



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107653333 A

(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201711055046.3

(22)申请日 2017.11.01

(71)申请人 王素华

地址 325000 浙江省温州市学院中路315号

(72)发明人 王素华 吴绍强 帅江冰 袁淑辉

杜爱芳 吕继洲 张晓峰

(74)专利代理机构 温州金瓯专利事务所(普通合伙) 33237

代理人 王坚强

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6893(2018.01)

C12Q 1/6848(2018.01)

C12Q 1/04(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12R 1/90(2006.01)

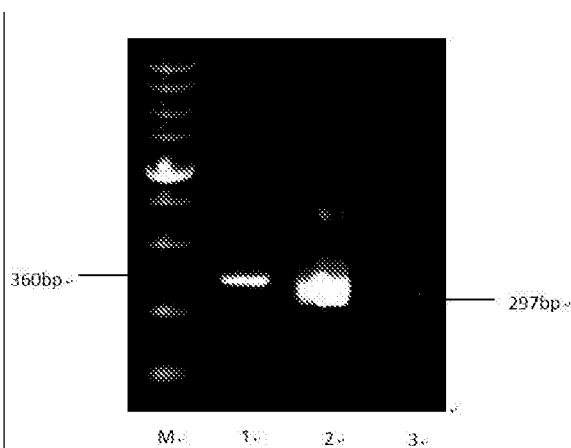
权利要求书2页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法

(57)摘要

一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法,本方法的模板DNA制备步骤简单费用低,本方法检测非常方便快捷,并能提高检测方法的特异性及敏感性,单蜱虫甚至蜱虫的部分组织器官提取的微量基因组DNA即可作为模板进行鉴定,相较于现有的血涂片镜检技术诊断牛巴贝斯虫病,本发明只需采集牛体表寄生的蜱,通过提取蜱的DNA,利用设计的牛巴贝斯虫外引物和内引物,巢式PCR扩增目的基因,可以准确、快速的判断牛是否感染了牛巴贝斯虫。



1. 一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物,其特征在于,包括设计的两对特异性引物,具体为:

引物F1: 5'-CGA-GGA-AGG-AAC-TAC-CGA-TG-3';

引物R1: 5'-GCA-TAA-CGA-CGT-GCA-AAC-TT-3';

引物F2: 5'-ACC-GAT-GTT-GAA-TAT-CTT-G-3';

引物R2: 5'-CTT-GGA-AAG-AGT-TGG-AAT-CT-3'.

2. 一种牛巴贝斯虫巢式PCR检测试剂盒,其特征在于,所述的巢式PCR检测试剂盒包括以下组分:

(一)权利要求1所述的两对特异性引物;

(二)阳性对照:所述的阳性对照为含有目的基因片段的重组质粒,该质粒含牛巴贝斯虫1092bp基因片段;

(三)阴性对照:所述的阴性对照为去离子水;

(四)Taq酶。

3. 根据权利要求2所述的牛巴贝斯虫巢式PCR检测试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照通过将扩增产物克隆至pUCm-T转化DH5- α 感受态细胞,经酶切鉴定及测序后获得为阳性重组质粒的阳性对照。

4. 一种采用权利要求1所述的特异性引物的牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)被检标本DNA提取:取微小牛蜱数只,酒精清洗,每只微小牛蜱放入单独的1.5ml EP dof管,200 μ L PBS液浸没微小牛蜱,用样品破碎机破碎蜱的虫体,吸取破碎后的溶液,加入Trizol试剂裂解,采用常规的酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,干燥后用三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶解,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

(2)以权利要求1中的外引物F1、R1扩增:在EP dof管中加入处理后的微小牛蜱标本DNA,同时设阴、阳性对照,10 \times PCR Buffer,MgCl₂,dNTP,Taq酶,25pmol/ μ L F1,25pmol/ μ L R1,DNA模板,ddH₂O混匀后稍离心的50 μ L反应体系中进行第一轮PCR;

