



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3437—2012

马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of potato spindle tuber viroid

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：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、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所。

本标准主要起草人：刘洪义、刘忠梅、陈红运、吕典秋、邱彩玲、张洪祥、王振华、杨立群、刘尚武。

马铃薯纺锤块茎类病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯纺锤块茎类病毒(potato spindle tuber viroid)的检疫鉴定方法。

本标准适用于检测可能带有马铃薯纺锤块茎类病毒的马铃薯脱毒苗、试管苗、种薯、商品薯、大田中生长的马铃薯及收获后的块茎、番茄、鳄梨、人参果等其他寄主。

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

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 原理

3.1 马铃薯纺锤块茎类病毒基本信息

种名:potato spindle tuber viroid

缩写:PSTVd

异名:potato spindle tuber virus,potato gothic virus,tomato bunchy top virus。

分类:马铃薯纺锤块茎类病毒科(family pospiviroidae),马铃薯纺锤块茎类病毒属(Genus Pospivir-oid)。

马铃薯纺锤块茎类病毒的其他信息参见附录 A。

3.2 检疫鉴定依据

PSTVd 的基因组特征和在寄主植物上的症状特征是检疫鉴定的依据。PSTVd 是一种具有侵染性、无外壳蛋白、高度碱基配对的棒状共价闭合环状单链小的 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。依据基因组特征建立往返聚丙烯酰胺凝胶电泳(Return-Polyacrylamide Gel Electrophoresis,R-PAGE)、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR(Real-time PCR)检测方法,这些方法结合寄主植物症状的有无和症状特征(参见附录 A),判断样品是否带有 PSTVd。

4 仪器设备、用具及试剂

4.1 仪器设备

PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、垂直电泳槽、小型离心机、台式冷冻离心机、水浴锅、凝胶成像系统、制冰机、冷藏冷冻冰箱、电子天平、涡旋振荡器、烘箱等。

4.2 用具

可调移液器(0.1 μL ~2.5 μL , 2 μL ~20 μL , 10 μL ~100 μL , 20 μL ~200 μL , 100 μL ~1 000 μL)和可调移液器头、离心管、研钵、微型磨杵。

4.3 试剂

主要试剂见附录 B、附录 C、附录 D。

5 检疫鉴定

5.1 检测方法的选择及检测鉴定的流程

本标准采用 RT-PCR、实时荧光 RT-PCR(Real-time PCR)、往返聚丙烯酰胺凝胶电泳(Return-Polyacrylamide Gel Electrophoresis,R-PAGE)检测方法。检测流程见图 1、图 2。

