



中华人民共和国国家标准

GB/T 31790—2015

马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of Potato spindle tuber viroid

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 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所、中华人民共和国甘肃出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张永江、刘洪义、刘忠梅、辛言言、陈慧、陈红运、马洁、吕典秋、沈建国、廖富荣、文朝慧、张成标、吴兴海。

马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了基于寄主植物症状及基因组特征的马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法。
本标准适用于可能携带有马铃薯纺锤块茎类病毒的马铃薯组织材料的检疫鉴定。

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 18133 马铃薯种薯

SN/T 2481 进境马铃薯种薯检疫操作规程

3 仪器设备、用具及试剂

3.1 仪器设备

电子分析天平(0.001 g)、垂直电泳槽、小型离心机、台式冷冻离心机、普通 PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳系统、pH 计、凝胶成像系统、4 ℃ 冰箱、超净工作台、-80 ℃ 超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、涡旋振荡器、微波炉等。

3.2 用具

可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、20 μ L、100 μ L、1 000 μ L)、吸头、离心管(0.2 mL、0.5 mL、1.5 mL)及研钵等。

3.3 试剂

除有特殊说明外,所有试验用试剂均为分析纯或生化试剂。

R-PAGE 试剂见附录 B;RT-PCR 试剂见附录 C;实时荧光 RT-PCR 试剂见附录 D。

4 检测方法

4.1 样品制备

4.1.1 脱毒苗制样:对脱毒苗要逐株制样,在无菌条件下,从脱毒苗上剪下长 2 cm 的茎段,放于小研钵中,用于提取核酸并进行后续检测;把取样的脱毒苗放回试管中,封好管口并编号,以便根据检测结果决定取舍。

4.1.2 种薯制样:在隔离种植前对种薯块茎进行症状检查,对有明显症状的薯块,直接取症状部位 0.2 g~0.5 g 用于核酸提取并进行后续检测;对于无明显症状的薯块进行隔离种植。

4.1.3 隔离种植植株制样:种薯隔离种植按照 SN/T 2481 的规定执行,生长温度应至少高于 18 ℃(更

适宜的温度是高于 20 ℃)和至少 16 h 的光周期。在生长期进行严格的症状检查,症状参见附录 A。在花期或接近花期时,对可疑症状的植株,每株采取植株顶部完全展开的叶片 0.2 g~0.5 g 单独制样,用于核酸提取并进行后续检测;如果没有发现可疑症状,可 5 株混合采样用于核酸提取并进行后续检测。

4.1.4 田间植株制样:对田间生长的植株作整体观察后,对症状可疑的植株,每株采集症状叶片 0.2 g~0.5 g 单独制样,进行核酸提取并进行后续检测;如果没有发现可疑症状,则按 GB/T 18133 的要求每 5 株混合采样,进行核酸提取并进行后续检测。

4.2 R-PAGE 测定

R-PAGE 测定见附录 B。

4.3 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测见附录 C。

4.4 实时荧光 RT-PCR 检测

实时荧光 RT-PCR 检测见附录 D。

5 结果判定

显症马铃薯样品经 4.2、4.3 及 4.4 中的一种方法检测为阳性,则判定样品携带 PSTVd;无症马铃薯样品经单一方法检测为阳性,需不同原理的检测方法确认一次,两次结果均为阳性,则判定样品携带 PSTVd。

6 样品保存与结果记录

6.1 样品保存

结果判定为阳性的样品应妥善保存,并作好登记和标记,以备复核用。保存期满后,需经灭活处理。

6.2 结果记录

完整的试验记录应包括:样品的来源、种类、时间,试验检测时间、地点、方法和结果,并有试验人员的签字;种薯隔离种植的显症植株应有显症照片;R-PAGE 测定应有银染色结果图片,RT-PCR 检测应有电泳结果图片,实时荧光 RT-PCR 检测应有扩增曲线结果图片。

附录 A

(资料性附录)

