



中华人民共和国国家标准

GB/T 36833—2018

马铃薯 X 病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato virus X*

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中华人民共和国中山出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、浙江大学、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘洪义、刘忠梅、车瑞丰、陈定虎、魏梅生、张星哲、李桂芬、张永江、吴建祥、封立平、袁建江、杨立群。

马铃薯 X 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯 X 病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于可能带有马铃薯 X 病毒的马铃薯植株、繁殖材料及其他寄主植物的检疫鉴定。

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 7331 马铃薯种薯产地检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 马铃薯 X 病毒基本信息

中文名:马铃薯 X 病毒

学名:*Potato virus X*

缩写:PVX

分类地位:甲型线状病毒科(*Alphaflexiviridae*),马铃薯 X 病毒属(*Potexvirus*)。

传播途径:田间自然条件下主要靠寄主植株不同部位、寄主植株之间接触摩擦进行机械传播,在农事或园艺操作中,还可以借助有关工具器械进行传播。远距离传播通过种薯等无性繁殖材料的调运完成。有资料表明马铃薯实生种子可传带该病毒,但在生产上意义不大;未见其他茄科作物种子传带该病毒的资料。据报道,某些昆虫如异黑蝗(*Melanoplus differentialis*)和绿丛螽斯(*Tettigonia viridissima*)的咀嚼式口器经机械作用可传播该病毒,菟丝子(*Cuscuta campestris*)和集合油壶菌(*Synchytrium endobioticum*)也能传播该病毒。

马铃薯 X 病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

PVX 的基因组特征和免疫原性是该病毒检疫鉴定的依据。依据 PVX 的基因组特征建立反转录 PCR(RT-PCR)、实时荧光反转录 PCR(Real-time RT-PCR)和反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法;依据 PVX 免疫原性建立酶联免疫吸附测定(ELISA)方法、免疫层析试纸条检测方法和斑点酶联免疫吸附测定(dot-ELISA)方法;通过这些方法的有效组合,判断样品是否带有 PVX。

5 仪器设备、用具及试剂

5.1 仪器设备

酶标仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳系统、生物安全柜、小型离心机、台式冷冻离心机、水浴锅、pH 计、凝胶成像系统、制冰机、超低温冰箱、常规冰箱、电子天平(0.001 g)、涡旋振荡器、组织捣碎机、超

净工作台、低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、恒温培养箱、紫外分光光度计等。

5.2 用具

可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、1 000 μL)、吸头、离心管和研钵等。

5.3 试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。

双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)所需试剂见附录 B,RT-PCR 检测所需试剂见附录 C,Real-time RT-PCR 检测所需试剂见附录 D,RT-LAMP 检测所需试剂见附录 E,免疫层析试纸条检测所需试剂见附录 F,dot-ELISA 检测所需试剂见附录 G。

6 样品的抽取及制备

6.1 抽样

马铃薯贸易商品或科研用薯材料或国际间种质交流材料等现场抽样按照 SN/T 2122 的规定执行,田间调查采样按照 GB 7331 的规定执行。

6.2 马铃薯组培苗、微型薯、块茎等样品的制备

将马铃薯组培苗、微型薯、块茎播于非土介质或灭菌土中,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右生长并进行症状观察。待长出 3 片~4 片真叶后将表现症状的植株单独编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。表现可疑症状的繁殖材料,可直接用于检测,必要时再进行栽培生长实验。

6.3 茄科等寄主植物种子样品的制备

将种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右生长并进行症状观察。待长出 3 片~4 片真叶后将表现症状的植株单独编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。

