



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116875744 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 29

(21) 申请号 202311152326.1

CN 112094948 A, 2020.12.18

(22) 申请日 2023.09.08

CN 114774590 A, 2022.07.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 115707775 A, 2023.02.21

申请公布号 CN 116875744 A

WO 2023030246 A1, 2023.03.09

(43) 申请公布日 2023.10.13

Julia Joung et al..Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing.《The New England Journal of Medicine》.2020,第383卷(第15期),第1492-1494页.

(73) 专利权人 江西农业大学

地址 330045 江西省南昌市经开区志敏大道1101号

Max J. Kellner et al..SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases.《NATURE PROTOCOLS》.2019,第1-29页.

(72) 发明人 叶昱 江宁 唐玉新 黄冬艳

Feng Zhang et al..A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics.2020,第1-8页.

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 宋春雨

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12Q 1/6804 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12R 1/93 (2006.01)

Heather E. James et al..Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification.《Journal of Virological Methods》.2009,第164卷69页右栏第2.3节、第70-71页第3.1节.

(56) 对比文件

CN 110093457 A, 2019.08.06

CN 112522444 A, 2021.03.19

CN 111235232 A, 2020.06.05

CN 110894557 A, 2020.03.20

潘兴等.CRISPR/Cas 系统在感染性疾病诊断中的应用进展.《国际检验医学杂志》.2023,第3.2节.

(续)

审查员 叶金金

权利要求书1页 说明书6页

序列表(电子公布) 附图6页

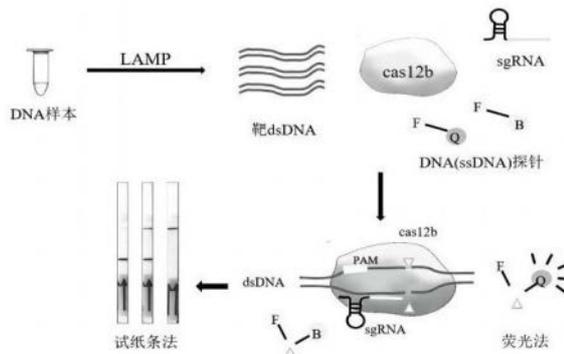
(54) 发明名称

一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒,并提供了相应的sgRNA如SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.5所示。所述试剂盒基于LAMP-CRISPR/Cas12b的技术,可恒温一管检测非洲猪瘟病毒,只需设定一个反应温度且中途不开盖,灵敏性和特异性均较高,对其他猪病无特异性,具有高效便捷、不依赖大型实验设备等优势。本发明较传统的荧光定量PCR法,灵敏度大幅提高,可以检测至1拷贝/ μ L。本发明是通过和胶体金试纸条检测

结合,可实现可视化检测。



CN 116875744 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

刘厚荣等.非洲猪瘟检测方法研究进展.《湖南畜牧兽医》.2022,(第4期),第48-51页.

Peter T. Mee et al..Field
Verification of an African Swine Fever

Virus Loop-Mediated Isothermal
Amplification (LAMP) Assay during an
Outbreak in Timor-Leste.《viruses》.2020,第
12卷第1-17页.

1. 一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒,其特征在于,包括:靶向非洲猪瘟病毒P1192R基因的sgRNA、针对非洲猪瘟病毒P1192R设计的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液;所述试剂盒还包括免疫胶体金试纸条;

所述sgRNA的核酸序列如:SEQ ID NO.2所示;

所述LAMP扩增引物序列如:SEQ ID NO.8-11所示;

所述反应缓冲液中含有MgSO₄、甜菜碱,所述MgSO₄的使用终浓度为6-12mM,所述甜菜碱的使用终浓度为0.1-0.8M;

所述免疫胶体金试纸条为侧向流动试纸条,其中结合垫中含有能与FAM特异性结合的金标抗体、检测线包被有可结合Bio的抗体、蛋白或者亲和素;质控线包被有可与FAM结合的抗体、蛋白或者亲和素。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述ssDNA探针序列如SEQ ID NO.7所示,为5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-Bio-3'。

3. 如权利要求1中所述试剂盒在以非诊断为目的检测非洲猪瘟病毒中的应用,其特征在于,将试剂盒中的sgRNA、试剂盒中的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液与待测模板混合,于55-60℃的温度范围内恒温下反应30min,然后将反应液加入免疫胶体金试纸条显色。

一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于核酸检测技术领域,尤其涉及一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒。

