



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105717301 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201610089776.4

(22)申请日 2016.02.17

(71)申请人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 万贵钧 江守林 陈法军 党志浩
张逸飞 代阳

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛 李晓峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

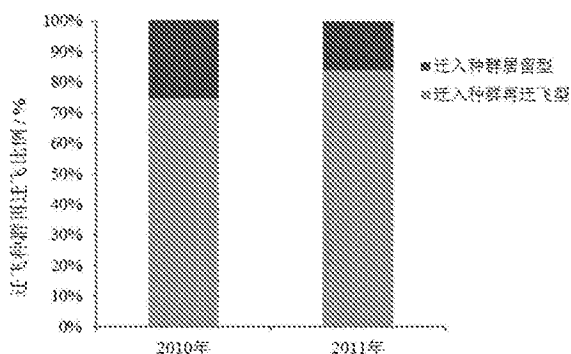
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法

(57)摘要

本发明公开一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法,包括以下步骤:(1)迁飞型昆虫的选择;(2)蛋白标记物的选择;(3)目的昆虫当地种群的发生情况调查;(4)第一种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获;(5)第二种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获;(6)目的昆虫当地种群的迁出行为规律及迁入种群的再迁飞行为规律研究。通过酶联免疫标记技术来研究迁飞昆虫的迁出规律和迁入种群的再迁飞规律将是一种行之有效的方法。本发明可以明确当地迁飞型昆虫的迁出规律,以及迁入昆虫的再迁飞规律,从而更好地指导迁飞昆虫的预测预报及其防控。



1. 一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)迁飞型昆虫的选择:选择一种或多种迁飞型昆虫;

(2)蛋白标记物的选择:选择蛋清蛋白标记物为第一种蛋白标记物,脱脂奶粉标记物为第二种蛋白标记物;

(3)目的昆虫当地种群的发生情况调查:结合寄主作物的生长期,捕获目的昆虫,并结合大田调查以明确目的昆虫当地种群的发生数量;

(4)第一种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获:在目的昆虫当地种群高密度期喷洒第一种蛋白标记物,24小时后分别捕获居留型和迁出型的目的昆虫,-20℃下保存;

(5)第二种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获:于目的昆虫迁入高峰期均匀喷洒第二种蛋白标记物,24小时后分别捕获居留型和迁出型的目的昆虫,-20℃下保存;

(6)目的昆虫当地种群的迁出行为规律及迁入种群的再迁飞行为规律研究:通过酶联免疫吸附法分别检测步骤(4)和步骤(5)所捕获目的昆虫携带的标记蛋白种类及数量,以明确当地种群的迁出行为规律和迁入种群的再迁飞规律;

I在调查目的昆虫当地种群时只用蛋清蛋白进行标记,捕获的迁出型目的昆虫中呈蛋清蛋白阳性的即为有迁飞行为的当地种群:

当地种群迁飞比例=迁出型蛋清蛋白阳性种群数量/(迁出型蛋清蛋白阳性种群数量+居留型蛋清蛋白阳性种群数量);

II在调查迁入种群中利用蛋清蛋白和脱脂奶粉双重蛋白标记,捕获的迁出型目的昆虫中只有呈脱脂奶粉阳性的即为有再迁飞行为的迁入种群:

迁入种群再迁飞比例=(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量)/(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量+居留型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量-居留型双重阳性种群数量)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述第一蛋白标记物的配制方法为:称取体积比为1:99的蛋清蛋白和水混合均匀。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述第二蛋白标记物的配制方法为:称取质量体积比为1:99的脱脂奶粉和水混合均匀。

4. 根据权利要求1~3中任意一项所述的方法,其特征在于:所述第一蛋白标记物和第一蛋白标记物的喷洒量为250~300L/公顷。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述的居留型目的昆虫通过大田普查的方式进行捕获,所述的迁出型目的昆虫通过诱虫灯诱捕的方式进行捕获。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(6)中采用酶联免疫吸附法检测脱脂奶粉标记蛋白的过程为:

(1)捕获的目的昆虫分别放在微量离心管中,每一个微量离心管中加入750μl TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27℃,100rpm,清洗1h,取上清液移至新微量离心管;

(2)获得的上清液即为抗原样品,取80μl抗原样品加入到微量滴定板中,每个样品重复三次,然后在4℃冰箱孵育1h;

(3)用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次,每次每孔用300μl冲洗,用洗板机清洗;

(4)向微量滴定板中加入360μl 25%鸡蛋清蛋白封闭剂,然后置于4℃冰箱孵育1h;

