



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113215320 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(21) 申请号 202110573195.9

(22) 申请日 2021.05.25

(71) 申请人 龙岩学院

地址 364012 福建省龙岩市东肖北路1号

(72) 发明人 俞国华 杨小燕 戴爱玲 林楚云

范克伟 刘建奎 黄翠琴 杨守深

尹会方 李晓华 王鑫 包银莉

(74) 专利代理机构 福州君诚知识产权代理有限公司

公司 35211

代理人 戴雨君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

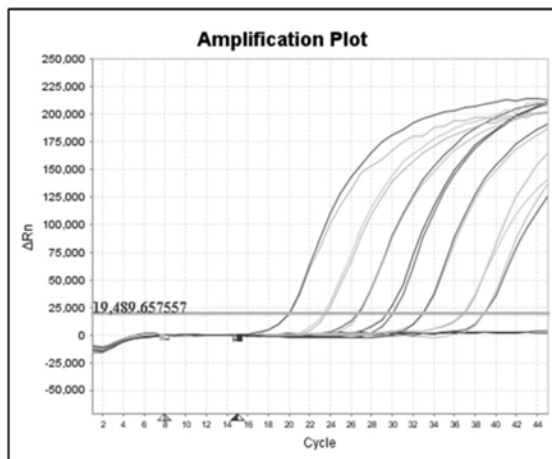
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合及试剂盒,非洲猪瘟病毒P72基因的正向引物、反向引物、特异性荧光探针的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3所示,所述特异性荧光探针的5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团,该引物探针组合还包括针对内参基因设计的特异性引物和探针,内参基因的正向引物、反向引物、特异性荧光探针的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示、SEQ ID NO.6所示,所述特异性荧光探针的5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团。本发明通过在ASFV荧光PCR检测试剂盒中引入一个人工合成的内参基因,从而开发出一款可以区分真阴性样品和假阴性样品的ASFV荧光PCR检测试剂盒。



1. 一种非洲猪瘟病毒P72基因和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合,其特征在于,P72基因的正向引物核苷酸序列如SEQ ID NO. 1所示,P72基因的反向引物核苷酸序列如SEQ ID NO. 2所示,特异性荧光探针核苷酸序列如SEQ ID NO. 3所示,所述特异性荧光探针的5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团,具体核苷酸序列如下所示:

SEQ ID NO. 1: 5' - gagaacgtgaaccttgctattcc -3'

SEQ ID NO. 2: 5' - accaaatccttttgatgc-3'

SEQ ID NO. 3: 5' - cttcgcgagcgctttatcaccataa-3' ;

该引物探针组合还包括针对内参基因设计的特异性引物和探针。

2. 根据权利要求1所述的一种非洲猪瘟病毒P72基因和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合,其特征在于,所述内参基因为IC234,内参基因IC234的正向引物核苷酸序列如SEQ ID NO. 4所示,内参基因IC234的反向引物核苷酸序列如SEQ ID NO. 5所示,内参基因IC234的特异性荧光探针核苷酸序列如SEQ ID NO. 6所示,所述特异性荧光探针的5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团,具体核苷酸序列如下所示:

SEQ ID NO. 4: 5' - ggttcagaggtcaagcaagc-3'

SEQ ID NO. 5: 5' - tgaggtcagcacagcaggttc-3'

SEQ ID NO. 6: 5' - cctcgcaagtgtcacgtctcgc-3' 。

3. 根据权利要求2所述的一种非洲猪瘟病毒P72基因和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合,其特征在于,所述荧光探针的荧光报告基团选自FAM、Alexa 488、TET、VIC、HEX、JOE、Cy3、Alexa 532、TAMRA、ROX、Texas Red、Alexa 594、Cy5、Alexa 647中的一种,淬灭基团选自BHQ0、BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabcyl、TAMRA、MGB、Eclipse中的一种。

4. 根据权利要求3所述的一种非洲猪瘟病毒P72基因和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合,其特征在于,P72基因荧光探针和内参基因IC234荧光探针各自所选择的荧光报告基团是不同的而且可以通过荧光定量PCR仪的不同荧光通道进行检测。

5. 非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含权利要求1或2所述的引物探针组合。

非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合及试剂盒。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)引起的一种急性、烈性、高病死率的传染病。非洲猪瘟病毒(ASFV)是非洲猪瘟病毒科的唯一成员,病毒颗粒呈二十面体,有囊膜,基因组为双股线状DNA,长度大约在170-190kB左右。

