



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103592209 B

(45) 授权公告日 2016.05.04

(21) 申请号 201310627439.2

(22) 申请日 2013.11.27

(73) 专利权人 武汉武大绿洲生物技术有限公司
地址 430000 湖北省武汉市东湖开发区高新大道 888 号高农生物园总部 A 区 15 栋高农生物大厦 18-19 楼

(72) 发明人 陈娇 尹宜农

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 15/04(2006.01)

G01N 15/02(2006.01)

G01N 21/33(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101063169 A, 2007.10.31,

US 2005/0130313 A1, 2005.06.16,

GB 2416030 A, 2006.11.01,

CN 102181438 A, 2011.09.14,

CN 103261858 A, 2013.08.21,

朱宏杰. 病毒性软化病病原(桐株). 《中国优秀硕士学位论文全文数据库, 农业科技

辑》. 2007, (第 4 期), 第二部分第 1.1 节、2.1 节、2.3 节.

李莉等. 黑胸大蠊浓核病毒分类的相关研究. 《中国病毒学》. 2003, 第 18 卷(第 5 期), 全文.

Chiharu SUTO et al..
A New Virus Isolated from the
Cockroach, *Periplaneta fuliginosa*
(Serville). 《Microbiol. Immunol.》. 1978, 第 23 卷(第 3 期), 全文.

审查员 钟爱芝

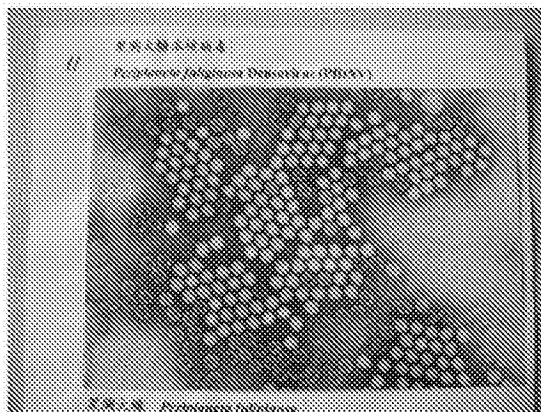
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量的检测方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量检测方法及应用。该方法包括病毒粒子纯化、病毒粒子沉淀特征鉴定、病毒粒子形态测定、病毒核酸提取、核酸分子量电泳测定、电镜计数(包括样品处理、计数)。本发明检测准确度高,检测时间短,具有良好的特异性和稳定性,适用于该病毒的定性和定量的检测。



1. 一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量的检测方法,其步骤如下:

1) 病毒粒子纯化

将样品悬浮于磷酸缓冲溶液,匀浆后以5000r/min离心3min;上清液加入硫酸铵至350g/L,硫酸铵水溶液饱和度为55%,放置于4℃冰箱内静置12-14小时,然后以8000r/min离心50min,沉淀加入PBS重悬浮,匀浆后,以15000r/min离心20min,上清液以40000r/min离心2h,取沉淀;匀浆离心后,上清液经40%蔗糖单梯度,以40000r/min离心5h,沉淀悬于PBS中,匀浆,以12000r/min离心20min,得上清,再经过10%~40%蔗糖线性梯度,以26000r/min离心2.5h;

经10%~40%蔗糖梯度离心后,用部分收集器收集,每管25滴共收集50管,用紫外分光光度计测定每管在260nm处的吸收值,绘制吸收曲线;

将峰值管的收集液洗糖,以40000r/min离心2h,PBS悬浮,即为提纯病毒;

2) 病毒粒子的沉降特征

以家蚕浓核病毒伊那株和家蚕传染性软化病毒作为对照,将纯化的黑胸大蠊浓核病毒样品稀释10倍上样,铺在10%~40%蔗糖线性梯度上层,40000r/min离心3.5h,以形成沉降区带;部分收集器收集,每管0.75mL,收集50管,分别测定260nm光吸收值,并对应收集管号绘制曲线,收集出现光吸收峰的区带病毒,测定病毒的沉降特性;

黑胸大蠊浓核病毒沉降系数为102S,病毒粒子密度为1.45g/cm³;

3) 蟑螂病毒的形态测定

纯化的蟑螂病毒粒子用2%磷钨酸染色,透射电子显微镜下检查,病毒为大小均一的近似球状二十面体的粒子,加入直径15nm的烟草花叶病毒作为标准,测定其直径;

