



中国农业标准经典收藏系列

NY

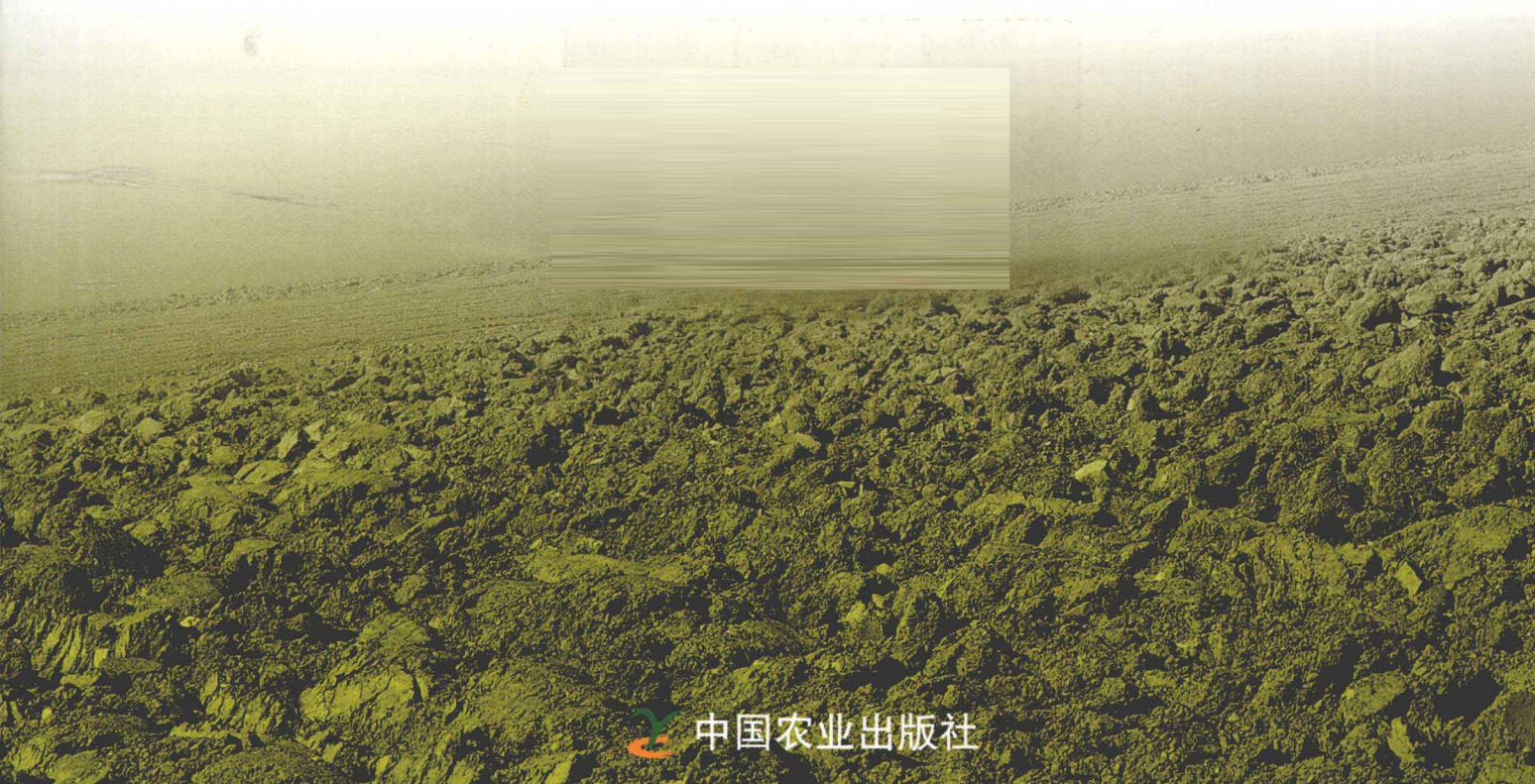
最新

中国农业行业标准

The Latest Agriculture Industry Standard of China

第四辑 4

农业标准出版研究中心◎编



中国农业出版社

中国农业标准经典收藏系列

最新中国农业行业标准

第四辑

4

农业标准出版研究中心 编

中国农业出版社

目 录

NY/T 1491—2007	花卉植物病毒检测规程	2591
NY/T 1492—2007	桑蚕原种繁育技术规程	2603
NY/T 1493—2007	农药残留试验良好实验室规范	2613
NY/T 1494—2007	辊筒式天然橡胶初加工机械安全技术要求	2627
NY/T 1495—2007	热带作物纤维刮麻机械设备安全技术要求	2633
NY/T 1496.1—2007	农村户用沼气输气系统第1部分：塑料管材	2639
NY/T 1496.2—2007	农村户用沼气输气系统第2部分：塑料管件	2649
NY/T 1496.3—2007	农村户用沼气输气系统第3部分：塑料开关	2657
NY/T 1497—2007	饲料添加剂 大蒜素（粉剂）	2663
** NY/T 1498—2007	饲料微生物添加剂地衣芽孢杆菌	
NY/T 1499—2007	草种病害检疫技术规程	2671
NY 1500.1.1~1500.30.4—2007	农产品中农药最大残留限量	2687
NY/T 1502—2007	生物农药中辣椒碱总量的测定	2693
