



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101649356 B

(45) 授权公告日 2012.09.05

(21) 申请号 200910101243.3

(22) 申请日 2009.07.24

(73) 专利权人 浙江省疾病预防控制中心
地址 310051 浙江省杭州市滨江区信诚路
630 号

(72) 发明人 张严峻

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201
代理人 黄美娟 冷红梅

(56) 对比文件

CN 101487061 A, 2009.07.22, 全文.

US 20070161078 A1, 2007.07.12, 全文.

审查员 邢维玲

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

C12R 1/93(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

甲型 H1N1 流感病毒荧光定量检测试剂盒及
检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测甲型 H1N1 流感病毒核酸荧光定量 RT-PCR 试剂盒及其检测方法。主要包括特异性引物和荧光探针、PCR 缓冲液、脱氧三磷酸核苷混合物和 DNA 聚合酶, 逆转录酶、RNA 酶抑制剂, 所述特异性引物和荧光探针序列如下: 上游引物甲型 H1N1-FP: 5'-AGGTTTGAGATATTCCCAAGACA-3'; 下游引物甲型 H1N1-RP: 5'-AATTTTGTAGAAGCTTTTGCTCC-3'; 特异性探针甲型 H1N1-P: 5'-F-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-Q-3', 其中 F 为荧光报告基团, Q 为荧光淬灭基团。本发明的有益效果主要体现在: 可应用于甲型 H1N1 流感病毒引起暴发疫情的实验室应急检测和监测。

1. 一种甲型 H1N1 流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒, 主要包括特异性引物和荧光探针、PCR 缓冲液、脱氧三磷酸核苷混合物和 DNA 聚合酶, 逆转录酶、RNA 酶抑制剂, 所述特异性引物和荧光探针序列如下:

上游引物 :5' -AGGTTTGAGATATTCCTCCCAAGACA-3'

下游引物 :5' -AATTTTGTAGAAGCTTTTGTCTCC-3'

特异性探针 :5' -F-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-Q-3' ;F 为荧光报告基团, Q 为荧光淬灭基团。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于所述试剂盒还包括的甲型 H1N1 流感病毒基因 DNA 标准品, 所述的标准品序列如下 :AGGTTTGAGATATTCCTCCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGCTCCTCATGCTGGAGCAAAAAAGCTTCTACAAAAATT。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于所述试剂盒中所述的逆转录酶为 MMLV 逆转录酶。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于所述试剂盒中所述的 DNA 聚合酶, 逆转录酶、RNA 酶抑制剂来自于它们的混合制剂 Enzyme Mix, 所述的 Enzyme Mix 为 DNA 聚合酶, 逆转录酶、RNA 酶抑制剂按 1 : 50 : 5 单位之比混合配制而成。

5. 如权利要求 1 ~ 4 之一所述的试剂盒, 其特征在于所述特异性探针中 F 与 Q 的选择为下列之一 :① F 为 FAM, Q 为 BHQ1 ;② F 为 VIC, Q 为 BHQ1 ;③ F 为 TAMRA, Q 为 BHQ2 ;④ F 为 ROX, Q 为 BHQ2 ;⑤ F 为 CY5, Q 为 BHQ3。

甲型 H1N1 流感病毒荧光定量检测试剂盒及检测方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及甲型 H1N1 流感病毒核酸荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒及检测方法,可应用于甲型 H1N1 流感病毒引起暴发疫情的实验室应急检测。

(二) 背景技术

[0002] 2009 年 3 月 18 日以来,墨西哥发生了人感染甲型 H1N1 流感病毒暴发疫情。自墨西哥 2009 年 4 月 13 日出现第 1 例人感染甲型 H1N1 流感病毒的死亡病例以来,至 5 月 5 日全球已有 21 个国家经实验室检测确认存在甲型 H1N1 流感病例,总感染人数上升至 1124 例,其中死亡人数 26 例。除墨西哥与美国外,许多国家都报告了甲型 H1N1 的确认病例。为此,世界卫生组织 (WHO) 在将全球流感大流行的警告级别提升到 4 级,4 月 29 日又进一步提高到 5 级,这意味着在世卫组织六个管辖区域的一个中,至少有两个国家出现了病毒的人际传播,虽然在此阶段大多数国家不会受到影响,但宣布进入第五级是一个强烈的信号,表明大流行迫在眉睫,充分体现了世界卫生组织对这次新型流感流行的重视程度。