(5)按照步骤(3),用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次;

(6)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l的第一抗体:羊抗牛酪蛋白,按1:2000稀释,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

(7)用5x PBST缓冲液冲洗微量滴定板,每次每孔用300 μ l;

(8)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l的第二抗体:鼠抗羊免疫球蛋白,按1:4000稀释,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

(9)用5x PBST缓冲液对微量滴定板清洗1~4次,每次每孔用300 μ l;

(10)微量滴定板每反应孔中加入80 μ l的TBM酶作用物3,3',5,5'-四甲基联苯胺,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育10min;

(11)加入50 μ l终止液2M H₂SO₄终止反应;

(12)用酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值,借助吸光光度的方法测定在650nm处吸光值;

(13)将样品的吸光度值与阴性对照进行比较,判定样品为阴性或阳性:当样品的吸光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时,就判定为阳性读数;当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时,样品被判定为阴性。

7.根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(6)中采用酶联免疫吸附法检测蛋清蛋白标记蛋白的过程为:

(1)捕获的目的昆虫分别放在微量离心管中,每一个微量离心管中加入750 μ l TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27 $^{\circ}$ C,100rpm,清洗1h,取上清液移至新微量离心管;

(2)获得的上清液即为抗原样品,取80 μ l抗原样品加入到微量滴定板中,每个样品重复三次,然后在恒温箱37 $^{\circ}$ C,温育1h;

(3)用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次,每次每孔用300 μ l冲洗,用洗板机清洗;

(4)向微量滴定板中加入360 μ l 1%牛血清蛋白封闭剂,然后放在摇床上在27 $^{\circ}$ C下孵育1h;

(5)按照步骤(3),用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次;

(6)向微量滴定板反应孔加入80 μ l的第一抗体:兔抗鸡蛋清蛋白,按1:8000稀释,将微量滴定板置于恒温箱37 $^{\circ}$ C,孵育1h;

(7)用5x PBST缓冲液冲洗微量滴定板,每次每孔用300 μ l;

(8)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l第二抗体:羊抗兔免疫球蛋白,按1:2000稀释,将板置于恒温箱37 $^{\circ}$ C,孵育2h;

(9)用5x PBST缓冲液对微量滴定板清洗1~4次,每次每孔用300 μ l;

(10)微量滴定板每反应孔中加入80 μ l的TBM酶作用物3,3',5,5'-四甲基联苯胺,置于恒温箱27 $^{\circ}$ C,10min;

(11)加入50 μ l终止液2M H₂SO₄终止反应;

(12)用酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值,借助吸光光度的方法测定在650nm处吸光值;

(13)将样品的吸光度值与阴性对照进行比较,判定样品为阴性或阳性:当样品的吸光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时,就判定为阳性读数;当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时,样品被判定为阴性。

一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物保护技术领域,具体涉及一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法,即采用酶联免疫吸附测定方法检测带有不同标记蛋白的迁飞型昆虫,以此来明确当地迁飞昆虫的迁出规律以及迁入种群的再迁飞规律,进而指导农业迁飞性害虫的预测预报及其防控。

背景技术

[0002] 昆虫迁飞是指在一定的季节里,在生长发育的某个特定阶段,成群或分散的,有规律的从一个发生地飞到另一个地区的适应性现象。迁飞性昆虫多呈现跨省乃至跨国远距离迁飞的景象,在农林牧区常常突发成灾,进而对经济生产造成严重威胁。例如,非洲的沙漠蝗(*Schistocerca gregaria*)、澳大利亚的疫蝗(*Chortoicetes terminifera*)和中国的东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*),都是臭名昭著的具有大区域暴发性和毁灭性的迁飞性害虫。中国地处东亚季风区,特殊的地理气候条件使中国农作物的主要害虫都是南北往返迁飞数千公里,屡屡“小虫成大灾”。因此研究昆虫的迁飞规律,对于防治迁飞型昆虫显的尤为重要。

[0003] 当前主要运用雷达昆虫学和轨迹分析技术来研究昆虫的迁飞规律。前者主要通过毫米波或厘米波昆虫雷达观测迁飞昆虫的空中迁飞行为规律来开展;后者则主要通过气象数据(风向、风速和降雨等)分析,并采用回推的方式来计算迁飞型昆虫的来源,即虫源概率区域。然而有关迁飞种群的迁出规律以及迁入种群的再迁飞规律等至今仍未具体明确。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法,该方法为能明确当地种群的迁出规律以及迁入种群的再迁飞规律的行之有效的监测技术,进而指导农业迁飞性害虫的预测预报及其防控。

