



中华人民共和国国家标准

GB/T 29582—2013

GB/T 29582—2013

花生矮化病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of peanut stunt virus

中华人民共和国
国家标准
花生矮化病毒检疫鉴定方法
GB/T 29582—2013

*

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

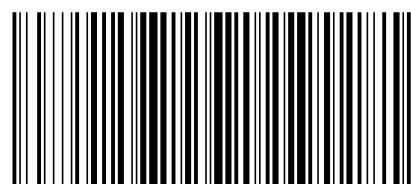
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2013年10月第一版 2013年10月第一次印刷

*

书号: 155066·1-47515 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 29582-2013

2013-07-19 发布

2013-12-06 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

表 D.1 (续)

名称	储存液浓度	终浓度	加样量/ μL
Taq 酶	5 U/ μL	0.05 U/ μL	0.25
cDNA	—	—	1.5
无菌水	—	—	17.75
总体积	—	—	25

D.4.1 PCR 反应循环参数:

普通 PCR 反应参数见表 D.2, 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

表 D.2 普通 RT-PCR 反应参数

变性	扩增条件	循环次数	延伸
94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min
	58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s		
	72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s		

D.4.2 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(1 \times TAE)配制 2.0% 的琼脂糖凝胶(55 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 时加入溴化乙锭至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 也可在电泳后进行染色)。在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面刚刚没过凝胶。将 9 μL PCR 扩增产物, 加 1 μL 10 \times 上样缓冲液上样。恒压(5 V/cm~6 V/cm)电泳 40 min~50 min。凝胶成像系统中观察电泳结果, 拍照并记录结果。

D.5 结果判定

如果阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现预期大小的条带, 样品未出现预期大小的条带, 则可判定样品为花生矮化病毒阴性。

如果阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现预期大小的条带, 样品出现预期大小条带, 可通过测序的方式进一步确认。如果 PCR 产物序列与花生矮化病毒的序列同源, 则可判定样品为花生矮化病毒阳性, 若序列不同源, 则可判定样品为花生矮化病毒阴性。也可通过荧光 PCR 的方式进一步确认。

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: 中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人: 于翠、杨翠云、印丽萍、郑耘、廖富荣、郑建中、易建平。

附录 C (规范性附录)

双抗体酶联免疫吸附测定方法(DAS-ELISA)

C.1 检测

- C.1.1 根据检测需要将适量的孔条放于酶联板架上,包括 2 个阳性对照孔、2 个阴性对照孔、2 个空白对照孔和多个待检测样品孔。待测样品孔重复两次。
- C.1.2 每孔加入 100 μL 的 PSV 的包被抗体溶液,封口膜包好,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h~4 h(或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜)。
- C.1.3 将酶联板孔中溶液控干,用 200 μL 的 1 \times PBST 洗涤液洗涤酶联板 3 次,每次 3 min,然后在干净毛巾或滤纸上扣干。
- C.1.4 将 100 μL 制备的待测样品溶液加入到设计的待检测孔中,对照孔中也各加入 100 μL 相应的阴性对照、阳性对照和空白对照。封口膜包好,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h~3 h(或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜)。
- C.1.5 洗涤,步骤同 C.1.3。
- C.1.6 用酶标抗体稀释缓冲液按照要求稀释酶标抗体,每孔加入 100 μL 酶标抗体溶液,封口膜包好,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h~4 h。
- C.1.7 洗涤,步骤同 C.1.3。
- C.1.8 将 ρNPP 溶于底物缓冲液中,使最终浓度为 1 mg/mL。每孔加入 100 μL 配好的底物溶液,室温孵育 0.5 h~2 h。必要时每孔加入 50 μL 的 3 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应。
- C.1.9 酶标仪 405 nm 波长下检测各孔的吸收值并记录。

C.2 结果判定

- C.2.1 质量控制要求:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.15,阴性对照孔的 OD_{405} 值小于 0.05 时,按 0.05 计算。阳性对照有明显的颜色反应,孔的重复性以样品 OD 值的平行允许率控制,按照式(C.1)进行计算:

$$P = \frac{OD_1 - OD_2}{(OD_1 + OD_2) \times 1/2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

- P ——平行允许率;
 OD_1 ——重复样品 1 的 OD 值;
 OD_2 ——重复样品 2 的 OD 值。

当重复检测样品 OD 值平行允许率(P)小于 20%时,判定检测结果有效。

- C.2.2 若满足不了 C.2.1 的质量要求,则不能进行结果判定。
- C.2.3 在满足了 C.2.1 的质量要求后,则按如下原则作出判定:
 样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值明显大于 2,结果判定为阳性;
 样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近,判为可疑样品,需重做一次或者用其他方法进行验证;
 样品 OD_{405} /阴性对照 OD_{405} 值明显小于 2,判为阴性。

花生矮化病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了花生矮化病毒检疫鉴定方法。
 本标准适用于活体植物材料,包括无性繁殖材料、组培苗、种子和苗木中花生矮化病毒的检测。

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 花生矮化病毒基本信息

中文名:花生矮化病毒。
 英文名:Peanut stunt virus。
 异名:groundnut stunt virus; peanut stunt cucumovirus; robinia mosaic virus; clover blotch virus; peanut common mosaic virus。
 缩写:PSV。
 属雀麦花叶病毒科 Bromoviridae,黄瓜花叶病毒属 *Cucumovirus*。
 花生矮化病毒的其他信息参见附录 A。

4 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(double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay,DAS-ELISA)、体外反转录和体外 DNA 合成技术的反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)进行检测鉴定。

5 仪器设备、设施、用具和试剂

5.1 仪器

PCR 仪、超净工作台、电子天平(0.001 g)、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、电子透射显微镜、水浴锅、高速冷冻离心机、-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、涡旋振荡器。

5.2 设施

隔离温室(10 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$)。

5.3 用具

可调式微量移液器(2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 、5 000 μL)及相应的无 RNase 吸头、无 RNase 离心管、PCR 管和研钵等。