



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106191314 B

(45)授权公告日 2019.12.20

(21)申请号 201610595919.9

C12Q 1/6844(2018.01)

(22)申请日 2016.07.26

C12N 15/11(2006.01)

C12R 1/93(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106191314 A

(56)对比文件

CN 103952497 A, 2014.07.30,

US 2006240462 A1, 2006.10.26,

(43)申请公布日 2016.12.07

(73)专利权人 严银芳

审查员 幸颖

地址 430071 湖北省武汉市武昌区东湖路  
185号武汉大学基础医学院病毒学研  
究所

(72)发明人 严银芳 严文馨 刘军 高平

(74)专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务

所(普通合伙) 61223

代理人 俞晓明

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

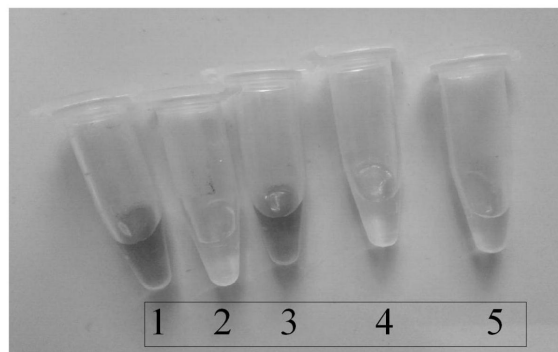
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种DNA病毒的LAMP检测试剂盒、检测方法  
及应用

(57)摘要

本发明公开了一种DNA病毒的环介导等温基  
因扩增检测试剂盒,包括如下部分:水化溶液、阳  
性对照、矿物油和阴性对照;且每升所述水化溶  
液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的  
Tris-HCl,10mmol的KCl,6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>,  
10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1mL的Triton X-100,  
0.2mmol的dNTPs,内引物FIP和内引物BIP各1.6  
μmol,外引物F3和外引物B3各0.2μmol,480U的  
Bst DNA聚合酶,0.4-0.7g的十二烷基硫酸钠,  
0.7-1.2g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠,  
5mmol的β-巯基乙醇,6.7μmol的EDTA,100mL的  
甘油,30mmol的二硫苏糖醇,8-12g的PEG-4000,  
0.1g的四甲基联苯胺,0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1.0μmol的  
病毒特异性识别序列,余量为双蒸水。该试剂盒  
能够高效、快速、准确、灵敏的得到病毒的检测  
结果,且检测结果特异性高、敏感性高、肉眼易判  
断,适合于现场快速检测。



1. 一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,其特征在于,包括如下部分:水化溶液、阳性对照、矿物油和阴性对照;

每升所述水化溶液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的Tris-HCl,10mmol的KCl,6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>,10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1mL的Triton X-100,0.2mmol的dNTPs,内引物FIP和内引物BIP各1.6μmol,外引物F3和外引物B3各0.2μmol,480U的Bst DNA聚合酶,0.4-0.7g的十二烷基硫酸钠,0.7-1.2g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠,5mmol的β-巯基乙醇,6.7μmol的EDTA,100mL的甘油,30mmol的二硫苏糖醇,8-12g的PEG-4000,0.1g的四甲基联苯胺,0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1.0μmol的病毒特异性识别序列,余量为双蒸水;所述病毒特异性识别序列包含病毒特异性探针序列和脱氧核酶序列;

所述DNA病毒为乙肝病毒,所述内引物FIP的序列为:

5' -AGTAATTGTCTGATTTTTAGGC-TAGTAGTCAGCTATGTCAATGT-3' ;

所述内引物BIP的序列为:

5' -GATCCCGAGATTGAGATCTTC-AAGTTTCCCACCTTATCTGTCC-3' ;

所述外引物F3的序列为:5' -GTAATTTGGAAGATCCAGCATC-3' ;

所述外引物B3的序列为:5' -AGGATTAAAGACAGGTACCGTA-3' ;

所述病毒特异性识别序列为:

5' -TGATTGCGTATTTGGTGTCTTTTGGAGCAATCAGTGCCAAGCTTAGTCACTTACGCTGGATCTGTACAGATTATCTTATTCGGTTCTTAGCGGAACGCAGGCTCGCAGTCGACGTTACGGACGACCTGCATGATTCTGAAGAAGC-3' 。

2. 根据权利要求1所述的DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,其特征在于,所述阳性对照为含有病毒基因组核酸序列的病毒阳性人血清,所述阴性对照为不含病毒基因组核酸序列的病毒阴性人血清。

3. 根据权利要求1所述的DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,其特征在于,每升水化溶液制备时采用的十二烷基硫酸钠的质量为0.6g,辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠的质量为0.9g,PEG-4000的质量为10g。

4. 权利要求1所述的DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒在制备乙肝病毒检测试剂中的应用。

## 一种DNA病毒的LAMP检测试剂盒、检测方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种DNA病毒的LAMP检测试剂盒、检测方法及应用。

### 背景技术

[0002] 目前检测和诊断病毒性疾病的传统方法有病毒中和试验、酶联免疫吸附试验、免疫荧光抗体试验、免疫荧光电子显微镜技术及PCR等,这些方法曾在病原体的检测和疾病的诊断及研究中发挥了巨大作用,但存在的问题是需时长、操作复杂、需要昂贵的设备仪器、不利于现场检测等,限制了它们在病毒快速诊断中的应用。

[0003] 传统聚合酶链反应(PCR)是体外扩增DNA序列的技术,它的基本原理类似于DNA的天然复制过程。自1985年PCR技术建立以来,该技术不断发展,逐渐成为分子生物学、基因组学、疾病诊断等领域的基本研究手段。传统PCR反应过程包括变性、退火和延伸三个阶段,因此PCR技术需要特殊的热循环仪器,耗时长,一般需要2-3h。传统PCR技术容易产生假阳性反应,并且由于其检测形式单一,结果不易判读。

[0004] 环介导等温基因扩增(LAMP)是新型的基因扩增法,具有以下特点:简便、快速、不需要昂贵的仪器设备,适合现场使用,不需要对模板进行热变性过程,退火和延伸在同一温度(等温)条件下进行,大大减少了反应时间,能在短时间内获得结果。由于LAMP采用识别6个部位的4种引物,所以特异性极高。大量研究报告证实LAMP的特异性要比传统PCR技术高,而且能够区分同一病原体的不同血清型,如人流感病毒和人疱疹病毒等病毒的研究结果提示,LAMP能对多血清型的同一病原体进行定型而没有出现假阳性。LAMP的灵敏度高,能从极低微量的拷贝中扩增出目的基因,扩增效率高达 $10^9$ - $10^{10}$ 拷贝,比传统PCR技术高出2-3个数量级,具有与Real-Time TaqMan PCR同样的敏感性。

[0005] 目前,环介导等温扩增结果判定办法有3种:凝胶电泳检测、浊度监测和通过添加显色剂观察颜色。前两种判定方法存在操作复杂,需特殊仪器设备的缺点,添加显色剂观察颜色的方法,操作简单,且不需要特殊仪器设备。目前LAMP使用的显色剂有两种:DNA嵌入染料和金属离子指示剂,但这两种显色剂的特异性和敏感性都不高,且结果肉眼不易判断,限制了其应用,因此,为了高效、快速、准确、灵敏的得到病毒的检测结果,需要开发一种新的含有特异性高、敏感性强、肉眼易判断显色剂的检测试剂盒。

### 发明内容

[0006] 本发明提供一种DNA病毒的环介导等温基因扩增(LAMP)检测试剂盒、检测方法及应用,该试剂盒能够高效、快速、准确、灵敏的得到病毒的检测结果,且检测结果特异性高、敏感性强、肉眼易判断,适合于现场快速检测。

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,包括如下部分:水化溶液、阳性对照、矿物油和阴性对照;

[0008] 每升所述水化溶液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的Tris-HCl,10mmol的

