

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1804—2009

---

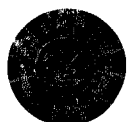
### 甘蔗花叶病毒检测技术规范

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。

4.1.2.9 加底物溶液:每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含 1 mg/mL PNP 的底物显色缓冲液,在室温下避光保湿孵育 30 min~60 min。

4.1.2.10 终止反应:每孔加入 50  $\mu\text{L}$  3 mol/L NaOH 终止反应,在酶标仪上测定波长 405 nm 吸光值 ( $\text{OD}_{405}$ ),并打印结果。

#### 4.1.3 结果判定

样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值大于或等于 2,判为阳性;

样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值小于或等于 1.5 时判为阴性;

样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值在 1.5~2 之间,应经进一步确认。

### 4.2 反转录-多聚合酶链式反应(RT-PCR)检测法

#### 4.2.1 引物

上游引物 SCMV-F5:5'-GAAGAWGTYTTCCAYCAAKCWGGAAC-3'(W=T/A, Y=C/T, K=G/T);

下游引物 SCMV-R3:5'-AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC-3';

预期扩增片段为 906 bp。

#### 4.2.2 操作步骤

##### 4.2.2.1 总 RNA 提取

从取样(保存)样品中切取 1 g 样品,加液氮在大小合适的离心管或研钵中研磨成粉末,转至 2 mL 离心管,加 600  $\mu\text{L}$  水饱和酚与 600  $\mu\text{L}$  2 $\times$ RNA 抽提缓冲液,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 20 min,上清转移至新离心管,加入等体积 4 mol/L LiCl,混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$  沉淀过夜,4 $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 70%乙醇漂洗数次,风干,用 30  $\mu\text{L}$  DEPC 处理过的水溶解,-70 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用 RNA 提取试剂盒的,操作步骤参照产品说明书。

阳性样品为已知带 SCMV 的材料或 SCMV 提纯液,阴性样品为已知不带 SCMV 的材料,按同样方法制备和保存。

##### 4.2.2.2 反转录及 PCR 反应

以样品总 RNA,以及阴性、阳性对照总 RNA 为模板,可选用一步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录和 PCR 扩增,实验步骤按产品说明书进行。

若不是采用一步法 RT-PCR 试剂盒,以 SCMV-R3 为反转录引物,参照反转录酶产品说明合成 cDNA,然后在 PCR 反应管中依次加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L 的四种脱氧核糖核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)混合液 0.4  $\mu\text{L}$ 、上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 10 ng~20 ng、TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ ,根据 cDNA 模板的用量加入无菌重蒸馏水,使 PCR 反应体系达到 20  $\mu\text{L}$ ,每个试样 3 次重复。

以 4 000 r/min 离心 10 s 后,将 PCR 管放入 PCR 仪中,94 $^{\circ}\text{C}$  预热 4min;进行 35 次扩增循环(94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min);72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。取出 PCR 反应管,对反应产物进行电泳检测或 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

##### 4.2.2.3 扩增产物的电泳检测

将适量的琼脂糖加入 1 $\times$ TAE 缓冲液中,加热将其溶解,配制琼脂糖浓度为 1%的溶液,然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5  $\mu\text{L}$  溴化乙锭溶液的比例,加入溴化乙锭溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,室温下凝固成凝胶后,放入 1 $\times$ TAE 缓冲液中。在每个泳道中加入 7.5  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物(需和上样缓冲液混合),其中一个泳道中加入 DNA 分子量标记,接通电源进行电泳。

##### 4.2.2.4 凝胶成像分析

电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统成像仪上或紫外投射仪上成像,根据 DNA 分子量标记判断扩增出的目的条带的大小,将电泳结果形成文件存档或用照相系统拍照。

#### 4.2.3 结果判定

如果阳性对照和检测样品中同时出现目的扩增条带,而阴性对照、空白对照均不出现该条带,该样品判为阳性;

如果阳性对照出现目的扩增条带,而阴性对照、空白对照及检测样品中均不出现该条带,则该样品判为阴性;

如果空白、阴性对照出现目的条带,或阳性对照未出现目的条带,应重新进行 RT-PCR 检测。

附录 A  
(规范性附录)

双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)法试剂及缓冲液配制

A.1 抗体或试剂盒

SCMV 单克隆抗体,碱性磷酸酯酶标二抗,DAS-ELISA 检测试剂盒均来自市售。

A.2 缓冲液及配制

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,配制好的溶液在 4℃ 条件下保存。

A.2.1 PBST 洗液(pH 7.4)

