



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101942526 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 201010225726.7

(22) 申请日 2010.07.05

(73) 专利权人 中国药品生物制品检定所
地址 100050 北京市天坛西里 2 号

(72) 发明人 贺争鸣 高正琴

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1786190 A, 2006.06.14,

孙彦伟等. 荧光定量 RT-PCR 检测猪日本脑

炎病毒. 《动物医学进展》. 2007, 第 28 卷 (第 8 期), 13-17.

吕晓丽. 猪乙脑病毒 RT-PCR、荧光定量 PCR 及多重 RT-PCR 诊断方法建立. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科学辑》. 2009, (第 3 期),

审查员 于仁涛

权利要求书 1 页 说明书 8 页
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法及其试剂盒。所述引物和 TaqMan 探针, 是根据乙脑病毒 E 基因保守区域的保守区域设计的, 用以定量检测样本中乙脑病毒的核酸拷贝数。具体来讲, 所述引物的上游引物具有序列表中 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列, 下游引物具有序列表中 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列; 所述 TaqMan 探针具有序列表中 SEQ ID NO:3 的核苷酸序列。本发明对控制人和动物源性相关生物制品的质量及进出口动物检验检疫领域中有具有较大的实际意义, 能够保证相关生物制品的质量, 控制乙脑病毒传播和人民用药安全。本发明的检测方法及试剂盒可用于临床病人脑脊液样品和小型猪脑组织样品及生物制品的乙脑病毒检定, 应用前景广阔。

1. 用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针, 是根据乙脑病毒 E 基因保守区域的保守区域设计的, 用以定量检测样本中乙脑病毒的核酸拷贝数; 所述引物的上游引物为序列表中 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸, 下游引物为序列表中 SEQ ID NO. 2 所示的核苷酸; 所述 TaqMan 探针为序列表中 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸, 其 5' 端标记有报告荧光基团 FAM, 3' 端标记有淬灭荧光基团 NFQ。

2. 一种用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的试剂盒, 包括权利要求 1 所述用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针。

乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域中病毒的分子生物学检测方法,特别是涉及乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 流行性乙型脑炎病毒首先(1953年)在日本从患者脑组织中分离获得,因此称为日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV),所致疾病在日本称日本脑炎(Japanese encephalitis, JBE)。1950年,我国对该病进行了大量病原学和流行病学研究,为了与甲型脑炎相区别,定名为流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis),简称乙脑。根据我国《传染病防治法》的有关规定,乙脑在我国属于乙类传染病。乙脑是一种中枢神经系统感染的急性传染病,也是一种人兽共患的自然疫源性疾病,临床上以高热、意识障碍、抽搐、呼吸衰竭及脑膜刺激征为特征。乙脑是亚洲最常见的一种病毒性脑炎。据估计,乙脑病毒每年至少造成50,000例临床病例,其中多数为10岁以下儿童,导致约10,000人死亡,另有约15,000例病例留有长期的神经-精神性后遗症。近几十年来,乙脑在一些以前无地方性流行的地区出现了暴发。蚊虫是JEV的主要传播媒介。在动物中,猪是最重要的中间宿主,对乙脑病毒有扩增作用,使乙脑病毒感染呈猪-蚊-人的链状。尽管成年猪在感染乙脑病毒后无临床症状,但妊娠母猪却会产生死胎、木乃伊胎以及弱仔。大多数人感染乙脑病毒后表现为亚临床症状,但儿童却会引起致死性脑炎,孕妇则会导致流产(Chaturvedi MC, Mather A, Chandra A, et al. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. J Infect Dis, 1980, 141, 712-714. Endy TP, Nisalak A. Japanese encephalitis virus: ecology and epidemiology. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, 267: 11-48.)。根据《中华人民共和国动物防疫法》有关规定,农业部会同卫生部组织制定了《人畜共患传染病名录》,并于2009年1月19日施行。在“人畜共患传染病名录”中即有猪乙型脑炎(http://www.ivdc.gov.cn/gg/200902/t20090209_31549.htm[2009-02-04])。

