ICS 65.020
CCS B 16

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 4395—2022

小麦土传病毒病病原检测技术规程

Code of practice for detection of pathogen of soil-borne wheat viral diseases

2022-11-14 发布　　2022-12-14 实施

江苏省市场监督管理局　发布
中国标准出版社　出版

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。

本文件由江苏省作物标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位:江苏省农业科学院、宁波大学、江苏省植物保护植物检疫站。

本文件主要起草人:周彤、羊健、杜琳琳、朱凤、周益军。

小麦土传病毒病病原检测技术规程

1 范围

本文件规定了小麦黄花叶病毒和中国小麦花叶病毒检测原理、设备和试剂、间接酶联免疫吸附剂测定、斑点酶联免疫吸附剂测定及 RT-PCR 测定方法。

本文件适用于小麦黄花叶病毒和中国小麦花叶病毒的检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

小麦黄花叶病 wheat yellow mosaic disease

小麦的一种土传病毒病，自然界中由禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)在土壤中传播，病原为小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus)。

2.2

中国小麦花叶病 Chinese wheat mosaic disease

小麦的一种土传病毒病，自然界中由禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)在土壤中传播，病原为中国小麦花叶病毒(chinese wheat mosaic virus)。

3 缩略语

CWMV：中国小麦花叶病毒（Chinese Wheat Mosaic Virus）

Dot-ELISA：斑点酶联免疫吸附剂测定（Dot Enzyme-linked Immunosorbent Assay）

ELISA：酶联免疫吸附剂测定（Enzyme-linked Immunosorbent Assay）

间接 ELISA：间接酶联免疫吸附剂测定(Indirect Enzyme-Iinked Immunosorbent Assay)

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

RT- PCR：逆转录-聚合酶链式扩增反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

WYMV：小麦黄花叶病毒（Wheat Yellow Mosaic Virus）

4 原理

4.1 间接 ELISA 原理

将酶分子与抗体共价结合，得到同时具有免疫活性和酶的生物活性的酶标抗体。检测时，将已知的抗体吸附在固相载体表面，若受检样本中含有相应的抗原，则会与固相载体上的抗体发生特异性结合从而随之固定在固相载体上，然后洗涤除去未结合及多余的其他蛋白，再加入酶标抗体，使其与吸附在固相载体上的抗原特异性结合，最后加入酶反应底物，底物被酶催化出现颜色反应产生有色产物。因此，可通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应。颜色反应的深浅与受检样品中抗原的量呈正比，故可根据颜色反应的深浅进行定性或定量分析。

间接 ELISA，首先将受检样品包被固相载体，经洗涤，加入特定的抗体，若受检样品中含有相应的抗原，则会形成待测抗原-抗体复合物，再经洗涤后，加入酶标抗体，以形成抗原-抗体-酶标抗体复合物，然后加入酶反应的底物，通过测定颜色反应的深浅，定性或定量分析受检样品中的抗原量。

4.2 Dot-ELISA 原理

硝酸纤维素膜具有很强的静电吸附力，在中性条件下可有效地吸附蛋白质等生物大分子，并保持其免疫活性。将抗原吸附在硝酸纤维素膜表面，利用膜作为固相载体进行抗原抗体反应，通过与相应的抗体和酶标抗抗体的一系列免疫反应，形成抗原-抗体-酶标抗抗体复合物，加入酶反应的底物后，底物被催化出现颜色反应产生有色物质并沉着于抗原抗体复合物吸附的部位，呈现出肉眼可见的斑点，可通过肉眼观察斑点的出现与否和颜色深浅程度判定受检样品中是否存在特定抗原及其浓度。

4.3 RT-PCR 原理

将逆转录(RT)和聚合酶链式扩增反应(PCR)相结合的技术。逆转录是在逆转录酶的作用下，以 RNA 为模板合成与之互补的 DNA（complementary DNA，cDNA）的过程，再利用特异性引物以 cDNA 为模板在 DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 扩增，依据是否能扩增出目的片段大小的 PCR 产物进行结果判定。

