



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

第三辑 4

农业标准出版研究中心◎编

 中国农业出版社

责任编辑：刘 伟

封面设计：RUNLONG 润龙恒业 + 程石江

NY

The Latest Agriculture Industry Standard of China

ISBN 978-7-109-15324-0



9 787109 153240 >

总定价：980.00元

目 录

NY/T 1212—2006	马铃薯脱毒种薯繁育技术规程	2765
NY/T 1213—2006	豆类蔬菜种子繁育技术规程	2799
NY/T 1214—2006	黄瓜种子繁育技术规程	2807
NY/T 1215—2006	水稻光、温敏雄性核不育系育性鉴定规程	2819
NY/T 1216—2006	东北高油大豆栽培技术规范	2827
NY/T 1217—2006	境外引进植物隔离检疫规程	2837
NY/T 1218—2006	黄淮海地区强筋白硬冬小麦	2855
NY/T 1219—2006	浓缩天然胶乳初加工原料 鲜胶乳	2861
NY/T 1220.1—2006	沼气工程技术规范 第1部分：工艺设计	2869
NY/T 1220.2—2006	沼气工程技术规范 第2部分：供气设计	2883
NY/T 1220.3—2006	沼气工程技术规范 第3部分：施工及验收	2901
NY/T 1220.4—2006	沼气工程技术规范 第4部分：运行管理	2923
NY/T 1220.5—2006	沼气工程技术规范 第5部分：质量评价	2935
NY/T 1221—2006	规模化畜禽养殖场沼气工程运行、维护及其安全技术规程	2971
NY/T 1222—2006	规模化畜禽养殖场沼气工程设计规范	2987
NY/T 1223—2006	沼气发电机组	3001
NY/T 1224—2006	农用塑料薄膜安全使用控制技术规范	3025
NY/T 1225—2006	喷雾器安全施药技术规范	3031
NY/T 1226—2006	农机零配件 螺杆、螺母质量评价技术规范	3037
NY/T 1227—2006	残地膜回收机 作业质量	3047
NY/T 1228—2006	耕整机质量评价技术规范	3053
NY/T 1229—2006	旋耕施肥播种联合作业机 作业质量	3061
NY/T 1230—2006	饲料粉碎机 筛片和锤片质量评价技术规范	3067
NY/T 1231—2006	油菜联合收获机质量评价技术规范	3073
NY 1232—2006	植保机械运行安全技术条件	3083
NY/T 1233—2006	草原资源与生态监测技术规程	3089
NY/T 1234—2006	牛冷冻精液生产技术规程	3139
NY/T 1235—2006	牧草与草坪草种子清选技术规程	3151
NY/T 1236—2006	绵、山羊生产性能测定技术规范	3159
NY/T 1237—2006	草原围栏建设技术规程	3171
NY/T 1238—2006	牧草与草坪草种苗评定规程	3179
NY/T 1239—2006	飞播种草技术规范	3211
NY/T 1240—2006	草原鼠荒地治理技术规范	3221
NY/T 1241—2006	蜂产品加工技术管理规范	3229
NY/T 1242—2006	奶牛场 HACCP 饲养管理规范	3235
NY/T 1243—2006	蜂蜜中农药残留限量（一）	3247

