



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 40194—2021

---

## 大麦条纹花叶病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Barley stripe mosaic virus*

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

---

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会



## 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。

本文件由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本文件起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国福州海关。

本文件主要起草人：张永江、沈建国、辛言言。



# 大麦条纹花叶病毒检疫鉴定方法

## 1 范围

本文件规定了大麦条纹花叶病毒的血清学和分子生物学检疫鉴定方法。  
本文件适用于可能带有大麦条纹花叶病毒的植物及其产品的检疫鉴定。

## 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 大麦条纹花叶病毒基本信息

学名: *Barley stripe mosaic virus*

缩写: BSMV

异名: *Barley false stripe virus*、*Barley mild stripe mosaic virus*、*Barley mild stripe virus*、*Barley mosaic virus*、*Barley stripe mosaic hordeivirus*、*Barley very mild stripe mosaic virus*、*Oat stripe mosaic virus*、*Setripe mosaic virus*

分类地位: 马泰利病毒目 (*Martellivirales*) 植物杆状病毒科 (*Virgaviridae*) 大麦病毒属 (*Hordeivirus*) 成员。

大麦条纹花叶病毒的其他信息参见附录 A。

## 5 方法原理

大麦条纹花叶病毒的血清学特性和基因组特征是该病毒检疫鉴定的依据。根据 BSMV 与抗体之间的特异性反应,对植物样品进行双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (DAS-ELISA); 依据 BSMV 的基因组特征进行 RT-PCR、实时荧光 RT-PCR 检测; 通过这些方法的有效组合,判断样品是否带有 BSMV。

## 6 仪器用具与试剂

### 6.1 仪器设备

6.1.1 电子天平 (感量 0.001 g)。

6.1.2 高速冷冻离心机。

- 6.1.3 微型瞬时离心机。
- 6.1.4 普通冰箱。
- 6.1.5 超低温冰箱(−80 ℃)。
- 6.1.6 制冰机。
- 6.1.7 涡旋振荡器。
- 6.1.8 磁力搅拌器。
- 6.1.9 高压灭菌锅。
- 6.1.10 pH 计。
- 6.1.11 超净工作台。
- 6.1.12 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.1.13 PCR 仪。
- 6.1.14 微波炉。
- 6.1.15 电泳仪。
- 6.1.16 电泳槽。
- 6.1.17 凝胶成像分析仪。
- 6.1.18 洗板机。
- 6.1.19 酶标仪。
- 6.1.20 酶联板。
- 6.1.21 可调移液器(2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)。
- 6.1.22 可调移液器头。
- 6.1.23 Eppendorf 管。
- 6.1.24 研钵。
- 6.1.25 微型磨杵。

## 6.2 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 中相关规定。

- 6.2.1 DAS-ELISA 检测试剂,制备按附录 B 中 B.1 执行。
- 6.2.2 RT-PCR 检测试剂,制备按附录 C 中 C.1 执行。
- 6.2.3 实时荧光 RT-PCR 检测试剂,制备按附录 D 中 D.1 执行。

## 7 检测样品的制备

### 7.1 种子

挑取畸形、不成熟种子播于灭菌土中,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,采集的未表现症状的叶片分成 2 份;用于酶联测定和分子生物学检测。也可以挑取畸形、不成熟的种子直接进行酶联测定和分子生物学检测。

### 7.2 植株

对于有症状(如叶片条纹、花叶、褐色细小斑点等)的植株,每个植株编号并进行单株检测。没有症状的分组并编号后按组进行检测,分组方法和检测方法同 7.1。

### 7.3 植物产品

植物产品有症状的部分(如条纹、花叶等)单独编号检测。没有症状或无法观察症状的植物产品,分

组编号,分组方法和检测方法同 7.1。

## 8 检测鉴定

### 8.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定

包被抗体后,再把制备的样品上清液加入已包被 BSMV 抗体的酶联板中,进行 DAS-ELISA 检测。每个样品平行加到两个孔中。健康的植物组织作为阴性对照,感染 BSMV 的植物组织作为阳性对照,样品提取缓冲液作为空白对照;其中阴性对照的植物种类和材料(如叶片)应尽量与检测样品相一致。

具体操作按 B.2 的规定执行。

### 8.2 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测的阴性和阳性对照设置同 8.1,灭菌双蒸水作为空白对照。分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后进行 PCR 检测,具体操作按 C.2 的规定执行。如采用商品化一步法试剂盒,则按照试剂盒说明进行。

