



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101942524 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200910040954. 4

(22) 申请日 2009. 07. 08

(73) 专利权人 中国科学院广州生物医药与健康
研究院

地址 510663 广东省广州市广州科学城国际
企业孵化器 D 栋 10 楼

(72) 发明人 曾令文 顿博影 刘杰

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 刘宇峰

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

C12R 1/93 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0233128 A2, 2002. 04. 25,

CN 1670219 A, 2005. 09. 21,

CN 101363063 A, 2009. 02. 11,

CN 1670220 A, 2005. 09. 21,

US 2007238093 A1, 2007. 10. 11,

审查员 马艳林

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核
酸实时荧光检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种同时检测甲型 H1N1 流感病毒及甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方法及其试剂盒。本发明所述的甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方法,包括以下步骤:1) 病毒 RNA 的提取;2) 荧光定量 PCR 检测;3) 检测结果判断。通过序列多重比对,针对甲型流感病毒及甲型 H1N1 (2009 年流行) 流感病毒的保守基因片段,设计出特异性强的引物和探针,用于实时荧光 RT-PCR 检测。本发明可用于检测甲型人流感、猪流感、禽流感等流感病毒 RNA,同时可以特异地检测甲型 H1N1 (2009 年流行) 流感病毒 RNA,进行双重分析使检测结果更加可靠。

1. 一种甲型流感病毒与甲型 H1N1 流感病毒联合核酸实时荧光检测的试剂盒,包括 ROX 校正液、焦碳酸二乙酯水、阴性对照、甲型流感病毒阳性对照、甲型 H1N1 阳性对照,其特征 在于,还包括以下成分:

甲型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 反应液,包含:

RT-PCR 缓冲液;

一对甲型 H1N1 流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 1,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 2;以及

一条甲型 H1N1 流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 3,其中,5' 端的荧光基 团为 6-羧基荧光素,3' 端的淬灭剂为 6-羧基四甲基若丹明;

以及

甲型流感病毒 RT-PCR 反应液,包含:

RT-PCR 缓冲液;

一对甲型流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 4,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 5;以及

一条甲型流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 6,其中,5' 端的荧光基团为 6-羧基荧光素,3' 端的淬灭剂为 6-羧基四甲基若丹明;

以及

酶混合液,由 Taq 酶 5U/ μ l 和逆转录酶 5U/ μ l 以体积比 1:1 混合组成。

甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种同时检测甲型及甲型 H1N1 流感病毒的实时荧光检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 流行性感冒简称流感,是由甲型、乙型、丙型三种流感病毒引起的急性呼吸道传染病。根据其表面结构(血凝素 H 和神经氨酸酶 N)及其基因特性的不同,甲型流感病毒又可分为许多亚型,至今甲型流感病毒已发现的血凝素有 16 个亚型(H1-H16),神经氨酸酶 9 个亚型(N1-N9)。甲型 H1N1 流感病毒是其中的一种亚型,它引起甲型 H1N1 流感。

[0003] 2009 年从墨西哥爆发并蔓延到全球多个国家的人感染甲型 H1N1 流感疫情,是由于一种新变异的甲型 H1N1 流感病毒引发的,被世界卫生组织称为“国际关注的突发公共卫生事件”,已达到了最高的 6 级警告标准。

[0004] 引起本次甲型 H1N1 流感的流感病毒的毒株包含有猪流感、禽流感和人流感等三种流感病毒的基因片段(余健民. 甲型 H1N1 流感的诊治与预防. 江西医药,2009,44(4))。本次甲型 H1N1 流感具有以下几个特点:一是此次疫情由新的流感病毒变异株引起,人群普遍易感,已引起跨国、跨洲传播。二是出现了人传人病例。三是墨西哥已经出现了较多的重症和死亡病例。四是流感病人在发病前一天已可排毒,有些人感染后不发病,但仍然具有传染性,隐性传染比例相当高。