NY/T 1503—2007	甜荞	2697
NY/T 1504—2007	莲子	2703
NY/T 1505—2007	水果套袋技术规程 苹果	2711
NY/T 1506—2007	绿色食品 食用花卉	2717
NY/T 1507—2007	绿色食品 山野菜	2723
NY/T 1508—2007	绿色食品 果酒	2731
NY/T 1509—2007	绿色食品 芝麻及其制品	2737
NY/T 1510—2007	绿色食品 麦类制品	2745
NY/T 1511—2007	绿色食品 膨化食品	2753
NY/T 1512—2007	绿色食品 生面食、米粉制品	2761
NY/T 1513—2007	绿色食品 畜禽可食用副产品	2767
NY/T 1514—2007	绿色食品 海参及制品	2775
NY/T 1515—2007	绿色食品 海蜇及制品	2783
NY/T 1516—2007	绿色食品 蛙类及制品	2791
NY/T 1517—2007	加工用番茄	2799
NY/T 1518—2007/ISO 4072: 1982	袋装生咖啡 取样	2807
NY/T 1519—2007/ISO 10470: 2004	生咖啡 缺陷参考图	2813
NY/T 1520—2007	木薯	2827
NY/T 1521—2007	澳洲坚果 带壳果	2837
NY/T 1522—2007	椰子产品 椰纤果	2843
NY/T 1523—2007	钢丝绳芯用剑麻纱	2855
NY/T 1524—2007	复合橡胶 规格	2861
NY/T 1525—2007	胶乳黏合纤维垫	2867

