



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28067—2011

GB/T 28067—2011

## 甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection of sugarcane yellow leaf virus using the real-time RT-PCR

中华人民共和国  
国家标准  
甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法  
GB/T 28067—2011

\*  
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 0.75 字数 13 千字  
2012 年 4 月第一版 2012 年 4 月第一次印刷

\*  
书号: 155066·1-44581 定价 16.00 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 28067-2011

2011-12-30 发布

2012-06-01 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

附录 A  
(资料性附录)

甘蔗黄叶病毒反转录反应与实时荧光 PCR 扩增反应混合液配制

表 A.1 每个测试样本反转录反应混合液配制的组分及使用量

试剂	使用量	25 $\mu\text{L}$ 反应体系终浓度
5 $\times$ 反转录反应缓冲液(Mg <sup>2+</sup> Plus)	5.0 $\mu\text{L}$	1 $\times$
10 mmol/L dNTPs	1.0 $\mu\text{L}$	0.4 mmol/L
10 U/ $\mu\text{L}$ RNase 抑制剂	0.5 $\mu\text{L}$	5 U/25 $\mu\text{L}$
200 U/ $\mu\text{L}$ M-MLV 反转录酶	1.0 $\mu\text{L}$	200 U/25 $\mu\text{L}$
无 RNase 水	7.5 $\mu\text{L}$	
总体积	15.0 $\mu\text{L}$	

表 A.2 每个测试样本荧光 PCR 扩增反应混合液配制的组分及使用量

试剂	使用量	25 $\mu\text{L}$ 反应体系终浓度
2 $\times$ 荧光 PCR 反应液(含 <i>Taq</i> 酶)	12.5 $\mu\text{L}$	1 $\times$
5'-引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$
3'-引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$
荧光探针(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$ <sup>2)</sup>
双蒸水	8.5 $\mu\text{L}$	
总体积	24.0 $\mu\text{L}$	

2) 探针浓度与使用的实时荧光 PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关,实际使用时请参照仪器说明书,或各荧光探针的具体使用要求进行。

## 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:福建农林大学甘蔗综合研究所、农业部甘蔗及制品质量监督检验测试中心、农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室。

本标准主要起草人:高三基、陈平华、陈如凯、郭晋隆、张华、许莉萍、王恒波、陈由强。

9.2.3 蔗茎样品:取甘蔗植株可见肥厚带叶下两叶(+3叶)对应的蔗茎,若为甘蔗蔗种,取中部种茎,编号备用。

### 9.3 存放与运送

采集或处理的样本在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,要求放置-80℃冰箱,但应避免反复冻融。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,或用液氮处理,尽快运送到实验室。

## 10 操作方法

### 10.1 总 RNA 的提取

10.1.1 取 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管,并对每个管进行编号。

10.1.2 称取 0.2 g 样品材料(蔗茎样品要去除表皮),并用液氮研磨成粉末状(要保持液氮不挥发干净)。

10.1.3 向 1.5 mL 离心管中加入粉末,等液氮刚挥发完立即加入 1 mL 裂解液,盖上管盖,振荡混匀,于 4℃、12 000 g 离心 10 min。

10.1.4 吸取上清液至另一新的离心管中,加入 0.2 mL 三氯甲烷,盖住管盖,剧烈振荡混匀约 15 s,室温静置 3 min 后,于 4℃、12 000 g 离心 15 min。

10.1.5 吸取上清液至另一新的离心管中,加入 0.5 mL 预冷的异丙醇(-20℃),颠倒混匀,室温静置 10 min 后,于 4℃、12 000 g 离心 15 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。

10.1.6 小心倒出离心管中上清液,加入 1 mL 75%预冷的乙醇(-20℃)洗涤,颠倒离心管 2 次~3 次,7 500 g 离心 5 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。重复洗涤沉淀 1 次。

10.1.7 小心倒出离心管中上清液,用微量加样器将其吸干,一份样本换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀的一面,室温干燥 10 min~15 min。

10.1.8 加入 50 μL 无 RNase 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 g 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增;若需长期保存,应放置-80℃冰箱。

10.1.9 取 5 μL RNA 溶液加无 RNase 水稀释至 1 mL,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计上测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ 。RNA 浓度按式(1)计算:

$$c = A \times N \times 40 / 1\ 000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$c$  ——RNA 浓度,单位为微克每微升( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ );

$A$  ——260 nm 处的吸光值;

$N$  ——RNA 稀释倍数。

当  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间时,适合于实时荧光 RT-PCR 扩增。

### 10.2 反转录

10.2.1 取 1.0 μL RNA(约 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、1.0 μL 反转录引物(3'-引物)和 8.0 μL DEPC 水加入到无 RNase 的 PCR 管中,70℃15 min。

10.2.2 冰浴 2 min。

10.2.3 加入反转录反应混合液,每个测试样本反转录反应混合液配制参见表 A.1。轻微混匀,500 g 离心 30 s,42℃1 h,75℃8 min。反应结束后,可以直接进行实时荧光 PCR 检测,或者放于-20℃保存备用。

## 甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

### 1 范围

本标准规定了甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法所需的仪器与试剂、样品的采集与前处理、操作方法以及结果判定。

本标准适用于甘蔗植株、种苗及种茎中甘蔗黄叶病毒的快速检测、诊断。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 2.1

**反转录 reverse transcription**

以 RNA 为模板合成 DNA 的过程,也称逆转录。

#### 2.2

**实时荧光 RT-PCR real time RT-PCR**

实时荧光反转录-聚合酶链式反应。

#### 2.3

**Ct 值 cycle time**

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RNA:核糖核酸

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶

dNTPs:4 种脱氧核苷 5'-三磷酸混合液

RNase:RNA 酶

M-MLV:莫洛尼鼠白血病病毒(*Moloney murine leukemin virus*)反转录酶

FAM:6-羧基荧光素

TAMRA:6-羧基四甲基罗丹明

### 4 方法原理

在反转录酶作用下将 RNA 反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板利用 Taq 酶进行实时荧光 PCR 扩增反应(采用 Taq Man 探针方法)。在比对甘蔗黄叶病毒外壳蛋白基因的基础上,设计一对仅在甘蔗黄叶病毒外壳蛋白基因间保守的特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。探针的 5'端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团,3'端标记 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团,结合部位位于目的扩增片段内部。当完整的探针与目的序列配对时,荧光基团发射的荧光因与 3'端的淬灭剂接近而被淬灭,仪器检测不到荧光信号;但在进行延伸反应时,Taq 酶发挥 5'→3'的外切核酸酶功能,将探针降解,使得荧光基团