[0005] 今年流行的甲型 H1N1 病毒已经蔓延到世界许多国家,不足一个月,全球确诊的甲型 H1N1 流感病例已突破万例,我国也出现了多例输入性流感病例。给人类生命安全造成了一定危害,包括我国政府在内的世界各国都采取了积极有效的防控措施,以防止疾病的迅速蔓延。面对突然爆发的流行性疾病,开展对疾病预防、诊断、致病机理以及治疗研究是相关领域关注和研究的重点。

[0006] 荧光定量 PCR 具有灵敏、准确、实时的技术优点,通过针对当前流行的甲型 H1N1 和甲型流感病毒,设计不同的引物和探针,组装成荧光定量 PCR 试剂盒,迅速准确检测甲型流感病毒及当前流行的甲型 H1N1 流感病毒,以便开展早期大规模筛查及有效地控制疾病的迅速传播。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供了一种甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方法以及相应的试剂盒,采用两种探针同时检测甲型 H1N1 流感病毒(2009 年流行的新变种)和甲型流感病毒,通过双重验证使结果更加稳定;同时也可以区分甲型流感病毒及其他病毒,以及区分甲型 H1N1 流感病毒(2009 年流行的新变种)及其他普通流感病毒。

[0008] 本发明所述的一种甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方

法,包括以下步骤:

[0009] 1) 病毒 RNA 的提取:

[0010] a) 从已灭活的病毒培养液中取 200-400ul 病毒样本加入 0.5ml Trizol,反复震荡,抽吸以利于病毒裂解,20-37°C 下孵化 5 分钟;

[0011] b) 在病毒裂解液中加入 0.1ml 的氯仿并震荡至乳糜化,20-37°C 下孵化 10 分钟,4°C 12000rpm 下离心 15 分钟,取上清液;

[0012] c) 在上清液中加入 0.1ml 的异丙醇,20-37°C 下孵化 10 分钟,4°C 12000rpm 下离心 15 分钟,去掉上清液,使沉淀干燥;

[0013] d) 加 0.5ml 的 75%乙醇洗涤沉淀,4°C 7500rpm 下离心 5 分钟,除尽上清液,使沉淀干燥,该沉淀为病毒样本的 RNA;

[0014] e) 用焦碳酸二乙酯水 20 μ l 溶解 RNA 沉淀, RNA 溶液于 -80°C 下保存;

[0015] 2) 荧光定量 PCR 检测:

[0016] 采用 50 μ l 的荧光定量 PCR 反应体系;

[0017] 甲型 H1N1 流感病毒检测体系包含:

[0018] 甲型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 反应液 29 μ l,

[0019] 酶混合液 2 μ l,

[0020] ROX 校正液 1 μ l,

[0021] RNA 提取液 4 μ l;

[0022] 甲型流感病毒检测体系包含:

[0023] 甲型流感病毒 RT-PCR 反应液 29 μ l,

[0024] 酶混合液 2 μ l,

[0025] ROX 校正液 1 μ l,

[0026] RNA 提取液 4 μ l;

[0027] 实时荧光定量 RT-PCR 反应程序:

[0028] 反转录 42°C 5 分钟,

[0029] 反转录酶灭活 95°C 10 秒,

[0030] 40 个循环 95°C 5 秒,60°C 31 秒;

[0031] 所述的甲型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 反应液包含:

[0032] RT-PCR 缓冲液;

[0033] 一对甲型 H1N1 流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 1,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 2 以及

[0034] 一条甲型 H1N1 流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 3,其中,5' 端的荧光基团为 FAM(6-羧基荧光素),3' 端的淬灭剂为 TAMARA(6-羧基四甲基若丹明);

[0035] 所述的甲型流感病毒 RT-PCR 反应液包含:

[0036] RT-PCR 缓冲液;

[0037] 一对甲型流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 4,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 5 以及

[0038] 一条甲型流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 6,其中,5' 端的荧光基团为 FAM(6-羧基荧光素),3' 端的淬灭剂为 TAMARA(6-羧基四甲基若丹明);

