



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28974—2012

---

## 马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法 纳米颗粒 增敏胶体金免疫层析法

Detection and identification of potato virus A—Nanoparticles-enlarged in colloidal  
gold immunochromatographic assay

2012-12-31 发布

2013-06-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国湖南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:邹明强、张帆、李锦丰、陈艳、戴华、田世民、马吉湘、金涌。

## 引 言

本文件的发布机构提请注意,申明符合本文件时,可能涉及到 6.4.3、B.4 与增敏试剂相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

该专利持有人:中国检验检疫科学研究院

联系人:邹明强

地址:北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号 中国检验检疫科学研究院 邮编:100123

请注意除上述专利外,本文件的某些内容能够仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

## 马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法 纳米颗粒 增敏胶体金免疫层析法

### 1 范围

本标准规定了用纳米颗粒增敏胶体金免疫层析法检测马铃薯 A 病毒的原理、实验步骤及结果判定等。

本标准适用于植物及其产品组织中马铃薯 A 病毒的快速筛查。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 23629—2009 引进植物病原生物安全控制技术要求

GB/T 23632—2009 进境植物检疫截获有害生物鉴定复核规程

### 3 马铃薯 A 病毒基本信息

中文名:马铃薯 A 病毒

学名:potato virus A

缩写:PVA

分类地位:马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae)马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。

马铃薯 A 病毒的其他信息参见附录 A。

### 4 方法原理

基于胶体金免疫层析双抗体夹心检测法原理,采用氯金酸与还原剂反应生成的纳米金颗粒对常规胶体金免疫层析试纸条进行处理,提高检测灵敏度,根据试纸条颜色的变化,判定待测样品中是否存在马铃薯 A 病毒。

### 5 仪器设备、用具及试剂材料

#### 5.1 仪器设备

天平(感量,1/10 000 g)、离心机、组织捣碎机、低温冰箱等。

#### 5.2 用具

微量移液器(2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、研钵、离心管等。

### 5.3 试剂材料

纳米颗粒增敏胶体金免疫层析法测定马铃薯 A 病毒试剂材料(见附录 B)。

## 6 实验步骤

### 6.1 生物安全与废弃物处理

实验过程中的生物安全要求应严格按照 GB 19489 的规定进行操作,实验废弃物按照 GB/T 23629—2009 中 5.7 进行处理。

### 6.2 样品制备

称取 1 g 植物或其产品组织,加入 2 mL 样品提取缓冲液用研钵研磨,然后 4 ℃ 下 3 000 g~5 000 g 离心 10 min,取上清液制备成一个样品。

### 6.3 样本存放

制备的样品在 2 ℃~8 ℃ 条件下保存应不超过 24 h,若需长期保存,应置-70 ℃ 以下,避免反复冻融。

### 6.4 病毒检测

#### 6.4.1 检测步骤

取同一批次胶体金免疫层析增敏快速检测试纸条(即开即用),置于平整的台面上,向样品垫中分别加入被检样品、阳性对照和阴性对照各 100 μL,每个试验同时做平行。室温放置 15 min,观察检测线和质控线条带。

#### 6.4.2 质量控制

质控线条带出现颜色,阳性对照检测线条带出现颜色,阴性对照检测线条带不出现颜色,检测结果有效。如果质控线条带不出现颜色,或阳性对照检测线条带不出现颜色,或阴性对照检测线条带出现颜色,出现任何一种现象以上者,说明检测结果无效,另选一批次试纸条重新按 6.4.1 操作。

#### 6.4.3 增敏实验

向检测线没有产生颜色条带的试纸条样品垫上加入 100 μL 的 PBST 缓冲溶液进行清洗,反复清洗 3 次,每次 1 min,然后在硝酸纤维素膜靠近结合垫端加入 30 μL 增敏试剂,室温反应 5 min~8 min 后,观察检测线条带颜色。

#### 6.4.4 结果判定

检测线条带出现颜色,判定为阳性;检测线条带不出现颜色,判定为阴性。

注:增敏前条带颜色为红色,增敏后因为氧化还原反应使条带颜色变为黑灰色。

## 7 结果的确认

可疑阳性样品应采用马铃薯 A 病毒 RT-PCR 检测方法进行确认。

## 8 样品的保存与复核

种子类样品保存 6 个月,如果发现带毒样品保存 1 年。植株中发现病毒的,采集病叶干燥后保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件。检测原始记录、照片等文档按有关规定做好登记、标记和存档,以便必要时复核。复核程序按照 GB/T 23632—2009 中第 6 章进行操作。

附 录 A  
(资料性附录)  
马铃薯 A 病毒相关资料

A.1 寄主范围

马铃薯 A 病毒的自然寄主为马铃薯(*Solanum tuberosum*);人工接种可侵染的植物(包括鉴别寄主)为番茄(*Lycopersicon esculentum* 和 *L. pimpinellifolium*)、假酸浆(*Nicandra physaloides*)、烟草(*Nicotiana debneyi*、*N. glauca*、*N. glutinosa*、*N. sanderae*、*N. sylverstris*、*N. tabacum* cv. Samsun 和 *N. tabacum* cv. White Burley)、*Solanum demissum* × *S. tuberosum* cv. Aquila (= A6 hybrid)、*S. demissum*“SdA”和 *Datura meteloides*。