[0003] 由于目前为止,非洲猪瘟没有有效的疫苗和治疗方法,自2018年8月首次传入我国后,迅速传遍我国的大江南北,给我国的生猪养殖业造成了巨大的损失。非洲猪瘟是一种毁灭性动物传染病,被称为养猪业的头号杀手,具有重大的政治、经济和社会影响。

[0004] 目前,非洲猪瘟的防控主要依靠消灭传染源和切断传播途径两种方式。而要达到以上两个目的,传染源的快速确诊就是前提。由于荧光PCR具有灵敏度高、特异性好、检测时间短、检测通量高等优点,是非洲猪瘟病毒快速检测的主要方法。

[0005] 但是目前公布的ASFV荧光PCR检测试剂盒(如:专利CN110628956A,CN112646934A、CN111996191A、CN110791590B)几乎都只有针对ASFV相关基因的检测引物和探针,而没有针对内参基因的引物和探针,从而导致无法区分真阴性样品(PCR扩增正常进行而样品中确实没有ASFV)和假阴性样品(样品中存在抑制PCR扩增的成分,导致PCR扩增失败)。如果没有针对内参基因的引物和探针,真阴性样品和假阴性样品的检测结果都是阴性。由于ASFV样品种类繁多,有血液、唾液、环境样、各类组织等,部分样品可能存在抑制PCR的成分,而且提取过程残留的乙醇也可能导致PCR的失败。因此,在ASFV荧光PCR检测试剂盒中引入内参基因是非常必要的。

发明内容

[0006] 为了克服非洲猪瘟病毒(ASFV)荧光PCR检测试剂盒无法区分真阴性样品和假阴性样品的缺点,本发明在ASFV荧光PCR检测试剂盒中引入一个人工合成的内参基因,从而开发出一款可以区分真阴性样品和假阴性样品的ASFV荧光PCR检测试剂盒。

[0007] 本发明是通过如下技术方案实现的:

[0008] 首先,选取ASFV的P72基因不同基因型的保守序列,设计了针对P72基因的荧光PCR引物和特异探针,具体序列如下:

[0009] SEQ ID NO.1 (P72基因正向引物,P72-For):5'-gagaacgtgaaccttgctattcc-3'

[0010] SEQ ID NO.2 (P72基因反向引物,P72-Rev):5'-accaaatcctttttgcatgac-3'

[0011] SEQ ID NO.3 (P72基因荧光探针,P72-Probe):

[0012] 5'-cttcggcgagcgctttatcaccataa-3',其5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团。

[0013] 同时,我们还合成了ASFV P72基因该保守序列相对应的DNA片段并将其连接到质粒pGH上,该质粒命名为pGH-P72,用作ASFV荧光PCR检测时的阳性对照,其具体序列如SEQ ID NO.7所示。

[0014] SEQ ID NO.7 (ASFV P72基因部分片段):

[0015] 5' -tcaaaccctaaatactatcagccccctcttgcgctctggattaagttgcgcttttggtttaatgagaacgtgaaccttgctattccctcagtatccattcccttcggcgagcgctttatcaccataaagcttgcatcgcaaaaggatttggtgaatgaatttcttgactttttgtacgccagtcacgttttatagctggacgccccagtagacgcaatatacgctttaaacatggtttatcccagga-3'

[0016] 其次,我们人工合成了一个基因片段并命名为IC234,其具体序列如SEQ ID NO.8所示。然后将该基因片段连接到质粒pGH上,该质粒命名为pGH-IC234,在进行ASFV检测时,将该质粒加入到反应体系中,作为内参基因,用于监控荧光PCR扩增是否正常进行。同时设计了针对该基因片段的荧光PCR引物和特异探针,具体序列如下:

[0017] SEQ ID NO.4 (内参基因IC234正向引物,IC4d-For):

[0018] 5' -ggttccagaggtcaagcaagc-3'

[0019] SEQ ID NO.5 (内参基因IC234反向引物,IC4d-Rev):

[0020] 5' -tgaggtcagcacagcagagttc-3'

[0021] SEQ ID NO.6 (内参基因IC234荧光探针,IC4d-Probe):

[0022] 5' -cctcgcaagtgctcacgtctcgc-3',其5'端标记有荧光报告基团而3'端标记有淬灭基团。

[0023] SEQ ID NO.8 (人工合成的内参基因IC234):