[0003] 乙脑病毒在分类上属于黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)成员。乙脑病毒的基因组为单股正链RNA,全长约11kb,基因结构为5'端有95个核苷酸的非编码区接着一段10296个核苷酸的编码区,随后是585个核苷酸的3'端的非编码区。基因组只有一个开放读码框,其编码是由3个432个氨基酸组成的多聚蛋白前体,该多聚蛋白前体在宿主细胞内,在病毒自身编码的蛋白酶(NS3)及胞内其它酶类作用下,形成3个结构蛋白(C、pre M/M、E)和7个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5),其中C、pre M/M和E基因分别编码衣壳/核心蛋白(capsid protein)、蛋白囊膜前体蛋白/囊膜蛋白(membrane/membraneprotein)和E囊膜糖蛋白(envelope glycoprotein)。C蛋白与基因组RNA构成病毒的核衣壳,对病毒有一定的保护作用。膜蛋白M与病毒的装配、成熟有关。E蛋白是病毒颗粒表面最重要的成分,由它形成的表面抗原决定簇具有血凝活性和中和活性,能刺激机体产生中和抗体,保护机体免受病毒攻击,参与病毒的吸附、穿入、致病并与诱导宿主的免疫应答密切相关。E蛋白基因大小为1500bp,编码500个

氨基酸残基, E 蛋白在乙脑病毒毒力中占有重要位置, E 基因的单点突变即可使乙脑病毒丧失其神经毒力 / 侵袭力。乙脑病毒的 SA14-14-2 减毒株与其母本株 SA14 野毒株的 E 区比较共有 8 个氨基酸残基差异, 具体位置在 E107、E138、E176、E177、E264、E279、E315 和 E439 位, 是毒力减弱的关键氨基酸残基位点 (Arroyo J, Guirakhoo F, Fenner S, et al. Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a Yellow fever virus/ Japanese encephalitis virus chimeravaccine (ChimeriVaxJE). J Virol, 2001, 934-942. Tsarev SA, Sanders ML, Vaughn DW, et al. Phylogenetic analysis suggests only one serotype of Japanese encephalitis virus. Vaccine, 2000, 18, 36-43. Mchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. Am J Trop Med Hyg, 2001, 65, 242-251.)。

[0004] 乙脑病毒的检测主要依赖于 ELISA (酶联免疫吸附试验) 试剂盒, 因此应用较为广泛。另一方面, 乙脑病毒感染后, 病毒血症期与 IgM 抗体出现在时间上并不同步, 完全依赖血清学抗体检测的结果势必会遗漏相当一部分单纯病毒核酸阳性的标本。

[0005] 1985 年, 美国 Cetus 公司和加利福尼亚大学联合创建了一种核酸体外扩增技术 - 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 它的原理类似于 DNA 的体内复制。不久, PE-Cetus 公司推出了第一台 PCR 热循环仪, 使 PCR 技术的自动化成为现实。由于 PCR 技术具有的高度敏感性、特异性以及操作简便、适用样品的广泛性, 所以它及其相关技术的发展速度惊人, 并广泛应用于众多领域。

[0006] 高正琴等人建立了乙脑病毒嵌套式 RT-PCR 检测方法, 用于动物源性样本和实验室常用细胞培养病毒液的检测, 显示出良好的特异性和敏感性, 对保证相关生物制品的安全具有重要意义 (高正琴, 贺争鸣, 邢瑞昌, 等. 乙脑病毒 - 嵌套式 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用. 中国人兽共患病杂志. 2005, 21 (4) : 7-10.)。

[0007] 采用核酸扩增的方法检测病毒 RNA, 现阶段比较成熟的有以下几种: 普通逆转录 PCR、核酸序列依赖扩增 (NASBA)、逆转录实时荧光 PCR、逆转录环介导等温扩增 (LAMP) 等。然而, 这些建立起来的方法, 相当一部分是针对细胞培养病毒液, 很少直接将方法应用于病毒载量较低的临床样本检测。

[0008] 近年来, 实时荧光定量 PCR 技术以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。荧光定量 PCR 定义: 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化, 通过 C_T 值和标准曲线实现对起始模板的定量分析。

[0009] 探针法实时荧光定量 PCR 原理: PCR 扩增时在体系中含有引物的基础上再加入一个特异性的荧光探针, 该探针为一寡核苷酸, 两端分别标记一个报告荧光基团 (R) 和一个淬灭荧光基团 (Q)。当探针完整的时候, 报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收, 仪器检测不到信号。随着 PCR 的进行, Taq 酶在链延伸过程中遇到与模板结合的探针, 其 5' → 3' 外切核酸酶活性就会将探针切断, 报告基团远离淬灭基团, 其能量不能被吸收, 即产生荧光信号。目前仍未见探针法实时荧光定量 PCR 技术用于临床病人和小型猪样本中乙脑病毒的定量检测。

[0010] 因此,为了实现临床样本中乙脑病毒的定量检测,分析人和动物的乙脑病毒感染状况,进一步提高检测的灵敏度,建立乙脑病毒的探针法实时荧光定量 PCR 检测方法,以及研制相应的检测试剂变得十分迫切。