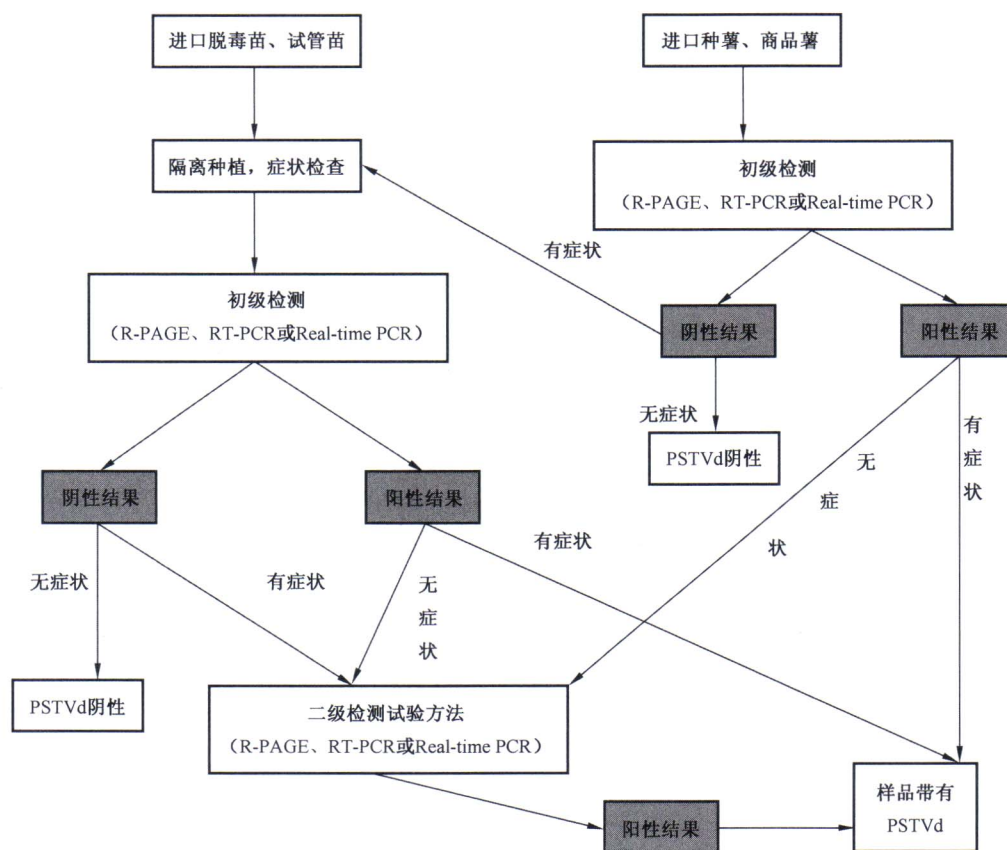


图 1 进口马铃薯种薯、商品薯、脱毒苗和试管苗系统检测确认 PSTVd 存在与否的判定方案

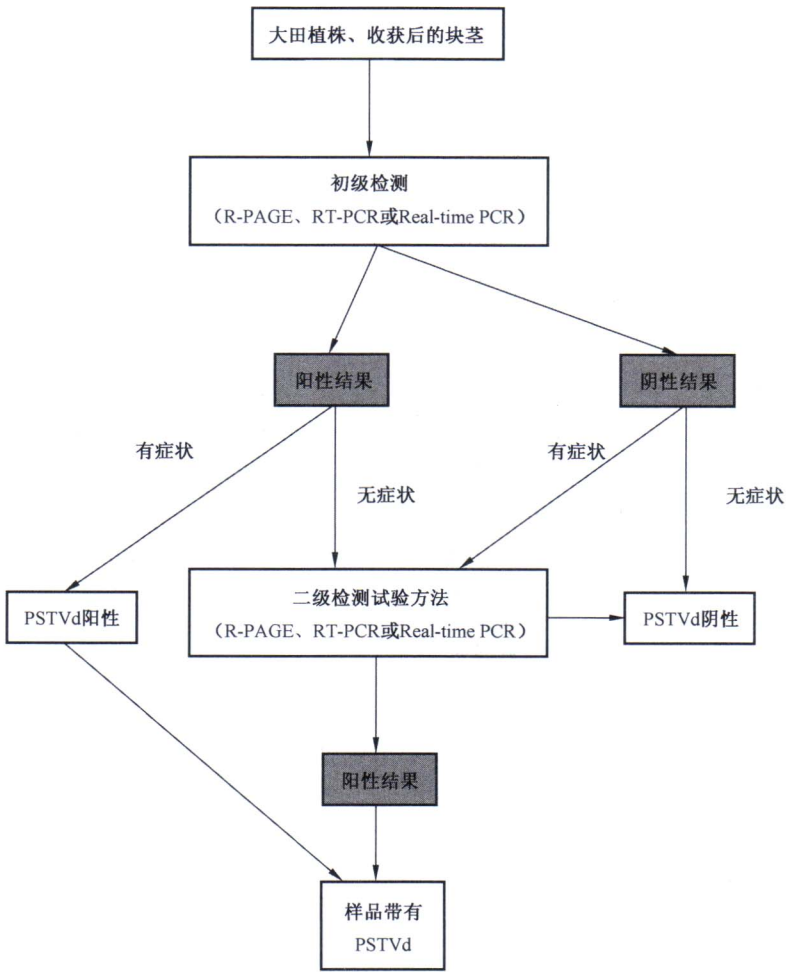


图 2 收获后的块茎或收获前大田植株系统检测确认 PSTVd 存在与否的判定方案

5.2 隔离种植及症状检查

所有进境的脱毒苗、种苗等各类可繁殖的马铃薯材料都需要按有关要求隔离种植,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。仔细检查马铃薯植株是否有可疑症状,在花期或接近花期时,采集有可疑症状的植株叶片,进行室内检测,如果没有发现任何可疑症状,可随机取样。对于进境的种薯可在隔离种植前对块茎进行症状检查,并取样,取样标准按照 SN/T 2122 的规定执行。按流程做室内检测。对于产地检疫,可在花期或接近花期的生产田调查采样,也可采集收获后的薯块样品。症状检查可参见附录 A。

5.3 往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

分别提取样品和对照的总 RNA,进行往返聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,健康的植物组织作阴性对照,感染 PSTVd 的植物组织作阳性对照,用 DEPC 水作空白对照。
方法见附录 B。

5.4 RT-PCR 检测

分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。健康的植物组织作阴性对照,感染 PSTVd 的植物组织作阳性对照,用 DEPC 水作空白对照。

SN/T 3437—2012

具体操作见附录 C。

5.5 实时荧光 RT-PCR 检测

分别提取样品和对照的总 RNA,进行实时荧光 RT-PCR 检测。健康的植物组织作阴性对照,感染 PSTVd 的植物组织作阳性对照,用 DEPC 水作空白对照。

具体操作见附录 D。

6 结果判定

6.1 脱毒苗与试管苗在隔离种植期间观察到可疑症状植株,经 5.3、5.4、5.5 中的任一种方法检测为阳性,则判断样品带有 PSTVd;生长期无症状植株样品,经单一方法检测结果为阳性,需不同方法再确认一次,两次结果都为阳性,则判断样品带有 PSTVd。