[0024] 5' -ttgctccacacacgctcaagaacttaaatcagcatcgcaactcgtcagacatcgttcccacaagcaccgagtcacactgtatggacgtgcagccatgtgagtcacactagagcacgggtcacactgtcgctactcctctacgtcagacctcggttgggttccagaggtcaagcaagctttcctcgcaagtgctcacgtctcgcaagaactctgctgtgctgacctcaaa-3'

[0025] P72基因荧光探针和内参基因IC234荧光探针的荧光报告基团选自FAM、Alexa 488、TET、VIC、HEX、JOE、Cy3、Alexa 532、TAMRA、ROX、Texas Red、Alexa 594、Cy5、Alexa 647中的一种,淬灭基团选自BHQ0、BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabcyl、TAMRA、MGB、Eclipse中的一种。P72基因荧光探针和内参基因IC234荧光探针各自所选择的荧光报告基团必须是不同的而且可以通过荧光定量PCR仪的不同荧光通道进行检测,比如:P72基因荧光探针的荧光报告基团可以选择FAM而内参基因IC234荧光探针的荧光报告基团可以选择VIC。

[0026] 最后,在荧光PCR系统中同时加入上述P72基因的引物和特异探针以及IC234内参基因的引物和特异探针,同时将含内参基因的质粒pGH-IC234稀释后,加入到每个荧光PCR反应管中,用于监控每个荧光PCR的扩增是否正常进行。

[0027] 每次检测同时设置阴性对照和阳性对照,其中阴性对照管只含有人工合成的含内参基因的质粒pGH-IC234,而阳性对照管同时含有P72基因片段和含内参基因的质粒pGH-IC234。如果P72基因荧光探针的荧光报告基团是FAM而内参基因IC234荧光探针的荧光报告基团是VIC,那么:阳性对照管的FAM通道应该有S型扩增曲线,阴性对照管的FAM通道只有直线型扩增线而其VIC通道应该有S型扩增曲线。待测试样品管有可能出现以下四种情况:(1) FAM通道和VIC通道都有S型扩增曲线,说明该样品PCR扩增正常而样品ASFV检测为阳性;(2)

FAM通道有S型扩增曲线而VIC通道扩增线呈直线,说明该样品PCR扩增正常而样品ASFV检测为阳性;(3) FAM通道扩增线呈直线而VIC通道有S型扩增曲线,说明说明该样品PCR扩增正常而样品ASFV检测为阴性,为真阴性样品;(4) FAM通道和VIC通道的扩增线都呈直线,说明该样品PCR被抑制,为假阴性样品。

[0028] 可见,只要在反应体系中引入一个人工合成的内参基因及其荧光PCR引物和特异探针,就能开发出一款可以区分真阴性样品和假阴性样品的ASFV荧光PCR检测试剂盒。

附图说明

[0029] 图1为ASFV P72基因荧光PCR扩增曲线。图中一共有8个不同的pGH-P72质粒10倍系列稀释度,有S型扩增曲线的最低稀释度的分子数是14.0个分子。

[0030] 图2为内参基因IC234荧光PCR扩增曲线。图中一共有8个不同的pGH-IC234质粒10倍系列稀释度,有S型扩增曲线的最低稀释度的分子数是27.5个分子。

[0031] 图3为ASFV临床样品的双重荧光PCR扩增曲线。图中,蓝色扩增线为FAM通道(测ASFV P72基因)扩增线,而绿色扩增线为VIC通道(测内参基因)扩增线。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例,更具体的说明本发明的内容,但其内容不构成对本发明的限制。

[0033] 实施例1

[0034] 非洲猪瘟病毒(ASFV) P72基因荧光PCR引物和探针的设计

[0035] 根据已公布的ASFV P72基因不同基因型的核酸序列,在不同基因型的保守序列处,设计了针对P72基因的荧光PCR引物和特异探针。具体序列如下:

[0036] SEQ ID NO.1 (P72基因正向引物,P72-For): 5'-gagaacgtgaaccttgctattcc-3'

[0037] SEQ ID NO.2 (P72基因反向引物,P72-Rev): 5'-accaaattccttttgcgatgc-3'

[0038] SEQ ID NO.3 (P72基因荧光探针,P72-Probe): 5'-cttcggcgagcgcctttatcaccataa-3',

[0039] 其5'端标记有FAM荧光报告基团而3'端标记有BHQ1淬灭基团。

[0040] 同时,我们还合成了ASFV P72基因该保守序列相对应的DNA片段并将其连接到质粒pGH上,该质粒命名为pGH-P72,用作ASFV荧光PCR检测时的阳性对照,其具体序列如SEQ ID NO.7所示。

