



# 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

与淬灭剂分离,所发出的荧光不再为淬灭剂所吸收而被检测仪所接受。随着扩增循环数的增加,释放出来的荧光基团不断积累。因此荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。

## 5 甘蔗黄叶病毒基本信息

### 5.1 病毒粒子形态特征

甘蔗黄叶病毒粒子为二十面对称体,直径 24 nm~29 nm,浮力密度 1.30 g/cm<sup>3</sup>,由蛋白质外壳及其包裹着的一条单链、正义的 RNA (ssRNA)构成,病毒基因组大小约 6 kb。

### 5.2 寄主范围

自然寄主为甘蔗属中的热带种(*Saccharum officinarum*)、大茎野生种(*Saccharum robustum*)、中国种(*Saccharum sinensis*)和割手密(*Saccharum spontaneum*)。

实验寄主包括蔗茅属(*Erianthus sp.*)、小麦、燕麦、大麦、水稻、玉米和高粱等。

在寄主植株内的分布主要局限于组织韧皮部内。

### 5.3 寄主症状

田间病症表现为甘蔗叶片中脉黄化,并向两侧扩展,中脉下表皮为鲜黄色,上表皮仍是正常的白色或绿白色,有的染病品种叶片中脉两侧出现红褐色。染病植株叶片从叶尖开始干枯坏死,并向下扩展,严重感病植株叶片发黄、坏死。由甘蔗黄叶病毒引起的这种病害称为甘蔗黄叶病(Sugarcane yellow leaf disease),早期称为甘蔗黄叶综合症(sugarcane yellow leaf syndrome)。

### 5.4 分布地区

甘蔗黄叶病 1989 年首次发生在美国夏威夷,随后陆续在美国的佛罗里达州、德克萨斯州、路易斯安那州以及巴西、澳大利亚、南非、中国、印度等 30 多个国家和地区出现并不断蔓延扩大。

### 5.5 传播途径

由甘蔗蚜虫(*Melanaphis sacchari*)、甘蔗绵蚜(*Ceratovacuna lanigera*)、玉米叶蚜(*Rhopalosiphum maidis*)和水稻根际蚜虫(*Rhopalosiphum rufiabdominalis*)传播,也可由感病的种茎传播,但不能通过种子、机械摩擦方式传播。

## 6 病毒的分类信息

国际病毒分类委员会(ICTV)第 8 次报告将甘蔗黄叶病毒列入黄症病毒科(Luteoviridae)马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)中成员,英文名称为 sugarcane yellow leaf virus,缩写为 SCYL.V。

## 7 仪器与设备

7.1 实时荧光 PCR 检测系统。

7.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

7.3 电子天平,感量 0.01 g。

7.4 高速台式冷冻离心机;离心力 12 000 g 以上。

- 7.5 微量加样器:0.1  $\mu\text{L}$ ~2.5  $\mu\text{L}$ ,0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ ,5  $\mu\text{L}$ ~20 $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ,100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。
- 7.6 无 RNA 酶的离心管、PCR 反应管、Tip 头、实时荧光 PCR 反应管。
- 7.7 恒温水浴锅。
- 7.8 鼓风干燥箱。
- 7.9 冰箱:2  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$ , -20  $^{\circ}\text{C}$ , -80  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 8 试剂与材料

### 8.1 试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯或生化试剂;所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

- 8.1.1 三氯甲烷。
- 8.1.2 异丙醇。
- 8.1.3 75%乙醇<sup>1)</sup>。
- 8.1.4 无 RNase 水及双蒸水。
- 8.1.5 裂解液:主要成分为异硫氰酸胍和苯酚,为 RNA 提取试剂。
- 8.1.6 5 $\times$ 反转录反应混合液:含 5 $\times$ 反转录反应缓冲液、dNTPs、RNase 抑制剂、M-MLV 反转录酶,具体配制方法参见附录 A。
- 8.1.7 检测引物  
5'-引物:5'-TTCAGTATAACTCATGCTCCTCCG-3'  
3'-引物:5'-ACTTTCTTGGCGTTCCTCTTG-3'  
扩增片段大小为 130 bp。
- 8.1.8 TaqMan 探针:5'-FAM-CGCAACTCCAGGTGCAATCGC-TAMRA-3'。
- 8.1.9 含有 EX Taq 荧光 PCR 反应混合液  
含有 2 $\times$ EX Taq 荧光 PCR 反应液、5'-引物、3'-引物、Taq Man 探针,具体配制方法参见附录 A。

