



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112080587 A

(43) 申请公布日 2020.12.15

(21) 申请号 202010898296.9

(22) 申请日 2020.08.31

(71) 申请人 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心

地址 200135 上海市浦东新区民生路1208号

(72) 发明人 薛俊欣 李健 熊炜 张强 蒋原 申进玲 黄忠荣

(74) 专利代理机构 上海领誉知识产权代理有限公司 31383

代理人 车超平

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

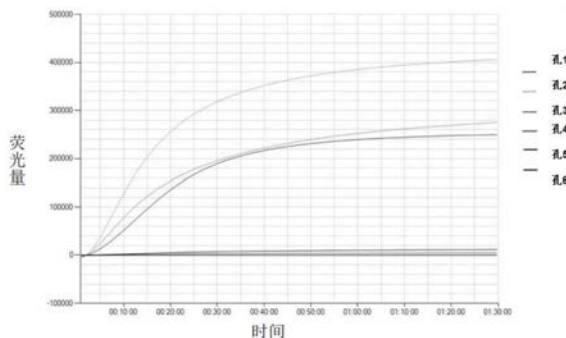
权利要求书1页 说明书9页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增引物组、试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增引物组、试剂盒及方法,所述引物组为包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和/或SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5的核酸序列,或与其同源性大于90%的核酸序列;方法包括,采用进行新型冠状病毒的核酸扩增;向扩增后的产物中加入crRNA、T7转录酶、NTP、探针和缓冲液制成检测液;检测所述检测液的荧光强度,根据荧光曲线判断样品中是否含有新型冠状病毒;本发明提供了可代替荧光PCR方法,成为更加廉价、高效、应用范围广泛的检测新型冠状病毒的方法、扩增引物及试剂盒。



1. 一种用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增引物组,其特征在于,所述引物组为包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和/或SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5的核酸序列,或与其同源性大于90%的核酸序列。

2. 一种用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1所述的RAA-CRISPR扩增引物组。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括水化缓冲液和醋酸镁。

4. 一种高效检测新型冠状病毒的方法,其特征在于,包括采用权利要求1-3任意一项所述的RAA-CRISPR扩增引物组或RAA-CRISPR扩增试剂盒进行新型冠状病毒的核酸扩增。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,还包括以下步骤:

1) 向扩增后的产物中加入Cas13a酶、crRNA、T7转录酶、NTP、探针和缓冲液制成检测液;

2) 检测所述检测液的荧光强度,根据荧光曲线判断样品中是否含有新型冠状病毒。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述核酸扩增的方法为重组酶介导等温核酸扩增。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,重组酶介导等温核酸扩增的条件为:37℃、30min。

8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤1)与步骤2)之间还包括:向扩增后的产物中加入苯酚氯仿纯化扩增产物。

9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述荧光强度的检测仪器包括恒温扩增仪、酶标仪中的任意一种。

10. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,收集荧光的时间不少于10min。

用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增引物组、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及用于高效检测新型冠状病毒的 RAA-CRISPR 扩增引物组、试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)传播方式多样。目前已有证据表明,新型冠状病毒的传播方式包括飞沫传播和接触传播等。而动物及其产品在运输、屠宰、加工和储存等过程中被新型冠状病毒感染或者污染的可能性极大。现有研究认为新型冠状病毒来源于蝙蝠,也有证明穿山甲体内发现的冠状病毒与SARS-CoV-2的相似性高达85.5%-92.4%,穿山甲也被认为是SARS-CoV-2的中间宿主。可见,SARS-CoV-2具有广泛的宿主,是一种新发现、传染性强、危害大的人兽共患性传染病。

[0003]

[0004] 新型冠状病毒目前的检测方法主要是基于PCR方法检测病毒的核酸以及免疫学方法检测患者的抗体。但是PCR和实时荧光PCR需要特定温度循环的扩增仪器,不便于实现现场检测。目前应用广泛的恒温扩增技术如环等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)与重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification)等可以满足现场检测的需求。但是也有证明LAMP存在特异性方面的缺陷,容易导致假阳性。张锋等也证明,重组酶介导等温核酸扩增技术(Recombinase Aided Amplification,RAA)对引物的设计非常敏感,需要从多对引物中筛选才能达到高灵敏度检测的要求。此外,血清学检测方法也有一定的局限性。目前血清学检测方法是检测患者感染早期血清中的IgM或IgG,但是也有研究证明IgM通常在感染5天以后出现,IgG通常在感染10天以后出现,并且感染的早期抗体水平比较低,容易出现漏检或者非特异性结合。因此,目前确诊仍然需要通过荧光PCR方法。

[0005] 但是荧光PCR需要价格昂贵的荧光PCR仪,且检测环境要求高。不利于大范围推广。因此,现有技术还缺少一种高效、低成本、操作便捷的新型新型冠状病毒(SARS-CoV-2)检测试剂盒及其方法。