NY/T 1244—2006	接触传染性脓疱皮炎诊断技术	3251
NY/T 1245—2006	奶牛用精饲料	3263
NY/T 1246—2006	饲料添加剂 维生素 D ₃ (胆钙化醇) 油	3269
NY/T 1247—2006	禽网状内皮增生病诊断技术	3277
NY/T 1248.1—2006	玉米抗病虫害性鉴定技术规范 第1部分: 玉米抗大斑病鉴定 技术规范	3287
NY/T 1248.2—2006	玉米抗病虫害性鉴定技术规范 第2部分: 玉米抗小斑病鉴定 技术规范	3295
NY/T 1248.3—2006	玉米抗病虫害性鉴定技术规范 第3部分: 玉米抗丝黑穗病鉴定技术 规范	3303
NY/T 1248.4—2006	玉米抗病虫害性鉴定技术规范 第4部分: 玉米抗矮花叶病鉴定技术 规范	3311
NY/T 1248.5—2006	玉米抗病虫害性鉴定技术规范 第5部分: 玉米抗玉米螟鉴定 技术规范	3321
NY/T 1249—2006	南江黄羊饲养技术规程	3329
NY/T 1250—2006	南江黄羊繁育技术规程	3341
NY/T 1251—2006	蚕茧干燥设备	3353
NY/T 1252—2006	大豆异黄酮	3365
NY/T 1253—2006	植草砖	3379
NY/T 1254—2006	钢筋混凝土果树支架	3385
NY/T 1255—2006	烟火药爆炸力测定 铅柱压缩猛度试验方法	3395
NY/T 1256—2006	冷冻水产品辐照杀菌工艺	3405
NY/T 1257—2006	食用菌中荧光物质的检测	3409
NY 5011—2006	无公害食品 仁果类水果	3413
NY 5013—2006	无公害食品 林果类产品产地环境条件	3419
NY/T 5022—2006	无公害食品 香蕉生产技术规程	3425
NY 5030—2006	无公害食品 畜禽饲养兽药使用准则	3441
NY 5032—2006	无公害食品 畜禽饲料和饲料添加剂使用准则	3447
NY/T 5038—2006	无公害食品 家禽养殖生产管理规范	3453
NY 5058—2006	无公害食品 海水虾	3459
NY 5066—2006	无公害食品 龟鳖	3465
NY 5073—2006	无公害食品 水产品中有毒有害物质限量	3471
NY 5095—2006	无公害食品 食用菌	3475
NY 5152—2006	无公害食品 鲆鲽鲷	3481
NY 5160—2006	无公害食品 鲑鳟鲟	3487
NY/T 5183—2006	无公害食品 杨桃生产技术规程	3493
NY 5288—2006	无公害食品 蛤	3507
NY 5305—2006	无公害食品 小杂粮	3513
NY 5316—2006	无公害食品 可食用花卉	3519
NY 5317—2006	无公害食品 芽类蔬菜	3525
NY 5318—2006	无公害食品 参类	3531
NY 5319—2006	无公害食品 瓜子	3537
NY 5320—2006	无公害食品 甜叶菊	3543

NY 5321—2006	无公害食品	茱萸果	3549
** NY 5322—2006	无公害食品	仁果类水果	
NY 5323—2006	无公害食品	香辛料	3555
NY 5324—2006	无公害食品	(常绿果树) 坚(壳)果	3561
NY 5325—2006	无公害食品	螺	3567
NY 5326—2006	无公害食品	头足类水产品	3573
NY 5327—2006	无公害食品	鲷科、鲹科、军曹鱼科海水鱼	3579
NY 5328—2006	无公害食品	海参	3585
NY 5329—2006	无公害食品	海捕鱼	3591
** NY 5330—2006	无公害食品	食用菌	
NY 5331—2006	无公害食品	水生蔬菜产地环境条件	3597
NY 5332—2006	无公害食品	大田作物产地环境条件	3603
NY/T 5333—2006	无公害食品	食用菌生产技术规范	3609
NY/T 5334—2006	无公害食品	小麦粉加工技术规范	3615
NY/T 5335—2006	无公害食品	产地环境质量调查规范	3621
NY/T 5336—2006	无公害食品	粮食生产管理规范	3627
NY/T 5337—2006	无公害食品	茶叶生产管理规范	3633
NY/T 5338—2006	无公害食品	家禽屠宰加工生产管理规范	3639
NY/T 5339—2006	无公害食品	畜禽饲养兽医防疫准则	3647
NY/T 5340—2006	无公害食品	产品检验规范	3653
NY/T 5341—2006	无公害食品	认定认证现场检查规范	3657
NY/T 5342—2006	无公害食品	产品认证准则	3661
NY/T 5343—2006	无公害食品	产地认定规范	3665
NY/T 5344.1—2006	无公害食品	产品抽样规范 第1部分: 通则	3671
NY/T 5344.2—2006	无公害食品	产品抽样规范 第2部分: 粮油	3677
NY/T 5344.3—2006	无公害食品	产品抽样规范 第3部分: 蔬菜	3681
NY/T 5344.4—2006	无公害食品	产品抽样规范 第4部分: 水果	3685
NY/T 5344.5—2006	无公害食品	产品抽样规范 第5部分: 茶叶	3689
NY/T 5344.6—2006	无公害食品	产品抽样规范 第6部分: 畜禽产品	3693
NY/T 5344.7—2006	无公害食品	产品抽样规范 第7部分: 水产品	3701

