

DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB37/T 4101—2020

苹果轮纹病菌快速检测方法

Rapid detection of botryosphaeria dothidea

地方标准信息服务平台

2020 - 08 - 31 发布

2020 - 10 - 01 实施

山东省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。
本标准由山东省农业农村厅提出并组织实施。
本标准由山东省农业标准化技术委员会归口。
本标准起草单位：山东省烟台市农业科学研究院。
本标准主要起草人：王英姿、刘保友、汪少丽、王培松、石洁。

地方标准信息服务平台

苹果轮纹病菌快速检测方法

1 范围

本标准规定了用环介导等温扩增（LAMP）快速检测苹果轮纹病菌的测定方法。

本标准适用于苹果叶片、枝条和果实中苹果轮纹病菌的快速检测。方法检出限： 10^{-7} ng/ μ L苹果轮纹病菌DNA。

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，仅所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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 原理

3.1 扩增原理

根据苹果轮纹病菌的ITS序列中特异性序列设计特异性内、外引物及环引物各一对，特异性序列参见附录A。三对引物特异性识别靶标序列上的六个独立区域，利用*Bst*酶启动循环链置换反应，在ITS基因序列启动互补链合成，在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环DNA混合物，加入显色液即可通过颜色变化观察判定结果。

3.2 显色液显色原理

SYBR Green I是一种高灵敏度的DNA荧光染料，可以嵌入方式结合到双链DNA的小沟内。当它与双链DNA结合时，荧光信号是游离状态的800~1 000倍。在不发生扩增反应时，SYBR染料分子的荧光信号不发生改变，颜色显现为橙色；当发生扩增反应时，随着双链DNA的增加，SYBR染料的荧光信号也随之大幅度增强，其信号强度可代表双链DNA分子的数量，同时颜色由橙色变为绿色。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

LAMP: 环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

ITS: 内转录间隔区 (Internal transcribed spacer)

2×Lamp Master Mix: 等温扩增PCR混合液

*Bst*酶: *Bst* DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase)

5 试剂和材料