



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I731425 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 21 日

---

(21) 申請案號：108135519 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 01 日

(51) Int. Cl. : **C12Q1/70 (2006.01)** **C12Q1/686 (2018.01)**  
**C12N15/11 (2006.01)**

(30) 優先權：2018/10/09 美國 62/743,162  
2018/11/13 美國 62/760,184

(71) 申請人：先進應用技術有限公司 (香港地區) ADVANCED APPLIED TECHNOLOGIES LTD.  
(HK)  
香港

(72) 發明人：郭村勇 KUO, TSUN-YUMG (TW)；謝旺儒 HSIEH, WANG-JU (TW)；李柏寬 LI, BO-KUAN (TW)；蕭志奇 HSIAO, CHIH-CHI (TW)；陳子翔 CHEN, TZ-SHIANG (TW)

(74) 代理人：蔡嘉慧

(56) 參考文獻：  
CN 108300808A WO 2012079016A1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：1 項 圖式數：2 共 28 頁

---

(54) 名稱

一種用於偵測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對及探針

(57) 摘要

本發明涉及一種檢測非洲豬瘟病毒的方法。此外，本發明並涉及用於檢測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對。

The present invention relates to a method for detecting African swine fever virus (ASFV). In addition, the present invention also relates to pairs of oligonucleotides for detecting African swine fever virus (ASFV).

指定代表圖：

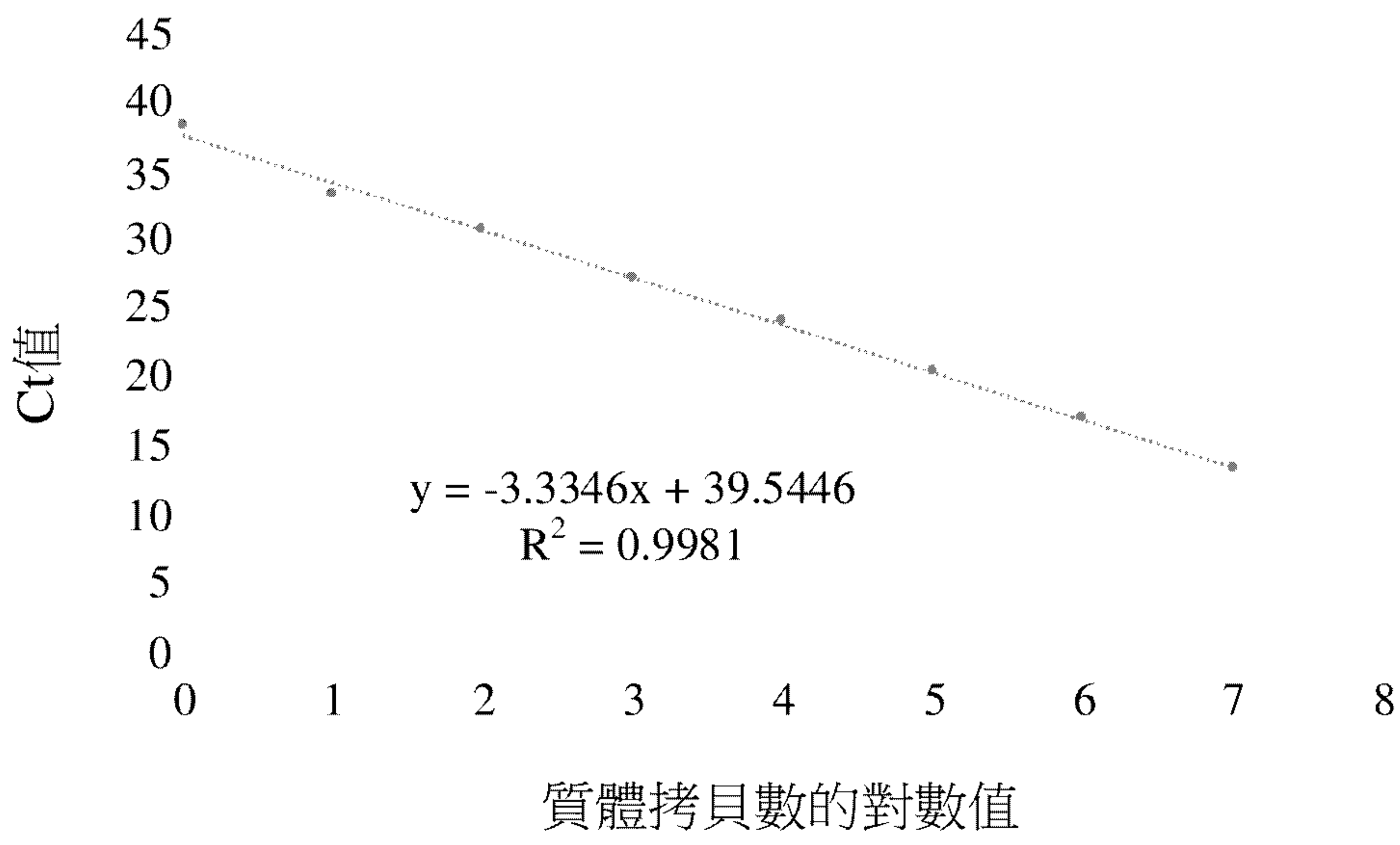


圖1



I731425

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 一種用於偵測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對及探針