发明内容

[0011] 本发明提供了用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针。

[0012] 本发明所提供的引物和 TaqMan 探针,是根据乙脑病毒 E 基因保守区域的保守区域设计的,用以定量检测样本中乙脑病毒的核酸拷贝数。

[0013] 具体来讲,所述引物的上游引物具有序列 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列,下游引物具有序列 SEQ ID NO :2 的核苷酸序列;所述 TaqMan 探针具有序列 SEQ ID NO :3 的核苷酸序列。

[0014] 所述 TaqMan 探针为经过荧光标记的,其 5' 端标记有报告荧光基团,3' 端标记有淬灭荧光基团。

[0015] 所述报告荧光基团为 FAM,荧光淬灭基团为 NFQ。

[0016] 本发明的第二个目的是提供一种灵敏度较高且可准确定量的乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法。

[0017] 本发明所提供检测方法,是以本发明的引物和 TaqMan 探针进行的实时荧光定量 PCR 检测方法。

[0018] 所述 20ul 实时荧光定量 PCR 反应体系可包括: TaqMan 探针 + 引物 1ul (TaqMan 探针浓度 250nM, 上、下游引物浓度各为 900nM), 样品 cDNA 1ul (1 μg/mL), 无 RNA 酶水 8ul, Taqman Mix (TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016, 购自美国应用系统 (ABI) 公司) 10ul。

[0019] 所述实时荧光定量 PCR 反应条件可为: 先 50 °C 2min; 然后 95 °C 10min; 最后 95 °C 15s, 60 °C 1min, 共 40 个循环, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

[0020] 所述检测方法还包括标准曲线的建立, 方法为: 用含有目的片段的质粒作为标准品, 将其 10 倍系列稀释成①: 8.86×10^9 拷贝 / μl; ②: 8.86×10^8 拷贝 / μl; ③: 8.86×10^7 拷贝 / μl; ④: 8.86×10^6 拷贝 / μl; ⑤: 8.86×10^5 拷贝 / μl; ⑥: 8.86×10^4 拷贝 / μl; ⑦: 8.86×10^3 拷贝 / μl; ⑧: 8.86×10^2 拷贝 / μl; ⑨: 8.86×10^1 拷贝 / μl。将质粒作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测, 得到用于乙脑病毒检测的标准曲线。

[0021] 所述标准曲线的 20ul 实时荧光定量 PCR 反应体系包括: TaqMan 探针 + 引物 1ul (TaqMan 探针浓度 250nM, 上、下游引物浓度各为 900nM), 质粒 DNA 1ul (0.0003219mg/mL), 无 RNA 酶水 8ul, Taqman Mix (TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016, 购自美国应用系统 (ABI) 公司) 10ul; 实时荧光定量 PCR 反应条件与上述相同。

[0022] 本发明的第三个目的是提供一种用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的试剂盒。

[0023] 本发明所提供的试剂盒, 包括上述用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针。

[0024] 本发明提供了一种乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测方法及其专用引物和 TaqMan 探针。该方法是以待检样品中的乙脑病毒核酸为检测对象, 准确度及精密度均较好。

本发明具有以下优点：

[0025] 1、首次建立了乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测方法，利用此检测方法既可以对临床病人脑脊液和小型猪脑组织中的乙脑病毒进行检测，也可以对生物制品中的乙脑病毒进行检测。

[0026] 2、本检测方法与乙脑病毒的其它常规检测方法如病毒的分离培养鉴定、全病毒 ELISA 法和嵌套式 PCR 相比，灵敏度较高，具有取样便捷，检测效率得到了很大的提高，并且有效的防止了污染。

[0027] 3、本检测方法与乙脑病毒的其它常规检测方法，如病毒的分离培养鉴定、全病毒 ELISA 法和嵌套式 PCR 相比，具有操作程序简单易用的特点，并可进一步制成检测试剂盒，操作程序化，适合大面积推广和应用。

[0028] 4. 本检测方法不仅能够评价人和猪的乙脑病毒感染状况，同时也为乙脑病毒的流行病学、致病机理等相关领域的研究提供了依据。

[0029] 5. 本检测方法也可用于动物源性生物制品和实验室常用细胞培养物中外源性乙脑病毒的污染监测，为生物制品的安全性检测提供了有效工具。

[0030] 综上所述，本发明能快速、准确地检测出人（如临床病人脑脊液样本）和小型猪（如小型猪脑组织样本）的乙脑病毒，对保障实验用小型猪的质量和人类健康具有重要意义；本发明也可用于动物源性生物制品和实验室常用细胞培养物中外源性乙脑病毒的污染监测，对控制人和动物源性相关生物制品的质量及进出口动物检验检疫领域中有具有较大的实际意义，能够保证相关生物制品的质量，控制乙脑病毒传播和人民用药安全。本发明的检测方法及试剂盒可用于乙脑的诊断及生物制品的乙脑病毒检定，应用前景广阔。