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1212—2006

马铃薯脱毒种薯繁育技术规程 (马铃薯脱毒技术规程、脱毒马铃薯基础种薯生产技术规程)

Rules for multiplication of certified seed potatoes
(Rules for virus eradication of potatoes. Rules for production of
virus-free foundation seed potatoes)

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施

2765

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F、附录 G、附录 H、附录 I、附录 J、附录 K、附录 L 是标准的规范性附件。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准的起草单位：农业部薯类产品质量监督检验测试中心（张家口）、河北省高寒作物研究所。

本标准主要起草人：尹江、张希近、姚瑞、马恢、高永龙。

马铃薯脱毒种薯繁育技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯脱毒技术、脱毒马铃薯基础种薯生产技术。

本标准适用于马铃薯脱毒技术和基础种薯生产。

2 引用标准

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,凡注明日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误内容)或修订版均不适用本标准,凡不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 7331—87 马铃薯种薯产地检疫规程

GB 3243—82 马铃薯种薯生产技术操作规程

GB 4406—84 种薯

GB 18133—2000 马铃薯脱毒种薯

NY/T 401—2000 脱毒马铃薯种薯(苗)病毒检测技术规程

3 术语和定义

3.1

脱毒

应用茎尖分生组织培养技术,脱去主要危害马铃薯的病毒病及类病毒病。

3.2

脱毒试管苗

经检测确认不带马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)、马铃薯 S 病毒(PVS)、马铃薯卷叶病毒(PLRV)的试管苗。

3.3

脱毒种薯

脱毒试管苗生产的试管薯、微型薯、网室生产的原原种和继代生产供于大田用的种薯。

3.3.1

原原种 Pre-Elite

用试管苗在容器内生产的微型薯(Microtuber)和在防虫网室生产出符合质量标准的种薯。

3.3.2

原种 Elite

一级原种、二级原种。

3.3.2.1

一级原种 Elite I

用原原种生产出符合一级原种质量标准的种薯。

3.3.2.2

二级原种 Elite II

用一级原种生产出符合二级原种质量标准的种薯。

3.4

病毒株允许率

指马铃薯脱毒种薯田内病毒病株的允许比率。

3.5

细菌性病害病株允许率

指马铃薯脱毒种薯的繁殖田内细菌性病害病株的允许比率。

3.6

混杂植株允许率

指马铃薯脱毒种薯的繁殖田内混入不同品种植株比率。

3.7

有缺陷薯

指畸形、次生、串薯、龟裂、虫口、冻伤、草穿、黑心、空心和机械损伤的块茎。

4 病害

4.1 控制病害

4.1.1 病毒病

指马铃薯脱毒种薯繁殖田内具有花叶、卷叶、条斑坏死病毒病的植株。

4.1.2 马铃薯黑胫病〔*Erwinia* var. *atroseptica* (VanHall) Dye〕或〔*Erwinia* var. *carotovora* (Jones) Dye〕。

