



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28103—2011

GB/T 28103—2011

## 小麦线条花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of wheat streak mosaic virus

中华人民共和国  
国家标准  
小麦线条花叶病毒检疫鉴定方法  
GB/T 28103—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

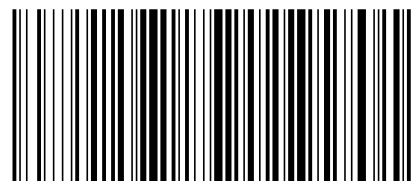
\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字  
2012年4月第一版 2012年4月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-44655 定价 16.00 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 28103-2011

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

附录 C  
(规范性附录)

反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测

C.1 试剂

C.1.1 饱和酚、三氯甲烷、异戊醇、 $MgCl_2$ 、3 mol/L 醋酸钠(pH5.2)、无水乙醇、DEPC、溴化乙锭、琼脂糖、dNTPs、*Taq* 酶、M-MLV 反转录酶、RNase inhibitor、M-MLV 反转录缓冲液、Trizol-RNA 抽提缓冲液、10×PCR 缓冲液、TAE 电泳缓冲液、TE 缓冲液、溴酚蓝载样缓冲液。

C.1.2 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒。

C.1.3 小麦线条花叶病毒阳性对照、阴性对照、DNA ladder marker。

C.2 实验步骤

C.2.1 RNA 提取

将 250 mg 植物材料置于离心管中,液氮冷冻,研碎。悬浮于 750  $\mu$ L 抽提缓冲液中,继续研磨。再加入等体积的饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),混匀。13 000 r/min 离心 5 min,取上清液。加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH5.2),2.5 倍体积的无水乙醇,−80 °C 30 min 以上(或−20 °C 过夜)。13 000 r/min 离心 15 min,留沉淀。加入 300  $\mu$ L 的 75%乙醇洗涤。13 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,重复离心一次,风干。将 RNA 溶于 50  $\mu$ L 经 DEPC 处理的蒸馏水中,作为待检测核酸。分别从 WSMV 阳性对照、阴性对照中提取 RNA。

可使用 RNA 提取试剂盒并按照说明书进行操作。

C.2.2 引物合成

依据文献(Deb M & Anderson J M,2008)所设计的引物序列:

WSMV L2;5'-CGA CAA TCA GCA AGA GAC CA-3'

WSMV R2;5'-TGA GGA TCG CTG TGT TTC AG-3'

扩增产物大小约为 190 bp。

C.2.3 RT-PCR 检测

C.2.3.1 cDNA 的合成

反应体系为 20  $\mu$ L,包括 20  $\mu$ mol/L 引物 1  $\mu$ L,RNase-free  $H_2O$  8.5  $\mu$ L,待检测核酸 2  $\mu$ L,空白对照用 RNase-free  $H_2O$ 。88 °C 水浴 10 min 后,置于冰上,加入 10 mmol/L 的 dNTP 1  $\mu$ L,40 U/ $\mu$ L 的 RNase inhibitor 0.5  $\mu$ L,5 倍 M-MLV 反转录缓冲液 4  $\mu$ L,100 mmol/L DTT 2  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L M-MLV 反转录酶 1  $\mu$ L,混匀,42 °C 水浴 1 h,合成 cDNA。同样处理阳性对照、阴性对照和水空白对照。

C.2.3.2 PCR 扩增

反应体系 50  $\mu$ L,包括 10 mmol/L 的 dNTPs 1  $\mu$ L,20  $\mu$ mol/L 引物 WSMV L2/WSMV R2 各 1  $\mu$ L,10 倍 PCR 缓冲液 5  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶 1  $\mu$ L,双蒸水 39  $\mu$ L,进行如下热循环:95 °C 3 min,然后 95 °C 30 s,55 °C 1 min,72 °C 30 s,35 个循环,最后 72 °C 10 min,4 °C 保存 PCR 产物。同

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:中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:郭京泽、廖芳、刘跃庭、张裕君、刘勇、崔铁军、王金成。