6.2 大田植株和收获后的块茎不需隔离种植,检测结果判断方法相同。

6.3 针对番茄、鳄梨、人参果等其他寄主的结果判定,需对阳性 RT-PCR 产物进行序列测定,并和已知 PSTVd 株系的序列比对,序列和已知株系一致时,则判断样品带有 PSTVd。

7 样品保存

7.1 结果记录与资料保存

完整的实验记录要包括:样品的来源、种类、时间、实验检测时间、地点、方法和结果,并有实验人员的签字;往返聚丙烯酰胺凝胶电泳银染色结果图片、RT-PCR 检测电泳结果图片、实时荧光 RT-PCR 检测结果图片。

7.2 样品保存

样品直接放于 -80°C 冰箱或冷冻干燥后放于 -80°C 冰箱保存 1 年,保存的样品要做好标记和登记工作,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经灭活处理。

附 录 A

(资料性附录)

马铃薯纺锤块茎类病毒相关资料

A.1 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(*Brugmansia* sp)、素馨叶白英(*Solanum jasminoides*)、蓝花茄(*S. rantonnetii*)、果酱木(*Streptosolen jamesonii*)和灯笼果(*Physalis peruviana*)。人工接种寄主比较广泛,能感染 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.2 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.3 传播途径

PSTVd 可以通过机械接触、汁液接种及被感染的农机具、农民的衣物进行传播。此外,采用块茎生产繁殖时,如果切取块茎的切刀被污染也可传播该类病毒。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 leaf roll virus, PLRV)混合侵染时,PSTVd 可通过蚜虫传播。实生种子也是传播该类病毒的主要途径。远距离传播主要通过国际间或地区间种薯贸易。