4.1.3 马铃薯青枯病(*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith)。

4.2 汰除病害

4.2.1 马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd)。

4.2.2 马铃薯环腐病(*Corynebacterium sepedonicum*)(Sieck & Kott)(Skapt & Burkh)。

4.2.3 马铃薯癌肿病〔*Synchytrium endobaiticum* (Schilb.) Perc〕。

5 脱毒技术

所用茎尖组织分生培养茎

5.1 培养基制备

5.1.1 培养基分装:培养基分装于试管中,加盖管塞。

5.1.2 消毒:试管置于 $0.8 \text{ kg/cm}^2 \sim 1.1 \text{ kg/cm}^2$ 消毒锅 120°C 高压灭菌 20 min。

5.2 取材

5.2.1 取材于经审(认)定品种的腋芽或休眠芽。

5.2.2 芽段用无菌水冲洗 20 min~30 min 后,再用 75%酒精浸蘸一下,放入无菌杯内用 0.1%升汞水浸泡 5 min,用无菌水冲洗 2 次~3 次。

5.3 组培室甲醛溶液熏蒸后,用紫外线灯照射 40 min。工作人员用肥皂水洗手,75%酒精擦拭消毒,操作用具置烘箱 180°C 消毒。

5.4 30 倍~40 倍双筒解剖镜下,解剖针剥离生长点,用解剖针切下 $0.1 \text{ mm} \sim 0.3 \text{ mm}$ 的生长点,接菌针将生长点移至试管。

6 试管苗培养

温度 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$,光照时间 16 h/d,强度 $2\,000 \text{ Lx} \sim 3\,000 \text{ Lx}$,培养 120 d~140 d 转接到 MS 培养基

的试管。

7 脱毒苗的病毒鉴定

试管苗按品种随机编号取样 3 管,采用酶联免疫吸附(ELISA)检验,无阳性反应再用指示植物鉴定;采用往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法(R-PRAGE)进行纺锤块茎类病毒复检,检出不带 PVX、PVY、PVS、PLRV 和 PSTVd 的脱毒苗。

8 脱毒试管苗的繁殖

8.1 将 MS 培养基配制成液,装入试管。

8.2 置于 $0.8 \text{ kg/cm}^2 \sim 1.1 \text{ kg/cm}^2$ 消毒锅灭菌 20 min。

8.3 将试管苗置于超净工作台上,试管表面和管塞用 75% 酒精擦拭消毒,取出脱毒苗,按单茎切段,每个切段带 1 片小叶摆放在培养基面上。

8.4 培养温度 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$,光照 18 h/d,强度 $2\,000 \text{ Lx} \sim 3\,000 \text{ Lx}$ 。

9 脱毒种薯生产

9.1 试管薯生产

设备、药品、试剂按附录 L 制备。

9.1.1 操作程序

9.1.2 在超净工作台上将试管苗切段置于 MS 液体培养基的容器中,每管 8 个茎段,温度 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$,光照强度 $2\,000 \text{ Lx} \sim 3\,000 \text{ Lx}$ 培养 25 d~30 d。

9.1.3 茎段腋芽处长成 4 片~6 片叶的小苗在无菌操作的条件下转接到结薯诱导培养基上,MS+BA5 mg/L+CCC50 mg/L+0.5%活性炭+8%蔗糖配制成液体,置于 $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$,16 h/d 黑暗条件诱导结薯。

9.2 微型薯生产

基质是蛭石、珍珠岩、草炭土。

9.2.1 建造温室,温室下覆 0.08 mm 聚乙烯薄膜,上覆 40 目~45 目尼龙网纱。

9.2.2 与土壤隔离,均匀铺设 5 cm。

9.2.3 浇足水达饱和状态。

9.2.4 试管苗在温室内炼苗 7 d,清洁水洗净培养基,按株行距 $6 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$ 栽入基质 2 cm~2.5 cm 深,栽后小水细喷。

9.2.5 栽植后遮阴网遮阴 5 d~7 d,温度保持 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$,相对湿度 85%,缓苗后每 7 d 浇灌营养液一次,自栽植后 15 d 起,每隔 7 d 喷施杀虫剂和杀菌剂一次。