[0041] SEQ ID NO.7 (ASFV P72基因部分片段):

[0042] 5'-tcaaaccctaaataactatcagccccctcttgcgctctggattaagttgcgcttttggtttaatgagaacgtgaaccttgctattccctcagtatccattcccttcggcgagcgcctttatcaccataaagcttgcacatgcaaaaggatttggatgaatttctggacttttgtacgccagtcacgttttatagctggacgccccagtagacgc aatatacgttttaaccatggtttatcccagga-3'

[0043] 然后,我们将含有ASFV P72基因的质粒pGH-P72作为阳性模板,进行系列稀释,对设计的P72基因的荧光PCR引物和特异探针的有效性进行了测试。

[0044] 荧光PCR的反应体系如下:2X Premix Ex Taq (Probe qPCR)为12.5 μ L;20 μ M P72-For引物和P72-Rev引物各0.5 μ L;10 μ M P72-Probe探针0.5 μ L;不同浓度的pGH-P72质粒5 μ L,剩余部分用水补足到25 μ L。

[0045] ASFV P72基因荧光PCR的反应条件为：(1) 1cycle:95°C, 2min; (2) 45cycles:95°C, 10sec; 60°C, 15sec (收集FAM荧光)。

[0046] ASFV P72基因荧光PCR扩增曲线的实验结果如图1所示。结果显示：所设计的ASFV P72引物和探针具有良好的扩增效率，其最低检测下限至少是14.0个分子，灵敏度良好。

[0047] 实施例2

[0048] 内参基因荧光PCR引物和探针的设计

[0049] 我们人工合成了一个基因片段并命名为IC234，其具体序列如SEQ ID NO.8所示。然后将该基因片段连接到质粒pGH上，该质粒命名为pGH-IC234，在进行ASFV检测时，将该质粒加入到反应体系中，作为内参基因，用于监控荧光PCR扩增是否正常进行。同时设计了针对该基因片段的荧光PCR引物和特异探针，具体序列如下：

[0050] SEQ ID NO.4 (内参基因IC234正向引物, IC4d-For) : 5' -ggttccagaggtcaagcaagc-3'

[0051] SEQ ID NO.5 (内参基因IC234反向引物, IC4d-Rev) : 5' -tgaggtcagcacagcagagttc-3'

[0052] SEQ ID NO.6 (内参基因IC234荧光探针, IC4d-Probe) :

[0053] 5' -cctcgcaagtgtcacgtctcgc-3'，其5'端标记有VIC荧光报告基团而3'端标记有BHQ1淬灭基团。

[0054] SEQ ID NO.8 (人工合成的内参基因IC234) :

[0055] 5' -ttgctccacacacgctcaagaacttaaatcagcatcgcactcgtcagacatcgttcccacaagcaccgagtcacactgtatggacgtgcagccatgtgagtccacactagagcacgggtcacactgtcgtactcctctacgtcagacctcggttgggttccagaggtcaagcaagctttcctcgaagtgtcagctctcgcaagaactctgctgtgctgacctcaaa-3'

[0056] 然后，我们将pGH-IC234质粒作为模板，进行系列稀释，对设计的内参基因IC234的荧光PCR引物和特异探针的有效性进行了测试。

[0057] 荧光PCR的反应体系如下：2X Premix Ex Taq (Probe qPCR) 为12.5μL；20μM IC4d-For引物和IC4d-Rev引物各0.5μL；10μM IC4d-Probe探针0.5μL；不同浓度的pGH-IC234质粒5μL，剩余部分用水补足到25μL。

[0058] 内参基因IC234基因荧光PCR的反应条件为：(1) 1cycle:95°C, 2min; (2) 45cycles: 95°C, 10sec; 60°C, 15sec (收集VIC荧光)。

[0059] 内参基因IC234荧光PCR扩增曲线的实验结果如图2所示。结果显示：所设计的内参基因IC234引物和探针具有良好的扩增效率，其最低检测下限至少是27.5个分子，灵敏度良好。

[0060] 实施例3

[0061] 非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测引物和探针及试剂盒

[0062] 为了克服非洲猪瘟病毒 (ASFV) 荧光PCR检测试剂盒无法区分真阴性样品和假阴性样品的缺点，本发明在ASFV荧光PCR检测试剂盒中引入一个人工合成的IC234内参基因，从而开发出一款可以区分真阴性样品和假阴性样品的ASFV荧光PCR检测试剂盒。