[0039] 所述的酶混合液,由 Taq 酶 5U/ μ l 和逆转录酶 5U/ μ l 以体积比 1 : 1 混合组成 ;

[0040] 3) 检测结果判断 :

[0041] 荧光定量 RT-PCR 程序结束后,仪器已自动记录保存每个循环的荧光信号,进行阈值调整后,通过检测甲型 H1N1 和甲型流感病毒的扩增曲线及 Ct 值进行结果判断。

[0042] 本发明的另一目的在于提供了一种甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测的试剂盒。

[0043] 本发明所述的一种甲型流感病毒与甲型 H1N1 流感病毒联合核酸实时荧光检测的试剂盒,包括 ROX 校正液、焦碳酸二乙酯水、阴性对照、甲型阳性对照、甲型 H1N1 阳性对照,其特征在于,还包括以下成分 :

[0044] 甲型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 反应液,包含 :

[0045] RT-PCR 缓冲液 ;

[0046] 一对甲型 H1N1 流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 1,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 2 ;以及

[0047] 一条甲型 H1N1 流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 3,其中,5' 端的荧光基团为 FAM(6- 羧基荧光素),3' 端的淬灭剂为 TAMARA(6- 羧基四甲基若丹明) ;

[0048] 以及

[0049] 甲型流感病毒 RT-PCR 反应液,包含 :

[0050] RT-PCR 缓冲液 ;

[0051] 一对甲型流感病毒特异引物,上游引物的序列为 SEQ ID NO. 4,下游引物的序列为 SEQ ID NO. 5 ;以及

[0052] 一条甲型流感病毒 TaqMan 荧光探针,序列为 SEQ ID NO. 6,其中,5' 端的荧光基团为 FAM(6- 羧基荧光素),3' 端的淬灭剂为 TAMARA(6- 羧基四甲基若丹明) ;

[0053] 以及

[0054] 酶混合液,由 Taq 酶 5U/ μ l 和逆转录酶 5U/ μ l 以体积比 1 : 1 混合组成。

[0055] 本发明的特点和优点在于 :在甲型流感病毒及当前流行的甲型 H1N1 序列分析的基础上,选取甲型流感病毒及当前流行的甲型 H1N1 流感病毒的保守基因片段,应用 primer Express 软件设计引物和探针 ;采用改良的 Trizol 法提取流感病毒 RNA,同时,利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对流感病毒进行检测。在核酸提取结束后直接将核酸加入到 RT-PCR 反应液中,cDNA 的合成与 PCR 反应在同一管中进行,不用增加额外的步骤。本发明所述得检测方法和试剂盒在不影响灵敏度、准确度的情况下,不仅缩短了操作时间、降低了劳动强度,而且也直接降低了检测的成本。本发明可用于检测甲型人流感、猪流感、禽流感等流感病毒 RNA,同时可以特异地检测甲型 H1N1 (2009 流行) 流感病毒 RNA,进行双重分析使检测结果更加可靠。

具体实施方式

[0056] 实施例一 :针对甲型流感病毒及甲型 H1N1 流感病毒的特异性引物及探针的设计

[0057] 在 NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/request.cgi> 中查找出所有甲型流感病毒的 MP 基因片段序列,通过多重比对找出甲型流感病毒的保守区段。采用 Express Primer 在其保守片段上设计引物和探针。

[0058] 通过对甲型 H1N1 (2009 流行) 的 PA 基因片段序列, 采用 Express Primer 设计引物和探针。将所设计的引物与探针与所有病毒序列进行比对, 找出变异性最强的引物和探针。

[0059] 上述甲型 H1N1 (2009 年流行) 的全长 PA 基因序列来源于 NCBI (> gi|227831814|gb|FJ966977.1|InfluenzaAvirus(A/California/07/2009(H1N1)) segment 3 polymerase PA(PA) gene, complete cds)

[0060] 设计结果为:

[0061] 甲型流感病毒的特异性引物

[0062] 上游引物 :GGGRATTTTAGGATTTGTGTTCAC SEQ ID NO. 1

[0063] 下游引物 :CCCATWAGGGCATTGGA SEQ ID NO. 2

[0064] TaqMan 探针 :SEQ ID NO. 3

[0065] 5' -FAM-ACCGTGCCCAGTGAGCGAGG-TAMARA-3'

[0066] 甲型 H1N1 流感病毒的特异性引物

[0067] 上游引物 :TCAAAAAGAAGTGAACGCCAAAA SEQ ID NO. 4

[0068] 下游引物 :CAGGAACTTTGACCGCTGATG SEQ ID NO. 5

[0069] TaqMan 探针 :SEQ ID NO. 6

[0070] 5' -FAM-ACGACACCACGCCCCCTCAGATT-TAMARA-3'

[0071] TaqMan 荧光探针是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端。本发明中, 荧光基团采用 FAM (6- 羧基荧光素), 淬灭剂采用 TAMARA (6- 羧基四甲基若丹明)。

[0072] 实施例二 :建立和优化甲型流感病毒及甲型 H1N1 流感病毒的定量 PCR 反应体系和条件

[0073] 建立具有如下组分浓度的 50 μ l 反应体系 :2 倍 RT-PCR 缓冲液 25 μ l, Taq 酶 5U, 反转录酶 5U, 上下游引物各 0.2 μ M, 探针 0.15 μ M, ROX 校正液 1 μ l (TaKaRa 公司), 提取的 RNA 4 μ l ;

[0074] 确立如下的反应条件 :42 $^{\circ}$ C 5 分钟 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 10 秒 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 31 秒, 其中 95 $^{\circ}$ C 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 31 秒之间进行 40 个循环, 选择荧光 PCR 仪上的 FAM 进行检测。

[0075] 逆转录及实时荧光定量 PCR 扩增

[0076] 取 2 μ l 或 4 μ l 提取的 RNA 作为 RT-PCR 反应的模板, 同时加入 20 μ l 或 50 μ l 的 RT-PCR 反应液至八联管中进行 RT-PCR 扩增

[0077] 一步实时荧光定量 RT-PCR 反应液的配制 :

[0078] 甲型 RT-PCR 反应液配制 :

[0079] 试剂	使用量 (μ l)	使用量 (μ l)
[0080] 甲型 RT-PCR 反应液	11.6	29
[0081] 酶混合液	0.8	2
[0082] ROX 校正液	0.4	1
[0083] 阴性对照 / 甲型阳性对照 / 总 RNA	2	4
[0084] DEPC 水	5.2	14
[0085] 总体积	20	50

[0086] 甲型 H1N1RT-PCR 反应液配制：

[0087]	试剂	使用量 (μ l)	使用量 (μ l)
[0088]	甲型 H1N1RT-PCR 反应液	11.6	29
[0089]	酶混合液	0.8	2
[0090]	ROX 校正液	0.4	1
[0091]	阴性对照 / 甲型 H1N1 阳性对照 / 总 RNA	2	4
[0092]	DEPC 水	5.2	14
[0093]	总体积	20	50

[0094] b) 一步实时荧光定量 RT-PCR 反应程序：

[0095] 第一阶段, 42°C 5min 反转录

[0096] 第二阶段, 95°C 10s 反转录酶灭活

[0097] 第三阶段, [95°C 5s ; 60°C 31s] \times 40 次循环

[0098] 最后一步反应时间依据所采用 PCR 仪而定。

[0099] 实施例三 : 实时荧光检测方法的建立

[0100] 本发明所采用的仪器有：

[0101] Thermal Cycler Dice™ Real Time System (TaKaRa)

[0102] Smart **Cycler**® System (Cepheid)

[0103] ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

[0104] Line-Gene (Bioer, 杭州博日)

[0105] LightCycler (Roche Diagnostics)

[0106] Mx3000P (Stratagere) 其他各种 Real Time PCR 扩增仪。

[0107] 结果判断：

[0108] 以使用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪为例, 在其他仪器上操作参照各仪器说明书进行。