NY/T 1526—2007	植物油中棕榈油的鉴别	2879
NY/T 1527—2007	天然生胶 水溶物含量的测定	2885
NY/T 1528—2007	浓缩天然胶乳 化学稳定性的测定	2889
NY/T 1529—2007	鲜切蔬菜加工技术规范	2895
NY/T 1530—2007	龙眼、荔枝产后贮运保鲜技术规程	2907
NY/T 1531—2007	番茄酱加工技术规范	2915
NY/T 1532—2007	水稻免耕抛秧栽培技术规程	2923
NY/T 1533—2007	农用航空器喷施技术作业规程	2931
NY/T 1534—2007	水稻工厂化育秧技术要求	2945
NY/T 1535—2007	肥料合理使用准则 微生物肥料	2955
NY/T 1536—2007	微生物肥料田间试验技术规程及肥效评价指南	2959
NY/T 1537—2007	苧麻生物脱胶技术规范	2967
NY/T 1538—2007	苧麻纤维细度快速测定方法	2973
NY/T 1539—2007	剑麻纤维及制品商业公定重量的测定	2983
NY/T 1540—2007	农资营销员	2991
NY/T 1541—2007	农机检验员	3001
NY/T 1542—2007	大豆栽培工	3013
NY/T 1543—2007	喷油泵调修工	3023
NY/T 1544—2007	农业机械操作工	3035
NY/T 1545—2007	烟花爆竹制作工	3047
NY/T 1546—2007	农机服务经纪人	3057
NY/T 1547—2007	渔业船舶电焊工	3065
NY/T 1548—2007	农业技术推广员（水产）	3073
NY/T 1549—2007	生物颗粒肥加工成套设备质量技术评价规范	3083
NY/T 1550—2007	风送高射程喷雾机	3091
NY/T 1551—2007	禽蛋清选消毒分级技术规范	3103
NY/T 1552—2007	铺膜机质量评价技术规范	3111
NY/T 1553—2007	日光温室能效评价规范	3119
NY/T 1554—2007	饲料粉碎机质量评价技术规范	3129
NY/T 1555—2007	苹果育果纸袋	3137
NY/T 1556.1—2007	机制蚕簇 第一部分 纸板方格簇	3143
NY/T 1556.2—2007	机制蚕簇 第二部分 塑料折簇	3149
NY/T 1557—2007	天然橡胶初加工机械 干搅机	3155
NY/T 1558—2007	天然橡胶初加工机械 干燥设备	3163
NY/T 1559—2007	滴灌铺管铺膜精密播种机质量评价技术规范	3171
NY/T 1560—2007	热带作物机械 分类	3187
NY/T 1561—2007	秸秆燃气灶	3195
NY 1562—2007	纯血马登记	3205
NY/T 1563—2007	饲料级 乳清粉	3209
NY/T 1564—2007	羊肉分割技术规范	3217
NY/T 1565—2007	冷却肉加工技术规范	3235
NY/T 1566—2007	标准化肉鸡养殖场建设规范	3241
NY/T 1567—2007	标准化奶牛场建设规范	3251

NY/T 1568—2007	标准化规模养猪场建设规范	3257
NY/T 1569—2007	畜禽养殖场质量管理体系建设通则	3265
NY/T 1570—2007	乳制品加工 HACCP 准则	3269
NY/T 1571—2007	羊胚胎移植技术规程	3285
NY/T 1572—2007	牛胚胎移植技术规程	3299
NY/T 1573—2007	辐照含骨类动物源性食品的鉴定—ESR 法	3313
NY/T 1574—2007	豆科牧草干草质量分级	3319
NY/T 1575—2007	草颗粒质量检验与分级	3327
NY/T 1576—2007	草种引种技术规范	3335
NY/T 1577—2007	草籽包装与标识	3351
NY/T 1578—2007	草原蝗虫调查规范	3355
NY/T 1579—2007	天然草原等级评定技术规范	3373
NY/T 1580—2007	饲料稻	3393
NY/T 1581—2007	食用向日葵籽	3399
NY/T 1582—2007	油菜籽中硫代葡萄糖苷的测定高效液相色谱法	3405
NY 5001—2007	无公害食品 葱蒜类蔬菜	3417
NY 5355—2007	无公害食品 芝麻	3423
NY 5356—2007	无公害食品 腌腊肉制品	3429
NY/T 5357—2007	无公害食品 海洋水产品捕捞生产管理规范	3435
NY 5358—2007	无公害食品 食用菌产地环境条件	3441

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1491—2007

花卉植物病毒检测规程

Rules for viruses detection on floral plants

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

2591

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准主要起草单位：农业部花卉产品质量监督检验测试中心（昆明）、农业部蔬菜产品质量监督检验测试中心（北京）。

本标准起草人：唐开学、王继华、王丽花、瞿素萍、张颢、熊丽、刘肃、陆琳、苏艳。

花卉植物病毒检测规程

1 范围

本标准规定了主要花卉植物常见病毒的检测方法。

本标准适用于主要花卉植物常见病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 18247—2000 主要花卉产品等级

