

ICS 65.020.01
B 16



中华人民共和国国家标准

GB/T 28073—2011

GB/T 28073—2011

南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of arabis mosaic virus

中华人民共和国
国家标准
南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法
GB/T 28073—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

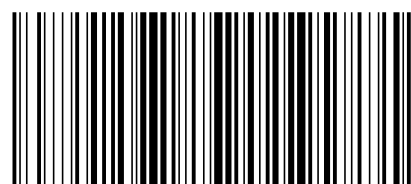
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2012年5月第一版 2012年5月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44629 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 28073-2011

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:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:廖富荣、于翠、张永江、陈红运、林石明、陈青、黄蓬英、沈建国、吴媛。

C.4 cDNA 合成

在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 ArM2 引物(10 $\mu\text{mol/L}$),于 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中 7 min,然后迅速冰浴 5 min。继续加入 5 \times RT 缓冲液 2.5 μL 、dNTP 混合物(10 mmol/L)0.5 μL 、M-MLV 反转录酶(200 U/ μL)0.5 μL 、RNasin 0.5 μL 、经 DEPC 处理的 ddH₂O 4.5 μL 。然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,自然冷却至室温,−20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

C.5 PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。在 PCR 的薄壁管中分别加入以下试剂(25 μL 体系):10 \times PCR 缓冲液(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺) 2.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.5 μL 、dNTP 混合物(每种各含 10 mmol/L)0.5 μL 、ArM1 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL 、ArM2 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL 、cDNA 3.0 μL 、ddH₂O 16.5 μL 。

反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 35 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 7 min。

C.6 琼脂糖凝胶电泳

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 RT-PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,并加到置于 0.5 \times TBE 缓冲液的 1.5% 琼脂糖凝胶孔中,然后在 120 V 下电泳。电泳结束后,放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

C.7 结果判定

在阴性对照没有产生条带、阳性对照产生约 370 bp 的预期大小条带情况下,如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则判定为阳性;否则判定为阴性。

南芥菜花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了南芥菜花叶病毒血清学和分子生物学的检测鉴定方法。

本标准适用于植物种子、鳞球茎、苗木和组培苗等植物及其产品中南芥菜花叶病毒的检测与鉴定。

2 南芥菜花叶病毒基本信息

中文名:南芥菜花叶病毒。

英文名:arabis mosaic virus。

异名:arabis mosaic nepovirus;hop nettlehead virus(啤酒花荨麻病病毒);rhubarb mosaic virus(大黄花叶病毒);raspberry yellow dwarf virus(悬钩子黄矮病毒);ash ring and line pattern viurs(白腊树环线状病毒);rhabarber-mosaik-virus(大黄花叶病毒);forsythia yellow net virus(连翘黄网状病毒);jasmine yellow blotch virus(茉莉黄斑病毒)。

英文缩写:ArMV。

属豇豆花叶病毒科 Comoviridae,线虫传多面体病毒属 *Nepovirus*。

南芥菜花叶病毒的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

利用基于抗原抗体反应的双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)、反转录和体外 DNA 扩增技术的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行检测鉴定。

4 主要仪器设备

本标准的检测鉴定方法主要使用以下仪器设备:

微量榨汁机、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、PCR 仪、荧光 PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、水浴槽、pH 计等和各种量程的可调移液器(1 000 μL 、200 μL 、100 μL 、20 μL 、10 μL 、2 μL)。

5 检测与鉴定

5.1 DAS-ELISA 检测

把 0.5 g~1.0 g 样品充分研磨或在液氮中研磨,按 1:10 比例加入样品提取缓冲液,转移到 5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,上清液作为 DAS-ELISA 的检测提取液。

设置阴性对照、阳性对照和空白对照,阴性对照的种类和材料(如:种子或叶片)应该尽量与所检测样品类型相一致。具体操作过程见附录 B。

注:提取液在 3 h 内使用,否则保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中。