7 检疫鉴定方法

7.1 DAS-ELISA 检测

DAS-ELISA 检测见附录 B。如选用合格的试剂盒,按试剂盒说明操作。

7.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测见附录 C。

7.3 Real-time RT-PCR 检测

Real-time RT-PCR 检测见附录 D。

7.4 RT-LAMP 检测

RT-LAMP 检测见附录 E。

7.5 免疫层析试纸条检测

免疫层析试纸条检测见附录 F。如选用不同生产商的合格产品,按其操作说明操作。

7.6 dot-ELISA 检测

dot-ELISA 检测见附录 G。

8 结果判定

8.1 无可疑症状的样品,经 PVX 特异性的血清学检测(7.1、7.5、7.6 任选一种)或分子检测(7.2、7.3、7.4 任选一种)后,任意一项结果为阴性时,则判定样品不带有 PVX;有可疑症状的样品,经 PVX 特异性的血清学检测(7.1、7.5、7.6 任选一种)和分子检测(7.2、7.3、7.4 任选一种)后,两项结果均为阴性时则判定样品不带有 PVX。

8.2 PVX 特异性的血清学检测结果(7.1、7.5、7.6 任选一种)、分子检测结果(7.2、7.3、7.4 任选一种)中任意两项为阳性时,则判定样品带有 PVX。

9 样品保存与结果记录

9.1 样品保存

样品直接放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或冷冻干燥后放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 1 年,保存的样品要做好标记和登记工作。以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,应经灭活处理。

9.2 结果记录

完整的实验记录要包括:样品的来源、种类、时间、实验检测时间、地点、方法和结果,并有实验人员的签字;酶联免疫吸附方法应有酶联反应的原始数据, dot-ELISA 检测应有显色图片,免疫层析试纸条检测应有结果图片, RT-PCR 检测应有电泳结果图片, Real-time RT-PCR 检测应有扩增曲线结果图片, RT-LAMP 检测应有结果图片。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯 X 病毒背景资料

A.1 寄主范围

该病毒可侵染 16 科 240 种植物,茄科植物是其主要寄主,主要危害马铃薯(*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*)、烟草(*Nicotiana* spp.)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等。其诊断寄主有白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv. White burely)及其他烟草品种。初侵染的叶片通常表现为坏死斑,之后发展为坏死斑驳、褪绿、花叶或脉褪绿。在曼陀罗(*Datura stramonium*)上继斑驳之后产生褪绿环、脉褪绿或脉坏死。烟草栽培品种适于作繁殖寄主。千日红(*Gomphrena globosa*)是较好的指示植物,除 HB 株系外都产生局部斑。

A.2 分布

世界马铃薯栽培地区都有该病毒的发生。

A.3 病害症状及危害

在田间,PVX 侵染马铃薯植株,引起轻型花叶或者潜隐症状,若多年侵染则易引起重花叶或者植株矮化,造成 10%~80%减产。PVX 常与 PVY、PVS、PSTV 等病毒或类病毒复合侵染,使症状加剧。

A.4 粒体特征

马铃薯 X 病毒是一条正链 RNA 组成的线形病毒,RNA 长约 6.4 kb,病毒粒体呈线形,大小为 515 nm×13 nm。

A.5 基因组特征

PVX 基因组 RNA 的 5'-末端有 m⁷GpppA 帽子结构,3'-末端有 1 个 poly(A)尾结构,共包含 5 个开放式阅读框(open reading frame,ORF)。ORF1 编码 166 kDa 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase,RdRp),是 PVX 合成 RNA 必需的,也是唯一来源于自身的蛋白。中间的 ORF2、ORF3、ORF4 相互重叠,被称为三基因区段(triple-gene block,TGB),分别编码 25 kDa 的 TGBp1 蛋白、12 kDa 的 TGBp2 蛋白、8 kDa 的 TGBp3 蛋白,这些蛋白与病毒在寄主细胞间的移动有关,其中,TGBp1 蛋白已经被证明是一种转录后基因沉默的抑制因子,可打破寄主植物的防御反应,使病毒成功侵染。3'-末端的 ORF5 编码 25 kDa 的病毒外壳蛋白(capsid protein,CP),除具有包装核酸的功能外,也是病毒在细胞间移动所必需的,而且还能起到复制调节的作用。