[0109] 反应结束后根据分析后图象调节 Baseline 的 Start 值, 调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线, 点击 Analysis 自动获得分析结果。

[0110] 参考值 (参考范围)：

[0111] Ct 值 \leq 32, 可判定甲型流感病毒 H1N1 阳性；

[0112] Ct 值为 0 或 $>$ 35, 可判定甲型流感病毒 H1N1 阴性；

[0113] $32 <$ Ct 值 \leq 35 为无效。

[0114] 检验结果的解释：

[0115] 如果检测样本在 RT-PCR 反应体系甲型和甲型 H1N1 中的扩增曲线均无对数增长期或 Ct 值 $>$ 35, 可判断样本为甲型流感病毒阴性；

[0116] 如果检测样本在 RT-PCR 反应体系甲型和甲型 H1N1 中的扩增曲线均有对数增长期且 Ct 值 \leq 32, 可判断样本为甲型 H1N1 (2009 流行) 流感病毒阳性；

[0117] 如果检测样本在 RT-PCR 反应体系甲型的扩增曲线有对数增长期且 Ct 值 \leq 32 而在 RT-PCR 反应体系甲型 H1N1 的扩增曲线无对数增长期且 Ct 值 $>$ 35, 可判断样本为甲型流感病毒阳性, 甲型 H1N1 (2009 流行) 流感病毒阴性；

[0118] 如果检测样本在 RT-PCR 反应体系甲型的扩增曲线无对数增长期且 Ct 值 $>$ 35 而

在 RT-PCR 反应体系甲型 H1N1 的扩增曲线有对数增长期且 Ct 值 ≤ 32 , 试验结果无效, 检查整个实验流程, 重新试验。

[0119] 质量控制标准:

[0120] 阴性质控品: 扩增曲线无对数增长期或 Ct 值 > 35 ;

[0121] 阳性质控品: 扩增曲线有明显对数增长期, 且 Ct 值 ≤ 30 ;

[0122] 以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

[0123] 实施例四: 甲型及甲型 H1N1 (2009) 流感病毒联合核酸实时荧光检测试剂盒

[0124] 本发明所述的甲型流感病毒与甲型 H1N1 流感病毒联合核酸实时荧光检测的试剂盒, 包括 ROX 校正液、焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水、阴性对照 (无关 DNA, 如人基因组 DNA)、甲型阳性对照 (克隆有甲型流感病毒 MP 全长片段的质粒 PMD18-T)、甲型 H1N1 阳性对照 (克隆有甲型 H1N1 流感病毒 PA 全长片段的质粒 PMD18-T), 还包括以下成分:

[0125] (1) 甲型 H1N1 流感病毒 RT-PCR 反应液, 包含:

[0126] RT-PCR 缓冲液;

[0127] 一对甲型 H1N1 流感病毒特异引物,

[0128] 上游引物: GGGRATTTTAGGATTTGTGTTCAC SEQ ID NO. 1

[0129] 下游引物: CCCATTWAGGGCATTGGA SEQ ID NO. 2

[0130] TaqMan 探针: SEQ ID NO. 3

[0131] 5' -FAM-ACCGTGCCCAGTGAGCGAGG-TAMARA-3'

[0132] (2) 甲型流感病毒 RT-PCR 反应液, 包含:

[0133] RT-PCR 缓冲液;

[0134] 上游引物: TCAAAAAGAAGTGAACGCCAAAA SEQ ID NO. 4

[0135] 下游引物: CAGGAACCTTGACCGCTGATG SEQ ID NO. 5

[0136] TaqMan 探针: SEQ ID NO. 6

[0137] 5' -FAM-ACGACACCACGCCCCCTCAGATT-TAMARA-3'

[0138] TaqMan 荧光探针是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端。本发明中, 荧光基团采用 FAM (6- 羧基荧光素), 淬灭剂采用 TAMARA (6- 羧基四甲基若丹明)。