马铃薯纺锤块茎类病毒相关资料

A.1 背景资料

A.1.1 马铃薯纺锤块茎类病毒基本信息

学名: *Potato spindle tuber viroid*。

缩写: PSTVd。

异名: Potato pindle tuber virus、Potato gothic virus 和 Tomato bunchy top virus。

分类地位: 马铃薯纺锤块茎类病毒科 (*Pospiuviroidae*), 马铃薯纺锤块茎类病毒属 (*Pospiuviroid*)。

传播途径: 远距离传播主要通过国际间或地区间种薯贸易; 田间可通过机械接触及被感染的农机具等进行传播。

A.1.2 方法原理

根据 PSTVd 在寄主植物上的症状进行初步判定; 根据其 RNA 自然状态和变性后的不同结构分子在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率的差异进行往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (return-polyacrylamide gel electrophoresis, R-PAGE) 检测; 根据其基因组特征进行常规 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测, 通过电泳条带大小或扩增曲线的变化进行结果判定。

A.2 寄主范围

自然寄主有马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、鳄梨 (*Persea americana*)、人参果 (*Solanum muricatum*)、曼陀罗 (*Datura stramonium*)、素馨叶白英 (*Solanum jasminoides*)、蓝花茄 (*S. rantonnetii*)、果酱木 (*Streptosolen jamesonii*) 和灯笼果 (*Physalis peruviana*)。人工接种寄主有 31 属 94 种。

鉴别寄主: 常用的鉴别寄主有鲁特格尔斯番茄 (*Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers) 和莨菪 (*Scopolia sinensis*)。

A.3 地理分布

北美洲: 美国 (堪萨斯、缅因、马里兰、密西根、纽约、威斯康星)、加拿大 (阿尔伯特、哥伦比亚、新布伦斯维克、安大略、爱德华岛、魁北克)。

欧洲: 捷克、法国、德国、匈牙利、荷兰、波兰、斯洛伐克、瑞士、土耳其、英国、苏格兰、前苏联。

南美洲: 阿根廷、乌拉圭、巴西、秘鲁、古巴。

非洲: 南非、尼日利亚。

亚洲: 阿富汗、印度、日本、中国 (河北、黑龙江、江苏)。

大洋洲: 澳大利亚 (新南威尔士、维多利亚)。

A.4 传播途径

被感染的繁殖材料如实生种子及种薯等是远距离传播的主要途径；田间可通过机械接触、汁液接种、农民的衣物、被感染的农机具及切取块茎的切刀等进行传播。咀嚼式昆虫的传播已有报道，但还未定论。当 PSTVd 和马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus*, PLRV) 混合侵染时, PSTVd 可通过蚜虫传播。

A.5 症状特征

PSTVd 侵染马铃薯引起的症状表现与其株系、栽培品种品系及环境条件有关。PSTVd 可以引起植株矮化,茎秆直立僵硬,叶片叶柄与主茎的夹角变小,呈半闭半合状和扭曲,叶片叶柄常呈锐角形态向上竖起。有的全株失去润泽的绿色,有的从上方观察叶子是暗绿色和皱缩的;有的顶部叶片变小、卷曲、耸立,有的感病植株不表现症状(见图 A.1)。块茎变小,畸形,有的顶端变尖,圆形的块茎变长,有的表面开裂,有的芽眼突出,典型的块茎症状为纺锤形或哑铃形(见图 A.2)。

A.6 基因组特征

PSTVd 是一种含 356 个~351 个核苷酸、具有侵染性、无外壳蛋白、高度碱基配对的棒状共价闭环状单链小的 RNA 分子。PSTVd 的 RNA 变性后转变为开环状分子,这种开环状的 RNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率比相同相对分子质量的线状分子要慢得多。

