



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105018593 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510183810. X

(22) 申请日 2015. 04. 17

(30) 优先权数据

61/981, 311 2014. 04. 18 US

(71) 申请人 富创蓝图有限公司

地址 中国台湾台北市内湖区内湖路一段
120 巷 16 号 4 楼

(72) 发明人 郭村勇 谢旺儒

(74) 专利代理机构 北京天平专利商标代理有限公司 11239

代理人 孙刚

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/70(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12R 1/93(2006. 01)

权利要求书4页 说明书20页

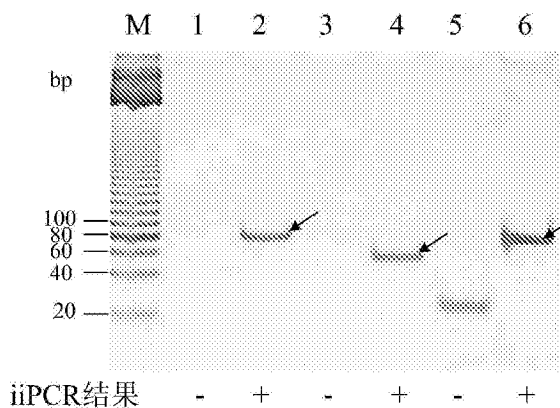
序列表11页 附图16页

(54) 发明名称

冷水鱼病原菌检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种冷水鱼病原菌检测方法。此外,本发明并涉及用于检测冷水鱼中病原菌的寡核苷酸对。



1. 一种冷水鱼病原菌检测方法,包含:

提供一可能含有在冷水鱼中的病原菌的一或多个核苷酸序列的样本;

提供一寡核苷酸引子对,所述寡核苷酸引子对定义在所述病原菌的一或多个核苷酸序列上一双股目标序列的二互补股的 5' 端;

提供一聚合酶;

在一容器中混合所述样本、所述寡核苷酸引子对、所述聚合酶、脱氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphates, dATPs)、脱氧胞核苷三磷酸 (deoxycytidine triphosphates, dCTPs)、脱氧鸟苷三磷酸 (deoxyguanosine triphosphates, dGTPs), 以及脱氧胸苷三磷酸 (deoxythymidine triphosphates, dTTPs), 以形成一聚合酶连锁反应 (polymerase chain reaction, PCR) 混合物;

透过在一固定温度下加热所述容器的底部,使所述 PCR 混合物进行隔绝恒温聚合酶连锁反应 (insulated isothermal polymerase chain reaction, iiPCR), 以形成一 PCR 产物;

侦测所述 PCR 产物以辨识所述双股目标序列。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*, 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:2 所示。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*, 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:23, 25 以及 27 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:24, 26 以及 28 所组成的群组。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV), 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:4, 30, 32, 33 以及 35 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:5, 31, 34 以及 36 所组成的群组。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV), 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:7 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:8 或 9 所示。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV), 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:11, 12 以及 13 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:14, 15 以及 16 所组成的群组。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述病原菌为感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV), 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NOs:18 或 19 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:20 或 21 所示。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一与所述双股目标序列的一区段互补的序列、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的

一第二位置的荧光抑制分子,当所述寡核苷酸探针未杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光抑制分子大体上抑制所述荧光分子,且当所述寡核苷酸探针杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光分子大体上未被抑制。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:2 所示,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因的第 136 至第 225 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:3 所示。

11. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:23, 25 以及 27 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:24, 26 以及 28 所组成的群组,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因的第 968 至第 1068 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:29 所示。

13. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:4, 30, 32, 33 以及 35 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:5, 31, 34 以及 36 所组成的群组,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 PRV 的 L1 区段基因的第 3178 至第 3287 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:6 或 37 所示。

15. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:7 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:8 或 9 所示,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 IPNV 的 A 区段基因的第 432 至第 519 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:10 所示。

17. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:11, 12 以及 13 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:14, 15 以及 16 所组成的群组,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 SAV 的完整基因组的第 446 至第 534 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

19. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述病原菌为感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NOs:18 或 19 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:20 或 21 所示,且所述寡核苷酸探针为一介于所述病原菌 ISAV 的非结构蛋白与基质蛋白的基因的

第 178 至第 305 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:22 或 38 所示。

21. 一种用于侦测冷水鱼病原菌的寡核苷酸对。

22. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:2 所示。

23. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因的第 136 至第 225 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

24. 如权利要求 23 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:3 所示。

25. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:23, 25 以及 27 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:24, 26 以及 28 所组成的群组。

26. 如权利要求 25 所述的寡核苷酸对,其中,进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因的第 968 至第 1068 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

27. 如权利要求 26 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:29 所示。

28. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为鱼呼吸道与肠道病毒 (*piscine reovirus, PRV*),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:4, 30, 32, 33 以及 35 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:5, 31, 34 以及 36 所组成的群组。

29. 如权利要求 28 所述的寡核苷酸对,其中,进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 PRV 的 L1 区段基因的第 3178 至第 3287 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

30. 如权利要求 29 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:6 或 37 所示。

31. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为感染性胰脏坏死病毒 (*infectious pancreatic necrosis virus, IPNV*),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:7 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:8 或 9 所示。

32. 如权利要求 31 所述的寡核苷酸对,其中,进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 IPNV 的 A 区段基因的第 432 至第 519 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

33. 如权利要求 32 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:10 所示。

34. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:11, 12 以及 13 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:14, 15 以及 16 所组成的群组。

35. 如权利要求 34 所述的寡核苷酸对,其中,进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 SAV 的完整基因组的第 446 至第 534 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

36. 如权利要求 35 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

37. 如权利要求 21 所述的寡核苷酸对,其中,所述病原菌为感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NOs:18 或 19 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:20 或 21 所示。

38. 如权利要求 37 所述的寡核苷酸对,其中,进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 ISAV 的非结构蛋白与基质蛋白的基因的第 178 至第 305 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。

39. 如权利要求 38 所述的寡核苷酸对,其中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:22 或 38 所示。

冷水鱼病原菌检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在冷水鱼中检测病原菌的方法,特别是涉及使用寡核苷酸对检测冷水鱼病原菌的方法。

背景技术

[0002] 冷水鱼的经济价值已达到数十亿美金,其中大西洋鲑鱼为最大的单一养殖种类,且其数量于2013年已超过150万吨。冷水鱼疾病可造成高达超过90%的死亡率,但一般较常见的死亡率为10-30%,这样的死亡率对于水产养殖业仍是巨大的负面经济因素,造成一年数亿美金的损失。这些疾病可能在生产周期的早期与晚期发生,其中发生在晚期对经济的冲击最大。

[0003] 解决上述问题的关键在于,诊断冷水鱼之病原菌且采取必要措施以避免高死亡率。由于冷水鱼养殖业通常分散在偏远的沿海地区,因此本发明即提供了快速、分散的冷水鱼病原菌检测方法以供产业利用。

发明内容

[0004] 于一方面,本发明涉及一种冷水鱼病原菌检测方法,包含提供一可能含有在冷水鱼中的病原菌的一或多个核苷酸序列的样本;提供一寡核苷酸引子对,所述寡核苷酸引子对定义在所述病原菌的一或多个核苷酸序列上一双股目标序列的二互补股的5'端;提供一聚合酶;在一容器中混合所述样本、所述寡核苷酸引子对、所述聚合酶、脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphates, dATPs)、脱氧胞核苷三磷酸(deoxycytidine triphosphates, dCTPs)、脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphates, dGTPs),以及脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphates, dTTPs),以形成一聚合酶连锁反应(polymerase chain reaction, PCR)混合物;透过在一固定温度下加热所述容器的底部,使所述PCR混合物进行隔绝恒温聚合酶连锁反应(insulated isothermal polymerase chain reaction, iiPCR),以形成一PCR产物;以及侦测所述PCR产物以辨识所述双股目标序列。

[0005] 在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应(PCR)混合物进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一与所述双股目标序列的一区段互补的序列、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子,当所述寡核苷酸探针未杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光抑制分子大体上抑制所述荧光分子,且当所述寡核苷酸探针杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光分子大体上未被抑制。

[0006] 在某些具体实施例中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*, 且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:2 所示。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应(PCR)混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的16S核糖体RNA基因(GenBank accession No. JQ723599)的

第 136 至第 225 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0007] 在某些具体实施例中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:23, 25 以及 27 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:24, 26 以及 28 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因 (GenBank accession No. JQ723599) 的第 968 至第 1068 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:29 所示。

[0008] 在某些具体实施例中,所述病原菌为鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:4, 30, 32, 33 以及 35 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:5, 31, 34 以及 36 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 PRV 的 L1 区段基因 (GenBank accession No. GU994013) 的第 3178 至第 3287 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:6 或 37 所示。

[0009] 在某些具体实施例中,所述病原菌为感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NO:7 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:8 或 9 所示。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 IPNV 的 A 区段基因 (GenBank accession No. AY379740) 的第 432 至第 519 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:10 所示。

[0010] 在某些具体实施例中,所述病原菌为鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:11, 12 以及 13 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:14, 15 以及 16 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 SAV 的完整基因组 (GenBank accession No. KC122926) 的第 446 至第 534 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

[0011] 在某些具体实施例中,所述病原菌为感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV),且所述寡核苷酸引子对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如 SEQ ID NOs:18 或 19 所示,所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:20 或 21 所示。在某些具体实施例中,所述聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物进一步包含一寡核苷酸探针,其为一介于所述病原菌 ISAV 的非结构蛋白与基质蛋白的基因 (GenBank accession No. DQ785286) 的第 178 至第 305 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:22 或 38 所示。

[0012] 于一方面,本发明涉及一种用于侦测冷水鱼病原菌的寡核苷酸对。

[0013] 在某些具体实施例中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如SEQ ID NO:1所示,所述第二引子的序列如SEQ ID NO:2所示。在某些具体实施例中,所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因 (GenBank accession No. JQ723599) 的第 136 至第 225 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:3 所示。

[0014] 在某些具体实施例中,所述病原菌为 *Candidatus Branchiomonas cysticola*,且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:23, 25 以及 27 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:24, 26 以及 28 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因 (GenBank accession No. JQ723599) 的第 968 至第 1068 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:29 所示。

[0015] 在某些具体实施例中,所述病原菌为鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:4, 30, 32, 33 以及 35 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:5, 31, 34 以及 36 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 PRV 的 L1 区段基因 (GenBank accession No. GU994013) 的第 3178 至第 3287 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:6 或 37 所示。

[0016] 在某些具体实施例中,所述病原菌为感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列如SEQ ID NO:7所示,所述第二引子的序列如SEQ ID NO:8或9所示。在某些具体实施例中,所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 IPNV 的 A 区段基因 (GenBank accession No. AY379740) 的第 432 至第 519 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中,所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:10 所示。

[0017] 在某些具体实施例中,所述病原菌为鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV),且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子,所述第一引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:11, 12 以及 13 所组成的群组,所述第二引子的序列选自于由 SEQ ID NOs:14, 15 以及 16 所组成的群组。在某些具体实施例中,所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针,所述寡

核苷酸探针包含一介于所述病原菌 SAV 的完整基因组 (GenBank accession No. KC122926) 的第 446 至第 534 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子, 以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中, 所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

[0018] 在某些具体实施例中, 所述病原菌为感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV), 且所述寡核苷酸对包含一第一引子与一第二引子, 所述第一引子的序列如 SEQ ID NOs:18 或 19 所示, 所述第二引子的序列如 SEQ ID NO:20 或 21 所示。在某些具体实施例中, 所述寡核苷酸对进一步包含一寡核苷酸探针, 所述寡核苷酸探针包含一介于所述病原菌 ISAV 的非结构蛋白与基质蛋白的基因 (GenBank accession No. DQ785286) 的第 178 至第 305 个核苷酸之间的 13 至 25 个碱基对的寡核苷酸、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子, 以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子。在某些较佳具体实施例中, 所述寡核苷酸探针的序列如 SEQ ID NOs:22 或 38 所示。

[0019] 本说明书中所述的所有技术性 & 科学术语, 除非另外有所定义, 皆为该所属领域具有通常技艺者可共同了解的意义。

[0020] 本发明系以下面的实施例予以示范阐明, 但本发明不受下述实施例所限制。

附图说明

[0021] 图 1A : 所示为使用引子 BCF1 与 BCR1 进行传统 PCR 检测鲑鱼病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的结果 ; 第 1 至 11 道 : 分别以 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒进行传统 PCR 的结果 ; 第 12 道 : 不含 DNA 模板所进行之传统 PCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0022] 图 1B 所示为使用引子 BCF1、BCR1 与探针 BCP1 进行 iiPCR 检测的结果 ; 第 1 道 : 不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ; 第 2 至 7 道 : 分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒进行 iiPCR 的结果。

[0023] 图 1C 所示为以 iiPCR 分析引子 BCF1、BCR1 与探针 BCP1 的专一性的结果 ; 第 1 道 : 不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ; 第 2 至 8 道 : 分别以鲑鱼鳃、SAV、IPNV、ISAV、NNV、PRV 以及 pUC57-BC 质粒的 DNA/RNA 模板进行 iiPCR 的结果。

[0024] 图 1D 所示为使用不同引子与探针 BCP2 进行 iiPCR 检测的结果 ; 第 1 与 2 道 : 以引子 BCF2、BCR2 与探针 BCP2 在不含 DNA 模板 (第 1 道, 阴性对照组) 以及含 DNA 模板 (第 2 道) 下进行 iiPCR 的结果 ; 第 3 与 4 道 : 以引子 BCF3、BCR3 与探针 BCP2 在不含 DNA 模板 (第 3 道, 阴性对照组) 以及含 DNA 模板 (第 4 道) 下进行 iiPCR 的结果 ; 第 5 与 6 道 : 以引子 BCF4、BCR4 与探针 BCP2 在不含 DNA 模板 (第 5 道, 阴性对照组) 以及含 DNA 模板 (第 6 道) 下进行 iiPCR 的结果。

[0025] 图 1E 所示为以 iiPCR 分析引子 BCF3、BCR3 与探针 BCP2 的敏感度的结果 ; 第 1 道 : 不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ; 第 2 至 8 道 : 分别以 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒进行 iiPCR 的结果。

[0026] 图 1F 所示为使用引子 BCF3 与 BCR3 进行实时 PCR (real-time PCR) 检测鲑鱼病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola*, pUC57-BC 质粒的结果。“M”代表分子量标记 ;

箭头指示目标 PCR 产物；“+”表示在所述样本中检测到荧光讯号，而“-”表示在所述样本中未检测到荧光讯号。

[0027] 图 2A 所示为使用引子 PRVF1 与 PRVR1 进行传统 PCR 检测鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV) 的结果；第 1 至 6 道：分别以 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数的 pUC57-PRV 质粒进行传统 PCR 的结果；第 7 道：不含 DNA 模板所进行之传统 PCR 的结果（阴性对照组）。

[0028] 图 2B 所示为使用引子 PRVF1、PRVR1 与探针 PRVP1 进行 iiPCR 检测的结果；第 1 与 3 道：以 pUC57-PRV 质粒进行之 iiPCR 的结果；第 2 与 4 道：在不含 DNA 模板下进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）。

[0029] 图 2C 所示为使用不同引子与探针 PRVP1 进行 iiPCR 检测的结果；第 1 与 3 道：以引子 PRVF2、PRVR2 与探针 PRVP1 在不含 DNA 模板下进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 2 与 4 道：以引子 PRVF2、PRVR2 与探针 PRVP1 在含有 pUC57-PRV 质粒下进行之 iiPCR 的结果；第 5 与 7 道：以引子 PRVF3、PRVR2 与探针 PRVP1 在不含 DNA 模板下进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 6 与 8 道：以引子 PRVF3、PRVR2 与探针 PRVP1 在含有 pUC57-PRV 质粒下进行之 iiPCR 的结果；第 9 与 11 道：以引子 PRVF4、PRVR4 与探针 PRVP1 在不含 DNA 模板下进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 10 与 12 道：以引子 PRVF4、PRVR4 与探针 PRVP1 在含有 pUC57-PRV 质粒下进行之 iiPCR 的结果。

[0030] 图 2D 所示为以 iiPCR 分析引子 PRVF2、PRVR2 与探针 PRVP1 的敏感度的结果；第 1 道：不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 2 至 7 道：分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 PRV 体外转录 RNA (in vitro transcriptional RNA) 进行 iiPCR 的结果。

[0031] 图 2E 所示为以 iiPCR 分析引子 PRVF3、PRVR2 与探针 PRVP1 的敏感度的结果；第 1 道：不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 2 至 7 道：分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 PRV 体外转录 RNA 进行 iiPCR 的结果。

[0032] 图 2F 所示为以 iiPCR 分析引子 PRVF5、PRVR5 与探针 PRVP2 的敏感度的结果；第 1 道：不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 2 至 7 道：分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 pUC57-PRV 质粒进行 iiPCR 的结果。

[0033] 图 2G 所示为以 iiPCR 分析引子 PRVF5、PRVR5 与探针 PRVP2 的敏感度的结果；第 1 道：不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果（阴性对照组）；第 2 至 7 道：分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 PRV 体外转录 RNA 进行 iiPCR 的结果。“M”代表分子量标记；箭头指示目标 PCR 产物；“+”表示在所述样本中检测到荧光讯号，而“-”表示在所述样本中未检测到荧光讯号。

[0034] 图 3A 所示为使用引子 IPNVF1 与 IPNVR1 进行传统 PCR 检测感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 的结果；第 1 至 5 道：分别以 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数的 pTA-IPNV 质粒进行传统 PCR 的结果；第 6 道：不含 DNA 模板所进行之传统 PCR 的结果（阴性对照组）。

[0035] 图 3B 所示为使用引子 IPNVF1 与 IPNVR1 进行反转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测 IPNV 的结果；第 1 至 6 道：分别以 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 稀释倍数的总 RNA 进行 RT-PCR 的结果；第 7 道：不含 RNA 样本所进行之 RT-PCR 的结果（阴性对照组）。

[0036] 图 3C 所示为使用不同引子进行 iiPCR 检测 IPNV 的结果 ;第 1 道 :以引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 与 pTA-IPNV 质粒进行 iiPCR 的结果 ;第 2 道 :以引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 在不含 DNA 模板下进行 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ;第 3 道 :以引子 IPNVF1、IPNVR2 与探针 IPNVP1 与 pTA-IPNV 质粒进行 iiPCR 的结果 ;第 4 道 :以引子 IPNVF1、IPNVR2 与探针 IPNVP1 在不含 DNA 模板下进行 iiPCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0037] 图 3D 所示为以 pTA-IPNV 质粒进行 iiPCR 分析引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 的敏感度的结果 ;第 1 至 5 道 :分别以 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 拷贝数的 pTA-IPNV 质粒进行 iiPCR 的结果 ;第 6 道 :不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0038] 图 3E 所示为以体外转录 RNA 进行 iiPCR 分析引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 的敏感度的结果 ;第 1 道 :不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ;第 2 至 7 道 :分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 IPNV 体外转录 RNA 进行 iiPCR 的结果 。