[0006] 猪流行性腹泻病毒(PEDV)属于冠状病毒科、冠状病毒属。到目前为止,还没有发现本病毒有不同的血清型。本病毒对乙醚、氯仿敏感。病毒粒子呈现多型性,倾向圆形,外有囊膜。从患病仔猪的肠灌液中浓缩和纯化的病毒不能凝集家兔、小鼠、猪、豚鼠、绵羊、牛、马、雏鸡和人的红细胞。

[0007] 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)感染可导致猪传染性胃肠炎,该病是一种急性、接触性传染病,TGEV可引起仔猪肠黏膜上皮细胞发生变性、死亡,造成肠道水、电解质代谢紊乱,营养吸收障碍,从而引起仔猪腹泻、脱水、营养流失、甚至死亡。猪传染性胃肠炎主要呈地区性流行,各个品种及不同年龄段猪均对本病易感,但最主要的发病群体是新生仔猪。调查发现对两周龄以下仔猪的致死率高达100%。

[0008] 犬冠状病毒 (CCV) 为单链RNA病毒,有6~7种多肽,其中4种是糖肽,其不含RNA聚合酶及神经氨酸酶,可使犬发生程度不同的胃肠炎症状。特征有 频繁呕吐、腹泻、沉郁、厌食等症状。

[0009] 猫冠状病毒 (FCV) 分为两个生物型,猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV) 和猫肠道冠状病毒 (FECV)。FECV在猫肠道中普遍存在,感染FECV的猫可产生轻微的肠道症状,能够自愈,死亡率低。感染FIPV的猫可患致死性疾病FIP,该病以浆膜炎、系统性炎症和肉芽肿样病变为主要特征。

[0010] 火鸡冠状病毒 (TCV) 属冠状病毒科、日冕冠状病毒属。是单链RNA病毒。可导致火鸡发生急性、高度传染性的疾病。

[0011] 禽传染性支气管炎病毒 (IBV) 属于冠状病毒属的一个代表种。鸡传染性支气管炎病毒具有很强的变异性,世界上分离出30多个血清型。主要传播方式是病鸟从呼吸道排出病毒,经空气飞沫传染给易感鸟。此外可通过被污染的饲料、饮水、笼具等经消化道传染。过热、严寒、拥挤、通风不好及维生素、矿物质供应不足均可促使本病发生。各种日龄的鸡都易感,但5周龄内的鸡症状较明显,死亡率可达15-19%。

发明内容

[0012] 本发明克服现有技术的缺陷,提供了用于高效检测新型冠状病毒的 RAA-CRISPR 扩增引物组、试剂盒及方法,其可代替荧光PCR方法,成为更加廉价、高效、应用范围广的方法。

[0013] 本发明的第一个方面,提供了一种用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR 扩增引物组,所述引物组为包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和/或SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5的核酸序列,或与其同源性大于90%的核酸序列。

[0014] 本发明的第二个方面,提供了一种用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR 扩增试剂盒,所述试剂盒包括本发明所述的RAA-CRISPR扩增引物组。

[0015] 优选的,所述引物组为包含SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2和/或SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5的核酸序列,或与其同源性大于90%的核酸序列。

[0016] 优选的,所述试剂盒还包括水化缓冲液和醋酸镁。

[0017] 本发明的第三个方面,提供了一种高效检测新型冠状病毒的方法,包括采用本发明提供的RAA-CRISPR扩增引物组或RAA-CRISPR扩增试剂盒进行新型冠状病毒的核酸扩增。

[0018] 优选的,方法还包括以下步骤:

[0019] 1) 向扩增后的产物中加入Cas13a酶、crRNA、T7转录酶、NTP、探针和缓冲液制成检测液;