背景技术

[0002] 目前临床检测非洲猪瘟病毒主要通过荧光定量PCR,耗时且依赖大型仪器,等温扩增技术中LAMP虽然已经获批上市,灵敏度高但极易出现假阳性;虽然现有技术中存将LAMP等温扩增技术和CRISPR融合的检测方法以提高检测结果的准确性,但是目前,现有技术中LAMP等温扩增和CRISPR融合的检测仍然需要分步进行,如:在专利公开号为CN112359137A中公开的可视化病毒核酸RNA检测所用的RT-LAMP扩增体系中,仍然需要将扩增反应和切割反应分步进行,还是不够便捷。而常规的免疫胶体金试纸条可以可视化检测非洲猪瘟病毒,方便快捷,但存在灵敏度不够。因此,为了更好的应用于临床检测,仍然需要探究一种快速检测非洲猪瘟病毒的方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明基于LAMP-CRISPR/Cas12b的技术,提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种基于LAMP-CRISPR/Cas12b的检测非洲猪瘟病毒的试剂盒,包括:靶向非洲猪瘟病毒P1192R基因的sgRNA、针对非洲猪瘟病毒P1192R设计的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液;

[0006] 所述sgRNA的核酸序列如:SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.5中任意一项所示。

[0007] 所述反应缓冲液中含有MgSO₄、甜菜碱。

[0008] 优选的,所述MgSO₄的使用终浓度为6-12mM。

[0009] 优选的,所述甜菜碱的使用终浓度为0.1-0.8M。

[0010] 可选的,所述ssDNA探针序列如SEQ ID NO.7所示,探针为5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-BHQ1-3'。

[0011] 上述试剂盒在以非诊断为目的检测非洲猪瘟病毒中的应用,将试剂盒中的sgRNA、LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液与待测模板混合,于55-60°C的温度范围内恒温下反应30min,通过荧光读取设备读取反应结果。

[0012] 进一步的,上述试剂盒还包括免疫胶体金试纸条;所述ssDNA探针序列如SEQ ID NO.7所示,探针为5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-Bio-3'。

[0013] 所述免疫胶体金试纸条为侧向流动试纸条,其中结合垫中含有能与FAM特异性结合的金标抗体、检测线包被有可结合Bio的抗体、蛋白或者亲和素;质控线包被有可与FAM结合的抗体、蛋白或者亲和素。

[0014] 上述试剂盒在以非诊断为目的检测非洲猪瘟病毒中的应用,将试剂盒中的sgRNA、试剂盒中的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液与待测模板

混合,于55-60℃的温度范围内恒温下反应30min,然后将反应液加入免疫胶体金试纸条显色。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] (1)本发明提供一种靶向非洲猪瘟病毒P1192R基因的sgRNA,对靶序列有着极强附带切割活性。

[0017] (2)本发明首次采用LAMP结合CRISPR/Cas12b技术恒温一管检测非洲猪瘟病毒,只需设定一个反应温度且中途不开盖,灵敏性和特异性均较高,对其他猪病无特异性,具有高效便捷、不依赖大型实验设备等优势。

[0018] (3)本发明较传统的荧光定量PCR法,灵敏度大幅提高,可以检测至1拷贝/ μL 。

[0019] (4)本发明还提供了一种可视化的胶体金试纸检测试剂盒,方便用于基层实验室和养殖企业对非洲猪瘟的基层疫情监测和鉴定诊断。

附图说明

[0020] 图1:不同ASFV P1192R sgRNA附带切割活性。

[0021] 图2:不同 MgSO_4 浓度下附带切割活性。

[0022] 图3:不同 MgSO_4 浓度下添加甜菜碱的模板DNA酶切。

[0023] 图4:一步法核酸检测sgRNA切割活性。

[0024] 图5:不同拷贝数质粒模板一步法核酸检测结果。

[0025] 图6:一步法核酸检测法特异性评估结果。

[0026] 图7:临床血清样本qPCR检测。

[0027] 图8:临床阳性(P)和阴性(N)血清样本一步法核酸检测结果。

[0028] 图9:一步法核酸检测与免疫胶体金试纸条融合后检测原理流程图。

具体实施方式

[0029] 针对非洲猪瘟病毒的P1192R基因片段,寻找包含Cas12b识别序列(PAM)5'-TTN的靶向序列,设计20bp长度的sgRNA,分别命名为ASFV P1192R sgRNA P1、ASFV P1192R sgRNA PA、ASFV P1192R sgRNA PB、ASFV P1192R sgRNA PC、ASFV P1192R sgRNA PD(下文简写为P1、PA、PB、PC、PD),分别对应的核酸序列为SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.5。

[0030] 本发明基于LAMP-CRISPR/Cas12b的技术,提供一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒,包括:靶向非洲猪瘟病毒P1192R基因的sgRNA、针对非洲猪瘟病毒P1192R设计的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液;