[0039] 图 3F 所示为以连续稀释的 RNA 进行 iiPCR 分析引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 的敏感度的结果 ;第 1 至 6 道 :分别以原液 (10^0), 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 稀释倍数的 IPNV 总 RNA 进行 iiPCR 的结果 ;第 7 道 :不含 RNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0040] 图 3G 所示为以 iiPCR 分析引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 的专一性的结果 ;第 6 道 :不含 RNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ;第 1 至 5 与 7 道 :分别以 ISAV、SAV、NNV、PRV、鲑鱼肌肉组织以及 pTA-IPNV 质粒的 DNA/RNA 模板进行 iiPCR 的结果 。

[0041] 图 3H 所示为使用引子 IPNVF1、IPNVR1 进行 real-time PCR 检测 IPNV, pTA-IPNV 质粒的结果。“M”代表分子量标记 ;箭头指示目标 PCR 产物 ;“+”表示在所述样本中侦测到荧光讯号,而“-”表示在所述样本中未侦测到荧光讯号 。

[0042] 图 4A 所示为使用不同引子进行 iiPCR 检测 鲑鱼甲病毒 (salmonid alphavirus, SAV) 的结果 ;第 1、3 与 5 道 :分别以引子 SAVF1 与 SAVR1、引子 SAVF2 与 SAVR2、以及引子 SAVF3 与 SAVR3 在不含 pTA-SAV 质粒下进行 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ;第 2、4 与 6 道 :分别以引子 SAVF1 与 SAVR1、引子 SAVF2 与 SAVR2、以及引子 SAVF3 与 SAVR3 在含有 pTA-SAV 质粒下进行 iiPCR 的结果 。

[0043] 图 4B 所示为以 pTA-SAV 质粒进行 iiPCR 分析引子 SAVF1、SAVR1 与探针 SAVP1 的敏感度的结果 ;第 1 至 5 道 :分别以 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数的 pTA-SAV 质粒进行 iiPCR 的结果 ;第 6 道 :不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0044] 图 4C 所示为以 SAV 的体外转录 RNA 进行 iiPCR 分析引子 SAVF1、SAVR1 与探针 SAVP1 的敏感度的结果 ;第 1 道 :不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) ;第 2 至 7 道 :分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 SAV 的体外转录 RNA 进行 iiPCR 的结果 。

[0045] 图 4D 所示为以连续稀释的 SAV 总 RNA 进行 iiPCR 分析引子 SAVF1、SAVR1 与探针 SAVP1 的敏感度的结果 ;第 1 道 :含有 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阳性对照组) ;第 2 至 6 道 :分别以 10^1 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 稀释倍数的 SAV RNA 进行 iiPCR 的结果 ;第 7 道 :不含 RNA 模板所进行之 iiPCR 的结果 (阴性对照组) 。

[0046] 图 4E 所示为使用引子 SAVF1、SAVR1 进行 real-time PCR 检测 SAV, pTA-SAV 质粒的结果。“M”代表分子量标记 ;箭头指示目标 PCR 产物 ;“+”表示在所述样本中侦测到荧光讯号,而“-”表示在所述样本中未侦测到荧光讯号 。

[0047] 图 5A 所示为使用引子 ISAVF1 与 ISAVR1 进行传统 PCR 检测感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV) 的结果;第 1 至 5 道:分别以 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数的 pTA-ISAV 质粒进行传统 PCR 的结果;第 6 道:不含 DNA 模板所进行之传统 PCR 的结果(阴性对照组)。

[0048] 图 5B 所示为使用不同引子与探针 ISAVP1 进行 iiPCR 检测的结果;第 1、3、5 与 7 道:分别以引子 ISAVF1 与 ISAVR1、引子 ISAVF1 与 ISAVR2、引子 ISAVF2 与 ISAVR2,以及引子 ISAVF2 与 ISAVR1 在含有 pTA-ISAV 质粒下进行 iiPCR 的结果;第 2、4、6 与 8 道:分别以引子 ISAVF1 与 ISAVR1、引子 ISAVF1 与 ISAVR2、引子 ISAVF2 与 ISAVR2,以及引子 ISAVF2 与 ISAVR1 在不含 pTA-ISAV 质粒下进行 iiPCR 的结果(阴性对照组)。

[0049] 图 5C 所示为以 pTA-ISAV 质粒进行 iiPCR 分析引子 ISAVF1、ISAVR1 与探针 ISAVP2 的敏感度的结果;第 1 道:不含 DNA 模板所进行之 iiPCR 的结果(阴性对照组);第 2 至 7 道:分别以 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数的 pTA-ISAV 质粒进行 iiPCR 的结果。

[0050] 图 5D 所示为以连续稀释的 SAV 总 RNA 进行 iiPCR 分析引子 ISAVF1、ISAVR1 与探针 ISAVP2 的敏感度的结果;第 1 道:不含 RNA 模板所进行之 iiPCR 的结果(阴性对照组);第 2 至 7 道:分别以 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 稀释倍数的 ISAV 总 RNA 进行 iiPCR 的结果。

[0051] 图 5E 所示为以 iiPCR 分析引子 ISAVF1、ISAVR1 与探针 ISAVP2 的专一性的结果;第 1 道:不含 RNA 模板所进行之 iiPCR 的结果(阴性对照组);第 2 至 7 道:分别以 SAV、IPNV、NNV、PRV、鲑鱼肌肉组织,以及 pTA-ISAV 质粒的 DNA/RNA 模板进行 iiPCR 的结果。

[0052] 图 5F 所示为使用引子 ISAVF1、ISAVR1 进行 real-time PCR 检测 ISAV, pTA-ISAV 质粒的结果。“M”代表分子量标记;箭头指示目标 PCR 产物;“+”表示在所述样本中侦测到荧光讯号,而“-”表示在所述样本中未侦测到荧光讯号。

具体实施方式

[0053] 于一方面,本发明涉及一种冷水鱼病原菌检测方法。在某些具体实施例中,所述方法为聚合酶连锁反应 (polymerase chain reaction, PCR)。在某些具体实施例中,所述方法为反转录聚合酶连锁反应 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。在某些具体实施例中,所述方法为隔绝恒温聚合酶连锁反应 (insulated isothermal polymerase chain reaction, iiPCR)。在某些具体实施例中,所述方法为实时聚合酶连锁反应 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)。

[0054] 于一方面,本发明涉及一种冷水鱼病原菌检测方法,包含:

[0055] 提供一可能含有在冷水鱼中的病原菌的一或多个核苷酸序列的样本;

[0056] 提供一寡核苷酸引子对,所述寡核苷酸引子对定义在所述病原菌的一或多个核苷酸序列上一双股目标序列的二互补股的 5' 端;

[0057] 提供一聚合酶;

[0058] 在一容器中混合所述样本、所述寡核苷酸引子对、所述聚合酶、脱氧腺苷三磷酸 (dATPs)、脱氧胞核苷三磷酸 (dCTPs)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTPs),以及脱氧胸苷三磷酸 (dTTPs),以形成一聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物;

[0059] 透过在一固定温度下加热所述容器的底部,使所述 PCR 混合物进行隔绝恒温聚合酶连锁反应 (iiPCR),以形成一 PCR 产物;以及

- [0060] 侦测所述 PCR 产物以辨识所述双股目标序列。
- [0061] 于另一方面,本发明涉及一种冷水鱼病原菌检测方法,包含:
- [0062] 提供一可能含有在冷水鱼中的病原菌的一或多个核苷酸序列的样本;
- [0063] 提供一寡核苷酸引子对,所述寡核苷酸引子对定义在所述病原菌的一或多个核苷酸序列上一双股目标序列的二互补股的 5' 端;
- [0064] 提供一寡核苷酸探针,所述寡核苷酸探针包含一与所述双股目标序列的一区段互补的序列、一附加于所述寡核苷酸探针上的一第一位置的荧光分子,以及一附加于所述寡核苷酸探针上的一第二位置的荧光抑制分子,当所述寡核苷酸探针未杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光抑制分子大体上抑制所述荧光分子,且当所述寡核苷酸探针杂合于所述双股目标序列的所述区段时,所述荧光分子大体上未被抑制;
- [0065] 提供一聚合酶;
- [0066] 在一容器中混合所述样本、所述寡核苷酸引子对、所述聚合酶、脱氧腺苷三磷酸 (dATPs)、脱氧胞核苷三磷酸 (dCTPs)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTPs),以及脱氧胸苷三磷酸 (dTTPs),以形成一聚合酶连锁反应 (PCR) 混合物;
- [0067] 透过在一固定温度下加热所述容器的底部,使所述 PCR 混合物进行隔绝恒温聚合酶连锁反应 (iiPCR),以形成一 PCR 产物;以及
- [0068] 侦测所述 PCR 产物以辨识所述双股目标序列。
- [0069] 于又一方面,本发明涉及一种用于侦测冷水鱼病原菌的寡核苷酸对。
- [0070] 于再一方面,本发明涉及一种用于侦测冷水鱼病原菌的寡核苷酸对与寡核苷酸探针。
- [0071] 应当进一步理解的是,在某些具体实施例中,本文揭露的寡核苷酸对及/或寡核苷酸探针可用于各种基础 PCR 技术之变异,例如但不限于,反转录聚合酶连锁反应 (RT-PCR)、隔绝恒温聚合酶连锁反应 (iiPCR)、实时聚合酶连锁反应 (real-time PCR)、巢式聚合酶连锁反应 (nested PCR),以及热不对称性交错聚合酶连锁反应 (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)。
- [0072] 如本文所用,术语「冷水」意指在北半球及南半球水温介于冬天为冰冻且夏天最高达 15-20°C 之间的水域。冷水鱼包含鲑鱼,例如但不限于,大西洋鲑鱼、银鲑鱼、帝王鲑 (Chinook salmon) 以及虹鳟鱼,此外海洋物种例如大比目鱼、鳕鱼及比目鱼。在某些具体实施例中,所述冷水鱼为鲑鱼。
- [0073] 如本文所用,术语「冷水鱼病原菌」意指在冷水鱼中发现的病毒性、细菌性及寄生性病原菌。冷水鱼病原菌的例子如,但不限于:a) 病毒:感染性胰脏坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)、鲑鱼胰腺病病毒 (Salmon pancreas disease virus, SPDV)、感染性鲑鱼贫血病毒 (infectious salmon anemia virus, ISAV)、鱼呼吸道与肠道病毒 (piscine reovirus, PRV, 造成心脏及骨骼肌炎症 heart and muscle inflammation, HSMI)、感染性造血器官坏死病毒 (infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)、病毒性出血性败血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)、神经坏死病毒 (viral nervous necrosis virus, VNNV);b) 细菌:鲑鱼肾菌 (Renibacterium salmoninarum, 造成细菌性肾病 bacterial kidney disease, BKD)、鳃弧菌 (Vibrio anguillarum)、鲑弧菌 (Vibrio salmonicida)、鲑产气单胞菌 (Aeromonas salmonicida)、

柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*)、鳟鱼红嘴病耶氏杆菌 (*Yersinia ruckeri*)、鲑鱼病原菌 (*Candidatus Branchiomonas cysticola*) ;c) 寄生虫:佩鲁兰新副变形虫 (*Neoparamoeba perurans*, 造成阿米巴鳃病 amoebic gill disease, AGD)、脑黏体虫 (*Myxosoma cerebralis*), 以及海虱 (sea lice)。

[0074] 如本文所用, 术语「隔绝恒温聚合酶连锁反应 (iiPCR)」意指一种聚合酶连锁反应, 其中, 在一试管中的自发性液体对流是受到温度梯度所驱动, 所述温度梯度是单纯透过自所述试管底部以一固定温度加热而形成。因此, 反应成分循环经过温度梯度的各区域, 而 PCR 的变性、黏合, 以及延伸步骤分别发生于所述试管的底部、顶部及中间区域。隔绝恒温聚合酶连锁反应 (iiPCR) 的详细描述请参见如, Chang et al., *Biotech J.* (2012) 7:662-666 ; Tsai et al., *J. Virol. Methods* (2012) 181:134-137 ; 美国专利号 8, 187, 813 以及 8, 574, 516 ; 美国公开专利申请案号 2012/0094373、2012/0309083、2013/0023010, 以及 2013/0217112 皆以引用的方式将其整体并入本文。

[0075] 如本文所用, 术语「荧光分子」意指一物质或其一部份, 其系能够在可侦测的范围内显示荧光。如本文所用, 术语「荧光抑制分子」意指一物质或其一部份, 其系能够抑制当由一光源激发时由所述荧光分子所发射的荧光。在某些具体实施例中, 术语「荧光分子」与「荧光抑制分子」为 TaqMan™ 分析试剂盒 (Applied Biosystems Inc., 加州, 美国) 的荧光分子与荧光抑制分子。TaqMan™ 分析试剂盒的详细描述请参见如, Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1991) 88:7276-7280 ; 美国专利号 5, 538, 848、5, 723, 591、5, 876, 930, 以及 7, 413, 708 皆以引用的方式将其整体并入本文。

[0076] 所述荧光分子的例子包括, 但不限于, 3-(ϵ -羧)-3'-乙基-5, 5'-二甲基己羧花青 (3-(ϵ -carboxypentyl)-3'-ethyl-5, 5'-dimethyl-oxa-carbocyanine, CYA)、6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, FAM)、5, 6-羧基罗丹明-L L0 (5, 6-carboxyrhodamine-110, R110)、6-羧基罗丹明-6G (6-carboxyrhodamine-6G, R6G)、N', N', N', N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (N', N', N', N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine, TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明 (6-carboxy-X-rhodamine, ROX)、2', 4', 5', T,-四氯-4-7-二氯荧光素 (2', 4', 5', T,-tetrachloro-4-7-dichlorofluorescein, TET)、2', 7-二甲氧基-4', 5'-6-羧基罗丹明 (2', 7-dimethoxy-4', 5'-6-carboxyrhodamine, JOE)、6-羧基-2', 4, 4', 5', 7, 7'-六氯荧光素 (6-carboxy-2', 4, 4', 5', 7, 7'-hexachlorofluorescein, HEX)、ALEXA 荧光、Cy3 荧光与 Cy5 荧光。所述荧光抑制分子的例子包括, 但不限于, 4-(4'-二甲基氨基-苯偶氮基) 苯甲酸 (4-(4'-dimethylamino-phenylazo)-benzoic acid, Dabcyl)、黑洞荧光抑制剂 1 (Black Hole Quencher 1, BHQ1)、黑洞荧光抑制剂 2 (Black Hole Quencher 2, BHQ2)、黑洞荧光抑制剂 3 (Black Hole Quencher 3, BHQ3)、四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine, TAMRA)。在某些具体实施例中, 所述荧光分子为 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, FAM), 且所述荧光抑制分子为二氢环吡咯并吡啶三肽小沟结合物 (dihydro cyclo pyrrolo indole tripeptide minor groove binder, MGB)。

[0077] 除非本文另有定义, 否则用以与本文结合的科学与技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外, 除非上下文另有要求, 单数术语应包括复数, 并且复数术语应包括单数。本发明的方法与技术一般可根据本领域已知的常规方法进行。一般而言, 本文所描述之用以连结以下技术的命名法, 以及生物化学、酵素学、分子及细胞生物学、微生

物学、遗传学与蛋白质及核酸化学及杂合反应的技术皆为本领域已知且经常使用者。除非另有说明,本发明的方法与技术一般可根据本领域已知的常规方法进行,且被描述于在本说明书中被引用且讨论的各种一般及更具体的参考文献中。

[0078] 本发明进一步透过以下的实施例阐释,其不应以任何方式被解释为进一步的限缩。本申请案中引用的所有引用文件(包括参考文献、核准的专利、公开的专利申请,以及一同在申请中的专利申请案)的整体内容,在此透过引用的方式明确地并入本案中。

[0079] 实施例

[0080] 实施例 1 病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的检测

[0081] 病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的 16S 核糖体 RNA 基因 (GenBank accession No. JQ723599) 被插入 pUC57 选殖载体中 (Thermo 公司,麻州,美国),以得到 pUC57-BC 质粒。

[0082] 1. 以引子 BCF1 与 BCR1 进行传统 PCR

[0083] 进行传统 PCR 所用的 50 μ l PCR 混合物含有:稀释的 pUC57-BC 质粒(分别为 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 个拷贝数)、0.01-2 μ M 前置引子 BCF1 (SEQ ID NO:1)、0.01-2 μ M 后置引子 BCR1 (SEQ ID NO:2)、0.2 μ M dNTP 以及 1.25U Taq DNA 聚合酶。在一热循环仪(例如,但不限于 PC818, Astec Co. Ltd., 日本)中进行扩增反应,且包含一个变性的初始循环 94 $^{\circ}$ C 持续 3 分钟,以及 35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒以及 72 $^{\circ}$ C 延展 30 秒。扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel) 在 TAE 缓冲液 (40mM Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA) 中分析,并且以溴化乙锭 (ethidium bromide) 染色显现。

[0084] 传统 PCR 的结果如图 1A 所示。如图 1A 所示,第 1 至 9 道的条带显示,本发明的引子 BCF1 与 BCR1 正确地扩增 90-bp 的目标序列,而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 12 道)。所述结果表明,所述引子对可用于传统 PCR 扩增反应以检测 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的存在。

[0085] 2. 以引子 BCF1、BCR1 以及探针 BCP1 进行 iiPCR

[0086] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pUC57-BC 质粒(分别为 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数)、0.01-2 μ M 前置引子 BCF1 (SEQ ID NO:1)、0.01-2 μ M 后置引子 BCR1 (SEQ ID NO:2)、0.01-2 μ M 探针 BCP1 (5' FAM-CAGGCTTTCCTCTCCCA-MGB 3', SEQ ID NO:3)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间(约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0087] iiPCR 的结果如图 1B 所示。如图 1B 所示,第 2 至 7 道的条带显示,本发明的引子及探针正确地扩增 90-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 1 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0088] 此外,重复上述 iiPCR 分析试验 6 次 ($n = 6$) 以评估引子 BCF1 (SEQ ID NO:1)、BCR1 (SEQ ID NO:2) 与探针 BCP1 (SEQ ID NO:3) 的敏感度。敏感度测试的结果如表 1 所示。

[0089] 表 1 引子 BCF1、BCR1 与探针 BCP1 的敏感度测试结果 ($n = 6$)

[0090]

DNA 拷贝数	阴性对照组	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
阳性率%	0	17	50	100	100	100	100