9.2.6 收获

60 d~80 d 收获,按 1 g 以下、2 g~4 g、5 g~9 g、10 g 以上四个规格分级包装,拴挂标签,注明品种名称,薯粒规格,数量。

9.2.7 收获后在通风干燥的种子库预贮 15 d~20 d 后入窖。

9.2.8 入窖后按品种、规格摆放,温度 $2^\circ\text{C} \sim 3^\circ\text{C}$,湿度 75%。

9.3 原原种生产

9.3.1 炼苗

温室地表洒水湿润,管与管之间相隔 5 cm,温度 $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ 炼苗 7 d。

9.3.2 假植

腐熟沃土装营养钵,钵高 10 cm、直径 5 cm,每 m^2 300 个,钵内浇足水,栽苗后小水细喷,遮阴 5 d~7 d。

9.3.3 管理

温度 25°C ~ 30°C ,相对湿度 70%,苗高 3 cm~4 cm 除尽杂草,松土,苗高 5 cm 根部培沃土一次,10 cm 出圃。

9.3.4 定植

苗龄 32 d~35 d,定植。

9.3.5 选地

1 500 m 之内无高代马铃薯和“十字”花科作物。

9.3.6 建立网室,以钢管为材,跨度 9.5 m,高度 2 m,40 目~45 目尼龙网纱覆盖。

9.3.7 施肥

按马铃薯需 N、P、K 配方施肥,并防地下害虫。

9.3.8 定植

早熟品种 667 m^2 5 000 株~5 500 株,中、晚熟品种 4 000 株~4 500 株,随定植浇透水一次。

9.3.9 喷药

定植 30 d 后防治晚疫病,每隔 7 d 喷施杀虫剂和杀菌剂。

9.3.10 收获

成熟后立即收获,用通气良好清洁卫生韧性较好的材料包装,加标签、标明品种名称、生产单位、检验人。

9.3.11 预贮

收获后先在风干种子库预贮 7 d~10 d。

9.3.12 贮窖要甲醛熏蒸,撒生石灰,喷杀菌剂,防鼠害,不同品种单贮,贮量为窖容量的 2/3。

9.3.13 保管

贮藏温度 3°C ,湿度 70%,通风、窖内清洁卫生、防冻害。

10 一级原种和二级原种生产

10.1 种薯生产

10.1.1 500 m 之内不种高代马铃薯和“十字”花科作物。

10.1.2 播前种薯催芽。

10.1.3 30 g~50 g 小薯整薯直播,50 g 以上块茎切种,单块重 25 g~30 g,每块带 1~2 个芽眼,刀具用高锰酸钾溶液消毒。

10.1.4 播种,10 cm 地温稳定在 5°C 为适宜播期,深度为 9 cm~10 cm。

10.1.5 播种密度,早熟品种, 667 m^2 5 000 株~5 500 株,中、晚熟品种 4 000 株~4 500 株。

10.1.6 施肥,按设计产量 N、P、K 配方施肥。

10.2 田间管理

10.2.1 全生育期中耕一次,培土两次。

10.2.2 浇水和追肥,田间土壤持水量 60%~70%,现蕾期 667 m^2 追尿素 10 kg~15 kg。

10.2.3 去杂去劣

现蕾至盛花期,两次拔除混杂植株与块茎。

10.3 病虫害防治

10.3.1 晚疫病、蚜虫的综合防治

出苗后 40 d 每隔 7 d 喷杀虫剂和杀菌剂。

10.4 种薯田品种特征特性调查物候、植物、生物学特性及病虫害识别，目测按标准附录 H、标准附录 I、标准附录 K 执行。

10.5 种薯贮藏期间管理

收获按 9.3.11、9.3.12、9.3.13 执行。

11 种薯检验

11.1 检验方法

11.1.1 类病毒用往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法(R - PAGE)检验(PSTVd)类病毒

