

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102134612 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201010617198. X

(22) 申请日 2010. 12. 31

(73) 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483 号

(72) 发明人 刘吉平 王永宾

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

张晓媛等. 家蚕浓核病毒的研究进展. 《家蚕浓核病毒研究进展》. 2009, (第 13 期), 全文.

王永杰等. 家蚕浓核病毒 DNV-3 的 VD2 基因组序列分析. 《微生物学报》. 2006, 全文.

潘慧敏. 家蚕浓核病毒 BmDNV-6 对理化因子稳定性的研究. 《西南农业大学学报》. 2005, 第 27 卷 (第 5 期), 全文.

审查员 王超

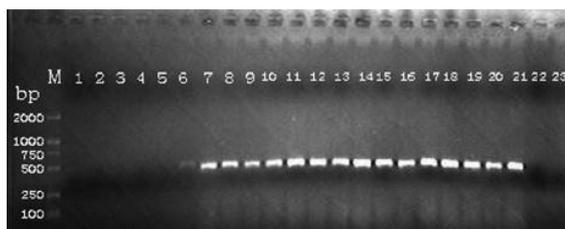
权利要求书 1 页 说明书 5 页
序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法。本发明采用煮沸沉淀法快速抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA, 设计特异性引物进行 PCR 法检测家蚕浓核病毒 BmDNV。本发明方法能够有效地提取到家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA, 检测快速准确, 适于小量样本操作, 操作简单, 使用本发明方法制备的 DNA 样品能够满足 PCR 方法对家蚕浓核病毒 BmDNV 进行分子诊断的需要, 为应用 PCR 技术进行 BmDNV 的早期诊断和预知检查提供基础和技术储备。



1. 一种家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 采用煮沸沉淀法抽提家蚕浓核病毒的模板 DNA;

(2) 设计引物,对步骤(1)提取的家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 进行 PCR 检测;

所述引物的核苷酸序列为:

VD2f :5' TCATTGGCAACTGGAAGTGGAG 3' ;

VD2r :5' GCTTGATTACTTGCGGTTCTTA 3' ;

(3) 取 5 μ L PCR 产物用 1.2 % 的琼脂糖凝胶电泳检测,用核酸染料 Goldview 进行染色检测;

所述家蚕浓核病毒 BmDNV 为中国株 BmDNV-3。

2. 根据权利要求 1 所述的家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法,其特征在于步骤(1)包括以下步骤:

(a) 取研究实验用的感染 BmDNV 的家蚕中肠于研钵中,加水研磨,离心留上清液;

(b) 往步骤(a)制得的上清液中加入抽提缓冲液,水浴下煮沸裂解后冷却,离心使变性的蛋白沉淀,取上清液;所述抽提缓冲液组成为:10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 8.0;0.5% SDS;

(c) 按照体积比为 1:1 的比例往步骤(b)制得的上清液中加入预冷的异丙醇,冰冻使沉淀形成,离心后用体积比浓度为 70% 的乙醇洗涤沉淀,晾干后加入 TE 溶液或灭菌 ddH₂O 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用;所述 TE 溶液组成为:10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA, pH 8.0。

3. 根据权利要求 2 所述的家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法,其特征在于步骤(b)加入抽提缓冲液后水浴下煮沸时间为 10 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述的家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法,其特征在于步骤(2)所述 PCR 反应采用 25 μ L 体系:2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,1 μ L dNTPs,正反向引物浓度为 10 μ M,各加 1 μ L,1 μ L DNA 模板,18 μ L ddH₂O,2.5 U/ μ L 的 Taq 酶 0.5 μ L;引物扩增的 PCR 循环为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

一种家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断和鉴定技术领域,具体涉及一种快速诊断家蚕浓核病毒及基因组克隆测序分析的方法。