A.4 基因组特征

PSTVd 是一种具有侵染性、无外壳蛋白、高度碱基配对的棒状共价闭合环状单链小的 RNA 分子。PSTVd 的 RNA 变性后转变为开环状分子,这种环状的 RNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率比相同分子量的线状分子要慢得多。PSTVd 通常含有 359 个核苷酸,偶尔有 358 或 360 个核苷酸。在一种野生的茄属和西红柿中发现含 356 个核苷酸的 PSTVd,在人参果中有 356 和 357 个核苷酸的 PSTVd,各分离物在同源性上差异很小。

A.5 寄主症状

PSTVd 侵染马铃薯引起的症状表现与类病毒株系、栽培品种品系及环境条件有关,PSTVd 可以引

SN/T 3437—2012

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、图 A. 3、图 A. 4)。



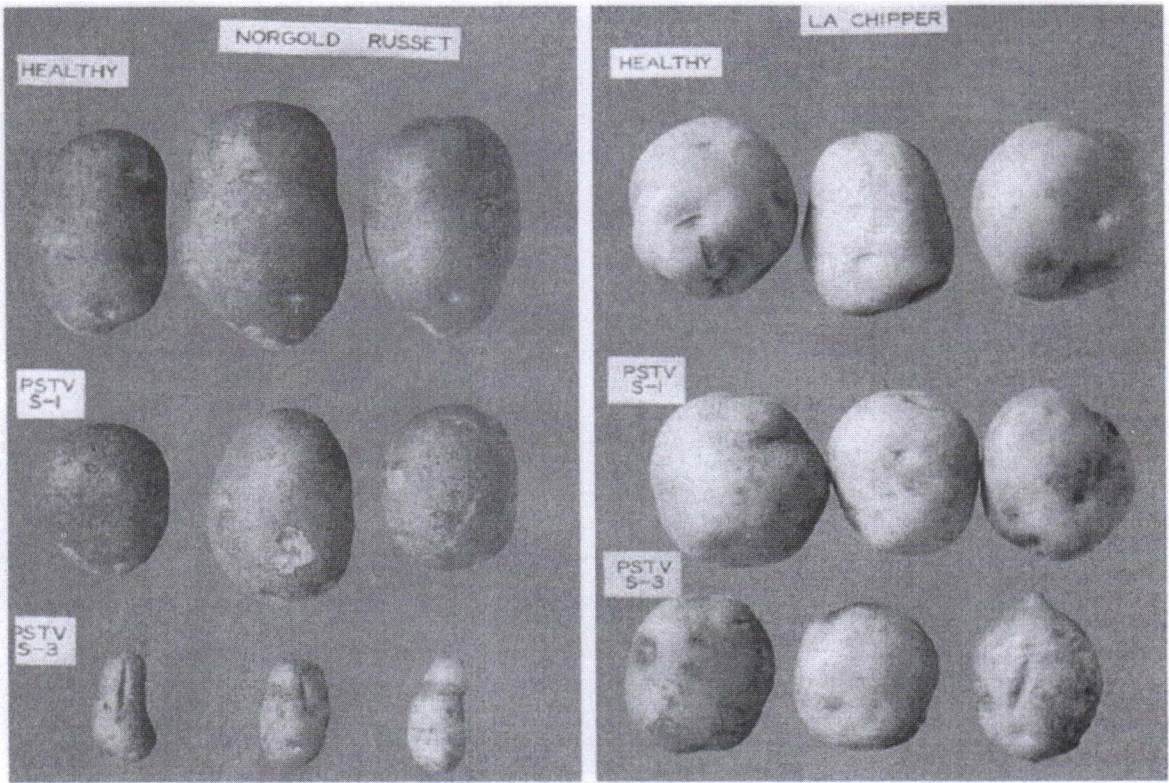
注: 感病植株症状表现为束顶,叶片失绿变黄,植株僵硬。

图 A. 1 感染 PSTVd 马铃薯植株症状(中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局提供)