3 定义

3.1

脱毒核心材料 **nuclear stock of virus free**

初次应用茎尖分生组织脱毒或其他有效脱毒方法培养形成的无病毒的再生材料。

3.2

扩繁材料 **propagation stock**

由脱毒核心材料在严格的隔离条件下生产出的符合质量标准的种苗(球)。

3.3

生产用材料 **certified stock**

用扩繁材料在隔离条件下生产出的符合质量标准的种苗(球)。

3.4

病毒病株允许率 **tolerance of virus plant**

同一检验批次的花卉植株中,病毒病株允许存在的最大限度,用病毒病株数占植株总数的百分率表示。

4 抽样

4.1 脱毒核心材料

每株(粒)均需检测。在继代培养中,每3个月检测一次。随机选取每株的中、上位置组织作为检测样品。样本在4℃~6℃下保存,24 h内检测。

4.2 扩繁材料及生产用材料

抽样方法分为两次抽样。第一次抽样从同一检测批次中随机抽取,抽样比例小于等于10 000株(粒),按6%~10%抽取,最低抽样数量为100株(粒),不足100株(粒)时全部作为检测样品;大于10 000株(粒),按3%~5%抽取。最大样品抽样数为1 000株(粒)。第二次抽样在第一次抽取的样品中再随机抽取10%。

5 主要检测对象

5.1 麝香石竹

麝香石竹斑驳病毒 *Carnation mottle carmovirus* (CarMV)
麝香石竹坏死斑点病毒 *Carnation necrotic fleck closterovirus* (CNFV)
麝香石竹潜隐病毒 *Carnation latent carlavirus* (CLV)
麝香石竹蚀环病毒 *Carnation etched ring caulimovirus* (CERV)
麝香石竹叶脉斑驳病毒 *Carnation vein mottle potyvirus* (CVMV)
麝香石竹环斑病毒 *Carnation ringspot dianthovirus* (CRSV)

5.2 菊花

菊花 B 病毒 *Chrysanthemum B carlavirus* (CVB)
番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)
番茄不孕病毒 *Tomato aspermy cucumovirus* (TAV)
黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

5.3 满天星

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

5.4 火鹤

芋花叶病毒 *Dasheen mosaic potyvirus* (DsMV)

5.5 非洲菊

烟草脆裂病毒 *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV)
黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)
番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)

5.6 月季

苹果花叶病毒 *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV)
李坏死环斑病毒 *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV)

5.7 一品红

一品红花叶病毒 *Poinsettia mosaic tymovirus* (PoMV)

5.8 洋桔梗

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)
烟草脆裂病毒 *Tobacco rattle tobnavirus* (TRV)

5.9 补血草

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)
芜菁花叶病毒 *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV)

5.10 百合

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)
百合无症病毒 *Lily symptomless carlavirus* (LSV)
百合斑驳病毒 *Lily mottle potyvirus* (LMoV)

5.11 郁金香

郁金香碎色病毒 *Tulip breaking potyvirus* (TBV)
黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)
百合无症病毒 *Lily symptomless carlavirus* (LSV)

5.12 鸢尾

鸢尾重花叶病毒 *Iris severe mosaic potyvirus* (ISMV)
水仙潜隐病毒 *Narcissus latent macluravirus* (NaLV)

5.13 唐菖蒲

菜豆黄花叶病毒 *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV)

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV)

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

5.14 马蹄莲

芋花叶病毒 *Dasheen mosaic potyvirus* (DsMV)

5.15 水仙

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

水仙花叶病毒 *Narcissus mosaic potexvirus* (NMV)

水仙黄条斑病毒 *Narcissus yellow stripe potyvirus* (NYSV)

5.16 兰花

建兰花叶病毒 *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV)

齿兰环斑病毒 *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV)

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV)

5.17 凤仙花

凤仙花坏死斑点病毒 *Impatiens necrotic spot tospovirus* (INSV)

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)

5.18 仙客来

黄瓜花叶病毒 *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)

5.19 凤梨

番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)