(3)以权利要求1中的内引物F2、R2扩增:以第一轮PCR产物DNA为模板,以F2、R2为第二套引物,在10 \times PCR Buffer,MgCl₂,dNTP,Taq酶,25pmol/ μ L F2,25pmol/ μ L R2,DNA模板,ddH₂O混匀后稍离心的50 μ L反应体系进行第二轮PCR;

(4)PCR产物鉴定:取第二轮PCR产物2 μ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定;

(5)测序:将第二轮PCR产物送测序公司进行序列测定。

5. 根据权利要求4所述的牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,其特征在于,所述的步骤(2)中的第一轮PCR反应条件为:

95 $^{\circ}$ C预热5min ;

95 $^{\circ}$ C保持30s,55 $^{\circ}$ C保持1min,72 $^{\circ}$ C保持1min,该步骤进行共30个循环;

末次延伸至72 $^{\circ}$ C,保持10min。

6. 根据权利要求4所述的牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,其特征在于,所述的步骤(2)中的第二轮PCR反应条件为:

95 $^{\circ}$ C预热5min ;

95 $^{\circ}$ C保持30s,55 $^{\circ}$ C保持1min,72 $^{\circ}$ C保持1min,该步骤进行共30个循环;

末次延伸至72°C,保持10min。

7. 根据权利要求4所述的牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,其特征在于,所述的步骤(2)中第一轮PCR50 μ L反应体系中微小牛蜱样品基因组DNA模板量为5 μ l,10 \times PCR Buffer 为5 μ L,Mgc1₂为2 μ L,dNTP为4 μ L,Taq酶为0.5 μ L,25pmol/ μ L F1为 1 μ L,25pmol/ μ L R1 为1 μ L, ddH₂O为31.5 μ L。

8. 根据权利要求4所述的牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,其特征在于,所述的步骤(4)中第二轮PCR50 μ L反应体系中第一轮PCR产物DNA模板量为2 μ l, 10 \times PCR Buffer为5 μ L,Mgc1₂为2 μ L,dNTP为4 μ L,Taq酶为0.5 μ L,25pmol/ μ L F2 1 μ L,25pmol/ μ L R2为1 μ L, ddH₂O为34.5 μ L。

一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法

技术领域

[0001] 本发明具体涉及生物学技术领域,具体涉及一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法。

背景技术

[0002] 牛巴贝斯虫是一类经蜱传播,红细胞内寄生的原虫,属于复顶亚门,由该类寄生虫引起的巴贝斯虫病,在世界上许多地区发生和流行,我国各地也常有发生,给畜牧业和国民经济造成巨大损失。牛感染该虫后,常出现贫血、发热、血红蛋白尿、共济失调等症状,严重时引起死亡。该病已经造成了巨大的经济损失,并呈世界范围扩大趋势,因而引起国内外学者的广泛关注。巴贝斯虫是经蜱传播的一种血液原虫,寄生于哺乳动物红细胞、淋巴细胞和其他细胞中,也可以寄生在蜱的各种组织细胞中。目前,普通PCR检测技术仍是诊断寄生在蜱虫体内的巴贝斯虫最常用的方法,但是该方法具有很大的一个缺点—低特异性,扩增时容易产生假阳性。而且在检测牛巴贝斯虫的过程中发现,牛巴贝斯虫与双芽巴贝斯虫之间常出现交叉反应。敏感性和特异性更高的方法,例如反向线性斑点杂交技术(RBL)以及PCR-ELISA等也已经见诸于报道,但是这些方法都存在假阳性率高的缺点。另外,出于经济和实际应用等原因,大部分方法并不适合于流行病学的实验室诊断。基于DNA水平的分子诊断,其敏感性与靶基因扩增的数目是息息相关的。因此选择一个在基因组中高拷贝数的基因作为靶基因将会大大提高现有PCR方法的敏感性。

