ICS 65.020.20
CCS B 16

DB22

# 吉　林　省　地　方　标　准

DB22/T 3601—2023

# 人参锈腐病菌分子检测 实时荧光定量 PCR 法

Detection of *Ilyonectria robusta* causing ginseng rusty root rot by quantitative real-time PCR

地方标准信息服务平台

2023-12-28 发布　　2024-02-01 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》的规定起草。

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：吉林农业大学、吉林参王植保科技有限公司。

本文件主要起草人：陈长卿、姜云、高洁、徐怀友、卢宝慧、杨丽娜、姜伊琳。

地方标准信息服务平台

# 人参锈腐病菌分子检测 实时荧光定量 PCR 法

## 1 范围

本文件确立了人参锈腐病菌实时荧光定量 PCR 分子检测方法，给出了实时荧光定量 PCR 检测原理，规定了试剂和材料、仪器设备、样品采集与制备、分析步骤、结果判定、废弃物处理和防止污染的措施。

本文件适用于人参根和土壤中锈腐病菌的实时荧光定量 PCR 分子检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该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 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 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

**人参锈腐病 ginseng rusty root rot**

一种主要由强壮土赤壳菌（*Ilyonectria robusta*）侵染人参根部导致的土传病害。

3.2

**实时荧光定量 PCR 法 quantitative real-time PCR**

一种在 DNA 扩增反应中，以荧光化学物质测定每次聚合酶链式反应（PCR）循环后产物总量的方法。

3.3

**Ct 值 cycle threshold**

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。

[来源：GB/T 28067—2011，2.3]

## 4 原理

根据人参锈腐病强壮土赤壳菌 *I. robusta* 组蛋白 Histone 基因的保守序列设计一对特异性引物进行 PCR 扩增反应。利用荧光信号伴随目的 PCR 产物的增加而增强的原理，收集 PCR 扩增过程的荧光信号值。随着 PCR 扩增反应的进行，Ct 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系，根据 Ct 值判断供试样品是否含有人参锈腐病强壮土赤壳菌。

## 5 试剂和材料

地方标准信息服务平台

### 5.1 通用要求

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

### 5.2 试剂

5.2.1 水，GB/T 6682，一级。
5.2.2 植物基因组 DNA 提取试剂盒。
5.2.3 土壤总 DNA 提取试剂盒。
5.2.4 实时荧光定量 PCR 试剂盒。

### 5.3 引物

#### 5.3.1 引物序列

上游引物:5′-CCGCCGACCTGACCTGACCGTCCGCC-3′，下游引物:5′-ATGATGTTTGATGCGAGACGTAA-3′。

#### 5.3.2 引物配制

引物用水稀释成 10 μmol/L，-20 ℃ 保存备用。

## 6 仪器设备

6.1 天平：感量 0.001 g。
6.2 实时荧光定量 PCR 仪：激发/检测波长范围 350 nm～750 nm，可用荧光染料（SYBR Green Ⅰ）；升降温速度≥3.0 ℃/s；均一性≤±0.5 ℃；准确性≤±0.3 ℃；温度范围 4 ℃～100 ℃。
6.3 高压灭菌锅：125 kPa。
6.4 离心机：离心转速 12 000 rpm 以上。
6.5 冰箱：4 ℃，-20 ℃，-80 ℃。
6.6 微量移液器：0.1 μL～2.5 μL，2 μL～20 μL，20 μL～200 μL，100 μL～1000 μL。
6.7 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
6.8 恒温水浴锅。
6.9 涡旋振荡器。
6.10 粉碎机。

## 7 样品

### 7.1 对照样品

#### 7.1.1 阳性样品

人参锈腐病强壮土赤壳菌菌丝体 DNA。

#### 7.1.2 阴性样品

7.1.2.1 经分子检测 3 次未检出强壮土赤壳菌的健康人参根基因组 DNA。
7.1.2.2 经分子检测 3 次未检出强壮土赤壳菌的土壤总 DNA。

#### 7.1.3 空白样品

地方标准信息服务平台

无菌一级水。

### 7.2 样品采集与制备

#### 7.2.1 人参

采集新鲜人参根，装入密封袋，置于冰盒中，在实验室用研磨机将参根打碎，充分混合，4 ℃ 保存不超过 12 h，也可 -80 ℃ 长期保存。

#### 7.2.2 土壤

每 25 $m^2$ 人参田块采用梅花形采样法，不少于 5 点，每个点取人参根际土壤样品 50 g，装入密封袋，充分混合，置于冰盒中，4 ℃ 保存不超过 12 h，也可 -80 ℃ 长期保存。

## 8 分析步骤

### 8.1 基因组 DNA 提取

准备人参根样品和土壤样品，参照基因组 DNA 提取试剂盒说明要求提取基因组 DNA。采用核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度和纯度。当 DNA 浓度为 100 ng/μL ～200 ng/μL，A260/A280 比值为 1.8～2.0 之间时，DNA 模板适宜荧光定量 PCR 扩增。用无菌一级水将模板 DNA 浓度稀释成 50 ng/μL 用于荧光定量 PCR 扩增。

### 8.2 实时荧光定量 PCR 反应

#### 8.2.1 反应体系

反应体系见表 1。

表1 实时荧光定量 PCR 反应体系

| 试剂 | 体积（μL） |
|---|---|
| 2×SYBR Green Mix | 10.0 |
| 正向引物（10 μmol/L） | 0.2 |
| 反向引物（10 μmol/L） | 0.2 |
| DNA 模板 | 1.0 |
| 二甲基亚砜 DMSO | 1.0 |
| 一级水 | 7.6 |
| 总体积 | 20.0 |

#### 8.2.2 反应程序

按照商品化试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 反应，每个样品重复 3 次。

#### 8.2.3 质量控制

扩增反应结束后，阳性对照出现典型的扩增曲线，空白对照和阴性对照的荧光曲线平直或低于阳性对照荧光值的 15 %，表明反应体系工作正常。否则，表明 PCR 反应体系不正常，应重新进行检测。

地方标准信息服务平台

## 9 结果判定与表述

### 9.1 结果判定

在 PCR 反应体系正常工作的前提下，Ct 值＞30 为阴性，≤30 为阳性。

### 9.2 结果表述

样品中检出或未检出人参锈腐病菌。

## 10 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物需经 121 ℃ 高压灭菌处理 30 min 后再弃置；防止交叉污染的措施按照 GB/T 28067 的规定执行。

地方标准信息服务平台