[0063] 该试剂盒的荧光PCR的反应体系如下：2X Premix Ex Taq (Probe qPCR) 为12.5μL；20μM P72-For引物和P72-Rev引物各0.5μL；10μM P72-Probe探针0.5μL；20μM IC4d-For引

物和IC4d-Rev引物各0.5 μ L;10 μ M IC4d-Probe探针0.5 μ L;反应体系中加入适量的pGH-IC234质粒,剩余部分用水补足到25 μ L。反应阴性对照加去离子水,阳性对照使用pGH-P72质粒。

[0064] 试剂盒的荧光PCR的反应条件为:(1) 1cycle:95 $^{\circ}$ C,2min;(2) 45cycles:95 $^{\circ}$ C,10sec;60 $^{\circ}$ C,15sec(同时收集FAM和VIC荧光)。

[0065] 我们用这个非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测试剂盒,对6个ASFV临床样品(同时设置,1个阴性对照和1个阳性对照)进行检测,其荧光PCR扩增曲线如图3所示,检测结果如表1所示。由结果可知:因为6个ASFV临床样品的VIC通道均有典型的S型扩增曲线,说明这些样品中均不含抑制PCR扩增的成分。

[0066] 总结:在反应体系中加入内参基因后,可以明确知道样品中是否含有抑制PCR扩增的成分,从而达到区分真阴性样品(PCR扩增正常进行而样品中确实没有ASFV)和假阴性样品(样品中存在抑制PCR扩增的成分,导致PCR扩增失败)的效果,使最终检测结果更加可靠。

[0067] 表1 ASFV临床样品检测结果

样品	1	2	3	4	5	6	阴性对照	阳性对照
[0068] FAM (测 ASFV P72 基因)	36.4	-	-	36.0	38.8	39.4	-	30.1
VIC (测内参 IC234 基因)	36.2	35.9	35.5	35.7	37.2	35.8	36.5	34.4
ASFV 检测结果判断	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阳性	阴性	阳性

序列表

<110> 龙岩学院

<120> 非洲猪瘟病毒和内参基因双重荧光PCR检测的引物探针组合及试剂盒

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gagaacgtga accttgctat tcc 23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

accaaactcct tttgcatgc 20

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

cttcggcag cgctttatca ccataa 26

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggttccagag gtcaagcaag c 21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tgaggtcagc acagcagagt tc 22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cctcgcaagt gtcacgtct cgc 23

<210> 7

<211> 250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tcaaacacct aaatactatc agccccctct tgcgctctgg attaagttgc gcttttggtt 60

taatgagaac gtgaaccttg ctattcctc agtatccatt cccttcggcg agcgctttat 120

caccataaag cttgcatcgc aaaaggattt ggtgaatgaa tttctggac tttttgtacg 180

ccagtcacgt tttatagctg gacgccccag tagacgcaat atacgcttta aaccatgggt 240

tatcccagga 250

<210> 8

<211> 229

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttgctccaca cacgctcaag aacttaaate agcatcgcac tcgtcagaca tcgttccac 60