[0031] 所述sgRNA的核酸序列如:SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.5中任意一项所示。

[0032] 针对流行毒株ASFV I型和II型P1192R基因,通过序列比对,确定SNP位点,再通过<http://primerexplorer.jp/e/>在线网页设计筛选合适的引物。

[0033] 优选的,LAMP引物组SET1的序列如SEQ ID NO.8-SEQ ID NO.11所示,见表1。

[0034] 表1 LAMP引物序列

分组	引物名称	序列5' → 3'	序列号
[0035]	F3	AGGCTTACAAGCTGGATGC	SEQ ID NO.8
	B3	AGGAGCCYGGGTAATACTGG	SEQ ID NO.9
	FIP	GCTAAAATTTTGCGCCGCGC-CCATCGAGCGGCAGATTCC	SEQ ID NO.10
	BIP	AAGGTTTTTCAGTTCGGGGGCT-TGTTTAAACGACATGTCGCCA	SEQ ID NO.11

[0036] 上述反应缓冲液中含有MgSO₄、甜菜碱。

[0037] 优选的,MgSO₄的使用终浓度为6-12mM,更优的,MgSO₄的使用终浓度为8mM。

[0038] 优选的,甜菜碱的使用终浓度为0.1-0.8M,更优的,甜菜碱的使用终浓度为0.5M。

[0039] 上述试剂盒中可选的ssDNA探针序列如SEQ ID NO.7所示,ssDNA探针为5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-BHQ1-3'。

[0040] 上述试剂盒的使用方法为将试剂盒中的sgRNA、LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液与待测模板混合,于55-60℃的温度范围内恒温下反应30min,通过荧光读取设备读取反应结果。

[0041] 可选的,上述试剂盒中还包括免疫胶体金试纸条;ssDNA探针序列如SEQ ID NO.7所示,ssDNA探针为5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-Bio-3'。

[0042] 上述免疫胶体金试纸条为侧向流动试纸条,其中结合垫中含有能与FAM特异性结合的金标抗体、检测线包被有可结合Bio的抗体、蛋白或者亲和素;质控线包被有可与FAM结合的抗体、蛋白或者亲和素。

[0043] 试剂盒的使用方法为将试剂盒中的sgRNA、试剂盒中的LAMP扩增引物、AapCas12b、ssDNA探针、Bst2.0聚合酶和反应缓冲液与待测模板混合,于55-60℃的温度范围内恒温下反应30min,然后将反应液加入免疫胶体金试纸条显色。

[0044] 本发明构建的一步法核酸检测与免疫胶体金试纸条融合后检测原理如图9所示,LAMP与Cas12b切割一步同时反应,通过等温扩增与探针切割两次放大检测信号,实现对低丰度非洲猪瘟核酸的检测,既可以采用荧光法收集信号强度判定,又可以直接可视化观察试纸条的条带变化,快速精准诊断非洲猪瘟。

[0045] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料组分均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0046] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0047] 实施例1

[0048] sgRNA切割效率验证:

[0049] 根据序列SEQ ID NO.1-SEQ ID NO.5合成后进行磷酸化退火,构建sgRNA质粒,EcoRI单酶切线性化后,采用苯酚:氯仿提取纯化质粒模板DNA,通过T7启动子进行体外转录,获得sgRNA。直接合成P1152序列中651bp序列如SEQ ID NO.6所示,再直接与pUC57载体连接形成以pUC57-ASFV-P1192R质粒,设计针对ASFV P1192R靶标DNA片段的引物并扩增,200ng回收纯化的靶标DNA片段与250nM Aapcas12b蛋白、250nM ssDNA探针及制备的200nM

sgRNA混合,置于ABI 7500荧光定量PCR仪恒温60℃反应2h,每2min检测一次荧光,验证切割效率。

[0050] P1192R序列如SEQ ID NO.6所示。

[0051] 结果如图1所示,NTC代表阴性样本,PM代表阳性样本,15、30、45和60分别代表4个不同时间段(15-60 min),P1、PA、PB、PC和PD代表不同sgRNA,可见sgRNA PA表现出了极强附带切割活性,切割效率随时间提高。

[0052] 实施例2

[0053] 不同MgSO₄浓度下切割效率的研究:

[0054] 根据实施例1中的操作方式,探究不同sgRNA在6-12mM的MgSO₄情况下sgRNA的切割活性。以扩增的靶标DNA片段的回收产物作为模板,在含2mM MgSO₄的LAMP缓冲液体系中额外加入不同浓度的MgSO₄,将反应体系MgSO₄终浓度维持在6-12mM范围,通过ABI 7500荧光定量PCR仪检测荧光值,验证5条P1192R sgRNA与Aapcas12b对靶片段切割后激活的附带切割作用。