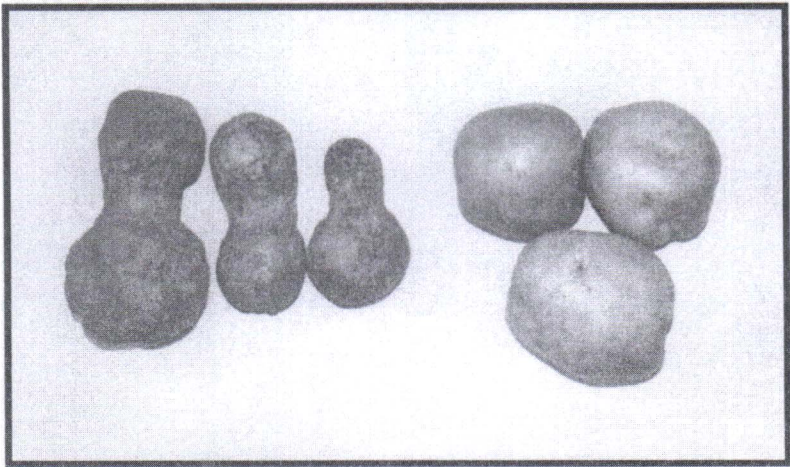
注: 从左向右三个块茎是感染 PSTVd 的症状,表现为纺锤形;最右边的一个块茎是健康对照。

图 A. 2 感染 PSTVd 的马铃薯块茎
(引自 EPPO Standards PM 7/33. potato spindle tuber pospiviroid)



注：感病的块茎症状表现为纺锤形、畸形、龟裂。

图 A.3 感染 PSTVd 的马铃薯块茎
(引自 EPPO Standards PM 7/33. potato spindle tuber pospiviroid)



注：左边为感染 PSTVd 的块茎，表现症状为龟裂、纺锤形、畸形，右边为健康块茎。

图 A.4 感染 PSTVd 的马铃薯块茎(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供)

附 录 B

(规范性附录)

往返聚丙烯酰胺凝胶电泳法

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 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)

称取乙二胺四乙酸二钠 186.1 g,溶于 700 mL 水中,用氢氧化钠调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。

B.1.2 水饱和酚(pH4.0)

B.1.3 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水

在 100 mL 水中,加入 DEPC 50 μ L,室温过夜,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min,分装到 1.5 mL DEPC 处理过的微量管中。

B.1.4 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2)

称取三水合乙酸钠 24.6 g,加水 80 mL 溶解,用冰乙酸调 pH 至 5.2,定容至 100 mL。

B.1.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)溶液(pH8.0)

称取 Tris 碱 121.1 g,溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。

B.1.6 RNA 提取缓冲液

称取 Tris 碱 12.12 g,氯化钠 5.88 g,乙二胺四乙酸二钠 3.75 g,加水至 900 mL,溶解,用浓盐酸调 pH 至 9~9.5,加水定容至 1 000 mL,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。

B.1.7 5 \times Tris-硼酸(TBE)电泳缓冲液

称取 Tris 碱 27 g,硼酸 13.75 g,量取 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0)10 mL,加灭菌双蒸水 400 mL 溶解,定容至 500 mL。

B.1.8 加样缓冲液

分别称取聚蔗糖 25 g,溴酚蓝 0.1 g,二甲苯青 0.1 g,加水至 100 mL。

B.1.9 30%胶贮液

称取丙烯酰胺 29 g, N,N' -亚甲基双丙烯酰胺 1 g,加水定容至 100 mL,过滤,4 $^{\circ}$ C 储存。

B.1.10 10%过硫酸铵溶液(现用现配)

称取 0.1 g 过硫酸铵,加蒸馏水定容至 1 mL。

B. 1. 11 四甲基乙二胺(TEMED)**B. 1. 12 5%聚丙烯酰胺凝胶**

量取 5×Tris-硼酸(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%过硫酸铵溶液 200 μ L, 加水至 45 mL。