### 8.3 实时荧光 RT-PCR 检测

实时荧光 RT-PCR 检测的阴性和阳性对照设置同 8.1,灭菌双蒸水作为空白对照。分别提取样品和对照的总 RNA,反转录合成 cDNA 后进行实时荧光 PCR 检测,具体操作按 D.2 和 D.3 的规定执行。如采用商品化一步法试剂盒,则按照试剂盒说明进行。

## 9 结果判定

DAS-ELISA、RT-PCR 和荧光 RT-PCR 检测方法按照 B.3、C.3、D.4 的判定方法进行判定,其中任意两种检测方法的结果为阳性即可判定样品携带 BSMV。

## 10 样品保存与结果记录

### 10.1 样品保存

经检测确定携带 BSMV 的样品应保存在适合的环境下以备复核。如种子保存在干燥室温环境中;种苗、叶片等样品保存在超低温冰箱(—80℃)中;做好登记和标记工作,保存期限至少 1 年。

### 10.2 结果记录

记录包括样品来源、种类、检测时间、地点、方法和结果、检测人员签字。DAS-ELISA 检测应有酶联反应数值;RT-PCR 检测应有电泳图片;实时荧光 RT-PCR 检测应有荧光曲线图。

## 附 录 A

(资料性)

### 大麦条纹花叶病毒相关资料

#### A.1 寄主范围

寄主范围有限,自然寄主主要为大麦(*Hordeum vulgare*)、栽培二棱大麦(*H. distichon*)、小麦(*Triticum aestivum*)和野燕麦(*Avena fatua*)。

#### A.2 危害症状

受侵染的大麦在三叶期时即出现褐色分散的细小斑点,后逐渐增多引起叶片枯死。有的品种沿叶片中脉出现褐色条斑,在上部叶片出现黄绿相间的花叶和斑驳。轻病株能抽穗,但千粒重明显降低。

小麦感染大麦条纹花叶病毒,发病轻的,叶片上只有褪绿小斑驳;发病中等的,在叶片上出现较大的褪绿斑驳;发病中等偏重的,则出现黄色花叶或坏死斑块;发病严重的则使整张叶片变成黄白色。病株所结种子不饱满,千粒重不同程度地降低。

#### A.3 分布地区

中国、以色列、日本、韩国、黎巴嫩、巴基斯坦、叙利亚、突尼斯、土耳其、埃及、澳大利亚、新西兰、丹麦、匈牙利、罗马尼亚、德国、墨西哥、美国、阿根廷、巴西、秘鲁、加拿大、南非、俄罗斯、智利、波兰、保加利亚、芬兰、捷克、葡萄牙、摩尔多瓦、瑞士、塞尔维亚、黑山、斯洛伐克、斯洛文尼亚、乌克兰、希腊、意大利、英国、朝鲜。

#### A.4 传播方式

该病毒主要通过种子传播,也可通过花粉传播。种传率分别为大麦 90%~100%,小麦 7%~81%,野燕麦 22%,燕麦 0~10%,长穗燕麦草 22%,无芒燕麦 8%,鸭跖草 8%,玉米 90%~100%,黑麦草属 3%~8%。

#### A.5 粒体形态

病毒粒体为棒状,长度在 50 nm~150 nm,大多数为 110 nm;直径约为 20 nm。

#### A.6 基因组

基因组为正单链 RNA,由三个组分组成,其中组分 RNA $\alpha$  的长度约 3.7 kb,组分 RNA $\beta$  的长度约 3.2 kb,组分 RNA $\gamma$  的长度在不同株系间差别较大,约 2.7 kb~3.1 kb。



## 附录 B

(规范性)

## 双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)

## B.1 试剂

## B.1.1 包被抗体

特异性大麦条纹花叶病毒抗体。建议使用商品化试剂盒抗体;4℃保存不超过1年;抗体使用时的稀释比例按说明书要求稀释。

## B.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的大麦条纹花叶病毒抗体。

## B.1.3 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

## B.1.4 1×PBST 缓冲液(pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.15 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL

加入 900 mL 双蒸水并用磁力搅拌器搅拌,用 pH 计调节至 7.4,并定容至 1 000 mL,4℃储存。

## B.1.5 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

亚硫酸钠(Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	1.3 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP, MW24 000-40 000)	20.0 g
溶于 900 mL 的 1×PBST 中,并用 1×PBST 定容至 1 000 mL,4℃储存。	

## B.1.6 包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	2.93 g
溶于 900 mL 双蒸水中,并定容至 1 000 mL,4℃储存。	

## B.1.7 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

牛血清白蛋白(BSA)	2.0 g
聚乙烯基吡咯烷酮(PVP, MW24 000-40 000)	20.0 g
溶于 900 mL 1×PBST 中,并用 1×PBST 定容至 1 000 mL,4℃储存。	