[0055] 结果如图2所示:P1、PA、PB、PC和PD代表不同sgRNA,不同MgSO₄浓度下,不同sgRNA最佳切割活性不同,PA最佳MgSO₄浓度在8mM,P1切割活性仅次于PA。

[0056] 实施例3

[0057] 在实施例2的基础上,以靶标DNA片段的回收产物作为模板,在含2mM MgSO₄的LAMP缓冲液体系中额外加入不同浓度的MgSO₄,将MgSO₄终浓度维持在8-14mM范围,同时不含ssDNA探针,而额外加0.1-0.8M的甜菜碱,通过琼脂糖凝胶电泳,探究不同甜菜碱和MgSO₄浓度的sgRNA PA与Aapcas12b对靶片段的切割作用。

[0058] 结果如图3所示,a为不同MgSO₄浓度(8-14mM)切割情况;b为MgSO₄浓度8mM,添加不同浓度甜菜碱(0.1M-0.8M)切割情况;c为MgSO₄浓度10mM,添加不同浓度甜菜碱(0.1M-0.8M)切割情况;d为MgSO₄浓度12mM,添加不同浓度甜菜碱(0.1M-0.8M)切割情况;e为MgSO₄浓度14mM,添加不同浓度甜菜碱(0.1M-0.8M)切割情况。

[0059] 可以看出,在不同浓度MgSO₄体系中额外添加甜菜碱,结果发现甜菜碱具有一定的辅助切割作用,在8-10mM的MgSO₄存在的情况下,体系中额外加0.5M的甜菜碱可以将200ng浓度的模板完全切开。

[0060] 实施例4

[0061] 一步法核酸检测sgRNA切割活性:

[0062] 使用优化的LAMP反应体系:1×Isothermal Amplification Buffer、MgSO₄ 8mM、dNTP Mix 0.5mM、FIP/BIP Primers 0.64μM、F3/B3 Primers 0.16μM、Bst 2.0 DNA Polymerase 320U/mL、甜菜碱 0.5M、sgRNA 200nM、Aapcas12b 250nM、ssDNA探针 250nM和200ng浓度的模板。

[0063] ssDNA探针为:5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-BHQ1-3'。

[0064] LAMP引物组使用SET1;

[0065] 以pUC57-ASFV-P1192R质粒作为阳性对照;

[0066] 以ddH₂O作为阴性对照。

[0067] 等温扩增反应总体积20μL,混合均匀后,置于ABI 7500荧光定量PCR仪恒温60℃反应2h,每2min检测一次荧光。

[0068] 结果如图4所示,上图表示不同sgRNA阳性结果图;下图表示不同sgRNA阴性结果图。由此可见,P1、PA、PB、PD切割反应良好,显示出了不同程度的切割效率,其中PA切割活性最高;而PC对阴性对照扩增切割反应也出现了荧光值,在单纯对片段的荧光切割中并没有出现,与靶向LAMP引物有关,后续排除PC。

[0069] 实施例5

[0070] 在实施例4的LAMP反应体系的基础上,使用sgRNA-PA,探究不同拷贝数的模板情况下的检测情况,以pUC57-ASFV-P1192R质粒作为模板,计算质粒拷贝数,进行10倍梯度稀释,获得每微升含有 10^{10} - 10^0 拷贝数(copy/ μL)质粒。将 $1\mu\text{L}$ 梯度稀释质粒模板添加到反应体系,只选择切割效率最高的PA作为crRNA, $20\mu\text{L}$ 总体系置于ABI 7500荧光定量PCR仪恒温 60°C 反应2h,每2min检测一次荧光。

[0071] 结果如图5所示,对于不同拷贝数的模板其附带切割活性荧光值呈现预期的梯度扩增,而用水作为模板的阴性对照结果显示整个反应过程无扩增也无切割反应,最低检测限可达1个拷贝/ μL 。

[0072] 实施例6

[0073] 特异性检测测试:

[0074] 在实施例4的LAMP反应体系的基础上,使用sgRNA-PA探究不同病毒模板情况下的检测情况,使用常见的猪病毒性病原(PEDV、PADV3、SPV、PRV、PCV3和CSFV)核酸作为模板,以pUC57-ASFV-P1192R质粒作为阳性对照,加入优化的 $20\mu\text{L}$ 一步法反应体系,置于ABI 7500荧光定量PCR仪恒温 60°C 反应2h,每2min检测一次荧光。