[0091] 以下列 iiPCR 分析引子 BCF1 (SEQ ID NO:1)、BCR1 (SEQ ID NO:2) 与探针 BCP1 (SEQ ID NO:3) 的专一性。50 μ l 的 PCR 混合物含有自鲑鱼鳃抽取的 DNA 样本或不同鱼类病原菌的 DNA/RNA 模板 (分别为 SAV、IPNV、ISAV、NNV、PRV 以及 pUC57-BC 质粒)、0.01-2 μ M 前置引子 BCF1 (SEQ ID NO:1)、0.01-2 μ M 后置引子 BCR1 (SEQ ID NO:2)、0.01-2 μ M 探针 BCP1 (5' FAM-CAGGCTTTCCTCTCCCA-MGB 3', SEQ ID NO:3)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间 (约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0092] iiPCR 的结果如图 1C 所示。如图 1C 所示,只有在含有 *Candidatus Branchiomonas cysticola* DNA 模板的样本中 (第 8 道) 可以正确地扩增 90-bp 的目标序列 (如箭头所指),而含有鲑鱼鳃、SAV、IPNV、ISAV、NNV 或 PRV 的 DNA/RNA 模板的样本中则无目标序列被扩增 (第 1 至 7 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应 (即侦测到荧光),而在第 1 至 7 道中则未侦测到荧光讯号。

[0093] 3. 以引子 BCF2、BCR2、BCF3、BCR3、BCF4、BCR4 以及探针 BCP2 进行 iiPCR

[0094] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pUC57-BC 质粒 (10⁸ 个拷贝数)、0.01-2 μ M 前置引子 BCF2 (SEQ ID NO:23) 或 BCF3 (SEQ ID NO:25) 或 BCF4 (SEQ ID NO:27)、0.01-2 μ M 后置引子 BCR2 (SEQ ID NO:24) 或 BCR3 (SEQ ID NO:26) 或 BCR4 (SEQ ID NO:28)、0.01-2 μ M 探针 BCP2 (5' FAM-CGGCGTGCCTGAGAA-MGB 3', SEQ ID NO:29)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间 (约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0095] iiPCR 的结果如图 1D 所示。如图 1D 所示,第 2、4、6 道的条带显示,引子 BCF2 (SEQ ID NO:23) 与 BCR2 (SEQ ID NO:24)、BCF3 (SEQ ID NO:25) 与 BCR3 (SEQ ID NO:26)、BCF4 (SEQ ID NO:27) 与 BCR4 (SEQ ID NO:28) 分别正确地扩增 100-bp、75-bp 以及 100-bp 的目标序列 (如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增 (第 1、3、5 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应 (即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。所述结果表明,引子 BCF2、BCR2、BCF3、BCR3、BCF4、BCR4 以及探针 BCP2 可用于 iiPCR 扩增反应以检测 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的存在。

[0096] 此外,以不同拷贝数 (分别为 10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ 个拷贝数) 的 DNA 模板 pUC57-BC 质粒重复上述 iiPCR 分析试验 7 次 (n = 7) 以评估引子 BCF3 (SEQ ID NO:25)、BCR3 (SEQ ID NO:26) 与探针 BCP2 (SEQ ID NO:29) 的敏感度。敏感度测试的结果如表 2 及图 1E 所示。

[0097] 表 2 引子 BCF3、BCR3 与探针 BCP2 的敏感度测试结果 (n = 7)

[0098]

DNA 拷贝数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
---------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

阳性率%	42.9	100	100	100	100	100
------	------	-----	-----	-----	-----	-----

[0099] 如图 1E 所示,第 3 至 8 道的条带显示,所述引子可正确地扩增 75-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组与 10^0 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒样本中则无目标序列被扩增(第 1 与 2 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 1 与 2 道中则未侦测到荧光讯号。

[0100] 4. 以引子 BCF3、BCR3 以及探针 BCP2 进行实时 PCR

[0101] 以稀释的 pUC57-BC 质粒(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数)于一实时 PCR 仪(例如,但不限于 ABI StepOnePlus™;Applied BioSystem,Life Technologies,加州,美国)中进行实时 PCR 分析。以含有 $2\mu\text{l}$ pUC57-BC 质粒、 $0.01\text{--}2\mu\text{M}$ 前置引子 BCF3(SEQ ID NO:25)、 $0.01\text{--}2\mu\text{M}$ 后置引子 BCR3(SEQ ID NO:26)、 $0.01\text{--}2\mu\text{M}$ 探针 BCP2(5' FAM-CGGCGTGCCTGAGAA-MGB 3', SEQ ID NO:29) 总体积为 $20\mu\text{l}$ 的商用 RT-PCR 试剂盒(例如,但不限于,OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit;Takara Bio Inc.,日本)进行实时 PCR 分析。实时 PCR 的程序为 42°C 5 分钟、 94°C 10 秒,以及 40 个循环的 94°C 10 秒以及 60°C 30 分钟。在 60°C 的步骤中记录荧光测量的结果。

[0102] 如图 1F 所示,计算连续稀释(10 倍)的 pUC57-BC 质粒的实时 PCR 分析的标准曲线。至少 10 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒可被侦测到。所述标准曲线的 R^2 值为 0.994,表示本发明的引子对与探针可以被用于实时 PCR,并产生可信的结果。

[0103] 所述结果表明,本发明的引子对与探针可用于 iiPCR 扩增反应以检测 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的存在,并且具有高度敏感度及专一性。

[0104] 实施例 2 病原菌鱼呼吸道与肠道病毒 (PRV) 的检测

[0105] 病原菌鱼呼吸道与肠道病毒 (PRV) 的 L1 区段基因 (GenBank 登录号 GU994013) 被插入 pUC57 选殖载体中 (Thermo),以得到 pUC57-PRV 质粒。

[0106] 此外,透过使用一商用试剂盒(例如,但不限于,MAXIscript® Kit;Thermo Fisher Scientific,麻州,美国)对 PRV 的 L1 区段基因的 DNA 序列进行转录,以制备 PRV 的体外转录 RNA 模板。

[0107] 1. 以引子 PRVF1 与 PRVR1 进行传统 PCR

[0108] 进行传统 PCR 所用的 $50\mu\text{l}$ PCR 混合物含有:稀释的 pUC57-PRV 质粒(分别为 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数)、 $0.01\text{--}2\mu\text{M}$ 前置引子 PRVF1(SEQ ID NO:4)、 $0.01\text{--}2\mu\text{M}$ 后置引子 PRVR1(SEQ ID NO:5)、 $0.2\mu\text{M}$ dNTP 以及 1.25U Taq DNA 聚合酶。在一热循环仪(例如,但不限于 PC818,Astec Co.Ltd.,日本)中进行扩增反应,且包含一个变性的初始循环 94°C 持续 3 分钟,以及 35 个循环的 94°C 30 秒、 60°C 30 秒以及 72°C 延展 30 秒。扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭 (ethidium bromide) 染色显现。

[0109] 传统 PCR 的结果如图 2A 所示。如图 2A 所示,第 1 至 3 道的条带显示,本发明的引子 PRVF1 与 PRVR1 正确地扩增 86-bp 的目标序列,而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 7 道)。所述结果表明,所述引子对可用于传统 PCR 扩增反应以检测鱼呼吸道与肠道病毒 (PRV) 的存在。

[0110] 2. 以引子 PRVF1、PRVR1、PRVF2、PRVR2、PRVF3、PRVF4、PRVR4 以及探针 PRVP1 进行

iiPCR

[0111] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pUC57-PRV 质粒、0.01-2 μ M 前置引子 PRVF1 (SEQ ID NO:4) 或 PRVF2 (SEQ ID NO:30) 或 PRVF3 (SEQ ID NO:32) 或 PRVF4 (SEQ ID NO:33)、0.01-2 μ M 后置引子 PRVR1 (SEQ ID NO:5) 或 PRVR2 (SEQ ID NO:31) 或 PRVR4 (SEQ ID NO:34)、0.01-2 μ M 探针 PRVP1 (5' FAM-CTCCAGGAGTCATTGTC-MGB 3', SEQ ID NO:6)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间(约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0112] iiPCR 的结果如图 2B 所示。如图 2B 所示,第 1 及 3 道的条带显示,本发明的引子 PRVF1 (SEQ ID NO:4) 及 PRVR1 (SEQ ID NO:5) 正确地扩增 86-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 2 及 4 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0113] 如图 2C 所示,第 2、4、6、8、10 及 12 道的条带显示,本发明的引子 primers PRVF2 (SEQ ID NO:30) 与 PRVR2 (SEQ ID NO:31)、PRVF3 (SEQ ID NO:32) 与 PRVR2 (SEQ ID NO:31)、PRVF4 (SEQ ID NO:33) 与 PRVR4 (SEQ ID NO:34) 分别正确地扩增 89-bp、83-bp 以及 100-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 1、3、5、7、9 及 11 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0114] 此外,以不同拷贝数(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数)的 PRV 体外转录 RNA 模板重复上述 iiPCR 分析试验,以评估引子 PRVF2 (SEQ ID NO:30) 与 PRVR2 (SEQ ID NO:31)、PRVF3 (SEQ ID NO:32) 与 PRVR2 (SEQ ID NO:31) 以及探针 PRVP1 (SEQ ID NO:6) 的敏感度。敏感度测试的结果分别如图 2D(针对引子 PRVF2、PRVR2 以及探针 PRVP1) 及表 3 与图 2F(针对引子 PRVF3、PRVR2 以及探针 PRVP1) 所示。

[0115] 如图 2D 所示,第 4 至 7 道的条带显示,所述引子 PRVF2 及 PRVR2 可正确地扩增 89-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组与 10^1 及 10^2 个拷贝数的体外转录 RNA 中则无目标序列被扩增(第 1、2 与 3 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 1、2 与 3 道中则未侦测到荧光讯号。

[0116] 如图 2E 所示,第 3 至 7 道的条带显示,所述引子 PRVF3 及 PRVR2 可正确地扩增 83-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组与 10^1 个拷贝数的体外转录 RNA 中则无目标序列被扩增(第 1 与 2 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 1 与 2 道中则未侦测到荧光讯号。重复此敏感性试验 8 次($n = 8$) 的统计数据如表 3 所示。

[0117] 表 3 引子 PRVF3、PRVR2 与探针 PRVP1 的敏感度测试结果 ($n = 8$)

[0118]

RNA 拷贝数	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
阳性率%	1.25	3.75	75	100	100	100

[0119] 3. 以引子 PRVF5、PRVR5 以及探针 PRVP2 进行 iiPCR

[0120] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pUC57-PRV 质粒 (分别为 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ 个拷贝数) 或 PRV 体外转录 RNA 模板 (分别为 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ 个拷贝数)、0.01-2 μ M 前置引子 PRVF5 (SEQ ID NO:35)、0.01-2 μ M 后置引子 PRVR5 (SEQ ID NO:36)、0.01-2 μ M 探针 PRVP2 (5' FAM-CAATGGGATGCTAACACTC-MGB 3', SEQ ID NO:37)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间 (约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。iiPCR 的结果分别如图 2F (针对 DNA 质粒) 及表 4 与图 2G (针对体外转录 RNA) 所示。

[0121] 如图 2F 及图 2G 所示,第 3 至 7 道的条带显示,所述引子对可正确地扩增 72-bp 的目标序列 (如箭头所指),而在阴性对照组与 10^1 个拷贝数的 pUC57-PRV 质粒 (图 2F, 第 1 与 2 道) 或体外转录 RNA (图 2G, 第 1 与 2 道) 中则无目标序列被扩增。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应 (即侦测到荧光),而在图 2F 或图 2G 中的第 1 与 2 道中则未侦测到荧光讯号。以 PRV 体外转录 RNA 模板重复此敏感性试验 4 次 ($n = 4$) 的统计数据如表 4 所示。

[0122] 表 4 引子 PRVF5、PRVR5 与探针 PRVP2 的敏感度测试结果 ($n = 4$)

[0123]

RNA 拷贝数	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
阳性率%	0	75	100	100	100	100

[0124] 所述结果表明,本发明的引子对与探针可用于 iiPCR 扩增反应以检测鱼呼吸道与肠道病毒 (PRV) 的存在,并且具有高度敏感度。

[0125] 实施例 3 病原菌感染性胰脏坏死病毒 (IPNV) 的检测

[0126] 病原菌感染性胰脏坏死病毒 (IPNV) 的 A 区段基因 (GenBank 登录号 AY379740) 被插入 T&A™选殖载体中 (Yeastern biotech, 台湾),以得到 pTA-IPNV 质粒。

[0127] 透过使用一商用试剂盒 (例如,但不限于, MAXIscript® Kit; Thermo Fisher Scientific, 麻州, 美国) 对 IPNV 的 A 区段基因的 DNA 序列进行转录,以制备 IPNV 的体外转录 RNA 模板。

[0128] 此外,收集来自养殖场的鲑鱼病毒样本,并进行测试以评估 iiPCR 与实时 PCR 用于野外样本上的表现。来自鲑鱼养殖场的鲑鱼被诊断得到感染性胰脏坏死病毒 (IPNV)。藉由使用商业试剂盒 (例如,但不限于 FavorPrep™ 病毒核酸萃取试剂盒; Favorgen Biotech Corp., 台湾) 萃取来自组织的 RNA 萃取物。以在波长 260/280nm 下测量吸光率来评估总 RNA 的纯度。

[0129] 1. 传统 PCR

[0130] 进行传统 PCR 所用的 50 μ l PCR 混合物含有:稀释的 pTA-IPNV 质粒 (分别为 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$ 个拷贝数)、0.01-2 μ M 前置引子 IPNVF1 (SEQ ID NO:7)、0.01-2 μ M 后置引子 IPNVR1 (SEQ ID NO:8)、0.2 μ M dNTP 以及 1.25U Taq DNA 聚合酶。在一热循环仪 (例如,但不限于 PC818, Astec Co. Ltd., 日本) 中进行扩增反应,且包含一个变性的初始循环 94°C 持续 3 分钟,以及 35 个循环的 94°C 30 秒、60°C 30 秒以及 72°C 延展 30 秒。扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0131] 传统 PCR 的结果如图 3A 所示。如图 3A 所示,第 1 至 4 道的条带显示,本发明的引子 IPNVF1 与 IPNVR1 正确地扩增 83-bp 的目标序列,而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 6 道)。所述结果表明,所述引子对可用于传统 PCR 扩增反应以检测感染性胰脏坏死病毒(IPNV)的存在。

[0132] 2. 反转录 PCR(RT-PCR)

[0133] 藉由使用商业试剂盒(例如,但不限于 One step RT-PCR kit;LTK Biolab,台湾)以来自得到感染性胰脏坏死病毒(IPNV)的鱼类而来的总 RNA 萃取物、0.01-2 μ M 前置引子 IPNVF1(SEQ ID NO:7)、0.01-2 μ M 后置引子 IPNVR1(SEQ ID NO:8)进行反转录 PCR。反转录 PCR 于 42°C 进行 30 分钟后,接着进行以下 PCR 程序:94°C 10 分钟,以及 35 个循环的 94°C 30 秒、60°C 30 秒,以及在 72°C 下延长 30 秒。扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0134] 反转录 PCR 的结果如图 3B 所示。如图 3B 所示,第 1 至 4 道的条带显示,本发明的引子 IPNVF1 与 IPNVR1 正确地扩增 83-bp 的目标序列,而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 6 道)。所述结果表明,所述引子对可用于传统 PCR 扩增反应以检测感染性胰脏坏死病毒(IPNV)的存在。

[0135] 3. iiPCR

[0136] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pTA-IPNV 质粒、0.01-2 μ M 前置引子 IPNVF1(SEQ ID NO:7)、0.01-2 μ M 后置引子 IPNVR1(SEQ ID NO:8)或 IPNVR2(SEQ ID NO:9)、0.01-2 μ M 探针 IPNVP1(5' FAM-ACGCTCAACGCTGCCA-MGB 3', SEQ ID NO:10)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间(约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0137] iiPCR 的结果如图 3C 所示。如图 3C 所示,第 1 及 3 道的条带显示,本发明的引子 IPNVF1 与 IPNVR1、引子 IPNVF1 与 IPNVR2 分别正确地扩增 83-bp、88-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 2 及 4 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0138] 此外,以不同拷贝数(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 个拷贝数)的 pTA-IPNV DNA 质粒,或以不同拷贝数(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数)的 IPNV 体外转录 RNA 模板,或以来自得到感染性胰脏坏死病毒(IPNV)的鱼类而来的总 RNA 萃取物(分别为原液与稀释至 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 倍数),重复上述 iiPCR 分析试验,以评估引子 IPNVF1(SEQ ID NO:7)与 IPNVR1(SEQ ID NO:8)以及探针 IPNVP1(SEQ ID NO:10)的敏感度。以总 RNA 萃取物进行 iiPCR 分析的试验,还加入 50U MMLV RTase 与 4U RNase 抑制剂至反应物中。敏感度测试的结果分别如图 3D、3E、3F 所示。

[0139] 如图 3D 所示,第 1 至 5 道的条带显示,所述引子 IPNVF1 与 IPNVR1 可正确地扩增 83-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 6 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 6 道中则未侦测到荧光讯号。

[0140] 如图 3E 所示,第 4 至 7 道的条带显示,所述引子 IPNVF1 与 IPNVR1 可正确地扩增

83-bp 的目标序列（如箭头所指），而在阴性对照组与 10^1 及 10^2 个拷贝数的体外转录 RNA 中则无目标序列被扩增（第 1、2 与 3 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在第 1、2 与 3 道中则未侦测到荧光讯号。

[0141] 如图 3F 所示，第 1、2、3 及 8 道的条带显示，所述引子 IPNVF1 与 IPNVR1 可正确地扩增 83-bp 的目标序列（如箭头所指），而在稀释至 10^5 、 10^6 、 10^7 倍的 RNA 样本与阴性对照组中则无目标序列被扩增（第 4、5、6 与 7 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在稀释至 10^5 、 10^6 、 10^7 倍的 RNA 样本与阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。重复此 PRV 的 RNA 样本的敏感性试验 5 次 ($n = 5$) 的统计数据如表 5 所示。

[0142] 表 5 引子 IPNVF1、IPNVR1 与探针 IPNVP1 的敏感度测试结果 ($n = 5$)

[0143]

RNA 稀释倍数	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
阳性率%	0	0	0	20	100	100	100

[0144] 以萃取自鲑鱼肌肉组织的 DNA 萃取物以及不同鱼类病原菌的 DNA/RNA 模板（分别为 ISAV、SAV、NNV、PRV 以及 IPNV）进行 iiPCR，以分析引子 IPNVF1 (SEQ ID NO:7)、IPNVR1 (SEQ ID NO:8) 与探针 IPNVP1 (SEQ ID NO:10) 的专一性。

[0145] iiPCR 的结果如图 3G 所示。如图 3G 所示，只有在含有 IPNV 的 RNA 模板的样本中（第 7 道）可以正确地扩增 83-bp 的目标序列（如箭头所指），而含 ISAV、SAV、NNV、PRV、IPNV 的 DNA/RNA 模板以及萃取自鲑鱼肌肉组织的 DNA 萃取物的样本中则无目标序列被扩增（第 1 至 6 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在第 1 至 6 道中则未侦测到荧光讯号。