4) 蟑螂病毒核酸检测

a) 蟑螂病毒核酸提取

纯化的蟑螂病毒悬液与等体积TE饱和酚混匀,室温下置40-60min,期间数次摇动;酚处理后以10000r/min离心5min,取水相,重复两次,再用等体积的氯仿:异戊醇=24:1抽提,取水相,加1/10体积的3mol/L乙酸钠,2.5倍体积无水冷乙醇,-20℃静置4小时,以15000r/min离心10min,沉淀真空干燥后,悬浮在pH8.0TE缓冲液中,即为蟑螂病毒核酸;

b) 蟑螂病毒核酸电泳检测及其分子量

采用核酸的琼脂糖电泳方法检测其核酸分子量,用1×TBE配制的琼脂糖浓度为1.9%;电泳时以Hind III酶切的λDNA作标准,电泳结束后用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察照相,计算病毒核酸的大小;

5) 样品的处理

制备检测病毒悬液,取1mL,精确至0.01mL试样,溶解于10mL蒸馏水中,然后10倍梯度稀释样品,再用1μL磷钨酸与1μL样品重复混匀后滴在铜网上,自然干燥后直接电镜检测计数,要求电镜视野中的病毒颗粒不重叠,每网孔中的病毒数不少于4个;

6) 计算有效网孔中病毒的总和 $P=P_1+P_2+P_3+\dots+P_n$,重复3次取平均值,蟑螂浓核病毒含量x用式(1)进行计算:

$$x=P \times 10 \times 10^5 \times 1000$$

式中:P—电镜下统计的总数;

S—梯度稀释的次数。

2. 权利要求1所述的黑胸大蠊浓核病毒定性定量的检测方法在蟑螂病毒杀蟑饵剂检测中的应用。

一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量的检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及昆虫病毒生物农药检测技术领域,更具体涉及一种检测黑胸大蠊浓核病毒的定性定量检测方法及应用,该方法不仅可使用目前存在市场上的所有类型电子显微镜仪器,更重要的是能准确地对黑胸大蠊浓核病毒进行定性、定量检测。

背景技术

[0002] 蟑螂学名蜚蠊,属于昆虫纲(Insecta)、直翅目(Blattaria)、蜚蠊科(Blattidae)。蟑螂是一种非常古老的昆虫,早在3亿年前就已出现,素有活化石之称。同时蟑螂又是危害人类健康的重要卫生害虫之一,其危害不亚于蚊虫、苍蝇及老鼠的一类重要卫生害虫,已知蟑螂体内能携带霍乱弧菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、副伤寒杆菌、绿脓杆菌、大肠杆菌等多种细菌和钩虫、蛔虫、鞭虫等十种寄生虫卵,可在体内贮存多天,并不断排出体外,污染周围环境。多年来防治蟑螂的主要方法是使用化学农药,造成了蟑螂抗药性增强,且一年多次用药,造成环境污染,现在人民生活水平逐步提高,在家庭灭蟑上都希望采用生物农药,而应用微生物防治蟑螂已有很多报道,其中从自然罹病蟑螂体内分离到的黑胸大蠊浓核病毒对蟑螂有非常好的感染性,死亡率高达99%。