氯化钠(NaCl) 8.00 g,氯化钾(KCl) 0.20 g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.15 g,磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.20 g,吐温-20(Tween-20)0.5 mL,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

A.2.2 ECI 缓冲液

牛血清白蛋白(BSA)2.0 g,聚乙烯吡咯烷酮(PVP, $\text{MW}_{24\,000-40\,000}$ )20.0 g,叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ) 0.2 g,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

A.2.3 包被液(pH 9.6)

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )1.59 g,碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )2.93 g,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

A.2.4 通用样品提取缓冲液(pH 7.4)

亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) 1.3 g,聚乙烯吡咯烷酮(PVP, $\text{MW}_{24\,000-40\,000}$ )20.0 g,吐温-20(Tween-20)20 mL,鸡蛋清粉 2.0 g,用 PBST 溶解并定容至 1 000 mL。

A.2.5 封闭液(pH 7.4)

牛血清白蛋白(BSA)2.0 g,聚乙烯吡咯烷酮(PVP, $\text{MW}_{24\,000-40\,000}$ )20.0 g,用 PBST 溶解并定容至 1 000 mL。

A.2.6 PNP 底物显色缓冲液(pH 9.8)

二乙醇胺( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ) 97 mL,氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )0.1 g,用盐酸(HCl)调 pH 至 9.8,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

**附 录 B**  
(规范性附录)

**反转录-多聚合酶链式反应(RT-PCR)法试剂及缓冲液配制**

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,所用试剂和缓冲液均用 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理过的双蒸水配制。

**B. 1 化学试剂**

- B. 1. 1 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- B. 1. 2 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na · 2H<sub>2</sub>O)。
- B. 1. 3 十二烷基磺酸钠(SDS)。
- B. 1. 4 氯化锂(LiCl)。
- B. 1. 5 三氯甲烷(chloroform)。
- B. 1. 6 异戊醇(isoamyl alcohol)。
- B. 1. 7 氯化钠(NaCl)。
- B. 1. 8 亚硫酸钠(Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)。
- B. 1. 9 溴化乙锭(EB)。

**B. 2 分子生物学试剂**

- B. 2. 1 各 10 mmol/L 的四种脱氧核糖核苷酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)混合溶液。
- B. 2. 2 Taq DNA 聚合酶(5 单位/ $\mu$ L)及 10 $\times$ PCR 反应缓冲液(含 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>)。
- B. 2. 3 植物 RNA 提取试剂盒。
- B. 2. 4 反转录酶及缓冲液,反转录试剂盒。
- B. 2. 5 DNA 分子量标记。
- B. 2. 6 引物溶液:用 DEPC 处理过的水将上、下游引物分别配制成浓度为 10  $\mu$ mol/L 的水溶液。

**B. 3 缓冲液**

- B. 3. 1 RNA 抽提缓冲液:20 mmol/L Tris - HCl(pH 8. 0), 1% 十二烷基磺酸钠, 200 mmol/L 氯化钠, 5 mmol/L EDTA, 1%亚硫酸钠。
- B. 3. 2 加样缓冲液:称取溴酚蓝 250 mg,加水 10 mL,在室温下过夜溶解;再称取二甲苯晴蓝 250 mg,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 50 g,用 30 mL 水溶解,合并三种溶液,用水定容至 100 mL,在 4 $^{\circ}$ C 中保存。
- B. 3. 3 50 $\times$ TAE 缓冲液:取 Tris 242. 2 g,先用 300 mL 水加热搅拌溶解后,加 100 mL 500 mmol/L EDTA 的水溶液(pH 8. 0),用冰乙酸调 pH 至 8. 0,用水定容到 1 000 mL。

中华人民共和国  
农业行业标准  
甘蔗花叶病毒检测技术规范  
NY/T 1804—2009

\* \* \*

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)  
(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)  
北京昌平环球印刷厂印刷  
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

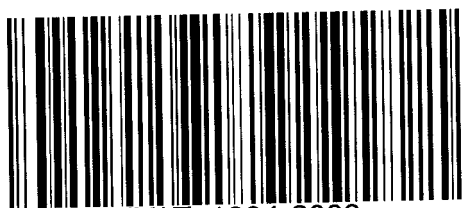
开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 7千字  
2009年12月第1版 2009年12月北京第1次印刷

书号: 16109·1972

定价: 18.00元

---

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 65005894



NY/T 1804-2009