发明内容

[0003] 为了解决现有技术的缺陷及不足,本发明提供了一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法,建立一种简便、高效、实用的DNA检测方法。该方法可用于牛巴贝斯虫病流行病学调查及快速检测。

[0004] 本发明采用的技术解决方案是:一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物,包括设计的两对特异性引物,具体为:

引物F1: 5'-CGA-GGA-AGG-AAC-TAC-CGA-TG-3';

引物R1: 5'-GCA-TAA-CGA-CGT-GCA-AAC-TT-3';

引物F2: 5'-ACC-GAT-GTT-GAA-TAT-CTT-G-3';

引物R2: 5'-CTT-GGA-AAG-AGT-TGG-AAT-CT-3'。

[0005] 一种牛巴贝斯虫巢式PCR检测试剂盒,所述的巢式PCR检测试剂盒包括以下组分:

- (一)权利要求1所述的两对特异性引物;
- (二)阳性对照:所述的阳性对照为含有目的基因片段的重组质粒,该质粒含牛巴贝斯虫1092bp基因片段;
- (三)阴性对照:所述的阴性对照为去离子水;
- (四)Taq酶。

[0006] 所述的阳性对照通过将扩增产物克隆至pUCm-T转化DH5- α 感受态细胞,经酶切鉴定及测序后获得为阳性重组质粒的阳性对照。

[0007] 一种牛巴贝斯虫巢式PCR检测方法,包括以下步骤:

(1)被检标本DNA提取:取微小牛蜱数只,酒精清洗,每只微小牛蜱放入单独的1.5ml EP dof管,200 μ L PBS液浸没微小牛蜱,用样品破碎仪破碎蜱的虫体,吸取破碎后的溶液,加入Trizol试剂裂解,采用常规的酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,干燥后用三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸溶解,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

(2)以权利要求1中的外引物F1、R1扩增:在EP dof管中加入处理后的微小牛蜱标本DNA,同时设阴、阳性对照,10 \times PCR Buffer,Mgcl₂,dNTP,Taq酶,25pmol/ μ L F1,25pmol/ μ L R1,DNA模板,ddH₂O混匀后稍离心的50 μ L反应体系中进行第一轮PCR;

(3)以权利要求1中的内引物F2、R2扩增:以第一轮PCR产物DNA为模板,以F2、R2为第二套引物,在10 \times PCR Buffer 5 μ L,Mgcl₂ 2 μ L,dNTP 4 μ L,Taq酶 0.5 μ L,25pmol/ μ L F2 1 μ L,25pmol/ μ L R2 1 μ L,DNA模板2 μ L,ddH₂O 34.5 μ L混匀后稍离心的50 μ L反应体系进行第二轮PCR;

(4)PCR产物鉴定:取第二轮PCR产物2 μ L进行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定;

(5)测序:将第二轮PCR产物送测序公司进行序列测定。

[0008] 所述的步骤(2)中的第一轮PCR反应条件为:

95 $^{\circ}$ C预热5min ;

95 $^{\circ}$ C保持30s,55 $^{\circ}$ C保持1min,72 $^{\circ}$ C保持1min,该步骤进行共30个循环;

末次延伸至72 $^{\circ}$ C,保持10min。

[0009] 所述的步骤(2)中的第二轮PCR反应条件为:

95 $^{\circ}$ C预热5min ;

95 $^{\circ}$ C保持30s,55 $^{\circ}$ C保持1min,72 $^{\circ}$ C保持1min,该步骤进行共30个循环;

末次延伸至72 $^{\circ}$ C,保持10min。

[0010] 所述的步骤(2)中第一轮PCR50 μ L反应体系中小牛蜱样品基因组DNA模板量为5 μ l,10 \times PCR Buffer 为5 μ L,Mgcl₂为2 μ L,dNTP为4 μ L,Taq酶为0.5 μ L,25pmol/ μ L F1为 1 μ L,25pmol/ μ L R1 为1 μ L, ddH₂O 为31.5 μ L。

