

# DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 3455—2023

## 分蘖洋葱中洋葱黄矮病毒检测 实时荧光 PCR 法

Detection of onion yellow dwarf virus by real-time PCR on Shallot

地方标准信息服务平台

2023 - 02 - 27 发布

2023 - 03 - 27 实施

吉林省市场监督管理厅

发布



## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》和GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》的规定起草。

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

本文件由吉林省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：吉林省农业科学院。

本文件主要起草人：李小宇、张春雨、王海鹏、王永志、苏颖、李建平、张金花、杨阳、于红。

地方标准信息服务平台



# 分蘖洋葱中洋葱黄矮病毒检测 实时荧光 PCR 法

警告—使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

## 1 范围

本文件描述了分蘖洋葱中洋葱黄矮病毒实时荧光 PCR 检测方法。  
本文件适用于分蘖洋葱中洋葱黄矮病毒的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过中文的规范性引用而构成本文件的必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅注日期对应的版本适用于本文件；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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 28067 甘蔗黄叶病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

## 3 术语和定义

GB/T 28067 界定的术语和定义适用于本文件。

## 4 原理

比对洋葱黄矮病毒外壳蛋白基因，设计一对仅在洋葱黄矮病毒外壳蛋白基因间保守的特异性引物。提取分蘖洋葱总 RNA，在反转录酶作用下反转录成 cDNA，并以其为模板，利用 Taq 酶进行实时荧光 PCR 扩增反应（采用 SYBR Green I 荧光染料方法）。SYBR Green I 是一种具有绿色激发波长的染料，能够与双链 DNA 小沟区域结合。游离状态的 SYBR Green I 只发出微弱的荧光，当与双链 DNA 结合后，荧光强度会显著增加，而且荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。

## 5 试剂或材料

### 5.1 试剂

5.1.1 水：符合 GB/T 6682-2008 中一级水的要求。

5.1.2 Trizol 核酸提取试剂盒。

5.1.3 反转录试剂盒。

5.1.4 实时荧光 PCR 试剂盒。

5.1.5 DEPC（焦炭酸二乙酯 Diethyl Pyrocarbonate）。

5.1.6 三氯甲烷。

DBXX/ XXXXX—XXXX

5.1.7 异丙醇。

5.1.8 无水乙醇。

5.1.9 DEPC 处理的水。

5.1.10 DEPC 处理的 75%乙醇：无水乙醇（含量 $\geq 99.8\%$ ）与 DEPC 处理的水按 3:1 的体积比配置。

## 5.2 引物

### 5.2.1 引物序列

上游引物：5'-GCACGTTACGCATTCGACTT-3'

下游引物：5'-GCCTTCATCTGCATGTGTG-3'

### 5.2.2 引物配制

引物用水稀释成  $10 \mu\text{mol/L}$ ， $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

## 6 仪器设备

6.1 实时荧光 PCR 仪。

6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.3 电子天平：感量  $0.01 \text{ g}$ 。

6.4 高速冷冻离心机：离心力  $12000 \text{ g}$  以上。

6.5 微量移液器： $0.1 \mu\text{L} \sim 2.5 \mu\text{L}$ ， $2 \mu\text{L} \sim 20 \mu\text{L}$ ， $20 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ ， $100 \mu\text{L} \sim 1000 \mu\text{L}$ 。

6.6 恒温水浴锅。

6.7 冰箱： $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ， $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ， $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

6.8 离心管：DEPC 处理， $1.5 \text{ mL}$ 。

6.9 实时荧光 PCR 反应管：DEPC 处理， $200 \mu\text{L}$ 。

## 7 样品

### 7.1 对照样品

#### 7.1.1 阳性样品

用已知含有洋葱黄矮病毒的新鲜管状叶作为阳性样品。

#### 7.1.2 阴性样品

用已知不含有洋葱黄矮病毒的新鲜管状叶作为阴性样品。

### 7.2 试样

采集新鲜管状叶为宜，也可采集地下鳞茎。装入密封袋，置于冰盒中， $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存不超过  $12 \text{ h}$ ，也可  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  长期保存。

## 8 操作步骤

### 8.1 RNA 提取

- 8.1.1 离心管、药匙等经液氮预冷。
- 8.1.2 称取 0.1 g 样品液氮充分研磨（检测鳞茎时，选择中部层取样。），转入 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）处理的 1.5 mL 离心管中，立即加 1 mL Trizol 试剂，混匀，室温裂解 5 min。
- 8.1.3 加 200  $\mu\text{L}$  氯仿，充分摇晃混匀 15 s，室温静置 2 min~3 min，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 15 min，取上层溶液转入新的 DEPC 处理的 1.5 mL 离心管中。
- 8.1.4 加 0.5 mL 异丙醇，混匀，室温静置 10 min，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 10 min，弃上清。
- 8.1.5 加 1 mL DEPC 处理的 75%乙醇，涡旋震荡 1 min，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 5 min，弃上清。
- 8.1.6 离心管开盖晾 5 min~10 min 至管壁和管盖无液体，加入 40  $\mu\text{L}$  DEPC 水，混匀溶解，直接进行下步操作或-80  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
- 8.1.7 用核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度。

## 8.2 反转录

- 8.2.1 利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链，反应体系见表 1、表 2。

表1 反应体系-1

试剂	体积 $\mu\text{L}$
随机的 6 核苷酸引物	1
dNTP 混合溶液(10 mmol/L)	1
模板 RNA	2.5
rnase free ddH <sub>2</sub> O	5.5

表2 反应体系-2

试剂	体积 $\mu\text{L}$
上述变性后反应液	10
5 $\times$ PrimeScriptII Buffer	4
rnase inhibitor(40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5
primeScriptII RTase(200 U/ $\mu\text{L}$ )	1
rnase free ddH <sub>2</sub> O	4.5

## 8.2.2 反应程序

- 8.2.2.1 反应体系-1，65  $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min，冰浴冷却备用。
- 8.2.2.2 反应体系-2，30  $^{\circ}\text{C}$  10 min 后 42  $^{\circ}\text{C}$  1 h。

## 8.3 实时荧光 PCR 反应

### 8.3.1 实时荧光 PCR 反应体系

见表3。

表3 反应体系

试剂	剂量 μL	终浓度
2×Magic SYBR Mixtrue	10	1×
上游引物 (10 μM)	0.6	0.3 μM
下游引物 (10 μM)	0.6	0.3 μM
cDNA	2	10 ng~200 ng
ddH <sub>2</sub> O	补齐至 20	

### 8.3.2 反应程序

预变性95 °C 5 min, 变性95 °C 30 s, 退火延伸60 °C 15 s, 40 个循环。

## 9 试数据处理

### 9.1 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扩增曲线的最高点, 结果呈阴性为准。

### 9.2 检测结果的判定

根据 Ct 值判定检测结果, 在阳性对照、阴性对照和空白对照检测结果与预期一致的前提下:

- 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。
- 检测样品的 Ct 值介于 35~40, 且出现特定的扩增曲线, 需重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值仍介于 35~40, 且出现特定的扩增曲线, 判定结果为阳性; 否则判为阴性。
- 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。

## 10 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- 试验对象;
- 所使用的标准;
- 所使用的方法;
- 结果;
- 观察到的异常现象;
- 试验日期。