[0005] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0006] 一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法,包括以下步骤:

[0007] (1)迁飞型昆虫的选择:选择一种或多种迁飞型昆虫;

[0008] (2)蛋白标记物的选择:选择蛋清蛋白标记物为第一种蛋白标记物,脱脂奶粉标记物为第二种蛋白标记物;

[0009] (3)目的昆虫当地种群的发生情况调查:结合寄主作物的生长期,捕获目的昆虫,并结合大田调查以明确目的昆虫当地种群的发生数量;

[0010] (4)第一种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获:在目的昆虫当地种群高密度期喷洒第一种蛋白标记物,24小时后分别捕获居留型和迁出型的目的昆虫,-20℃下保存;

[0011] (5)第二种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获:于目的昆虫迁入高峰期均匀喷洒第二种蛋白标记物,24小时后分别捕获居留型和迁出型的目的昆虫,-20℃下保存;

[0012] (6)目的昆虫当地种群的迁出行为规律及迁入种群的再迁飞行为规律研究:通过

酶联免疫吸附法分别检测步骤(4)和步骤(5)所捕获目的昆虫携带的标记蛋白种类及数量,以明确当地种群的迁出行为规律和迁入种群的再迁飞规律;

[0013] I在调查目的昆虫当地种群时只用蛋清蛋白进行标记,捕获的迁出型目的昆虫中呈蛋清蛋白阳性的即为有迁飞行为的当地种群:

[0014] 当地种群迁飞比例=迁出型蛋清蛋白阳性种群数量/(迁出型蛋清蛋白阳性种群数量+居留型蛋清蛋白阳性种群数量);

[0015] II在调查迁入种群中利用蛋清蛋白和脱脂奶粉双重蛋白标记,捕获的迁出型目的昆虫中只有呈脱脂奶粉阳性的即为有再迁飞行为的迁入种群:

[0016] 迁入种群再迁飞比例=(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量)/(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量+居留型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量-居留型双重阳性种群数量)。

[0017] 所述第一蛋白标记物的配制方法为:称取体积比为1:99的蛋清蛋白和水混合均匀。

[0018] 所述第二蛋白标记物的配制方法为:称取质量体积比(g:mL)为1:99的脱脂奶粉和水混合均匀。

[0019] 所述第一蛋白标记物和第一蛋白标记物的喷洒量为250~300L/公顷。

[0020] 所述的居留型目的昆虫通过大田普查的方式进行捕获,所述的迁出型目的昆虫通过诱虫灯诱捕的方式进行捕获。大田普查捕获目的昆虫时一般是采用电动吸虫器进行。

[0021] 所述酶联免疫吸附法为本领域的常规的技术方法。

[0022] 步骤(6)中采用酶联免疫吸附法检测脱脂奶粉标记蛋白的详细过程为:

[0023] (1)捕获的目的昆虫分别放在微量离心管中,每一个微量离心管中加入750 μ l TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27 $^{\circ}$ C,100rpm,清洗1h,取上清液移至新微量离心管;

[0024] (2)获得的上清液即为抗原样品,取80 μ l抗原样品加入到微量滴定板中,每个样品重复三次,然后在4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0025] (3)用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次,每次每孔用300 μ l冲洗,用洗板机清洗;

[0026] (4)向微量滴定板中加入360 μ l 25%鸡蛋清蛋白封闭剂,然后置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0027] (5)按照步骤(3),用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次;

[0028] (6)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l的第一抗体:羊抗牛酪蛋白,按1:2000稀释,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0029] (7)用5x PBST缓冲液冲洗微量滴定板,每次每孔用300 μ l;

[0030] (8)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l的第二抗体:鼠抗羊免疫球蛋白,按1:4000稀释,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0031] (9)用5x PBST缓冲液对微量滴定板清洗1~4次,每次每孔用300 μ l;

[0032] (10)微量滴定板每反应孔中加入80 μ l的TBM酶作用物3,3',5,5'-四甲基联苯胺,将微量滴定板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育10min;

[0033] (11)加入50 μ l终止液2M H₂SO₄终止反应;

[0034] (12)用酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值,借助吸光光度的方法测定在

650nm处吸光值；

[0035] (13)以水和第二种蛋白标记物分别作为阴性对照和阳性对照,将样品的吸光度值与阴性对照(水)进行比较,判定样品为阴性或阳性:当样品的吸光光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时,就判定为阳性读数,即阳性读数认定标准为:样品平均OD值 \geq 阴性对照平均OD值+3 \times 阴性对照平均OD值的标准差;当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时,样品被判定为阴性,即阴性读数认定标准为:样品平均OD值 $<$ 阴性对照平均OD值。