5 设备和试剂

5.1 设备

酶标仪、洗板机、微量天平、台式离心机、水浴锅、冰箱、－80 ℃低温冰箱、磁力搅拌器、高压灭菌锅、微量移液枪、96 孔酶标板、硝酸纤维素膜、培养皿、冰盒、紫外分光光度计、PCR 仪。

5.2 试剂

间接 ELISA 的检测试剂，按照附录 A。Dot-ELISA 的检测试剂，按照附录 B。RT-PCR 的检测试剂，按照附录 C。除另有规定外，所用试剂均为分析纯或生化试剂。

5.3 对照

田间采集疑似小麦黄花叶病和中国小麦花叶病的小麦病株，采用附录 C 中的特异性引物进行 RT-PCR 检测，得到的扩增产物长度为 124 bp 的小麦样品则认定为感染 WYMV 的阳性样品，得到的扩增产物长度为 182 bp 的小麦样品则认定为感染 CWMY 的阳性样品；没有出现目的产物的小麦植株叶片则认定为阴性样品，阳性样品和阴性样品存放于－80 ℃低温冰箱；间接酶联免疫吸附剂测定和斑点酶联免疫吸附剂测定中，样品提取缓冲液作空白对照，RT-PCR 检测方法中无菌水作为空白对照。

6 间接 ELISA

6.1 取样

田间剪取待测样品叶片，锡箔纸包裹后放入 0 ℃冰盒中。

6.2 样品制备

待检测样品按 1∶10(克∶毫升)加入包被缓冲液，用研钵研磨成浆，8 000 r/min 离心 3 min，上清液即为制备好的检测样品。对照样品做相同处理。

6.3 加样

在 96 孔酶标板上加入 6.2 制备好的待检测样品、阴性对照、阳性对照及样品提取缓冲液，每孔加样 100 μL，加盖，37 ℃孵育 1 h 或 4 ℃冰箱孵育过夜，每个样品重复 3 次。

6.4 洗板

孵育结束后，用聚对苯二甲酸乙二醇酯（PBST）清洗酶标板 3 次～5 次。每孔每次加 PBST 洗液 700 μL，每次停留 1 min～2 min。

6.5 加抗血清

用相应病毒抗血清和抗体稀释缓冲液按照 1∶2 000 的比例稀释，每孔加入稀释好的抗体液 100 μL，加盖，37 ℃孵育 1.5 h。

6.6 洗板

同 6.4。

6.7 加酶标抗体

用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 1.5 h。

6.8 洗板

同 6.4。

6.9 加底物缓冲液

将现配的底物缓冲液按 100 μL/孔，加入到酶联板中，室温避光孵育 15 min～30 min。

6.10 终止反应

加入 2 mL 硫酸，50 μL/孔，终止反应。

6.11 读数

用酶标仪在 405 nm 波长下测定各孔的吸光值（OD_{405}）。

6.12 结果判定

6.12.1 首先读取对照孔的 OD_{405} 值（缓冲液、阴性对照、阳性对照），应该在质量控制范围内。缓冲液孔的 OD_{405} 值＜0.15，阴性对照孔的 OD_{405} 值＜0.15，当阴性对照孔的 OD_{405} 值＜0.05 时，按 0.05 计算。阳性对照有明显的颜色反应，且阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值＞2，孔的重复性基本一致。

6.12.2 在满足了 6.12.1 质量控制要求后，可根据如下数据判断结果：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} ＜2，判为阴性；样品 OD_{405} 值阴性对照 OD_{405} 值在 1.5～2.0，判为可疑样品，需重新检测一次，或用其他方法验证。

7 Dot-ELISA

7.1 取样

田间剪取待测样品叶片，锡箔纸包裹后放入 0 ℃冰盒中。

7.2 样品制备

待测样品和对照样品按 1∶10（克∶毫升）加入硫化铅（PBS）磷酸盐缓冲液，用研钵研磨成浆，8 000 r/min离心 3 min，上清液即为制备好的检测样品。对照样品做相同处理。