## B.1.8 底物缓冲液(pH 9.8)

二乙醇胺	97 mL
------	-------

氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )

0.1 g

溶于 800 mL 双蒸水中,用浓盐酸( $\text{HCl}$ )调 pH 至 9.8,定容至 1 000 mL,4 ℃ 储存。

## B.2 试验步骤

### B.2.1 包被抗体

按要求的浓度和需要的体积用包被缓冲液稀释包被抗体,每孔加 100  $\mu\text{L}$ 。酶联板加盖或用保鲜膜包好,37 ℃ 孵育 2 h。清空孔中溶液,用 1×PBST 加满各孔,3 min 后倒掉孔中溶液,在吸水纸上拍干。再重复 2 次上述洗板过程。

### B.2.2 样品制备与加样

待测样品、阴性对照及阳性对照按 1 : 10(W/V)加入抽提缓冲液,在研钵中研磨;将样品研磨液倒入离心管中,5 000 r/min 离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照也可以按试剂盒说明书进行处理。按 100  $\mu\text{L}$ /孔分别加入制备好的检测样品、阴性对照和阳性对照;酶联板加盖或用保鲜膜包好,4 ℃ 孵育过夜。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 1×PBST 洗涤 3 次,每次 3 min;或用洗板机自动清洗 3 次。

### B.2.3 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  $\mu\text{L}$ /孔,酶联板加盖或用保鲜膜包好,37 ℃ 孵育 4 h。酶联板用自来水彻底冲洗,再用 1×PBST 洗涤 3 次,每次 3 min;或用洗板机自动清洗 3 次。

### B.2.4 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),100  $\mu\text{L}$ /孔加入到酶联板中,室温避光孵育。

### B.2.5 读数

在不同的时间内如 30 min、60 min、90 min、120 min 或更长时间,用酶标仪在 405 nm 处读 OD 值。

## B.3 结果判定

### B.3.1 质量控制要求

对照孔的  $\text{OD}_{405}$  值(缓冲液孔、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  $\text{OD}_{405}$  值  $\leq 0.15$ ,当阴性对照孔的  $\text{OD}_{405}$  值  $\leq 0.05$  时,按 0.05 计算;阳性对照孔的  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值  $> 5$ ;同一样品的重复性基本一致。

### B.3.2 结果判定

在满足 B.3.1 的质量控制要求后,结果原则上可判断如下:样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值  $> 2$ ,判为阳性;样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值为 2 时,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证;样品  $\text{OD}_{405}$  值/阴性对照  $\text{OD}_{405}$  值  $< 2$ ,判为阴性。

若不满足 B.3.1 的质量控制要求,则不能进行结果判断。

## 附 录 C

### (规范性)

### RT-PCR 检测

#### C.1 试剂

##### C.1.1 核酸提取试剂

Trizol 或合格的 RNA 提取试剂盒。

##### C.1.2 电泳缓冲液 TAE(50×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸( $C_2H_4O_2$ )	57.1 mL
乙二胺四乙酸二钠( $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ )	37.2 g
双蒸水定容至 1 000 mL,用时稀释至 1×TAE。	

#### C.2 检测步骤

##### C.2.1 核酸提取

用电子天平称取 0.1 g 样品加液氮研磨成粉末状,迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管(用高压灭菌锅高压灭菌)中,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,用涡旋振荡器剧烈振荡 3 min;用高速冷冻离心机 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min;将上清液移入一新离心管中,加入 0.5 mL 三氯甲烷,猛烈振荡 15 s;4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min;小心吸取上层无色水相到新离心管中;加入等体积异丙醇,混匀;室温静置 10 min;4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 75% 的冷乙醇洗涤沉淀;4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,弃乙醇;沉淀于室温下充分干燥后溶于 30  $\mu$ L DEPC- $H_2O$  中,微型瞬时离心机瞬离,置于普通冰箱-20 ℃ 保存备用。

注:此处以 0.1 g 样品为例进行核酸提取,实际检测时如样品量有变化,加入的试剂可按比例调整;或者按照商品化 RNA 提取试剂盒进行操作。

##### C.2.2 引物序列

上游引物 BSMVF:5'-AGGATCAATGGGATACACAAGTT-3'

下游引物 BSMVR:5'-TTCGAAAGTCTTCCTGGTATACAC-3'