[0031] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0032] 图 1 为 10 倍系列稀释 pMD-JEV-E 质粒标准品的乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测扩增曲线

[0033] 图 2 为乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测的标准曲线

[0034] 图 3 为乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测 23 份样本荧光扩增曲线

[0035] 图 4 为乙脑病毒探针法实时光定量 PCR 检测特异性的荧光扩增曲线

具体实施方式

[0036] 下述实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人所编《分子克隆实验指南》中所述的条件，或按照制造厂商建议的条件。所用引物及 TaqMan 探针由美国应用系统 (ABI) 公司合成，所有序列测定工作均由宝生物工程（大连）有限公司完成。

[0037] 实施例 1、用于对乙脑病毒 (JEV) 进行实时荧光定量 PCR 检测的引物及 TaqMan 探针的设计

[0038] 参照 GenBank 收录的乙脑病毒 SA14 基因组全序列 (GeneBank :U14163)，将与乙脑病毒基因组结构极为相似的登革病毒和西尼罗河病毒分别进行序列比对，选择 E 基因保守区域，采用 ABI Primer Express 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件，设计合成 TaqMan 探

针及引物。探针的荧光标记选择 FAM(5' 端) 作为报告发光基团, NFQ(3' 端) 为淬灭基团。序列如下:

[0039] 上游引物 (JEV-1) :5' -GAGAAACAGAGAACTCCTCATGGAA-3' (序列表中 SEQID NO : 1) ;

[0040] 下游引物 (JEV-2) :5' -CTGTGACCCAAGAGCAACAAC-3' (序列表中 SEQ ID NO :2)。

[0041] TaqMan 探针 :5' FAM-CACGCCACAAAACAG-NFQ 3' (序列表中 SEQ ID NO :3)。

[0042] 实施例 2、乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测

[0043] 一、标准曲线的建立

[0044] 1、构建 pMD-JEV-E 重组质粒

[0045] 1.1 目的基因 - 乙脑病毒 E 基因的克隆

[0046] 1.1.1 乙脑病毒 RNA 的提取

[0047] 以下操作必须严格按照要求在 P2 实验室负压生物安全柜内进行。

[0048] (1) 无菌条件下将乙脑动物脑组织样本 50mg 或乙脑病人脑脊液 500 μ L 或乙脑病毒液 300 μ L 置入 1.5mL 洁净离心管, 加入 500 μ L Trizol Reagents (购自美国 Promega 公司), 充分振荡, 室温静置 5min。

[0049] (2) 加入 100 μ L 氯仿, 用力振荡 10sec, 室温静置 5min, 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 10min。

[0050] (3) 小心将上层水相转移到另一洁净离心管中, 加等体积异丙醇, 充分混匀, 12000r/min 离心 10min。

[0051] (4) 弃上清, 加入 500 μ L 75% 乙醇 (用无 RNA 酶水新鲜配制), 充分混匀, 12000r/min 离心 10min, 小心吸取大部分乙醇。将离心管敞口在室温空气中干燥 10min 等待乙醇挥发干净。

[0052] (5) 加入 50 μ L 无 RNA 酶水溶解沉淀。

[0053] (6) 用紫外分光光度仪测定所得 RNA 浓度 (浓度为 1 μ g/mL), 立即进行逆转录或置于 -70 $^{\circ}$ C 保存。

[0054] 乙脑病毒 RNA 也可以从其他商业渠道获取, 或以公开文献介绍的其它方法提取。

[0055] 1.1.2 逆转录

[0056] 逆转录的反应体系为 20 μ L, 依次加入下列成分 :4 μ L $MgCl_2$ (25mM)、2 μ L Reverse Transcription 10 \times Buffer (Reverse Transcription System (逆转录作用系统, 购自美国 Promega 公司)、2 μ L dNTP Mixture (10mM)、0.5 μ L Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor ((重组) 核糖核酸酶抑制剂, 购自美国 Promega 公司) (40unit/ μ L)、0.5 μ L 随机引物 (50pmol, Reverse Transcription System (逆转录作用系统), 购自美国 Promega 公司)、0.1 μ L AMV 反转录酶 (15unit/ μ L, Reverse Transcription System (逆转录作用系统, 购自美国 Promega 公司)、6 μ L RNA、4.9 μ L 无 RNA 酶水。