[0036] 步骤(6)中采用酶联免疫吸附法检测蛋清蛋白标记蛋白的详细过程为:

[0037] (1)捕获的目的昆虫分别放在微量离心管中,每一个微量离心管中加入750 μ l TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27 $^{\circ}$ C,100rpm,清洗1h,取上清液移至新微量离心管;

[0038] (2)获得的上清液即为抗原样品,取80 μ l抗原样品加入到微量滴定板中,每个样品重复三次,然后在恒温箱37 $^{\circ}$ C,温育1h;

[0039] (3)用2 \times PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次,每次每孔用300 μ l冲洗,用洗板机清洗;

[0040] (4)向微量滴定板中加入360 μ l 1%牛血清蛋白封闭剂,然后放在摇床上在27 $^{\circ}$ C下孵育1h;

[0041] (5)按照步骤(3),用2 \times PBST缓冲液冲洗微量滴定板1~4次;

[0042] (6)向微量滴定板反应孔加入80 μ l的第一抗体:兔抗鸡蛋清蛋白,按1:8000稀释,将微量滴定板置于恒温箱37 $^{\circ}$ C,孵育1h;

[0043] (7)用5 \times PBST缓冲液冲洗微量滴定板,每次每孔用300 μ l;

[0044] (8)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l第二抗体:羊抗兔免疫球蛋白,按1:2000稀释,将板置于恒温箱37 $^{\circ}$ C,孵育2h;

[0045] (9)用5 \times PBST缓冲液对微量滴定板清洗1~4次,每次每孔用300 μ l;

[0046] (10)微量滴定板每反应孔中加入80 μ l的TBM酶作用物3,3',5,5'-四甲基联苯胺,置于恒温箱27 $^{\circ}$ C,10min;

[0047] (11)加入50 μ l终止液2M H₂SO₄终止反应;

[0048] (12)用酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值,借助吸光光度的方法测定在650nm处吸光值;

[0049] (13)以水和第一种蛋白标记物分别作为阴性对照和阳性对照,将样品的吸光度值与阴性对照(水)进行比较;当样品的吸光光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时,就判定为阳性读数,即阳性读数认定标准为:样品平均OD值 \geq 阴性对照平均OD值+3 \times 阴性对照平均OD值的标准差;当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时,样品被判定为阴性,即阴性读数认定标准为:样品平均OD值 $<$ 阴性对照平均OD值。

[0050] 本发明的有益效果:

[0051] 通过酶联免疫标记技术来研究迁飞昆虫的迁出规律和迁入种群的再迁飞规律将是一种行之有效的方法,该方法操作简单,结果精确,成本低廉。通过对大田当地迁飞种群和外地迁入种群先后喷洒两种标记蛋白,检测带有不同标记蛋白的迁飞昆虫数量,以明确当地迁飞昆虫的迁出规律以及迁入种群的再迁飞规律,进而指导农业迁飞性昆虫的预测预报及其防控。

附图说明

[0052] 图1为苜蓿草中集栖瓢虫迁入种群单一及双重标记比例。

具体实施方式

[0053] 以下通过实验案例来进一步说明本发明的有益效果：

[0054] 实验案例：本地种群迁出规律和迁入种群的再迁飞规律

[0055] 该试验分别于2010年和2011年在山东省德州市宁津县实验基地进行了两年。具体步骤如下：

[0056] (1)实验昆虫的选择：集栖瓢虫，幼虫、成虫均以蚜虫为主要食物源，成虫为越夏迁飞型；

[0057] 实验植物的选择：苜蓿为多年生开花植物，是重要的青贮饲料，同样也是有益昆虫重要的庇护所，特别是自然天敌，例如集栖瓢虫；

[0058] 实验田选择与设置：实验地点位于山东省德州市宁津县。试验田种植面积为 2160m^2 ($180\text{m}\times 12\text{m}$)。试验田划分为均等3个实验区 ($60\text{m}\times 12\text{m}$)。2010年，每个实验区设置4个同等面积的样本区 ($60\text{m}\times 0.508\text{m}$)，即总共取样12次；2011年，每个实验区设置3个同等面积的样本区 ($60\text{m}\times 0.508\text{m}$)，即总共取样9次；

[0059] (2)蛋白标记物的选择与制备：选择蛋清蛋白标记物为第一种蛋白标记物，脱脂奶粉标记物为第二种蛋白标记物；(标记物的配置方法详见附录2)