KCl, 6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>, 10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1mL的Triton X-100, 0.2mmol的dNTPs, 内引物FIP和内引物BIP各1.6μmol, 外引物F3和外引物B3各0.2μmol, 480U的Bst DNA聚合酶, 0.4-0.7g的十二烷基硫酸钠, 0.7-1.2g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠, 5mmol的β-巯基乙醇, 6.7μmol的EDTA, 100mL的甘油, 30mmol的二硫苏糖醇, 8-12g的PEG-4000, 0.1g的四甲基联苯胺, 0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.0μmol的病毒特异性识别序列, 余量为双蒸水; 所述病毒特异性识别序列包含病毒特异性探针序列和脱氧核酶序列。

[0009] 优选的, 所述阳性对照为病毒阳性人血清, 所述阴性对照为病毒阴性人血清。

[0010] 优选的, 每升水化溶液制备时采用的十二烷基硫酸钠的质量为0.6g, 辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠的质量为0.9g, PEG-4000的质量为10g。

[0011] 本发明还提供了一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒在检测乙肝病毒中的应用。

[0012] 本发明还提供了一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒在检测乙肝病毒中的应用, 检测乙肝病毒时采用的内引物FIP的序列为:

[0013] 5'-AGTAATTGTCTGATTTTTAGGC-TAGTAGTCAGCTATGTCAATGT-3' ;

[0014] 采用的内引物BIP的序列为:

[0015] 5'-GATTCCCGAGATTGAGATCTTC-AAGTTTCCCACCTTATCTGTCC-3' ;

[0016] 采用的外引物F3的序列为: 5'-GTAATTTGGAAGATCCAGCATC-3' ;

[0017] 采用的外引物B3的序列为: 5'-AGGATTAAGACAGGTACCGTA-3' ;

[0018] 采用的病毒特异性识别序列为:

[0019] 5'-TGATTGCGTATTTGGTGTCTTTGGAGCAATCAGTGCCAAGCTTAGTCACTTACGCTGGATCTGTACAGATTATCTTATTCGGTCTTAGCGGAACGCAGGCTCGAGTCGACGTTACGGACGACCTGCATGATTCTGAAGAAGC-3' 。

[0020] 本发明还提供了一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒检测DNA病毒的方法, 具体按照以下步骤实施:

[0021] 步骤1, 提取待测材料的血清, 得到待测血清;

[0022] 步骤2, 取3个反应管, 分别标记为阳性对照管、测试管和阴性对照管, 并分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内加入相同体积的水化溶液;

[0023] 步骤3, 按阳性对照: 水化溶液=2:25的体积比例, 向阳性对照管内加入阳性对照; 按待测血清: 水化溶液=2:25的体积比例, 向测试管内加入待测血清; 按阴性对照: 水化溶液=2:25的体积比例, 向阴性对照管内加入阴性对照;

[0024] 分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内加入相同体积的矿物油, 并且矿物油与水化溶液A的体积比例均为3:5;

[0025] 步骤4, 将步骤3的阳性对照管、测试管和阴性对照管置于62-66℃水浴50-65分钟;

[0026] 步骤5, 结果判断: 将步骤4的阳性对照管、测试管和阴性对照管冷却至室温, 观察溶液颜色的变化, 如果测试管与阴性对照管的颜色相同, 均为无色, 则说明待测血清无DNA病毒感染, 如果测试管与阳性对照管的颜色相同, 均为蓝色, 则说明待测血清有DNA病毒感染。

[0027] 优选的, 上述步骤4中水浴的温度为65℃, 水浴的时间为60分钟。

[0028] 本发明的RNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒, 提供一种特异显色方法, 我

们将特异探针的3'端连接具有特殊结构序列的脱氧核酶,探针5'连接一个TGATTGC序列,即5'-TGATTGC-病毒特异性探针序列-GCAATCA-脱氧核酶序列。这种特殊探针结构在未与特异模板杂交前5'端形成一个G折叠发夹结构,此时脱氧核酶无过氧化物酶的活性,但与特异模板杂交后5'端G折叠发夹结构被打开,此时由于生物感应作用,连接脱氧核酶具有类似过氧化物酶的活性,催化底物TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,反应液呈现蓝色。实验证明这种显色方法特异性高、灵敏性强、肉眼易判断。

