

江 苏 省 地 方 标 准

DB 32/T XXXX-XXXX

南方水稻黑条矮缩病毒免疫斑点检测
方法

Detection method of southern rice black-streaked dwarf virus by dot
immunobinding assay
(报批稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

江苏省市场监督管理局 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由江苏省农业农村厅提出并组织实施。

本文件由江苏省农作物标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、江苏省植物保护植物检疫站。

本文件主要起草人：周彤、朱凤、杜琳琳、李晨羊、周晨、张海波、梁修成、许津铭、潘俚辰、赵忆宁、张玉、段云辉。

南方水稻黑条矮缩病毒免疫斑点检测方法

1 范围

本文件描述了采用免疫斑点法检测南方水稻黑条矮缩病毒（SRBSDV）的方法。
本文件适用于南方水稻黑条矮缩病的诊断、监测与流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂和材料

试验用水均为GB/T 6682规定的三级水。

4.1 碳酸盐包被液

0.05 mol/L, pH=9.6, 称取1.59 g Na_2CO_3 和2.93 g NaHCO_3 , 加水定容至1 000 mL, 用HCl调pH至9.6, 4℃保存。

4.2 磷酸盐Tween-20缓冲液（PBST）

0.01 mol/L, pH=7.5, 称取40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 和15 g Na_2HPO_4 , 加水定容至5 000 mL, 用HCl调节pH至7.5, 再加入2.5 mL Tween-20, 4℃保存。

4.3 磷酸盐缓冲液（PBS）

0.02 mol/L, pH=7.5, 称取40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 和15 g Na_2HPO_4 , 加水定容至2 500 mL, 用HCl调节pH至7.5, 4℃保存。

4.4 2%脱脂奶粉封闭液

2 g 脱脂奶粉加入 100 mL 磷酸盐 Tween-20 缓冲液中, 4℃保存。

4.5 单克隆抗体（单抗）

南方水稻黑条矮缩病毒单克隆抗体，效价为1:5 000~1:10 000，-20℃保存。

4.6 碱性磷酸酶(AP) 标记的羊抗鼠IgG二抗，-20℃保存。

4.7 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠IgG二抗，-20℃保存。

4.8 NBT/BCIP显色底物。

4.9 TMB显色底物。

4.10 硝酸纤维素膜(NC膜)。

4.11 水稻对照

田间采集疑似感染SRBSDV的水稻植株，一步双重RT-PCR(见附录A)检测为阳性的水稻叶片为检测水稻阳性对照，-20℃保存。健康水稻叶片为检测水稻阴性对照。

4.12 白背飞虱对照

温室内饲养、扩繁的白背飞虱种群饲喂感染SRBSDV的水稻4 d~6 d，再在健康水稻苗上饲养8 d~10 d，随机取10头混样，一步双重RT-PCR检测为阳性的白背飞虱群体为检测白背飞虱阳性对照，-20℃保存。不携带SRBSDV白背飞虱为检测白背飞虱阴性对照。

5 仪器设备

5.1 台式离心机，转速不低于5 000 r/min。

5.2 微量天平，精确到0.001 mg。

6 植物样品检测

6.1 样品制备

田间采集新鲜水稻植株的茎秆或叶片，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。

取0.5 mg水稻植株的茎秆或叶片研磨成粉末，用碳酸盐包被液稀释100倍，离心3 min，取上清液备用。

6.2 点样

在NC膜上画出方格阵列，每个方格大小5 mm×5 mm，取2 μL 5.1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)；同时分别取2.0 μL水稻阳性对照、阴性对照点于NC膜上，将NC膜置于室温晾干10 min。

将干燥的NC膜置于玻璃培养皿内，加入2%脱脂奶粉封闭液，要求将NC膜完全浸没，放入37℃摇床轻轻摇晃(转速70 r/min) 30 min。

6.3 一抗孵育

用镊子压住NC膜倒弃封闭液，将SRBSDV单抗用2%脱脂奶粉封闭液按1:5 000比例稀释配制孵育液，将NC膜完全浸入孵育液，放入37℃摇床轻轻摇晃，孵育1 h~1.5 h。

用镊子压住NC膜倒弃孵育液,加入磷酸盐Tween-20缓冲液,将NC膜完全浸没,轻轻摇晃,洗膜3 min~5 min,用镊子压住NC膜倒弃洗液,重复洗膜3次。

6.4 二抗孵育

用镊子压住NC膜倒弃洗液,AP标记的羊抗鼠IgG二抗和封闭液按1:5 000比例稀释配制孵育液,将NC膜完全浸入二抗孵育液,放入37℃摇床轻轻摇晃,孵育1.5 h~2 h,再用镊子压住NC膜倒弃二抗孵育液。

加入磷酸盐Tween-20缓冲液,将NC膜完全浸没,轻轻摇晃,洗膜3 min~5 min,用镊子压住NC膜倒弃洗液,重复洗膜3次。

6.5 显色

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

6.6 结果

显色后,首先观察对照的颜色反应,阳性对照应显紫色,阴性对照仍为水稻汁液的绿色或无色。然后观察样品的颜色反应,如果显紫色,则认定植株感染SRBSDV;如为水稻汁液的绿色或无色,则认定植株未感染SRBSDV。显色结果参见附录B。