另外,PVX 基因组还包括 5'-末端非翻译区域(5'-Untranslational region,5'-UTR)和 3'-端非翻译区域(3'-Untranslational region,3'-UTR)。5'-UTR 有 84 个核苷酸(nt),已有的研究表明,5'-UTR 对于病毒的复制、细胞与细胞间的移动以及病毒的组装等有重要作用。3'-UTR 有 72 个核苷酸,含有多重重叠的作用元件,其中包括 1 个富含 U 的八核苷酸序列,对于病毒 RNA 与寄主蛋白之间的互作以及病毒的增殖起着重要作用。

附 录 B
(规范性附录)
DAS-ELISA 检测

B.1 试剂和材料

B.1.1 酶联板的要求

使用质量有保证厂商生产的酶联板。

B.1.2 包被抗体

特异性的马铃薯 X 病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的马铃薯 X 病毒抗体。

B.1.4 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.5 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
吐温-20(Tween-20)	0.50 mL
蒸馏水定容至 1 L, 4 °C 储存。	

B.1.6 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP (MW24 000~40 000)	20 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
4 °C 储存。	

B.1.7 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
蒸馏水定容至 1 L, 4 °C 储存。	

B.1.8 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
------	-----

牛血清白蛋白(BSA)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000~40 000)	20.0 g
NaN ₃	0.20 g
4 ℃储存。	

B.1.9 底物(pNPP)缓冲液(pH 9.8)

氯化镁(MgCl ₂)	0.1 g
叠氮钠(NaN ₃)	0.2 g
二乙醇胺	97 mL
溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调 pH 值至 9.8,蒸馏水定容至 1 L,4 ℃储存。	

B.2 程序

B.2.1 包被抗体

用包被缓冲液将抗体按说明稀释,加入酶联板的孔中,100 μL/孔,加盖,37 ℃孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1:10(质量:体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,2 000 g 离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行。

B.2.3 加样

加入制备好的检测样品、缓冲溶液、阴性对照、阳性对照,100 μL/孔,每一样品设一重复。加盖后于 4 ℃冰箱孵育过夜或 37 ℃孵育 4 h,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释缓冲液按说明将酶标抗体稀释至工作浓度,并加入到酶联板中,100 μL/孔,加盖,37 ℃孵育 4 h,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.5 加底物

将底物 pNPP 加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100 μL/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

在不同的时间内如 30 min、1 h、2 h 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值,或用肉眼观察显色情况。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD₄₀₅ 值(缓冲溶液孔、阴性对照及阳性对照孔),应在质量控制范围内,即:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.15,当阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD₄₀₅ 值 / 阴

性对照 OD_{405} 值 $>5\sim 10$;同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 若满足 B.3.1 的质量要求,结果原则上可判断如下:

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 ≥ 2 ,判为阳性;

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 < 2 ,判为阴性。

B.3.3 若不满足 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判断。

附 录 C
(规范性附录)
RT-PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 RNA 提取试剂

Trizol、三氯甲烷、异丙醇、75%乙醇。

C.1.2 反转录试剂

200 U/ μ L M-MLV 反转录酶、5 $\times$ 反转录反应缓冲液、40 U/ μ L RNA 酶抑制剂、10 mmol/L dNTPs。

C.1.3 PCR 试剂

10 $\times$ PCR 缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L dNTPs、5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶。

C.1.4 电泳试剂

C.1.4.1 50 $\times$ TAE

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 g
加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1 $\times$ TAE。	