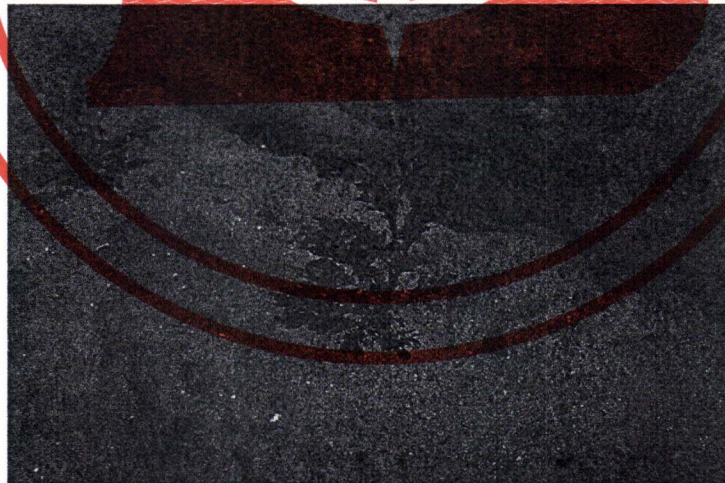


图 A.1 受马铃薯纺锤块茎类病毒侵染的马铃薯植株症状



注：从左向右三个块茎是感染 PSTVd 的症状，表现为纺锤形；最右边的一个块茎是健康对照。

图 A.2 受马铃薯纺锤块茎类病毒侵染的马铃薯块茎症状

注：图 A.1 和图 A.2 引自 EPPO Standards PM 7/33, *Potato spindle tuber pospiviroid*。



附录 B

(规范性附录)

往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法(R-PAGE)

B.1 试剂与材料

以下所用试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

B.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶液(pH 8.0)

称取乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)186.1 g,溶于 700 mL 水中,用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。

B.1.2 水饱和酚(pH 4.0)

B.1.3 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水

在 100 mL 水中,加入焦碳酸二乙酯(DEPC)50 μL ,室温过夜,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

B.1.4 3 mol/L 乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)溶液(pH 5.2)

称取乙酸钠($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)24.6 g,加水 80 mL 溶解,用冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)调 pH 至 5.2,定容至 100 mL。

B.1.5 1 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)

称取三羟基甲基氨基甲烷(Tris)121.1 g,溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

B.1.6 RNA 提取缓冲液

称取三羟基甲基氨基甲烷(Tris)12.12 g,氯化钠(NaCl)5.88 g,乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)3.75 g,加水至 900 mL,溶解后用浓盐酸(HCl)调 pH 至 9~9.5,加水定容至 1 000 mL,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min。

B.1.7 5×三羟基甲基氨基甲烷-硼酸(TBE)电泳缓冲液

称取三羟基甲基氨基甲烷(Tris)27 g,硼酸(H_3BO_3)13.75 g,量取 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 8.0)10 mL,加灭菌双蒸水 400 mL 溶解,定容至 500 mL。

B.1.8 30%胶贮液

称取丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)29 g, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$)1 g,加水定容至 100 mL,过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

B.1.9 10%过硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ 溶液(现用现配)

称取 0.1 g 过硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$,加水定容至 1 mL。

B.1.10 四甲基乙二胺(TEMED)**B.1.11 5%聚丙烯酰胺(PAM)凝胶**

量取 5×TBE 电泳缓冲液 9 mL, 30% 胶贮液 7.6 mL, 四甲基乙二胺(TEMED) 44 μ L, 10% 过硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ 溶液 200 μ L, 加水至 45 mL。

B.1.12 固定液。

量取无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 30 mL 及冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) 3 mL, 加水定容至 300 mL。

B.1.13 染色液

称取硝酸银(AgNO_3) 0.6 g, 加水溶解, 定容至 300 mL。

B.1.14 显色液(现配现用)

在 300 mL 水中, 加入氢氧化钠(NaOH) 3 g 及甲醛(HCHO) 1 mL, 混合均匀。

B.1.15 终止液

称取碳酸钠(Na_2CO_3) 3.7 g, 加水溶解, 定容至 300 mL。

注: 电泳中用到的丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)是神经毒剂, 避免接触皮肤, 操作时要带手套。

B.2 实验步骤**B.2.1 样品 RNA 的提取**

分别称取阴性(健康)对照、阳性(染病)对照及待检样品 0.5 g, 放于灭菌冷冻研钵中, 加入 1 mL RNA 提取缓冲液、1 mL 水饱和酚和 1 mL 三氯甲烷, 充分研磨后倒入 1.5 mL 离心管中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 r/min 离心 15 min, 用移液器小心将上层水相移入另一离心管中。再加入 3 倍体积无水乙醇及 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液后混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1.5 h 以上。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清液, 用 1 mL 70% 乙醇清洗沉淀, 然后离心, 再用吸头彻底吸弃遗留在管中的上清液, 在自然条件下干燥至核酸沉淀变成白色或透明状态, 再将核酸沉淀溶于 30 μ L DEPC 处理水中。 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