[0020] 2) 检测所述检测液的荧光强度,根据荧光曲线判断样品中是否含有新型冠状病毒。

[0021] 优选的,所述核酸扩增的方法为重组酶介导等温核酸扩增。

[0022] 优选的,重组酶介导等温核酸扩增的条件为:37℃、30min。

[0023] 优选的,步骤1)与步骤2)之间还包括:向扩增后的产物中加入苯酚氯仿纯化扩增产物。

- [0024] 优选的,所述荧光强度的检测仪器包括恒温扩增仪、酶标仪中的任意一种。
- [0025] 优选的,收集荧光的时间不少于10min。
- [0026] 优选的,方法包括以下步骤:
- [0027] 1) RAA扩增:按照50 μ L反应体系,每支冻干粉中加上下游引物各2 μ L (10 μ M),水化缓冲液41.5 μ L,模板2 μ L,醋酸镁2.5 μ L。反应条件为37 $^{\circ}$ C 30min。
- [0028] 2) 扩增产物纯化:将扩增产物分别加入苯酚氯仿后震荡并10000g,离心5 min。
- [0029] 3) Cas13a酶检测:按照25 μ L反应体系:Cas13a酶0.5 μ L、10倍反应缓冲液2.5 μ L, crRNA 1 μ L, T7转录酶1 μ L, NTP 2 μ L, 探针5 μ L, RAA产物4.5 μ L, 水8.5 μ L, 反应温度为37 $^{\circ}$ C, 采用荧光恒温扩增仪或酶标仪收集 荧光90min。
- [0030] 优选的,所述方法是非诊断、非治疗目的。
- [0031] 本发明相对于现有技术具有如下优点:本发明提供了基于RAA-Cas13a检测方法的新新型冠状病毒检测方法以及扩增新型冠状病毒的引物及试剂盒,降低对荧光PCR检测设备的依赖,丰富临床检测手段,为基于恒温扩增的新新型冠状病毒的检测试剂的制备和生产提供参考。

附图说明

- [0032] 图1为本发明实施例2中两组引物RAA扩增产物的琼脂糖电泳结果图;
- [0033] 图2为本发明实施例2中两组引物RAA扩增产物的Cas13a检测结果图;
- [0034] 图3为本发明实施例3中不同浓度的质粒的琼脂糖电泳结果图;
- [0035] 图4为本发明实施例3中不同浓度的质粒的Cas13a检测结果图;
- [0036] 图5为本发明实施例4中荧光PCR灵敏度检测结果;
- [0037] 图6为本发明实施例5中多种病毒的琼脂糖电泳结果图;
- [0038] 图7为本发明实施例5中多种病毒的Cas13a检测结果图;
- [0039] 图8为本发明实施例6中酶标仪检测Cas13a荧光信号的结果图。

具体实施方式

- [0040] 主要试剂和仪器
- [0041] 主要试剂
- [0042] Cas13a酶采用常规方法表达和纯化;
- [0043] RT-RAA检测试剂盒购自杭州众测生物科技有限公司;
- [0044] RNaseAlert Lab Test Kit V2购自Invitrogen公司;
- [0045] RNA合成试剂盒购自NEB公司;
- [0046] 荧光PCR检测试剂购自Takara公司;
- [0047] 新型冠状病毒核壳蛋白基因N蛋白编码基因的全长质粒(下面简称质粒)购自生物工程(上海)股份有限公司。
- [0048] 其他试剂为国产分析纯试剂。
- [0049] 主要仪器
- [0050] NanoDrop 2000核酸检测仪;Genie II恒温扩增仪;Bio-Rad电泳仪;TECAN 化学发光酶标仪,ABI ViiA7荧光PCR仪和离心机等。

[0051] 实施例1 RAA引物、crRNA的设计与合成

[0052] 鉴于新型冠状病毒与其他病毒的同源性较高,发明人通过对全长序列进行比,经过大量的筛选,共设计出了2套扩增引物及相应的crDNA。引物以及crDNA 序列见表1。引物及crDNA由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,利用RNA 合成试剂盒按照说明书操作将合成的crDNA转录为crRNA。

[0053] 表1

名称	序列	序号
[0054] nCoV F1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGACTTGTGCTAATGACCCTGTG	SEQ ID
	GGTTTACACTTAA	NO. 1
nCoV R1	CAGCTGACTGAAGCATGGGTTTCGCGGAGTTGATC	SEQ ID NO. 2
[0055] nCoV crDNA1	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGATTTAGACTACCCCAAAAAC	SEQ ID
	GAAGGGGACTAAAACGCCATAACCTTTCACATACCGCAGACG	NO. 3
[0055] nCoV F2	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGTGATAGATATCCTGCTAA	SEQ ID
	TTCCATTGTTTGTA	NO. 4
nCoV R2	CACATGGACTGTCAGAGTAATAGAAAAATGGTAAT	SEQ ID NO. 5
[0055] nCoV crDNA2	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGATTTAGACTACCCCAAAAAC	SEQ ID
	GAAGGGGACTAAAACCTTATCAAAAAGCTGGTGTGTGGAATGCA	NO. 6

[0056] 实施例2 RAA扩增及Cas13a酶检测

[0057] 2.1、RAA扩增:利用实施例1设计的两对引物,模板为质粒,进行RAA 扩增。按照50 μ L反应体系,每支冻干粉中加上下游引物各2 μ L(10 μ M),水化缓冲液41.5 μ L,模板2 μ L,醋酸镁2.5 μ L。反应条件为37 $^{\circ}$ C30min。

[0058] 2.2、扩增产物纯化:将2组扩增产物分别加入苯酚氯仿后震荡并10000g,离心5min。

[0059] 2.3、吸取步骤2.2中2组水相成分利用1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增。结果 如图1所示,图中M为DL2000,1为nCoV F1和nCoV R1扩增产物,2为nCoV F2和nCoV R2扩增产物。图中结果显示引物nCoV F2和nCoV R2的扩增效率高 于引物nCoV F1和nCoV R1。