C.1.4.2 6 $\times$ 加样缓冲液

0.25% 溴酚蓝
0.4 g/mL 蔗糖水溶液

C.2 实验步骤

C.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 待测样品,用液氮研磨成粉末状,加入 1 mL Trizol,待溶解后继续研磨至混匀,移入 1.5 mL 离心管中,室温静置 5 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 10 min 以除去不溶成分,将上清液转入一新的 1.5 mL 离心管中;加入 200 μ L 三氯甲烷,剧烈振荡 15 s,室温静置 2 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 10 min,小心吸取上层水相到新离心管中;加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10 min;4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 20 min,弃上清液;加入 1 mL 75%冷乙醇洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 1 min,弃乙醇,充分干燥沉淀;加入 20 μ L DEPC 处理的超纯水(DEPC-H₂O),溶解沉淀,存于-80 $^{\circ}$ C 备用。

也可按照商品 RNA 提取试剂盒进行操作。

C.2.2 RT-PCR 反应

C.2.2.1 引物序列

表 C.1 RT-PCR 检测的引物序列

引物名称	引物序列
PVX-RT-F	5'-GCTGAACGGTTAAGTTTCCATTGATAC-3'
PVX-RT-R	5'-CGTAGTTATGGTGGTGGGAGAGTG-3'

C.2.2.2 反转录合成 cDNA

反转录体系见表 C.2。

表 C.2 反转录体系

试剂名称	加样体积/ μL
RNA	2
20 $\mu\text{mol/L}$ PVX-RT-R	1
在 70 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 然后立即置于冰上; 放置 5 min	
5 $\times$ 反转录反应缓冲液	4
10 mmol/L dNTPs	1
40 U/ μL RNA 酶抑制剂	0.5
200 U/ μL M-MLV 反转录酶	1
DEPC- H_2O 补足至	20

反应参数: 42 $^{\circ}\text{C}$, 45 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。合成的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。也可采用 RT-PCR 一步法试剂盒, 操作步骤按使用说明进行。

C.2.2.3 PCR 反应

PCR 反应体系见表 C.3。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

表 C.3 PCR 反应体系

试剂名称	加样体积/ μL
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	2.5
25 mmol/L MgCl_2 (反应缓冲液中已含有的可不加入)	2.5
10 mmol/L dNTPs	1
20 $\mu\text{mol/L}$ PVX-RT-F	1
20 $\mu\text{mol/L}$ PVX-RT-R	1
5 U/ μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.2

表 C.3 (续)

试剂名称	加样体积/ μL
cDNA 模板	2
ddH ₂ O 补足至	25

C.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测

将制胶板同制好的琼脂糖凝胶一放入水平电泳槽,取 5 μL 扩增反应物加 1 μL 的 6 $\times$ 溴酚蓝上样缓冲液混匀,以及 5 μL DNA Marker 作为分子量标准物分别点入样孔内。电泳缓冲液 1 $\times$ TAE 适量,100 V,电泳 30 min。电泳结束后,放入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭(或其替代物)溶液中染色 10 min,将整个凝胶置于凝胶成像系统上拍照,记录结果。

C.3 结果判断

C.3.1 阳性对照在 753 bp 左右处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带,可判定为阳性。

C.3.2 阳性对照在 753 bp 左右处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品在 753 bp 左右处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 D
(规范性附录)
Real-time RT-PCR 检测

D.1 Real-time RT-PCR 试剂

一步法 RT-PCR 反应缓冲液(TaqMan One-step RT-PCR Mixture)。

D.2 实验步骤

D.2.1 总 RNA 提取

总 RNA 提取同 C.2.1。

D.2.2 引物合成

引物序列见表 D.1。

表 D.1 Real-time RT-PCR 检测的引物序列

引物名称	序列(5'-3')
PVX-Tm-F	5'-AGGCTATCTGGAAGGACATGAA-3'
PVX-Tm-R	5'-TGAGCAGATGAGCCCACAT-3'
PVX-探针	5'-FAM-CCCACAGACACTATGGCACAGGCTG-Tamra-3'