[0146] 4. 实时 PCR

[0147] 以稀释的 pTA-IPNV 质粒（分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 个拷贝数）于一实时 PCR 仪（例如，但不限于 ABI StepOnePlus™; Applied BioSystem, Life Technologies, 加州, 美国）中进行实时 PCR 分析。以含有 $2 \mu\text{l}$ pTA-IPNV 质粒、 0.01 – $2 \mu\text{M}$ 前置引子 IPNVF1 (SEQ ID NO:7)、 0.01 – $2 \mu\text{M}$ 后置引子 IPNVR1 (SEQ ID NO:8)、 0.01 – $2 \mu\text{M}$ 探针 IPNVP1 (5'FAM-ACGCTCAACGCTGCCA-MGB 3', SEQ ID NO:10) 总体积为 $20 \mu\text{l}$ 的商用 RT-PCR 试剂盒（例如，但不限于，OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit; Takara Bio Inc., 日本）进行实时 PCR 分析。实时 PCR 的程序为 42°C 5 分钟、 94°C 10 秒，以及 40 个循环的 94°C 10 秒以及 60°C 30 分钟。在 60°C 的步骤中记录荧光测量的结果。

[0148] 如图 3H 所示，计算连续稀释（10 倍）的 pTA-IPNV 质粒的实时 PCR 分析的标准曲线。至少 10 个拷贝数的 pTA-IPNV 质粒可被侦测到。所述标准曲线的 R^2 值为 0.99795，表示本发明的引子对与探针可以被用于实时 PCR，并产生可信的结果。

[0149] 所述结果表明，本发明的引子对与探针可用于 iiPCR 扩增反应以检测感染性胰脏坏死病毒 (IPNV) 的存在，并且具有高度敏感度及专一性。

[0150] 实施例 4 病原菌鲑鱼甲病毒 (SAV) 的检测

[0151] 病原菌鲑鱼甲病毒 (SAV) 的完整基因组 (GenBank 登录号 KC122926) 的一段 984-bp 部分序列（自第 33 至 1016 个核苷酸）被插入 T&A™ 选殖载体中 (Yeastern biotech,

台湾),以得到 pTA-IPNV 质粒。

[0152] 透过使用一商用试剂盒(例如,但不限于,MAXIscript® Kit; Thermo Fisher Scientific,麻州,美国)对 SAV 的所述 984-bp 部分序列的 DNA 序列进行转录,以制备 SAV 的体外转录 RNA 模板。

[0153] 此外,收集来自养殖场的鲑鱼心脏组织,并进行测试以评估 iiPCR 用于野外样本上的表现。来自鲑鱼养殖场的鲑鱼被诊断得到鲑鱼甲病毒(SAV)。藉由使用商业试剂盒(例如,但不限于 FavorPrep™ 病毒核酸萃取试剂盒; Favorgen Biotech Corp., 台湾)萃取来自组织的 RNA 萃取物。以在波长 260/280nm 下测量吸光率来评估总 RNA 的纯度。

[0154] 1. iiPCR

[0155] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pTA-SAV 质粒、0.01-2 μ M 前置引子 SAVF1、SAVF2 或 SAVF3(分别为 SEQ ID NOs:11、12 或 13)、0.01-2 μ M 后置引子 SAVR1、SAVR2 或 SAVR3(分别为 SEQ ID NOs:14、15 或 16)、0.01-2 μ M 探针 SAVP1(5' FAM-CGTGAGTTGTAAAGTAAAG-MGB 3', SEQ ID NO:17)、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中,并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间(约 1 小时)。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外,扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析,并且以溴化乙锭染色显现。

[0156] iiPCR 的结果如图 4A 所示。如图 4A 所示,第 2、4 及 6 道的条带显示,本发明的引子 primers SAVF1 与 SAVR1、SAVF2 与 SAVR2、SAVF3 与 SAVR3 分别正确地扩增 70-bp、85-bp 以及 70-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 1、3 及 5 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0157] 此外,以不同拷贝数(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 个拷贝数)的 pTA-SAV DNA 质粒,或以不同拷贝数(分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数)的 SAV 体外转录 RNA 模板,或以来自得到鲑鱼甲病毒(SAV)的鱼类而来的总 RNA 萃取物(分别为原液与稀释至 10^1 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 倍数),重复上述 iiPCR 分析试验,以评估引子 SAVF1(SEQ ID NO:11) 与 SAVR1(SEQ ID NO:14) 以及探针 SAVP1(SEQ ID NO:17) 的敏感度。以总 RNA 萃取物进行 iiPCR 分析的试验,还加入 50U MMLV RTase 与 4U RNase 抑制剂至反应物中。敏感度测试的结果分别如图 4B、4C、4D 所示。

[0158] 如图 4B 所示,第 1 至 4 道的条带显示,所述引子 SAVF1 与 SAVR1 可正确地扩增 70-bp 的目标序列(如箭头所指),而在 10^1 拷贝数的 pTA-SAV DNA 质粒以及阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 5 与 6 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 5 与 6 道中则未侦测到荧光讯号。

[0159] 如图 4C 所示,第 3 至 7 道的条带显示,所述引子 SAVF1 与 SAVR1 可正确地扩增 70-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组与 10^1 个拷贝数的 SAV 体外转录 RNA 中则无目标序列被扩增(第 1 与 2 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在第 1 与 2 道中则未侦测到荧光讯号。

[0160] 如图 4D 所示,第 1 至 6 道的条带显示,所述引子 SAVF1 与 SAVR1 可正确地扩增 70-bp 的目标序列(如箭头所指),而在阴性对照组中则无目标序列被扩增(第 7 道)。此外,以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应(即侦测到荧光),而在阴

性对照组中则未检测到荧光讯号。重复此 SAV 的 RNA 样本的敏感性试验 5 次 ($n = 5$) 的统计数据如表 6 所示。

[0161] 表 6 引子 SAVF1、SAVR1 与探针 SAVP1 的敏感度测试结果 ($n = 5$)

[0162]

RNA 稀释倍数	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
阳性率%	0	20	60	60	100	100	100

[0163] 2. 实时 PCR

[0164] 以稀释的 pTA-SAV 质粒 (分别为 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 个拷贝数) 于一实时 PCR 仪 (例如, 但不限于 ABI StepOnePlus™; Applied BioSystem, Life Technologies, 加州, 美国) 中进行实时 PCR 分析。以含有 $2 \mu\text{l}$ pTA-SAV 质粒、 $0.01-2 \mu\text{M}$ 前置引子 SAVF1 (SEQ ID NO:11)、 $0.01-2 \mu\text{M}$ 后置引子 SAVR1 (SEQ ID NO:14)、 $0.01-2 \mu\text{M}$ 探针 SAVP1 (5' FAM-CGTGAGT TGTAAGTAAAG-MGB 3', SEQ ID NO:17) 总体积为 $20 \mu\text{l}$ 的商用 RT-PCR 试剂盒 (例如, 但不限于, OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit; Takara Bio Inc., 日本) 进行实时 PCR 分析。实时 PCR 的程序为 42°C 5 分钟、 94°C 10 秒, 以及 40 个循环的 94°C 10 秒以及 60°C 30 分钟。在 60°C 的步骤中记录荧光测量的结果。

[0165] 如图 4E 所示, 计算连续稀释 (10 倍) 的 pTA-SAV 质粒的实时 PCR 分析的标准曲线。至少 10 个拷贝数的 pUC57-BC 质粒可被检测到。所述标准曲线的 R^2 值为 0.99046, 表示本发明的引子对与探针可以被用于实时 PCR, 并产生可信的结果。

[0166] 所述结果表明, 本发明的引子对与探针可用于 iPCR 扩增反应以检测鲑鱼甲病毒 (SAV) 的存在, 并且具有高度敏感度。

[0167] 实施例 5 病原菌感染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV) 的检测

[0168] 病原菌感染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV) 的非结构蛋白与基质蛋白的基因 (GenBank 登录号 DQ785286) 被插入 T&A™ 选殖载体中 (Yeastern biotech, 台湾), 以得到 pTA-ISAV 质粒。

[0169] 此外, 收集来自养殖场的鲑鱼心脏组织, 并进行测试以评估 iPCR 用于野外样本上的表现。来自鲑鱼养殖场的鲑鱼被诊断得到感染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV)。藉由使用商业试剂盒 (例如, 但不限于 FavorPrep™ 病毒核酸萃取试剂盒; Favorgen Biotech Corp., 台湾) 萃取来自组织的 RNA 萃取物。以在波长 260/280nm 下测量吸光率来评估总 RNA 的纯度, 且以琼脂凝胶 (1%) 在 TAE 缓冲液中确认 RNA 的质量, 并且以溴化乙锭染色显现。

[0170] 1. 传统 PCR

[0171] 进行传统 PCR 所用的 $50 \mu\text{l}$ PCR 混合物含有: 稀释的 pTA-ISAV 质粒 (分别为 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 个拷贝数)、 $0.01-2 \mu\text{M}$ 前置引子 ISAVF1 (SEQ ID NO:18)、 $0.01-2 \mu\text{M}$ 后置引子 ISAVR1 (SEQ ID NO:20)、 $0.2 \mu\text{M}$ dNTP 以及 1.25U Taq DNA 聚合酶。在一热循环仪 (例如, 但不限于 PC818, Astec Co. Ltd., 日本) 中进行扩增反应, 且包含一个变性的初始循环 94°C 持续 3 分钟, 以及 35 个循环的 94°C 30 秒、 60°C 30 秒以及 72°C 延展 30 秒。扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析, 并且以溴化乙锭染色显现。

[0172] 传统 PCR 的结果如图 5A 所示。如图 5A 所示, 第 1 至 3 道的条带显示, 本发明的引子 ISAVF1 与 ISAVR1 正确地扩增 92-bp 的目标序列, 而在阴性对照组中则无目标序列被扩

增（第6道）。所述结果表明，所述引子对可用于传统PCR扩增反应以检测感染性鲑鱼贫血病毒（ISAV）的存在。

[0173] 2. iiPCR

[0174] 50 μ l 的 PCR 混合物含有 pTA-ISAV 质粒、0.01-2 μ M 前置引子 ISAVF1 或 ISAVF2（分别为 SEQ ID NOs:18 或 19）、0.01-2 μ M 后置引子 ISAVR1 或 ISAVR2（分别为 SEQ ID NOs:20 或 21）、0.01-2 μ M 探针 ISAVP1（5' FAM-CGACGATGACTCTCTACTGTGT-MGB 3'，SEQ ID NO:22）或 ISAVP2（5' FAM-CGATGACTCTCTACTGTGTGA-MGB 3'，SEQ ID NO:38）、1X qPCR 缓冲液以及 1-5U Taq DNA 聚合酶。将 PCR 混合物加入一反应试管中，并置于一 iiPCR 仪中一段指定的时间（约 1 小时）。以所述 iiPCR 仪侦测每个样本中的 FAM 荧光。此外，扩增的产物接着以 15% 聚丙烯酰胺凝胶在 TAE 缓冲液中分析，并且以溴化乙锭染色显现。iiPCR 的结果如图 5B 及 5C 所示。

[0175] 如图 5B 所示，第 1、3、5 及 7 道的条带显示，本发明的引子 ISAVF1 与 ISAVR1、ISAVF1 与 ISAVR2、ISAVF2 与 ISAVR2 分别正确地扩增 92-bp、93-bp 以及 128-bp 的目标序列（如箭头所指），而在阴性对照组中则无目标序列被扩增（第 1、3、5 及 7 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在阴性对照组中则未侦测到荧光讯号。

[0176] 如图 5C 所示，第 5、6 及 7 道的条带显示，所述引子 ISAVF1（SEQ ID NO:18）与 ISAVR1（SEQ ID NO:20）可在含有 10^4 、 10^5 、 10^6 个拷贝数的 pTA-ISAV 质粒样本中正确地扩增 92-bp 的目标序列（如箭头所指），而在阴性对照组以及含有 10^1 、 10^2 、 10^3 个拷贝数的 pTA-ISAV DNA 质粒的样本中，则无目标序列被扩增（第 1 至 4 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在第 1 至 4 道中则未侦测到荧光讯号。

[0177] 以来自得到感染性鲑鱼贫血病毒（ISAV）的鱼类而来的总 RNA 萃取物（分别为稀释至 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 倍数），重复上述 iiPCR 分析试验，以评估引子 ISAVF1（SEQ ID NO:18）与 ISAVR1（SEQ ID NO:20）以及探针 ISAVP2（5' FAM-CGATGACTCTCTACTGTGTGA-MGB 3'，SEQ ID NO:38）的敏感度。以总 RNA 萃取物进行 iiPCR 分析的试验，还加入 50U MMLV RTase 与 4U RNase 抑制剂至反应物中。重复所述 iiPCR 分析试验 5 次（n = 5），其结果如表 7 及图 5D 所示。

[0178] 表 7 引子 ISAVF1、ISAVR1 与探针 ISAVP1 的敏感度测试结果（n = 5）

[0179]

RNA 稀释倍数	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
阳性率%	0	20	60	100	100	100

[0180] 如图 5D 所示，第 4 至 7 道的条带显示，所述引子 ISAVF1 与 ISAVR1 可正确地扩增 92-bp 的目标序列（如箭头所指），而在阴性对照组以及稀释至 10^6 、 10^7 倍的 RNA 样本中则无目标序列被扩增（第 1 至 3 道）。此外，以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应（即侦测到荧光），而在阴性对照组以及稀释至 10^6 、 10^7 倍的 RNA 样本中则未侦测到荧光讯号。

[0181] 以萃取自鲑鱼肌肉组织的 DNA 萃取物以及不同鱼类病原菌的 DNA/RNA 模板（分

别为 SAV、IPNV、NNV、PRV 以及 ISAV) 进行 iiPCR, 以分析引子 ISAVF1 (SEQ ID NO:18)、ISAVR1 (SEQ ID NO:20) 与探针 ISAVP2 (SEQ ID NO:38) 的专一性。

[0182] iiPCR 的结果如图 5E 所示。如图 5E 所示, 只有在含有 ISAV 的 RNA 模板的样本中 (第 7 道) 可以正确地扩增 92-bp 的目标序列 (如箭头所指), 而在阴性对照组以及含 SAV、IPNV、NNV、PRV 的 DNA/RNA 模板以及萃取自鲑鱼肌肉组织的 DNA 萃取物的样本中则无目标序列被扩增 (第 1 至 6 道)。此外, 以所述 iiPCR 仪在相同的样本中侦测到显著的探针水解反应 (即侦测到荧光), 而在第 1 至 6 道中则未侦测到荧光讯号。

[0183] 3. 实时 PCR

[0184] 以稀释的 pTA-ISAV 质粒 (分别为 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ 个拷贝数) 于一实时 PCR 仪 (例如, 但不限于 ABI StepOnePlus™; Applied BioSystem, Life Technologies, 加州, 美国) 中进行实时 PCR 分析。以含有 $2 \mu\text{l}$ pUC57-BC 质粒、 $0.01\text{-}2 \mu\text{M}$ 前置引子 ISAVF1 (SEQ ID NO:18)、 $0.01\text{-}2 \mu\text{M}$ 后置引子 ISAVR1 (SEQ ID NO:20)、 $0.01\text{-}2 \mu\text{M}$ 探针 ISAVP2 (5'FAM-CGATGACTCTCTACTGTGTGA-MGB 3', SEQ ID NO:38) 总体积为 $20 \mu\text{l}$ 的商用 RT-PCR 试剂盒 (例如, 但不限于, OneStep PrimeScript™ RT-PCR Kit; Takara Bio Inc., 日本) 进行实时 PCR 分析。实时 PCR 的程序为 42°C 5 分钟、 94°C 10 秒, 以及 40 个循环的 94°C 10 秒以及 60°C 30 分钟。在 60°C 的步骤中记录荧光测量的结果。

[0185] 如图 5F 所示, 计算连续稀释 (10 倍) 的 pTA-IPNV 质粒的实时 PCR 分析的标准曲线。至少 100 个拷贝数的 pTA-IPNV 质粒可被侦测到。所述标准曲线的 R^2 值为 0.992, 表示本发明的引子对与探针可以被用于实时 PCR, 并产生可信的结果。

[0186] 所述结果表明, 本发明的引子对与探针可用于 iiPCR 扩增反应以检测感染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV) 的存在, 并且具有高度敏感度及专一性。

[0187] 上列详细说明系针对本发明之一可行实施例的具体说明, 惟该实施例并非用以限制本发明的专利范围, 凡未脱离本发明技艺精神所为的等效实施或变更, 均应包含于本案的专利范围中。

[0001]

序列表

<110> 富创蓝图有限公司

<120> 冷水鱼病原菌检测方法

<130> P15-0060

<150> US 61/981,311

<151> 2014-04-18

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的前置引子

<400> 1

gogaaagtta agctaatacc gcata

25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的反置引子

<400> 2

taatcagcca tcagcgcgc

20

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 用于检测病原菌Candidatus Branchiomonas cysticola的探针

<400> 3

caggettcca tctacca

17

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的前置引子

<400> 4

tcaacgttat cggctggga

19

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的反置引子

<400> 5

gaatccgctg cagatgagta gag

23

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的探针

<400> 6

ctccaggagt cattgta

17

<210> 7

<211> 20

[0003]

- <212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 用于检测病原菌感染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)的前置引子
- <400> 7
tccaaaagctc cacactaacg 20
- <210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 用于检测病原菌感染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)的反置引子
- <400> 8
ctcagacaga ctgccttega a 21
- <210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 用于检测病原菌感染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)的反置引子
- <400> 9
tccacctcag acagactgcc t. 21
- <210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 用于检测病原菌感染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)的探针
- <400> 10
acgctcaacg ctgcc. 16

[0004]

- <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的前置引子

 <400> 11
 caccagtatc tgcctgaacg a 21

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

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的前置引子

 <400> 12
 cggacacgtc actggaaac 19

 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的前置引子

 <400> 13
 gaaaccacca gtatctgoc t ga 22

 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>

[0005]

<223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的反置引子

<400> 14

cacgtcctgg tacactgaaa

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的反置引子

<400> 15

tcttggtaca ctgcaatata gg

22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的反置引子

<400> 16

ccttggtacac tgeaatatcg g

21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鲑鱼甲病毒(salmonid alphavirus, SAV)的探针

<400> 17

cgtgagttgt aaagtaaag

19

<210> 18

<211> 20

[0006]

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的前置引子
- <400> 18
 ccaattgggtg aacggaatga 20
- <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的前置引子
- <400> 19
 ccagaagggga aaatgggtgaa ag 22
- <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的反置引子
- <400> 20
 tcatacagtggt cgccatgctt 20
- <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的反置引子
- <400> 21