[0003] 在自然界,流感病毒在人以及猪和马等动物,尤其是鸟类中间持续流行。目前,在全球范围内猪群中已造成世界性流行的猪流感病毒血清型仅有 H1N1、H1N2、H3N2 三种。猪流感是世界上最常见的猪传染病之一,常引起猪的急性呼吸道疾病爆发,其病原猪流感病毒也是甲型流感病毒的成员。猪呼吸道上皮细胞上既有禽流感病毒的受体,唾液酸 α -2,3- 半乳糖苷 (SA α 2,3Gal) 又有人流感病毒的受体唾液酸 α -2,6- 半乳糖苷 (SA α 2,6Gal)。因此,猪群在储存流感病毒、诱导流感病毒新亚型出现的环节上起到了重要作用。

[0004] 有专家对近三十多年来猪流感病毒的重配进行研究,认为从 1970 年起,在美国的猪群中就已经分离到含有古典猪流感病毒和人流感病毒的重配猪流感病毒,在欧洲和亚洲的猪群中也分离人流感病毒与禽流感病毒的重配毒株,且这些重配病毒在欧洲和亚洲的猪群中持续存在。1984 年,在欧洲和亚洲出现的大规模猪流感,很可能也是人源 H3N2 与禽源 H1N1 病毒基因片段在猪体内进行重配的结果。此外,自 1998 年起,猪群中三源重配的 H3N2 病毒在美国广泛流行,该病毒同时含有人流感病毒的 HA、NA 和 PB1 基因,北美禽病毒的 PB2 和 PA 基因,以及古典猪病毒的 NP、M 和 NS。

[0005] 猪流感除了对养猪业的影响之外,最突出的流行病学特点是它具有同时感染人和禽的能力,因此猪流感病毒除具有畜牧业传染病上的意义外,在人类的流感流行中也具有重要的公共卫生意义。流行于猪群中的流感病毒有的具有在人体上复制的能力,这就增加了新流感病毒经猪重配后传播给人类的可能性。因此,许多学者认为,猪体内的流感病毒是人类流感病毒的潜在来源,下一次人类流感大流行的流行株基因中,将会有现今流行于猪群中的流感病毒片段,对猪群中的人、猪、禽流感病毒基因的监测,有可能对人类下一次流感大流行的毒株进行预测。一旦这类重配病毒具有较强的传染性、致病性,并能感染人类,就有可能引起新的世界性流感大流行,这次墨西哥发生的新型甲型 (H1N1) 流感,也具有这种特点。

[0006] 在流行后期间,流感的活动可能恢复到通常见到的季节性流感水平。此次甲型

H1N1 流感病毒流行有可能转而表现为季节性 A 型流感病毒。在此阶段,重要的是持续监测,这也对检测方法的改进和完善提出了更高的要求。

[0007] 在 4 月 30 日公布针对本次甲型 H1N1 流感病毒的荧光定量检测方法后,近几天又有许多国家和地区公布了甲型 H1N1 流感病毒的基因序列。但众所周知,流感病毒是一种变异速率非常快的 RNA 病毒,自然界中像甲型流感病毒这样变异频繁,变异幅度大的生物是少有的,其变异可以通过抗原漂移与抗原转换这二种机制来实现。在流感病毒的 8 个基因中,HA 变异最快,其次是 NA。如甲型流感病毒的 HA1 基因每年每个核苷酸变异的概率为 $3 \sim 4 \times 10^{-3}$,而细胞染色体 DNA 的突变率仅为 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ 。而 HA 和 NA 基因正是甲型 H1N1 流感病毒检测的重要目标基因。虽然 WHO 的方法能够检测本次流行的流感病毒,由于流感病毒的高度变异性,同时还应考虑针对我国的猪源流感病毒的监测,因此从方法学的角度去完善流感病毒的检测还需要进行很多探索性工作。

[0008] 鉴于包括人季节性流感、禽流感和甲型 H1N1 流感在公共卫生中的重要性与日俱增,所以在流感监测工作中同时要多种流感病毒的检测,费时费力而且浪费临床标本与试剂。在目前流行的甲型 H1N1 流感病毒序列分析的基础上,建立多重荧光定量 PCR 的分子生物学快速、特异、准确、灵敏的基因诊断方法与诊断试剂盒尤为重要。