[0060] (3)当地种群集栖瓢虫密度调查：结合往年集栖瓢虫田间种群动态规律，对每个样本区划出面积相等的取样区 ($6\text{m}\times 0.508\text{m}=0.003095\text{ha}$ ；即样本每公顷的转换系数为322.80)，进行大田普查(居留型)与诱虫灯诱捕(迁出型)，明确苜蓿田集栖瓢虫当地种群的规模和数量；

[0061] (4)第一种蛋白标记物的喷洒(285L/公顷)与目的昆虫捕获：选择在集栖瓢虫当地种群高密度时期，将现配置的蛋清蛋白标记物装入到喷雾器在实验田中喷洒，喷洒均匀；24h后，通过电动吸虫器和诱虫灯分别捕获居留型和迁出型的集栖瓢虫，然后将捕获的居留型和迁出型的集栖瓢虫个体分别放在1.5mL微量离心管中， -20°C 保存；

[0062] (5)第二种蛋白标记物的喷洒(285L/公顷)与目的昆虫捕获：结合对迁入种群往年迁入高峰期的分析进行预判，并利用田间诱虫灯每日对迁入种群迁入情况的实时监测，于目的昆虫迁入高峰当天均匀喷洒脱脂奶粉标记物；24h后，通过电动吸虫器和诱虫灯分别捕获居留型和迁出型的集栖瓢虫，然后将捕获的居留型和迁出型的集栖瓢虫个体放在1.5mL微量离心管中， -20°C 保存；

[0063] (6)集栖瓢虫当地种群的迁出行为规律及迁入种群的再迁飞行为规律研究：通过酶联免疫吸附法(见附录1)分别检测步骤(4)和步骤(5)所捕获的目的昆虫所携带的标记蛋白种类和数量，以明确当地种群的迁出行为规律和迁入种群的再迁飞规律。

[0064] I在调查集栖瓢虫当地种群期间只是用蛋清蛋白进行标记，捕获的迁出型目的昆虫中呈蛋清蛋白阳性的即为有迁飞行为的当地种群；

[0065] 当地种群迁飞比例=迁出型蛋清蛋白阳性种群数量/(迁出型蛋清蛋白阳性种群数量+居留型蛋清蛋白阳性种群数量)；

[0066] II 在调查集栖瓢虫迁入种群中利用蛋清蛋白和脱脂奶粉双重蛋白标记,捕获的迁出型目的昆虫中只有呈脱脂奶粉阳性的即为有再迁飞行为的迁入种群:

[0067] 迁入种群再迁飞比例=(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量)/(迁出型脱脂奶粉阳性种群数量+居留型脱脂奶粉阳性种群数量-迁出型双重阳性种群数量-居留型双重阳性种群数量)。

[0068] 结果如下:两年的调查数据表明,栖息于苜蓿草的集栖瓢虫种群以居留型为主,种群迁出比例在2010年和2011年分别占带标记瓢虫总捕获量的8%和32%,2011年迁出比例稍有增加(表1)。

[0069] 表1 苜蓿草中集栖瓢虫当地种群迁飞比例(山东德州宁津县)

[0070]

	2010/公顷			2011/公顷		
	捕获数量	数量	%	捕获数量	数量	%
居留型种群蛋清蛋白阳性	214	69080	92%	48	15495	68%
迁出型种群蛋清蛋白阳性	18	5811	8%	23	7425	32%
带标记总捕获量	232	74891		71	22920	

[0071] 样本每公顷的转换系数为322.80(6m×0.508m)

[0072] 在2010年和2011年集栖瓢虫迁入种群迁入高峰期,对瓢虫捕获情况的统计结果显示,集栖瓢虫迁出种群呈脱脂奶粉阳性的比例为71%和79%,其中呈蛋清蛋白阳性的双重阳性样本为当地种群,分别占带标记昆虫总捕获量的6%和5%(表2),因此迁入种群在两年间的再迁飞性比例分别为75%和84%,表明迁入种群在找到最适居住地前仍是以迁飞为主,即迁飞种群有很强的再迁飞能力,但迁入种群两年中均有近1/5的种群停留取食(图1)。结果说明迁飞途中的集栖瓢虫在到达目的地前仍是以迁飞为主,但也有较大比例种群选择停留。

[0073] 表2 苜蓿草集栖瓢虫迁入种群捕获种群的标记类型及比例(山东德州宁津县)

[0074]