[0057] 逆转录反应条件为 : 室温 10min, 42 $^{\circ}$ C 15min, 95 $^{\circ}$ C 5min, 4 $^{\circ}$ C 5min。所得 cDNA 即可用作 PCR 反应模板。

[0058] 1.1.3 PCR 扩增

[0059] PCR 的反应体系为 50 μ L, 依次加入下列成分 :5 μ L 10 \times EX Buffer ($MgCl_2$ Plus, TaKaRa Ex Taq, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司)、4 μ L dNTP Mixture (10mM)、

0.5 μ L 正向引物:CGAAGTTGGCATT TTTGTGC(50pmol)、0.5 μ L 逆向引物:GCTCGCAACGGAAACAATCG(50pmol)、0.25 μ L EX Taq(5unit/ μ L,购自宝生物工程(大连)有限公司)、5 μ L cDNA、34.75 μ L 无 RNA 酶水。

[0060] PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 30sec,55 $^{\circ}$ C 30sec,72 $^{\circ}$ C 1min,共 30 个循环。

[0061] 1.1.4 琼脂糖凝胶电泳检测

[0062] 配制 1%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)。取 PCR 扩增产物 5 μ L,与 1 μ L 的 6 \times 载样缓冲液混匀,加到凝胶孔格中。电泳缓冲液为 1 \times TAE 缓冲液,电泳条件为 110V 恒压/30min,凝胶成像系统下拍摄记录电泳结果。结果得到了 622bp 的目的条带,用 Agarose Gel DNA Purification Kit(琼脂糖凝胶回收试剂盒,购自宝生物工程(大连)有限公司)回收并纯化。

[0063] 1.2 乙脑病毒 E 基因重组质粒的构建

[0064] 将乙脑病毒 E 基因片段与 pMD18-T 载体(购自宝生物工程(大连)有限公司)进行连接,连接反应体系:2 \times Rapid Ligation Buffer 5 μ L(宝生物工程(大连)有限公司试剂盒),pMD18-T 载体 0.5 μ L(浓度 50ng/ μ L),目的基因 4 μ L(45 μ g/mL),T4 DNA Ligase 0.5 μ L(5U/ μ L)。然后将连接产物热转化至 E. coli Competent Cell JM109 中,涂布 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。将选定的含有阳性克隆的单菌落进行培养,提取质粒 DNA,用 EcoR I 和 Hind III 限制性内切酶进行酶切鉴定并测序。酶切结果获得了 622bp 的目的条带及 pMD18-T 质粒条带,与预期结果相符。测序结果表明获得了序列及插入位置均正确的含目的基因的重组质粒,命名为 pMD-JEV-E。测定质粒 DNA 浓度,计算拷贝数,结果拷贝数为 8.86×10^{10} 拷贝/ μ L,-40 $^{\circ}$ C 保存。

[0065] 2、标准品检测

[0066] 将 pMD-JEV-E 质粒 DNA 作为模板进行乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测,建立标准曲线。具体操作如下:将质粒 DNA 进行 10 倍系列稀释成①: 8.86×10^9 拷贝/ μ L;②: 8.86×10^8 拷贝/ μ L;③: 8.86×10^7 拷贝/ μ L;④: 8.86×10^6 拷贝/ μ L;⑤: 8.86×10^5 拷贝/ μ L;⑥: 8.86×10^4 拷贝/ μ L;⑦: 8.86×10^3 拷贝/ μ L;⑧: 8.86×10^2 拷贝/ μ L;⑨: 8.86×10^1 拷贝/ μ L。每个稀释度重复平行试验 3 次。

[0067] 标准品检测反应体系为 20 μ L,依次加入下列成分:TaqMan 探针+引物 1 μ L(TaqMan 探针浓度 250nM,上、下游引物浓度各为 900nM),质粒 DNA 1 μ L(0.0003219mg/mL),无 RNA 酶水 8 μ L,Taqman Mix(TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016,购自美国应用系统(ABI)公司)10 μ L。

[0068] 标准品检测反应条件为:先 50 $^{\circ}$ C 2min;然后 95 $^{\circ}$ C 10min;最后 95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

[0069] 标准品探针法实时荧光定量 PCR 扩增曲线如图 1 所示(①: 8.86×10^9 拷贝/ μ L;②: 8.86×10^8 拷贝/ μ L;③: 8.86×10^7 拷贝/ μ L;④: 8.86×10^6 拷贝/ μ L;⑤: 8.86×10^5 拷贝/ μ L;⑥: 8.86×10^4 拷贝/ μ L;⑦: 8.86×10^3 拷贝/ μ L;⑧: 8.86×10^2 拷贝/ μ L;⑨: 8.86×10^1 拷贝/ μ L。)