[0009] 按照相关规定,此次甲型 H1N1 流感病毒的细胞培养需在 BSL-3 实验室进行,这对生产各流感网络实验室的检测阳性参照增加了生物安全风险。因此进行安全而稳定的 RNA 阳性参照对完善流感检测将具有十分重大的意义。

(三) 发明内容

[0010] 本发明目的是提供一种 2009 年 3 月从墨西哥开始流行于全球的甲型 H1N1 流感病毒的荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒及检测方法。

[0011] 本发明采用的技术方案是:

[0012] 一种甲型 H1N1 流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒,主要包括特异性引物和荧光探针、PCR 缓冲液、脱氧三磷酸核苷混合物和 DNA 聚合酶,逆转录酶、RNA 酶抑制剂,这些组分对于本领域技术人员来说属于公知常识,可根据需要选用;所述特异性引物和荧光探针序列如下:

[0013] 上游引物甲型 H1N1-FP:5'-AGGTTTGAGATATTCCTCAAGACA-3'

[0014] 下游引物甲型 H1N1-RP:5'-AATTTTTGTAGAAGCTTTTTGCTCC-3'

[0015] 特异性探针甲型 H1N1-P:5'-F-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-Q-3';其中 F 为荧光报告基团,Q 为荧光淬灭基团,所述特异性探针中 F 与 Q 的选择为下列之一:① F 为 FAM,Q 为 BHQ1;② F 为 VIC,Q 为 BHQ1;③ F 为 TAMRA,Q 为 BHQ2;④ F 为 ROX,Q 为 BHQ2;⑤ F 为 CY5,Q 为 BHQ3。本发明的系列探针委托上海超世生物科技有限公司合成。

[0016] 本发明所述试剂盒还包括的甲型 H1N1 流感病毒基因 DNA 标准品,所述的标准品序列如下:AGGTTTGAGATATTCCTCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAATT。

[0017] 本发明所述试剂盒中所述的逆转录酶为 MMLV 逆转录酶。

[0018] 本发明所述的试剂盒,试剂盒中所述的 DNA 聚合酶,逆转录酶、RNA 酶抑制剂推荐来自于它们的混合制剂 Enzyme Mix,所述的 Enzyme Mix 为 DNA 聚合酶,逆转录酶、RNA 酶抑

制制按 1 : 50 : 5 单位之比混合配制而成。

[0019] 本发明试剂盒对甲型 H1N1 流感病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法,所述方法包括:

[0020] (1) 提取待测样品 RNA ;如果浓度偏低,需浓缩至 5ng/u1 ;该步骤所述样品 RNA 提取可按常规方法进行,如采用德国 QIAGEN 公司的 RNeasyMini Kit 或其它试剂盒;

[0021] (2) 以待测样品 RNA 为模板,用一步法与下列物质混合配制成反应体系进行 PCR 反应:特异性引物和荧光探针、PCR 缓冲液、脱氧三磷酸核苷混合物和 DNA 聚合酶、逆转录酶、RNA 酶抑制剂;反应产物置于定量 PCR 仪进行荧光检测;所述特异性引物和荧光探针序列如下:上游引物甲型 H1N1-FP :5' -AGGTTTGAGATATCCCCAAGACA-3' 下游引物甲型 H1N1-RP :5' -AATTTTTGTAGAAGCTTTTTGCTCC-3' 特异性探针甲型 H1N1-P :5' -F-CATGGCCCAATCATGACTC GAACA-Q-3';其中 F 为荧光报告基团,Q 为荧光淬灭基团,所述的 F 为 FAM、VIC、TAMRA、ROX、CY5Q 为 BHQ1、BHQ2、BHQ3。

[0022] (3) 选择荧光检测模式 FAM 荧光,基线调整取 3 ~ 15 个循环的荧光信号,以阈值线刚好超过正常阴性对照的最高点设定阈值线;待测样品荧光增长曲线超过阈值线,并呈良好的对数增长,则判断为阳性,即则待测样品含有甲型 N1H1 流感病毒;若无典型的扩增曲线,判断为阴性。

[0023] 上述步骤 (1) 样品 RNA 提取方法采用德国 QIAGEN 公司的 RNeasyMini Kit,按照试剂盒说明书进行提取。

[0024] 所述步骤 (2) 中 PCR 反应体系终浓度组成推荐如下:

[0025]	PCR 缓冲液	终浓度为 1×
[0026]	脱氧三磷酸核苷混合物	dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP 各 0.2mmol/L
[0027]	MgCl ₂	5mmol/L
[0028]	上游引物	0.4 μ mol/L
[0029]	下游引物	0.4 μ mol/L
[0030]	探针	0.2 μ mol/L
[0031]	DNA 聚合酶	4U/ 反应
[0032]	MMLV 逆转录酶	200U/ 反应
[0033]	RNA 酶抑制剂	20U/ 反应
[0034]	模板 RNA	5ng/ μ L
[0035]	溶剂为 ddH ₂ O。	

[0036] 所述 PCR 反应体系中 PCR 缓冲液为磷酸缓冲液与脱氧三磷酸核苷混合物 One Step RT-PCR Reaction Buffer。所述 PCR 反应体系 DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂来制它们的混合制剂 Enzyme Mix,所述的 Enzyme Mix 中,DNA 聚合酶,逆转录酶、RNA 酶抑制剂之比为 1 : 50 : 5。One Step RT-PCR Reaction Buffer 与 Enzyme Mix 可先混合称为 onestep RT-PCR Master Mix,再以待测样 RNA 为模板,缓冲液终浓度为 1×,是指缓冲液各组分在反应体系中的终浓度与 1×one stepRT-PCR Master Mix 中各组分的浓度相同。通常采用反应体系 1/2 体积的 2×one stepRT-PCR Master Mix。本发明的 1×one step RT-PCR Master Mix 缓冲液(上海超世生物科技有限公司)Code :Q40101。

[0037] 所述步骤 (2) 中 PCR 反应条件如下:50 °C 30,95 °C 5min 进行逆转录,然后 95 °C 10s,60 °C 30 ~ 35s,在 60 °C 进行单点荧光检测,共进行 45 ~ 50 个循环。

[0038] 本发明本发明的有益效果主要体现在：本发明方法对甲型 H1N1 流感病毒检测有高度的特异性，本方法检测的灵敏，是一种快速检测甲型 H1N1 流感病毒特异、敏感的方法，非常适用于甲型 H1N1 流感病毒感染引起突发疫情的实验室早期诊断。

（四）附图说明

[0039] 图 1、图 2、图 3 中横坐标代表荧光定量 PCR 的 CT 值，纵坐标代表荧光强度。

[0040] 图 1 为甲型 H1N1 流感探针灵敏度测试：荧光 RT-PCR 法检测甲型 H1N1 流感病毒的灵敏度；从 1 至 4 依次为 1、0.1、0.01、0.001TCID₅₀；

[0041] 图 2 为使用该系统对浙江省发现的甲型 H1N1 的临床样本的检测图片，a1、a2、a3 代表强阳性样品、b 代表弱阳性样品、c 代表阴性样品

[0042] 图 3 为荧光 RT-PCR 法检测甲型 H1N1 流感病毒的特异性（5、HKH1N1 为确诊阳性标本，6 为季节性 H1N1、7 为季节性 H3N1，8 为 SWH1N1 为浙江省疾控保存的毒株，NTC 为阴性对照。）

（五）具体实施方式

[0043] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述，但本发明的保护范围并不仅限于此：

[0044] 实施例 1：

[0045] 1 材料与amp;方法

[0046] 病毒株与临床标本：

[0047] 甲型 H1N1、SWH1N1、季节性 H1N1、季节性 H3N1 病毒株来源于香港和浙江省疾病预防控制中心分离株。临床样本来源于近期浙江省甲型 H1N1 病毒爆发疫情疑似患者的咽拭子，样本采集后带冰运送到实验室。

[0048] 1.2 引物与探针

[0049] 从美国的 NCBI 基因库上下载了世界各地的甲型 H1N1、季节性 H1N1、猪 H1N1 流感病毒毒株。对其进行了同源性比较，在所有流感病毒基因组 HA 基因区设计甲型 H1N1 特异性引物与 Taqman 探针，序列如下：

[0050] 上游引物甲型 H1N1-FP：5'-AGGTTTGAGATATTCCTCAAGACA-3'