6 检测方法

指示植物检测法按附录 A 执行。

双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)按附录 B 执行。

反转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)按附录 C 执行。

7 质量要求

各种花卉种苗(球)病毒病株允许率应符合 GB/T 18247—2000 中的规定。

附 录 A
(规范性附录)
指示植物检测法

A.1 指示植物的栽植

每次检测指示植物数量不应少于 4 株。

种子播种于经过消毒的富含有机质土壤的花盆中,出苗后移栽到苗盘,真叶长至 2 片~3 片时分盆移栽,第 4 叶~6 叶完全展开后接种。

栽植的环境条件:温度为 20℃~25℃,光照时数为 12 h。

A.2 机械摩擦接种

将待测样品与 3 倍量(W/V)的磷酸缓冲液(0.2 mol/L,pH 7.4)混合研磨,用细纱布过滤匀浆液,在 1 000 g~10 000 g 下离心 10 min~15 min 后取上清液。接种时,叶面喷撒 300 目~600 目金刚砂粉,用毛笔蘸上清液摩擦叶片表面。接种后,立即用蒸馏水冲洗被接种叶片。每株指示植物只接种一个样品,且每株指示植物接种两片以上叶片。

每次检测均设阳性、阴性和空白对照。

A.3 管理

将植株栽培于 20℃~25℃严格隔离的防虫温室中,盆间距 50 cm。逐日观察记录指示植物症状。各种花卉病毒在指示植物上的症状见表 A.1。

A.4 结果判断

根据指示植物症状,确定病毒有无。在所有接种的指示植物中只要有一株表现典型症状,该样品即为阳性。

表 A.1 指示植物及症状

病毒种类	指 示 植 物		指示植物症状
	中文名	拉丁学名	
麝香石竹坏死斑点病毒	苋色藜	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	局部褪绿斑
菊花 B 病毒	矮牵牛	<i>Petunia hybrida</i>	黄化或坏死斑
番茄不孕病毒	心叶烟	<i>Nicotiana glutinosa</i>	褪绿或坏死斑
黄瓜花叶病毒	黄瓜	<i>Cucumis sativus</i>	系统花叶
芋花叶病毒	春羽蔓绿绒	<i>Philodendron selloum</i>	系统性叶脉褪绿
烟草脆裂病毒	克利夫兰烟	<i>Nicotiana clelandii</i>	局部坏死斑或褪绿
芜菁花叶病毒	白肋烟	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	边缘褐色的局部坏死斑
百合无症病毒	麝香百合	<i>Lilium longiflorum</i>	叶片出现扭曲和白色条斑
郁金香碎色病毒	台湾百合	<i>Lilium formosanum</i>	斑驳或条纹
水仙花叶病毒	豌豆	<i>Pisum sativum</i>	局部坏死斑
兰花叶病毒	苋色藜	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	接种叶上形成大的污渍状病斑
齿兰环斑病毒	三生烟	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi-NC	局部坏死斑或环形斑

附 录 B

(规范性附录)

双抗体夹心酶联免疫吸附(DAS-ELISA)检测法

B.1 设备和材料

所用移液枪头、离心管、镊子等皆用蒸馏水清洗后,高温消毒。

B.1.1 微量移液器:200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、10 μL ~100 μL 、0.1 μL ~10 μL 。

B.1.2 电子天平:感量为 0.01 g、0.000 1 g。

B.1.3 离心机。

B.1.4 冰箱。

B.1.5 恒温箱。

B.1.6 酸度仪。

B.1.7 洗板机。

B.1.8 酶标检测仪。

B.2 药品和试剂

所用试剂为分析纯,水为蒸馏水,酶标抗体为碱性磷酸酶标记抗体。

B.2.1 包被缓冲液(0.05 mol/L Na_2CO_3 — NaHCO_3 缓冲液, pH 9.6)

Na_2CO_3 1.5 g

NaHCO_3 2.9 g

NaN_3 0.2 g

加蒸馏水溶解至 1 000 mL,调至 pH 为 9.6。

B.2.2 洗涤缓冲液(PBST, pH 7.4)

NaCl 8.0 g

KH_2PO_4 0.2 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g

KCl 0.2 g

Tween-20 0.5 mL

加蒸馏水溶解至 1 000 mL,调至 pH 7.4。

B.2.3 样品磨碎缓冲液

脱脂奶粉 2.0 g

聚乙烯吡咯烷酮(PVP, $\text{MW}_{24,000-40,000}$) 10.0 g

无水亚硫酸钠 1.3 g

NaN_3 0.2 g

Tween-20 10.0 g

溶于 PBST 中,定容至 1 000 mL,4℃保存。

B.2.4 酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

牛血清白蛋白 BSA 2.0 g

聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW _{24 000-40 000})	10.0 g
NaN ₃	0.2 g

