



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2627—2010

马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of potato leafroll virus for quarantine

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国四川出入境检验检疫局、四川省农业厅植物检疫站、四川农业大学。

本标准主要起草人：孟兴、宁红、张洪峰、张敏、谭家兴、郭迪金、吴婕。

马铃薯卷叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中马铃薯卷叶病毒检测鉴定的程序。

本标准适用于马铃薯块茎、种苗等茄科植物感染马铃薯卷叶病毒的检验和鉴定。

2 原理

马铃薯卷叶病毒(potato leafroll virus, PLRV)属马铃薯黄斑病毒科,马铃薯卷叶病毒属。病毒粒体球状,粒体直径23 nm~25 nm,是等轴对称病毒。致死温度70℃,稀释限点约 10^{-7} 。引起马铃薯卷叶病病毒。马铃薯病病毒一般根据病害症状很难确定病毒种类,采用免疫学和分子生物学方法,可快速根据有关判断标准进行马铃薯卷叶病毒检疫鉴定。

3 试剂与材料

除非另有说明,在本标准中仅使用确认的分析纯试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

3.1 免疫学检验试剂

- 3.1.1 捕捉抗体(Capture antibody)马铃薯卷叶病毒免疫球蛋白,抗体稀释度按市售产品要求进行。储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.2 酶标抗体(Alkaline phosphatase enzyme conjugate):用碱性磷酸酶标记的马铃薯卷叶病毒的免疫球蛋白抗体。按市售产品要求进行稀释,储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.3 包被缓冲液(Coating buffer):取2.98 g 碳酸氢钠(Na_2HCO_3)、1.59 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、0.2 g 叠氮化钠(NaN_3),用1 000 mL 蒸馏水溶解,并调pH值到9.6,储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.4 洗涤液(PBST Buffer):取1.15 g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.2 g 氯化钾(KCl)、0.2 g 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.5 g 吐温-20,用1 000 mL 蒸馏水溶解,并调整pH值到7.4。
- 3.1.5 样品提取液(GEB buffer):取1.3 g 无水硫酸钠(Na_2SO_4)、20.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_{21-10000}]$ 、0.2 g 叠氮化钠(NaN_3)、2.0 g II级鸡蛋白清蛋白粉、20.0 g 吐温-20,用1 000 mL 洗涤液溶解,并调整pH值到7.4,储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.6 酶标抗体稀释缓冲液(ECI Buffer):取0.2 g 牛血清白蛋白(或脱脂奶粉)、2.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 $[(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n]$ 、0.02 g 叠氮化钠(NaN_3),用100 mL 洗涤缓冲液溶解,并调整pH值到7.4,储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.7 底物缓冲液(PNP Buffer):用80 mL 灭菌蒸馏水将0.01 g 氯化镁(MgCl_2)、0.02 g 叠氮化钠(NaN_3)、9.7 mL 二乙二醇(CH₂CH₂OH)溶解后,用盐酸调pH值到9.8,定容到100 mL,储藏于4℃条件下备用。
- 3.1.8 底物溶液(PNP substate):将5 mg 对硝基苯磷酸盐($\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$)溶解于5 mL 底物缓冲液中。底物溶液制备需在孵育结束前15 min内,避光条件下制备。
- 3.1.9 终止液:12 g 氢氧化钠(NaOH)溶于100 mL 蒸馏水。