

ICS 65.020
B 16

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1804—2009

甘蔗花叶病毒检测技术规范

Technical criterion of Sugarcane mosaic virus detection

2009-12-22 发布

2010-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由农业部热带作物及制品标准化委员会归口。

本标准起草单位：中国热带农业科学院热带生物技术研究所、国家重要热带作物工程技术研究中心。

本标准主要起草人：刘志昕、王健华、陈业渊。

甘蔗花叶病毒检测技术规范

警告——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施,并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本标准规定了甘蔗花叶病毒(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)及反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)分子生物学检测方法。

本标准适用于甘蔗种茎、甘蔗组培苗中的甘蔗花叶病毒的检测。

2 仪器和用具

2.1 主要仪器

台式冷冻离心机、PCR仪、水平电泳装置、凝胶成像系统、水浴锅、酶标仪、恒温培养箱。

2.2 用具及耗材

微量移液器、研钵、酶联板、离心管、PCR管、移液器吸头。

3 取样

3.1 种茎:取腋芽及其周围组织约10 g,心叶约10 g,4℃条件下保存,最多存放7 d。

3.2 组培苗:取叶片1 g~10 g,4℃条件下保存,最多存放7 d。

4 检测方法

4.1 双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)法

4.1.1 样品制备

从取样(保存)材料中切取0.5 g~1.0 g组织,加入5 mL抽提缓冲液研磨,4 000 r/min离心5 min,取上清液作试样,4℃条件下保存备用。

阳性样品为已知带SCMV的材料或试剂盒提供的阳性对照,阴性样品为已知不带SCMV的材料或试剂盒提供的阴性对照,按同样方法制备和保存。

4.1.2 操作步骤

4.1.2.1 包被抗体:每孔加100 μL用包被缓冲液按工作浓度稀释的SCMV抗体,37℃保湿孵育2 h~4 h或4℃条件下保湿过夜。

4.1.2.2 洗板:用PBST洗液洗板4次,每次3 min~5 min。

4.1.2.3 封闭:每孔加入200 μL封闭液,37℃保湿孵育1 h~2 h。

4.1.2.4 洗板:同4.1.2.2。

4.1.2.5 加检测样品:每孔加入100 μL试样,设阴性、阳性和空白对照(样品提取缓冲液),可根据需要设置重复,37℃条件下保湿孵育4 h,或4℃条件下过夜。

4.1.2.6 洗板:同4.1.2.2。

4.1.2.7 加酶标抗体:每孔加入100 μL经ECI缓冲液稀释至工作浓度的碱性磷酸酯酶标记抗体,37℃保湿孵育2 h~4 h。

4.1.2.8 洗板:同4.1.2.2。