[0029] 本发明提供的DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒使用独特的环介导等温基因扩增技术,彻底解决了一般PCR法耗时长、反应结果不易肉眼判断的缺点,由于水化溶液的特殊配方,使试剂盒具有以下优点:(1)整个检测过程只需1小时左右,大大缩短了检测时间;(2)无需样品的前处理,检测只需使用2 $\mu$ L的血清,无需样品的DNA的抽提;(3)环介导等温基因扩增的灵敏度是PCR法的10-100倍;(4)环介导等温基因扩增的产物无需电泳,可以通过指示剂的颜色变化直接肉眼判断反应结果;(5)无需用到PCR仪、电泳槽、凝胶成像仪、离心机等仪器。

### 附图说明

[0030] 图1为利用本发明乙肝病毒的环介导等温基因扩增引物检测不同材料的结果对照图。

[0031] 图1中,1号管为乙肝病毒DNA模板溶液(广州华银医药科技有限公司),2号管为乙肝病毒阴性人血清(经市场购买的PCR试剂盒检测为乙肝病毒感染阴性),3号管为乙肝病毒待测血清(经市场购买的PCR试剂盒检测为乙肝病毒感染阳性),4号管为单纯疱疹I型病毒阳性血清,5号管为巨细胞病毒阳性人血清。

### 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明,但不应理解为本发明的限制。

[0033] 本发明提供了一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,包括如下部分:水化溶液、阳性对照、矿物油、阴性对照;

[0034] 每升所述水化溶液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的Tris-HCl,10mmol的KCl,6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>,10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1mL的Triton X-100,0.2mmol的dNTPs,内引物FIP和内引物BIP各1.6 $\mu$ mol,外引物F3和外引物B3各0.2 $\mu$ mol,480U的Bst DNA聚合酶,0.4-0.7g的十二烷基硫酸钠,0.7-1.2g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠,5mmol的 $\beta$ -巯基乙醇,6.7 $\mu$ mol的EDTA,100mL的甘油,30mmol的二硫苏糖醇,8-12g的PEG-4000,0.1g的四甲基联苯胺,0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1.0 $\mu$ mol的病毒特异性识别序列,余量为双蒸水;所述病毒特异性识别序列包含病毒特异性探针序列和脱氧核酶序列,其核苷酸组成为5'-TGATTGC-病毒特异性探针序列-GCAATCA-脱氧核酶序列,并且所述病毒特异性探针序列能与环介导等温基因扩增的产物杂交,从而对该病毒进行特异性识别,并且杂交后该病毒特异性识别序列上的脱氧核酶具有类似于过氧化物酶的活性。

[0035] 需要说明的是,“余量为双蒸水”指的是每升水化溶液配制时,溶剂为双蒸水。

[0036] 需要说明的是,内引物FIP、内引物BIP、外引物F3和外引物B3是环介导等温基因扩增所需要的引物,病毒特异性探针序列是对病毒进行特异性识别的序列,不同的DNA病毒对

应的内引物FIP、内引物BIP、外引物F3、外引物B3序列和病毒特异性探针序列是不一样的。本领域人员根据待检测病毒的基因序列设计内引物FIP、内引物BIP、外引物F3、外引物B3和病毒特异性探针的具体序列,然后按照本发明所述的方法对特定的DNA病毒进行检测即可。

[0037] 优选的,所述阳性对照含有病毒基因组核酸序列的病毒阳性人血清,该病毒阳性人血清经市场购买的PCR试剂盒检测为乙肝病毒感染阳性,所述阴性对照不含病毒基因组核酸序列的病毒阴性人血清,该病毒阴性人血清经市场购买的PCR试剂盒检测为乙肝病毒感染阴性。

[0038] 基于同一种发明构思,本发明还提供了一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒检测DNA病毒的方法,具体按照以下步骤实施:

[0039] 步骤1,提取待测材料的血清,得到待测血清;

[0040] 步骤2,取3个反应管,分别标记为阳性对照管、测试管和阴性对照管,并分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内加入相同体积的水化溶液;

[0041] 步骤3,按阳性对照:水化溶液=2:25的体积比例,向阳性对照管内加入阳性对照;按待测血清:水化溶液=2:25的体积比例,向测试管内加入待测血清;按阴性对照:水化溶液=2:25的体积比例,向阴性对照管内加入阴性对照;