## 附录 B (规范性附录)

### 双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)方法检测

#### B.1 试剂

##### B.1.1 包被缓冲液(pH9.6)

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )1.59 g,碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )2.93 g,叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ) 0.20 g,溶解于900 mL蒸馏水中,用盐酸调节pH至9.6,用蒸馏水定容至1 000 mL。

##### B.1.2 PBST缓冲液(pH7.4)

氯化钠( $\text{NaCl}$ )8.0 g,磷酸二氢钠( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.2 g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.15 g,氯化钾( $\text{KCl}$ )0.2 g,0.5 mL Tween-20,叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )0.2 g,溶解于900 mL蒸馏水中,用盐酸调节pH至7.4,蒸馏水定容至1 000 mL。

##### B.1.3 样品抽提缓冲液

亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )20 g,2.0 g PVP(MW 24~4 000),加PBST缓冲液1 000 mL。

##### B.1.4 酶标抗体缓冲液

20 g PVP(MW 24~4 000),BSA 2.0 g,加PBST缓冲液1 000 mL。

##### B.1.5 底物缓冲液

乙二醇胺 97 mL,蒸馏水 600 mL,用盐酸调pH至9.8,然后用蒸馏水定容至1 000 mL。

##### B.1.6 底物 pNPP(对-硝基苯磷酸钠)

##### B.1.7 种子表面消毒液

将30%次氯酸钠( $\text{NaClO}$ )100 mL溶于900 mL蒸馏水中,制成3%种子表面消毒液。

##### B.1.8 生物制剂

小麦线条花叶病毒检测试剂盒(WSMV特异性抗体和酶标记抗体)。  
小麦线条花叶病毒阳性质控。  
小麦线条花叶病毒阴性质控。

#### B.2 DAS-ELISA 检测

##### B.2.1 样品制备

###### B.2.1.1 种子类

随机抽取或针对性挑选100粒种子,浸入种子表面消毒液中消毒10 min,用灭菌蒸馏水洗涤种子三次。将种子摆放于铺有湿润吸水纸的白瓷盘内。在植物光照培养箱中,使种子在适宜的发芽温度(20℃~28℃)下催芽长出叶片。

## 小麦线条花叶病毒检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了小麦线条花叶病毒(wheat streak mosaic virus)检疫鉴定方法。  
本标准适用于禾本科植物种子和苗木中的小麦线条花叶病毒检疫鉴定。

### 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。

SN/T 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

### 3 小麦线条花叶病毒基本信息

小麦线条花叶病毒 wheat streak mosaic virus,属于马铃薯Y病毒科 Potyviridae,小麦花叶病毒属 *Tritimovirus*。缩写:WSMV。

小麦线条花叶病毒传播途径有:汁液摩擦传播;种传;介体传播。

该病毒容易通过汁液摩擦方式近距离扩散。该病毒能通过带病小麦种子的调运远距离传播。该病毒的传毒介体为小麦卷叶螨 *Aceria tosichella*,成虫和若虫均可带毒传染,卵不传病毒。

小麦线条花叶病毒其他信息参见附录A。

### 4 方法原理

小麦线条花叶病毒的形态学特征、分子生物学特性和血清学特性是该病毒检疫鉴定方法的主要依据。采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定方法、植物病毒免疫电镜检测方法、反转录聚合酶链式反应检测方法,确定样品中带有小麦线条花叶病毒。

### 5 仪器设备、用具及试剂

#### 5.1 仪器设备

酶标仪、洗板机、恒温水浴锅、普通冰箱(0℃~4℃)、-20℃低温冰箱、-80℃超低温冰箱、植物光照培养箱(温度可调范围为0℃~50℃)、超净工作台、电子天平(1/10 000 g)、微量榨汁机、透射电子显微镜、低速离心机(转速为3 000 r/min~5 000 r/min)、PCR仪、纯水仪、电泳仪、凝胶成像系统。

#### 5.2 用具

可调微量移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL、5 000 μL)和相应的吸头、酶联板、封口膜、pH计或pH试纸条(广泛试纸和精密试纸)、1.5 mL离心管、PCR反应管、容量瓶(500 mL、1 000 mL)、解剖刀片、镊子、剪刀、吸水纸、白瓷盘、记号笔、标签、一次性手套。