

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 401—2000

脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

**Rules for virus detection of virus-free
seed (seedling) potatoes**

2000-09-22 发布

2000-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

为了有效地实施对脱毒马铃薯种薯质量检验和管理,规范脱毒马铃薯种薯市场,促进马铃薯脱毒技术推广,实现脱毒种薯病毒检测的规范化、标准化,特制定本规程。本规程在参照国内外马铃薯病毒检测技术最新研究进展的基础上,结合当前国内生产实际,力求达到快速、准确、可操作性强的检测要求。检测对象主要选择生产上发生分布范围广、危害性大的病毒。检测方法主要采用指示植物检测和双抗体夹心酶联免疫吸附检测方法,而类病毒检测采用指示植物检测、往返电泳或反转录-聚合酶链反应检测方法。

本规程内容包括脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测的适用范围、检测对象、抽样方法、检测方法和质量要求。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准主要起草单位:农业部植物脱毒种苗质量监督检验测试中心(济南)、山东省植物保护总站。

本标准主要起草人:孙作文、王同伟、商明清、杨勤民、徐鲁、刘敬东。

中华人民共和国农业行业标准

脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

NY/T 401—2000

Rules for virus detection of virus-free seed (seedling) potatoes

1 范围

本标准规定了脱毒马铃薯种薯、组培苗的病毒检测方法和操作规程。
本标准适用于脱毒马铃薯种薯、组培苗的病毒检测。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 7331—1987 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 18133—2000 马铃薯脱毒种薯

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 脱毒苗

应用茎尖组织培养技术获得的再生试管苗,经检测确认不带马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)等病毒和马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd),才确认是脱毒苗。

3.2 脱毒种薯

从繁殖脱毒苗开始,经逐代繁殖增加种薯数量的种薯生产体系生产出来的。

脱毒种薯分为基础种薯和合格种薯两类。基础种薯是指用于生产合格种薯的原原种和原种;合格种薯是指用于生产商品薯的种薯。

3.2.1 基础种薯(分为三级)

3.2.1.1 原原种 pre-elite

用脱毒苗在容器内生产的微型薯(microtuber)和在防虫网室、温室条件下生产出的符合质量标准的种薯或小薯(minituber)。

3.2.1.2 一级原种 elite I

用原原种作种薯,在良好隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯。

3.2.1.3 二级原种 elite II

用一级原种作种薯,在良好隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯。

3.2.2 合格种薯(分为二级)

3.2.2.1 一级种薯 certified grade I

用二级原种作种薯,在隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯。

3.2.2.2 二级种薯 certified grade II

中华人民共和国农业部 2000-09-22 批准

2000-12-01 实施

用一级种薯作种薯,在隔离条件下生产出的符合质量标准的种薯。

3.3 病毒病株允许率

脱毒种薯繁殖田中病毒病株的允许比率。

4 检测对象

- 马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX);
- 马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY);
- 马铃薯 S 病毒(Potato virus S, PVS);
- 马铃薯卷叶病毒(Potato leaf roll virus, PLRV);
- 马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)。

5 抽样

5.1 组培苗抽样

- 5.1.1 脱毒核心材料:每株必须检测。
- 5.1.2 扩繁苗:随机抽取 1%~2%的扩繁苗检测。

5.2 田间抽样

田间抽样数量及抽样时期应符合 GB 18133—2000 中 6.2 的规定。

5.3 商品种薯抽样

没有经过田间检验的种薯必须进行块茎检验。

- 5.3.1 根据种薯不同存放方式,采用分层设点取法或随机取法,抽样数量见表 1。

表 1 抽样数量标准表

种薯总量,kg	抽样百分率,%	抽样最低数量,kg
≤10 000	6~10	100
>10 000	3~5	
注:不足抽样最低数量的全部作为混合样品。		

- 5.3.2 将第一次抽取的样品混合后,进行二次抽样,随机抽取 10%的混合样品检测。

6 检测方法

6.1 指示植物检测法

按 GB 7331—1987 中 F4 规定的方法执行。

6.2 双抗体夹心酶联免疫检测法

检测方法见附录 A。

6.3 往返电泳检测法或反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测法

用于检测马铃薯纺锤块茎类病毒,检测方法见附录 B 和附录 C。

7 质量要求

凡指示植物检测、酶联免疫检测、往返电泳检测或 RT-PCR 检测呈阳性反应者为带毒种薯(苗)。各级种薯病株病毒允许率应符合 GB 18133—2000 中第 5 章的规定。