[0051] 下游引物甲型 H1N1-RP：5'-AATTTTGTAGAAGCTTTTGTCTCC-3'

[0052] 特异性探针甲型 H1N1-P：5'-FAM-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ1-3'；本发明使用的引物和探针委托上海超世生物科技有限公司合成。

[0053] 1.3 病毒定量标准与病毒 RNA 的提取：

[0054] 以确证患者标本分离的甲型 H1N1 病毒为标准毒株，用狗肾传代细胞 (MDCK) 进行病毒效价滴定 (1×10^3 TCID₅₀/ml) 后作为参考株。将其稀释至 1、0.1、0.01、0.001TCID₅₀ 每个反应管。病毒 RNA 的提取采用德国 QIAGEN 公司的 Reansy Mini Kit，按试剂盒说明书提取，得到病毒 RNA 为模板 RNA 备用。

[0055] 1.4 荧光 RT-PCR 反应体系和条件的优化：

[0056] 试剂盒：选用上海超世生物科技有限公司的 one step RT-PCR Master Mix, Code：Q40101，按说明书操作，one step RT-PCR Master Mix 中含 2×One Step RT-PCR Reaction

Buffer 7.5ul(其中PCR缓冲液为10X buffer2.5ul,5X RT buffer 4ul dNTP(10mM)1ul)和 Enzyme Mix 5ul(5ulEnzyme Mix 中含 DNA 聚合酶 4U,逆转录酶 200U、RNA 酶 20U),再取上游与下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l,探针(10 μ mol/L)0.5 μ l,模板 RNA 2 μ l,DEPC 水补足 25 μ l 反应体系为 25 μ l。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 30min,95 $^{\circ}$ C 5min 进行逆转录,然后 95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 30s,在 60 $^{\circ}$ C 进行单点荧光检测,共进行 45 个循环。

[0057] 结果判断:选择荧光检测模式 FAM,荧光基线调整取 3-15 个循环的荧光信号平均值,阈值设定以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点,样本呈典型的扩增曲线,并呈良好的对数增长,判断为阳性。无典型的扩增曲线,判断为阴性。体系的优化试验,在以相同浓度阳性核酸为模板的反应体系中,引物浓度从 0.10 ~ 1.00 μ M,探针浓度从 0.10 ~ 0.50 μ M,采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度,根据最低 Ct 值和最高荧光强度增加值(Δ Rn)选择最佳引物和探针浓度。本发明优选引物 400nmol、探针 200nmol。

[0058] 1.5 荧光 RT-PCR 特异性、敏感性和重复性试验

[0059] 选择甲型 H1N1、季节性 H1N1、猪 H1N1 流感病毒毒株和 2009 年浙江省爆发疫情确诊患者的咽拭子临床样本,对上述病毒株和样本分别提取核酸,用甲型 H1N1 流感病毒荧光 RT-PCR 方法进行检测,验证方法的特异性;对已标定 TCID₅₀的甲型流感病毒(1 \times 10³TCID₅₀/ml)稀释后分别提取 RNA,平行进行荧光 RT-PCR 与 RT-PCR 反应,比较其灵敏度。此外,对每一个浓度的病毒稀释液作 5 次重复检测,得到的 Ct 值计算标准差,验证方法的重复性,结果见图 3,结果表明,本发明所述的引物与探针对甲型 H1N1 流感病毒有特异性。

[0060] 分别以 5'-VIC-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ 1-3'、5'-TAMRA-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ2-3'、5'-ROX-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ2-3'、5'-CY5-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ3-3'F 为探针代替 1.2 中的 H1N1-P:5'-FAM-CATGGCCCAATCATGACTCGAACA-BHQ1-3' 其它条件不变进行试验,结果也相同。

[0061] 2 结果

[0062] 2.1 荧光 RT-PCR 反应体系及条件

[0063] 选用上海超世生物科技有限公司的 one step RT-PCR Master Mix,Code :Q40101,按说明书操作,one step RT-PCR Master Mix 中 2 \times One StepRT-PCR Reaction Buffer 7.5ul,DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂来制它们的混合制剂 Enzyme Mix 5ul,再取上游与下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l,探针(10 μ mol/L)0.5 μ l,模板 RNA 2-3 μ l,DEPC 水补足 25 μ l,使反应体系共为 25 μ l,其中。用 Rotor-Gene6000 荧光检测系统进行检测,反应参数为:反应条件为 50 $^{\circ}$ C 30min,95 $^{\circ}$ C 5min 进行逆转录,然后 95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 30s,在 60 $^{\circ}$ C 进行单点荧光检测,共进行 45 个循环,可获得最低 Ct 值和最高荧光强度。