### 8.2 材料

- 8.2.1 阳性对照:用已知含甘蔗黄叶病毒的样品作阳性对照。
- 8.2.2 阴性对照:用已知不含甘蔗黄叶病毒的样品作阴性对照。

## 9 样品的采集与前处理

### 9.1 取样工具

砍刀、剪刀、镊子等取样工具应经 121  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$ 、1.1 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 15 min 或经 160  $^{\circ}\text{C}$  干烤 2 h。

### 9.2 采样方法

- 9.2.1 采样过程中应避免样本交叉污染,采样及样品前处理过程中应戴一次性手套。
- 9.2.2 叶片样品:取甘蔗植株或种苗最高可见肥厚带叶上一叶(—1叶)叶片,编号备用。

1) 用无 RNase 水配制。

9.2.3 蔗茎样品:取甘蔗植株可见肥厚带叶下两叶(+3叶)对应的蔗茎,若为甘蔗蔗种,取中部种茎,编号备用。

9.3 存放与运送

采集或处理的样本在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,要求放置-80℃冰箱,但应避免反复冻融。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,或用液氮处理,尽快运送到实验室。

10 操作方法

10.1 总 RNA 的提取

- 10.1.1 取 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管,并对每个管进行编号。
- 10.1.2 称取 0.2 g 样品材料(蔗茎样品要去除表皮),并用液氮研磨成粉末状(要保持液氮不挥发干净)。
- 10.1.3 向 1.5 mL 离心管中加入粉末,等液氮刚挥发完立即加入 1 mL 裂解液,盖上管盖,振荡混匀,于 4℃、12 000 g 离心 10 min。
- 10.1.4 吸取上清液至另一新的离心管中,加入 0.2 mL 三氯甲烷,盖住管盖,剧烈振荡混匀约 15 s,室温静置 3 min 后,于 4℃、12 000 g 离心 15 min。
- 10.1.5 吸取上清液至另一新的离心管中,加入 0.5 mL 预冷的异丙醇(-20℃),颠倒混匀,室温静置 10 min 后,于 4℃、12 000 g 离心 15 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。
- 10.1.6 小心倒出离心管中上清液,加入 1 mL 75%预冷的乙醇(-20℃)洗涤,颠倒离心管 2 次~3 次,7 500 g 离心 5 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。重复洗涤沉淀 1 次。
- 10.1.7 小心倒出离心管中上清液,用微量加样器将其吸干,一份样本换一个吸头,吸头不要碰到有沉淀的一面,室温干燥 10 min~15 min。
- 10.1.8 加入 50 μL 无 RNase 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 g 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增;若需长期保存,应放置-80℃冰箱。
- 10.1.9 取 5 μL RNA 溶液加无 RNase 水稀释至 1 mL,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计上测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ 。RNA 浓度按式(1)计算:

$$c = A \times N \times 40 / 1\ 000 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- c ——RNA 浓度,单位为微克每微升( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ );
- A ——260 nm 处的吸光值;
- N ——RNA 稀释倍数。

当  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间时,适合于实时荧光 RT-PCR 扩增。

10.2 反转录

- 10.2.1 取 1.0 μL RNA(约 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、1.0 μL 反转录引物(3'-引物)和 8.0 μL DEPC 水加入到无 RNase 的 PCR 管中,70℃15 min。
- 10.2.2 冰浴 2 min。
- 10.2.3 加入反转录反应混合液,每个测试样本反转录反应混合液配制参见表 A.1。轻微混匀,500 g 离心 30 s,42℃1 h,75℃8 min。反应结束后,可以直接进行实时荧光 PCR 检测,或者放于-20℃保存备用。

### 10.3 实时荧光 PCR 反应

10.3.1 荧光 PCR 扩增试剂准备与配制。从试剂盒中取出含有 *EX Taq* 荧光 PCR 反应液,在冰上融化后,2 000 *g* 离心 5 s。每个测试样本反应混合液配制参见表 A.2。