D.2.3 Real-time RT-PCR 反应

反应体系:0.2 mL 离心管中加入 2×一步法 RT-PCR 缓冲液Ⅲ(One Step RT-PCR Buffer Ⅲ) 10 μ L, *Ex Taq*HS(5 U/ μ L)0.4 μ L, PrimeScript RT 酶混合液Ⅱ(PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅱ) 0.4 μ L, PVX-Tm-F(10 μ mol/L)0.4 μ L, PVX-Tm-R (10 μ mol/L) 0.4 μ L, PVX-探针(10 μ mol/L) 0.6 μ L, ROX 参比染料Ⅱ(ROX Reference Dye Ⅱ)0.4 μ L, 模板 RNA 2 μ L, 补 DEPC-H₂O 至 20 μ L。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:42 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,45 个循环。

PCR 反应体系中各种试剂的量可根据具体情况进行适当调整,也可采用商业化试剂盒。

D.3 结果判定

D.3.1 基线的设置

Real-time RT-PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。基线范围选择在 3 个~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。

D.3.2 检测结果的判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照正确的前提下:

- 检测样品的 C_t 值小于 35, 且出现特定的扩增曲线, 判定结果为阳性。 C_t 值介于 35~40 时为疑似阳性, 需要重新进行测试, 或采用其他方法进行验证。
- 检测样品的 C_t 值大于 40, 或未出现特定的扩增曲线, 判定结果为阴性。

附 录 E
(规范性附录)
RT-LAMP 检测

E.1 试剂

一步法 RT-LAMP 反应试剂盒, LAMP 荧光目视检测试剂盒, 纳米磁珠法提纯 RNA 试剂盒。

E.2 实验步骤

E.2.1 采用纳米磁珠试剂盒推荐的方法提取总 RNA

E.2.1.1 制样

取 0.5 g 的带毒植物组织加入 1 mL 抽提缓冲液进行研磨, 以无病毒感染的植物作为阴性对照。

E.2.1.2 清洗纳米磁珠

取出纳米磁珠到 PCR 管中, 用 ddH₂O 反复清洗纳米磁珠 3 次, 在磁铁的作用下吸去 ddH₂O。

E.2.1.3 结合

加入 100 μ L 的样品到 PCR 管中, 用移液枪吸吐混匀样品和纳米磁珠, 室温下吸附。

E.2.1.4 清洗

在磁铁的作用下移去上清液, 纳米磁珠清洗 3 次。

E.2.1.5 裂解

加入 50 μ L ddH₂O 到 PCR 管中, 用移液枪吸吐混匀纳米磁珠后, 95 $^{\circ}$ C, 10 min。

E.2.1.6 取样

用磁铁吸附纳米磁珠, 待 PCR 管内溶液澄清后, 上清液即为病毒 RNA。

E.2.1.7 核酸浓度的测定

取 5 μ L RNA 溶液加 ddH₂O 梯度稀释至 1 mL, 使用紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值。RNA 的浓度按照下式计算获得:

$$C = 40 \times N \times A$$

式中:

C —— RNA 浓度, 单位为微克每毫升 (μ g/mL);

N —— 核酸稀释倍数;

A —— 260 nm 处的吸光度值;

40 —— 换算系数, 单位为微克每毫升 (μ g/mL)。

当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值 2.0 左右时, 适宜于 PCR 扩增和 LAMP 检测。

E.2.2 引物合成

引物序列见表 E.1。

表 E.1 RT-LAMP 检测的引物序列

引物名称	序列(5'-3')
PVX-F3	5'- ACAGGCTGCTTGGGACTT-3'
PVX-B3	5'- GTTAGCAGGTGGACTGTTGT-3'
PVX- FIP	5'-ATGCCGTTGGAATAGGGACCTG-GCTGATGTAGGATCATCCGC-3'
PVX- BIP	5'-AGCAGAGCTAGACTGGCAGCA-CCATACCACTGGGGCATAC-3'

E.2.3 RT-LAMP 反应

E.2.3.1 RT-LAMP 反应体系

RT-LAMP 反应体系以 RNA 为模板,以健康植物材料为阴性对照,以 ddH₂O 为空白对照,以感染 PVX 的植物材料为阳性对照。RT-LAMP 反应体系见表 E.2。整个溶液的配制在冰上进行,也可采用其他等效 LAMP 试剂。