[0075] 结果如图6所示,PEDV为猪流行性腹泻,PRV为伪狂犬病毒,SPV为猪痘病毒,PADV3为猪3型腺病毒,PCV3为猪圆环病毒3型,CSFV为猪瘟病毒,可已看出使用其他猪病原体作为模板进行验证,发现其结果如水作为模板的阴性结果,无扩增曲线出现,说明本申请检测方法特异性强。

[0076] 实施例7

[0077] 临床样本检测:

[0078] 临床样本检测由华南农业大学非洲猪瘟防控技术研究中心完成,包括ASFV感染生猪养殖场采集的70份血清样品。包括50份阳性样本和20份阴性样本。使用PBS煮沸法处理ASFV临床血清样本,具体操作如下: $50\mu\text{L}$ 血清用 $200\mu\text{L}$ PBS预混后煮沸10min,12000rpm,离心5min,保留上清液分装保存至 -20°C 。qPCR参照GB/T 18648-2020,主要是针对ASFV p72 (B646L)基因的荧光PCR方法。每个样品做3个重复,加入模板后,密封qPCR 96孔板,瞬时离心。将反应板放置ABI 7500荧光定量PCR中,分析收集的荧光信号。同时,采用实施例4的LAMP反应体系与筛选出的具有较高切割活性的sgRNA PA,通过融合一管恒温 60°C 反应40个循环,每2min一循环,置于ABI 7500荧光定量PCR仪评估荧光值。

[0079] 如图7所示为70份样品的qPCR检测Ct值;而使用优化的一步法核酸检测结果如图8所示,阳性血清样本荧光切割值在 10^3 - 10^6 ,阴性结果背景荧光值在 10^1 。50份阳性样本和20份阴性样本的荧光检测结果与荧光定量PCR检测结果完全一致(表2),说明该方法能够适用于临床诊断。

[0080] 表2 临床样本qPCR与一步法核酸检测符合度

一步法核酸检测	qPCR 临床血清样本检测				
		阳	阴	总计	预测值
[0081]	阳	50(真阳)	0(假阳)	50	PPV=100%
	阴	0(假阴)	20(真阴)	20	NPV=100%
	总计	50	20	70	
		灵敏度 100%	灵敏度 100%		

[0082] 实施例8

[0083] 一步法核酸检测与免疫胶体金试纸条结合肉眼可视化检测:

[0084] 使用实施例4中的扩增体系:1×Isothermal Amplification Buffer、MgSO₄ 8mM、dNTP Mix 0.5mM、FIP/BIP Primers 0.64μM、F3/B3 Primers 0.16μM、Bst 2.0 DNA Polymerase 320U/mL、甜菜碱 0.5M、sgRNA 200nM、Aapcas12b 250nM、ssDNA探针 250nM。

[0085] ssDNA探针为:5'-6-FAM-TTTTTTTTTTTT-Bio-3'。

[0086] 阳性样品为:实施例7中50份阳性样本其中部分;

[0087] 阴性样品为:实施例7中20份阴性样本其中部分;

[0088] 等温扩增程序与实施例相同,置于恒温金属浴中60℃反应40min。

[0089] 免疫胶体金试纸条为Milenia Biotec公司的HybriDetect (货号:MGHD1)。

[0090] 扩增结束后不使用荧光切割检测,通过HybriDetect assay buffer与反应液按照4:1比例进行稀释后,吸取20μL混合液滴入样本垫一侧,待10min后直接通过肉眼可视化判定阳性与阴性结果(本申请试纸设置与常规不同,靠近加样端的设置为C线,远离加样端的设置为T线),结果显示:试纸条经过约10min反应后,可以观察到阳性样品呈现两条明显条带,分别代表参照线(C线)和检测线(T线),而阴性样品只有C线出现条带。