[0060] 2.4、Cas13a酶检测:将2.2中苯酚氯仿法纯化后的RAA扩增产物以及阴性 对照无Rnase水,分别加入下述25 μ L反应体系:Cas13a酶0.5 μ L,10倍反应 缓冲液2.5 μ L,crRNA 1 μ L,T7转录酶1 μ L,NTP 2 μ L,RNA探针5 μ L(订购的FAM和TAMARA标记的多聚U序列),RAA产物4.5 μ L,水8.5 μ L。反应温度为37 $^{\circ}$ C,采用荧光恒温扩增仪收集荧光90min。结果如图2所示,图中孔1为以nCoV F1和nCoV R1扩增产物,孔2为nCoV F2和nCoV R2扩增 产物,孔3为阴性对照。图中结果显示引物nCoV F2和nCoV R2扩增产物的Cas13a 体系的荧光值迅速升高,在

10min之内达到最大荧光值,而引物nCoV2和nCoV2扩增产物的Cas13a体系的荧光值在监测结束仍未达到最大荧光值。可见,高浓度的RAA产物可以提高检测效率和信号强度。

[0061] 实施例3 RAA扩增结合Cas13a酶检测(RAA-Cas13a检测)的方法的灵敏度检测

[0062] 3.1、利用Nanodrop 2000检测质粒浓度后,将质粒分别稀释为 10^6 拷贝/ μL 、 10^4 拷贝/ μL 、 10^2 拷贝/ μL 、 10^1 拷贝/ μL 和 10^0 拷贝/ μL 。

[0063] 3.2、采用实施例2的方法进行RAA扩增,其中,模板质粒为步骤3.1获取的梯度质粒,因为nCoV2和nCoV2。

[0064] 3.3、将步骤3.2得到的产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析。结果如图3所示,图中,M为DL2000、1-6的质粒浓度分别为 1×10^6 拷贝/反应、 1×10^4 拷贝/反应、 1×10^2 拷贝/反应、 1×10^1 拷贝/反应、 1×10^0 拷贝/反应、0拷贝/反应。图中结果显示:采用电泳法检测到阳性质粒的最低拷贝数为 10^6 拷贝/ μL ,而 10^4 拷贝/ μL 及低于该浓度的质粒不能被检出。

[0065] 3.4、将步骤3.2得到的产物采用实施例2的方法进行Cas13a酶检测。结果如图4所示,图中,孔1-6:质粒浓度分别为 1×10^8 拷贝/反应、 1×10^4 拷贝/反应、 1×10^2 拷贝/反应、 1×10^1 拷贝/反应、 1×10^0 拷贝/反应、0拷贝/反应。图中结果显示:采用Cas13a检测系统最低可以检测到 10^2 拷贝/ μL 的阳性质粒。

[0066] 综上,结合步骤3.3和步骤3.4的试验结果,Cas13a检测具有显著的信号放大作用,其检测效果明显优于常规的电泳法。

[0067] 实施例4荧光PCR的灵敏度检测

[0068] 利用Nanodrop 2000检测质粒浓度后,将质粒分别稀释为 10^5 拷贝/ μL 、 10^4 拷贝/ μL 、 10^3 拷贝/ μL 、 10^2 拷贝/ μL 和10拷贝/ μL 和1拷贝/ μL ,将上述样本利用中国疾病预防控制中心(CDC)提供的针对核壳蛋白基因区域的引物和探针进行荧光PCR检测。

[0069] 上游引物:GGGGAAGTCTCTCTGCTAGAAT,

[0070] 下游引物:CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG,

[0071] 探针:5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'。

[0072] 反应体系为20 μL :上游引物0.8 μL (10 μM),下游引物0.8 μL (10 μM),探针0.4 μL (10 μM),ROX 0.4 μL ,2倍反应缓冲液10 μL ,模板1 μL ,水 6.6 μL 。

[0073] 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20s,45个循环;在60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集荧光。依据CDC提供的依据进行结果判定。

[0074] 结果如图5所示,图中扩增曲线自左至右质粒浓度分别为 1×10^5 拷贝/反应、 1×10^4 拷贝/反应、 1×10^3 拷贝/反应、 1×10^2 拷贝/反应和10拷贝/反应,0拷贝/反应无扩增曲线。图中结果显示,利用荧光PCR方法检测不同浓度阳性质粒的发现,在质粒浓度大于 10^2 拷贝/ μL 时出现典型的荧光扩增曲线并且Ct值 <37 ,判定为阳性,质粒浓度为10拷贝/ μL 时,判定为可疑,阴性对照无扩增曲线(图5)。由此可初步判定荧光PCR检测的灵敏度低于 10^2 拷贝/ μL 。