注: 可采用等效的 RNA 提取试剂盒完成 RNA 的提取。

B.2.2 电泳**B.2.2.1 正向电泳**

电泳用 5% 聚丙烯酰胺凝胶, 1×Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液, 电泳方向从负极到正极, 电流量为每厘米凝胶 5 mA。点样量为 6 μ L~10 μ L。当二甲苯腈示踪染料迁移到凝胶板底部时停止电泳。

B.2.2.2 反向电泳

将正向电泳缓冲液倒出, 然后把电泳槽放到 70 $^{\circ}\text{C}$ ~80 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中预加热, 样品变性 30 min。同时将倒出的电泳缓冲液在微波炉中加热到 80 $^{\circ}\text{C}$ 。倒入电泳槽中, 变换电极进行反向电泳。当二甲苯腈示踪染料迁移到凝胶板顶部时, 停止电泳, 进行凝胶染色。

B.2.3 染色

B.2.3.1 固定

将电泳胶片放在盛有 300 mL 核酸固定液的容器中,轻缓振荡 10 min 后,倒掉固定液。

B.2.3.2 染色

向容器中加入 300 mL 染色液,轻缓振荡 15 min 后,倒出染色液。用蒸馏水冲洗胶板,反复冲洗 4 次。

B.2.3.3 显色

加入 300 mL 显色液,轻缓振荡,直至显现清晰的核酸带,然后用自来水冲洗,反复冲洗 4 次。

B.2.3.4 终止

将胶板放入 300 mL 终止液中终止反应。

B.3 结果判定

在凝胶板下方四分之一处的核酸带为类病毒核酸带,与上部寄主核酸带之间有一定距离,二者可明显分开。以电泳时载入的阴阳性样品作为对照,进行结果判定:满足前面条件,并出现与阳性对照一致的条带则判定为阳性;没有相应条带出现为阴性。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测方法

C.1 试剂

C.1.1 RNA 提取缓冲液或合格的试剂盒

C.1.2 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242 g、冰乙酸($C_2H_4O_2$) 57.1 mL、乙二胺四乙酸二钠($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) 37.2 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 用时稀释至 1×TAE。

C.2 实验步骤

C.2.1 植物材料总核酸提取

可采用附录 B 或附录 D 提取植物材料总核酸法, 也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

C.2.2 引物合成

上游引物: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3'

下游引物: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3'

C.2.3 cDNA 合成

在样品管中加入 5 μ L 下游引物(4 μ mol/L)及 5 μ L RNA 样品, 混匀, 瞬时离心 5 s; 90 $^{\circ}$ C 温浴 5 min, 完全变性 RNA 和引物; 4 $^{\circ}$ C 瞬时离心 5 s, 把样品管放在冰上或 -20 $^{\circ}$ C 预冷的冰盒上。

在变性过程中, 准备 RT 主要反应液(DEPC 水 1.9 μ L, 反转录酶 II 缓冲液 4 μ L, 0.1 M DTT 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, 25 mmol/L dNTPs 0.8 μ L, 200 U/ μ L 反转录酶 0.8 μ L; 共 10 μ L); 混匀, 瞬时离心, 冰上预冷, 备用。在变性后的样品管中加入 10 μ L RT 主要反应液, 50 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 95 $^{\circ}$ C 温浴 3 min, 破坏 II 型逆转录酶活性, 瞬时离心。PCR 或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

C.2.4 PCR 扩增

每个 cDNA 样品一式两份; 用已知健康、感病的样品的 cDNA 和 DEPC 水分别做阴性对照、阳性对照和空白对照。PCR 反应体系见表 C.1。

反应程序: 94 $^{\circ}$ C 9 min 15 s; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

组 分	体 积/ μ L
DEPC 水	9.57
AmpliTaq 缓冲液(无 $MgCl_2$)	2.2

表 C.1 (续)

组 分	体 积/ μL
MgCl_2 (25 mmol/L)	1.32
dNTPs (1 mmol/L)	4.4
上游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$)	1.1
下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$)	1.1
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.11
cDNA 模板	2.2
总体积	22

C.2.5 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,进行电泳分析。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

C.3 结果判定

C.3.1 阳性对照在 359 bp 左右处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

C.3.2 阳性对照在 359 bp 左右处有扩增片段,阴性对照、空白对照及待测样品无特异性扩增,可判定结果为阴性。

附录 D

(规范性附录)

