

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1616—2005

SN/T 1616—2005

非洲木薯花叶病毒检测方法

Detection of African Cassava Mosaic Virus

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
非洲木薯花叶病毒检测方法
SN/T 1616—2005

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzchs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字

2005年11月第一版 2005年11月第一次印刷

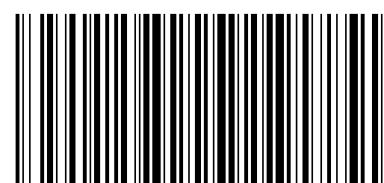
*

书号: 155066·2-16462 定价 8.00 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)68533533



SN/T 1616-2005

2005-08-18 发布

2006-02-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

附 录 C
(资料性附录)
免疫电镜观察

C.1 试剂

0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.2):

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 68.4 mL

磷酸二氢钠(NaH_2PO_4) 31.6 mL

加水至 1 L。

C.2 实验步骤**C.2.1 Formvar 膜制作**

将聚乙烯醇缩甲醛溶于三氯甲烷,配成 0.2%~0.3% 溶液,贮于冰箱内备用。制膜时取一块干净的玻璃片插入溶液中,取出倾斜待溶液挥发,用镊尖或刀片沿玻璃边划痕,再将玻璃片以一定角度缓慢插入蒸馏水中,使薄膜从玻片上脱落下来漂浮于水面,将干净的铜网小心摆上,再用一块滤纸覆盖其上,捞起后置于培养皿中干燥备用。

C.2.2 抗血清包被铜网

C.2.2.1 将一滴(约 10 μL)适当浓度的抗血清置于石蜡板上,用表面覆盖有 Formvar 膜的铜网覆盖其上,37℃ 下 1 h。

C.2.2.2 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.2)洗网 2 次~3 次,晾干。

C.2.3 电镜样品制备

C.2.3.1 将一滴病汁液置于石蜡板上,用包被有抗血清的铜网在病汁液上吸附 30 min~45 min,4℃ 下。

C.2.3.2 用 2% methylamine tungstate(pH5.0)5 滴~7 滴洗网。

C.2.3.3 用 2% 乙酸双氧铀负染 1 min,晾干即可用于电镜观察。

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录,附录 C 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:相宁、李明福、魏梅生、张成良。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

- A.2.7 取 1 g 待检测组织研碎,加入 2 mL~10 mL 的抽提缓冲液,过滤得到待检样品液。
- A.2.8 分别将稀释到适当浓度的阳性对照、阴性对照和待检样品各 200 μ L 加入已包被的孔中,为保证实验的准确性,建议每个样品再设一个重复。
- A.2.9 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。
- A.2.10 同步骤 A.2.3 洗板。
- A.2.11 用稀释缓冲液将抗体(单克隆抗体)稀释到适当浓度,每孔加 100 μ L。
- A.2.12 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。
- A.2.13 同步骤 A.2.3 洗板。
- A.2.14 用结合缓冲液将标有碱性磷酸酯酶的兔抗鼠 IgG 稀释到适当浓度,每孔加 200 μ L。
- A.2.15 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。
- A.2.16 同步骤 A.2.3 洗板,以确定所有未结合的抗体都被洗掉。
- A.2.17 按 1 mg/mL 的浓度将对硝基苯磷酸钠溶于底物缓冲液中(使用前配并注意避光以防变色),制成底物溶液。
- A.2.18 每孔加 100 μ L 底物溶液。
- A.2.19 室温下孵育 30 min~60 min。
- A.2.20 在酶联仪 405 nm 波长下检查各孔的吸收值 OD_{405} 。

A.3 结果判断

当样品 OD_{405} /阴性对照 $OD_{405} \geq 2$ 时,判定结果为阳性;如果是试剂盒,根据试剂盒的说明来判定。

非洲木薯花叶病毒检测方法

1 范围

本标准规定了非洲木薯花叶病毒检测鉴定的基本原则和方法。
本标准适用于可能带有非洲木薯花叶病毒的所有进境木薯、苗木等的检疫检测和鉴定。

2 原理

2.1 非洲木薯花叶病毒

学名:African cassava mosaic virus

缩写:ACMV

分类地位:联体病毒科(Geminiviridae),菜豆金黄色花叶病毒属(*Begomovirus*)。

2.2 寄主范围

自然寄主主要为木薯(*Manihot esculenta*),人工接种可侵染瓜类、烟类等多种植物。

2.3 病害症状

木薯植株各个不同生长期都可以被侵染致病,幼龄植株更易感染,典型症状为系统花叶。感病植株首先在叶片上呈褪绿小斑,逐渐扩大,褪绿斑愈合与正常绿色形成花叶。有时受侵叶背面可见突起。症状严重程度随季节、栽培品种不同而异。在潮湿、凉爽雨季症状表现得最严重,而夏季通常隐症或浅花叶。

2.4 分布地区

西非和南部非洲。包括:肯尼亚、南非、安哥拉、刚果、喀麦隆、贝宁、尼日利亚、中非、加纳、科特迪瓦、布基纳法索、卢旺达、坦桑尼亚、乌干达和塞内加尔等。

2.5 传播方式

木薯粉虱(*Bemisia tabaci*)为传毒介体,以持久方式传毒,并可以保持侵染能力 9 d,大约 10% 的传毒由单头成虫完成。病毒存在于口器中,脱皮仍保留病毒,但不能通过卵传给下一代。嫁接可以传毒,种子不传毒。汁液可以传毒,但传给木薯困难。

该病毒通过染病种薯、块茎、组培苗的运输等人为途径进行传播。

2.6 粒体形态

病毒粒体为双生球状(30 nm \times 20 nm),长轴中心线上有一明显的“腰”,每一面都有一明显的五角形,偶尔可见三联体病毒。

2.7 基因组

单链环状 DNA,二分体,DNA-1 长 2.779 kb,DNA-2 长 2.724 kb。

3 仪器设备、用具及试剂

3.1 仪器设备

透射式电子显微镜、酶联检测仪、电子天平(1/1 000 g)、紫外透射仪、隔离温室、榨汁机、水浴锅等。

3.2 用具

可调移液器(0 μ L~10 μ L、20 μ L~100 μ L、200 μ L~1 000 μ L、1 000 μ L~50 000 μ L)、可调移液器头、酶联板、eppendorf 管、指型管、研钵等。

3.3 试剂

酶联检测试剂(见附录 A)和电镜观察样品前处理试剂。