[0011] 所述的步骤(4)中第二轮PCR50 μ L反应体系中第一轮PCR产物DNA模板量为2 μ l,10 \times PCR Buffer为5 μ L,Mgcl₂为2 μ L,dNTP为4 μ L,Taq酶为0.5 μ L,25pmol/ μ L F2 1 μ L,25pmol/ μ L R2为1 μ L, ddH₂O为34.5 μ L。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明提供了一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法,本方法的模板DNA制备步骤简单费用低,本方法检测非常方便快捷,并能提高检测方法的特异性及敏感性,单蜱虫甚至蜱虫的部分组织器官提取的微量基因组DNA即可作为模板进行鉴定,相较于现有的血涂片镜检技术诊断牛巴贝斯虫病,本发明只需采集牛体表寄生的蜱,通过提取蜱的DNA,利用设计的牛巴贝斯虫外引物和内引物,巢式PCR扩增目的基因,可以准确、快速的判断牛是否感染了牛巴贝斯虫。

附图说明

[0013] 图1为本发明方法对RAP-1基因第一轮(由外引物扩增)PCR和第二轮(由内引物扩

增)PCR产物的凝胶电泳图,其中1为 F1和R1 PCR扩增结果;2为 F2和R2 PCR扩增结果;3为阴性对照。

[0014] 图2为RAP-1基因巢式PCR产物的测序结果,共297bp。

[0015] 图3为重组质粒的酶切鉴定结果。

[0016] 图4为重组质粒的PCR鉴定结果。

具体实施方式

[0017] 设置巢式PCR检测试剂盒,该试剂盒包括:

(1) EP dof管:反应管内含10×PCR Buffer、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、氯化镁(MgCl₂)。

[0018] (2) 引物F1、引物R1、引物F2、引物R2。引物F1、引物R1、引物F2、引物R2分别是按下述碱基序列由DNA合成仪合成的DNA片段:

引物F1: 5'-CGA-GGA-AGG-AAC-TAC-CGA-TG-3';

引物R1: 5'-GCA-TAA-CGA-CGT-GCA-AAC-TT-3';

引物F2: 5'-ACC-GAT-GTT-GAA-TAT-CTT-G-3';

引物R2: 5'-CTT-GGA-AAG-AGT-TGG-AAT-CT-3'。

[0019] (3) 阳性对照:该对照为含有目的基因片段的重组质粒,由本实验室构建。其方法是:将扩增产物克隆至pUCm-T转化DH5-α感受态细胞,经酶切鉴定及测序后获得阳性重组质粒,该质粒含牛巴贝斯虫1092bp基因片段。

[0020] (4) 阴性对照,该对照为去离子水(ddH₂O);

(5) Taq酶。

[0021] 操作程序:

(1) 被检标本DNA提取:取微小牛蜱数只,75%的酒精清洗,每只微小牛蜱放入单独的1.5ml EP dof管,200μL PBS液浸没蜱,用样品破碎仪破碎蜱的虫体,吸取破碎后的溶液,加入Trizol试剂裂解,采用常规的酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,干燥后用三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA TE)溶解,-20℃保存备用;

(2) 外引物F1、R1扩增:在EP dof管中加入处理后的标本DNA,同时设阴、阳性对照,50μL反应体系为:10×PCR Buffer 5μL,MgCl₂(25mM) 2μL,dNTP(2.5mM) 4μL,Taq酶(5U/μL) 0.5μL,25pmol/μL F1 1μL,25pmol/μL R1 1μL,DNA模板5μL,ddH₂O 31.5μL,混匀后稍离心。

[0022] 扩增条件为:

95℃, 5min;

95℃, 30sec;

55℃, 1min;30×

72℃, 1min;