附录 A

(标准的附录)

双抗体夹心酶联免疫检测法

A1 溶液配制

所用化学试剂为分析纯级规格,用水为蒸馏水。

A1.1 洗涤缓冲液(PBST,pH7.4)

氯化钠(NaCl)	8.00 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.93 g(或 Na ₂ HPO ₄ 1.15 g)
氯化钾(KCl)	0.20 g
吐温-20(Tween-20)	0.50 mL

溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL,4℃保存。

A1.2 抽提缓冲液(pH7.4)

20.00 g 聚乙烯吡咯烷酮(MW_{24000~40000})溶于 1 000 mL PBST 中。

A1.3 包被缓冲液(pH9.6)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
叠氮钠(NaN ₃)	0.20 g

溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL,4℃保存。

A1.4 封板液

牛血清白蛋白(或脱脂奶粉)	2.00 g
聚乙烯吡咯烷酮(MW _{24000~40000})	2.00 g

溶于 100 mL PBST 中,4℃保存。

A1.5 酶标抗体稀释缓冲液

牛血清白蛋白(或脱脂奶粉)	0.10 g
聚乙烯吡咯烷酮(MW _{24000~40000})	1.00 g
叠氮钠(NaN ₃)	0.01 g

溶于 100 mL PBST 中,4℃保存。

A1.6 底物缓冲液

二乙醇胺	97 mL
叠氮钠(NaN ₃)	0.20 g

溶于 800 mL 蒸馏水中,用 2 mol/L 盐酸调 pH 至 9.8,定容至 1 000 mL,4℃保存。

A1.7 底物溶液(现用现配)

0.05 g 4-硝基苯酚磷酸盐溶于 50 mL 底物缓冲液中。

A2 样品制备

取样品 0.5~1.0 g,加入 5 mL 抽提缓冲液,研磨,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

A3 操作步骤

A3.1 包被抗体:每孔加 100 μL 用包被缓冲液按工作浓度稀释的抗体,37℃保湿孵育 2~4 h 或 4℃保

湿过夜。

A3.2 洗板:用洗涤缓冲液洗板 4 次,每次 3~5 min。

A3.3 封板:每孔加 200 μL 封板液,34 $^{\circ}\text{C}$ 保湿孵育 1~2 h。

A3.4 洗板:同 A3.2。

A3.5 包被样品:每孔加样品 100 μL ,34 $^{\circ}\text{C}$ 保湿孵育 2~4 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 保湿过夜。同时设阴性、目标病毒的阳性和空白对照,可根据需要设置重复。

A3.6 洗板:用洗涤缓冲液洗板 4~8 次,每次 3~5 min。

A3.7 包被酶标抗体:每孔加 100 μL 用抗体稀释缓冲液稀释到工作浓度的碱性磷酸酯酶标记抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h。

A3.8 洗板:同 A3.2。

A3.9 加底物溶液:每孔加 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 保湿条件下反应 1 h。

A3.10 酶联检测:用酶联检测仪测定 405 nm 的光吸收值(OD_{405}),记录反应结果。

阳性判断标准: $\frac{\text{检测样品 } \text{OD}_{405}}{\text{阴性对照 } \text{OD}_{405}} \geq 2$ 为阳性

附录 B

(标准的附录)

往返电泳检测法

B1 溶液配制

所用化学试剂为分析纯级规格,用水为蒸馏水。

B1.1 抽提缓冲液(pH7.5)