[0003] 黑胸大蠊浓核病毒(*Periplaneta fuliginosa* densonucleosis virus, PfdNV)是武汉大学胡远扬教授等人在国内首先发现并报道,是在国内外第1个正式分类鉴定的蟑螂浓核病毒。该病毒与其他细小病毒一样,病毒粒子无包膜,呈球状二十面体对称,直径22nm基因组为单链线状DNA分子(ssDNA),沉降系数为102s,浮力密度为1.42g/ml,可以通过差离心和密度梯度离心的方法将其分离提纯。病毒粒子的SDS-PAGE显示由5个蛋白组成,分子量分别为52KD,56KD,79KD,82KD,105KD。PfdNV基因组全长为5454bp(PfdNV基因组序列已提交Genbank,编号为:AFI92260)。基因组正链有4个大的阅读框(ORF),负链含有3个大的阅读框,分别编码非结构蛋白和结构蛋白。ICTV第九次会议正式将其独立列为一个属:Pefudensovirus。黑胸大蠊浓核病毒可引起蟑螂食欲减退,行动迟缓,后体翻仰卧不能自正,直至不动而死去。死后虫尸外观体形体色不变,体软腐,压之流出乳白色脓液,无臭味;此病毒最显著的病症是嗦囊特别膨胀,呈白色鱼泡状的气囊,气囊一般伸达第2-4腹节,有的甚至占住整个胸腔,将中、后肠挤压至尾端一侧,囊内空而无物,破之气消瘪缩;其次是中肠稍肿胀,黑褐色,破之,流出黑褐色液体;后肠黑色,滞留有未排出的粪便。目前应用黑胸大蠊浓核病毒制成的杀蟑产品有拜乐生物杀蟑饵剂、方便贴、拜乐生物杀蟑饵盒等产品。而产品的不断推出,需要有更快更简单的方法对其有效成分黑胸大蠊浓核病毒进行定性定量检测,才能保证产品的质量。一直以来,电镜计数都是病毒定量的传统方法。

[0004] 申请人建立的黑胸大蠊浓核病毒定性定量检测方法,旨在对黑胸大蠊浓核病毒进行定性和定量检测,为生产及市场提供简单、准确、方便的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量检测方法,该方法具

有操作简单、快速、特异性好、灵敏度高,不仅可使用目前存在市场上的所有类型电子显微镜、电泳仪、离心机等仪器,更重要的是能准确、快速地对黑胸大蠹浓核病毒进行定性定量检测,可为生产提供可靠的保证产品质量的方法。

[0006] 本发明的另一个目的是在于提供了一种黑胸大蠹浓核病毒定性定量检测方法在蟑螂病毒杀蟑饵剂检测中的应用,此方法定性准确、稳定,定量重复性好。

[0007] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0008] 1. 病毒粒子纯化

[0009] 病毒的纯化通过沉淀法、差异离心法和密度梯度离心法结合进行。具体为:将样品悬浮于磷酸缓冲溶液(PBS),匀浆后以5000r/min离心3min。上清液加入硫酸铵至350g/L,硫酸铵水溶液饱和度为55%,放置于4℃冰箱内静置12-14小时,然后以8000r/min离心50min,沉淀加入PBS重悬浮,匀浆后,以15000r/min离心20min,上清液以40000r/min离心2h,取沉淀。匀浆离心后,上清液经40%蔗糖单梯度,以40000r/min离心5h,沉淀悬于PBS中,匀浆,以12000r/min离心20min,得上清,再经过10%~40%蔗糖线性梯度,以26000r/min离心2.5h。

[0010] 经10%~40%蔗糖梯度离心后,用部分收集器收集,每管25滴共收集50管。用紫外分光光度计测定每管在260nm处的吸收值,绘制吸收曲线。

[0011] 将峰值管的收集液洗糖,以40000r/min离心2h,PBS悬浮,即为提纯病毒。

[0012] 2. 病毒粒子的沉降特征

[0013] 以家蚕浓核病毒伊那株(*Bombyx mori* Densonucleosis Virus, BmDNV Ina isolate)和家蚕传染性软化病毒(*Bombyx mori* Infectious flacherie Virus BmIFV)作为对照,将纯化的黑胸大蠹浓核病毒样品稀释10倍上样,铺在10%~40%蔗糖线性梯度上层,121700g离心3.5hr,以形成沉降区带。部分收集器收集,每管0.75mL,收集50管,分别测定260nm光吸收值(OD₂₆₀),并对应收集管号绘制曲线,收集出现光吸收峰的区带病毒。测定收集到的病毒是否符合黑胸大蠹浓核病毒的沉降特性。

[0014] 本病毒沉降系数为102S,病毒粒子密度为1.45g/cm³。

[0015] 3. 蟑螂病毒的形态测定

[0016] 纯化的蟑螂病毒粒子用2%磷钨酸染色,透射电子显微镜下检查,病毒为大小均一的近似球状二十面体的粒子,加入直径15nm的烟草花叶病毒(TMV)作为标准,测定其直径应该是22nm。