背景技术

[0002] 家蚕浓核病毒(Bombyx mori densovirus, BmDNV)是我国蚕茧生产中普遍发生的病毒病的病毒,严重威胁着蚕丝业的持续稳定生产。

[0003] 二十世纪七十年代初期国外应用血清学方法对家蚕病毒病进行早期诊断。此法能在蚕感病初期(感染病毒后 24h ~ 48h)进行确诊。我国于七十年代后期正式开始了家蚕病毒病血清学早期诊断的研究。王裕兴等(王裕兴,曹诒孙,钱元骏等. 酶对流免疫电泳对家蚕浓核病的早期诊断技术. 蚕业科学,1983,9(2):97-102)将免疫酶联技术应用到该病的早期诊断中,发现酶对流免疫电泳检测灵敏度比对流免疫电泳提高 8 倍,最早检出时间为 16 h,半数检出时间为 21h,均比同样条件下的对流免疫电泳提早 8 h 左右。钱元俊等(钱元俊,胡雪芳,王红林. 家蚕病毒病血清诊断实用化研究. 蚕业科学,1984,10(3):155-157)进行了家蚕病毒病血清诊断实用化研究,研制了抗血清滤纸及其干燥保存的条件和方法;郭锡杰等(郭锡杰,钱元俊,胡雪芳. 家蚕浓核病的免疫酶组织化学方法早期诊断技术. 中国农业科学,1985,(5):82-85)研究了用酶标组化法进行了 DNV 病的早期诊断;钱元俊等(钱元俊,胡雪芳. 家蚕浓核病的血清学诊断方法. 蚕业科学,1989,15(4):217-222)进行了多种血清学诊断家蚕浓核病方法的比较研究,包括双向免疫扩散法(DID)、对流免疫电泳法(CIEP)、酶联对流免疫电泳法(ELCIEP)、酶标组化法(IEHC)、可溶性酶-抗酶法(PAP)、斑点免疫结合测定法(DIBA)、生物素-亲和素系统检测法(ABS)以及胶乳凝集试验法(LTA)等,应用这些方法可以检测出的纯化家蚕浓核病毒 BmDNV 的量为 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-4}$ OD。以 DIBA 法检测灵敏度最高,分别为 LAT 法的 10 倍、ELCIEP 法的 160 倍、CIEP 法的 1000 倍。检测蚕体 DNV 时,可在接种后 8 h ~ 40 h 检出,以 ABS 法检出阳性反应最早。

[0004] PCR 作为一种新的分子生物学实验技术,具有灵敏度高、快速特异、操作简单等优点,对于检测临床标本中病原体的核酸序列具有常规诊断方法无可比拟的优势,在应用于细菌、病毒的诊断与检测方面已有较多的报道并展示其良好的应用前景。近年来,在运用 PCR 技术诊断检测和研究家蚕浓核病毒基因方面,已经取得了可喜的进展(Kageyasu S, Hayakawa T, Isawa H et al. Detection of the Silkworm-pathogenic virus genomes by PCR. Journal of Sericultural Science of Japan,1997,66(6):477-483;韩序,姚勤,高路等,家蚕浓核病毒(中国镇江株)在不同感受性宿主体内的复制. 生物工程学报,2007,23(1):145-151;付艳红,唐顺明,覃光星等. 家蚕浓核病毒中国(镇江)株基因组的克隆及重组质粒转染家蚕对浓核病毒的拯救. 蚕业科学,2008,34(3):453-458;余蔚,姚勤,郭忠建等. 家蚕浓核病毒中国株非结构蛋白 1(NS1)的表达. 微生物学报,2008,48(2):191-196)依据已经报道的家蚕浓核病毒 BmDNV 基因片段序列设计引物,建立了家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 诊断方法,但其检测的敏感性还有待进一步研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有家蚕浓核病毒 BmDNV 检测技术的不足,提供一种家蚕浓核病 BmDNV 的 PCR 快速敏感的检测方法。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现;

[0007] 提供一种家蚕浓核病 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 提取感染家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA;

[0009] (2) 设计引物,对提取的家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 进行 PCR 检测;

[0010] 本申请人依据 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上报道的 BmDNV-3 的 VD2 ssDNA 基因组的核苷酸序列资料(DQ017269.1,gi 65306480),采用 Primer primer 5.0 设计了一对合适的 PCR 扩增引物 VD2f 和 VD2r,拟扩增的片段为 449 bp。上游引物 22 bp,位于其 5' 端从 2379 bp 到 2400 bp,下游引物 22 bp,位于从 2806 bp 到 2827 bp 之间的序列,两引物的核苷酸序列分别如 SEQ IDNO :3 和 SEQ IDNO :4 所示:

[0011] VD2f :5' TCATTGGCAACTGGAAGTGGAG 3' ;

[0012] VD2r :5' GCTTGATTACTTGCAGTTCTTA 3' ;

[0013] 本发明所述 PCR 反应采用 25 μ L 体系:2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,1 μ L dNTPs,正反向引物浓度为 10 μ M,各加 1 μ L,1 μ L DNA 模板,18 μ L ddH₂O,0.5 μ L Taq 酶(2.5 U/ μ L)。引物扩增的 PCR 循环为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 循环;72 $^{\circ}$ C 10 min ,4 $^{\circ}$ C 保存;

[0014] (3) 取 5 μ L PCR 产物用 1.2 % 的琼脂糖凝胶电泳检测,用核酸染料 Goldview 进行染色检测。

[0015] 优选地,步骤(1)所述感染家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 的提取采用煮沸沉淀法,具体是取感染家蚕浓核病毒 BmDNV 的家蚕中肠于研钵中,加 1 mL 的灭菌水将中肠研磨充分后装于 1.5 mL 的灭菌离心管中,10000 r/min 离心 10 min,取上清 400 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 400 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 8.0;0.5% SDS (十二烷基苯磺酸钠),于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸裂解 10 min 后,取出放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷却至室温,10000 r/min 离心 5 min 将变性的蛋白沉淀,另取上清 700 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 700 μ L 预冷的异丙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冰冻 30 min 促进沉淀形成;12000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA,并弃去上清;用 1 mL 70% (V/V)乙醇洗涤沉淀,然后尽量弃去乙醇,自然晾干,使乙醇挥发完全,但不能使沉淀过于干燥,否则很难溶解;加入 20 μ L TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA, pH 8.0)或灭菌 ddH₂O 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0016] 本发明的有益效果是:

[0017] 本发明使用煮沸沉淀法能够快速有效地提取到家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA,简捷快速,适于小量样本操作,操作简单,仅需 0.3 ~ 0.5 mL 病毒液。使用本发明方法制备的 DNA 样品能够满足 PCR 方法对家蚕浓核病毒 BmDNV 进行分子诊断的需要。因此本发明建立了用煮沸沉淀法快速抽提 BmDNV 的模板 DNA 的方法,为应用 PCR 技术进行 BmDNV 的早期诊断和预知检查提供基础和技术储备;

[0018] 本发明设计的一对特异的引物 VD2f 和 VD2r,大量实验证明其具有特异敏感的优

越性,有效克服了现有家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 检测技术的敏感性问题。

附图说明

[0019] 图 1 感染家蚕浓核病 BmDNV 家蚕的检测结果;

[0020] 图 2 煮沸沉淀法、煮沸法、酚-氯仿法制备家蚕浓核病 BmDNV 模板 DNA 的 PCR 检测结果。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图和具体实施例进一步说明本发明。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0022] 实施例 1

[0023] 本实施例分别以煮沸沉淀法、煮沸法和酚-氯仿法提取的 DNA 为模板进行家蚕浓核病毒(*Bombyx mori densovirus*, BmDNV) 的 PCR 分子检测。

[0024] 本实施例以家蚕浓核病毒 BmDNV (由华南农业大学蚕桑生物技术实验室经常规的桑叶添食继代繁殖获得,也可以采用本领域其他实验室或者研究院所提供的家蚕浓核病毒 BmDNV)为材料,分别通过煮沸法、煮沸沉淀法、酚-氯仿法(陈冬妹,林英,王艳霞.一种简便分离高质量家蚕基因组 DNA 的方法.蚕学通讯,2007,27(2):5-9)三种方法制备 BmDNV 模板 DNA,再经 PCR 方法进行家蚕浓核病 DNV 的分子检测鉴定。

[0025] 1. 煮沸沉淀法抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 模板 DNA:

[0026] 取一条感染家蚕浓核病毒 BmDNV 的蚕(例如感染所述病毒的死蚕)中肠于研钵中,加 1 mL 的灭菌水将中肠研磨充分后装于 1.5 mL 的灭菌离心管中,10000 r/min 离心 10 min,取上清 400 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 400 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 8.0;0.5% SDS,其余体积用水补足),于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸裂解 10 min 后,取出放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷却至室温,10000 r/min 离心 5 min 将变性的蛋白沉淀,另取上清 700 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 700 μ L 预冷的异丙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冰冻 30 min 促进沉淀形成;12000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA,并弃去上清;用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀,然后尽量弃去乙醇,自然晾干,使乙醇挥发完全,但不能使沉淀过于干燥,否则很难溶解;加入 20 μ L TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA, pH 8.0)或灭菌 ddH₂O 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0027] 2. 煮沸法抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 模板 DNA:

[0028] 取一条感染 BmDNV 的蚕(可以是实验用的感染 BmDNV 的活蚕,或者死蚕)的中肠于研钵中,加 1 mL 的灭菌水将中肠研磨充分后装于 1.5 mL 的灭菌离心管中,10000 r/min 离心 10 min,取上清 400 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 400 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 8.0;0.5% SDS),于 100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸裂解 10 min 后,取出放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷却至室温,10000 r/min 离心 5 min 将变性的蛋白沉淀,取上清 300 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存以备检测。

[0029] 3. 酚氯仿法抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA:

[0030] 参考陈冬妹等(陈冬妹,林英,王艳霞.一种简便分离高质量家蚕基因组 DNA 的方

法. 蚕学通讯, 2007, 27(2): 5-9) 抽提家蚕基因组 DNA 的方法, 并在此方法上略作修改: 取方法 1 中感病家蚕中肠研磨液上清 400 μ L 于 1.5 mL 的离心管中, 加入 400 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS), 用枪头吹打混匀, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 400 ~ 500 μ g/mL, 轻轻混匀, 然后放入 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中裂解消化 2-3 h; 向上述离心管中, 加入等体积 600 μ L 的酚/氯仿/异戊醇(25: 24: 1)混合液, 在振荡器上振荡混匀; 12000 r/min 离心 10 min, 用去尖的枪头小心移出上层水相至另一新离心管中; 加等体积的氯仿, 在振荡器上振荡混匀; 12000 r/min 离心 10 min, 取出上层水相至另一新离心管中; 加入等体积预冷的异丙醇沉淀 DNA, 后续操作同 1。

[0031] 4. PCR 法对家蚕浓核病毒 BmDNV 的检测:

[0032] 分别对煮沸沉淀获得的家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA、煮沸获得的病毒液、研磨离心获得病毒原液(作为对照)、酚/氯仿法抽提获得家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 进行了 PCR 检测。

[0033] 依据 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上报道的家蚕浓核病毒 BmDNV-3 的 VD2 ssDNA 基因组的核苷酸序列资料(DQ017269.1, gi 65306480), 用 Primer primer 5.0 设计了一对合适的 PCR 扩增引物 VD2f / VD2r, 拟扩增的片段为 449 bp。上游引物 22 bp, 位于其 5' 端从 2379 bp 到 2400 bp, 下游引物 22 bp, 位于从 2806 bp 到 2827 bp 之间的序列, 两引物的核苷酸序列分别为:

[0034] VD2f :5' TCATTGGCAACTGGAAGTGGAG 3'

[0035] VD2r :5' GCTTGATTACTTGC GGTTCTTA 3'

[0036] 上述引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

[0037] PCR 反应采用 25 μ L 体系: 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 1 μ L dNTPs, 正反向引物浓度为 10 μ M, 各加 1 μ L, 1 μ L DNA 模板, 18 μ L ddH₂O, 0.5 μ L Taq 酶(2.5 U/ μ L)。引物扩增的 PCR 循环为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用核酸染料 Goldview 进行染色检测。

[0038] 检测结果见附图 2 所示, 附图 2 中, 泳道: M. DL2000 DNA 分子量标准; 1 ~ 2 为煮沸沉淀法抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 的 PCR 产物; 3 ~ 4 为煮沸法抽提家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 的 PCR 产物; 5 ~ 6 为家蚕浓核病毒 BmDNV 病毒液的 PCR 产物; 7 ~ 8 为酚-氯仿法抽提 BmDNV 模板 DNA 的 PCR 产物; 9 为阳性对照; 10 为健康家蚕基因组 DNA 的 PCR 产物; 11 ddH₂O。对煮沸沉淀法、酚-氯仿法制备的模板均能扩增出与设计大小相符的约 449 bp 的明亮条带, 而对煮沸法制备的模板、病毒原液、健康家蚕组织的核酸模板扩增结果均为阴性, 扩增不出任何条带。