实时荧光 RT-PCR 检测方法

D.1 试剂

D.1.1 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)提取缓冲液

十六烷基三甲基溴化胺(CTAB) 20 g, 100 mmol/L 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0), 20 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 氯化钠(NaCl) 81.8 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min, 室温储存。

D.1.2 1% 十二烷基磺酸钠(SDS)三羟基甲基氨基甲烷(Tris)乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(SDS-TE)缓冲液

10 mmol/L 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0), 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1% 十二烷基磺酸钠(SDS)。

D.2 试验步骤

D.2.1 核酸提取

称取 100 mg~200 mg 样品组织于研钵中, 液氮研磨后加 1 mL~2 mL CTAB 提取缓冲液(现用现加上新的 1% Na_2SO_3 , 2% PVP-40)。将汁液移到 1.5 mL 离心管中, 65 °C 温浴 30 min; 室温 13 000 r/min 离心 5 min。取 700 μL 上清液, 加 700 μL 三氯甲烷: 乙酸异戊酯(24:1), 颠倒混匀; 13 000 r/min 离心 5 min。取 500 μL 上清液, 加 500 μL 三氯甲烷: 乙酸异戊酯(24:1), 颠倒混匀; 13 000 r/min 离心 5 min。取上清液, 加 0.5 倍体积的 5 mol/L NaCl 和等体积预冷的异丙醇, 混匀, -20 °C 过夜; 13 000 r/min 离心 10 min, 沉淀核酸。用 200 μL 1% SDS TE 缓冲液悬浮沉淀; 加 100 μL 5 mol/L NaCl 和 300 μL 预冷异丙醇, 混匀, -20 °C 放置 30 min; 13 000 r/min 离心 10 min; 用 400 μL 乙醇洗沉淀, 离心 4 min; 留沉淀, 干燥; 用 100 μL DEPC 水重悬沉淀, -20 °C 保存。

D.2.2 引物探针合成

PSTVd-231F: 5'-GCC CCC TTT GCG CTG T-3'

PSTVd-296R: 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3'

PSTVd-251T: 5'-FAM-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-TAMRA-3'

D.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应

取两个离心管, 分别配制第一阶段主要混合液(7.5 $\mu\text{mol/L}$ PSTV-296R 1.0 μL , DEPC 水 3.0 μL) 和第二阶段主要混合液(见表 D.1)。每个反应一式两份, 一个 RNA 阳性对照, 一个空白对照, 一个无感染 RNA 阴性对照。按上面规定的顺序和数量加试剂, 冰浴。准备 0.2 mL PCR 管。向每个管里加 1 μL 总 RNA 或对照材料, 加 4 μL 第一阶段的反应液, 把管放到 PCR 仪上。反应程序: 95 °C 3 min, 1 个循环; 离心管 4 °C 冷却 5 min~10 min; 同时向荧光 PCR 管加 20 μL 第二阶段的反应液; 变性完成

后,吸取第一个反应阶段的混合液加到相应的第二阶段混合液管内,确保这个混合液分散到每个管的底部;将荧光 PCR 管放到实时荧光 PCR 仪中。

反应程序:48 ℃ 30 min;95 ℃,10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。

表 D.1 实时荧光 PCR 反应体系

组 分	加 样 量/ μL
10×PE TaqGold 缓冲液 A	2.5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	5.5
dNTPs (6.25 mmol/L)	2.0
PSTV-231F (7.5 mmol/L)	1.0
PSTV-251T (7.5 mmol/L)	0.5
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.125
M-MLV Rtase (200 $\mu\text{mol/L}$)	0.05
灭菌 DEPC 水	8.325
总体积	20

D.3 结果判定

D.3.1 基线的设置

实时荧光 RT-PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。基线范围选择在 3 个~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。

D.3.2 结果的判定

在空白对照及阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线、阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现典型扩增曲线的条件下:

- 待测样品的 Ct 值 ≥ 40 时,判定 PSTVd 阴性。
- 待测样品的 Ct 值 ≤ 35 时,判定 PSTVd 阳性。
- 待测样品的 $35 \leq \text{Ct 值} \leq 40$ 时,应重新进行测试;如果重新测试的 Ct 值 ≥ 40 时,判定 PSTVd 阴性;如果重新测试的 Ct 值 < 40 ,则判定 PSTVd 阳性。