

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1750—2009

---

## 甜菜丛根病的检验 酶联免疫法

**Determination of rhizomania in sugarbeet  
ELISA method**

2009-04-23 发布

2009-05-20 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部甜菜品质监督检验测试中心。

本标准主要起草人：马龙彪、吴玉梅、张福顺、王哲玮、张玉霜、李成玉。

## 甜菜丛根病的检验 酶联免疫法

### 1 范围

本标准规定了甜菜丛根病的检验方法。

本标准适用于甜菜植株丛根病的检验。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB / T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 甜菜丛根病 rhizomania

由甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)侵染，以甜菜多黏菌(*Polymyxa betae*)为传播介体的一种土传病害，致使甜菜块根外表形成不规则纤细根群，象胡须一样。

### 4 原理

在测定时，把受检标本和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应，用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量有一定的比例，加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量成正比，根据颜色反应的深浅进行定性分析。

### 5 试剂和材料

除非另有说明，本标准所用试剂，均指分析纯试剂；所使用的水符合 GB / T 6682 中规定的三级水规定。

5.1 0.5 mol / L 盐酸溶液：取浓盐酸(HCl) 45 mL 用水定容至 1 000 mL。

5.2 1.0%氢氧化钠(NaOH)溶液：称取 1 g 氢氧化钠(NaOH)，用水定容至 100 mL。

5.3 包被缓冲液(pH9.6)：分别准确称取无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )1.59 g，碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )2.93 g，叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )0.20 g，然后在 900 mL 水中溶解，用 0.5 mol / L 盐酸溶液(5.1)调节 pH 至 9.6，用水定容至 1 000 mL。

5.4 PBS 磷酸缓冲液(pH7.4)：分别称取氯化钠( $\text{NaCl}$ ) 8.0 g，磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2 g，磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.15 g，氯化钾( $\text{KCl}$ ) 0.2 g，叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ) 0.2 g，然后在 900 mL 水中溶解，用 1.0%氢氧化钠溶液(5.2)或 0.5 mol / L 盐酸溶液(5.1)调节 pH 为 7.4，用水定容至 1 000 mL。

5.5 PBS -Tween(PBST)缓冲液：吸取 0.5 mL 吐温-20，用溶液 PBS 磷酸缓冲液(5.4)定容至 1 000 mL。

5.6 样品提取缓冲液：称取聚乙烯吡咯烷酮( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$ )<sub>n</sub> 2.0 g，用 PBS -Tween(PBST)缓冲液(5.5)溶解，并定容至 100 mL。

5.7 连接缓冲液：称取聚乙烯吡咯烷  $N(C_6H_6NO)_n$  2.0 g，卵蛋白质 2.0 g，用 PBS-Tween(PBST)缓冲液(5.5) 60 mL 溶解，并定容至 100 mL。

5.8 底物缓冲液：称取叠氮化钠( $NaN_3$ ) 0.2 g，在 600 mL 水中溶解，加入二乙醇胺( $C_4H_{11}NO_2$ ) 97 mL，用 0.5 mol/L 盐酸溶液(5.1)调节 pH 为 9.8，用水定容至 1 000 mL。

5.9 试剂组成

5.9.1 阳性对照物。

5.9.2 阴性对照物。

5.9.3 一抗 IgG。

5.9.4 二抗 IgG-AP。

5.10 抗体 (IgG) 溶液配制：用包被缓冲液 (5.3) 根据一抗 IgG 说明进行稀释。

5.11 酶标抗体 (IgG-AP) 溶液配制：用包被缓冲液 (5.3) 根据二抗 IgG-AP 说明进行稀释。

5.12 1 mg/mL 4-硝基苯磷酸盐配制：准确称取 4 硝基苯磷酸盐 ( $C_6H_4NNa_2O_6P$ ) 0.1 g，用底物缓冲液(5.8)溶解，并定容至 100 mL。

## 6 仪器和设备

6.1 恒温箱。

6.2 分析天平：感量为 0.000 1 g。

6.3 96 孔酶标板。

## 7 分析步骤

### 7.1 样品制备

取甜菜须根，洗净，称取 0.1 g，加 1.0 mL 样品提取缓冲液(5.6)，在研钵上研磨至均匀悬浮状备用。

### 7.2 实验步骤

7.2.1 在酶标板中每孔加入 200  $\mu$ L 抗体溶液(5.10)，在 37 $^{\circ}$ C 下保持 2 h~4 h。

7.2.2 用 PBS 磷酸缓冲液(5.4)冲洗(可使用洗板机)3 次(每次浸泡几分钟)，将酶标板倒扣在滤纸上，轻敲吸干。

7.2.3 在每个孔中加入 200 $\mu$ L 检测样品，2 次重复，同时做阴性对照、阳性对照以及样品空白，在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。

7.2.4 重复步骤 7.2.2，加入酶标抗体溶液(5.11) 200  $\mu$ L，在 37 $^{\circ}$ C 下温育 4 h。

7.2.5 重复步骤 7.2.2，加入 4-硝基苯磷酸盐溶液(5.12) 200  $\mu$ L，室温下 30 min~60 min，或延长至理想反应结果，目测结果。

## 8 结果的表述

根据酶标板的显色反应，进行结果判定。显色反应中，阳性对照为黄色，若检测样品呈现黄色即为含有甜菜坏死黄脉病毒，可以定性为该检测样品感染甜菜丛根病。

使用购买的甜菜丛根病 ELISA 检验试剂盒进行检验，按照试剂盒的说明进行。