10.3.2 根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量,全部加完后,充分混合均匀,2 000 *g* 离心 5 s。向每个实时荧光 PCR 管中各分装 24.0  $\mu\text{L}$ 。

10.3.3 在各设定的实时荧光 PCR 管中分别加入 10.2.3 中反转录产物各 1.0  $\mu\text{L}$ (cDNA 约 10 ng~100 ng),盖紧管盖后,轻微混匀,500 *g* 离心 30 s。

10.3.4 将 10.3.3 中加样后的实时荧光 PCR 反应管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。实时荧光 PCR 反应条件随不同仪器略有改变,一般的反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,1 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环,在每次循环的延伸阶段收集荧光。

## 11 结果判断与表述

### 11.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准。或可根据仪器噪音情况进行调整。

### 11.2 对照结果

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含甘蔗黄叶病毒的样品作阳性对照,用已知不含甘蔗黄叶病毒的样品作阴性对照,用等体积的无 RNase 水代替模板 RNA 作空白对照。

空白对照:无 Ct 值且无扩增曲线。

阴性对照:无 Ct 值且无扩增曲线。

阳性对照的 Ct 值应 $\leq$ 30.0,并出现典型的扩增曲线。否则,此次实验视为无效。

### 11.3 检测结果的判定

#### 11.3.1 阴性

无 Ct 值且无扩增曲线,表示样品中不含甘蔗黄叶病毒。

#### 11.3.2 阳性

Ct 值 $\leq$ 35.0,且出现典型的扩增曲线,表示样本中含甘蔗黄叶病毒。

#### 11.3.3 有效原则

Ct 值 $>$ 35.0 的样本应重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。

### 11.4 结果表述

该试样中检出甘蔗黄叶病毒。

该试样中未检出甘蔗黄叶病毒。

附 录 A  
(资料性附录)

甘蔗黄叶病毒反转录反应与实时荧光 PCR 扩增反应混合液配制

表 A.1 每个测试样本反转录反应混合液配制的组分及使用量

| 试 剂   | 使用量                | 25 $\mu\text{L}$ 反应体系终浓度 |
|---|--------------------|--------------------------|
| 5 $\times$ 反转录反应缓冲液( $\text{Mg}^{2+}$ Plus) | 5.0 $\mu\text{L}$  | 1 $\times$               |
| 10 mmol/L dNTPs                             | 1.0 $\mu\text{L}$  | 0.4 mmol/L               |
| 10 U/ $\mu\text{L}$ RNase 抑制剂               | 0.5 $\mu\text{L}$  | 5 U/25 $\mu\text{L}$     |
| 200 U/ $\mu\text{L}$ M-MLV 反转录酶             | 1.0 $\mu\text{L}$  | 200 U/25 $\mu\text{L}$   |
| 无 RNase 水                                   | 7.5 $\mu\text{L}$  |                          |
| 总体积   | 15.0 $\mu\text{L}$ |                          |

表 A.2 每个测试样本荧光 PCR 扩增反应混合液配制的组分及使用量

| 试 剂                                   | 使用量                | 25 $\mu\text{L}$ 反应体系终浓度            |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 2 $\times$ 荧光 PCR 反应液(含 <i>Taq</i> 酶) | 12.5 $\mu\text{L}$ | 1 $\times$                          |
| 5'-引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )          | 1.0 $\mu\text{L}$  | 0.4 $\mu\text{mol/L}$               |
| 3'-引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )          | 1.0 $\mu\text{L}$  | 0.4 $\mu\text{mol/L}$               |
| 荧光探针(10 $\mu\text{mol/L}$ )           | 1.0 $\mu\text{L}$  | 0.4 $\mu\text{mol/L}$ <sup>2)</sup> |
| 双蒸水                                   | 8.5 $\mu\text{L}$  |                                     |
| 总体积                                   | 24.0 $\mu\text{L}$ |                                     |

- 2) 探针浓度与使用的实时荧光 PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关,实际使用时请参照仪器说明书,或各荧光探针的具体使用要求进行。