

中华人民共和国国家标准

GB/T 28063—2011

GB/T 28063—2011

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of bean pod mottle virus

中华人民共和国
国家标准
菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法
GB/T 28063—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

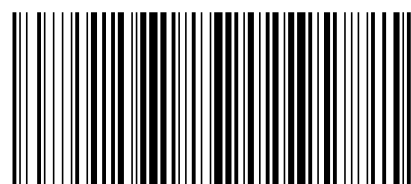
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2012年4月第一版 2012年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44585 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 28063-2011

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

D.4 cDNA 合成

在 3 μL 的总 RNA 中加入 1 μL 的 BPM4 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 反应缓冲液 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 、RNase Inhibitor 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。

D.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 Mg^{2+}) 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 、BPM3 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL 、BPM4 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 50 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,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。

D.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。

D.7 结果判定

在阴性对照和空白对照没有产生条带、阳性对照产生预期大小(约 228 bp)的条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品未出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

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、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

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

附 录 C
(规范性附录)
IC-RT-PCR 检测操作步骤

C.1 主要试剂

BPMV 抗体、包被缓冲液和 PBST 试剂见 B.1; RT-PCR 试剂见 D.1。

C.2 包被抗体

根据检测试剂说明,将包被抗体用包被缓冲液稀释(如 1:200),取 50 μL ~100 μL 稀释好的包被溶液于 0.6 mL 的离心管中。25 $^{\circ}\text{C}$ 中放置 3 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次~5 次,去除残留溶液。

C.3 抗原捕捉

向每个已包被抗体的离心管中加入检测样品上清液 100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h~3 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置过夜;加入 PBST 缓冲液洗涤 3 次~5 次,双蒸水洗涤 1 次,去除残留溶液。

注:如果是用于验证 DAS-ELISA 的检测结果,可直接使用血清学检测样品的剩余提取液。

C.4 cDNA 合成

在上述离心管中加入 1 μL 的 BPM4 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、37.5 μL 的 ddH₂O(经 DEPC 处理),于 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中处理 7 min,然后迅速冰浴 5 min;继续加入 5 \times RT 缓冲液 10 μL 、10 mmol/L 的 dNTP 混合物 0.5 μL 、M-MLV 反转录酶 0.5 μL 、RNase Inhibitor 0.5 μL ;然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,冷却后作为 PCR 扩增模板。

C.5 PCR 扩增

在 25 μL 的反应体系中:2.5 μL 的 10 \times PCR buffer(含 20 mmol/L 的 Mg²⁺),dNTP(每种各 10 mmol/L) 0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.5 μL ,BPM3 和 BPM4 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL (引物见表 D.1),加入上述 DNA 模板 10 μL ,ddH₂O 补足体积。

与 D.5 反应程序相同,反应完成后,取 5 μL 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,然后用 EB 染色,在凝胶成像系统上观察。

C.6 结果判定

阴性对照和空白对照没有产生条带、阳性对照产生预期大小(约 228 bp)的条带情况下:

- 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;
- 如果检测样品未出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

菜豆荚斑驳病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了菜豆荚斑驳病毒血清学和分子生物学的检测鉴定方法。

本标准适用于可能携带该病毒的豆科作物的种子、苗木等植物繁殖材料的检测鉴定,也适用于传播该病毒介体昆虫的检测鉴定。

2 菜豆荚斑驳病毒基本信息

中文名:菜豆荚斑驳病毒。

英文名:bean pod mottle virus。

异名:bean pod mottle comovirus(菜豆荚斑驳病毒),pod mottle virus(荚斑驳病毒),desmodium virus(金钱草病毒)。

英文缩写:BPMV。

属豇豆花叶病毒科 Comoviridae、豇豆花叶病毒属 *Comovirus*。

菜豆荚斑驳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 计和各种量程的可调移液器(1 000 μL 、200 μL 、100 μL 、20 μL 、2 μL)。

5 检测样品的制备

5.1 DAS-ELISA 和 IC-RT-PCR 检测样品的制备

对每批送检样品进行症状检查,优先选取具有褐色或黑色斑驳症状的种子(从种脐开始),或者选取具有斑驳、皱缩、褪绿等症状的叶片。

种子样品:称取 0.5 g~1.0 g 的种皮作为检测样品,在液氮中充分研磨,回温后按 1:10 比例加入样品提取缓冲液继续研磨。

叶片样品:称取 0.5 g~1.0 g 的叶片作为检测样品,在研钵中研磨或在液氮中研磨,按 1:10 比例加入样品提取缓冲液继续研磨。

把研磨后的样品转移到 5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,上清液作为 DAS-ELISA(见附录 B)和 IC-RT-PCR(见附录 C)检测提取液。

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