

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 825—2024

家蚕核型多角体病毒原液制备技术规程

Technical code of practice for preparation of *Bombyx mori*
nucleopolyhedrovirus concentrates

2024 - 08 - 23 发布

2024 - 08 - 29 实施

广西标准化协会 发布

前 言

本文件参照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。

本文件由广西壮族自治区蚕业技术推广站提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区蚕业技术推广站、河池市蚕业技术推广站、广西农业工程职业技术学院。

本文件主要起草人：安春梅、黄文功、黄玲莉、刘艳伟、闭立辉、黄扬玉、吴静颜、浦月霞、莫嘉凌、黄康东、李枫桦、覃龙伟、韦博尤、苏红梅、强艳芳、兰艳妮、黄凌、李嘉、苏林。

家蚕核型多角体病毒原液制备技术规程

1 范围

本文件界定了家蚕核型多角体病毒原液制备技术涉及的术语和定义、缩略语，确立了家蚕核型多角体病毒原液制备的程序，规定了设施设备选择，以及家蚕核型多角体病毒复壮、增殖、收集、破碎、过滤、差速离心、清洗、保存工艺的操作指示，描述了制备过程信息的追溯方法。

本文件适用于家蚕核型多角体病毒原液的制备。

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。

DB45/T 83 种茧育养蚕技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

复壮 rejuvenation

采用经口添食的方法将家蚕核型多角体病毒感染易感品种家蚕幼虫，使其致病力恢复的过程。

3.2

增殖 proliferation

家蚕核型多角体病毒感染宿主，在宿主体内产生大量子代多角体病毒的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BmNPV：家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus）

5 设施设备选择

5.1 选择配备有蚕架、蚕匾等附属蚕具以及温湿度调控设备、消毒机具的动物实验室。

5.2 选择配备有光学显微镜、低速离心机、血球计数板、纯水机、组织破碎仪、冰箱、移液枪、超净工作台、高压灭菌锅等设备及器材的病毒提取保存实验室。

6 制备工艺

6.1 制备流程

见图1

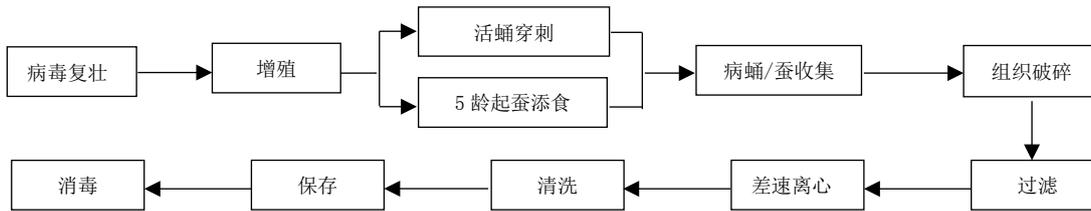


图1 家蚕核型多角体病毒原液制备流程图

6.2 制备操作

6.2.1 病毒复壮

将保存的BmNPV配制为 1×10^8 PIBs/mL以上的病毒悬液，将桑叶在病毒悬液中浸泡8 min~10 min，取出晾干表面水分后添食BmNPV易感品系的5龄起蚕，第2餐开始正常喂食桑叶，5 d~6 d后收集出现家蚕血液型脓病典型病征但皮肤未破裂的活蚕，用脱脂棉蘸取75%的医用酒精涂抹消毒蚕体，晾干后剪尾角收集血液备用。

6.2.2 增殖

采用以下方法之一进行。

a) 活蛹穿刺：

- 1) 选择化蛹后1 d~2 d的BmNPV易感品系健康蚕蛹，用28 G~32 G针头注射器将复壮后取得的病蚕血液穿刺接种到蛹体中；
- 2) 接种后的蛹体置于25 °C~29 °C的条件下发育4 d~5 d。

b) 5龄起蚕添食：

- 1) 经复壮的病蚕血液加入超纯水，配制为 1×10^8 PIBs/mL以上的病毒悬液备用；
- 2) 将桑叶在病毒悬液中浸泡，取出晾干表面水分后添食BmNPV易感品系的5龄起蚕，第2餐开始正常喂食桑叶至感染发病。

6.2.3 病蛹/蚕收集

蛹体出现环节松弛，蛹体发软即可收集；蚕出现体躯肿胀发亮、体壁易破、气门附近出现油浸斑、狂躁爬行等典型病征即可收集。收集的病蛹/蚕于-18 °C以下保存备用。

6.2.4 组织破碎

将收集到的病蛹/蚕，加入等体积超纯水，破碎组织。

6.2.5 过滤

组织液中加入超纯水并充分搅拌，用80目滤网过滤，收集滤液。

6.2.6 差速离心

将收集的滤液500 r/min离心10 min，取上层悬液，重复2~3次至底部无大颗粒沉淀；将收集的悬液3 000 r/min~4 000 r/min离心10 min，留沉淀。

6.2.7 清洗

在差速离心得到的沉淀物中加入超纯水重悬，3 000 r/min~4 000 r/min离心10 min，留其沉淀，重复4~5次至上清液澄清，留沉淀。

6.2.8 保存

在多角体病毒沉淀中等体积加入50%甘油，用移液枪吹打重悬，测定病毒原液的多角体浓度，分装于EP管封口并标记信息，于-18 °C以下保存。

6.2.9 消毒

器材及实验室消毒按照DB45/T 83执行。

7 制备记录

填写记录相关信息，包括：毒株名称及来源、增殖日期、形式及操作人员、所用蛹/蚕品种、病蛹/蚕收集时间、病毒提取时间、制备数量及操作人员签名等信息，制备记录妥善保存，保存2年以上。



中华人民共和国团体标准
家蚕核型多角体病毒原液制备技术规程
T/GXAS 825—2024
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究