

DB41

河 南 省 地 方 标 准

DB41/T 1422—2017

蝴蝶兰建兰花叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

地方标准信息服务平台

2017 - 07 - 07 发布

2017 - 10 - 07 实施

河南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准参照SN/T 2155—2008给出的规则编写。

本标准由河南省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：河南省农业科学院园艺研究所。

本标准主要起草人：王利民、蒋卉、董晓宇、符真珠、张和臣、王慧娟、李艳敏。

本标准参加起草人：高杰、张晶、袁欣。

地方标准信息服务平台

蝴蝶兰建兰花叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了蝴蝶兰建兰花叶病毒 (*Cymbidium mosaic virus*) 实时荧光 RT-PCR 检测的术语和定义、方法原理、仪器、用具、试剂、引物和检测方法。

本标准适用于蝴蝶兰植株建兰花叶病毒实时荧光 RT-PCR 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)适用于本文件。

SN/T 2155—2008 建兰花叶病毒检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

建兰花叶病毒

建兰花叶病毒 (*Cymbidium Mosaic Virus*, CymMV), 为马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*) 病毒, 该病毒的分类地位、粒体结构、理化性质、基因组结构、传播方式参见附录 A 和 SN/T 2155—2008。

4 方法原理

建兰花叶病毒为 ssRNA 病毒, 通过反转录酶和 DNA 聚合酶的作用将 RNA 反转录为 cDNA, 针对核酸保守序列设计引物, 对 cDNA 进行 PCR 扩增, 分析 PCR 检测结果, 可明确材料中是否含有病毒的核酸成分。采用实时荧光 RT-PCR 方法, 可实时监测每次扩增中特异性序列扩增的目的片段累积量, 荧光信号随时间变化形成一条曲线。通常在 10 个~15 个循环的荧光值设定阈值和基线, 荧光产生进入指数期、线性期和最终的平台期, 依次可以在 PCR 反应处于指数期的某一点上来监测 PCR 产物的量。荧光强度首次超过设定阈值时 PCR 所需的循环次数为 C_t 值, 与样本细胞中表达稳定、丰度较低的基因 (内参基因, 如 *Actin*、*GAPDH* 等) 的 C_t 值进行相对定量分析, 检测目的 RNA 片段的相对含量。

5 仪器、用具、试剂及引物

5.1 仪器

实时荧光 PCR 仪 (本检测方法适用于 ABI、Bio-Rad、Roche 的实时荧光 PCR 仪)、高速冷冻离心机、漩涡振荡仪、核酸蛋白测定仪、-20 °C 冰箱、-80 °C 超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机等。

5.2 用具