[0091] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

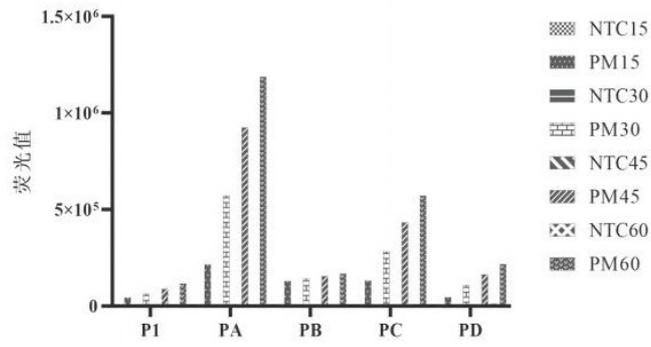


图 1

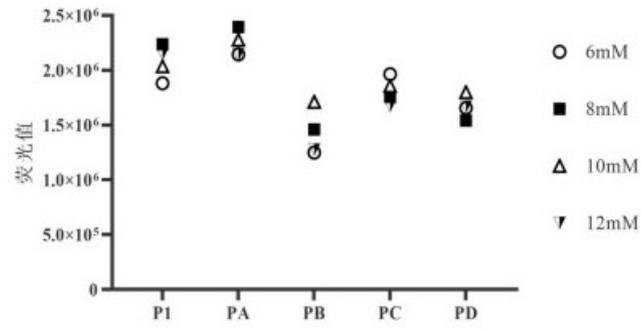


图 2

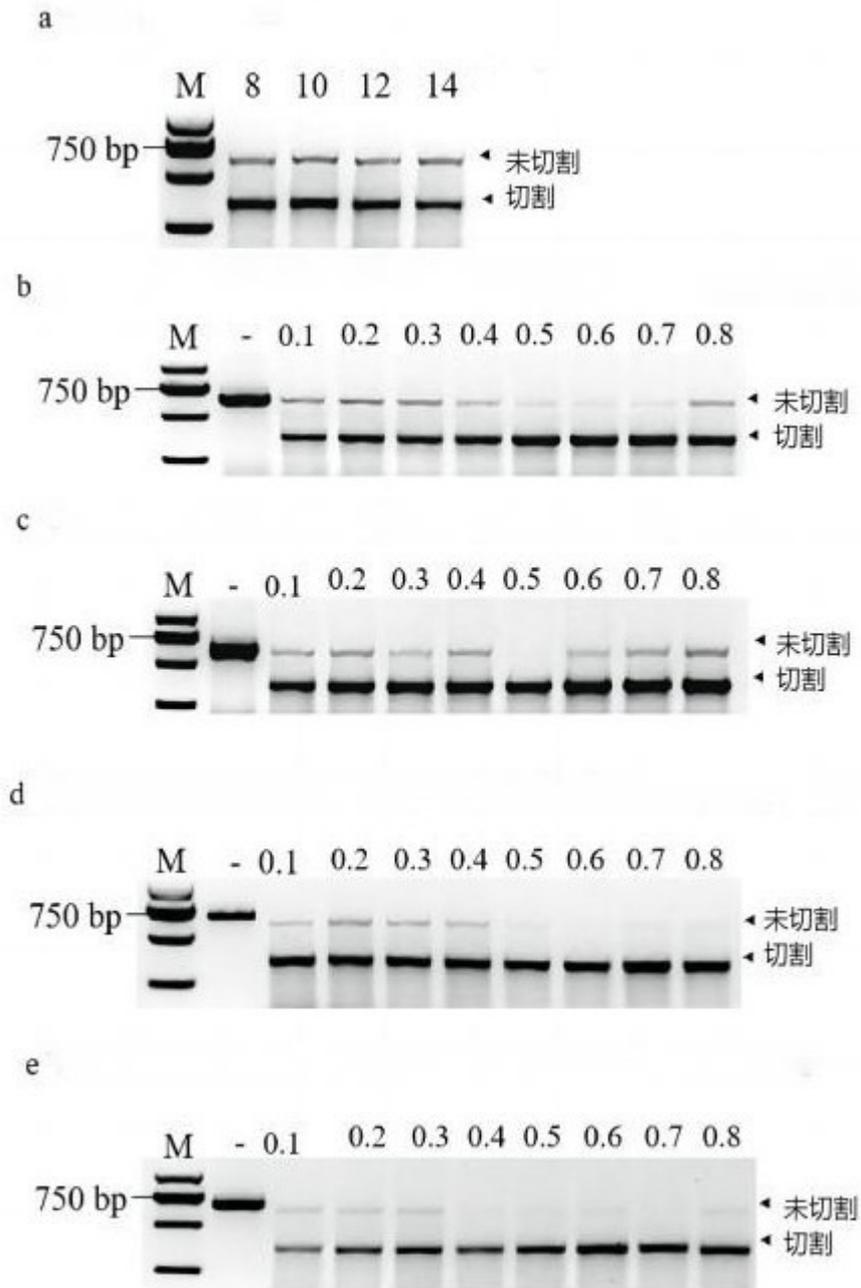


图 3

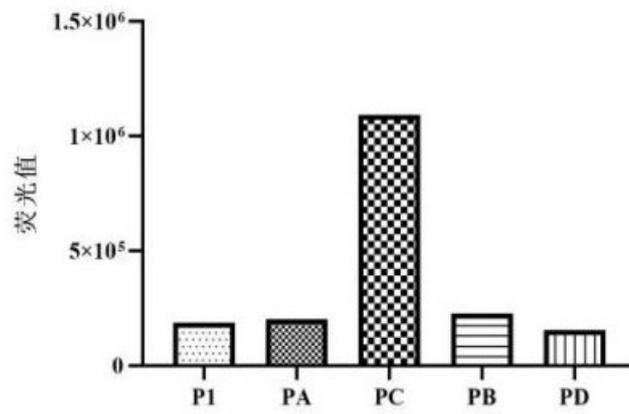
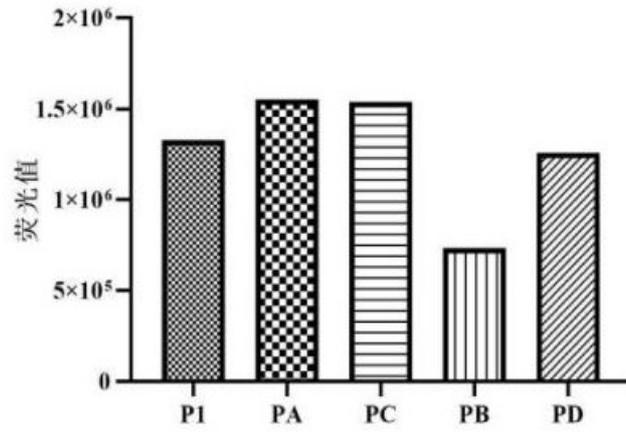