【英文發明名稱】 Pairs of Oligonucleotides and Probes for Detecting African

Swine Fever Virus (ASFV)

### 【中文】

本發明涉及一種檢測非洲豬瘟病毒的方法。此外，本發明並涉及用於檢測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對。

### 【英文】

The present invention relates to a method for detecting African swine fever virus (ASFV). In addition, the present invention also relates to pairs of oligonucleotides for detecting African swine fever virus (ASFV).

【指定代表圖】 圖1

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種用於偵測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對及探針

【英文發明名稱】 Pairs of Oligonucleotides and Probes for Detecting African

Swine Fever Virus (ASFV)

### 【技術領域】

【0001】 本發明關於檢測非洲豬瘟病毒(African Swine Fever Virus, ASFV)的方法，特別是關於使用寡核苷酸對檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)的方法。

### 【先前技術】

【0002】 豬是全球最重要的經濟動物之一。根據美國農業部統計，2018年全球主要養豬國的豬肉總產量達113,081千噸。豬肉的經濟價值已超過千億美金。然而，密集養殖加上管理不良可能造成豬隻容易感染疾病且疫情迅速擴散。以2018年中國爆發的非洲豬瘟(African Swine Fever, ASF)為例，病豬死亡率幾乎為100%，已經造成了巨大的經濟損失。由此可見，在飼養場密集監控豬隻疾病對管理而言是不可或缺的一環。本發明即提供了快速、方便的非洲豬瘟病毒(ASFV)檢測方法以供產業利用。

### 【發明內容】

【0003】 於一方面，本發明涉及一種非洲豬瘟病毒(ASFV)檢測方法，包含提供一可能含有一非洲豬瘟病毒(ASFV)的一或多個核苷酸序列的樣本；提供一寡核苷酸引子對，該寡核苷酸引子對包含一第一引子與一第二引子，該寡核

列的二互補股的5'端；提供一聚合酶；在一容器中混合該樣本、該寡核苷酸引子對、該聚合酶、去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphates, dATPs)、去氧胞核苷三磷酸(deoxycytidine triphosphates, dCTPs)、去氧鳥苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphates, dGTPs)，以及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphates, dTTPs)，以形成一聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)混合物；透過在一固定溫度下加熱該容器的底部，使該PCR混合物進行熱對流聚合酶連鎖反應(convective polymerase chain reaction, cPCR)，以形成一PCR產物；以及偵測該PCR產物以辨識該雙股目標序列。

【0004】 在某些具體實施例中，該第一引子與該第二引子的序列組合選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 1與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4與SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7與SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 18，以及SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 19。

【0005】 在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一與該雙股目標序列的一區段互補的序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子，當該寡核苷酸探針未雜合於該雙股目標序列的該區段時，該螢光抑制分子大體上抑制該螢光分子，且當該寡核苷酸探針雜合於該雙股目標序列的該區段時，該螢光分子大體上未被抑制。

【0006】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 1所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 2所示。在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第1162至第1206個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 3所示。

【0007】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 4所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 5所示。在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第454至第503個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 6所示。

【0008】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 7所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 5所示。在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第454至第583個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列選自由下列所組成之群組：SEQ ID NO: 6以及SEQ ID NO: 8。

【0009】 在某些具體實施例中，該第一引子與該第二引子的序列組合選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11，以及SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 13。在

某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第403至第442個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 14所示。

**【0010】** 在某些具體實施例中，該第一引子的序列選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 9以及SEQ ID NO: 10，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 12所示。在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第403至第453個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 14所示。

**【0011】** 在某些具體實施例中，該第一引子與該第二引子的序列組合選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 18，以及SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 19。在某些具體實施例中，該聚合酶連鎖反應(PCR)混合物進一步包含一寡核苷酸探針，其序列為一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第156至第189個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 20所示。

**【0012】** 於一方面，本發明涉及一種用於偵測非洲豬瘟病毒(ASFV)的寡核苷酸對，包含一第一引子與一第二引子。

【0013】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 1所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 2所示。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第1162至第1206個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 3所示。

【0014】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 4所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 5所示。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第454至第503個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 6所示。

【0015】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列如SEQ ID NO: 7所示，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 5所示。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第454至第583個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列選自由下列所組成之群組：SEQ ID NO: 6以及SEQ ID NO: 8。



【0016】 在某些具體實施例中，該第一引子與該第二引子的序列組合選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11，以及SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 13。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第403至第442個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 14所示。

【0017】 在某些具體實施例中，該第一引子的序列選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 9以及SEQ ID NO: 10，該第二引子的序列如SEQ ID NO: 12所示。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第403至第453個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 14所示。