溶于 PBST 中,定容至 1 000 mL,4℃ 保存。

B.2.5 底物缓冲液

二乙醇胺	97.0 mL
氯化镁	0.1 g
NaN ₃	0.2 g

溶于 800 mL 蒸馏水中,用 2 mol/L 盐酸调 pH 至 9.8,定容至 1 000 mL,4℃ 保存。

B.2.6 底物溶液(现用现配)

1 mg PNPP 溶于 1 mL 底物缓冲液中,浓度为 1 mg/mL。

B.2.7 终止液(3 mol/L 氢氧化钠溶液)

NaOH 120 g,溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

B.3 操作步骤

B.3.1 包被抗体

在酶标板孔中加入 100 μ L 用包被缓冲液按工作浓度稀释好的抗体,将酶标板放入湿盒中,置于 4℃ 冰箱内孵育过夜或室温(20℃~25℃)下孵育 4 h。

B.3.2 样品准备

将植物材料和研磨缓冲液按 1 : 10(W/V)的比例放入一次性自封袋中,将袋口封紧,碾压样品。

B.3.3 洗板

孵育结束后,用洗涤缓冲液清洗酶标板 4 次~6 次。每孔每次加 PBST 洗液 400 μ L,每次停留 1 min~2 min。

B.3.4 包被样品

取 B.20 研磨后的上清液,每孔加 100 μ L,每个待测样品进行 2 次重复,同时设阴性对照和阳性对照。

将酶标板放入湿盒中,4℃ 冰箱内孵育过夜或 21℃~24℃ 下孵育 2.5 h。

B.3.5 洗板

同 B.3.3。

B.3.6 包被酶标抗体

包被前 10 min 准备酶标抗体,将特异性酶标抗体用酶标抗体稀释缓冲液稀释至工作浓度,每孔加 100 μ L。酶标板放入湿盒,21℃~24℃ 下孵育 2.5 h。

B.3.7 洗板

同 B.3.3。

B.3.8 加底物溶液

每孔加入 100 μ L 的底物溶液。酶标板放入湿盒中 21℃~24℃ 下蔽光显色 30 min~60 min。

B.3.9 加终止液

每孔加入 50 μ L 终止液终止反应。

B.3.10 酶联检测

终止反应 20 min 内,将酶标板置于酶标仪中,在 405 nm 下测定吸收值(OD₄₀₅),记录反应结果。

B.4 结果判断

阳性对照和阴性对照按预期结果显色时,检测结果有效。

检测样品平均 OD_{405} / 阴性对照平均 $OD_{405} \geq 2$ 时,检测样品为阳性。

附 录 C

(规范性附录)

RNA 病毒的反转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)检测法

C.1 设备和材料

枪头、离心管和 PCR 小管等用具均用 DEPC (焦碳酸二乙酯)处理。

- C.1.1 微量移液器:200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、10 μL ~100 μL 、0.5 μL ~10 μL 。
- C.1.2 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- C.1.3 高速冷冻离心机。
- C.1.4 热循环仪(PCR 仪)。
- C.1.5 水平凝胶电泳系统。
- C.1.6 凝胶成像系统。

C.2 药品和试剂

所用试剂为分析纯,用水为双蒸水。

C.2.1 RNA 提取试剂

Trizol,氯仿,异丙醇,70%乙醇,双蒸水。

C.2.2 反转录试剂

M-MLV 反转录酶,5×M-MLV 缓冲液(250 mmol/L Tris·HCl pH 8.3,375 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl_2 ,50 mmol/L DTT),核糖核酸酶抑制剂,20 pmol/ μL 随机引物,10 mmol/L dNTP。
-20℃贮藏。

C.2.3 PCR 试剂

Taq DNA 聚合酶,10×Buffer (100 mmol/L Tris·HCl pH 8.3,500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl_2),PCR 引物(上游、下游)。