B. 1. 13 固定液

量取无水乙醇 30 mL, 冰乙酸 3 mL, 加水定容至 300 mL。

B. 1. 14 染色液

称取硝酸银 0.6 g, 加水溶解, 定容至 300 mL。

B. 1. 15 显色液(现配现用)

在 300 mL 水中, 加入氢氧化钠 3 g, 甲醛 1 mL, 混合均匀。

B. 1. 16 终止液

称取碳酸钠 3.7 g, 加水溶解, 定容至 300 mL。

注: 电泳中用到的丙烯酰胺是神经毒剂, 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****B. 2. 1. 1 RNA 的抽提**

称取 0.5 g 样品, 放于灭菌预冷的小研钵中, 分别加入 1 mL RNA 提取缓冲液、1 mL 水饱和酚(pH4.0)和 1 mL 三氯甲烷, 充分研磨后倒入 1.5 mL 离心管中, 于 4℃下 10 000 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。也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

B. 2. 1. 2 RNA 的沉淀

在 RNA 抽提液中, 加入 3 倍体积预冷无水乙醇, 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2), 混匀, -20℃沉淀 1.5 h 以上。

B. 2. 1. 3 RNA 的溶解

取出冷冻保存的 RNA 沉淀, 于 4℃下 10 000 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 水中。-20℃贮存, 备用。

注: 或者选择市售商品化 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。当二甲苯青示踪染料迁移到凝胶板中部时停止电泳。

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℃~80℃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℃。倒入电泳槽中,变换电极进行反向电泳。当三甲苯青示踪染料迁移到凝胶板中部时,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,反复冲洗四次。

B.2.3.3 显色

加入 300 mL 核酸显色液,轻缓振荡,直至显现清晰的核酸带,然后用自来水冲洗,反复冲洗四次。

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(pH8.0):称取 242 g Tris,37.23 g 乙二胺四乙酸二钠,加入 57.1 mL 冰醋酸,定容至 1 L。

C.1.3 6×上样缓冲液:0.25%(质量浓度)溴酚蓝,40%(质量浓度)蔗糖溶解在 1×的 TAE 缓冲液中。

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

PSTVd PCR 的引物:

下游引物:5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3'

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

RT 反应的内部对照引物:

下游引物:5'-TAA GAT CAT AGA AGC AAT GCT GC-3'

上游引物:5'-AAG ATC ACT GCA GTT CCT TTT C-3'

C.2.3 RT-PCR

C.2.3.1 变性

吸取 5 μL 4 μmol/L PSTVd 下游引物或内部对照下游引物放到管内,加入 5 μL RNA 样品(小心避免污染),混匀,瞬时离心 5 s;90 °C 温浴 5 min,完全变性 RNA 和引物;4 °C 瞬时离心 5 s,把样品管放在冰上或-20 °C 预冷的冰盒上。

C.2.3.2 RT-反应

在变性过程中,准备 RT 主要反应液(DEPC 水 1.9 μL;反转录酶 II 缓冲液 4 μL;0.1 M DTT 2 μL;RNA 酶抑制剂 0.5 μL;25 mM dNTPs 0.8 μL;200 U/μL 反转录酶 0.8 μL;共 10 μL);混匀,瞬时离心,冰上预冷,备用。在变性后的样品管中加入 10 μL RT 主要反应液,50 °C 温浴 1 h(在此温度下能保证类病毒 RNA 处于开环状态),95 °C 温浴 3 min,破坏 II 型逆转录酶活性,瞬时离心。PCR 或-20 °C 保存备用。

C.2.4 PCR 反应

每个 cDNA 样品一式两份和至少一个对照。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。PCR 反应程序如下:94 °C 9 min 15 s;94 °C

45 s, 62 °C 45 s, 72 °C 60 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。