表 E.2 RT-LAMP 反应体系

试剂名称	加样量/ μ L
2 $\times$ 反应缓冲液(RM)	12.5
10 μ mol/L PVX- FIP	0.5
10 μ mol/L PVX- BIP	0.5
20 μ mol/L PVX-F3	2
20 μ mol/L PVX-B3	2
荧光检测试剂(FD)	1
酶混合物(EM)	1
总 RNA	5
DEPC-H ₂ O 补足至	25

RT-LAMP 反应条件:65 $^{\circ}$ C 恒温扩增 60 min,80 $^{\circ}$ C 5 min。

E.2.3.2 质量控制

基本原则:实验室中设置的各种对照 LAMP 检测结果应符合以下情况:

- 空白对照:反应管中液体呈橙色;
- 阴性对照:反应管中液体呈橙色;
- 阳性对照:反应管中液体呈绿色。

任一种对照如果出现非上述正常结果,应重做实验。

E.3 结果判定

E.3.1 待检样品反应管中液体呈现橙色,同时各种实验对照结果正常,可判断该样品检测结果为阴性。

E.3.2 待检样品反应管中液体呈现绿色,同时各种实验对照结果正常,可判断该样品检测结果为阳性。

附 录 F
(规范性附录)
免疫层析试纸条检测

F.1 试剂

样品抽提缓冲液,配制方法见 B.1.5。

F.2 检测样品的制备

测试的样品按 1:10(质量:体积)加缓冲液,经研磨后,低速离心取上清液(未离心的样品在测试时,一些大颗粒物质的存在,易影响液流的上行,从而使得检测效果不佳),每一样品取约 250 μL ~1.5 mL 的离心管中,以能走完试纸条为宜,测试样品体积过多,可稀释胶体金,使得测试效果不好。

F.3 操作步骤

测试前将试纸条恢复至室温。

将试纸条含胶体金复合物的一端插入到样品中,样品液不要超过胶体金试纸条上的 MAX 线。测试观察的时间以 10 min~20 min 为好。对于病毒浓度低的样品时间可适当延长。

F.4 结果判断

F.4.1 质控点(线)显粉红色,测试点(线)也显粉红色,检测结果为阳性。

F.4.2 质控点(线)显粉红色,测试点(线)未显色,检测结果为阴性。

F.4.3 质控点(线)和测试点(线)均未显色,说明试纸条失效,检测结果无效。

F.5 贮存

试纸条应在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内密封干燥保存。

F.6 试纸条有效性的判断方法

F.6.1 用阳性对照进行测试,测试点(线)显色,质控点(线)也显色,说明整个系统工作正常。

F.6.2 用阳性对照进行测试,测试点(线)显色,而质控点(线)未显色,说明羊抗兔失效。

F.6.3 用阳性对照进行测试,测试点(线)未显色,而质控点(线)显色,说明测试点(线)的特异性抗体失效。测试纸条失效不能用。

F.6.4 用阳性对照进行测试,若测试点(线)未显色,质控点(线)也未显色,说明整个测试纸条失效,不能用。

附 录 G
(规范性附录)
dot-ELISA 检测

G.1 材料和试剂

G.1.1 硝酸纤维素膜(NC膜),购自有质量保证的厂商。

G.1.2 马铃薯X病毒特异性鼠源抗体。

G.1.3 碱性磷酸酯酶(AP)标记的羊抗鼠酶标二抗。

G.1.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4):NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3 g,加去离子水 950 mL 溶解后调 pH 至 7.4,定容至 1 000 mL。