[0064] 2.2 特异性试验

[0065] 本发明建立的荧光 RT-PCR 方法对甲型 H1N1 流感病毒具有较好的特异性,近期流行的甲型 H1N1 流感患者的咽拭子也显示阳性反应。而与其他流感病毒如季节性 H1N1、猪 H1N1、H3N1、H5N1、H7N1、H9N1 流感病毒等均无交叉反应(见图 3)。

[0066] 2.3 敏感性试验

[0067] 对甲型 H1N1 流感病毒毒株,采用 MDCK 细胞进行病毒效价测定(100TCID₅₀/ml),将其稀释至 1、0.1、0.01、0.001TCID₅₀。病毒 RNA 的提取采用德国 QIAGEN 公司的 Reansy Mini

Kit,按试剂盒说明书提取,得到病毒 RNA。用荧光 RT-PCR 方法进行检测,结果荧光 RT-PCR 方法检测敏感性达到 0.001TCID₅₀(见图 1)。

[0068] 2.4 重复性试验

[0069] 甲型 H1N1 流感病毒毒株按 10 倍梯度稀释成 3 个不同的浓度,反应体系如 1.4 中所述,对每一个浓度的样本作 5 个重复检测,结果不同核酸浓度各自的检测 Ct 值标准差在 0.10 ~ 0.31 之间,具有较好的重复性(表 1)。

[0070] 表 1 荧光 RT-PCR 法检测肠道病毒的重复性试验

[0071]

病毒稀释度 (TCID50)	结果(Ct 值)					平数均 (Ct 值)	标准差 (SD)
	1	2	3	4	5		
10	27.92	28.11	27.91	27.87	27.81	27.92	0.10
1.0	30.87	31.21	30.67	30.95	31.07	30.95	0.20
0.1	34.01	33.51	34.11	33.87	34.36	33.97	0.31

[0072] 2.5 临床样本的检测

[0073] 从近期浙江省各地报告的甲型 H1N1 流感爆发疫情疑似患者的咽拭子、含漱液共 40 份临床样本中直接提取病毒 RNA,用本发明甲型 H1N1 病毒荧光 RT-PCR 方法和 WHO 方法同时检测肠道病毒核酸,结果本发明方法检测出肠道病毒核酸阳性 40 份,WHO 法检测出 35 份,本发明荧光 RT-PCR 方法比 WHO 方法检测肠道病毒的阳性率高。本发明荧光 RT-PCR 方法用于临床样本检测的验证在 4 个平行实验室进行,均获得了满意的结果,图 2 显示的是部分临床样本的检测图谱。

[0074] 序列表_ST25.txt

[0075] SEQUENCE LISTING

[0076] <110> 浙江省疾病预防控制中心

[0077] <120> 甲型 H1N1 流感病毒荧光定量检测试剂盒及检测方法

[0078] <130>

[0079] <160>4

[0080] <170>PatentIn version 3.4

[0081] <210>1

[0082] <211>24

[0083] <212>DNA

[0084] <213>Unknown

[0085] <220>

[0086] <223> 人工序列

[0087] <400>1

[0088] aggttttgaga tattccccaa gaca 24

[0089]	<210>2	
[0090]	<211>25	
[0091]	<212>DNA	
[0092]	<213>Unknown	
[0093]	<220>	
[0094]	<223> 人工序列	
[0095]	<400>2	
[0096]	aatTTTTgta gaagctTTTT gctcc	25
[0097]	<210>3	
[0098]	<211>24	
[0099]	<212>DNA	
[0100]	<213>Unknown	
[0101]	<220>	
[0102]	<223> 人工序列	
[0103]	<400>3	
[0104]	catggcccaa tcatgactcg aaca	24
[0105]	<210>4	
[0106]	<211>106	
[0107]	<212>DNA	
[0108]	<213>H1N1swine influenza virus	
[0109]	<400>4	
[0110]	aggTTTgaga tattcccaa gacaagTtca Tggcccaatc atgactcgaa caaaggtgta	60
[0111]	acggcagcat gtctcatgc Tggagcaaaa agcttctaca aaaatt	106