C.2.4 5×TBE 缓冲液

Tris	54 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	20 mL

定容至 1 000 mL,4℃保存。

C.2.5 加样缓冲液

0.25%溴酚蓝溶解于 40%(W/V)蔗糖水溶液,4℃保存。

C.3 操作步骤

C.3.1 RNA 的提取

将 0.05 g 样品组织放入灭菌研钵,加入 1 mL Trizol 溶液研成匀浆,将匀浆液移入 1.5 mL 离心管中,室温(20℃~25℃)放置 5 min,使组织充分裂解。加入 200 μL 氯仿,用力颠倒离心管以混匀,静置 5 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上层水相,移至另一个 1.5 mL 离心管中。加入 500 μL 异丙醇,混匀,室温(20℃~25℃)放置 10 min。12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 75%乙醇,振荡

片刻后,7 500 r/min 离心 5 min,小心地弃上清。室温(20℃~25℃)静置 5 min~15 min,使 RNA 沉淀恰好干燥,加入 50 μL 双蒸水,溶解后备用。

C.3.2 反转录

在 0.5 μL PCR 管中依次加入以下试剂:双蒸水 ddH₂O 8 μL,20 pmol/μL 随机引物 0.5 μL,RNA 模板 2 μL,70℃变性 10 min,冰上 5 min。然后加入 5×M-MLV 反转录缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTP 3 μL,40 u/μL 核糖核酸酶抑制剂 0.5 μL,200 u/μL M-MLV 反转录酶 1 μL。将以上所有成分混匀,低速离心后,热循环仪中 42℃反应 1 h。

C.3.3 PCR 扩增

依次在 PCR 管中加入:双蒸水 32.7 μL,10×PCR 缓冲液 5 μL,20 pmol/μL 上游引物 1 μL,20 pmol/μL 下游引物 1 μL,5 u/μL TaqDNA 聚合酶 0.3 μL,反转录产物 10 μL。充分混匀,按如下程序进行 PCR 扩增:94℃10 min,然后按 94℃变性 30 s、退火(温度详见本附录表 C.1)60 s、72℃延伸 60 s 进行 35 个循环,再 72℃延伸 10 min。

C.3.4 扩增产物检测

将 5×TBE 以 1:5 稀释成 1×TBE 工作液,与琼脂糖配制成 1.5%(W/V)的溶液,加热使琼脂糖完全熔化。待凝胶液冷却至 50℃~60℃时,加入适量的溴化乙锭(终浓度为 0.5 μg/μL),灌制平台,冷却。将 PCR 产物按 6:1 混合加样缓冲液,点样。按 1 V/cm~10 V/cm 电泳,至溴酚蓝迁移超过胶板长度的 1/2 以上,停止电泳。把胶板取出后,用凝胶成像系统进行观察、照相。

C.4 结果判断

阳性对照有目标带出现,阴性对照无带时,检测的结果为有效。检测样品有与阳性对照相同的目标带时为阳性,无目标带为阴性。

表 C.1 花卉病毒的特异性引物

病毒名称	引物序列(5'—3')	退火温度(T _m 值)(℃)	产物(bp)
百合隐症病毒 (LSV)	P1:atg caa tca aga cca gca ca P2:tca tcc att att tgc gta tc	52	876
百合斑驳病毒 (LMOV)	P1:ggt ggt gct acc aaa att tc P2:cat ctg ttg tat gtc tct cc	56	560
黄瓜花叶病毒 (CMV)	P1:cgt tca cat cta tca ccc ta P2:tac ttt ctc atg tgc cct at	56	335
李坏死环斑病毒 (PNRSV)	P1:atg gtt tgc cga att tgc aa P2:ctc tag atc tca agc agg tc	58	680
郁金香碎色病毒 (TBV)	P1:gag tac ggt ctc aac gac g P2:aga ttt gag aag tgc gcc atg	52	200
香石竹斑驳病毒 (CarMV)	P1:tta gtt tgc ccc cgt tgg taa cc P2:aag cgt cat cgt tga atc cca gag	60	610
菊花 B 病毒 (CVB)	P1:ctg gtg aag ctg tga gga ttt ctg P2:tgc cac agc tgc ata gag acg gca	62	780