【0018】 在某些具體實施例中，該第一引子與該第二引子的序列組合選自包含以下之群組：SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 18，以及SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 19。在某些具體實施例中，該寡核苷酸對進一步包含一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一介

於該非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72完整基因序列 (GenBank accession No. MH713612)的第156至第189個核苷酸之間的13至30個鹼基對的寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子。在某些較佳具體實施例中，該寡核苷酸探針的序列如SEQ ID NO: 20所示。

### 【圖式簡單說明】

【0019】 圖1所示為使用引子ASFV-F1與ASFV-R1以及探針ASFV-P1進行即時PCR (real-time PCR)檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)的結果。

【0020】 圖2所示為使用引子ASFV-F2與ASFV-R2以及探針ASFV-P2進行即時PCR (real-time PCR)檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)的結果。

### 【實施方式】

【0021】 於一方面，本發明涉及一種非洲豬瘟病毒(ASFV)檢測方法。在某些具體實施例中，該方法為聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。在某些具體實施例中，該方法為反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。在某些具體實施例中，該方法為熱對流聚合酶連鎖反應(convective polymerase chain reaction, cPCR)。在某些具體實施例中，該方法為即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)。

【0022】 於一方面，本發明涉及一種非洲豬瘟病毒(ASFV)檢測方法，包含：提供一可能含有一非洲豬瘟病毒(ASFV)的一或多個核苷酸序列的樣本；

提供一寡核苷酸引子對，該寡核苷酸引子對包含一第一引子與一第二引子，該寡核苷酸引子對定義在該非洲豬瘟病毒(ASFV)的一或多個核苷酸序列上一雙股目標序列的二互補股的5'端；

提供一聚合酶；

在一容器中混合該樣本、該寡核苷酸引子對、該聚合酶、去氧腺苷三磷酸(dATPs)、去氧胞核苷三磷酸(dCTPs)、去氧鳥苷三磷酸(dGTPs)，以及去氧胸苷三磷酸(dTTPs)，以形成一聚合酶連鎖反應(PCR)混合物；

透過在一固定溫度下加熱該容器的底部，使該PCR混合物進行熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)，以形成一PCR產物；以及

偵測該PCR產物以辨識該雙股目標序列。

**【0023】** 於另一方面，本發明涉及一種非洲豬瘟病毒(ASFV)檢測方法，包含：

提供一可能含有一非洲豬瘟病毒(ASFV)的一或多個核苷酸序列的樣本；

提供一寡核苷酸引子對，該寡核苷酸引子對包含一第一引子與一第二引子，該寡核苷酸引子對定義在該非洲豬瘟病毒(ASFV)的一或多個核苷酸序列上一雙股目標序列的二互補股的5'端；

提供一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一與該雙股目標序列的一區段互補的序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子，當該寡核苷酸探針未雜合於該雙股目標序列的該區段時，該螢光抑制分子大體上抑制該螢光分子，且當該寡核苷酸探針雜合於該雙股目標序列的該區段時，該螢光分子大體上未被抑制；

提供一聚合酶；

在一容器中混合該樣本、該寡核苷酸引子對、該寡核苷酸探針、該聚合酶、去氧腺苷三磷酸(dATPs)、去氧胞核苷三磷酸(dCTPs)、去氧鳥苷三磷酸(dGTPs)，以及去氧胸苷三磷酸(dTTPs)，以形成一聚合酶連鎖反應(PCR)混合物；透過在一固定溫度下加熱該容器的底部，使該PCR混合物進行熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)，以形成一PCR產物；以及偵測該PCR產物以辨識該雙股目標序列。

【0024】於又一方面，本發明涉及一種用於偵測非洲豬瘟病毒(ASFV)的寡核苷酸對。

【0025】於再一方面，本發明涉及一種用於偵測非洲豬瘟病毒(ASFV)的寡核苷酸對與寡核苷酸探針。

【0026】應當進一步理解的是，在某些具體實施例中，本文揭露的寡核苷酸對及/或寡核苷酸探針可用於各種基礎PCR技術之變異，例如，但不限於，反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)、熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)、即時聚合酶連鎖反應(real-time PCR)、巢式聚合酶連鎖反應(nested PCR)，以及熱不對稱性交錯聚合酶連鎖反應(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)。

【0027】如本文所用，術語「熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)」是指一種聚合酶連鎖反應，其中，將一裝有一PCR樣品的管狀容器底部嵌入一穩定熱源中，並控制該PCR的參數，包括該PCR樣品的總體積、黏度、表面溫度，以及該管狀容器的內徑，使得該PCR樣品的底部到頂部的溫度梯度下降，誘導熱對流並且使得PCR樣品的變性、黏合、聚合在該管狀容器的不同區域中依序且重複發生。熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)的詳細描述請參見如美國專利號8,187,813，其以引用的方式將其整體併入本文。