	2010/公顷			2011/公顷		
	捕获数量	数量	%	捕获数量	数量	%
居留型种群脱脂奶粉阳性	173	55845	29%	92	29698	21%
迁出型种群脱脂奶粉阳性	414	133640	71%	342	110398	79%
居留型种群双重阳性	45	14526	8%	30	9684	7%
迁出型种群双重阳性	36	11621	6%	22	7102	5%
带标记总捕获量	587	189485		434	140096	

[0076] 样本每公顷的转换系数为322.80(6m×0.508m)

[0077] 附录1酶联免疫吸附法

[0078] A实验中所用的试剂以及配置要求见附录2。

[0079] B采用脱脂奶粉作为标记物

[0080] (1)捕获的目的昆虫分别放在1.5ml的微量离心管中,小心处理,以防止交叉污染。每一个离心管中加入750 μ l TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27 $^{\circ}$ C,100rpm,清洗1h,取上清液移至新1.5ml离心管;

[0081] (2)获得的上清液即为抗原样品(浸泡昆虫的TBS缓冲液),取80 μ l样品加入到96孔微量滴定板中(每个样品均加3个孔,即进行3次技术重复),然后在4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0082] (3)用2X PBST缓冲液冲洗微量滴定板三次,每次每孔用300 μ l冲洗,用Stat Fax[®] 2600microplate washer(Awareness Technology, Inc., FL)洗板机清洗;

[0083] (4)向微量滴定板中加入360 μ l 25%鸡蛋清蛋白封闭剂,然后置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0084] (5)按照步骤3,用2X PBST缓冲液冲洗微量滴定板三次;

[0085] (6)向微量滴定板反应孔加入80 μ l的第一抗体(羊抗牛酪蛋白,按1:2000稀释),将板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0086] (7)用5x PBST缓冲液冲洗微量滴定板,每次每孔用300 μ l;

[0087] (8)向微量滴定板反应孔中加入80 μ l第二抗体(鼠抗羊免疫球蛋白,按1:4000稀释),将板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1h;

[0088] (9)用5x PBST缓冲液对微量滴定板清洗三次,每次每孔用300 μ l;

[0089] (10)每反应孔中加入80 μ l的TBM酶作用物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺),将板置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育10min;

[0090] (11)加入50 μ l终止液(2M H₂SO₄)终止反应;

[0091] (12)用Stat Fax 3200酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值,借助吸光光度的方法测定在650nm处吸光值;

[0092] (13)设阴性对照(水)和阳性对照(第二蛋白标记物),将样品的吸光度值与阴性对照(水)进行比较;当样品的吸光光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时,就判定为阳性读数,即阳性读数认定标准为:样品平均OD值 \geq 阴性对照平均OD值+3 \times 阴性对照平均OD值的标准差;当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时,样品被判定为阴性,即阴性读数认定标准为:样品平均OD值 $<$ 阴性对照平均OD值。

[0093] C采用鸡蛋清蛋白作为标记物

[0094] (1)捕获的目的昆虫分别放在1.5ml的微量离心管中,小心处理,以防止交叉污染。每一个离心管中加入750 μ l TBS缓冲溶液,置于恒温摇床27 $^{\circ}$ C,100rpm,清洗1h,取上清液移至新1.5ml离心管;

[0095] (2)获得的上清液即为抗原样品(浸泡昆虫的TBS缓冲液),取80 μ l样品加入到96孔微量滴定板中(每个样品均加3个孔,即进行3次技术重复),然后在恒温箱37 $^{\circ}$ C,温育1h;

[0096] (3)用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板三次,每次每孔用300 μ l冲洗,用Stat Fax[®] 2600microplate washer(Awareness Technology, Inc., FL)洗板机清洗;

[0097] (4)向微量滴定板中加入360 μ l 1%牛血清蛋白封闭剂,然后放在摇床上在27 $^{\circ}$ C下孵育1h;

[0098] (5)按照步骤3,用2x PBST缓冲液冲洗微量滴定板三次;

[0099] (6)向微量滴定板反应孔加入80 μ l的第一抗体(兔抗鸡蛋清蛋白,按1:8000稀释),

将板置于恒温箱37℃, 孵育1h;

[0100] (7)用5_x PBST缓冲液冲洗微量滴定板, 每次每孔用300μl;

[0101] (8)向微量滴定板反应孔中加入80μl第二抗体(羊抗兔免疫球蛋白, 按1:2000稀释), 将板置于恒温箱37℃, 孵育2h;

[0102] (9)用5_x PBST缓冲液对微量滴定板清洗三次, 每次每孔用300μl;