7.3 加样

预先用铅笔将硝酸纤维素膜划成 7 mm×7 mm 大小的正方格，分别取 2 μL 7.2 中制备好的待检测样品、阴性对照、阳性对照、空白对照的上清液点于膜上正方格中，室温干燥 10 min。重复 3 次。

7.4 封闭

在平皿中加入 20 mL 封闭液，并将干燥好的硝酸纤维素膜浸入，室温下封闭 30 min。

7.5 加抗血清

用相应病毒抗血清和抗体稀释缓冲液按照 1 ∶ 2 000 的比例稀释，并将硝酸纤维素膜浸入其中，室温孵育 30 min～60 min。

7.6 洗膜

将平皿中抗体液倒出，加入 PBST 20 mL 洗膜 3 次～4 次，每次 3 min。

7.7 加酶标抗体

将硝酸纤维素膜浸入稀释至工作浓度的酶标抗体溶液中，室温孵育 30 min～60 min。

7.8 显色

显色底物氯化硝基四氮唑兰（NBT）66 μL 和 BCIP 33 μL 加到 10 mL 底物缓冲液中混匀，洗好的膜放入底物显色液中反应，显色 5 min～20 min，在蒸馏水中漂洗终止反应，肉眼观察并记录结果。

7.9 结果

显色后，首先观察对照的颜色反应，阳性对照应显棕红色或深褐色，阴性对照及空白对照应不显色，若出现阳性对照不显色或阴性对照显棕红色或深褐色，则应分析原因，并重新进行试验。

对照结果正确的情况下，再观察样品的颜色反应，如检测样品出现棕红色或深褐色圆形斑点者，判为阳性；如检测样品与阴性对照相同，不出现可见斑点，判为阴性；介于两者之间判为可疑样品，需重新检测一次，或用其他方法验证。

8 RT-PCR

8.1 植物总 RNA 提取

每株小麦样品取 0.2 g 病叶剪碎，置于液氮中研磨，参照植物总 RNA 提试剂盒（HiPure Plant RNA Mini Kit）的操作步骤提取病叶 RNA，然后在紫外分光光度计上测定所提 RNA 的浓度和纯度。

8.2 逆转录

参照 First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书的操作步骤对植物材料总 RNA 进行逆转录反应，操作步骤如下：

RNA 的热变性：向无 RNase 的 PCR 管中，依次加入植物总 RNA 1 μg，Random Primer 1 μL，最后加入 RNase Free H_2O 至液体总体积为 12 μL，混匀后于 PCR 仪中，65 ℃反应 5 min 后迅速冰浴 2 min ～3 min。

RT 反应液的配制：向变性后的 RNA 中加入 5×M-MuLV buffer 4 μL，10 mol/L dNTP 2 μL，RNase Inhibitor（40 U/μL）1μL，M-MuLV 反转录酶（200 U/μL）1μL，用移液枪轻轻吸打混匀后，进行逆转录反应。

逆转录反应条件：42 ℃ 10 min，70 ℃ 10 min，自然冷却至室温，获得的溶液即为 Cdna，将其保存于－20 ℃备用或进行后续 PCR。

8.3 PCR

以 8.2 获得的 cDNA 作为模板，利用相应引物进行 PCR 鉴定。20 μL PCR 反应体系：2×Taq Master mix 10 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 8 μL，移液枪轻轻吸打混匀后，于 PCR 仪中扩增。PCR 反应程序：95 ℃ 3 min；95 ℃ 15 s，58 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s（30 个循环）；72℃，5 min。

8.4 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，电泳结束后，凝胶成像系统观察、拍照。预期的 PCR 扩增产物片段大小：WYMV 为 124 bp，CWMV 为 182 bp。