【0028】如本文所用，術語「螢光分子」意指一物質或其一部份，其係能夠在可偵測的範圍內顯示螢光。如本文所用，術語「螢光抑制分子」意指一物質或其一部份，其係能夠抑制當由一光源激發時由該螢光分子所發射的螢光。在某些具體實施例中，術語「螢光分子」與「螢光抑制分子」為TaqMan™分析套組(Applied Biosystems Inc., 加州, 美國)的螢光分子與螢光抑制分子。TaqMan™分析套組的詳細描述請參見如，Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. (1991) 88:7276- 7280；美國專利號5,538,848、5,723,591、5,876,930，以及7,413,708皆以引用的方式將其整體併入本文。

【0029】該螢光分子的例子包括，但不限於，3-(ε-羧)-3'-乙基-5,5'-二甲基己羧花青(3-(ε-carboxypentyl)-3'-ethyl-5,5'-dimethyloxa-carbocyanine, CYA)、6-羧基螢光素(6-carboxyfluorescein, FAM)、5,6-羧基羅丹明-L LO (5,6-carboxyrhodamine-110, R110)、6羧基羅丹明-6G (6-carboxyrhodamine-6G, R6G)、*N',N',N',N'*-四甲基-6-羧基羅丹明 (*N',N',N',N'*-tetramethyl-6-carboxyrhodamine, TAMRA)、6-羧基-X-羅丹明 (6-carboxy-X-rhodamine, ROX)、2',4',5',7'-四氯4-7-二氯螢光素 (2',4',5',7'-tetrachloro-4-7-dichlorofluorescein, TET)、2',7-二甲氧基-4',5'-6羧基羅丹明(2',7-dimethoxy-4',5'-6 carboxyrhodamine, JOE)、6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯螢光素(6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein, HEX)、ALEXA螢光、Cy3螢光與Cy5螢光。該螢光抑制分子的例子包括，但不限於，4-(4'-二甲基氨基-苯偶氨基)苯甲酸(4-(4'-dimethylamino-phenylazo)-benzoic acid, Dabcyl)、黑洞螢光抑制劑1 (Black Hole Quencher 1, BHQ1)、黑洞螢光抑制劑2 (Black Hole Quencher 2, BHQ2)、黑洞螢光抑制劑3 (Black Hole Quencher 3, BHQ3)、二氫環吡咯並吡啶三

肽小溝結合物(dihydro cyclo pyrrolo indole tripeptide minor groove binder, MGB)、四甲基羅丹明(tetramethylrhodamine, TAMRA)。在某些具體實施例中，該螢光分子為6-羧基螢光素(FAM)，且該螢光抑制分子為二氫環吡咯並吡啶三肽小溝結合物(MGB)。在某些具體實施例中，該螢光分子為6-羧基螢光素(FAM)，且該螢光抑制分子為黑洞螢光抑制劑1 (BHQ1)。

**【0030】** 除非本文另有定義，否則用以與本文結合的科學與技術術語應具有本領域普通技術人員通常理解的含義。此外，除非上下文另有要求，單數術語應包括複數，並且複數術語應包括單數。本發明的方法與技術一般可根據本領域已知的常規方法進行。一般而言，本文所描述之用以連結以下技術的命名法，以及生物化學、酵素學、分子及細胞生物學、微生物學、遺傳學與蛋白質及核酸化學及雜合反應的技術皆為本領域已知且經常使用者。除非另有說明，本發明的方法與技術一般可根據本領域已知的常規方法進行，且被描述於在本說明書中被引用且討論的各種一般及更具體的參考文獻中。

**【0031】** 本發明進一步透過以下的實施例闡釋，其不應以任何方式被解釋為進一步的限縮。本申請案中引用的所有引用文件(包括參考文獻、核准的專利、公開的專利申請，以及一同在申請中的專利申請案)的整體內容，在此透過引用的方式明確地併入本案中。

### **【0032】 實施例**

#### **【0033】 實施例1 以傳統聚合酶連鎖反應檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)**

**【0034】** 非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72基因(GenBank accession No. MH713612)全長序列被插入一選殖載體中，該選殖載體可為，但不限於，pUC57、pGEM-T，以得到pASFV質體。

【0035】 進行傳統PCR所用的50  $\mu$ l PCR混合物含有： $10^6$  個拷貝數的 pASFV質體、0.01-2  $\mu$ M正向引子、0.01-2  $\mu$ M反向引子、0.2  $\mu$ M dNTP以及1.25U Taq DNA聚合酶。在一熱循環儀(例如，但不限於PC818, Astec Co. Ltd.，日本)中進行擴增反應，且包含一個變性的初始循環94°C持續3分鐘，以及35個循環的94°C 30秒、60°C 30秒以及72°C延展30秒。擴增的產物接著以15%聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel)在TAE緩衝液(40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA)中分析，並且以溴化乙錠(ethidium bromide)染色顯現。