72℃, 10min

(3) 内引物F2、R2扩增:以第一轮PCR产物DNA为模板(1μL),以F2、R2为第二套引物,50μL反应体系为:10×PCR Buffer 5μL,MgCl₂(25mM) 2μL,dNTP(2.5mM) 4μL,Taq酶(5U/μL) 0.5μL,25pmol/μL F2 1μL,25pmol/μL R2 1μL,DNA模板2μL,ddH₂O 34.5μL,混匀后稍离心。

[0023] 扩增条件为:

95℃, 5min;

95℃, 30sec;

55℃, 1min; 30×

72℃, 1min;

72℃, 10min

(4) PCR产物鉴定

取第二轮PCR产物2μL进行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

[0024] (5) 测序

将第二轮PCR产物送测序公司进行序列测定。

[0025] 本发明提供了一种牛巴贝斯虫巢式PCR特异性引物及检测试剂盒与巢式PCR检测方法,可快速、准确地检测出被检标本中的牛巴贝斯虫,也可用于牛巴贝斯虫的分子流行病学调查及疗效监测。本方法的模板DNA制备步骤简单费用低,常规的方法需经溶菌酶、蛋白酶K、SDS(十二烷基硫酸钠)、CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)等试剂处理,时间长费用高。本方法检测非常方便快捷,并能提高检测方法的特异性及敏感性。内侧引物扩增的模版是外侧引物扩增的产物,第二阶段反应能否进行,也是对第一阶段反应正确性的鉴定,保证了整改反应的准确性和可行性,建立的巢式PCR检测方法可满足临床检测的需要,应用前景广阔。

[0026] 现有的技术中,血涂片镜检技术仍是诊断牛巴贝斯虫病最合适的方法,但该方法不能应用于外周血内寄生虫含量很低的动物以及感染耐过后带虫动物的检测。而采集牛体表寄生的微小牛蜱,通过提取蜱的DNA,利用设计的牛巴贝斯虫外引物和内引物,巢式PCR扩增目的基因,可以准确、快速的判断牛是否感染了牛巴贝斯虫。

[0027] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,本发明的保护范围并不仅局限于上述实施例,凡属于本发明思路下的技术方案均属于本发明的保护范围。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理前提下的若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