[0070] 3、标准曲线的绘制

[0071] 根据所得 C_T 值与其对应的标准品的对数值绘制标准曲线(图 2),标准曲线的 R 平方值为 0.998,荧光定量 PCR 反应的扩增效率为 99.022%。标准曲线显示:本发明建立的乙

脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测方法有 9 个数量级的线性检测范围,进一步说明该检测方法具有非常高的灵敏度。

[0072] 二、乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测

[0073] 以 1 份临床确诊的乙脑病人脑脊液 cDNA 和 22 份乙脑病毒阳性的小型猪脑组织 cDNA 作为模板进行乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测。每份样本重复平行试验 3 次。

[0074] 样本检测体系为 20 μ L,依次加入下列成分:(TaqMan 探针浓度 250nM,上、下游引物浓度各为 900nM,样品 cDNA 1 μ L(1 μ g/mL),无 RNA 酶水 8 μ L, TaqmanMix(TaqMan Gene Expression Master Mix 4369016,购自美国应用系统(ABI)公司)10 μ L。

[0075] 检测反应条件为:先 50 $^{\circ}$ C 2min;然后 95 $^{\circ}$ C 10min;最后 95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

[0076] 探针法实时荧光定量 PCR 检测检测 23 份样本扩增曲线如图 3 所示,结果显示:以乙脑病人脑脊液 cDNA、乙脑病毒阳性的小型猪脑组织 cDNA 为模板均出现了目的荧光扩增曲线。

[0077] 试验一、乙脑病毒探针法荧光定量 PCR 检测方法的重复性分析

[0078] 乙脑病毒探针法荧光定量 PCR 检测方法的重复性分析方法为:将含乙脑病毒 E 基因的重组质粒 pMD-JEV-E 的 DNA 分别进行 10 倍系列稀释后,各取 1 μ L 作为模板,采用上述反应体系进行实时荧光定量 PCR 检测,每份样本重复平行试验 3 次,分两个批次进行,试验结果取 C_T 平均值,通过统计计算 C_T 标准差(SD)、 C_T 变异系数(CV)。重复性分析结果结果见表 1:批内重复测定其变异系数 CV 值小于 1.9%,批间重复测定 CV 值小于 0.8%,均说明本发明所建立的乙脑病毒探针法荧光定量 PCR 检测方法的稳定性良好。

[0079] 表 1 乙脑病毒探针法荧光定量 PCR 检测方法的重复性试验结果

[0080]

重复性	质粒拷贝数	C_T 值			C_T 平均值	C_T 标准差	C_T 变异系数
		1	2	3	C_T Mean	C_T SD	C_T CV
批内重复测定	10^5	20.56375	20.90122	21.11841	20.861124	0.2794934	0.0133978
	10^4	24.50341	24.6344	24.78418	24.640663	0.1404903	0.0057015
	10^3	27.74498	27.91633	28.21407	27.958459	0.2373629	0.0084898
	10^2	30.83682	31.14447	31.22188	31.067724	0.2036795	0.0065559
	10^1	32.97129	34.0809	34.11664	33.722942	0.6511958	0.0193101
批间重复测定	10^5	16.62055	16.65333	16.8708	16.71489	0.136009	0.0081369
	10^4	20.78204	20.68934	20.74299	20.73812	0.046545	0.0022444
	10^3	23.40626	23.32916	23.46639	23.40061	0.068791	0.0029397
	10^2	26.369	26.40692	26.41513	26.39701	0.02461	0.0009323
	10^1	30.52478	30.63807	30.98832	30.71706	0.241652	0.007867

[0081] 试验二、乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性

[0082] 将乙脑病毒 SA14-14-2 疫苗株(购自中国药品生物制品检定所)cDNA、乙脑病毒 Nakayama 株(购自中国药品生物制品检定所)cDNA、BHK-21 细胞(购自中国药品生物制品检定所)cDNA 作为模板进行探针法实时荧光定量 PCR 检测,评价反应系统的特异性。反应

体系及反应条件与实施例 2 相同。每份样本重复平行试验 2 次。

[0083] 探针法实时荧光定量 PCR 检测特异性扩增曲线如图 4 所示,结果显示:以乙脑病毒 -SA14-14-2 疫苗株 cDNA、乙脑病毒 -Nakayama 株 cDNA 为模板出现了目的荧光扩增曲线,而以脑脊髓炎病毒 (GDVII) cDNA、BHK-21 细胞 cDNA 为模板没有出现目的荧光扩增曲线。结果说明:本发明用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针的特异性良好,定量反应体系特异性良好。