[0139] (3) 酶混合液, 由 Taq 酶 5U/ μ l 和逆转录酶 5U/ μ l 以体积比 1 : 1 混合组成。

[0140] 实施例五: 应用 ABI7300 荧光 PCR 仪对试剂盒中阳性质控品及阴性质控品检测方法及其结果

[0141] 1) 取出试剂盒 (见实施例四), 于 4°C 解冻, 各试剂于用前 1000 转 / 分钟低速离心 1 分钟待用

[0142] 2) 按下列组份配制 RT-PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

[0143] 甲型 RT-PCR 反应液配制:

[0144] 试剂 使用量 μ l

[0145] 甲型 RT-PCR 反应液 29

[0146] 酶混合液 2

[0147] ROX 校正液 1

[0148] 阴性对照 / 甲型阳性对照 4

- [0149] DEPC 水 14
- [0150] 总体积 50 μ l
- [0151] 甲型 H1N1 RT-PCR 反应液配制：
- [0152] 试剂 使用量 μ l
- [0153] 甲型 H1N1RT-PCR 反应液 29
- [0154] 酶混合液 2
- [0155] ROX 校正液 1
- [0156] 阴性对照 / 甲型 H1N1 阳性对照 4
- [0157] DEPC 水 14
- [0158] 总体积 50 μ l
- [0159] 3) 进行实时荧光一步法 RT-PCR 反应。
- [0160] 设定 PCR 反应程序 :42 $^{\circ}$ C 5 分钟 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 10 秒 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 31 秒,其中 95 $^{\circ}$ C 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 31 秒之间进行 40 个循环,选择荧光 PCR 仪上的 FAM 进行检测。所用荧光 PCR 仪为 ABI7300。
- [0161] 4) 试验结果及分析
- [0162] 甲型阴性质控品 Ct 值为 0,阳性质控品 Ct 值为 21,甲型 H1N1 阴性质控品 Ct 值为 0,阳性质控品 Ct 值为 21,符合预期期望,试剂盒可以用于实际样品的检测。
- [0163] 实施例六 :应用本发明的试剂盒对实际样品的检测
- [0164] 1) 毒株及其来源
- [0165] A/ws/33(H1N1),A/hongkong/8/68(H3N2) 由中科院广州生物医药与健康研究院提供 ;A/P2/8/34(H1N1),B 型为临床分离毒株由广州呼吸疾病研究所提供 ;甲型 H1N1 由美国疾病控制及预防中心 (CDC) 提供。以上毒株信息可通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi?go=1> 查找。
- [0166] 2) 病毒 RNA 提取
- [0167] a) 200-400 μ l 样本加入 0.5ml Trizol(咽拭子来源或病毒培养液),反复震荡,抽吸以利于细胞裂解,室温下孵化 5 分钟 ;
- [0168] b) 加入 0.1ml 的氯仿并震荡至乳糜化,室温下孵化 10 分钟,4 $^{\circ}$ C 12000rpm 下离心 15 分钟,取上清液,转移至另一 1.5ml EP 管 ;
- [0169] c) 加入 0.1ml 的异丙醇,室温下孵化 10 分钟,4 $^{\circ}$ C 12000rpm 下离心 15 分钟,去掉上清液,将管倒置在吸水纸上,稍微风干 ;
- [0170] d) 加入 0.5ml 的 75%乙醇 (DEPC 处理的水配制) 洗涤 RNA,4 $^{\circ}$ C 7500rpm 下离心 5 分钟,倒置于吸水纸上,除去上清液后室温下静置 5 分钟 ;
- [0171] e) 用 DEPC 水 20 μ l. 溶解 RNA
- [0172] f) 测定 RNA 浓度及 A260/A280。
- [0173] 需要注意整个提取过程在生物安全柜内进行,试剂在冰上预冷 ;若 RNA 需反复使用,请尽量分装,避免反复冻融。
- [0174] 3) 应用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪进行检测
- [0175] a) 取出试剂盒,于 4 $^{\circ}$ C 解冻,各试剂于用前 1000 转 / 分钟低速离心 1 分钟待用 ;
- [0176] b) 按下列组份配制 RT-PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