【0036】 傳統PCR的結果如表1所示，各引子對擴增了各目標序列的正確大小的片段，而在負對照組中則無目標序列被擴增(結果未顯示)。該結果表明，各引子對可用於傳統PCR擴增反應以檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)的存在。

【表1】 各引子對進行傳統PCR的結果

正向引子	反向引子	合成片段大小(bp)
ASFV-F1 (SEQ ID NO: 1)	ASFV-R1 (SEQ ID NO: 2)	87
ASFV-F2 (SEQ ID NO: 4)	ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5)	92
ASFV-F3 (SEQ ID NO: 7)	ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5)	174
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9)	ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11)	81
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10)	ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11)	84
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9)	ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12)	90
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10)	ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12)	93
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9)	ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13)	81
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10)	ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13)	84
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15)	ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18)	81
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15)	ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19)	82
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16)	ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18)	82
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16)	ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19)	83

正向引子	反向引子	合成片段大小(bp)
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17)	ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18)	81
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17)	ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19)	82

**【0037】 實施例2 以熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)檢測非洲豬瘟病毒**

**(ASFV)**

**【0038】** 進行熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)所用的50  $\mu$ l PCR混合物含有：帶有非洲豬瘟病毒(ASFV)的p72基因全長序列的質體(pASFV質體，同實施例1)(分別為 $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  拷貝數)、0.01-2  $\mu$ M正向引子、0.01-2  $\mu$ M反向引子、0.01-2  $\mu$ M探針(各探針序列的5'端接合一螢光分子6-羧基螢光素(FAM)，且各探針序列的3'端接合一螢光抑制分子黑洞螢光抑制劑1 (BHQ1)或四甲基羅丹明(TAMRA))、0.2  $\mu$ M dNTP、1X cPCR緩衝液，以及1-5 U Taq DNA聚合酶。將PCR混合物加入一反應試管中，並置於一熱對流聚合酶連鎖反應(cPCR)儀中一段指定的時間(約30~45分鐘)。以該cPCR儀偵測每個樣本中的FAM螢光。重複上述cPCR分析試驗8次(n = 8)以評各估引子對與探針的敏感度。

**【0039】** 敏感度測試的結果如表2所示，各引子對及探針的組合皆可100%正確偵測到樣品中含有 $10^2$  拷貝數的pASFV質體，其敏感度可達 $10^2$  拷貝數。

**【表2】** 各引子對與探針組合的敏感度測試結果(n = 8)

引子對及探針的組合 陽性率%	負對 照組	pASFV 質體含量 (拷貝數)				
		$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$
ASFV-F1 (SEQ ID NO: 1)	0	100	100	100	100	100
ASFV-R1 (SEQ ID NO: 2)						
ASFV-P1 (SEQ ID NO: 3)						



引子對及探針的組合 陽性率%	負對 照組	pASFV 質體含量 (拷貝數)				
		10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
ASFV-F2 (SEQ ID NO: 4) ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5) ASFV-P2 (SEQ ID NO: 6)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F3 (SEQ ID NO: 7) ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5) ASFV-P3 (SEQ ID NO: 8)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	0	100	100	100	100	100
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100

引子對及探針的組合 陽性率%	負對 照組	pASFV 質體含量 (拷貝數)				
		10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	0	100	100	100	100	100

【0040】此外，以不同的豬病原菌基因質體(10<sup>6</sup> 拷貝數/μl)作為cPCR模板分析上述各引子對及探針組合的專一性。cPCR方法如上所述。專一性測試的結果如表3所示，各引子對及探針的組合皆可正確偵測到含有非洲豬瘟病毒(ASFV)的樣品，而偵測不到含有典型豬瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)、日本腦炎病毒(Japanese Encephalitis Virus, JEV)、豬繁殖與呼吸道症候群病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、A型豬流感病毒(Swine influenza A virus, SIV)、豬流行性下痢病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、豬環狀病毒第二型(Porcine

circovirus type 2, PCV2)、偽狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)的樣品。該結果顯示各引子對及探針組合具有專一性。

【表3】各引子對與探針組合的專一性測試結果

引子對及探針的組合	ASFV	CSFV	FMDV	JEV	PRRSV	SIV	PEDV	PCV2	PRV
ASFV-F1 (SEQ ID NO: 1) ASFV-R1 (SEQ ID NO: 2) ASFV-P1 (SEQ ID NO: 3)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F2 (SEQ ID NO: 4) ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5) ASFV-P2 (SEQ ID NO: 6)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F3 (SEQ ID NO: 7) ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5) ASFV-P3 (SEQ ID NO: 8)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R4 (SEQ ID NO: 11) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R5 (SEQ ID NO: 12) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F4 (SEQ ID NO: 9) ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-F5 (SEQ ID NO: 10) ASFV-R6 (SEQ ID NO: 13) ASFV-P4 (SEQ ID NO: 14)	+	—	—	—	—	—	—	—	—