[0017] 4. 蟑螂病毒核酸检测

[0018] a) 蟑螂病毒核酸提取

[0019] 纯化的蟑螂病毒悬液与等体积TE饱和酚混匀,室温下置40-60min,期间数次摇动。酚处理后以10000r/min离心5min,取水相,重复两次,再用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提,取水相,加1/10体积的3mol/L乙酸钠,2.5倍体积无水冷乙醇,-20℃静置4小时,以15000r/min离心10min,沉淀真空干燥后,悬浮在pH8.0TE缓冲液中,即为蟑螂病毒核酸。

[0020] b) 蟑螂病毒核酸电泳检测及其分子量

[0021] 采用核酸的琼脂糖电泳方法检测其核酸分子量,琼脂糖浓度为1.9%(用1×TBE配制)。

[0022] 电泳时以Hind III酶切的λDNA作标准,电泳结束后用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察照相,计算病毒核酸的大小。

[0023] 5.样品的处理

[0024] 制备检测病毒悬液,取1mL(精确至0.01mL)试样,溶解于10mL蒸馏水中,然后10倍梯度稀释样品 $S_1(1/10) \rightarrow S_2(1/10)$,再用1 μ L磷钨酸与1 μ L样品重复混匀后滴在铜网上,自然干燥后直接电镜检测计数。以电镜视野中的病毒颗粒不重叠为宜,每网孔中的病毒数不少于4个。

[0025] 6.计算有效网孔中病毒的总和 $P=P_1+P_2+P_3+\dots+P_n$,重复3次取平均值。蟑螂浓核病毒含量 x 用式(1)进行计算:

[0026] $x=P \times 10 \times 10^S \times 1000$

[0027] 式中: P —电镜下统计的总数;

[0028] S —梯度稀释的次数。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0030] 该方法具有操作简单、快速、特异性好、灵敏度高,不仅可使用目前存在市场上的所有类型电子显微镜、电泳仪、离心机等仪器,更重要的是能准确、快速地对黑胸大蠊浓核病毒进行定性定量检测,可为生产提供可靠的保证产品质量的方法。

附图说明

[0031] 图1为黑胸大蠊浓核病毒电镜示意图。

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明进一步描述。

[0033] 实施例1:

[0034] 一种检测黑胸大蠊浓核病毒定性定量检测方法,其步骤如下:

[0035] 1.病毒粒子纯化

[0036] 将黑胸大蠊浓核病毒样品(武汉武大绿洲生物技术有限公司提供)悬浮于磷酸缓冲溶液(PBS),匀浆后以5000r/min离心3min。上清液加入硫酸铵350g/L(指得是加入硫酸铵后的终浓度),硫酸铵水溶液饱和度为55%,放置于冰箱(4 $^{\circ}$ C)内静置12-14小时后,以8000r/min离心50min,沉淀加入PBS重悬浮,匀浆后,以15000r/min离心20min,上清液以40000r/min离心2h,取沉淀。匀浆离心后,上清液经40%蔗糖单梯度,以40000r/min离心5h,沉淀悬于PBS中,匀浆,以12000r/min离心20min,得上清,再经过10%~40%蔗糖线性梯度,以26000r/min离心2.5h。

[0037] 经10%~40%蔗糖梯度离心后,用部分收集器收集,每管25滴共收集50管。用紫外分光光度计测定每管在260nm处的吸收值,绘制吸收曲线,在26-30管处出现光吸收峰。

[0038] 将峰值管的收集液洗糖,以40000r/min离心2h,PBS悬浮,即为提纯病毒。

[0039] 2.病毒粒子的沉降特征

[0040] 以家蚕浓核病毒伊那株(*Bombyx mori* Densonucleosis Virus, BmDNV Ina isolate)(约6kb,沉降系数是100)和家蚕传染性软化病病毒(*Bombyx mori* Infectious flacherie Virus BmIFV)(核酸9650bp,沉降系数是183)作为对照,将步骤1中得到的提纯病毒稀释十倍,进行上样,铺在10%~40%蔗糖线性梯度上层,40000r/min离心3.5h,以形成沉降区带。部分收集器收集,每管0.75mL,收集50管,分别测定260nm光吸收值(OD₂₆₀),并

对应收集管号绘制曲线,在本实施例中,在26~33管处出现光吸收峰。本病毒沉降系数为102S,病毒粒子密度为 $1.45\text{g}/\text{cm}^3$ 。