[0042] 分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内加入相同体积的矿物油,并且矿物油与水化溶液A的体积比例均为3:5;

[0043] 步骤4,将步骤3的阳性对照管、测试管和阴性对照管置于62-66℃水浴50-65分钟;

[0044] 步骤5,结果判断:将步骤4的阳性对照管、测试管和阴性对照管冷却至室温,观察溶液颜色的变化,如果测试管与阴性对照管的颜色相同,均为无色,则说明待测血清无DNA病毒感染,如果测试管与阳性对照管的颜色相同,均为蓝色,则说明待测血清有DNA病毒感染。

[0045] 本发明以下实施例中,若没有特殊说明,所用试剂皆可在市场上购买得到,若没有特殊说明,所涉及的方法皆为常规方法。

[0046] 实施例1

[0047] 本发明一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,在检测乙肝病毒中的应用,该检测乙肝病毒的试剂盒包括如下部分:水化溶液、阳性对照、矿物油、阴性对照;

[0048] 每升所述水化溶液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的Tris-HCl,10mmol的KCl,6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>,10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1mL的Triton X-100,0.2mmol的dNTPs,内引物FIP和内引物BIP各1.6μmol,外引物F3和外引物B3各0.2μmol,480U的BstDNA聚合酶,0.6g的十二烷基硫酸钠,0.9g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠,5mmol的β-巯基乙醇,6.7μmol的EDTA,100mL的甘油,30mmol的二硫苏糖醇,10g的PEG-4000,0.1g的四甲基联苯胺,0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1.0μmol的病毒特异性识别序列,余量为双蒸水。

[0049] 其中,所述阳性对照为含有乙肝病毒基因组核酸序列的病毒阳性人血清,所述阴性对照为不含乙肝病毒基因组核酸序列的病毒阴性人血清。

[0050] 其中,采用的内引物FIP的序列如SEQ ID NO.1所示,为:

[0051] 5'-AGTAATTGCTGATTTTTAGGC-TAGTAGTCAGCTATGTCAATGT-3';

[0052] 采用的内引物BIP的序列如SEQ ID NO.2所示,为:

[0053] 5'-GATTCCCGAGATTGAGATCTTC-AAGTTTCCCACCTTATCTGTCC-3';

[0054] 采用的外引物F3的序列如SEQ ID NO.3所示,为:

[0055] 5'-GTAATTTGGAAGATCCAGCATC-3';

[0056] 采用的外引物B3的序列如SEQ ID NO.4所示,为:

[0057] 5'-AGGATTAAGACAGGTACCGTA-3';

[0058] 采用的病毒特异性识别序列如SEQ ID NO.5所示,为:

[0059] 5'-TGATTGCGTATTTGGTGTCTTTTGGAGCAATCAGTGCCAAGCTTAGTCACTTACGCTGGATCTGTACAGATTATCTTATTCGGTCTTAGCGGAACGCAGGCTCGCAGTCGACGTTACGGACGACCTGCATGATTCTGAAGAAGC-3',该病毒特异性识别序列中包含了病毒特异性探针序列5'-GTATTTGGTGTCTTTTGGGA-3'和脱氧核酶序列5'-GTGCCAAGCTTAGTCACTTACGCTGGATCTGTACAGATTATCTTATTCGGTCTTAGCGGAACGCAGGCTCGCAGTCGACGTTACGGACGACCTGCATGATTCTGAAGAAGC-3',在病毒特异性探针序列的5'端添加“TGATTGC”,并在病毒特异性探针序列与脱氧核酶序列之间添加“GCAATCA”,形成SEQ ID NO.5所示的病毒特异性识别序列。

[0060] 利用上述DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒检测乙肝病毒的方法,具体按照以下步骤实施:

[0061] 步骤1,提取待测材料的血清,得到待测血清;

[0062] 步骤2,取3个反应管,分别标记为阳性对照管、测试管和阴性对照管,并分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内均加入25 $\mu$ L的水化溶液;