11.1.2 病毒病用酶联免疫吸附(ELISA)方法进行(PVX、PVY、PVS、PLRV)检验。

11.1.3 田间检验。

11.1.3.1 原原种的检验，10 000 株以下随机取样 2%，10 000 株～100 000 株 1%，100 000 株以上 0.5%按表 1 取样方法设点，将检验结果记录于表 2 中。

表 1 不同繁种田面积的检验点数和检验植株数

面积(hm ²)	检验点数和每点抽取植株数
≤0.1 hm ²	随机抽样检验 2 个点，每点 100 株
0.11～1 hm ²	随机抽样检验 5 个点，每点 100 株
1.1～5 hm ²	随机抽样检验 10 个点，每点 100 株
≥5 hm ²	随机抽样检验 10 个点，每点 100 株，超出 5 hm ² 的面积，划出另一个检验区，按本标准规定的不同面积的检验点，抽取株数进行检验。

11.1.3.2 一级原种和二级原种的检验，全生育期三次检验，现蕾期、盛花期，枯黄期前两周，允许率见表 3。

表 2 脱毒种薯田间检验带病植株及混杂植株允许率

种 薯 级 别	第一次检验(现蕾期)					第二次检验(盛花期)					第三次检验(枯黄期前两周)				
	病害及混杂株(%)					病害及混杂株(%)					病害及混杂株(%)				
	类 病 毒 植 株	环 腐 病 植 株	病 毒 病 植 株	黑 胫 病 青 枯 病 植 株	混 杂 植 株	类 病 毒 植 株	环 腐 病 植 株	病 毒 病 植 株	黑 胫 病 青 枯 病 植 株	混 杂 植 株	类 病 毒 植 株	环 腐 病 植 株	病 毒 病 植 株	黑 胫 病 青 枯 病 植 株	混 杂 植 株
原原种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
一级原种	0	0	≤0.25	≤0.5	≤0.25	0	0	≤0.1	≤0.25	0	0	0	≤0.1	≤0.25	0
二级原种	0	0	≤0.25	≤0.5	≤0.25	0	0	≤0.1	≤0.25	0	0	0	≤0.1	≤0.25	0

11.2 检验标准

11.2.1 执行 GB 18133

11.3 检验程序

表3 马铃薯脱毒种薯田间检验原始数据记录表

品种名称									品种编号											
受检单位									联系电话											
检验地点	省 县 乡 村								检验时间											
检验类别									检验依据											
样品数量									代表面积 A/hm ²											
种薯来源									有无摄像照片											
田间栽培管理经过：																				
检验项目 检验点数	每点 检验 株数		混杂 株数		病毒病株数						真、细菌病害病株数								类病 毒病 株数	
					花叶		卷叶		条斑 坏死		黑胫		青枯		环腐		癌肿			
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
总计																				
混杂及 病株百 分 率 (%)	两次 重复																			
	合计或 平均																			
备 注																				

检验人:

校核人：

审核人:

11.3.1 自繁自用种薯,由繁种单位自检,将检验记录报检验部门备案,需要复检时,由检验部门派人复核检验。出售种苗、种薯由专职机构和种子部门进行检验,签发检验报告。

11.4 判定规则

11.4.1 脱毒种薯分级以脱毒种薯繁殖田所播种的级别,带病植株比率和混杂植株比率为定级标准。

11.4.2 各级别脱毒种薯的带病毒病株率,黑胫病和青枯病株率以及混杂植株比率三项指标,任何一项不符合原来级别所定质量标准,但又高于下一级别质量标准者,判定结果按降低一个级别定级。

11.4.3 种薯检验合格证

马铃薯脱毒种薯检验合格证

马铃薯脱毒种薯质量检验合格证书		
年 月 日		编号:
种薯生产单位全称:		省 县 村(单位) 联系方式:
种薯级别:	品种名称:	重量 kg
经按中华人民共和国马铃薯脱毒种薯 GB/T×××××质量标准检验合格。		
检 验 人:		(签字)
检验单位:		(印章)
联系方式:		