引子對及探針的組合	ASFV	CSFV	FMDV	JEV	PRRSV	SIV	PEDV	PCV2	PRV
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-dF7 (SEQ ID NO: 15) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-dF8 (SEQ ID NO: 16) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17) ASFV-dR7 (SEQ ID NO: 18) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—
ASFV-dF9 (SEQ ID NO: 17) ASFV-dR8 (SEQ ID NO: 19) ASFV-P7 (SEQ ID NO: 20)	+	—	—	—	—	—	—	—	—

“+”表示在該樣本中偵測到螢光訊號，而“—”表示在該樣本中未偵測到螢光訊號。

### 【0041】 實施例3 以即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR, qPCR) 檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)

【0042】 以稀釋的pASFV質體(分別為 $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ 個拷貝數)於一即時PCR儀(例如，但不限於ABI StepOnePlus™; Applied BioSystem, Life Technologies，加州，美國)中進行即時PCR分析。以含有2  $\mu$ l pASFV質體、0.01-2  $\mu$ M正向引子ASFV-F1 (SEQ ID NO: 1)、0.01-2  $\mu$ M反向引子ASFV-R1 (SEQ ID NO: 2)、0.01-2  $\mu$ M探針ASFV-P1 (5' FAM-

CACAAGCCGCACCAAAGCAAACCT -BHQ1 3', SEQ ID NO: 3)總體積為20  $\mu$ l的商用RT-PCR套組(例如,但不限於, OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit; Takara Bio Inc., 日本)進行即時PCR分析。即時PCR的程序為42°C 5分鐘、94°C 10秒,以及40個循環的94°C 10秒以及60°C 30分鐘。在60°C的步驟中記錄螢光測量的結果。

【0043】如圖1所示,計算連續稀釋(10倍)的pASFV質體的即時PCR分析的標準曲線。1個拷貝數的pASFV質體可被偵測到。該標準曲線的 $R^2$ 值為0.99812,表示本發明的引子對與探針可以被用於即時PCR,並產生可信的結果。

【0044】此外,以另一組引子對及探針進行即時PCR分析。以含有2  $\mu$ l pASFV質體(分別為 $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ 個拷貝數)、0.01-2  $\mu$ M正向引子ASFV-F2 (SEQ ID NO: 4)、0.01-2  $\mu$ M反向引子ASFV-R2 (SEQ ID NO: 5)、0.01-2  $\mu$ M探針ASFV-P2 (5' FAM- TCCTCATCAACACCGAGATTGGCACA -BHQ1 3', SEQ ID NO: 6)總體積為20  $\mu$ l的商用RT-PCR套組(例如,但不限於, OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit; Takara Bio Inc., 日本)進行即時PCR分析。即時PCR的程序為42°C 5分鐘、94°C 10秒,以及40個循環的94°C 10秒以及60°C 30分鐘。在60°C的步驟中記錄螢光測量的結果。

【0045】如圖2所示,計算連續稀釋(10倍)的pASFV質體的即時PCR分析的標準曲線。至少10個拷貝數的pASFV質體可被偵測到。該標準曲線的 $R^2$ 值為0.9998,表示本發明的引子對與探針可以被用於即時PCR,並產生可信的結果。

【0046】由實施例1-3結果表明,本發明的引子對與探針可用於不同的聚合酶連鎖反應,包括傳統PCR、cPCR、qPCR等,以檢測非洲豬瘟病毒(ASFV)的存在,並且具有高度敏感度及專一性。

【0047】 上列詳細說明係針對本發明之一可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

【0048】 綜上所述，本案所揭露之技術特徵已充分符合新穎性及進步性之法定發明專利要件，爰依法提出申請，懇請 貴局核准本件發明專利申請案，以勵發明，至感德便。

## 序列表

<110> 福又達生物科技股份有限公司  
 <120> 非洲豬瘟病毒檢測方法  
 <130> P19-0191  
 <160> 20  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子  
 <400> 1  
 ggccctctcc tatgcaacat t 21  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子  
 <400> 2  
 cgttcgctgc gtatcatttt c 21  
 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 探針  
 <400> 3  
 cacaagccgc accaaagcaa acct 24  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子  
 <400> 4  
 cctggaacat ctccgatcaa a 21  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 引子  
 <400> 5  
 gtggtgagtg ggctgcataa t 21

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探針

<400> 6  
 tcctcatcaa caccgagatt ggcaca 26

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 7  
 accaacaata accaccacga tga 23

<210> 8  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探針

<400> 8  
 ccgatcaaaa tcctcatcaa caccgaga 28

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 9  
 gaacatgcgt ctggaagagc 20

<210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 10  
 gatgaacatg cgtctggaag ag 22

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 11  
 tgттаacgcc attatgcagc 20



<210> 12  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 12  
 cggacatggtt gttaacgcc

19

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<400> 13  
 tgtaacgcc attatgcagc c

