

### 玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法

The detection of pathogen for Maize Rough Dwarf disease by dot immuobinding  
assay method



2019 – 12 – 04 发布

2019 – 12 – 25 实施

江苏省市场监督管理局

发 布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：周彤、杜琳琳、周益军、孙枫、兰莹、李硕、范永坚。

# 玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法

## 1 范围

本标准规定了大麦、小麦、玉米植株和灰飞虱携带玉米粗缩病病原免疫斑点检测方法。  
本标准适用于大麦、小麦、玉米植株和灰飞虱携带玉米粗缩病病原的检测。

## 2 斑点酶联免疫吸附检测原理

硝酸纤维素膜具有很强的静电吸附力，中性条件下即可有效地吸附蛋白质等生物大分子。将抗原吸附于硝酸纤维素膜后，可利用膜作为固相载体进行抗原抗体反应。当加入抗原的特异性抗体后，即可与膜上的抗原结合，然后再加入带有标记物的二抗，使酶标记通过二抗和相应抗体的结合间接地交联于纤维素膜上。最后加入标记物相应的底物后，标记物即可与底物作用形成不溶性产物，呈现斑点状着色。

## 3 仪器设备与试剂材料

### 3.1 仪器设备

台式离心机（5 000 r/min）；具盖塑料离心管：200  $\mu$ L；培养皿（直径为90 mm）；塑料盒（规格为100 mm $\times$ 50 mm）。

### 3.2 试剂材料

3.2.1 试验用水均为蒸馏水，使用的化学试剂未作说明均为分析纯级别。

3.2.2 包被缓冲液：0.05 mol/L，pH值9.6。称取 1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ ，加水定容至1 000 mL，用HCl调pH值至9.6，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

3.2.3 磷酸盐Tween 20缓冲液（0.01M PBST）：0.01mol/L，pH=7.5。称取40 g NaCl，1 g KCl，1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，加水定容至5 000 mL，用HCl调节pH值至7.5，再加入2.5 mL Tween 20，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

3.2.4 磷酸盐缓冲液（0.02M PBS）：0.02 mol/L，pH值7.5。称取40 g NaCl，1 g KCl，1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，加水定容至2 500 mL，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

3.2.5 1%脱脂奶粉封闭液：1 g脱脂奶粉加入100 mL磷酸盐Tween20缓冲液中，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

3.2.6 辣根过氧化物酶固体显色底物溶液：6 mg的4-氯-1-萘酚加入2 mL无水乙醇中，4 $^\circ\text{C}$ 保存备用，使用时加入10 mL 磷酸盐缓冲液中，再加入10  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

3.2.7 BCIP/NBT显色底物：碱性磷酸酶底物显色试剂盒。

3.2.8 单克隆抗体（单抗）：玉米粗缩病病原RBSDV单克隆抗体，效价为1:5 000~1:10 000，-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

3.2.9 酶标二抗：Goat Anti-Mouse IgG Antibody，HRP（检测灰飞虱），Goat Anti-Mouse IgG Antibody，AP（检测植物），-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

## 4 植物样品检测

#### 4.1 样品制备

4.1.1 田间采集新鲜的大麦、小麦、玉米植株的茎秆或叶片，装至无菌样品袋中。标记样品编号、取样时间、取样地点，48 h内送至实验室，放置-20℃冰箱保存备用，避免反复冻融。

4.1.2 取0.5 mg大麦、小麦或玉米的茎秆或叶片研磨成粉末，碳酸盐包被液稀释100倍，离心(5 000 r/min) 3 min，取上清液备用。

#### 4.2 封闭

4.2.1 预先用铅笔将硝酸纤维素膜(NC膜)划成5 mm×5 mm的正方格，取2.0 μL 4.1获得的上清液点于NC膜上正方格中心(以不超出正方格一半为准)；同时取2.0 μL已采用本方法测定为感染玉米粗缩病的玉米汁液点于膜上预先标记好的正方格内，作为阳性对照，取2.0 μL已采用本方法测定为不感染玉米粗缩病的玉米汁液点于膜上预先标记好的正方格内，作为阴性对照，将膜置于室温晾干。

