

玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法

The detection of pathogen for Maize Rough Dwarf disease by dot immuobinding assay method

地方标准信息服务平台

2019 - 12 - 04 发布

2019 - 12 - 25 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：周彤、杜琳琳、周益军、孙枫、兰莹、李硕、范永坚。

地方标准信息服务平台

玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法

1 范围

本标准规定了大麦、小麦、玉米植株和灰飞虱携带玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法。
本标准适用于大麦、小麦、玉米植株和灰飞虱携带玉米粗缩病病原的检测。

2 斑点酶联免疫吸附检测原理

硝酸纤维素膜具有很强的静电吸附力，中性条件下即可有效地吸附蛋白质等生物大分子。将抗原吸附于硝酸纤维素膜后，可利用膜作为固相载体进行抗原抗体反应。当加入抗原的特异性抗体后，即可与膜上的抗原结合，然后再加入带有标记物的二抗，使酶标记通过二抗和相应抗体的结合间接地交联于纤维素膜上。最后加入标记物相应的底物后，标记物即可与底物作用形成不溶性产物，呈现斑点状着色。

3 仪器设备与试剂材料

3.1 仪器设备

台式离心机（5 000 r/min）；具盖塑料离心管：200 μ L；培养皿（直径为90 mm）；塑料盒（规格为100 mm \times 50 mm）。

3.2 试剂材料

3.2.1 试验用水均为蒸馏水，使用的化学试剂未作说明均为分析纯级别。

3.2.2 包被缓冲液：0.05 mol/L，pH值9.6。称取 1.59 g Na_2CO_3 和2.93 g NaHCO_3 ，加水定容至1 000 mL，用HCl调pH值至9.6，4 $^\circ$ C保存。

3.2.3 磷酸盐Tween 20缓冲液（0.01M PBST）：0.01mol/L，pH=7.5。称取40 g NaCl，1 g KCl，1 g KH_2PO_4 和15 g Na_2HPO_4 ，加水定容至5 000 mL，用HCl调节pH值至7.5，再加入2.5 mL Tween 20，4 $^\circ$ C保存。

3.2.4 磷酸盐缓冲液（0.02M PBS）：0.02 mol/L，pH值7.5。称取40 g NaCl，1 g KCl，1 g KH_2PO_4 ，15 g Na_2HPO_4 ，加水定容至2 500 mL，4 $^\circ$ C保存。

3.2.5 1%脱脂奶粉封闭液：1 g脱脂奶粉加入100 mL磷酸盐Tween20缓冲液中，4 $^\circ$ C保存。

3.2.6 辣根过氧化物酶固体显色底物溶液：6 mg的4-氯-1-萘酚加入2 mL无水乙醇中，4 $^\circ$ C保存备用，使用时加入10 mL 磷酸盐缓冲液中，再加入10 μ L H_2O_2 。

3.2.7 BCIP/NBT显色底物：碱性磷酸酶底物显色试剂盒。

3.2.8 单克隆抗体（单抗）：玉米粗缩病病原RBSDV单克隆抗体，效价为1:5 000~1:10 000，-20 $^\circ$ C保存。

3.2.9 酶标二抗：Goat Anti-Mouse IgG Antibody，HRP（检测灰飞虱），Goat Anti-Mouse IgG Antibody，AP（检测植物），-20 $^\circ$ C保存。

4 植物样品检测