[0063] 步骤3,分别向阳性对照管内加入2 $\mu$ L的病毒阳性人血清,向测试管内加入2 $\mu$ L的待测血清,向阴性对照管内加入2 $\mu$ L的病毒阴性人血清;

[0064] 分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内均加入15 $\mu$ L矿物油;

[0065] 步骤4,将步骤3的阳性对照管、测试管和阴性对照管置于65 $^{\circ}$ C水浴60分钟;

[0066] 步骤5,结果判断:将步骤4的阳性对照管、测试管和阴性对照管冷却至室温,观察溶液颜色的变化,如果测试管与阴性对照管的颜色相同,均为无色,则说明待测血清无DNA病毒感染,如果测试管与阳性对照管的颜色相同,均为蓝色,则说明待测血清有DNA病毒感染。

[0067] 实施例2

[0068] 本发明一种DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒,在检测乙肝病毒中的应用,该检测乙肝病毒的试剂盒包括如下部分:水化溶液、阳性对照、矿物油、阴性对照;

[0069] 每升所述水化溶液由以下组分制备而成:20mmol pH=8.8的Tris-HCl,10mmol的KCl,6.5mmol的MgSO<sub>4</sub>,10mmol的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1mL的Triton X-100,0.2mmol的dNTPs,内引物FIP和内引物BIP各1.6 $\mu$ mol,外引物F3和外引物B3各0.2 $\mu$ mol,480U的Bst DNA聚合酶,0.45g的十二烷基硫酸钠,1.2g的辛基酚聚氧乙烯(10)醚丁二酸钠,5mmol的 $\beta$ -巯基乙醇,6.7 $\mu$ mol的EDTA,100mL的甘油,30mmol的二硫苏糖醇,8g的PEG-4000,0.1g的四甲基联苯胺,0.1mL的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,1.0 $\mu$ mol的病毒特异性识别序列,余量为双蒸水。

[0070] 其中,所述阳性对照为含有乙肝病毒基因组核酸序列的病毒阳性人血清,所述阴性对照为不含乙肝病毒基因组核酸序列的病毒阴性人血清。

[0071] 其中,采用的内引物FIP的序列如SEQ ID NO.1所示,为:

[0072] 5'-AGTAATTGTCTGATTTTTAGGC-TAGTAGTCAGCTATGTCAATGT-3';

[0073] 采用的内引物BIP的序列如SEQ ID NO.2所示,为:

[0074] 5' -GATTCCCGAGATTGAGATCTTC-AAGTTTCCCACCTTATCTGTCC-3' ;

[0075] 采用的外引物F3的序列如SEQ ID NO.3所示,为:

[0076] 5' -GTAATTTGGAAGATCCAGCATC-3' ;

[0077] 采用的外引物B3的序列如SEQ ID NO.4所示,为:

[0078] 5' -AGGATTAAGACAGGTACCGTA-3' ;

[0079] 采用的病毒特异性识别序列如SEQ ID NO.5所示,为:

[0080] 5' -TGATTGCGTATTTGGTGTCTTTTGGAGCAATCAGTGCCAAGCTTAGTCACTTACGCTGGATCTGT  
ACAGATTATCTTATTCGGTCTTAGCGGAACGCAGGCTCGCAGTCGACGTTACGGACGACCTGCATGATTCTGAAG  
AAGC-3' 。

[0081] 利用上述DNA病毒的环介导等温基因扩增检测试剂盒检测乙肝病毒的方法,具体按照以下步骤实施:

[0082] 步骤1,提取待测材料的血清,得到待测血清;

[0083] 步骤2,取3个反应管,分别标记为阳性对照管、测试管和阴性对照管,并分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内均加入50 $\mu$ L的水化溶液;

[0084] 步骤3,分别向阳性对照管内加入4 $\mu$ L的病毒阳性人血清,向测试管内加入4 $\mu$ L的待测血清,向阴性对照管内加入4 $\mu$ L的病毒阴性人血清;

[0085] 分别向阳性对照管、测试管和阴性对照管内均加入30 $\mu$ L矿物油;