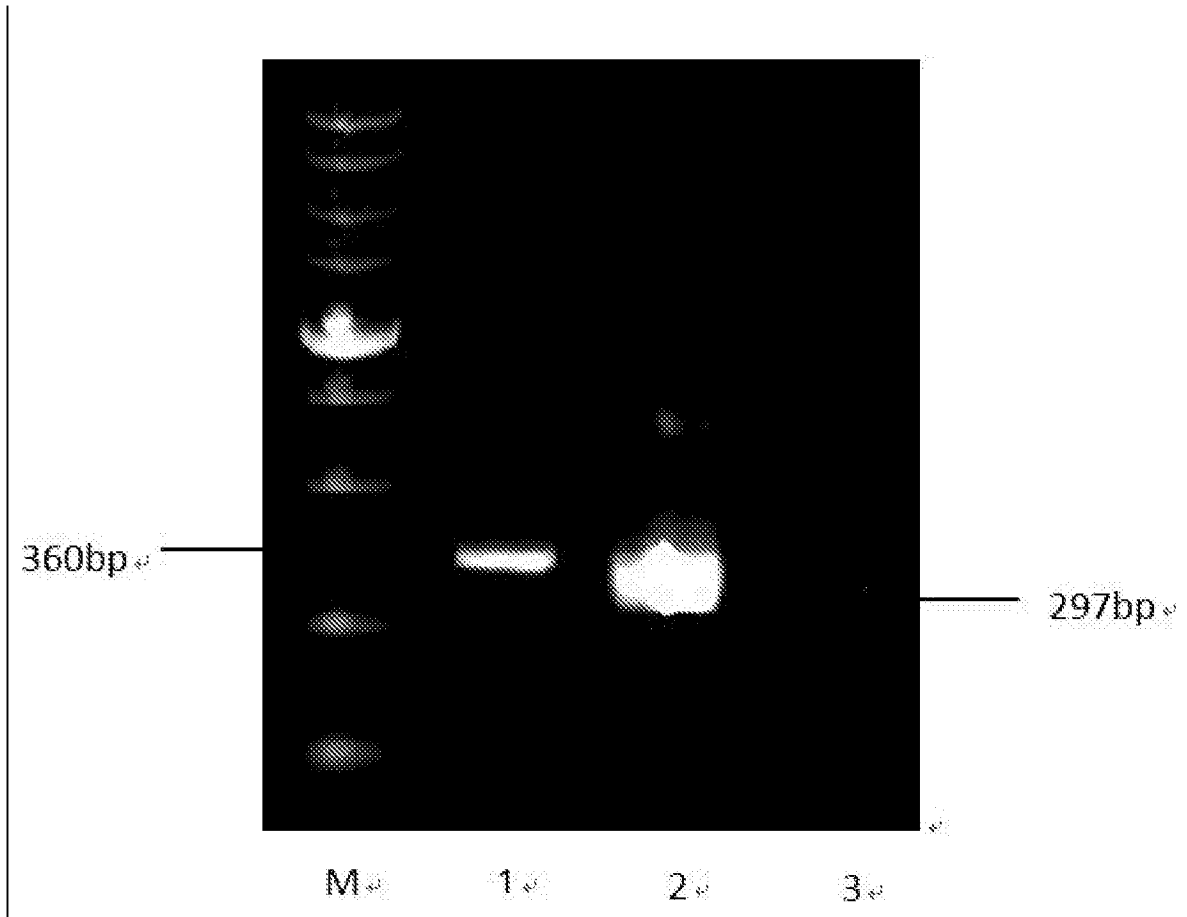


图1

```
CAACAAGGTACTCTATATGGCTACCATGAACTACAAGACTTATTTGACAGTAAACAGTATGAACGCC  
AAGTTTTTCAACAGATTCAGCTTCACTACAAAGATATTCAGCCGTCGTATTAGGCCAAACATTGAGTG  
ATATCATCAGGTTGAAATGTTCTGAAAGATTTTGAAGAAAAGGAGCATCGAACGTATCACTCAACTTAC  
TAGCAOCTACGAAGATTACATGTTGACCCAGATTCCAAACCTTTTCCAAGTTTGCACGTCGTTATGCTG  
ACATGGTGAAGAAGGTTCTGCTCGGTAG
```

图2



图3

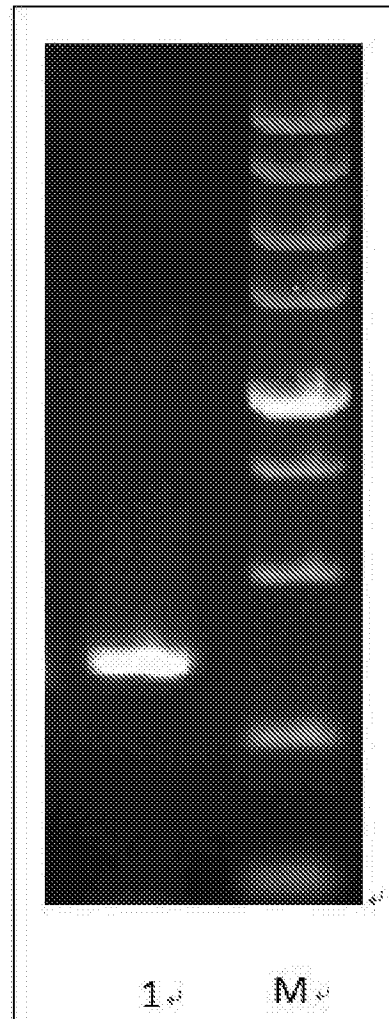


图4