[0039] 实施例 2

[0040] (1) 提取家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA;

[0041] 生物材料: 家蚕浓核病毒, 由华南农业大学蚕桑生物技术实验室经桑叶添食家蚕继代繁殖(按照常规方法, 为实验室为研究目的, 将一定浓度的病毒液涂布在新鲜桑叶的叶背, 然后喂食家蚕, 使家蚕感染得病的常规实验方法); EDTA 购自北京鼎国生物技术有限公司; 异丙醇由天津大茂化学试剂厂出品; 无水乙醇由天津大茂化学试剂厂出品。

[0042] 步骤(1)所述家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 的提取采用煮沸沉淀法, 取感染家

蚕浓核病毒 BmDNV 的家蚕中肠于研钵中,加 1mL 的灭菌水将中肠研磨充分后装于 1.5 mL 的灭菌离心管中,10000 r/min 离心 10 min,取上清 400 μ L 于 1.5mL 的灭菌离心管中,并加入 400 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 8.0;0.5% SDS),于 100°C 水浴锅中煮沸裂解 10 min 后,取出放于 -20°C 冰箱中冷却至室温,10000 r/min 离心 5 min 将变性的蛋白沉淀,另取上清 700 μ L 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,并加入 700 μ L 预冷的异丙醇,置 -20°C 冰箱中冰冻 30min 促进沉淀形成;12000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA,并弃去上清;用 1 mL 70% (V/V)乙醇洗涤沉淀,然后尽量弃去乙醇,自然晾干,使乙醇挥发完全,但不能使沉淀过于干燥,否则很难溶解;加入 20 μ L TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA, pH 8.0)或灭菌 ddH₂O 溶解沉淀,-20°C 保存备用。

[0043] (2) 设计引物,对提取的家蚕浓核病毒 BmDNV 的模板 DNA 进行 PCR 检测;

[0044] 依据 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上报道的家蚕浓核病毒 BmDNV-3 的 VD2 ssDNA 基因组的核苷酸序列资料(DQ017269.1, gi 65306480),采用 Primer primer 5.0 设计了一对合适的 PCR 扩增引物 VD2f / VD2r,拟扩增的片段为 449 bp。上游引物 22 bp,位于其 5' 端从 2379 bp 到 2400 bp,下游引物 22 bp,位于从 2806 bp 到 2827 bp 之间的序列,两引物的核苷酸序列分别为:

[0045] VD2f :5' TCATTGGCAACTGGAAGTGGAG 3' ;

[0046] VD2r :5' GCTTGATTACTTGCGGTTCTTA 3' 。

[0047] 所述 PCR 反应采用 25 μ L 体系:2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,1 μ L dNTPs,正反向引物浓度为 10 μ M,各加 1 μ L,1 μ L DNA 模板,18 μ L ddH₂O,0.5 μ L Taq 酶(2.5 U/ μ L)。引物扩增的 PCR 循环为:94°C 5 min; 94°C 45 s,60°C 45 s,72°C 45 s,30 个循环;72°C 10 min,4°C 保存。

[0048] (3) 取 5 μ L PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,用核酸染料 Goldview 进行染色检测。

[0049] 实验结果见附图 1 所示,本发明方法对家蚕感染家蚕浓核病毒 BmDNV 后 1~60 小时的 PCR 检测结果,泳道:M. DL2000 DNA 分子量标准;1~12 分别为家蚕感染家蚕浓核病毒 BmDNV 后 1~12h 的 PCR 产物;13~20 分别为家蚕感染家蚕浓核病毒 BmDNV 后 18~60h (间隔 6h) 的 PCR 产物;21. BmDNV 模板 DNA 的 PCR 产物;22. 健康家蚕基因组 DNA 的 PCR 产物;23. ddH₂O。