A.2 病害症状

多数马铃薯受该病毒侵染无明显症状,有的品种表现出轻型花叶、脉间叶组织凸起呈褶皱状、叶脉或叶脉间呈现不规则浅色斑及叶缘呈波状等症状。

A.3 分布地区

马铃薯 A 病毒分布于很多马铃薯重要产区,可存在于种薯、组培苗中,在欧洲各国、日本、美国、新西兰以及中国的福建、黑龙江、云南等地均有分布。

A.4 传播方式

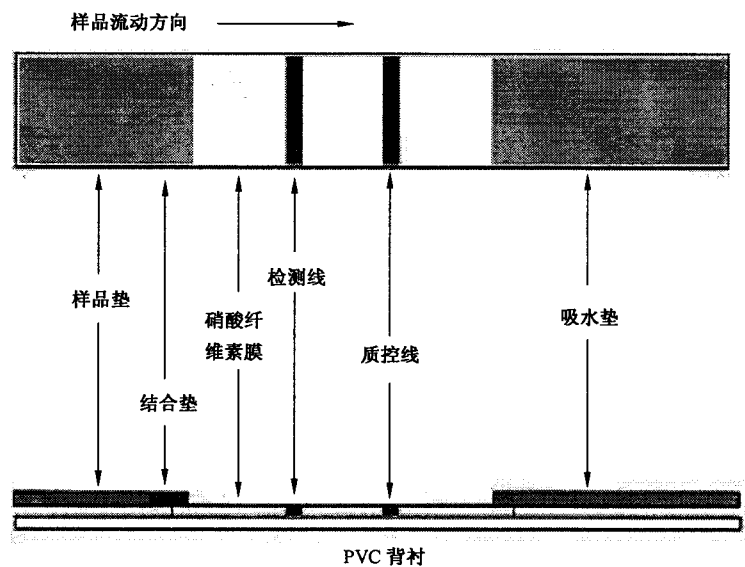
该病毒可通过汁液、种薯及介体蚜虫(*Aphis frangulae*、*A. nasturtii*、*Macrosiphon solanifolu*、*Myzus persicae* 及 *Neomyzus cirumflexus* 等)传播。

附录 B  
(规范性附录)

纳米颗粒增敏胶体金免疫层析法测定马铃薯 A 病毒试剂材料

B.1 胶体金免疫层析增敏快速检测试纸条

样品垫为玻璃纤维素片；结合垫是喷好了金标马铃薯 A 病毒单克隆抗体的玻璃纤维素片，免疫金释放时间小于 5 min，释放效率大于 80%；硝酸纤维素膜的检测线上包被了马铃薯 A 病毒多克隆抗体；质控线上包被了 1 mg/mL 的羊抗鼠 IgG；吸水垫为吸水纸。其结构见图 B.1。



其中：玻璃纤维素片：吸水速率大于 4 s/cm，吸水量大于 50 mg/cm<sup>2</sup>；  
硝酸纤维素膜(NC 膜)：毛细流动速率大于 25 s/cm；  
吸水纸：吸水速率大于 3 s/cm，吸水量大于 100 mg/cm<sup>2</sup>；  
聚氯乙烯(PVC)板：初粘力大于或等于 3 号球，持粘力标准条件下大于 80 h。

图 B.1 胶体金免疫层析增敏快速检测试纸条

B.2 样品提取缓冲液

|                                        |       |
|----------------------------------------|-------|
| PBST                                   | 1 L   |
| 亚硫酸钠(Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) | 1.3 g |
| PVP(MW24 000~40 000)                   | 20 g  |
| 叠氮钠(NaN <sub>3</sub> )                 | 0.2 g |
| 4℃储存。                                  |       |

B.3 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH 7.4)

|           |     |
|-----------|-----|
| 氯化钠(NaCl) | 8 g |
|-----------|-----|



|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 1.15 g |
| 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  | 0.2 g  |
| 氯化钾(KCl)                           | 0.2 g  |
| 吐温-20                              | 0.5 mL |
| 蒸馏水定容至 1 L。                        |        |

#### B.4 增敏试剂

将 1% 的氯金酸和 10 mmol/L 的盐酸羟胺按 1 : 5 的体积比混合,混合后 5 min 内使用。

#### B.5 阴性对照

取 1 g 的  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存的健康叶片组织,用研钵液氮研磨粉碎,加入 2 mL 样品提取缓冲液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 10 min (3 000  $g\sim 5\text{ }000\text{ }g$ ), 取上清液制备成阴性对照。

#### B.6 阳性对照

取 1 g 的  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存的灭活的病叶组织,用研钵液氮研磨粉碎,加入 2 mL 样品提取缓冲液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 10 min (3 000  $g\sim 5\text{ }000\text{ }g$ ), 取上清液制备成阳性对照。

---