[0041] 3. 蟑螂病毒的形态测定

[0042] 纯化的蟑螂病毒粒子用2%磷钨酸染色,透射电子显微镜下检查,病毒为大小均一的近似球状十二面体的粒子,加入直径15nm的烟草花叶病毒(TMV)作为标准,测定其直径应该是22nm。

[0043] 4. 蟑螂病毒核酸检测

[0044] a) 蟑螂病毒核酸提取

[0045] 纯化的蟑螂病毒悬液与等体积TE饱和酚混匀,室温($23\pm 2^\circ\text{C}$)下置40—60min,期间摇动10—15次。酚处理后以10000r/min离心5min,取水相,重复两次,再用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提,取水相,加1/10体积的3mol/L乙酸钠,2.5倍体积无水冷乙醇, -20°C 静置4小时,以15000r/min离心10min,沉淀真空干燥后,悬浮在pH8.0TE缓冲液中,即为蟑螂病毒核酸。

[0046] b) 蟑螂病毒核酸电泳检测及其分子量

[0047] 采用核酸的琼脂糖电泳方法检测其核酸分子量,琼脂糖浓度为1.9%(用1×TBE配制)。

[0048] 电泳时以Hind III酶切的 λ DNA作标准,电泳结束后用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察照相,计算病毒核酸的大小。该病毒的核酸大小5454bp。

[0049] 5. 样品的处理

[0050] 制备检测病毒悬液,取1mL(精确至0.01mL)试样,溶解于10mL蒸馏水中,然后10倍梯度稀释样品 $S_1(1/10)\rightarrow S_2(1/10)$,再用1 μL 磷钨酸与1 μL 样品重复混匀后滴在铜网上,自然干燥后直接电镜检测计数。以电镜视野中的病毒颗粒不重叠为宜,每网孔中的病毒数不少于4个。

[0051] 6. 计算有效网孔中病毒的总和 $P=P_1+P_2+P_3+\dots+P_n$,重复3次取平均值。蟑螂浓核病毒含量 x 用式(1)进行计算:

[0052] $x=P\times 10\times 10^5\times 1000$

[0053] 式中:P—电镜下统计的总数;

[0054] S—梯度稀释的次数。

[0055] 经过上述步骤测定后,黑胸大蠊浓核病毒原药含量为 1.05×10^8 个/ml,

[0056] 实施例2:

[0057] 一种黑胸大蠊浓核病毒定性定量检测方法在蟑螂病毒杀蟑饵剂检测中的应用,其应用过程如下:

[0058] 生物杀蟑饵剂的来源(武汉武大绿洲生物技术有限公司提供), ≥ 6000 个/g。

[0059] 步骤同实施例1

[0060] 生物杀蟑饵剂内含量为 7.1×10^4 个/g。

[0061] 以上仅为本发明所列举的较佳实施例,并非用以限制本发明的保护范围,所属技术领域中的普通技术人员运用本发明所作的等效修饰或变化,均同理应属于本发明的专利保护范围。

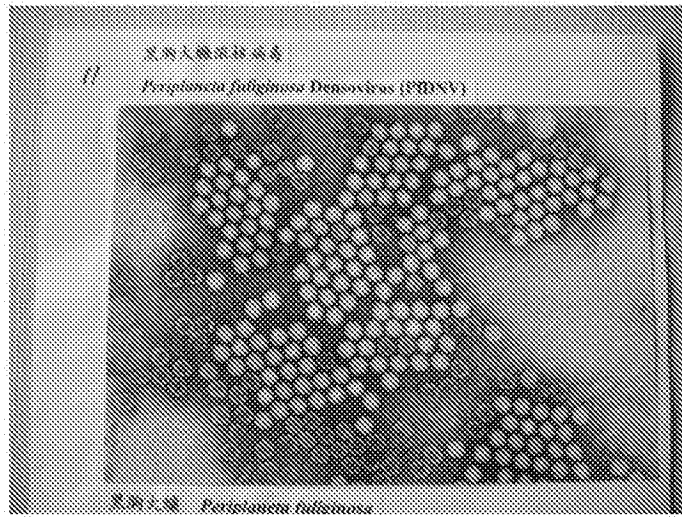


图1