G.1.5 PBST 洗涤液:含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS。

G.1.6 脱脂奶粉。

G.1.7 封闭液:含 5%脱脂奶粉的 PBST。

G.1.8 抗体稀释液:即封闭液。

G.1.9 硝基蓝四氮唑(NBT)和 5-溴-4-氯吲哚磷酸盐(BCIP)底物储备液:NBT 溶于 70%二甲基甲酰胺中,NBT 储备液配成 50 mg/mL 浓度,BCIP 溶于 100%二甲基甲酰胺中,BCIP 储备液配成 50 mg/mL 浓度,2 种底物储备液分别装于瓶中-20℃保存。

G.1.10 底物显色缓冲液:Tris 12.14 g,NaCl 5.84 g, MgCl_2 0.475 g,浓 HCl 调 pH 至 9.5,加去离子水定容至 1 000 mL。

G.1.11 底物显色液:10 mL 的底物缓冲液中加入 66 μL NBT 储备液和 33 μL BCIP 储备液。

G.2 实验步骤

G.2.1 制样:取病毒症状明显的或没有症状的植物叶片称重后放于研钵中,按 1:20(质量:体积)的比例加入 0.01 mol/L PBS 后研磨、匀浆 2 min~3 min;匀浆液移至 1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心 3 min,或静置 5 min;阳性对照为感染马铃薯X病毒的病叶,阴性对照为健康的马铃薯叶片。

G.2.2 点样:用镊子取一张 NC 膜放至干净的培养皿内,用移液枪取 3 μL 植物叶片提取液上清轻点到 NC 膜上,每取一个样换一个枪头。

G.2.3 膜干燥:点样完成后膜在室温下干燥,直至看不到点样水印为止,约 10 min。

G.2.4 封闭:将 NC 膜浸入到含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭液中 37℃封闭 30 min。

G.2.5 一抗孵育:在一个平皿中用抗体稀释液将马铃薯X病毒特异性鼠源抗体按试剂说明稀释,用镊子将 NC 膜放入上述抗体稀释液中,室温水平摇床上缓慢摇动孵育 60 min。

G.2.6 洗涤:倒去上述抗体稀释液后加入 PBST 洗涤液,在水平摇床上缓慢摇动洗涤 NC 膜 3 min;重复洗涤 2 次。

G.2.7 酶标二抗孵育:用抗体稀释液将碱性磷酸酯酶(AP)标记的羊抗鼠酶标二抗按试剂说明稀释,用镊子将 NC 膜放入上述酶标二抗稀释液中,室温水平摇床上缓慢摇动孵育 60 min。

G.2.8 洗涤:倒去上述酶标二抗稀释液后加入 PBST 洗涤液,在水平摇床上缓慢摇动洗涤 NC 膜 3 min;PBST 重复洗涤 3 次;最后用 PBS 洗涤 1 次以去除膜表面的吐温-20。

G.2.9 显色底物液配制:在一个干净的平皿中加入 10 mL 底物缓冲液、66 μL NBT 和 33 μL BCIP 底物储备液,晃动混匀。

G.2.10 显色及终止:将洗好的 NC 膜用滤纸吸干后放入上述显色底物液的培养皿中避光显色,待阳性

对照显色明显,而阴性没有任何显色时,约显色 10 min~20 min 时终止反应,即膜在自来水中漂洗一下洗去底物。

G.3 结果判断

肉眼观察判断结果,即点样点显色呈紫色的样品为阳性,点样点为绿色或无色的样品为阴性,并拍照记录。

G.4 注意事项

G.4.1 NC 膜位于 2 张保护纸中间,不要用手直接触摸膜,用镊子和戴一次性 PE 手套取膜。

G.4.2 NC 膜上滴加检测样品的一面为正面,整个实验过程中应朝上。

G.4.3 抗体在使用前 10 min 之内稀释。

G.4.4 底物显色液现配现用。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
马铃薯 X 病毒检疫鉴定方法
GB/T 36833—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 36 千字
2018 年 9 月第一版 2018 年 9 月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-61265 定价 24.00 元



GB/T 36833—2018

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107