图 4

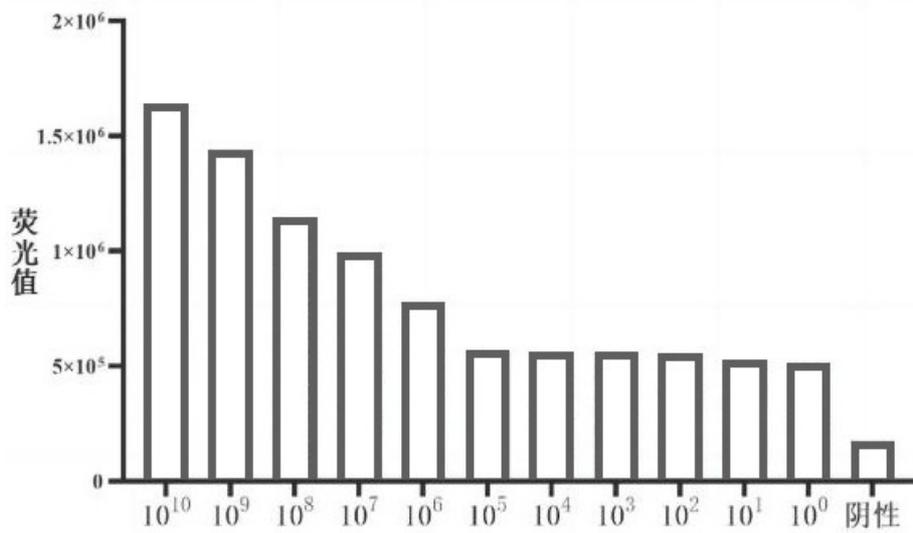


图 5

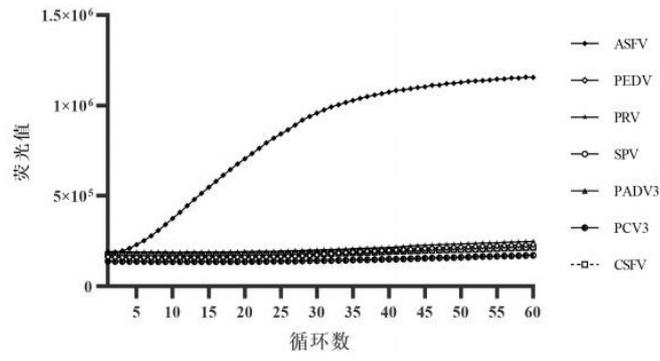


图 6

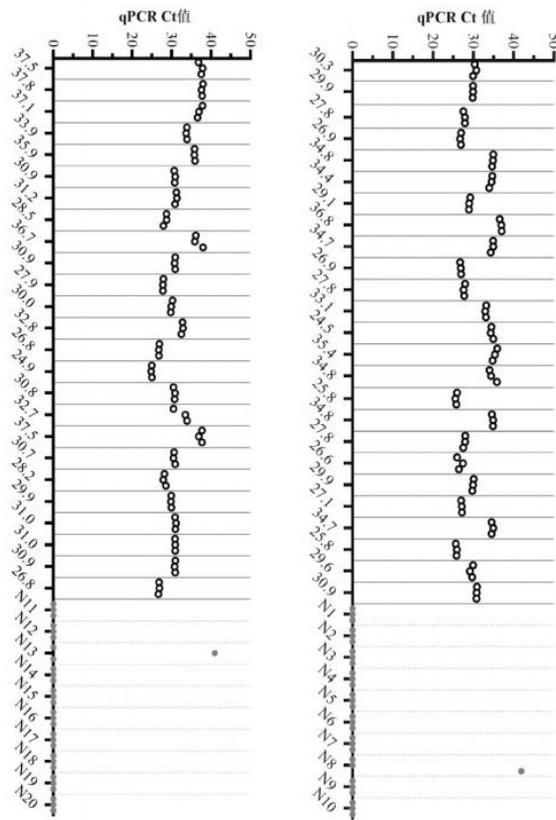