表 C.1 PCR 反应体系

组 分	体 积 μL
DEPC 水	9.57
AmpliTa q 缓冲液(无 MgCl_2)	2.2
25 mmol/L MgCl_2	1.32
1 mmol/L dNTPs	4.4
上游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)	1.1
下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)	1.1
AmpliTa q 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

C.2.5.1 制备 1.5%(质量浓度)的凝胶,称琼脂糖,并倒入适当体积 $1\times$ 浓度的 TAE 缓冲液。溶解琼脂糖,冷却 55 °C~60 °C,把胶溶液倒入凝胶槽里,插上梳子。待胶完全凝聚后,轻轻拔掉梳子。

C.2.5.2 每个 PCR 样品取 5 μL ,加 1 μL $6\times$ 上样缓冲液,混匀。取样品混合液和合适的 DNA 相对分子质量标准加到琼脂糖胶孔里。

C.2.5.3 在 120 V 下电泳,直到标记染料移动了 6 cm。取出凝胶。

C.2.5.4 用含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭溶液染色,约 10 min,再用清水漂洗 10 min。(也可用其他的 DNA 荧光染料)

C.2.5.5 将整个胶置于凝胶成像系统上观察,并拍照,保留照片结果。

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,内部对照出现特有的条带(194 bp),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 阴性对照和空白对照无特异性扩增,内部对照和阳性对照分别出现其特有的条带,并且待测样品在 359 bp 左右处无扩增条带,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 CTAB 提取缓冲液**

CTAB 20 g, 100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 20 mmol/L EDTA, 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% SDS

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS。

D.1.3 TE 缓冲溶液

10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA。

D.2 实验步骤**D.2.1 核酸提取**

D.2.1.1 提取的样品包括调查的、RNA 阴性和阳性对照样品。放 100 mg~200 mg 组织于研钵中, 液氮研磨。直到组织形成光滑粘稠状物。加 1 mL~2 mL CTAB 提取缓冲液(现用现加上新的 1% Na_2SO_3 , 2% PVR-40), 研磨。

D.2.1.2 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。

D.2.1.3 取 700 μL 上清液, 加 700 μL 三氯甲烷: 乙酸异戊酯(IAA)24:1, 颠倒混匀; 13 000 r/min, 离心 5 min。

D.2.1.4 取 500 μL 上清液, 加 500 μL 三氯甲烷: 乙酸异戊酯(IAA)24:1, 颠倒混匀; 13 000 r/min, 离心 5 min。

D.2.1.5 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。

D.2.1.6 用 200 μL 含有 1% SDS(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 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.2.1.7 也可采用等效的试剂盒提取总 RNA。

D.2.2 引物合成

PSTV-231F(Forward primer): 5'-GCC CCC TTT GCG CTG T-3'

PSTV-296R(Reverse primer): 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3'

PSTV-251T(Probe): 5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3'

探针 5'端含有 FAM 报告荧光染料, 3'端含有淬灭基团 TAMRA。

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 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物 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 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,1 个循环;离心管 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$,10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,45 循环。

表 D.1 第二阶段主要混合液

组 分	体 积 μL
10 \times PE <i>Taq</i> Gold 缓冲液 A	2.5
25 mmol/L MgCl_2	5.5
6.25 mmol/L dNTPs	2.0
7.5 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	1.0
<i>Taq</i> Man probe(FAM labelled)	0.5
MMLV <i>Rtase</i>	0.05
Ampli <i>Taq</i> Gold DNA Polymerase	0.125
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 3~15 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 检测结果的判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照正确的前提下:

检测样品的 Ct 值小于 35,且出现特定的扩增曲线,判定结果为阳性。Ct 值介于 35 与 40 之间时为疑似阳性,需要重新进行测试,或采用其他方法进行验证。

检测样品的 Ct 值大于 40,或未出现特定的扩增曲线,判定结果为阴性。