[0007]

ctcatcagtg tgcceatgct	20
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的探针	
<400> 22	
cgacgatgac tctctactgt gt	22
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌Candidatus Branchiomonas cysticola的前置引子	
<400> 23	
ttgacatgtg cggagctg	19
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌Candidatus Branchiomonas cysticola的反置引子	
<400> 24	
ccaacatctc acgacaagag	20
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0008]

- <220>
- <223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的前置引子
- <400> 25
gacatgtgcg gaagctgtaa ga 22
- <210> 26
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
- <223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的反置引子
- <400> 26
acgacagcca tgcagca 17
- <210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
- <223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的前置引子
- <400> 27
tgacatgtgc ggaagctg 18
- <210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
- <223> 用于检测病原菌 *Candidatus Branchiomonas cysticola* 的反置引子
- <400> 28
cccaacatct cacgacag 19
- <210> 29

[0009]

- <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌Candidatus Branchiomonas cysticola的探针

 <400> 29
 cggcgtgcct gagaa 15
- <210> 30
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的前置引子

 <400> 30
 atcggctggg agcaatg 17
- <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的反置引子

 <400> 31
 tctactcegt tgaatcegt 20
- <210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的前置引子

 <400> 32

[0010]

tgggagcaat gggatgc	17
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的前置引子	
<400> 33	
tctetggtct caacgttate gg	22
<210> 34	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的反置引子	
<400> 34	
ccgttgaatc ogctgca	17
<210> 35	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的前置引子	
<400> 35	
gggttctctg gtctcaacgt tat	23
<210> 36	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0011]

<220>

<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的反置引子

<400> 36

accggcgaca atgactcct

19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌鱼呼吸道与肠道病毒(piscine reovirus, PRV)的探针

<400> 37

caatgggatg ctaacactc

19

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于检测病原菌感染性鲑鱼贫血病毒(infectious salmon anemia virus, ISAV)的探针

<400> 38

cgatgactct ctactgtgtg a

21

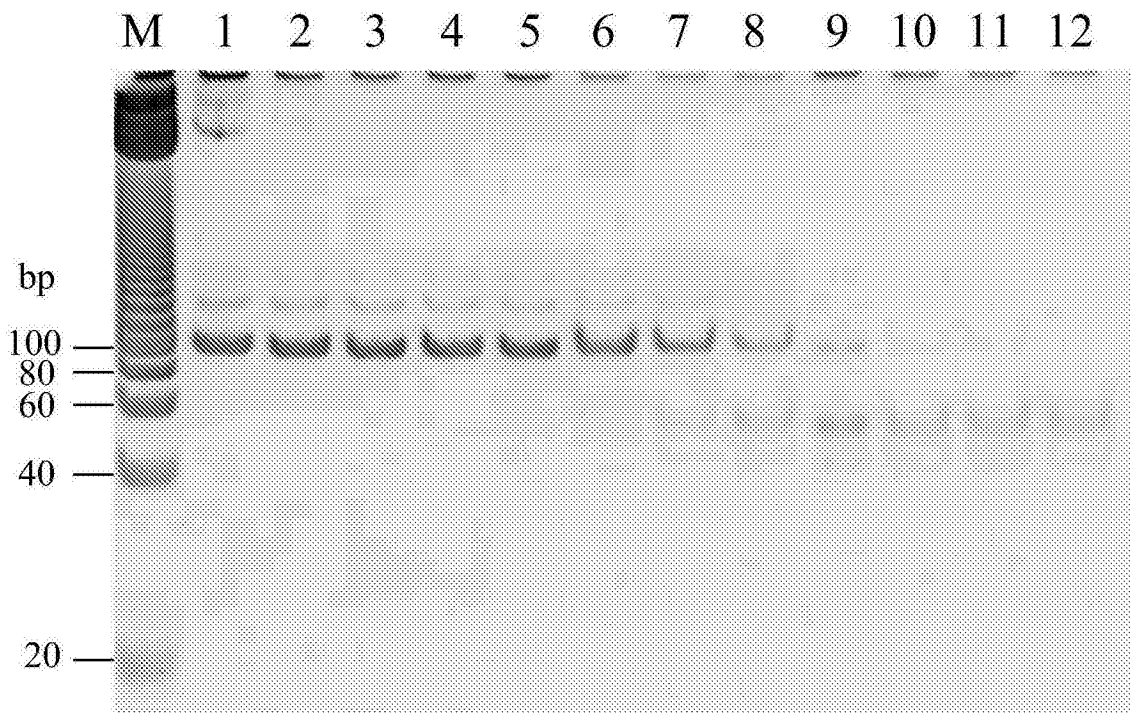


图 1A

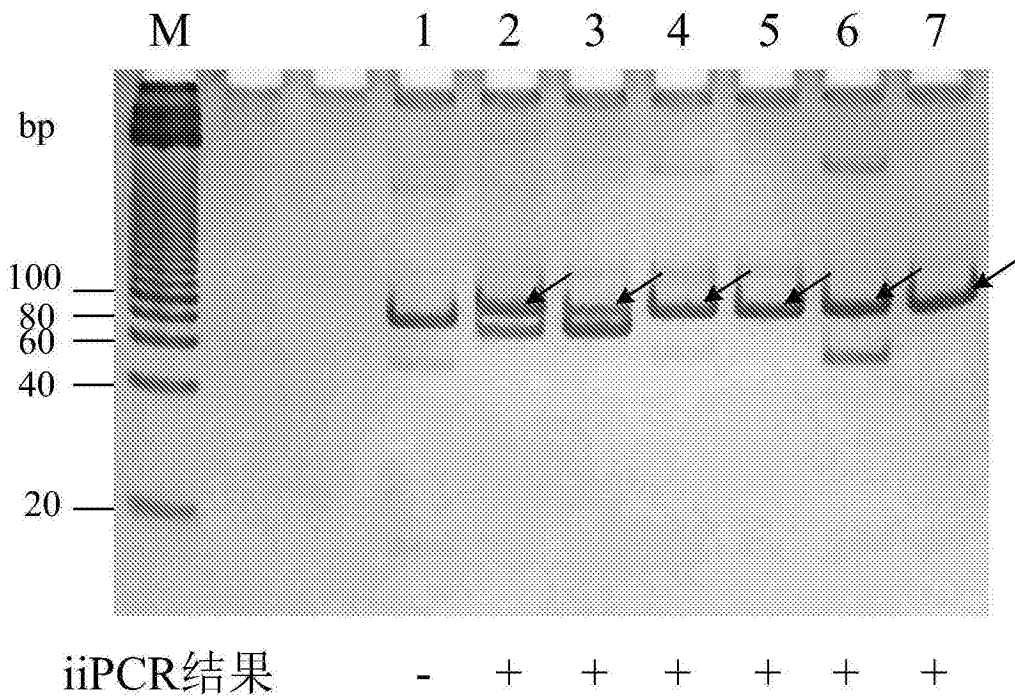
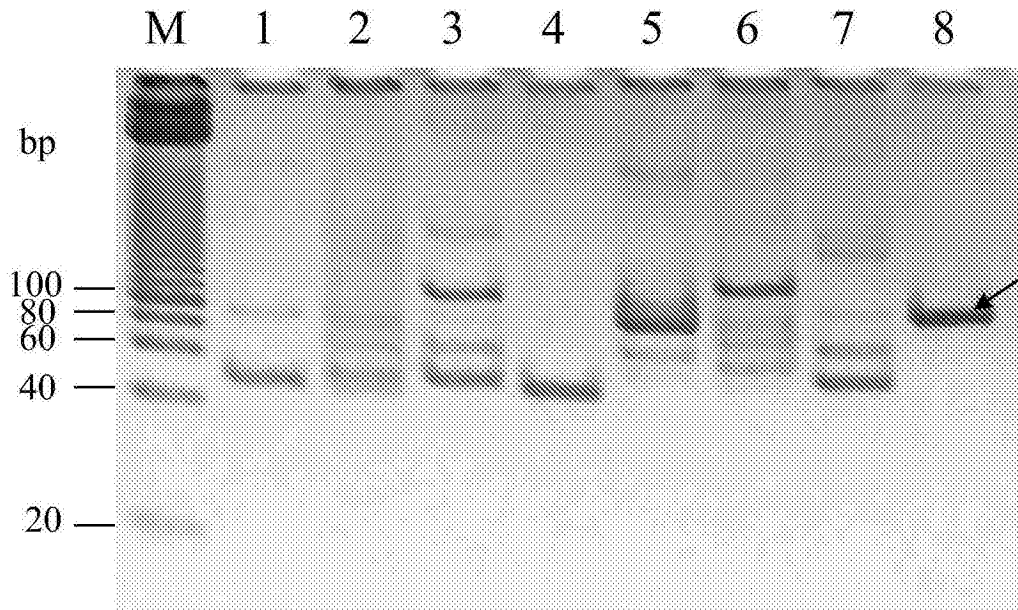