产物大小:503 bp。

##### C.2.3 反转录

反转录总体系为 20  $\mu$ L。0.2 mL PCR 管中加入总 RNA 1  $\mu$ L,dNTPs(10 mmol/L)1  $\mu$ L,DEPC 处理水 10  $\mu$ L,BSMVR(20  $\mu$ mol/L)2  $\mu$ L,70 ℃ 保温 5 min;冰上(用制冰机制备碎冰)放置 5 min;再加入 5×buffer 4  $\mu$ L,RNasin(40 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,M-MLV(200 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,42 ℃ 保温 1 h,得到 cDNA 后用作 PCR 的模板。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

##### C.2.4 PCR 扩增

0.2 mL PCR 管中加入 10×PCR buffer(含  $Mg^{2+}$ )2  $\mu$ L,dNTPs(10 mmol/L) 0.6  $\mu$ L,BSMVF 及 BSMVR(均为 20  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L,2 U/ $\mu$ L Taq 酶 1  $\mu$ L,cDNA 模板 2  $\mu$ L 和 DEPC 处理水 13.4  $\mu$ L。

设置阳性对照、阴性对照及空白对照。试剂全部加入后将 PCR 管放置到 PCR 仪中进行反应。

反应程序:95 ℃,8 min;95 ℃,45 s;58 ℃,45 s;72 ℃,1 min;40 个循环,72 ℃,10 min。

注:如采用商品化一步法 RT-PCR 检测试剂盒,可按照说明书进行操作,将步骤 C.2.3 和 C.2.4 合并进行。

### C.2.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

用微波炉将琼脂糖融化后制备 1% 的琼脂糖凝胶并放入电泳槽,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,用电泳仪进行电泳。电泳结束后在凝胶成像分析仪中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。

### C.3 结果判定

阳性对照在 503 bp 左右处有条带,阴性对照和空白对照无特异性条带,待测样品出现与阳性对照一致的条带,可判定为阳性。

阳性对照在 503 bp 左右处有条带,阴性对照、空白对照及待测样品无特异性条带,可判定结果为阴性。

**附 录 D**  
(规范性)  
**实时荧光 RT-PCR 检测**

**D.1 试剂**

D.1.1 核酸提取试剂同 C.1.1。

D.1.2 TaqMan One-step RT-PCR Mixture。

D.1.3 引物探针：

上游引物 BSMVF:5'-CGGAATCGGTGTCGTTGGA-3'

下游引物 BSMVR:5'-CTCTTTGACCCGTCTCTGTAACCTACC-3'

探针 BSMVP:5'-FAM-AAATCAAAAACATTCTACGGAATCCGG-TAMRA-3'。

**D.2 核酸提取**

方法同 C.2.1。

**D.3 实时荧光 RT-PCR 反应**

反应体系:0.2 mL 离心管中加入  $2 \times$  One Step RT-PCR 10  $\mu$ L, Enzyme Mix 0.6  $\mu$ L, BSMVF (10  $\mu$ mol/L)0.4  $\mu$ L, BSMVR (10  $\mu$ mol/L)0.4  $\mu$ L, BSMVP (10  $\mu$ mol/L)0.8  $\mu$ L, 模板 RNA 2  $\mu$ L, 补 DEPC 处理水至 20  $\mu$ L。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。所有试剂加入均在超净工作台上操作;试剂全部加入后将离心管放置到实时荧光定量 PCR 仪中进行反应。

反应程序:45  $^{\circ}$ C 10 min;95  $^{\circ}$ C 10 min;95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,共 45 个循环。

**D.4 结果判定**

对于疑似分离物,阳性对照和空白对照正常,出现典型扩增曲线判定为阳性;无典型扩增曲线判定为阴性。

对于样品检测,阳性对照和空白对照正常,出现典型扩增曲线,且  $CT \leq 35$ ,判定为阳性; $35 < CT \leq 40$ ,增加核酸用量 2 倍~10 倍再次测试,出现典型扩增曲线,且  $CT \leq 35$ ,判定为阳性;其余情况判定为阴性。





中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
大麦条纹花叶病毒检疫鉴定方法  
GB/T 40194—2021

\*

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.org.cn](http://www.spc.org.cn)

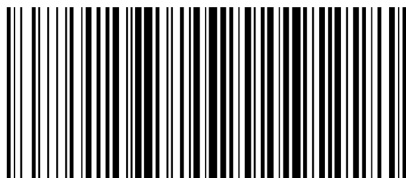
服务热线: 400-168-0010

2021年5月第一版

\*

书号: 155066 · 1-67584

版权专有 侵权必究



GB/T 40194-2021



码上扫一扫 正版服务到