21

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探針

<400> 14  
 atctctatcc tgaagct

18

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> y為t, u,或c

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> y為t, u,或c

<400> 15  
 gygcgatgat gattacctty

20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> y為t, u,或c

<400> 16  
 ggygcatga tgattacctt

20

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> y為t, u,或c

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> y為t, u,或c

<400> 17  
 ygcgatgatg attaccttyg

20

<210> 18  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> r為g或a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> r為g或a

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (26)..(26)  
 <223> r為g或a

<400> 18  
 ctcttgctct rgatacrtta atatgrcc

28

<210> 19  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引子

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)

<223> r為g或a

<400> 19

tctcttgctc trgatacgtt aatatgacc

29

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探針

<400> 20

ccacgggagg aataccaacc cagtg

25

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種用於偵測非洲豬瘟病毒的寡核苷酸對及探針，包含一第一引子、一第二引子，以及一寡核苷酸探針，該寡核苷酸探針包含一寡核苷酸序列、一附加於該寡核苷酸探針上的一第一位置的螢光分子，以及一附加於該寡核苷酸探針上的一第二位置的螢光抑制分子；

該第一引子與該第二引子的序列組合選自由下列所組成之群組：SEQ ID NO: 1與SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4與SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7與SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 18，以及SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 19；

其中

當該第一引子與該第二引子的序列組合為SEQ ID NO: 1與SEQ ID NO: 2時，該寡核苷酸序列如SEQ ID NO: 3所示；

當該第一引子與該第二引子的序列組合為SEQ ID NO: 4與SEQ ID NO: 5時，該寡核苷酸序列如SEQ ID NO: 6所示；

當該第一引子與該第二引子的序列組合為SEQ ID NO: 7與SEQ ID NO: 5時，該寡核苷酸序列選自由SEQ ID NO: 6以及SEQ ID NO: 8所組成之群組；

當該第一引子與該第二引子的序列組合選自由下列所組成之群組：SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 9與SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 9與SEQ ID

NO: 13、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 12，以及SEQ ID NO: 10與SEQ ID NO: 13時，該寡核苷酸序列如SEQ ID NO: 14所示；以及

當該第一引子與該第二引子的序列組合選自由下列所組成之群組：SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 15與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 16與SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 18，以及SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 19時，該寡核苷酸序列如SEQ ID NO: 20所示。