[0103] (10)每反应孔中加入80μl的TBM酶作用物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺), 置于恒温箱27℃, 10min;

[0104] (11)加入50μl终止液(2M H₂SO₄)终止反应;

[0105] (12)用Stat Fax 3200酶标仪测定微量滴定板各反应孔的吸光值, 借助吸光光度的方法测定在650nm处吸光值;

[0106] (13)设阴性对照(水)和阳性对照(第一蛋白标记物), 将样品的吸光度值与阴性对照(水)、阳性对照(蛋清蛋白)进行比较; 当样品的吸光光度值OD等于或大于阴性对照吸光光度值的平均值加上3倍标准差时, 就判定为阳性读数, 即阳性读数认定标准为: 样品平均OD值 ≥ 阴性对照平均OD值 + 3 × 阴性对照平均OD值的标准差; 当数值小于阴性对照的平均吸光光度值时, 样品被判定为阴性, 即阴性读数认定标准为: 样品平均OD值 < 阴性对照平均OD值。

[0107] 附录2试剂配置

[0108] A. 洗脱缓冲溶液: 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris Buffered Saline, TBS)

[0109]

10_x TBS (1_x TBS=1×10_x TBS+9×diH₂O)	1 L	500 ml	250 ml
1. NaCl	292.2 g	146.1 g	73.05 g
2. 三(羟基甲基)氨基甲烷	24.2 g	12.1 g	6.05 g
3. diH ₂ O (去离子水)	1000 ml	500 ml	250 ml
调整 pH 为 7.5			

[0110] B. 缓冲液: 磷酸盐缓冲溶液(PBS)

[0111]

10_x PBS (2_x PBS= 2×10_x PBS + 8×diH₂O ; 5_x PBS = 5×10_x PBS + 5×diH₂O)	1 L	500 ml	250 ml
1. NaCl	80 g	40 g	20 g
2. Na ₂ HPO ₄	30 g	15 g	7.5 g
3. KPO ₄	2 g	1 g	0.5 g
4. KCl	2 g	1 g	0.5 g
5. diH ₂ O	1000 ml	500 ml	250 ml
调整 pH 至 7.5			

[0112] C. 洗涤缓冲液: 磷酸盐缓冲溶液+Tween-20(PBST)

[0113]

10_x PBST (2_x PBST= 2×10_x PBST + 8×diH₂O ; 5_x PBST = 5×10_x PBST + 5×diH₂O)	1 L	500 ml	250 ml
1. 10 _x PBS	1000 ml	500 ml	250 ml
2. Tween-20	5 ml	2.5 ml	1.25 ml
调整 pH 至 7.5			

[0114] D. 封闭剂

[0115]

1	25%鸡蛋清蛋白封闭剂	大	中	小
	1 _x TBS	750 ml	375 ml	187.5 ml
	鸡蛋清蛋白溶液	250 ml	125 ml	62.5 ml
2	1%牛血清蛋白封闭剂 (PBS-BSA)			
	牛血清蛋白粉末 (BSA)	1 pkt	½ pkt	¼ pkt

[0116]

	1 _x PBS	1000 ml	500 ml	250 ml
--	--------------------	---------	--------	--------

[0117] E. 第一抗体原液

[0118]

1	用于脱脂奶粉的第一抗体原液(1:2000)	大	中	小
	羊抗牛酪蛋白	5ul	2ul	1ul
	25%鸡蛋清蛋白封闭剂	10ml	4ml	2ml
2	用于蛋清蛋白(EW)的第一抗体原液(1:8000)			
	兔抗鸡蛋清蛋白	5ul	2ul	1ul
	1%PBS-BSA	40ml	16ml	8ml
	有机硅表面活性剂(Silwet L-77, 1.3ul/ml)	52ul	20.8ul	10.4ul

[0119] F. 第二抗体原液

[0120]

1	用于脱脂奶粉中的第二抗体原液(1:4000)	大	中	小
	鼠抗羊免疫球蛋白(过氧化物酶共轭)	10ul	5ul	1ul
	25%鸡蛋清蛋白封闭剂	40ml	20ml	4ml
2	用于蛋清蛋白中的第二抗体原液(1:2000)			
	羊抗兔免疫球蛋白(过氧化物酶共轭)	8ul	4ul	1ul
	1%PBS-BSA	16ml	8ml	2ml
	有机硅表面活性剂(Silwet L-77, 1.3ul/ml)	20.8ul	10.4ul	2.6ul

[0121] G. 第一蛋白标记物和第二蛋白标记物

[0122]