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 6.06 g

乙二胺四乙酸(EDTA) 1.86 g

氯化钠(NaCl) 5.84 g

溶于 800 mL 蒸馏水中,用盐酸调 pH 至 7.5,定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B1.2 TBE 电泳缓冲液(pH8.3)

Tris 10.78 g

硼酸 5.50 g

EDTA 0.93 g

溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

B1.3 5%聚丙烯酰胺凝胶配方

30% 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺储备液(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1) 7.5 mL

N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)原液 0.045 mL

20% 过硫酸铵(现用现配) 0.4 mL

10 \times TBE 缓冲液 4.5 mL

加蒸馏水至 45 mL。

B1.4 显影液

氢氧化钠 6.40 g

硼氢化钠 0.40 g

甲醛 1.6 mL

溶于 400 mL 蒸馏水中。

B1.5 指示染料溶液

40%蔗糖, 0.03%的二甲苯蓝。

B2 样品制备

B2.1 研磨: 取 0.5~1.0 g 待检样品, 加入 2 mL 抽提缓冲液、2 mL 用抽提缓冲液饱和的酚、少许十二烷基磺酸钠(SDS)、1~2 滴 2-巯基乙醇, 研磨, 同时设阴性对照、阳性对照。

B2.2 离心: 加入 2 mL 氯仿-异戊醇(24:1), 继续研磨 2 min, 4 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。

B2.3 沉淀: 取上清液加入 3 mol/L 醋酸钠使其终浓度为 300 mmol/L, 并加入 3 倍体积 95% 的冷乙醇, 冰浴 1 h, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀抽干。

B2.4 回溶: 取用 400 μ L TBE 缓冲液溶解沉淀, 备用。

B3 往返电泳

B3.1 制板: 取洁净的电泳板, 1%琼脂糖封底, 制成 5%聚丙烯酰胺凝胶板。

B3.2 加样: 取 20 μ L 制备好的样品, 加入 5 μ L 指示染料溶液混匀后加入样品槽。

B3.3 第一向电泳: 在 380 V 电压下电泳至二甲苯蓝距胶底约 1 cm 时停止电泳。

B3.4 第二向电泳: 更换新的电泳缓冲液(75 $^{\circ}$ C), 交换正负极, 在 65 $^{\circ}$ C 温箱内、380 V 电压下电泳至二甲苯蓝距胶底约 1 cm 时停止电泳, 取下胶板染色。

B4 染色

B4.1 固定: 将胶板在固定液(10%乙醇、0.5%乙酸)中固定 15 min 或过夜。

B4.2 染色: 在 0.19% 的硝酸银溶液中染色 20 min。

B4.3 漂洗: 用蒸馏水漂洗 4 次, 每次 3~5 min。

B4.4 显影: 在显影液中显色 10 min。

B4.5 增色: 在 7.5 g/L 碳酸钠溶液中增色 10 min, 取出胶板放入固定液中, 观察结果。

阳性判断: 与阳性对照相同位置有明显带出现的为阳性。

附 录 C

(标准的附录)

反转录-聚合酶链反应检测法

C1 溶液配制

所用化学试剂为分析纯级规格。

C1.1 核酸提取缓冲液: 100 mmol/L 氯化钠, 100 mmol/L Tris-HCl(pH9.0), 10 mmol/L EDTA, 0.5%皂土, 0.5%十二烷基磺酸钠(SDS), 1% 2-巯基乙醇。

C1.2 1 \times TAE 缓冲液: 40 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 乙酸钠, 2 mmol/L EDTA(用冰乙酸调 pH 至 8.0)。

C1.3 缓冲液 I: 内含 0.2 mol/L 氯化钠的 1 \times TAE 缓冲液。

C1.4 缓冲液 II: 内含 1.5 mol/L 氯化钠的 1 \times TAE 缓冲液。

C1.5 5 \times cDNA 第一链合成缓冲液: 250 mmol/L Tris-HCl(pH8.3), 375 mmol/L 氯化钾, 150 mmol/L 氯化镁, 250 mmol/L DTT。

