



中华人民共和国国家标准

GB/T 31805—2015

豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Cowpea severe mosaic virus*

2015-07-03 发布

2015-11-27 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈青、李彬、方志鹏、黄峰、廖富荣、陈红运、林石明。

豇豆重花叶病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了豇豆重花叶病毒检疫鉴定的血清学、生物学和分子检测方法。
本标准适用于可能携带有豇豆重花叶病毒的植物繁殖材料(种子、植株)和产品的检疫鉴定。

2 仪器设备和主要试剂

2.1 仪器设备

PCR 仪、定量 PCR 仪、灭菌锅、制冰机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、电泳仪、凝胶成像系统、微量研磨仪、酶标仪、洗板机、微量天平(感量:0.001 g)、水平电泳槽、高速冷冻台式离心机、水浴槽、pH 计、移液器(1 000 μ L、200 μ L、20 μ L、2 μ L)、96 孔酶标板、研钵等;防虫温室。

2.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。PCR 缓冲液、dNTPs (dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、DNA 聚合酶、引物和探针、琼脂,酶联检测试剂见附录 B。

3 检测样品的制备

3.1 种子

挑取畸形种子播于灭菌土中,待长出 3 片~4 片叶后,将表现症状的植株编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。采集的叶片分成 2 份,根据需要分别用于酶联测定和分子检测。

3.2 植株

有症状(如叶片畸形、花叶、斑驳等)的植株编号单独检测。没有症状的分组并编号检测,分组方法和检测方法同 3.1。双抗体夹心酶联免疫吸附测定。

4 检测与鉴定

4.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定

把制备的样品上清液加入已包被 CPSMV 抗体的酶联板中,进行 DAS-ELISA。每个样品平行加到两个孔中。设阴性对照和阳性对照[健康的植物组织作阴性对照,感染了 CPSMV 的植物组织作阳性对照,其中阴性对照种类和材料(如种子或叶片)应尽量与检测样品一致],样品提取缓冲液作空白对照,不同的检测试剂或试剂盒按说明操作。具体操作见附录 B。

4.2 RT-PCR

分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后,进行 PCR 扩增。健康的植物组织作阴性对照,感染 CPSMV 的植物组织作阳性对照,用超纯水作空白对照。具体操作见附录 C。