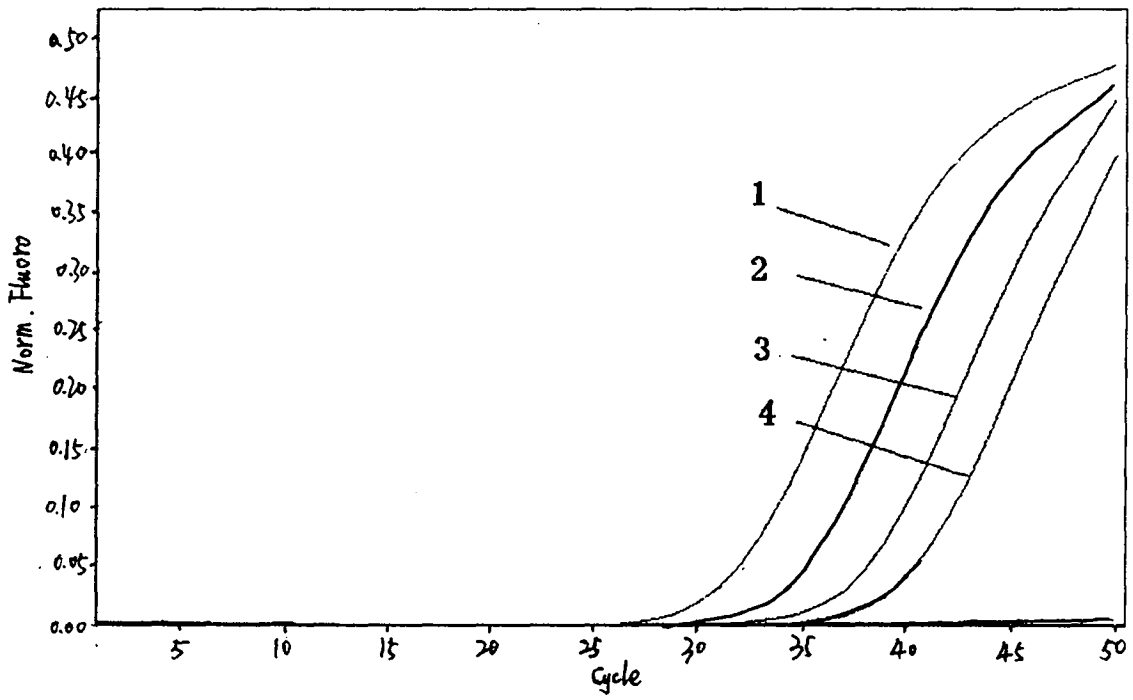


图 1

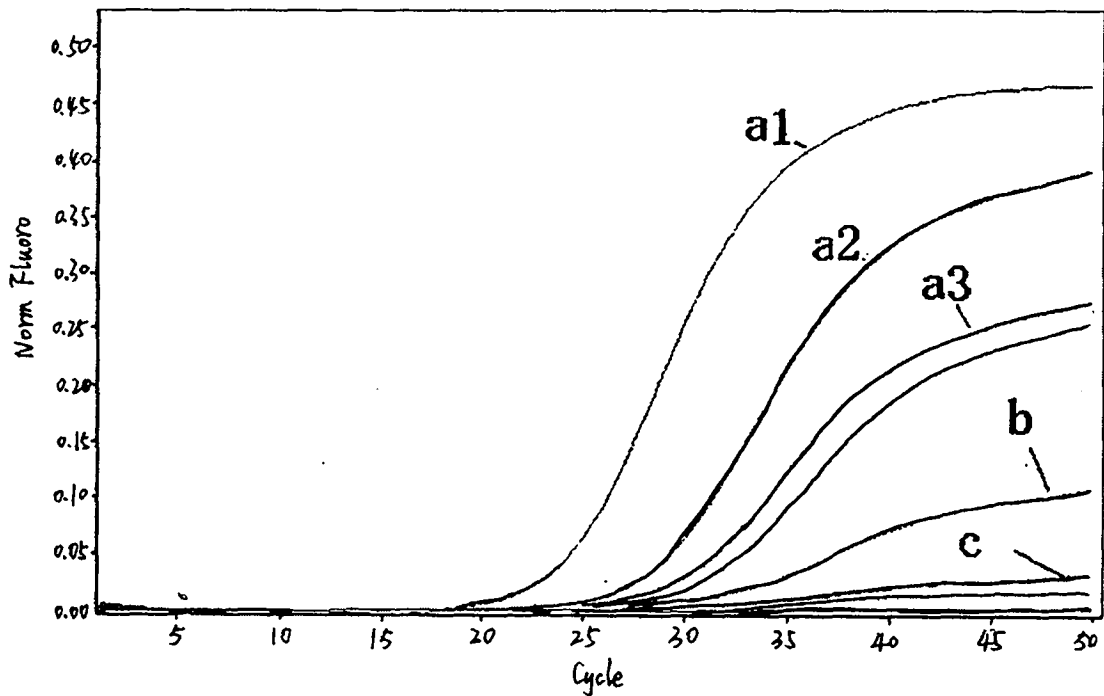