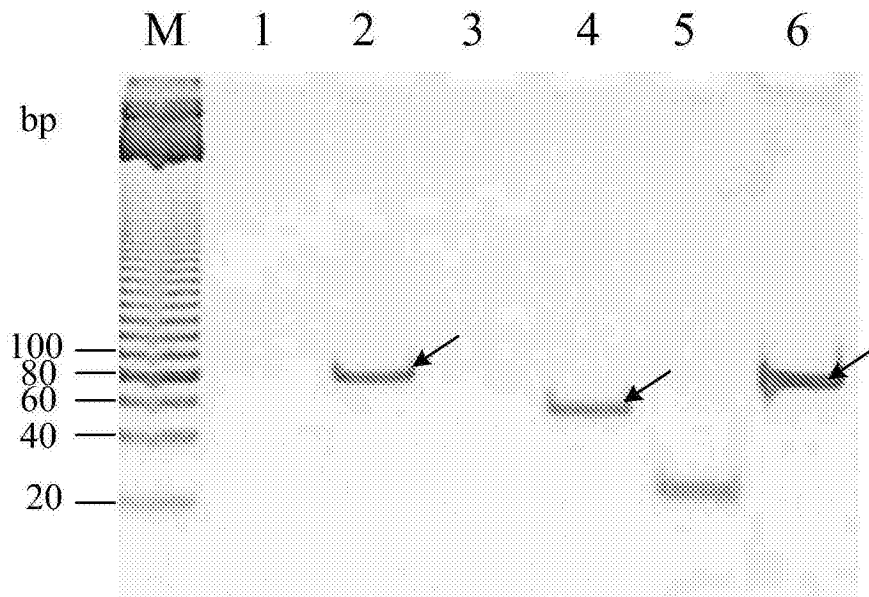
图 1B



iiPCR结果

- - - - - - - +

图 1C



iiPCR结果

- + - + - +

图 1D

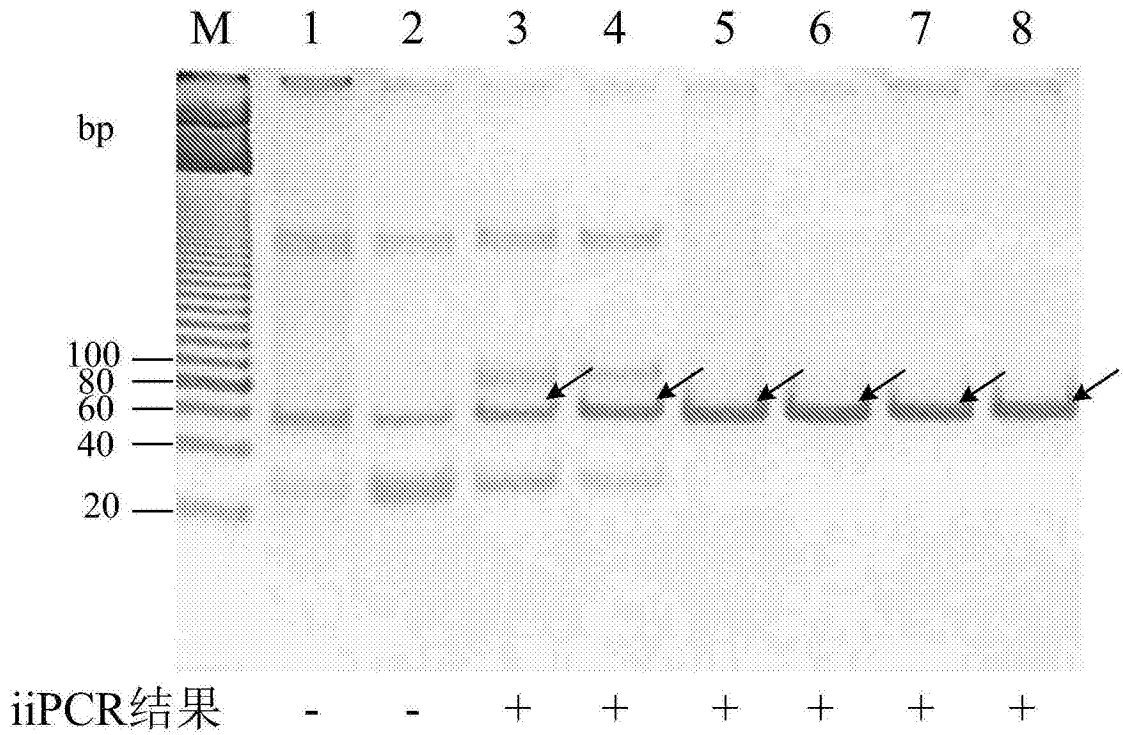


图 1E

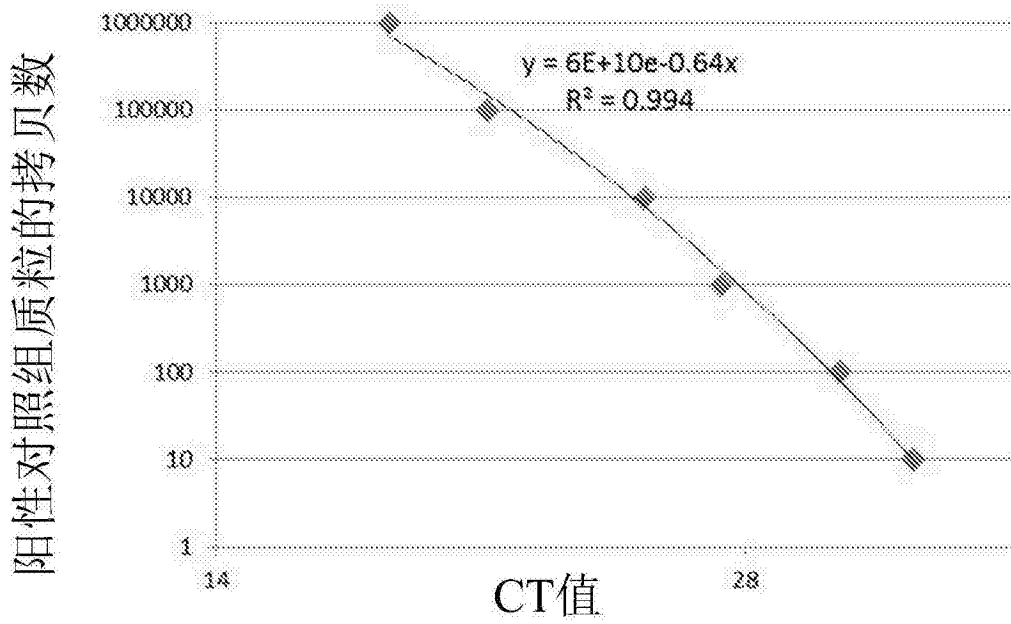


图 1F

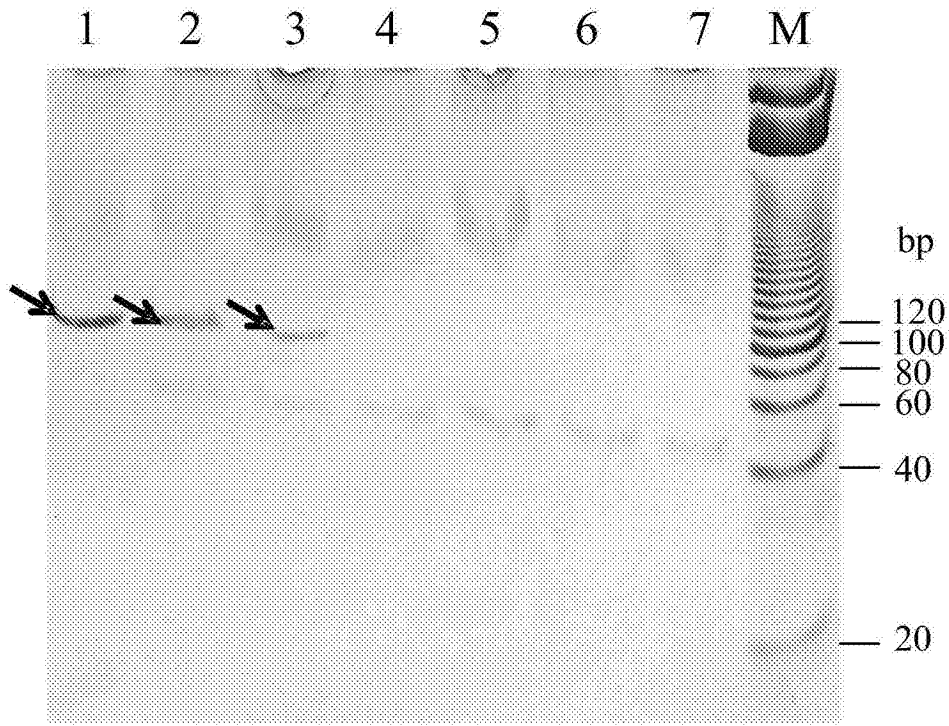


图 2A

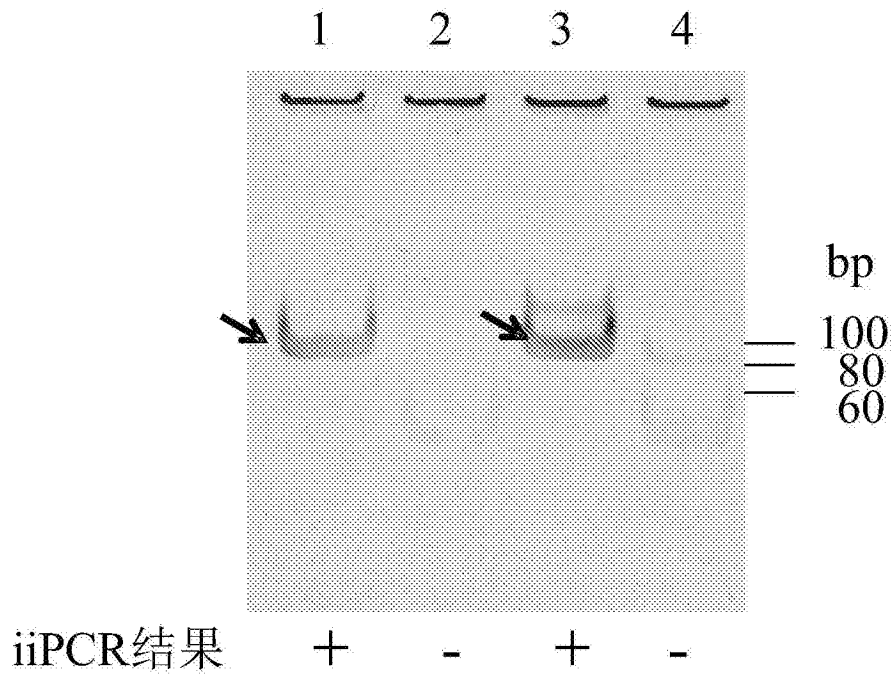


图 2B

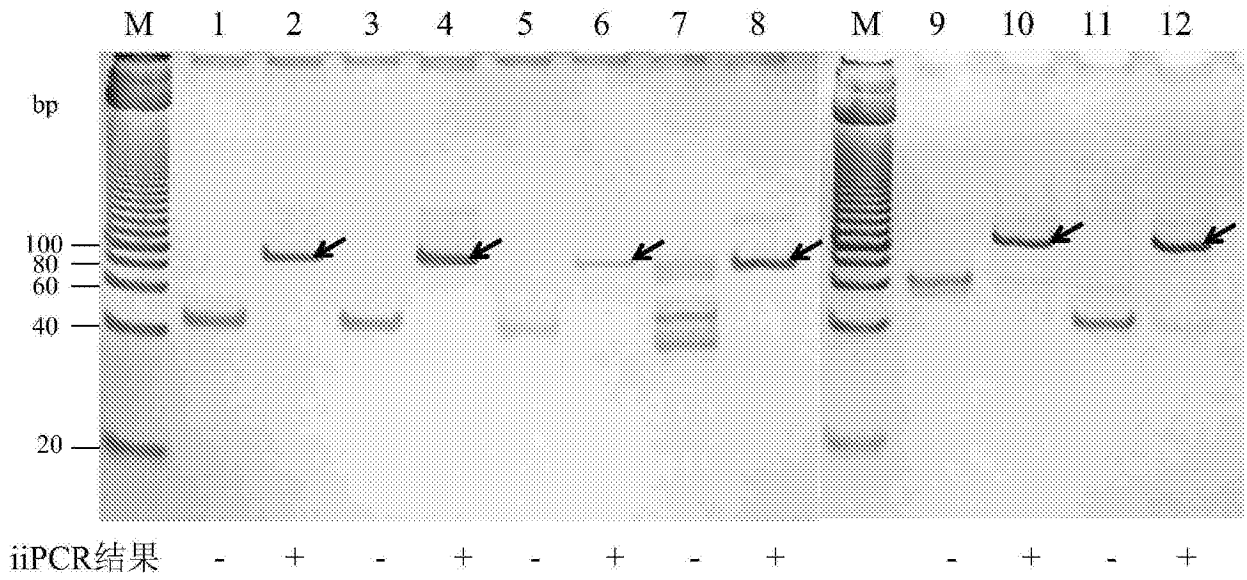


图 2C

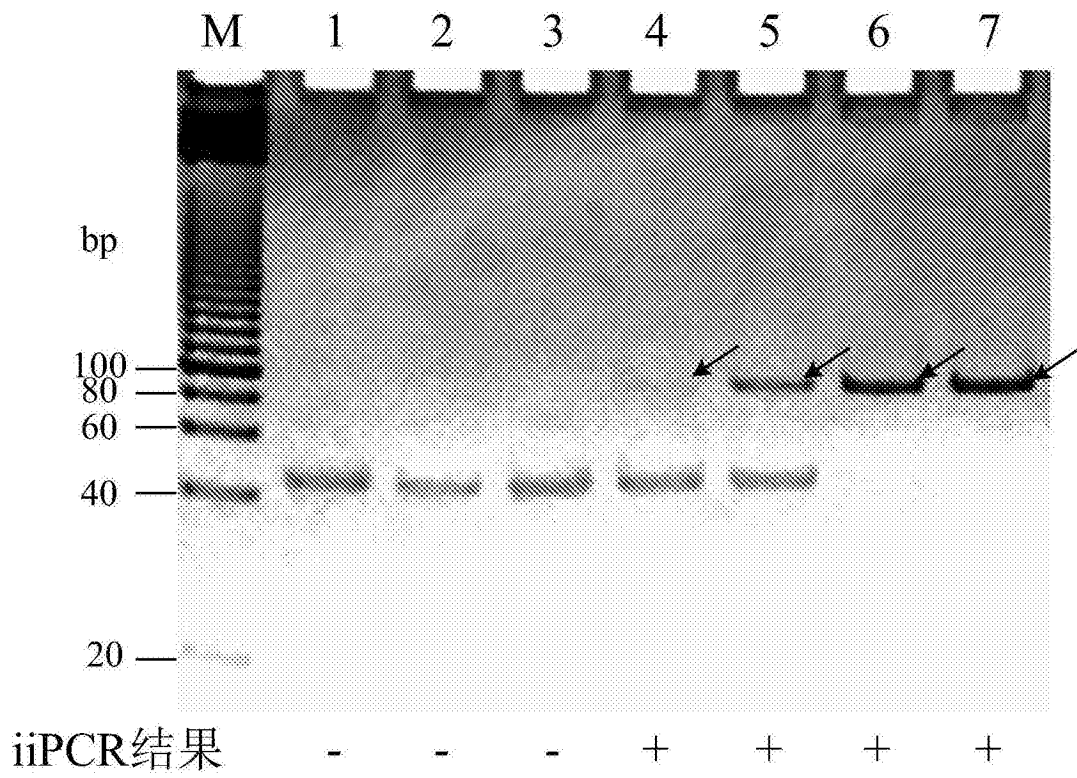


图 2D

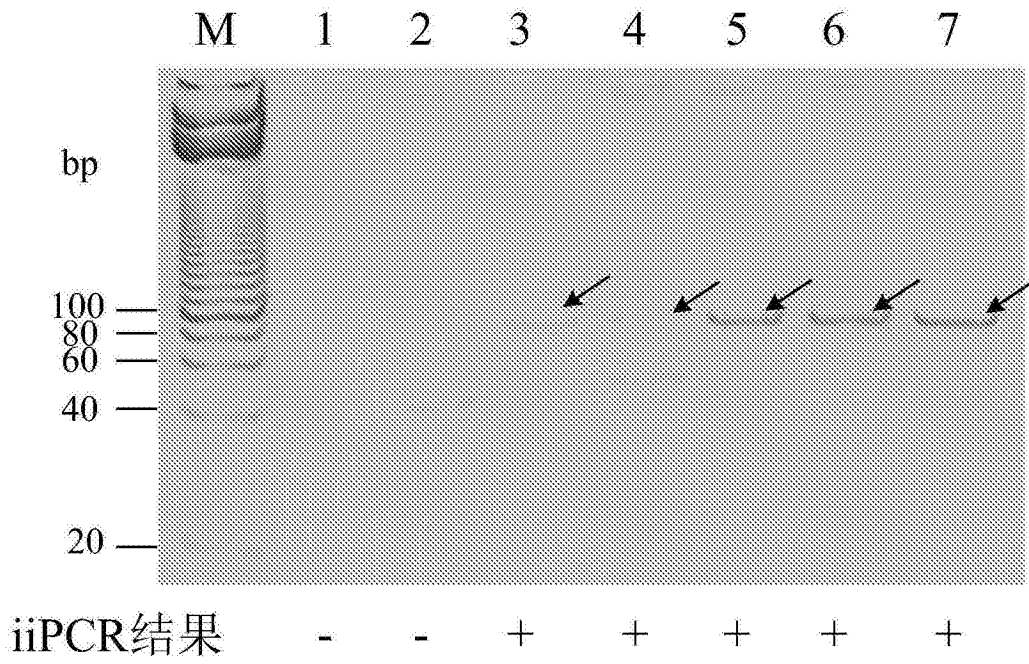


图 2E

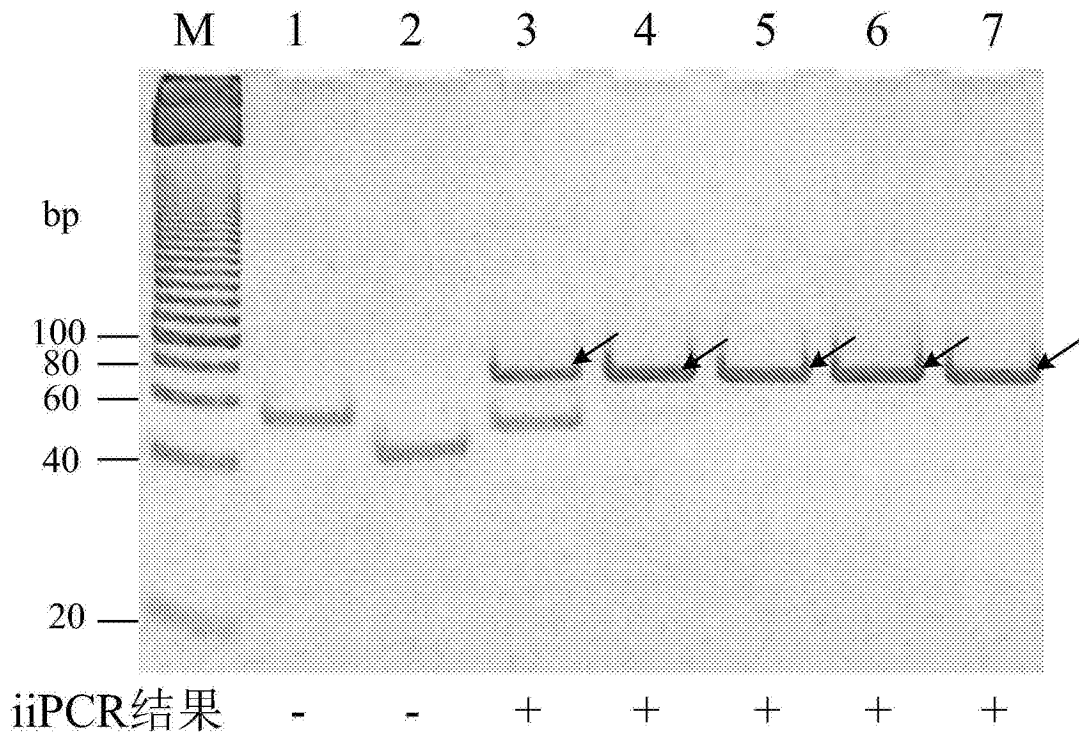