C1.6 10 \times PCR 缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.3), 500 mmol/L 氯化钾, 150 mmol/L 氯化镁, 0.1%牛血清蛋白(BSA)。

C1.7 6%聚丙烯酰胺凝胶配方

30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺储备液(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1)	9.0 mL
10×TAE 缓冲液	4.5 mL
N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)原液	0.045 mL
20%过硫酸铵(现用现配)	0.4 mL
加蒸馏水至 45 mL。	

C2 模板核酸(PSTVd RNA)的制备

取待检样品 0.5~1.0 g,在液氮中研磨,加 2~3 mL 核酸提取缓冲液研磨匀浆,加等体积水饱和酚(内含 0.1% 8-羟基喹啉),继续研磨匀浆,再加等体积氯仿,匀浆。4℃,8 000~9 000 r/min 离心 15 min。取上清过 1×3 cm DEAE-纤维素柱,先用 10 mL 缓冲液 I 冲洗柱子,再用缓冲液 I 洗脱,每次加 1 mL,待洗脱液有颜色时开始收集,直到洗脱液无颜色为止。向洗脱液中加入 3 倍体积的冷乙醇,-20℃ 沉淀过夜,10 000 r/min 冷冻离心 20 min。取沉淀用 75% 的乙醇洗涤,10 000 r/min 冷冻离心 15 min。收集沉淀,干燥后,用 0.4 mL 1×TAE 缓冲液溶解,即为 PSTVd 的模板核酸样品。

C3 PCR 扩增

C3.1 引物:引物 1(P1)的碱基序列为 5'CGGGTACCCGTTACACCT3',引物 2(P2)的碱基序列为 5'CCGAGCTCGGTCCAGGAGGT3'。

C3.2 PCR 扩增方法

C3.2.1 cDNA 的合成

在 0.5 mL 全子离心管(eppendorf)管中加入:模板核酸 1 μL,10 μmol/L 互补引物 1(P1)1 μL,无菌重蒸馏水 9 μL,95℃ 水浴 5 min。然后向管中加入下列混合物:40 U/μL rRNasin 1 μL,5×第一链合成缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,200 U/μL MMLV 逆转录酶 1 μL,42℃ 水浴保温 1 h。

C3.2.2 PCR 扩增

向 0.5 mL eppendorf 管中加入以下试剂:无菌重蒸馏水 37 μL,10×PCR 缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上游引物 1(P1)1 μL,10 μmol/L 下游引物 2(P2)1 μL,cDNA 4 μL,混匀后用 50 μL 石蜡油覆盖,95℃ 变性 10 min。然后加入 TaqDNA 聚合酶 1 μL,用 PCR 进行扩增 94℃ 3 min,60℃ 1 min,72℃ 90 s 进行预循环后,依 94℃ 40 s,60℃ 60 s,72℃ 90 s(最后一次 10 min)进行 40 次循环。

C4 扩增产物检测

C4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳

取洁净的电泳板,1%的琼脂糖封底,制成 6%聚丙烯酰胺凝胶板,120~140 V 电泳至溴酚蓝走到胶底进停止电泳。电泳缓冲液为 TAE 缓冲液。

C4.2 染色

C4.2.1 固定:将胶板在固定液(10%乙醇、0.5%乙酸)中固定 15 min 或过夜。

C4.2.2 染色:在 0.19% 的硝酸银溶液中染色 20 min。

C4.2.3 漂洗:用蒸馏水漂洗 4 次,每次 3~5 min。

C4.2.4 显影:在显影液(氢氧化钠 6.4 g,硼氢化钠 35 mg,甲醛 1.6 mL,溶于 400 mL 蒸馏水)中显色 10 min。

C4.2.5 增色:在 7.5 g/L 碳酸钠溶液中增色 10 min,取出胶板放入固定液中,观察结果。

C4.2.6 阳性判断:与阳性对照相同位置有明显带出现的为阳性。