标记物的制备		
标记物	成分	比例
第二蛋白标记物（脱脂奶粉）	脱脂奶粉 g：去离子水 mL	1:99
第一蛋白标记物（蛋清蛋白）	蛋清蛋白 mL：去离子水 mL	1:99

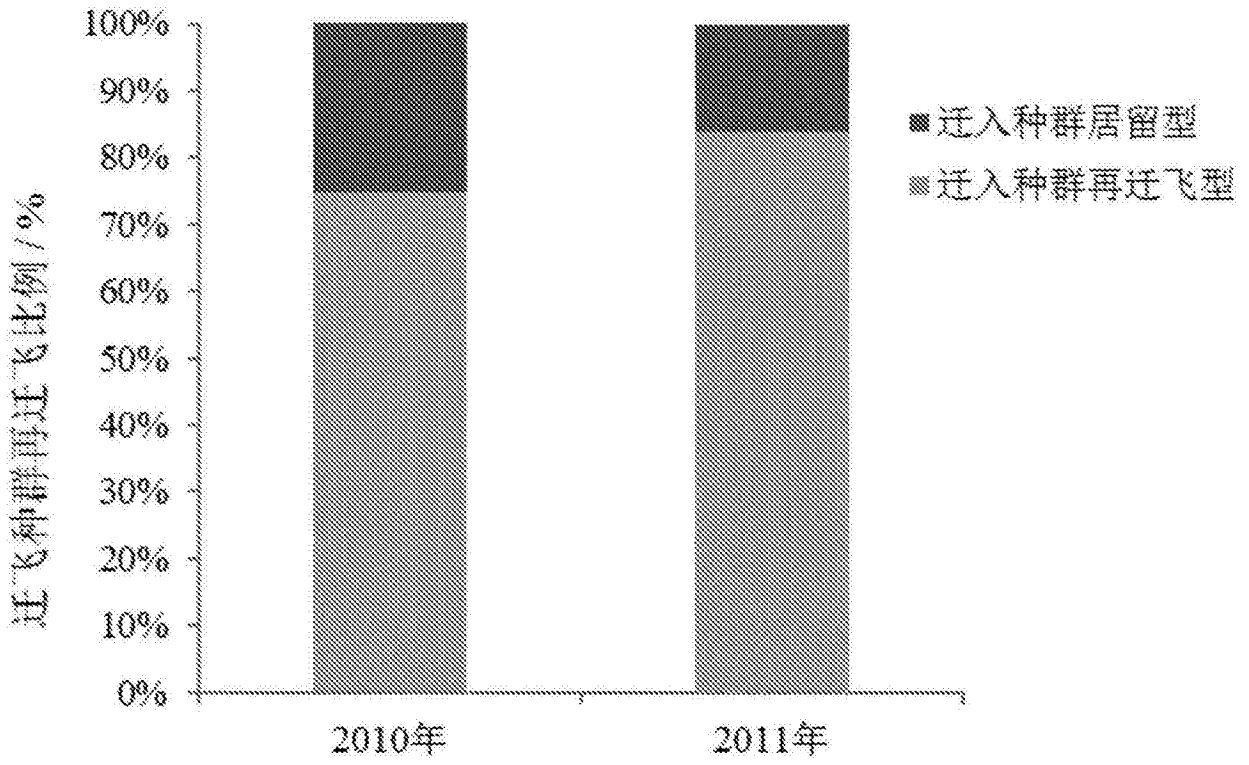


图1

专利名称(译)	一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法		
公开(公告)号	CN105717301A	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201610089776.4	申请日	2016-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	万贵钧 江守林 陈法军 党志浩 张逸飞 代阳		
发明人	万贵钧 江守林 陈法军 党志浩 张逸飞 代阳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/68		
代理人(译)	李晓峰		
其他公开文献	CN105717301B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明公开一种采用双重免疫标记监测昆虫迁飞规律的方法，包括以下步骤：(1)迁飞型昆虫的选择；(2)蛋白标记物的选择；(3)目的昆虫当地种群的发生情况调查；(4)第一种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获；(5)第二种蛋白标记物的喷洒以及目的昆虫捕获；(6)目的昆虫当地种群的迁出行为规律及迁入种群的再迁飞行为规律研究。通过酶联免疫标记技术来研究迁飞昆虫的迁出规律和迁入种群的再迁飞规律将是一种行之有效的方法。本发明可以明确当地迁飞型昆虫的迁出规律，以及迁入昆虫的再迁飞规律，从而更好地指导迁飞昆虫的预测预报及其防控。

