F.2　结果判定

F.2.1　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扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准。

F.2.2　结果判定

在阳性样品和阴性样品 Ct 值正确的情况下，进行以下判定：

——待测样品的 Ct 值为 40 或无 Ct 值时，则判定结果阴性。

——待测样品的 Ct 值小于或等于 35 时，则判定结果阳性。

——待测样品的 Ct 值小于 40 且大于 35 时，应重新进行测试，如果重新测试的 Ct 值为 40 时，则判定结果阴性。如果重新测试的 Ct 值小于 40 且大于 35 时，则判定结果阳性。

GB/T 31795-2015

版权专有　侵权必究

*
书号：155066・1-49526
定价：　21.00　元

GB/T 31795—2015

ICS 65.020.01
B 16

中华人民共和国国家标准

GB/T 31795—2015

番茄黑环病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Tomato black ring virus*

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

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
番茄黑环病毒检疫鉴定方法
GB/T 31795—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 1.25 字数 29 千字
2015年8月第一版 2015年8月第一次印刷
*
书号:155066·1-49526 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

附 录 F
（规范性附录）
实时荧光 RT-PCR 方法

F.1 实验步骤

F.1.1 引物和探针设计

引物序列:上游引物 TBRV-FP:5′-TCGTTTCTTGCAGTTTGCGTAT-3′
下游引物 TBRV-RP:5′-GTGGCAAAGAAGGGAGACTGTATT-3′
探针序列:TBRV-MGB-PROBE:FAM-CACAGATACCACATGTGGA-MGB

F.1.2 RNA 提取及反转录

操作方法见 D.2 和 D.3。

F.1.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 F.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,以含有番茄黑环病毒的 cDNA 为阳性对照;以健康植物材料或线虫传多面体病毒属其他病毒的 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 F.1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终 浓 度
10×PCR 反应缓冲液	1×
$MgCl_2$	3.0 mmol/L
dNTP	0.2 mmol/L
上游引物	0.24 μmol/L
下游引物	0.24 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	1 U
探针	0.4 μmol/L
DNA 模板	2 μL
补 H_2O 至	25 μL

F.1.4 实时荧光 PCR 反应参数

反应条件:预变性 94 ℃ 10 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 40 s,共 40 个循环。

本反应条件适用于 ABI7500 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。

附　录　E
（规范性附录）
免疫磁珠 RT-PCR 方法

E.1　免疫磁珠分离

E.1.1　磁珠清洗

取充分混匀后的磁珠 5 μL 加入到 0.2 mL PCR 管中，加入 100 μL 的缓冲液 B 后充分混匀并离心，PCR 管于磁性分离架上静置约 2 min，至磁珠贴壁、液体部分澄清透明后吸去清液。该清洗过程重复 3 次，彻底清洗磁珠，以备后用。

E.1.2　抗体包被

用包被缓冲液稀释抗体到所需浓度，在已清洗的磁珠中分别加入 100 μL 抗体溶液，充分混匀后置 37 ℃孵育器中旋转悬挂 16 h～18 h。取出离心，放于磁性分离架上静置约 2 min，磁珠贴壁后吸除清液，分别加入 100 μL 缓冲液 C 4 ℃清洗 5 min，重复清洗 3 次；再分别加入 100 μL 缓冲液 D，充分混匀后37 ℃悬挂 4 h，最后用缓冲液 C 4 ℃清洗 5 min。

已经包被抗体的磁珠可以直接用于抗原吸附。若暂时不用，也可保存于缓冲液 C 中，在 4 ℃的温度条件下可保存数月，为避免滋生细菌，可加 0.02%的叠氮钠。

E.1.3　抗原吸附

取带毒叶片 50 mg 置于研钵中，加入 1 mL 病毒提取缓冲液研磨均匀，8 000 r/min 离心 5 min，加入到包被有抗体的磁珠中，用枪头轻轻吹打 1 min，混合均匀；将此悬浊液置 37 ℃孵育器中 2 h，过程中始终保持离心管的旋转振荡，避免磁珠沉淀到管底，影响吸附效果；将包被好抗原的磁珠放于磁力架上吸附 2 min 左右，待磁珠贴壁，液体部分澄清透明，去除清液，备用。将吸附好抗原的磁珠用无 RNase 的水漂洗，5 000 *g* 30 s 离心沉淀磁珠。

E.2　cDNA 第一链的合成

直接在吸附了病毒的带有磁珠的离心管中进行反转录。反转录体系总体积为 20 μL，其中 1 μL 反向引物(20 μmol/L)，4 μL 5×AMV 酶缓冲液，2 μL dNTP(10 mmol/L)，10 μL 无 RNase 水，稍离心混匀后置于 85 ℃孵育器中变性 5 min，迅速置冰上 2 min～3 min，然后迅速加入 2 μL AMV 反转录酶(5 U/μL)，1 μL RNA 酶抑制剂(40 U/μL)，42 ℃反应 1 h。

E.3　PCR 反应

具体操作步骤见 D.4 和 D.5。

E.4　结果判定

结果判定见 D.6。

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、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、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：杨翠云、于翠、郭京泽、魏亚东、邓丛良、乔艳艳、崔学慧、胡培龙、孙娟。