[0084] 实施例 3、乙脑病毒探针法实时荧光定量 PCR 检测试剂盒

[0085] 将用于对乙脑病毒进行实时荧光定量 PCR 检测 JEV TaqMan assay mix 50 μ L (TaqMan 探针浓度 250nM, 上、下游引物浓度各为 900nM)、JEV TaqMan mix 500 μ L、JEV 阳性质控品 50 μ L、阴性质控品 50 μ L 以及无 RNA 酶水 500 μ L 共同包装,得到乙脑病毒的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒 (50 次反应)。

[0001]

序列表

<160> 3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

gagaaacaga gaactcctca tggaa

25

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

ctgtgacca agagcaaca c

21

[0002]

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

cacgccacaa aacag

15

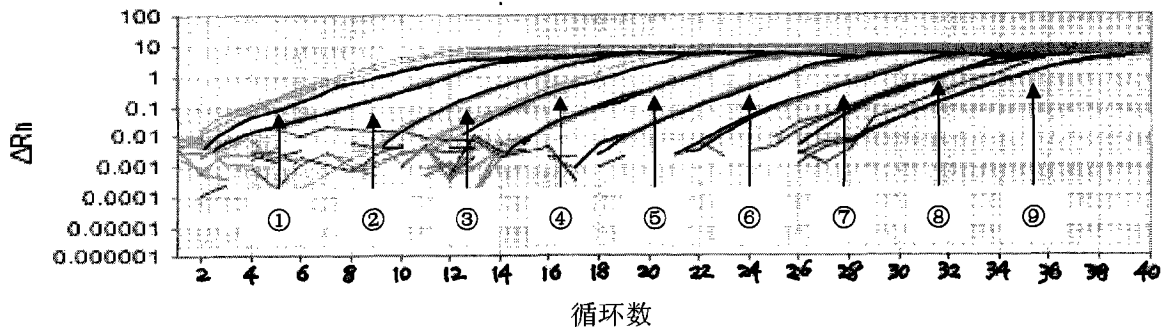


图 1

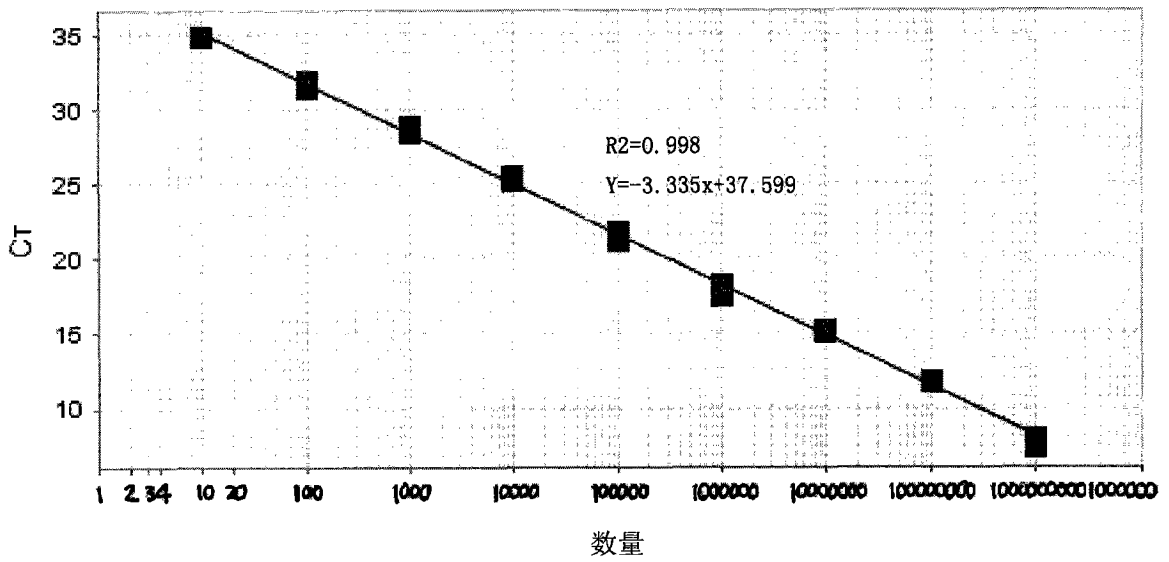


图 2

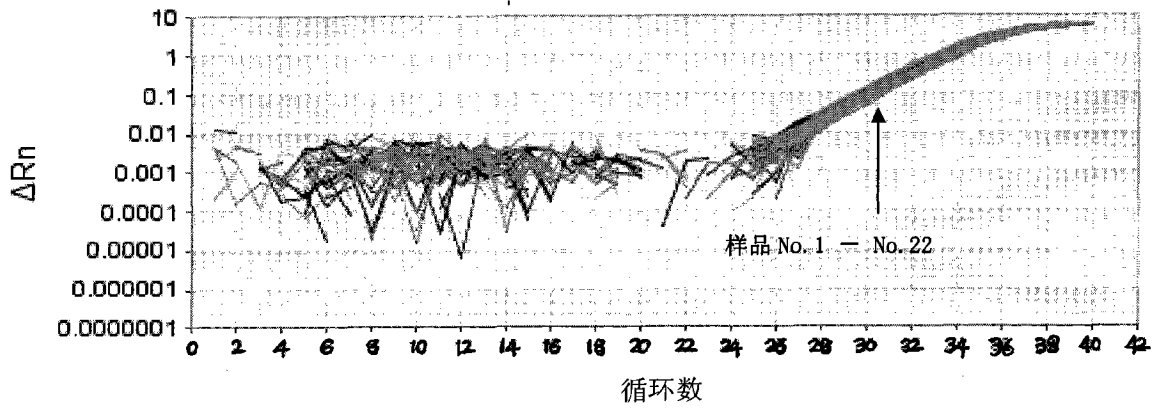


图 3

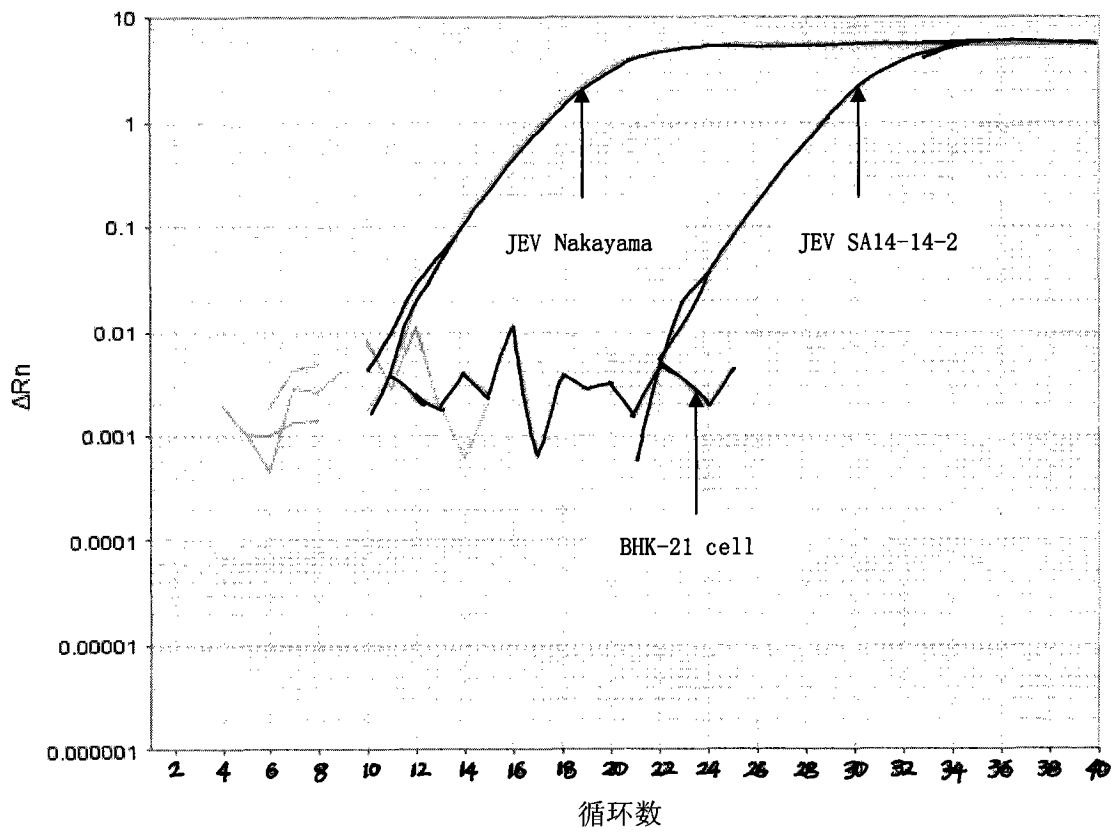


图 4