



中华人民共和国国家标准

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

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

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。

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