图 2F

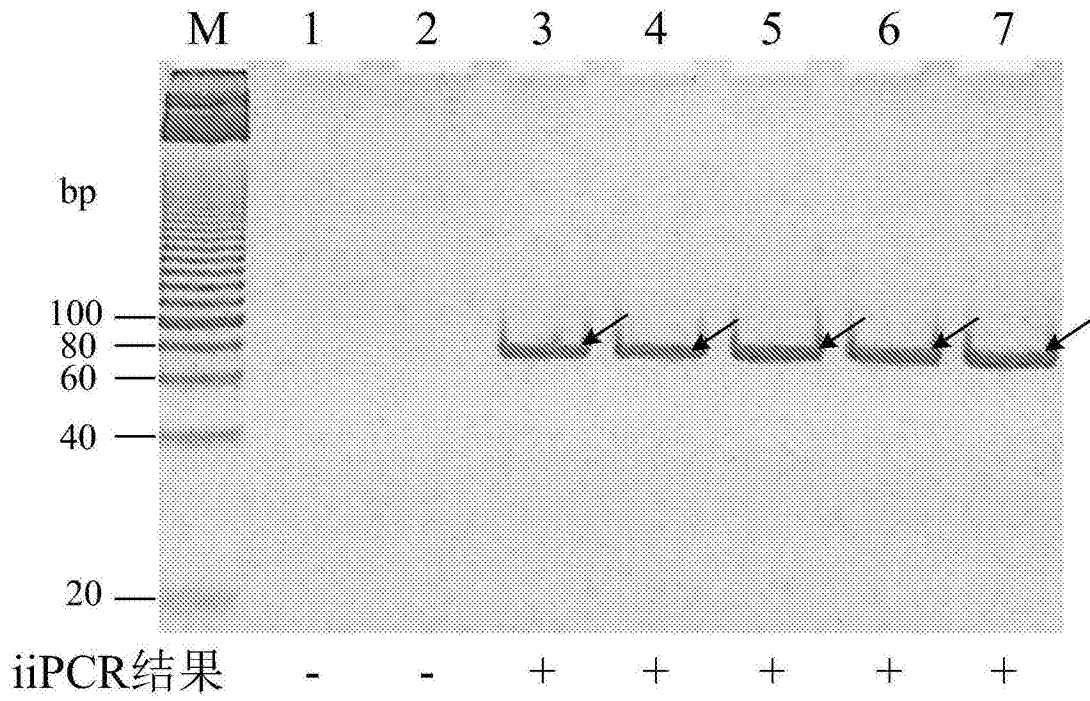


图 2G

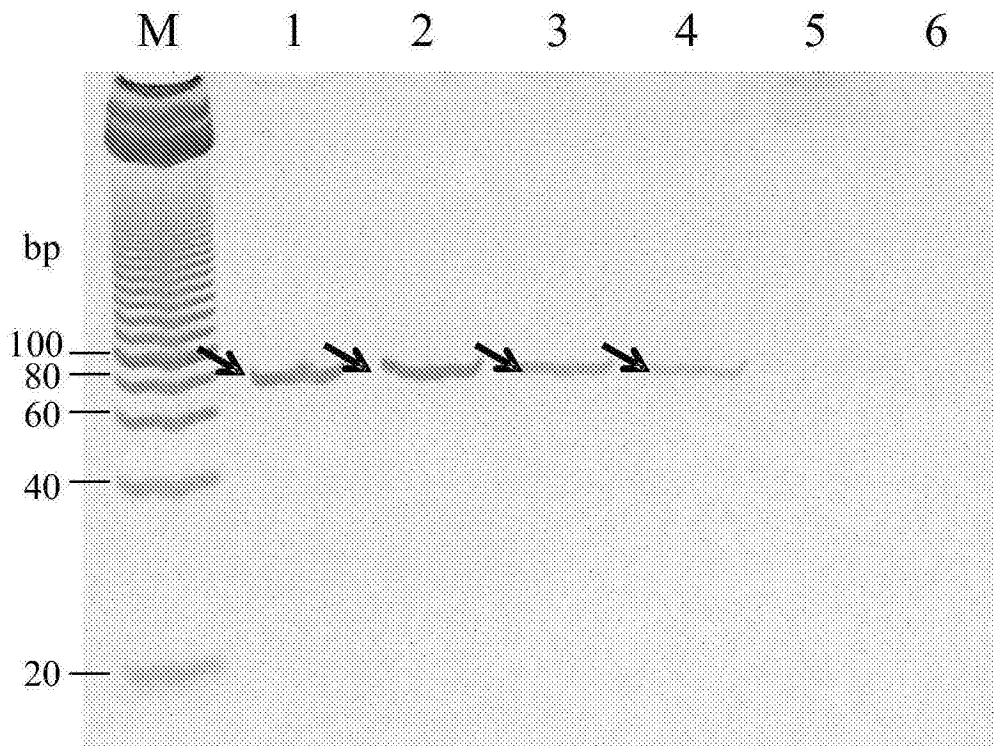


图 3A

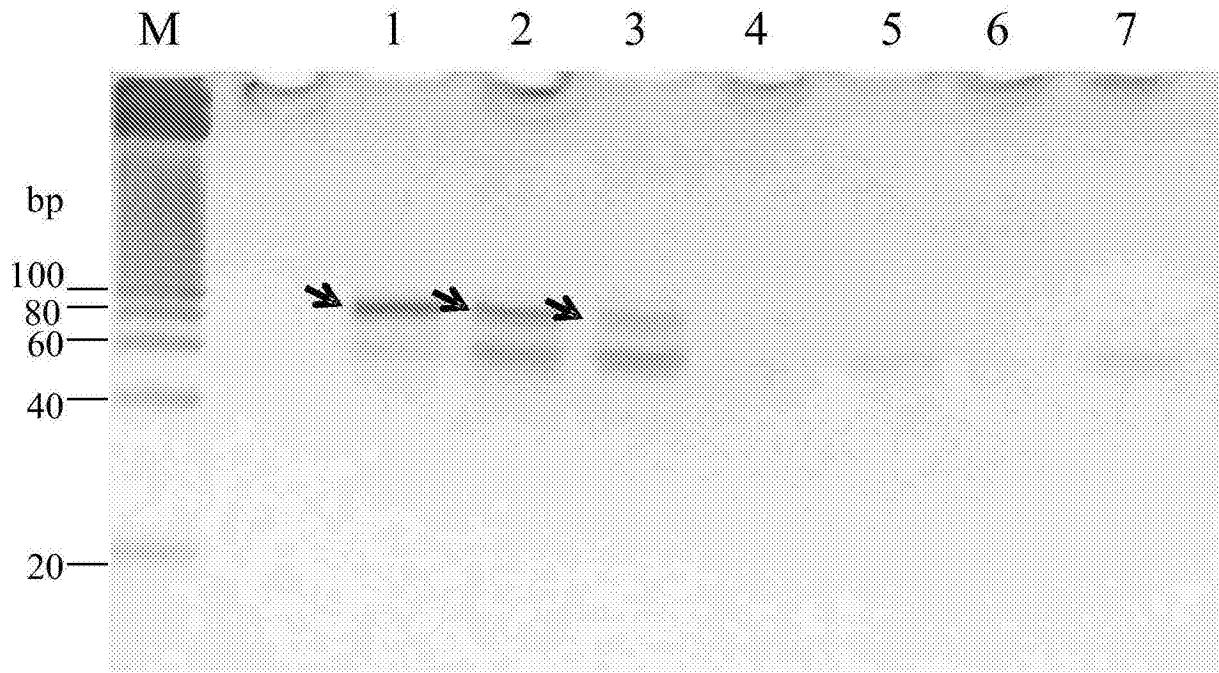


图 3B

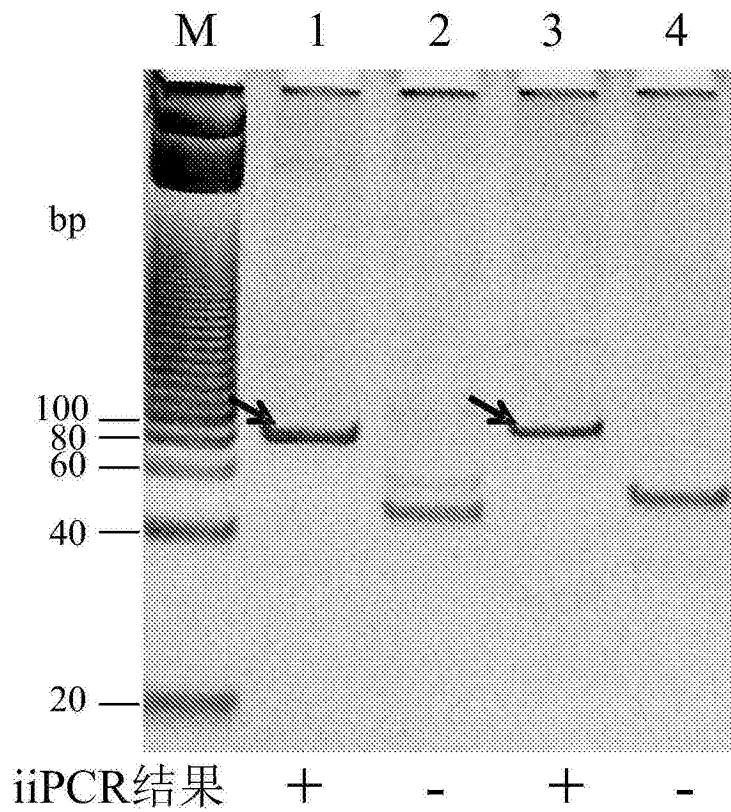


图 3C

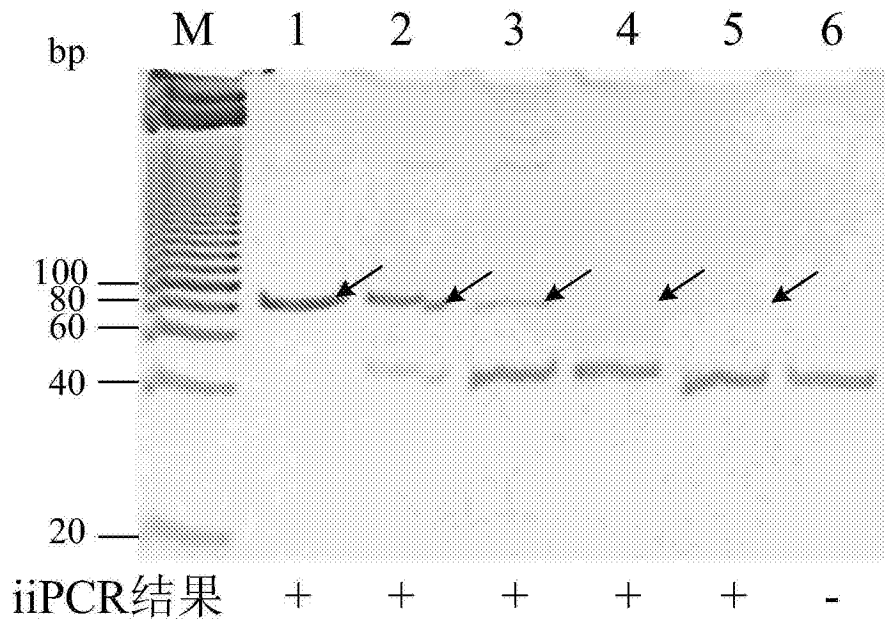


图 3D

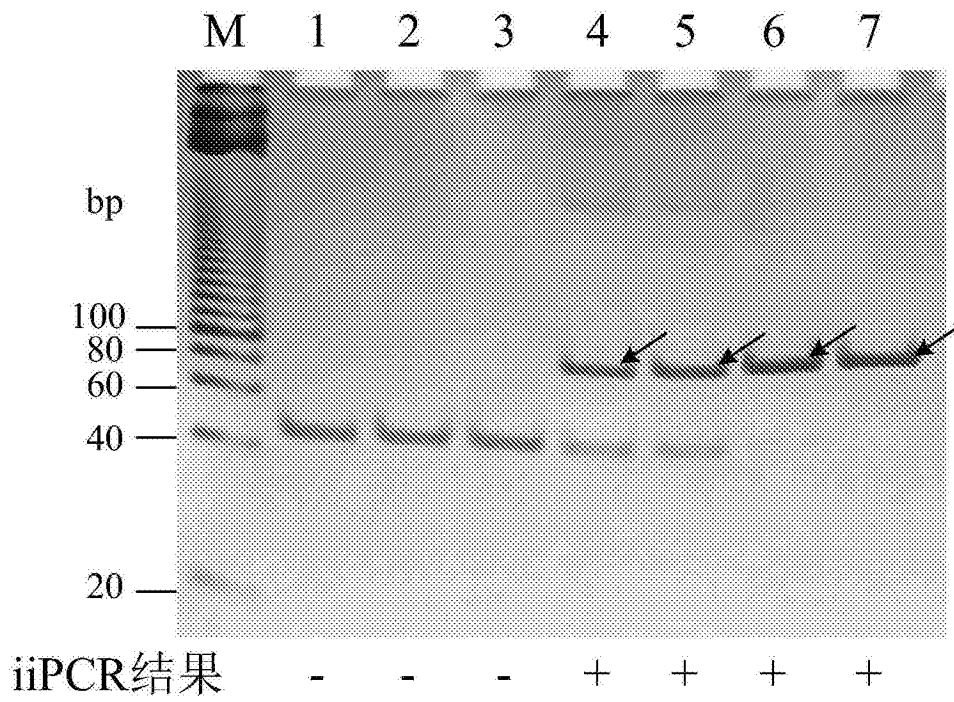


图 3E

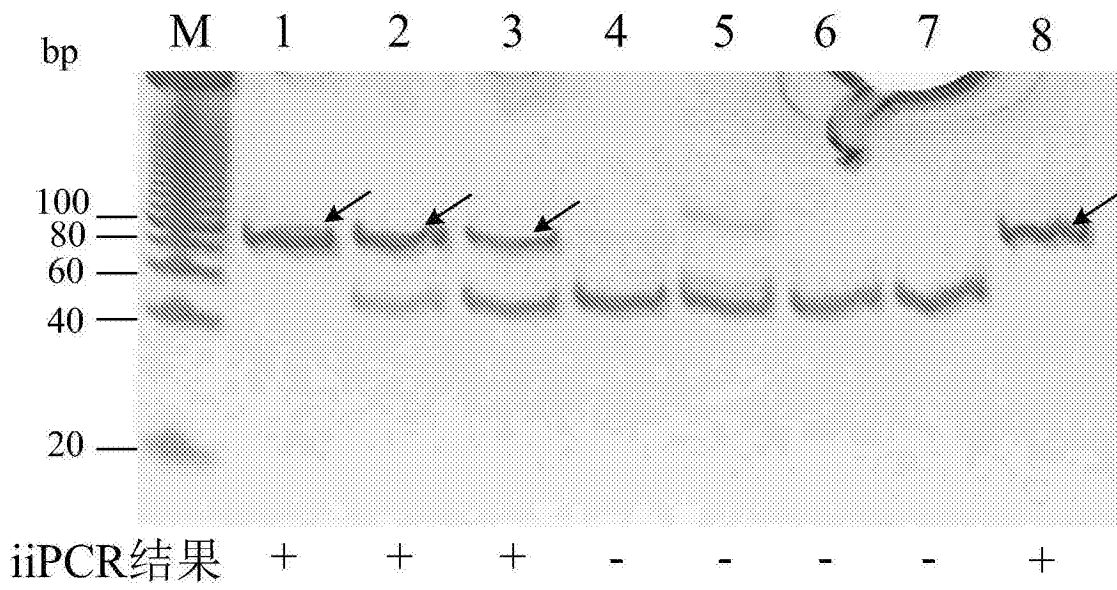


图 3F

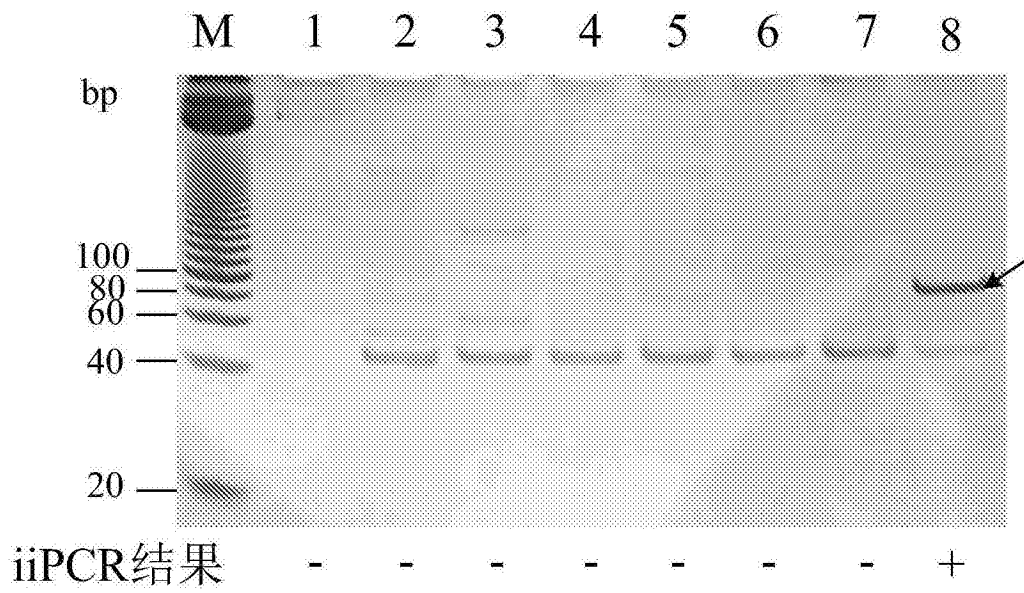


图 3G

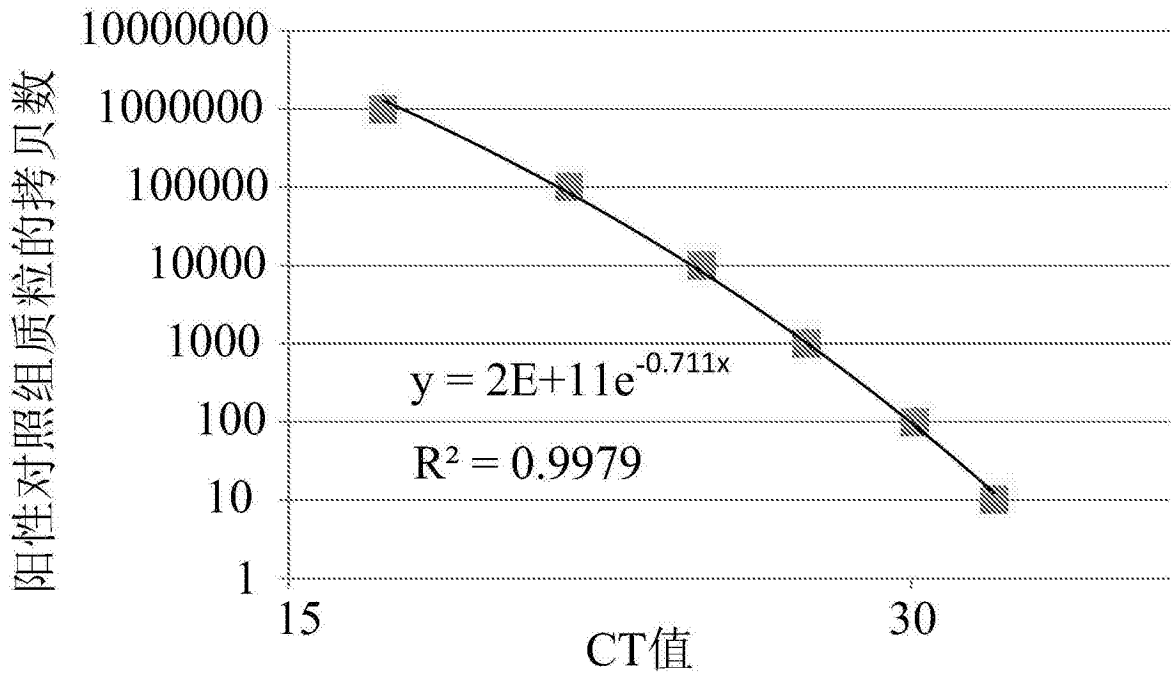


图 3H

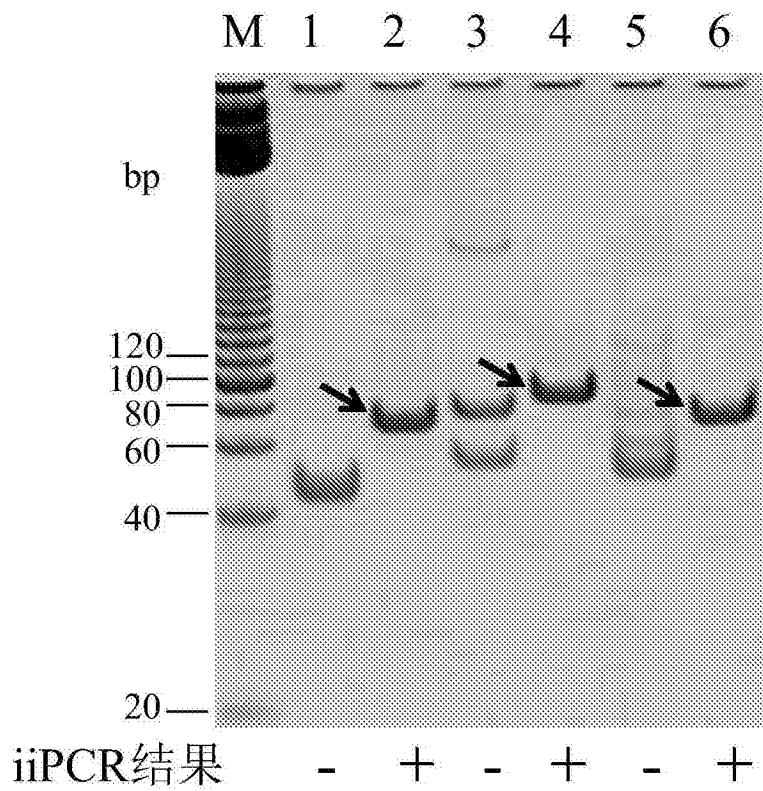