4.2.2 将干燥的膜置于塑料盒或玻璃培养皿，加入1%脱脂奶粉封闭液，要求将膜完全浸没，37℃轻轻摇晃，封闭30 min。

#### 4.3 孵育

4.3.1 用镊子压住膜倒弃封闭液，将单抗和1%脱脂奶粉封闭液按1:5 000~1:10 000比例稀释配制孵育液，将膜完全浸入孵育液，37℃轻轻摇晃，孵育1 h~1.5 h。

4.3.2 用镊子压住膜倒弃孵育液，加入磷酸盐Tween20缓冲液，将膜完全浸没，轻轻摇晃，洗膜3 min~5 min，用镊子压住膜倒弃洗液，重复洗膜三次。

#### 4.4 二抗孵育

4.4.1 用镊子压住膜倒弃洗液，将二抗(Goat Anti-Mouse IgG Antibody, AP)和封闭液按1:5 000比例稀释配制孵育液，将膜完全浸入二抗孵育液，37℃轻轻摇晃，孵育1.5 h~2 h，再用镊子压住膜倒弃二抗孵育液。

4.4.2 加入磷酸盐Tween20缓冲液，将膜完全浸没，轻轻摇晃，洗膜3 min~5 min，用镊子压住膜倒弃洗液，重复洗膜三次。

#### 4.5 显色

用镊子压住膜倒弃洗液，加入BCIP/NBT显色底物溶液，37℃静置显色30 min；蒸馏水冲洗膜，室温晾干。

#### 4.6 结果判定

显色后首先观察对照的颜色反应，阳性对照应显蓝紫色，阴性对照应不显色，再观察样品的颜色反应，如果显蓝紫色，则认定植株感染了玉米粗缩病，如果不显色，则认定未感染玉米粗缩病。试验结果记载表见附录A。

### 5 灰飞虱带毒率检测

#### 5.1 样品制备

5.1.1 采集灰飞虱高龄若虫或成虫，虫量不少于100头，装至塑料瓶中。样品储存方法同4.1.1。

5.1.2 单头灰飞虱置于离心管中，加100 μL碳酸盐包被缓冲液，用牙签捣烂，离心(5 000 r/min) 3 min，取灰飞虱提取液备用。

5.2 封闭

同4.2。取2.0 μL已采用本方法测定为带毒的灰飞虱提取液作为阳性对照，取2.0 μL已采用本方法测定不带毒的灰飞虱提取液，作为阴性对照。

5.3 孵育

同4.3。

5.4 二抗孵育

同4.4。二抗选Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP。

5.5 显色

用镊子压住膜倒弃洗液，加入辣根过氧化物酶固体显色底物溶液，37℃静置显色30 min；蒸馏水冲洗膜，室温晾干。

5.6 结果判定

5.6.1 灰飞虱带毒判定

同4.6。

5.6.2 带毒率计算

按照公式1计算灰飞虱带毒率，结果保留到小数点后一位。试验结果记载表见附录B。

$$L_c = \frac{N_c}{N_t} \times 100 \dots\dots\dots \text{公式1}$$

式中：Lc—灰飞虱带毒率，单位为百分率（%）；  
Nc—带毒灰飞虱虫量；  
Nt—测定灰飞虱总虫量。

附录 A  
(规范性附录)  
植物样品检测结果记录表

植物样品检测结果记录表A. 1。

表 A. 1 植物样品检测结果记录表

样品采集日期	样品采集地点	测定样品数量 (株)	阳性样品数 (株)	阴性样品数 (株)	鉴定技术负责 人

附录 B  
(规范性附录)  
灰飞虱带毒率测定结果记录表

灰飞虱带毒率测定记录表B. 1。

表 B. 1 灰飞虱带毒率测定结果记录表

灰飞虱采 集日期	灰飞虱采集 地点	灰飞虱代 次	测定样品数量 (头)	阳性样品数 (头)	阴性样品数 (头)	带毒率 (%)	鉴定技术 负责人

\_\_\_\_\_