8.5 结果判定

在阳性对照在预期位置产生明显条带，阴性对照和空白对照在预期位置未产生条带的前提下：

a） 如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带，则为阳性；

b） 如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带，则为阴性。

附　录　A
（规范性）
间接 ELISA 试剂

A.1　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，溶解于 900 mL 蒸馏水中，用盐酸调节 pH 至 9.6，用蒸馏水定容至 1 000 mL。

A.2　PBST 缓冲液（pH 7.4）

氯化钠（NaCl）8.0 g，磷酸二氢钾（KH_2PO_4）0.2 g，磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）1.15 g，氯化钾（KCl）0.2 g，0.5 mL Tween-20，溶解于 900 mL 蒸馏水中，用盐酸调节 pH 至 7.4，蒸馏水定容至1 000 mL。

A.3　抗体缓冲液

PVP（MW 24～4 000）2 g，脱脂奶粉 1 g，溶解于 100 mL PBST 中。

A.4　抗血清

病毒特异性抗体，抗体效价：1∶2 000，－20 ℃保存。

A.5　酶标抗体

碱性磷酸酶标记抗体，抗体效价：1∶2 000，－20 ℃保存。

A.6　底物稀释缓冲液（pH 9.8）

二乙醇胺 9.7 mL，氯化镁（$MgCl_2$）0.01 g，溶解于 80 mL 蒸馏水中，用盐酸调节 pH 至 9.8，用蒸馏水定容至 100 mL。

A.7　底物溶液（现配现用）

1 mg PNPP（对-硝基苯磷酸钠）溶于 1 mL 底物缓冲液中。

附　录　B
（规范性）
Dot-ELISA 试剂

B.1　PBS 磷酸盐缓冲液（pH 7.2）

氯化钠（NaCl）8.0 g，磷酸二氢钾（KH_2PO_4）0.2 g，磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）1.15 g，氯化钾（KCl）0.2 g，溶解于 900 mL 蒸馏水中，用盐酸（HCl）调节 pH 至 7.2，蒸馏水定容至 1 000 mL。

B.2　PBST 缓冲液（pH 7.4）

氯化钠（NaCl）8.0 g，磷酸二氢钾（KH_2PO_4）0.2 g，磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）1.15 g，氯化钾（KCl）0.2 g，0.5 mL Tween-20，溶解于 900 mL 蒸馏水中，用盐酸调节 pH 至 7.4，蒸馏水定容至 1 000 mL。

B.3　封闭液

取脱脂奶粉 5 g 加入到 100 mL PBST，充分溶解，4℃保存。

B.4　抗血清

病毒特异性抗体，抗体效价：1∶2 000，－20 ℃保存。

B.5　酶标抗体

碱性磷酸酶标记抗体，抗体效价：1∶2 000，－20 ℃保存。

B.6　底物稀释缓冲液（pH 9.5）

Tris・Cl 12.11 g，氯化镁（$MgCl_2$）2.38 g，氯化钠（NaCl）5.85 g，溶解于 900 mL 蒸馏水中，用氢氧化钠调节 pH 至 9.5，用蒸馏水定容至 1 000 mL。

B.7　底物溶液（现配现用）

碱性磷酸酶显色试剂（NBT/BCIP）。

附　录　C
（规范性）
RT-PCR 检测引物和试剂

C.1　引物序列

引物序列见表 C.1。

表 C.1　引物序列

检测对象	引物名称	序列
WYMV	WYMV CP-F	5′-CAGTGGCGCTTCAGACAAAC-3′
	WYMV CP-R	5′- TCTCAAGCCCCCATTCAACC -3′
CWMV	CWMV CP-F	5′- GAGGGGGTCAGTCAGGTACT -3′
	CWMV CP-R	5′-GTCATCAGTTCGCCCAAAGC -3′

C.2　逆转录试剂

M-MuLV 反转录酶（200 U/μL），RNase Inhibitor（40 U/μL），dNTPs（10 mM）。

C.3　PCR 试剂

2 × Rapid Taq Master Mix。