150 mm

8 mm

12 包装、标签

12.1 包装

12.1.1 用通气良好清洁卫生的材料。

12.1.2 标准袋净重 35 kg,内装标签。

13 标签

13.1 标签选择韧性大、防雨防潮,不易涂改的材料制作。

13.2 颜色

原原种为白色、一级原种为绿色、二级原种为黄色。

13.3 标签用蓝色圆珠笔填写,不得空项。

13.4 标签平展正面置于扎口处。

13.5 标签设计

80 mm

110 mm

○	
马铃薯脱毒种薯	
种薯级别	
品种名称	
合格证书 编 号	
生产单位 地 址 联系方式	
验 收 人	

80 mm

附 录 A
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验法
(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

应用双抗体夹心法(Double Antibody Sandwich Method)检测马铃薯脱毒苗是否带有 PVX、PVY、PVS、PLRV 等主要马铃薯病毒。

A.1 仪器和设备

- A.1.1 聚乙烯微量滴定板:40 孔和 96 孔,均可使用。
- A.1.2 微量可调进样器:需 $2\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 50\ \mu\text{L}$ 和 $10\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 三种规格,并附相应规格的塑料头。
- A.1.3 冰箱。
- A.1.4 保温箱:温度设置为 37°C 。
- A.1.5 直径 8 cm 的瓷研钵及钵锤。
- A.1.6 酶联免疫检测仪:检测辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的酶标记抗体用 490 nm,波长检测,碱性磷酸(Alkaline Phosphatase AKP)标记的酶标抗体用 405 nm 波长检测。

A.2 应用的化学试剂

所用为分析纯级规格、用水为蒸馏水。

- A.2.1 抗体免疫球蛋白(r-globulin)和酶标记抗体(Coniugate):从某一马铃薯病毒抗血清提取的免疫球蛋白,将其浓度调为 1 mg/mL,做为包被微量滴定板的抗体。用辣根过氧化物酶标记的某一病毒的免疫球蛋白的酶标记抗体、浓度为 1:1 000 以上,贮藏条件为 4°C 。
- A.2.2 碳酸盐包被缓冲液: $\text{pH}9.6$,1.59 g NaCO_3 (碳酸钠),2.93 g NaHCO_3 (碳酸氢钠)加水至 1 L。
- A.2.3 PBS—Tween20 缓冲液, $\text{pH}7.4$,8 g NaCl (氯化钠)0.2 g KH_2PO_4 (磷酸二氢钾)、2.2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (磷酸氢二钠)或 2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.2 g KCl (氯化钾)加水至 1 L,然后加 0.5 mL Tween 20,洗涤微量滴定板用。
- A.2.4 样品缓冲液:取 PBSTween-20 缓冲液 100 mL,加聚乙烯吡咯烧酮(PVP)2 g。
- A.2.5 底物缓冲液:取 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液 25.7 mL 加 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 24.3 mL 加水 50 mL, pH 调至 5.0(现用现配)临用前加磷苯二胺 40 mg,30% H_2O_2 (过氧化氢)0.15 mL 混匀,避光放置。应为白色或微黄色溶液。
- A.2.6 终止液:为 0.2 mol/L 硫酸溶液,用 1 体积浓硫酸加 9 份水。

A.3 操作步骤

- A.3.1 包被微量滴定板:把免疫球蛋白用包被缓冲液按 1:1 000 稀释,用微量进样器向微量滴定板的每一样品孔内加入稀释的免疫球蛋白 200 μL 。在 37°C 条件孵育 1 h(或在 4°C 条件下过夜)。
- A.3.2 洗涤包被的微量滴定板:甩掉微量滴定板中的免疫球蛋白稀释液,再在吸水纸上敲打微量滴定板,除尽残留溶液。向微量滴定板的样品孔中加满洗涤缓冲液,停留 30 min,甩掉洗涤缓冲液,共洗涤 3 次,以除尽未吸附的免疫球蛋白。