图 4A

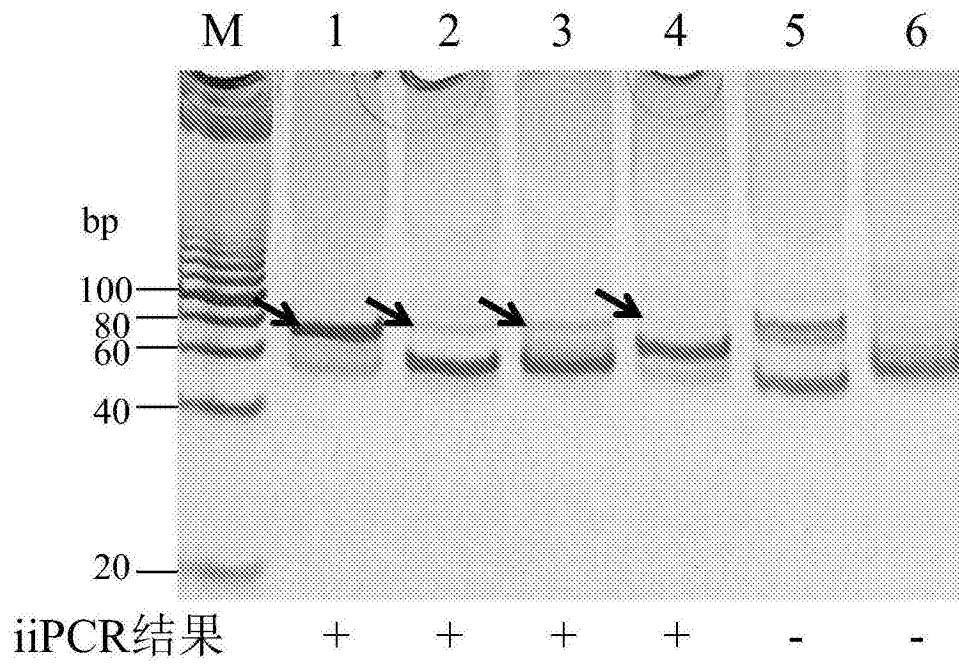


图 4B

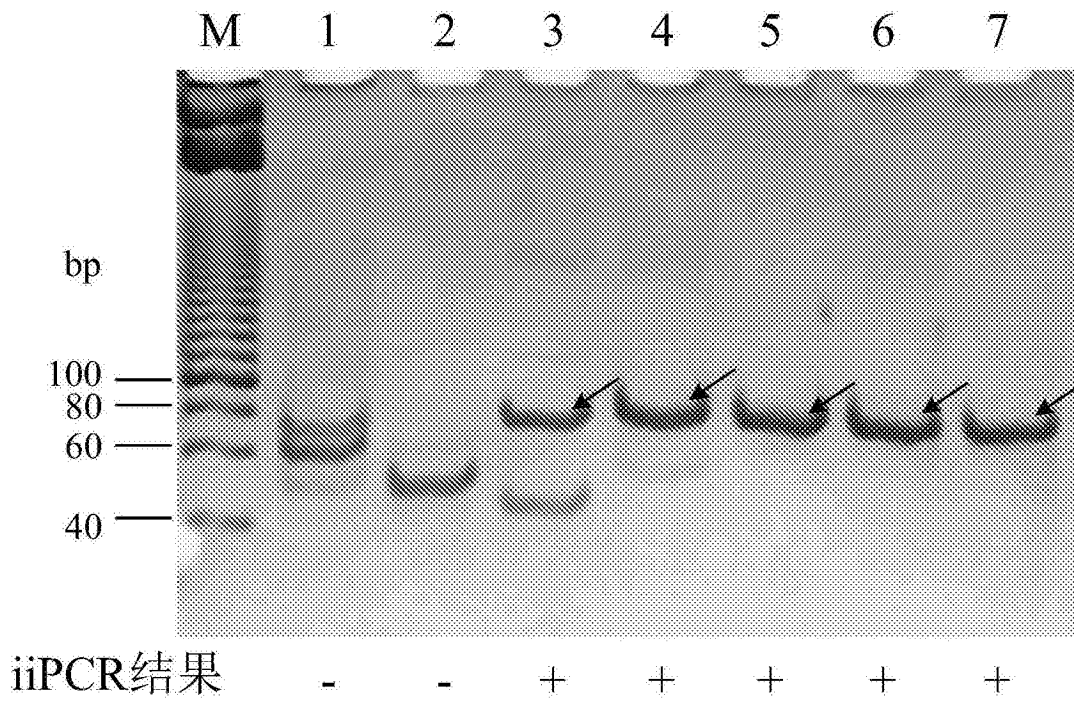


图 4C

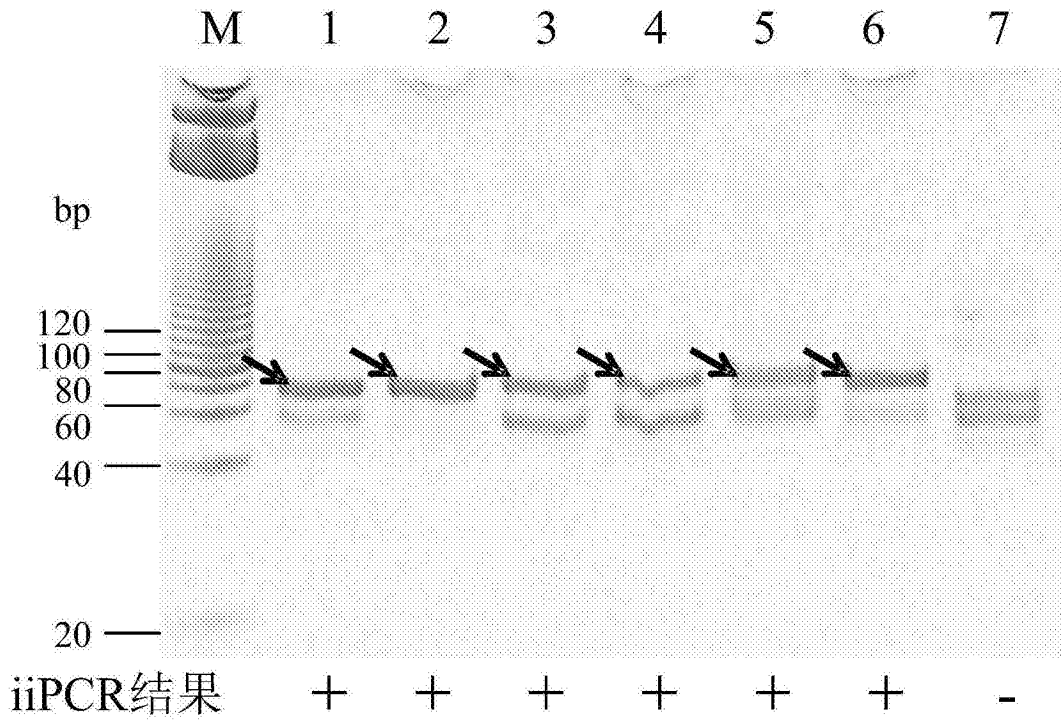


图 4D

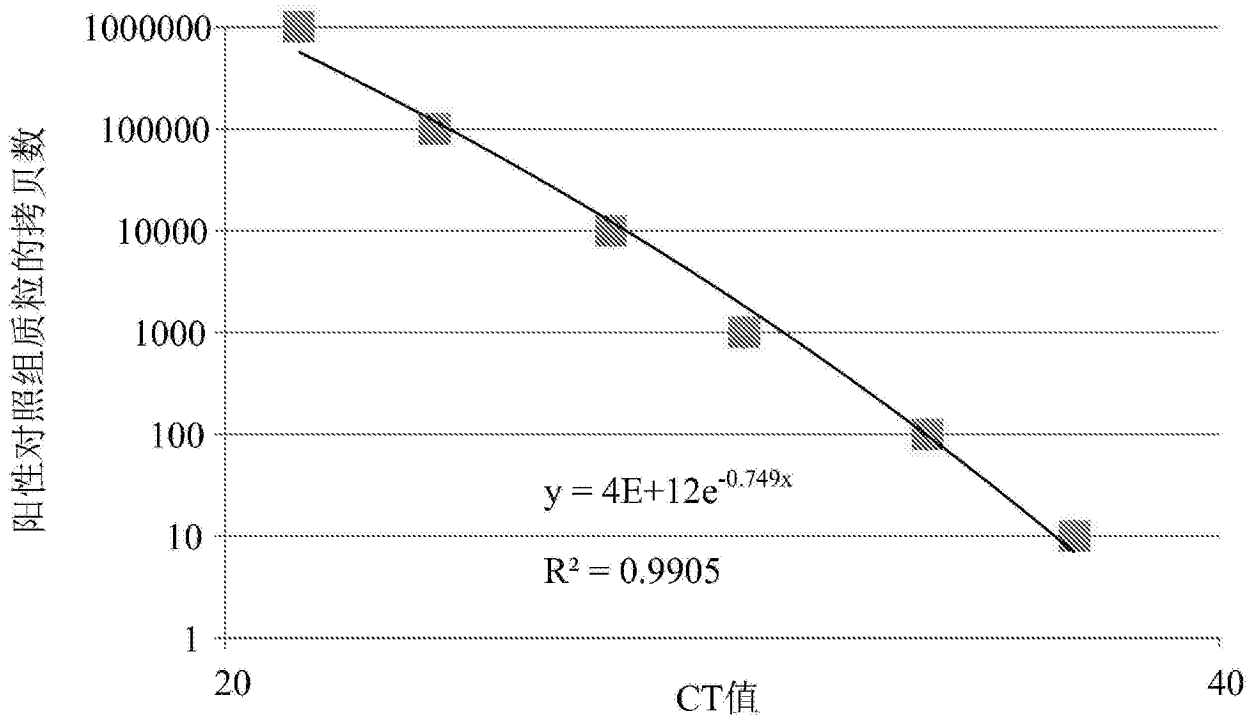


图 4E

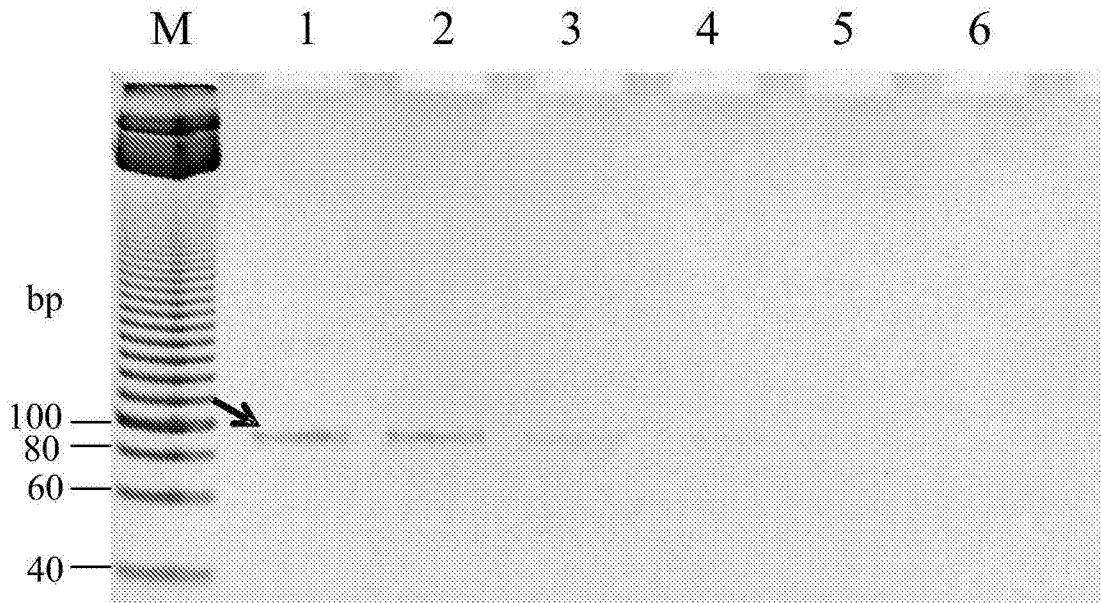


图 5A

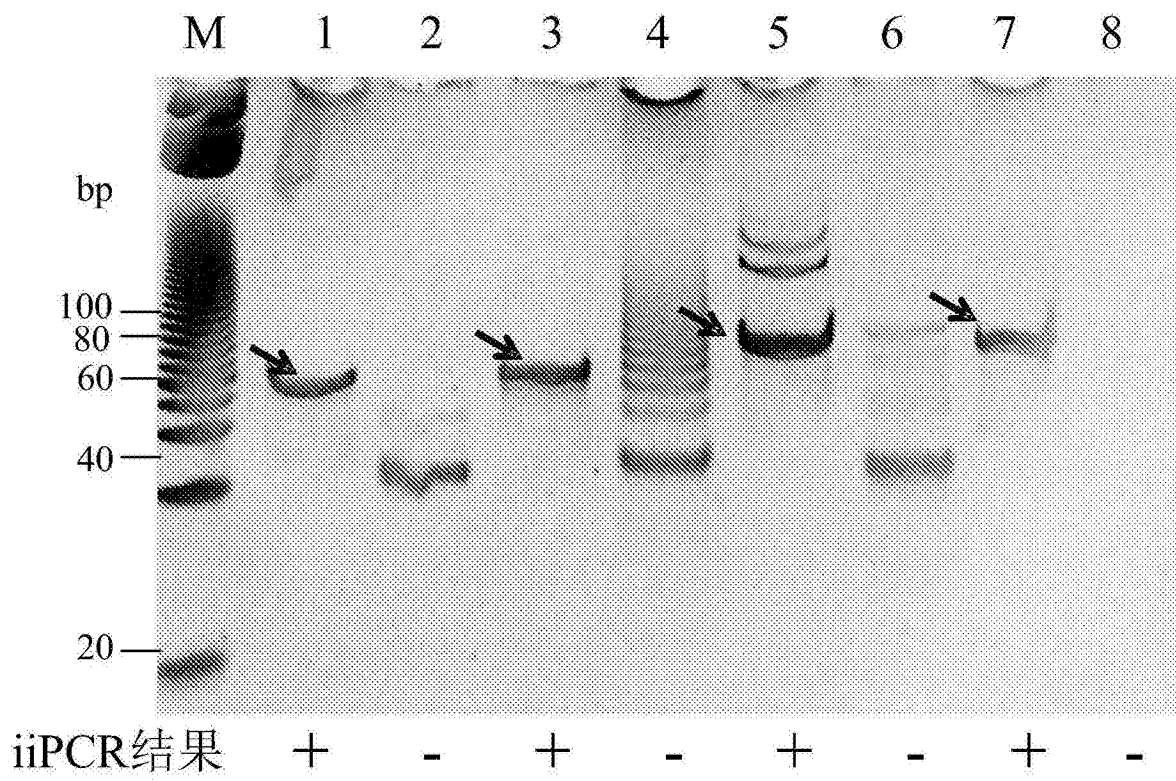


图 5B

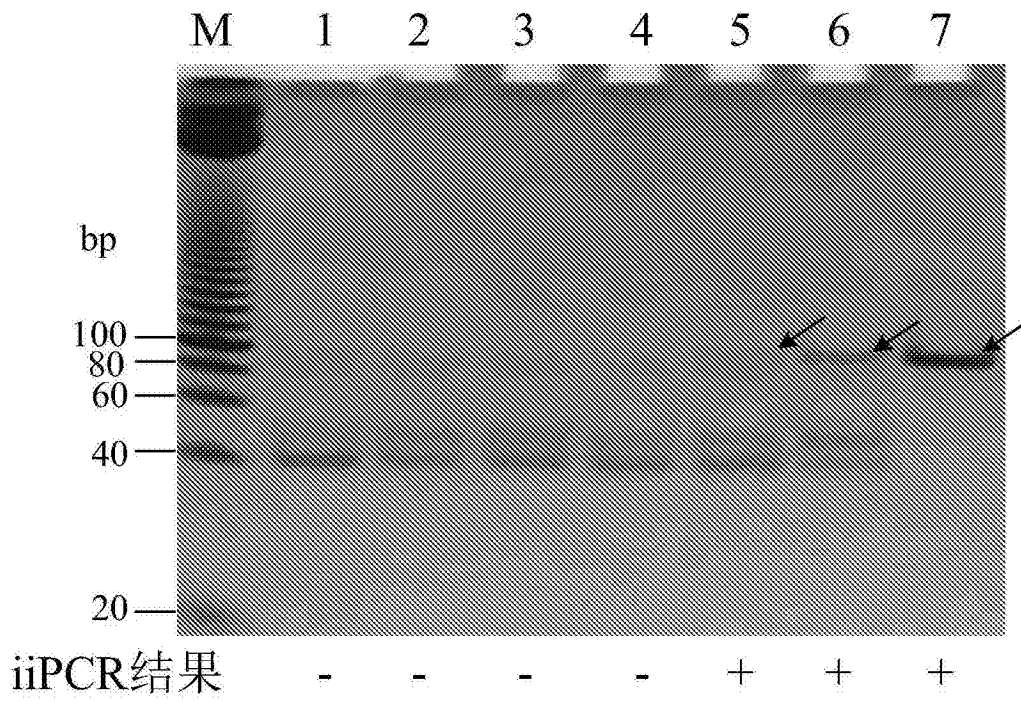


图 5C

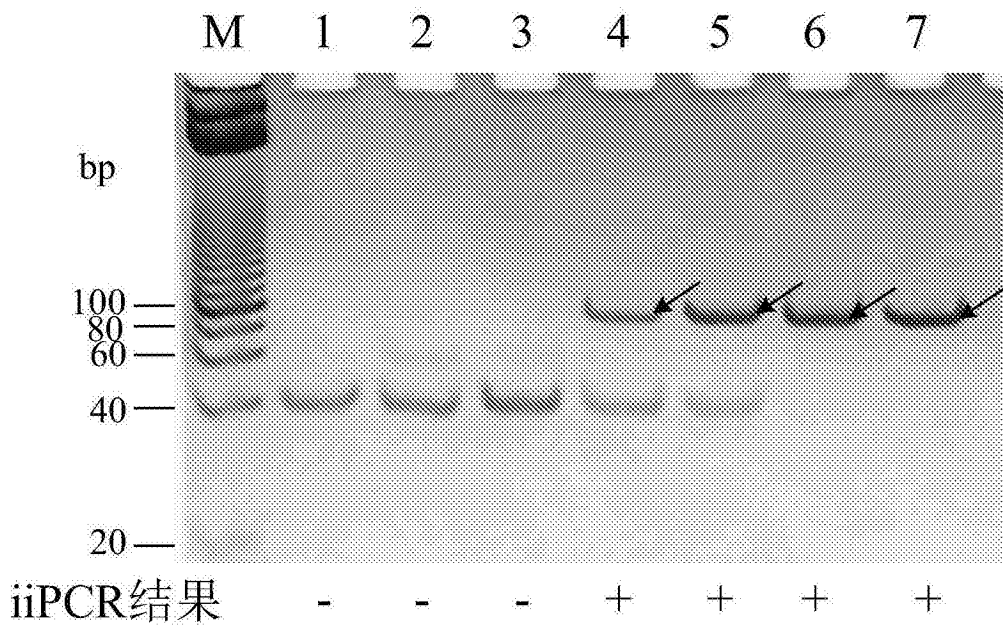


图 5D

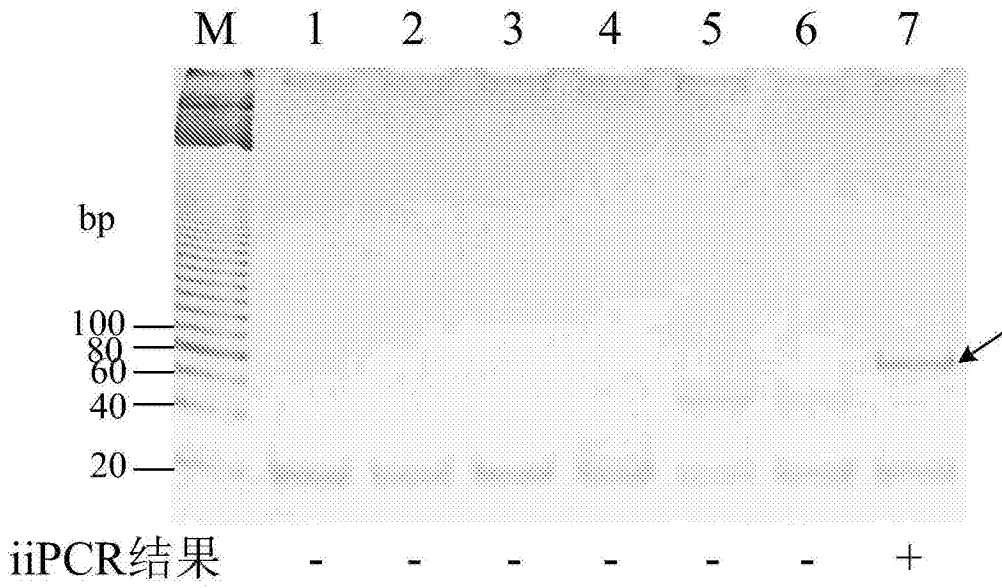


图 5E

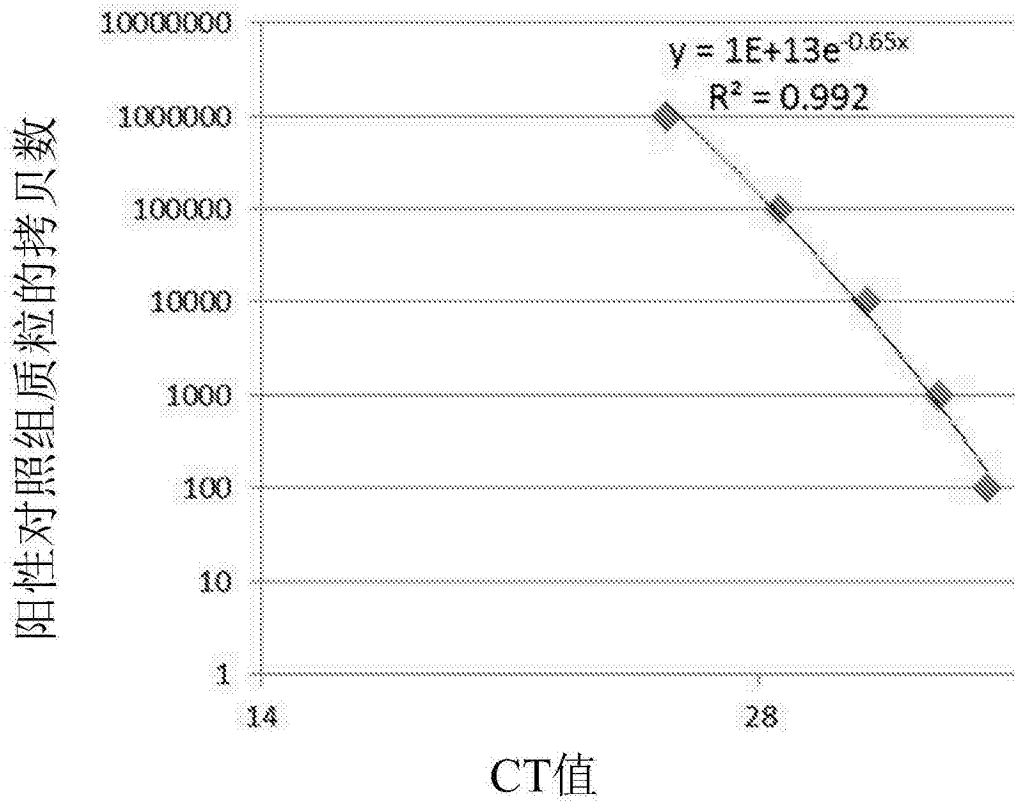


图 5F