[0177] 甲型 RT-PCR 反应液配制：

[0178]	试剂	使用 μ l
[0179]	甲型 RT-PCR 反应液	29
[0180]	酶混合液	2
[0181]	ROX 校正液	1
[0182]	阴性对照 / 甲型阳性对照 / 总 RNA	4
[0183]	DEPC 水	14
[0184]	总体积	50 μ l

[0185] 甲型 H1N1RT-PCR 反应液配制：

[0186]	试剂	使用 μ l
[0187]	甲型 H1N1RT-PCR 反应液	29
[0188]	酶混合液	2
[0189]	ROX 校正液	1
[0190]	阴性对照 / 甲型 H1N1 阳性对照 / 总 RNA	4
[0191]	DEPC 水	14
[0192]	总体积	50 μ l

[0193] C) 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

[0194] 设定 PCR 反应程序：42°C 5 分钟 → 95°C 10 秒 → 95°C 5 秒 → 60°C 31 秒，其中 95°C 5 秒 → 60°C 31 秒之间进行 40 个循环，选择荧光 PCR 仪上的 FAM 进行检测。所用荧光 PCR 仪为 ABI7300。

[0195] 4) 试验结果及分析

[0196] 甲型检测 A/ws/33/H1N1、A/hongkong/8/68 (H3N2)、A/P2/8/34 (H1N1)、甲型 H1N1、B 型临床分离样品的 Ct 值分别为 20、23、28、26、0，说明甲型检测 A/ws/33/H1N1、A/hongkong/8/68 (H3N2)、A/P2/8/34 (H1N1)、甲型 H1N1 为阳性，检测 B 型流感病毒为阴性，试验结果符合预期期望。

[0197] 甲型 H1N1 检测 A/ws/33/H1N1、A/hongkong/8/68 (H3N2)、A/P2/8/34 (H1N1)、B 型临床分离样品的 Ct 值分别均为 0，甲型 H1N1 检测甲型 H1N1Ct 值为 25，说明甲型 H1N1 检测 A/ws/33/H1N1、A/hongkong/8/68 (H3N2)、A/P2/8/34 (H1N1)、B 型流感病毒为阴性，检测甲型 H1N1 为阳性，试验结果符合预期期望。

[0198] 序列列表 (SEQUENCE LISTING)

[0199] <110> 中国科学院广州生物医药与健康研究院

[0200] <120> 甲型 H1N1 流感病毒与甲型流感病毒联合核酸实时荧光检测方法及其试剂盒

[0201] <130>

[0202] <160>6

[0203] <170>PatentIn version 3.4

[0204] <210>1

[0205] <211>24

[0206] <212>DNA

[0207] <213> 人工合成

[0208]	<400>1	
[0209]	gggratttta ggatttgtgt teac	24
[0210]	<210>2	
[0211]	<211>20	
[0212]	<212>DNA	
[0213]	<213> 人工合成	
[0214]	<400>2	
[0215]	cccattwagg gcattttgga	20
[0216]	<210>3	
[0217]	<211>20	
[0218]	<212>DNA	
[0219]	<213> 人工合成	
[0220]	<400>3	
[0221]	accgtgccca gtgagcgagg	20
[0222]	<210>4	
[0223]	<211>22	
[0224]	<212>DNA	
[0225]	<213> 人工合成	
[0226]	<400>4	
[0227]	tcaaaagaag tgaacgcca aa	22
[0228]	<210>5	
[0229]	<211>21	
[0230]	<212>DNA	
[0231]	<213> 人工合成	
[0232]	<400>5	
[0233]	caggaacttt gaccgctgat g	21
[0234]	<210>6	
[0235]	<211>23	
[0236]	<212>DNA	
[0237]	<213> 人工合成	
[0238]	<400>6	
[0239]	acgacaccac gccccctcag att	23