图 2

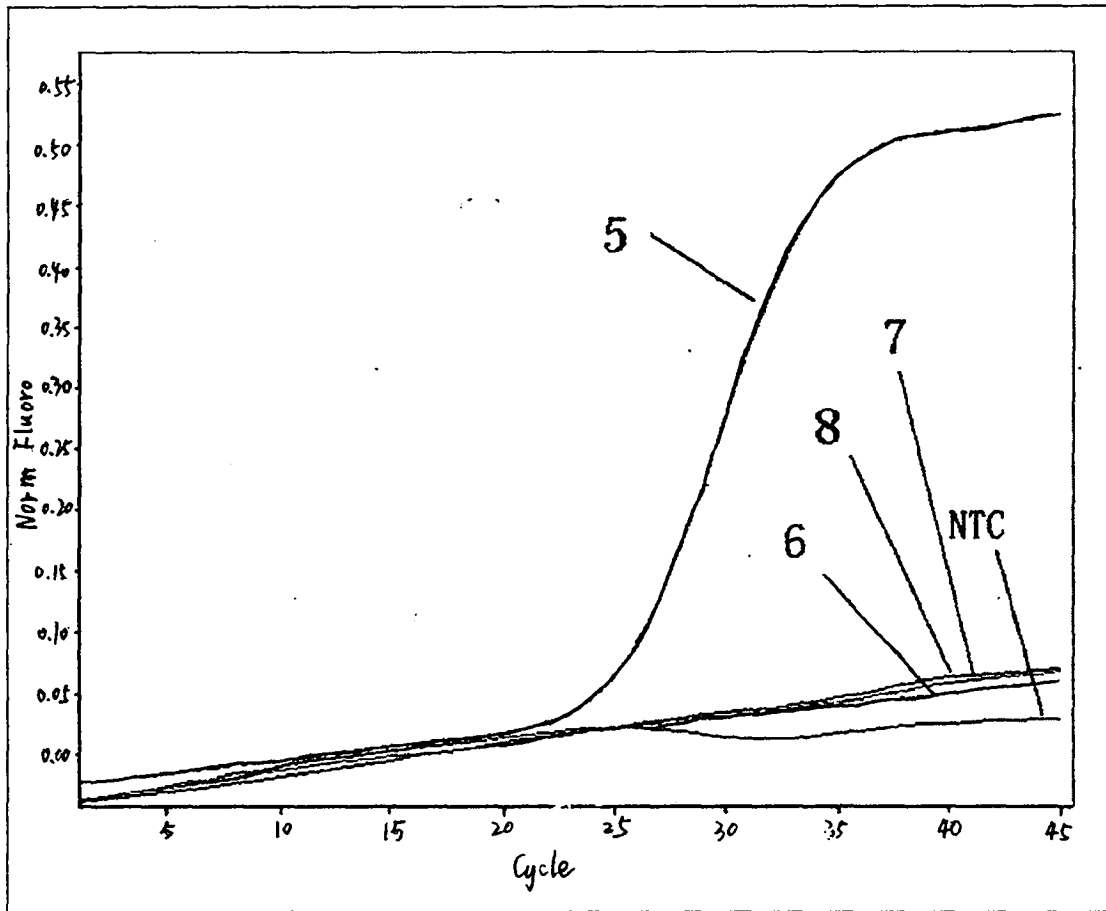


图 3