【發明圖式】

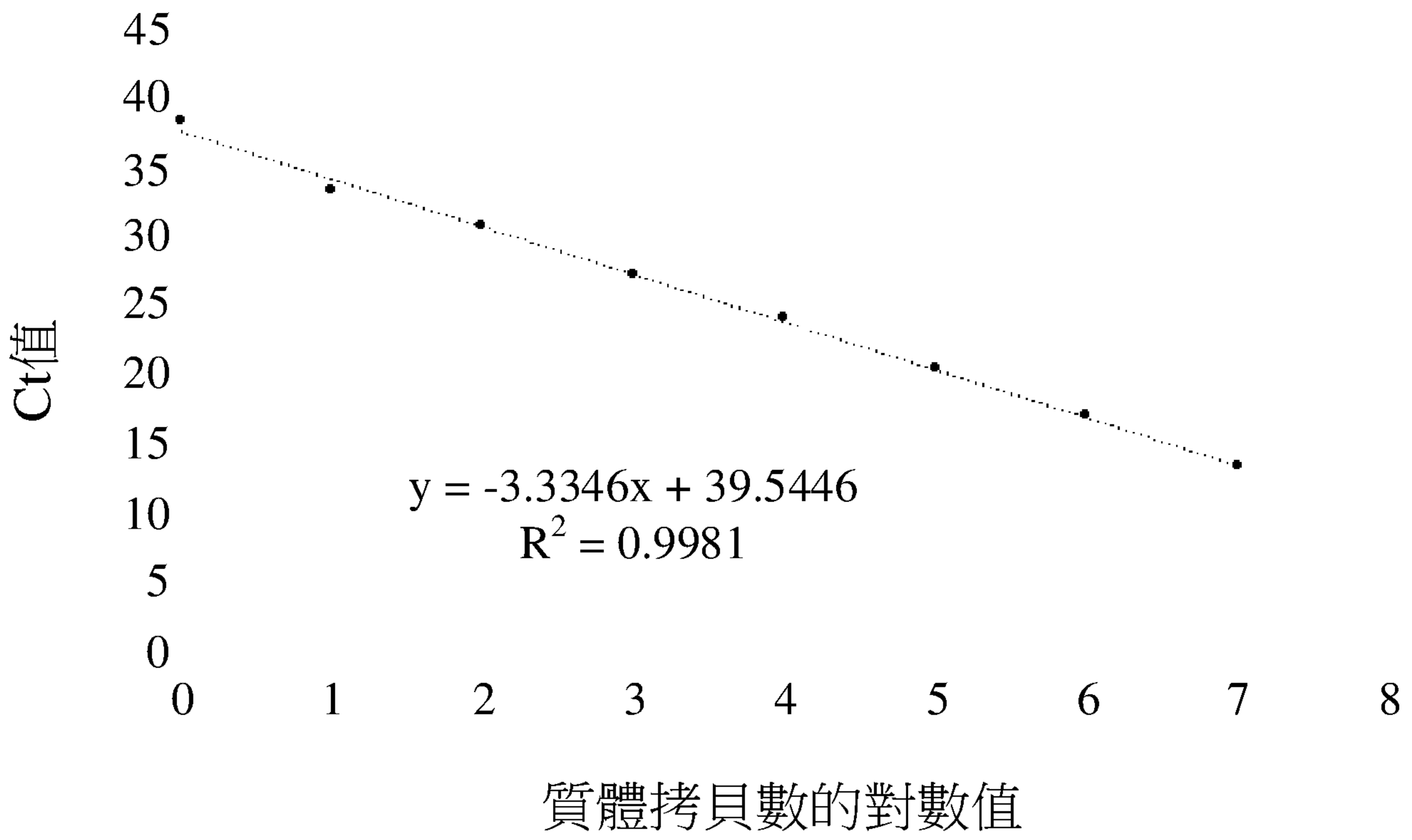


圖1

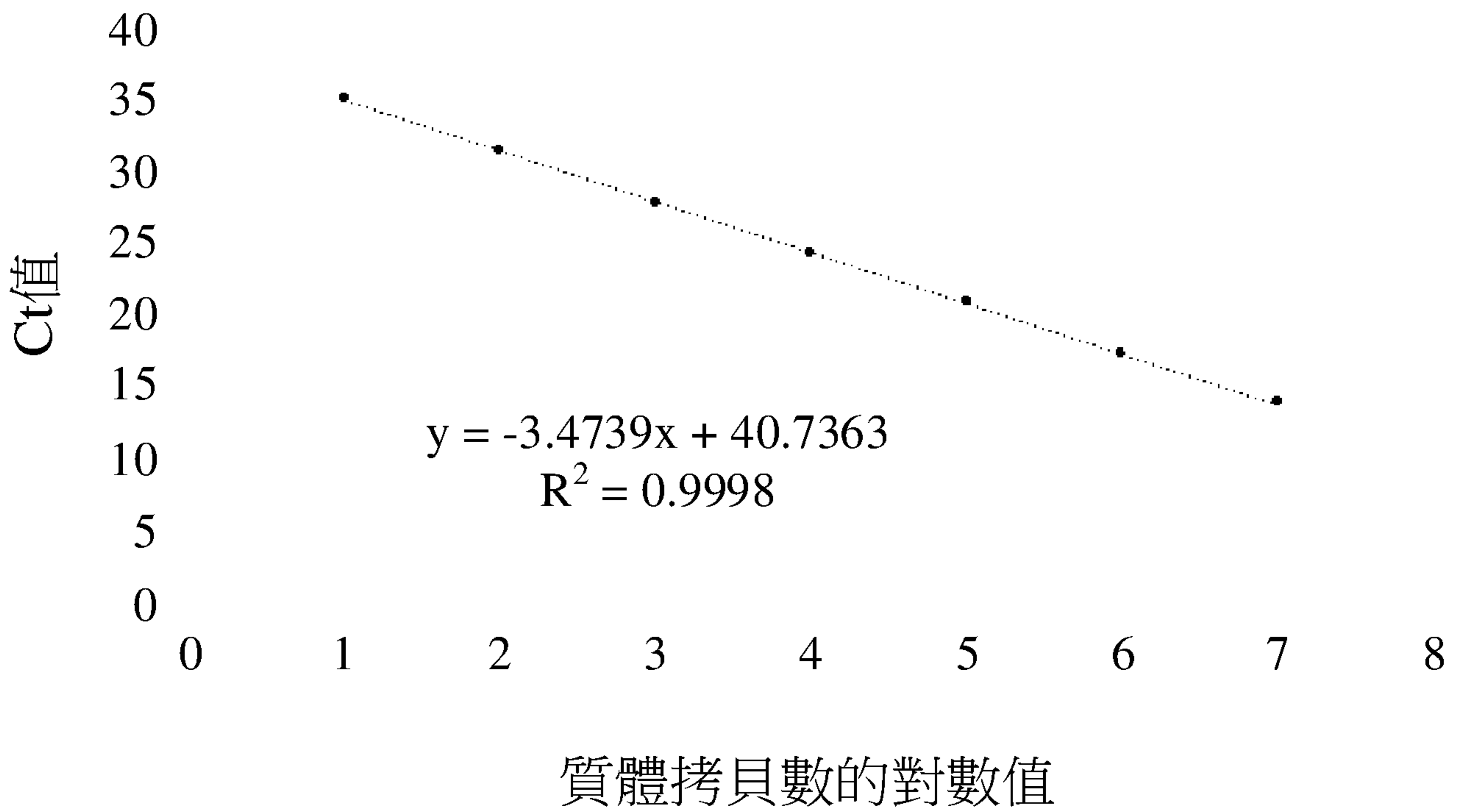


圖2