[0075] 综合实施例3和实施例4的结果可知,RAA-Cas13a检测限达到 10^2 个拷贝,接近或者相当于荧光PCR方法的灵敏度,可见,本发明提供的RAA-Cas13a检测方法具有替代荧光PCR方法的潜能。

[0076] 实施例5 RAA-Cas13a检测的特异性及临床样本的检测

[0077] 猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、犬冠状病毒(CCV)、猫冠

状病毒 (FCV)、猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV)、火鸡冠状病毒 (TCV)、禽 传染性支气管炎病毒 (IBV) 7种病毒阳性样本由本实验室保存,经磁珠法提取 总核酸后利用反转录试剂盒按照说明书操作反转录为cDNA。新型冠状病毒检测 阳性核酸 (cDNA) 由上海海关国际旅行卫生保健中心提供,该阳性核酸荧光PCR 检测的CT值约为35,按照实施例2提供的RAA反应体系扩增后分别利用1%琼脂 糖凝胶电泳及Cas13a检测体系检测。

[0078] 电泳结果如图6所示,图中M为DL2000、1为COVID-19、2为PEDV、3为 TGEV、4为CCV、5为FCV、6为FIPV、7为TCV、8为IBV。图中结果显示,电 泳法不能检测出阳性样本。

[0079] Cas13a检测结果如图7所示,图中孔1为COVID-19;孔2为PEDV;孔3 为TGEV;孔4: CCV;孔5:FCV;孔6:FIPV;孔7:TCV;孔8:IBV。图中结果显示,Cas13a法可以检测新型冠状病毒,但是不能检测出猪流行性腹 泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、犬冠状病毒 (CCV)、猫 冠状病毒 (FCV)、猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV)、火鸡冠状病毒 (TCV)、禽 传染性支 气管炎病毒 (IBV),可见RAA-Cas13a检测方法具有高效检测新型冠 状病毒的特异性。

[0080] 实施例6酶标仪检测Cas13a荧光信号

[0081] 为了检测是否可以通过多数实验室配备的酶标仪来检验Cas13a反应体系中 荧光 信号。

[0082] 将50 μ L实施例2制备的Cas13a酶检测用体系加入平底96孔板,其中阳 性对照为 10^2 拷贝/ μ L的质粒,震荡混匀后避光37 $^{\circ}$ C孵育60min,期间每10min 检测1次荧光强度,激发 波长为492nm,发射波长为518nm,每个检测设置两 个重复。

[0083] 结果如图8所示,避光孵育10min即可区分阴性孔和阳性孔的荧光值,二 者差异极 显著 ($P < 0.01$)。随着反应时间的延长,阳性孔的荧光强度逐渐升高,升高趋势与恒温荧光 检测设备收集的荧光强度变化曲线相似。可见,本发明提供 的RAA-Cas13a检测方法可以采用实验室常用的酶标仪进行检测,这样大大了增 加了RAA-Cas13a检测方法的实用性。

[0084] 实施例7

[0085] 本实施例对3份临床阳性样本利用本发明提供的RAA-Cas13a检测方法进行 检测, 结果显示,本发明提供的方法与荧光PCR方法全部吻合,可以检测到临床 荧光PCR的Ct值在 35左右的阳性样本,基本可以满足灵敏度的要求。

[0086] 综上所述,实验证明RAA的引物设计对后续Cas13a的荧光信号的放大效率 有影响,筛选高效的RAA引物对有助于进一步提升本方法的检测效率及信号强 度,进而有可能 进一步提高检测的灵敏度。Cas13a检测系统可以明显的弥补RAA 方法检测灵敏度方面的缺陷,可以在检测灵敏度方面提高100倍以上,此外,由 于crRNA的特异性结合才能激活 Cas13a的RNA酶活性,Cas13a检测系统可以有 效提高RAA检测的灵敏度。

[0087] 恒温扩增对仪器和检测硬件要求更低,荧光信号可以通过荧光恒温扩增仪、酶标 仪等多种仪器进行检测,并且有性能良好的国产设备可以替代,对检测环境 的适应性更好。此外,相对于荧光PCR仪,恒温扩增仪和酶标仪更加廉价易得, 本发明检测的RAA-Cas13a检测方法是对荧光PCR方法的有效补充,拓展了目前 新型冠状病毒分子生物学检测 方法的多样性。

[0088] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只作为范例,本发明并不 限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的 等同修改和替 代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围 下所作的均等变换和修

改,都应涵盖在本发明的范围内。

序列表

序列表

<110> 申请人 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心

<120> 用于高效检测新型冠状病毒的 RAA-CRISPR 扩增引物组、试剂盒及方法

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 60

[0089]