[0050] 实验证明,本发明采用煮沸沉淀法,并优化工艺条件,实现快速准确地提取所述病毒的 DNA,本发明方法适于小量样本操作,仅要 0.3~0.5 mL 病毒液,就能满足常规分子生物学实验要求,结合本发明设计的特异性引物,应用于所述病毒的 PCR 扩增检测,为生产中制备家蚕浓核病毒 BmDNV 模板以及满足其基因水平的快速诊断提供了重要的试验基础。

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 一种家蚕浓核病毒 BmDNV 的 PCR 快速检测的方法

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 引物 VD2f

<400> 1

tcattggcaa ctggaactgg ag

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 引物 VD2r

<400> 2

gcttgattac ttgcggttct ta

22

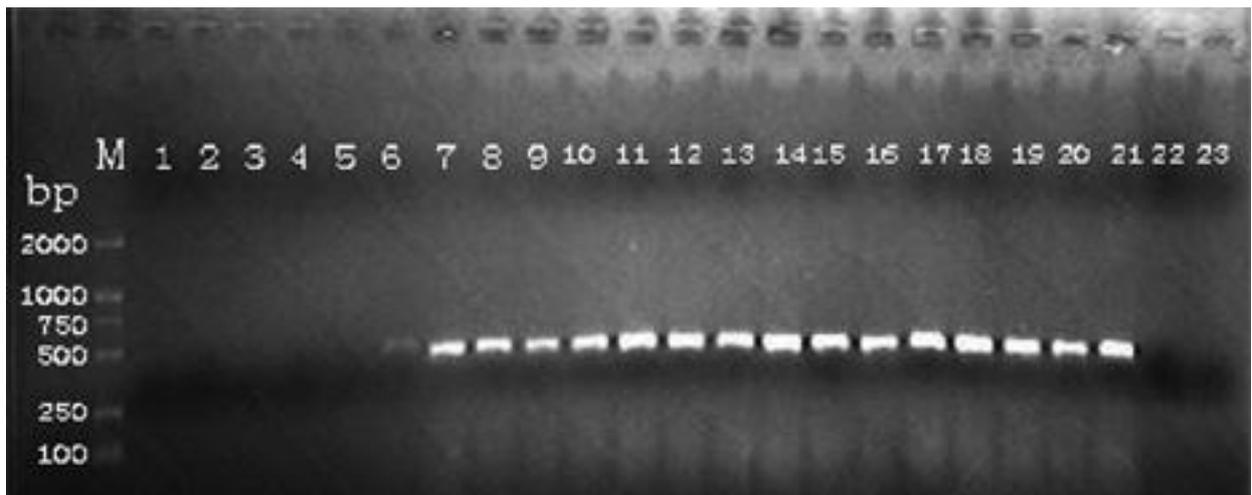


图 1

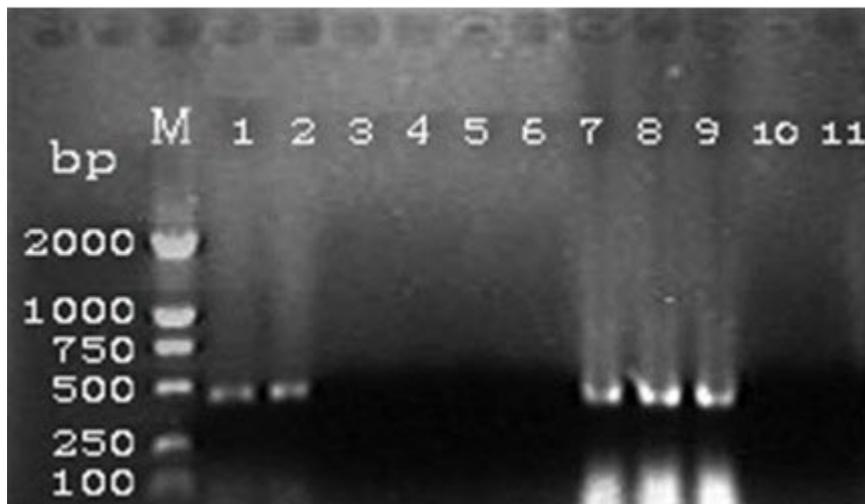


图 2