7 白背飞虱检测

7.1 样品制备

采集白背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5.1。

单头白背飞虱置于离心管中,加入100 μL碳酸盐包被液,捣烂白背飞虱,离心3 min,取白背飞虱提取液备用。

7.2 点样

同5.2。分别取2 μL白背飞虱阳性对照、阴性对照点于NC膜上。

7.3 一抗孵育

同5.3。

7.4 二抗孵育

同5.4。二抗用HRP标记的羊抗鼠IgG。

7.5 显色

用镊子压住NC膜倒弃洗液,加入TMB显色底物,37℃静置显色3 min~5 min;用水冲洗膜,室温晾干。

7.6 结果

7.6.1 白背飞虱带毒结果

显色后,首先观察对照的颜色反应,阳性对照应显蓝色,阴性对照应不显色。然后观察样品的颜色反应,如果显蓝色,则认定白背飞虱携带SRBSDV;如果不显色,则认定白背飞虱不携带SRBSDV。显色结果参见附录B。

7.6.2 带毒率计算

按照式（1）计算白背飞虱带毒率，结果保留到小数点后一位。

$$L_c = \frac{N_c}{N_t} \times 100$$

.....式（1）

式中：Lc——白背飞虱带毒率，单位为百分率（%）；
Nc——带毒白背飞虱虫量；
Nt——测定白背飞虱总虫量。

8 报告

检测完成后可出具完整的检测报告，报告中应包含植株或白背飞虱样本采集地点、采集日期、检测样本数量、阳性样本数量与阴性样本数量，显色结果拍照留存，检测白背飞虱样本还需计算出带毒率。

附 录 A
(资料性)
一步双重 RT-PCR 方法

疑似感染SRBSDV的水稻组织或人工饲喂感染SRBSDV的水稻植株后获得的白背飞虱群体提取总RNA，采用One Step RT-PCR Kit（宝生物工程（大连）有限公司）进行一步双重RT-PCR检测（引自王强等，2012）。一步双重RT-PCR反应总体积20 μL，内含样品总RNA抽提物溶液1 μL，S5-F1/S5-R2（5'-ttacaactggagaagcattaacacg-3' /5'-atgaggtattgcgtaactgagcc-3'）和 S10-oF/S10-oR（5'-cgcgatcatctcaaactacag-3' /5'-ttgtcagcatctaaagcgc-3'）终浓度分别为240 nmol /L和120 nmol /L，其他各组份参照试剂盒说明。反应程序为50 ℃反转录30 min；94℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，53 ℃退火30 s，72 ℃延伸50 s，35个循环；72℃延伸10 min。反应结束后，取5 μL反应产物，经2%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统中观察。2对引物扩增产物分别为病毒基因组S5 ORF1 3' 区段和S10 病毒外壳蛋白编码区，大小为819 bp 和682 bp（图1）。

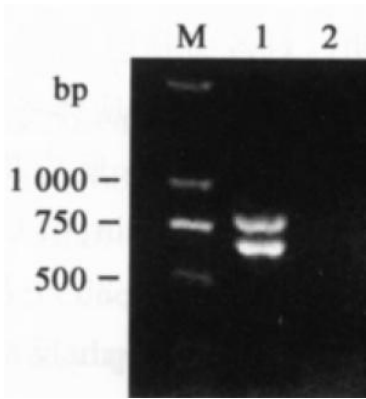


图 1 一步双重 RT-PCR 凝胶电泳结果图
M，DNA marker；1，阳性样本；2，阴性样本。

附 录 B
(资料性)
斑点免疫检测方法显色图示

感染SRBSDV水稻植株样品检测结果呈现紫色的阳性斑点，健康水稻叶片粗提液呈现叶片绿色斑点或无色（图2 A）。

携带SRBSDV白背飞虱检测结果呈现蓝色的阳性斑点，不携带SRBSDV白背飞虱呈现无色（图2 B）。

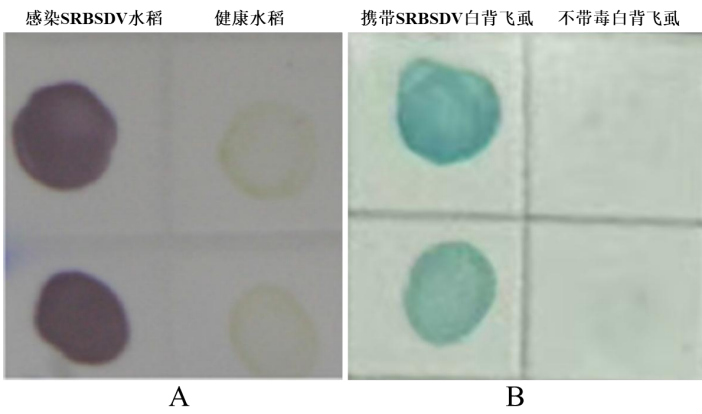


图 2 免疫斑点法检测结果显色图
A，水稻样品；B，白背飞虱样品。

参考文献

- [1] 王强,周国辉,张曙光. 南方水稻黑条矮缩病毒一步双重 RT-PCR 检测技术及其应用. 植物病理学报, 2012, 42(1): 84-87
-