aagcacgagt ccacctgtat ggacgtgcag ccatgtgagt ccacactaga gcacgggtca 120

cactgtcgt actcctctac gtcacgacct cggttgggtt ccagaggtca agcaagcttt 180

cctcgcaagt gtcacgtct cgcaagaact ctgctgtgct gacctcaa 229

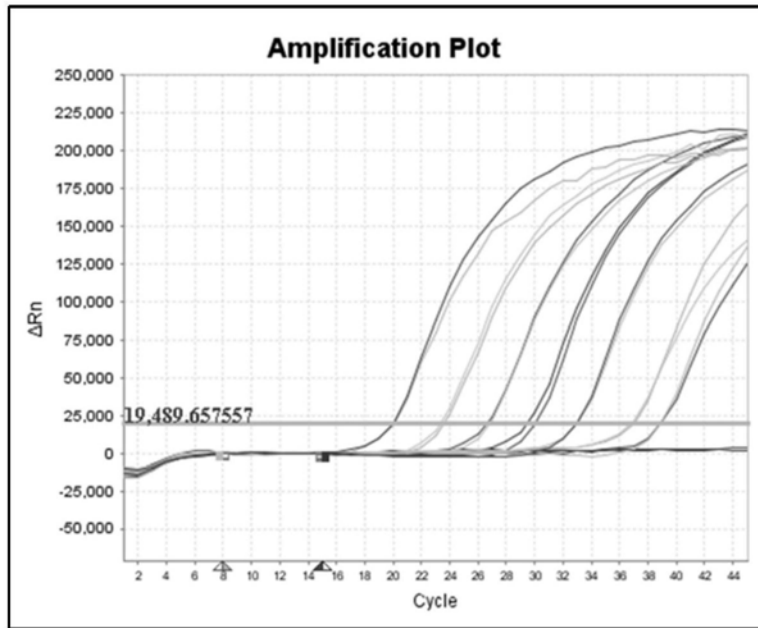


图1

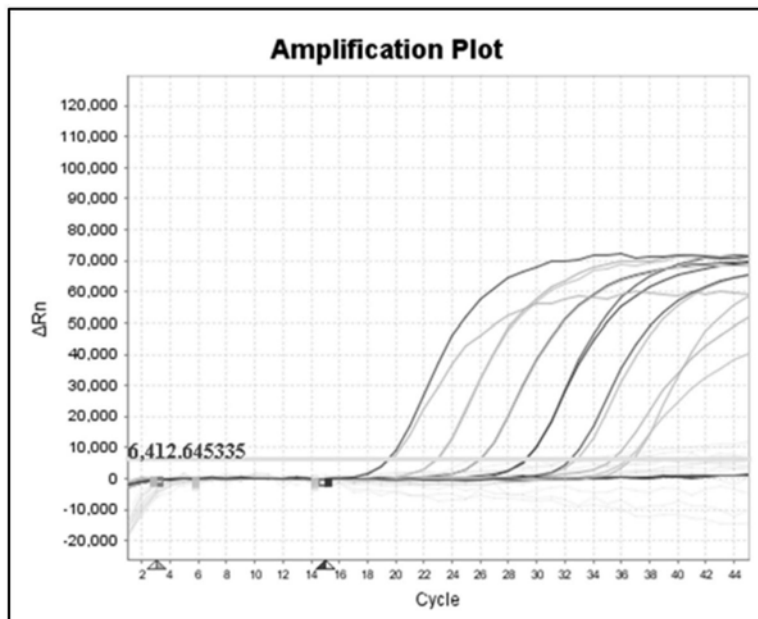


图2

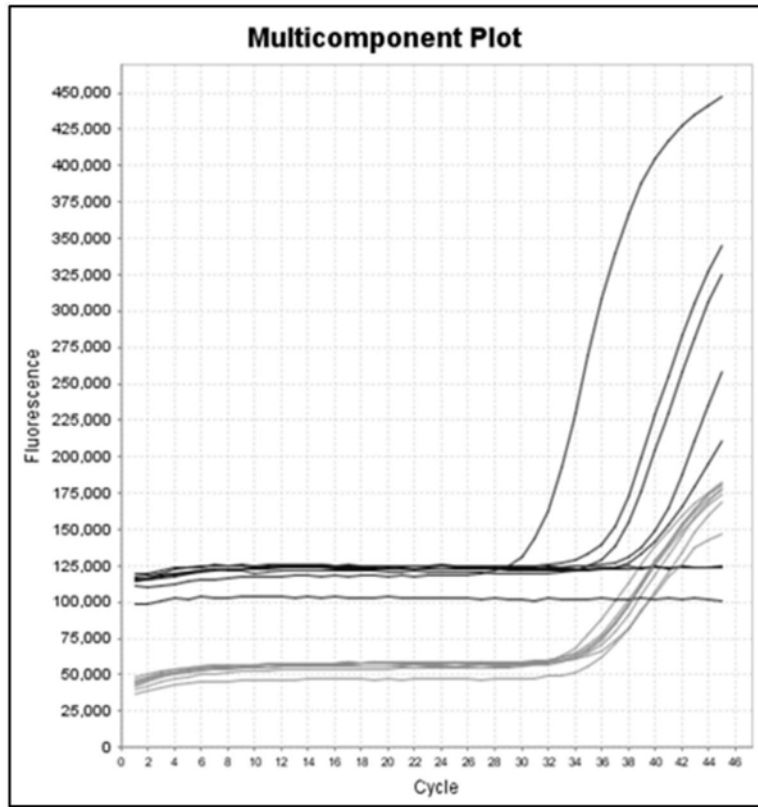


图3