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

aattctaata cgactcacta tagggacttg tgctaatgac cctgtgggtt ttacacttaa

60

<210> 2

<211> 34

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

cagctgactg aagcatgggt tcgcgagtt gatc

34

序列表

<210> 3

<211> 89

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

aattctaata cgactcacta taggggattt agactacccc aaaaacgaag gggactaaaa

60

cgccataacc tttccacata ccgcagacg

89

<210> 4

<211> 60

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

aattctaata cgactcacta taggggtgtcg atagatatcc tgctaattcc attgtttgta

60

<210> 5

<211> 35

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

cacatggact gtcagagtaa tagaaaaatg gtaat

35

[0090]

序列表

<210> 6

<211> 89

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0091]

<400> 6

aattctaata cgactcacta taggggattt agactacccc aaaaacgaag gggactaaaa

60

ctttatcaaa agctggtgtg tggaatgca

89

序列表

<110> 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心

<120> 用于高效检测新型冠状病毒的RAA-CRISPR扩增引物组、试剂盒及方法

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

aattctaata cgactcacta tagggacttg tgctaatac cctgtgggtt ttacacttaa 60

<210> 2

<211> 34

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

cagctgactg aagcatgggt tcgaggagtt gatc 34

<210> 3

<211> 89

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

aattctaata cgactcacta taggggattt agactacccc aaaacgaag gggactaaaa 60

cgccataacc tttccacata ccgagacg 89

<210> 4

<211> 60

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