[0086] 步骤4,将步骤3的阳性对照管、测试管和阴性对照管置于62 $^{\circ}$ C水浴65分钟;

[0087] 步骤5,结果判断:将步骤4的阳性对照管、测试管和阴性对照管冷却至室温,观察溶液颜色的变化,如果测试管与阴性对照管的颜色相同,均为无色,则说明待测血清无DNA病毒感染,如果测试管与阳性对照管的颜色相同,均为蓝色,则说明待测血清有DNA病毒感染。

[0088] 下面以实施例1的环介导等温基因扩增结果为例,说明上述乙肝病毒引物特异性检验结果:

[0089] 同时选取乙肝病毒DNA模板溶液、乙肝病毒阴性人血清、乙肝病毒待测血清、单纯疱疹I型病毒阳性血清、巨细胞病毒阳性血清进行实验,检测如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4所示的引物的特异性,以及如SEQ ID NO.5所示的序列特异性(针对探针序列的特异性),结果如图1所示,1号管和3号管颜色相同,均为蓝色,说明乙肝病毒待测血清为阳性,其余管为无色,说明该引物对其他病毒无扩增,也无交叉反应。说明本发明用于检测乙肝病毒的引物具有较高的特异性。

[0090] 下面以乙肝病毒为例,阐述本发明的灵敏度效果。

[0091] 以已知拷贝数的目的DNA作10倍梯度稀释后作为模板,分别进行LAMP和常规PCR扩增,比较两者灵敏度差异,LAMP以直接肉眼可见明显蓝色的最低模板浓度为检测的最低检出限;PCR以能出现电泳条带的最低模板浓度定为检测的最低检出限。

[0092] 实验表明,LAMP检测的最低模板浓度为原始模板浓度为 $10^{-7}$ 倍,检出限为25拷贝,且扩增产物浓度与模板浓度相关性很小,而常规PCR其检测的最低模板浓度为原始模板浓度的 $10^{-5}$ 倍,说明LAMP检测的灵敏度比常规PCR方法高100倍。

[0093] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优



选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0094] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

## 序列表

<110> 武汉大学基础医学院病毒学研究所

<120> 一种 DNA 病毒的 LAMP 检测试剂盒、检测方法及应用

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

[0001] agtaattgtc tgatttttag gctagtagtc agctatgtca atgt

44

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gattcccgag attgagatct tcaagttcc caccttatct gtcc

44

<210> 3

<211> 22

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 3	
	gtaatttgga agatccagca tc	22
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 4	
[0002]	aggattaaag acaggtaccg ta	22
	<210> 5	
	<211> 145	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 5	
	tgattgcgta ttggtgtct ttggagcaa tcagtgccaa gcttagtcac ttacgctgga	60
	tctgtacaga ttatcttatt cggttcttag cggaacgcag gctcgcagtc gacgttacgg	120
	acgacctgca tgattctgaa gaagc	145

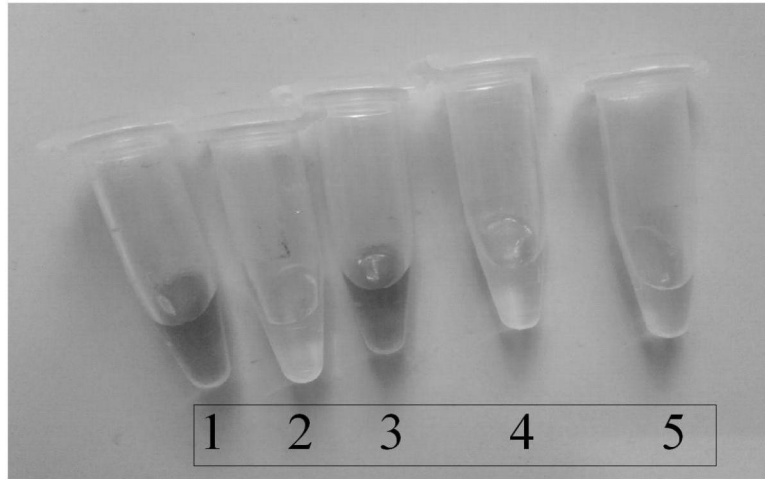


图1