



中华人民共和国国家标准

GB/T 31797—2015

GB/T 31797—2015

啤酒花潜隐类病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Hop latent viroid*

中华人民共和国
国家标准
啤酒花潜隐类病毒检疫鉴定方法
GB/T 31797—2015

*

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(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
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

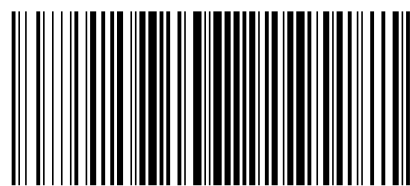
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 26 千字
2015年8月第一版 2015年8月第一次印刷

*

书号: 155066·1-49509 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 31797—2015

2015-07-03 发布

2015-11-27 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.2.9 结合抗体

加入抗体溶液(12 mL/100 cm²~15 mL/100 cm²膜)37 ℃孵育 30 min,弃抗体溶液。

D.2.10 洗涤

用洗涤缓冲液(12 mL/100 cm²~15 mL/100 cm²膜)室温洗膜 2 次,每次 15 min,弃洗涤液。

D.2.11 平衡

用检测缓冲液(12 mL/100 cm²~15 mL/100 cm²膜)室温平衡 10 min。

注: D.2.5~D.2.11 步骤中用到的各种液体可根据试验具体情况进行调整,但要确保膜能浸没于液体中且不漂浮。

D.2.12 感光处理

将杂交膜放入一边封好的杂交袋中(杂交膜点样面朝上),并将相邻两边封好,在点样面上加入适量的 CSPD 稀释液(1 mL/100 cm²膜),迅速将杂交袋放平,用手反复轻推数次,使 CSPD 稀释液在膜上扩散均匀,严防杂交袋与膜之间有气泡,20 ℃~30 ℃放置 5 min~10 min。此步骤操作要快,防膜干燥。将多余的 CSPD 液体挤干净,封口,37 ℃温育 15 min~25 min。

D.2.13 压片

在暗室中,膜正面向上放于暗盒,将比膜稍大的 X 光片平整地压于膜上,封好暗盒,必要时可用胶带固定杂交袋。暗盒内曝光约 1.5 h。

D.2.14 显影和定影

曝光后,在暗室内取出感光后的胶片放于显影液内显影 4 min~5 min,打开绿光灯一尺距离观察显影效果,当可以清楚地看到阳性对照或检测到的阳性显影清楚后,将胶片放入清水中冲洗 30 s,放入定影液中定影 10 min,再用流水冲洗 30 s,拿出暗室。

注: 曝光和显影时间可根据试验具体情况进行调整,以达到最佳效果。

D.3 结果判断

阴性对照和空白对照未出现杂交斑,待测样品与阳性对照出现杂交斑,判定结果为阳性。

阴性对照和空白对照未出现杂交斑,阳性对照出现杂交斑,且样品无杂交斑,判定结果为阴性。

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:中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中国农业科学院植物保护研究所、石河子大学。

本标准主要起草人:郭立新、邓丛良、段维军、张祥林、李世访、姜冬梅、荣德福、刘升学。

附录 D
(规范性附录)
斑点杂交检测方法

D.1 主要试剂**D.1.1 RNA 提取试剂**

见 B.1.1~B.1.5。

D.1.2 10×MOPS(pH 7.0)

MOPS(pH 7.0)	0.4 mol/L
乙酸钠(NaAc)	0.1 mol/L
乙二胺四乙酸(EDTA)	0.01 mol/L

用 2 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 7.0。加双蒸水定容至 1 L,用 0.45 μm 的滤膜过滤除菌,室温避光保存。

D.1.3 变性液(现用现配)

甲醛(12.3 mol/L)	162 μL
甲酰胺	500 μL
10×MOPS	100 μL

4 ℃贮存,无须灭菌。

D.1.4 20×SSC(pH 7.0)

氯化钠(NaCl)	17.53 g
柠檬酸钠	8.82 g

用 1 mol/L 盐酸(HCl)溶液调 pH 至 7.0,加双蒸水定容至 100 mL,高压灭菌待用。

D.1.5 10%十二烷基磺酸钠(SDS)

十二烷基磺酸钠	10 g
---------	------

用 80 mL 双蒸水溶解,加热到 68 ℃并用磁力搅拌器搅拌有助于溶解。如果需要,用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 7.2。用双蒸水定容至 100 mL。室温保存。无须蒸汽高压灭菌。

D.1.6 马来酸缓冲液(pH 7.5)

马来酸	1.16 g
氯化钠(NaCl)	0.877 5 g

加双蒸水定容至 100 mL,灭菌待用。

D.1.7 1%封闭液(现用现配)

封闭剂(-20 ℃保存)	1 g
--------------	-----

用马来酸缓冲液定容至 100 mL。

注:此处要求马来酸 pH 严格,否则不溶;封闭剂很难溶,要稍加热(50 ℃左右),并用磁力搅拌子搅拌溶化。

D.1.8 抗体溶液(现用现配)

Anti-DIG-AP(4 ℃保存)	10 μL
--------------------	-------

用封闭液定容至 100 mL。

D.1.9 洗涤缓冲液(现用现配)

马来酸缓冲液	100 mL
吐温-20(Tween-20)	0.3 mL

啤酒花潜隐类病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了啤酒花潜隐类病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于啤酒花(*Humulus lupulus*)及其无性繁殖材料、种子、花粉上啤酒花潜隐类病毒的检疫鉴定,同时也适用于葎草(*Humulus japonicus*)和异株荨麻(*Urtica dioica*)上啤酒花潜隐类病毒的检疫鉴定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 仪器设备、主要用具和主要试剂**3.1 仪器设备**

电子天平(感量 0.001 g)、普通天平(感量 0.1 g)、高速冷冻离心机、小型瞬时离心机、普通冰箱、超低温冰箱(-80 ℃)、制冰机、涡旋振荡器、磁力搅拌器、高压灭菌锅、pH 计、PCR 仪、微波炉、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、实时荧光 PCR 仪、杂交炉、塑料薄膜封口机、紫外交联仪、暗箱、摇床、可调移液器(2.5 μL,10 μL,20 μL,200 μL,1 000 μL,5 000 μL)。

3.2 主要用具

无 RNase 吸头(10 μL,20 μL,200 μL,1 000 μL,5 000 μL)、无 RNase 离心管(1.5 mL,5 mL,10 mL)、研钵、研棒、磁性分离架、PCR 反应管(200 μL)、实时荧光 96 孔反应板、杂交瓶、杂交膜、杂交袋、X 光片。

3.3 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中相关规定。RT-PCR 检测试剂见附录 B;实时荧光 RT-PCR 检测试剂见附录 C;斑点杂交检测试剂见附录 D。

4 检测样品制备**4.1 种子类**

随机抽取至少 50 粒种子样品,进行表面消毒后,置于铺有吸水纸的白瓷盘或培养皿中,在适宜的发芽温度条件下催芽,直至长出第一对真叶(发芽时间大约一周);或者在消毒的土壤中直接种植,直至长出第一对真叶。取适量叶片,放入洁净的研钵中,加入液氮后迅速研磨成细粉状。