应条件适用于 ABI 7500 型荧光 PCR 仪, 如使用其他荧光 PCR 仪, 可根据仪器性能进行适当调整。操作方法按照仪器的使用说明进行, 反应结束后保存各项数据和图像。

草莓潜隐环斑病毒检疫鉴定方法**1 范围**

本标准规定了草莓潜隐环斑病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于植物材料, 包括无性繁殖材料、种子和苗木中草莓潜隐环斑病毒的检疫鉴定。

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 1840 植物病毒免疫电镜检测方法
 SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 草莓潜隐环斑病毒基本信息

中文名:草莓潜隐环斑病毒

学 名:strawberry latent ringspot virus

缩 写:SLRSV

分类地位:Secoviridae 科, 温州蜜柑矮缩病毒属(*Sadwavirus*)

草莓潜隐环斑病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

病毒粒子的形态特征、为害症状、血清学特性和分子生物学特征是检疫鉴定该病毒的主要依据, 采用 DAS-ELISA、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR、免疫电镜和鉴别寄主反应等方法进行检疫鉴定。

5 仪器设备、设施、用具和试剂**5. 1 仪器设备**

酶标仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、超净工作台、电子天平(感量 0.001 g)、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、电子透射显微镜、水浴锅、高速冷冻离心机、超低温冰箱(-80 °C)、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、涡旋振荡器。

5. 2 设施

植物隔离检疫圃。

5. 3 用具

可调式微量移液器(2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL)及相应的无 RNase 吸头、无 RNase 离心管、PCR 管、研钵、样品袋、标签、镊子、放大镜等。

5. 4 试剂

5. 4. 1 除有特殊说明外, 所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。