图 7

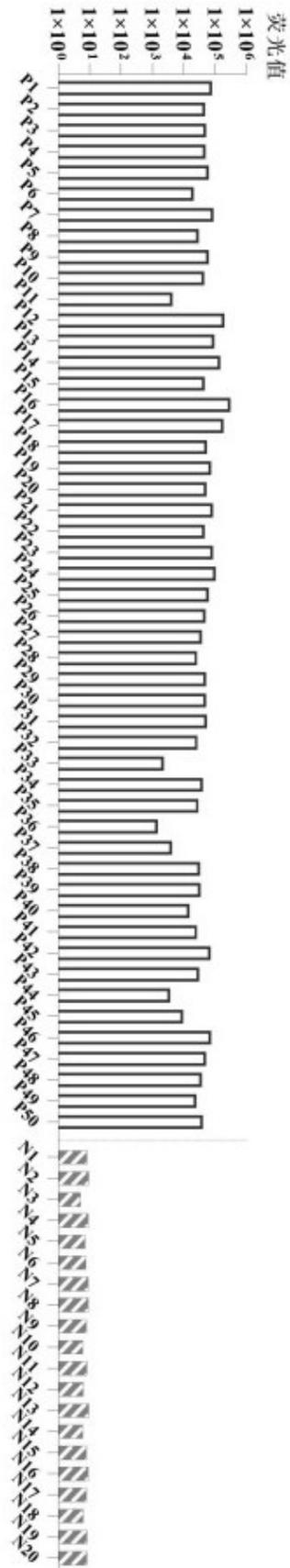


图 8

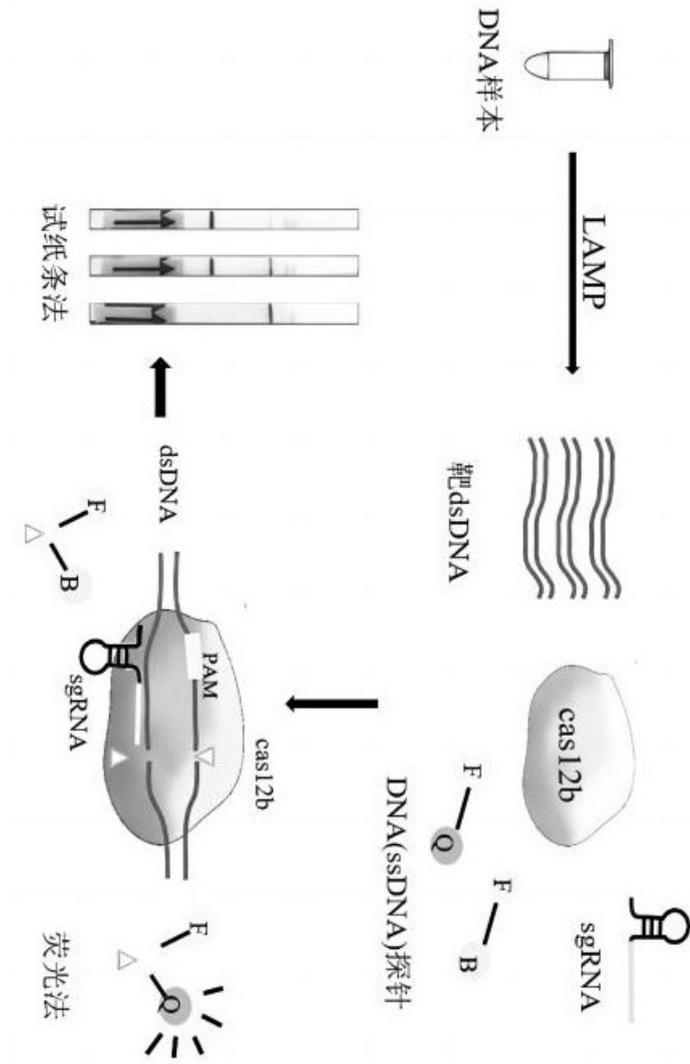


图 9