aattctaata cgactcacta tagggtgtcg atagatatcc tgctaattcc attgtttgta 60

<210> 5

<211> 35

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

cacatggact gtcagagtaa tagaaaaatg gtaat 35

<210> 6

<211> 89

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

aattctaata cgactcacta taggggattt agactacccc aaaaacgaag gggactaaaa 60

ctttatcaaa agctgggtgt tggaatgca 89

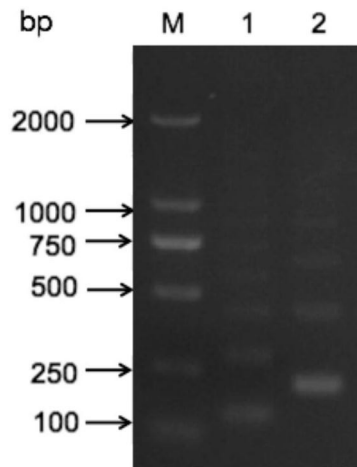


图1

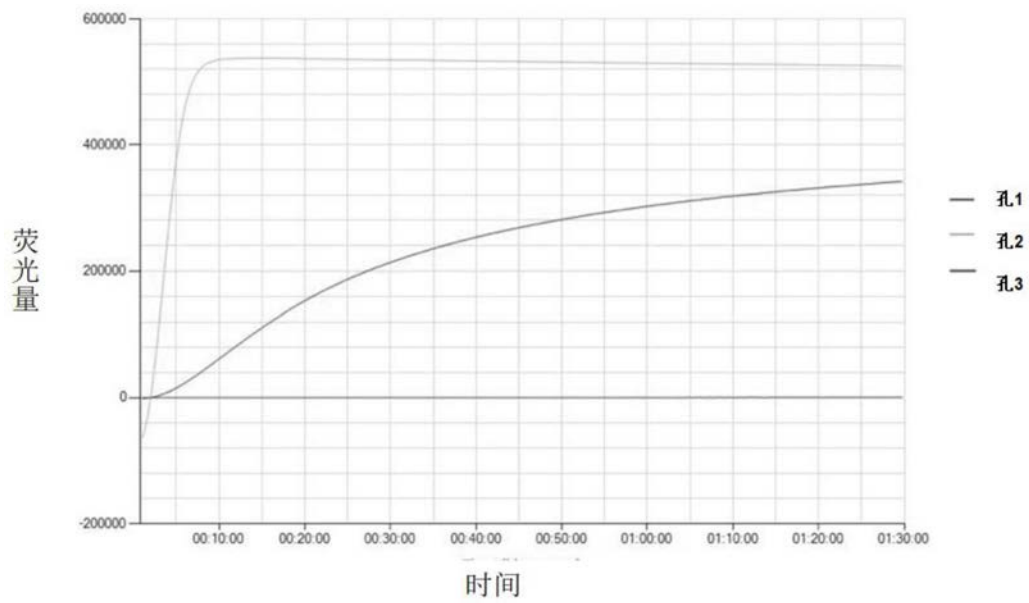


图2

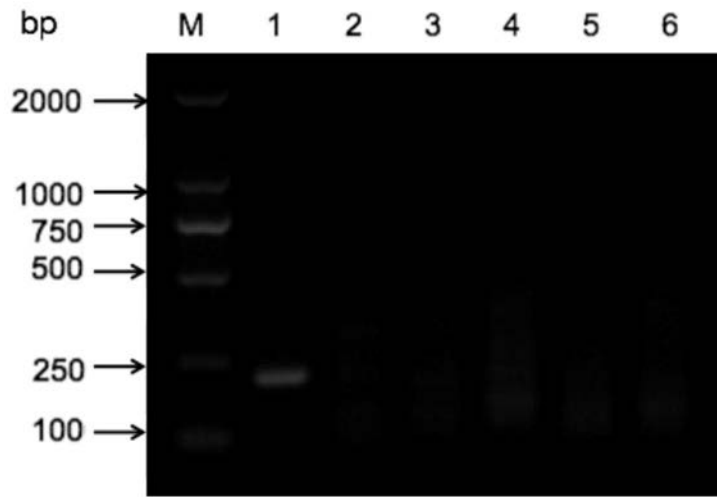


图3

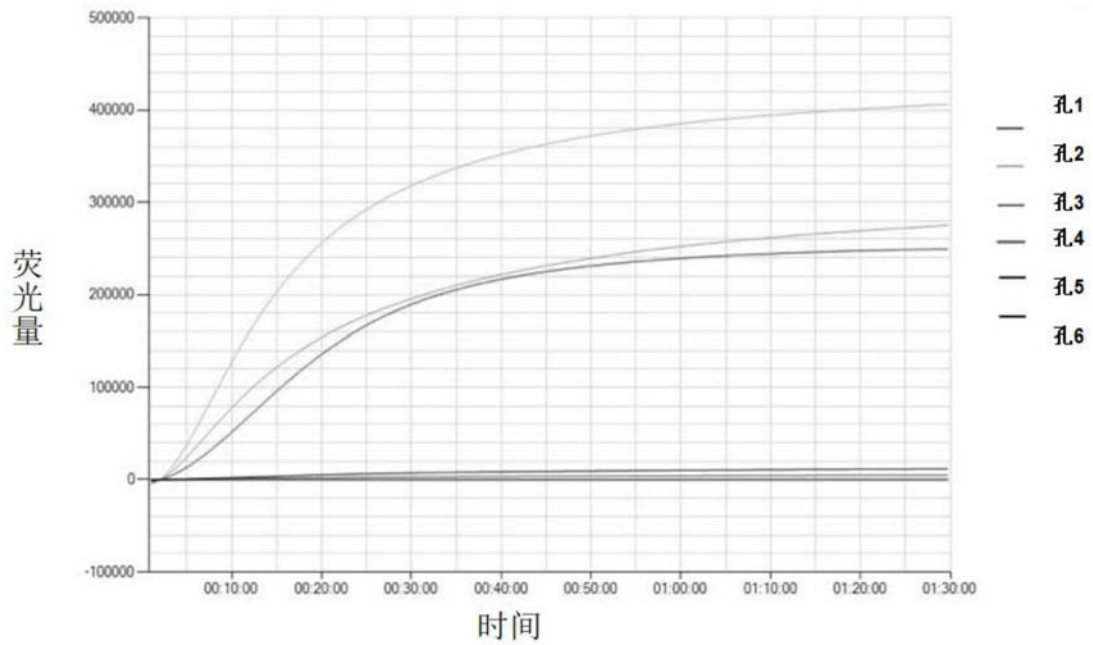


图4

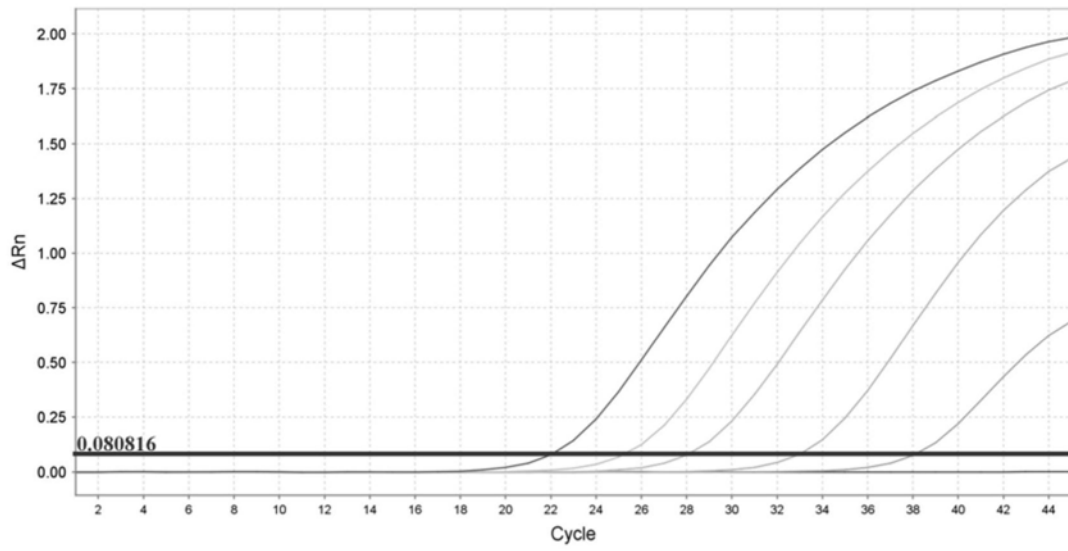


图5

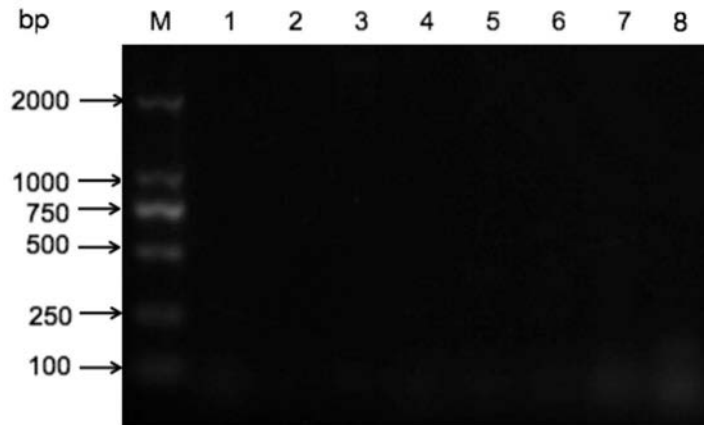


图6

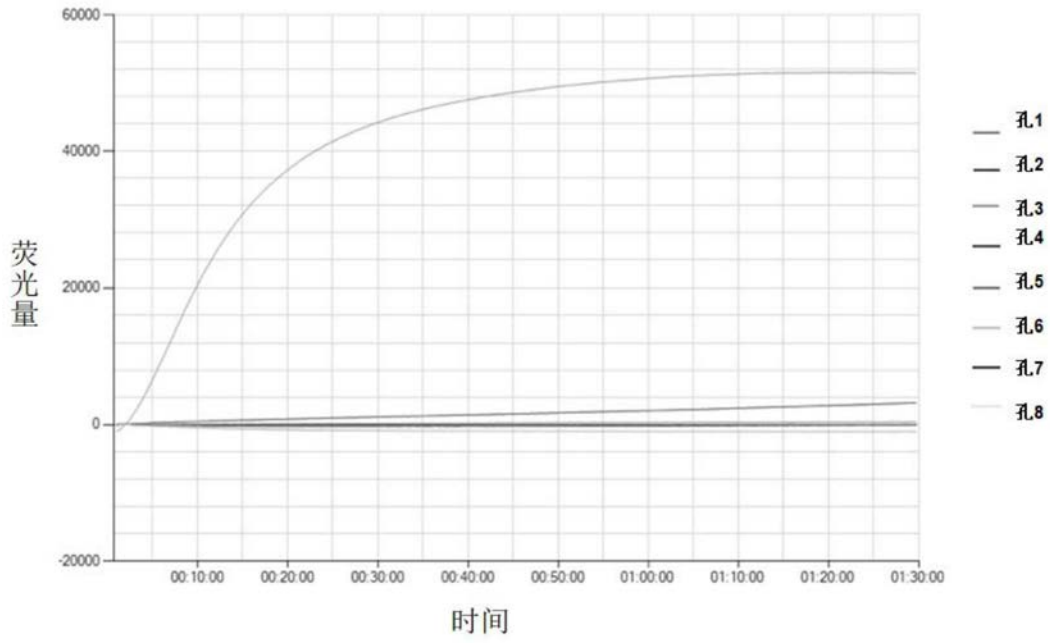


图7

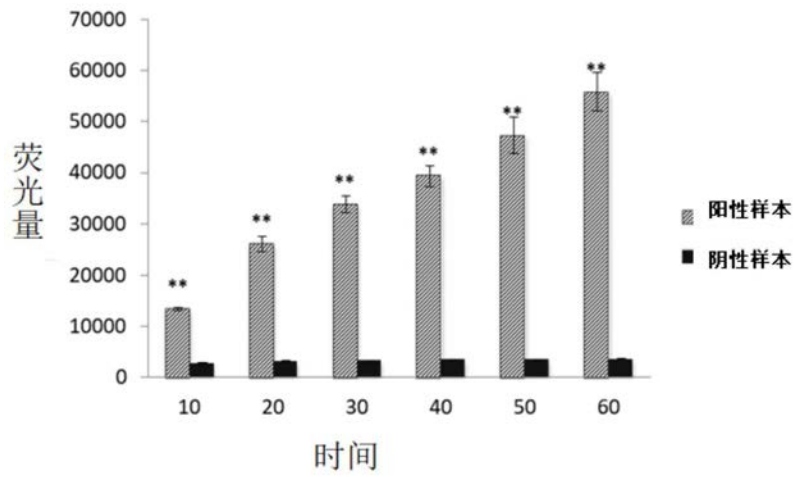


图8