



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113186351 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(21) 申请号 202110578840.6

(22) 申请日 2021.05.26

(71) 申请人 广州博识生物科技有限公司
地址 510630 广东省广州市天河区黄村三
联路20号(部位:A2层203-6)

(72) 发明人 裘细毛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12R 1/93 (2006.01)

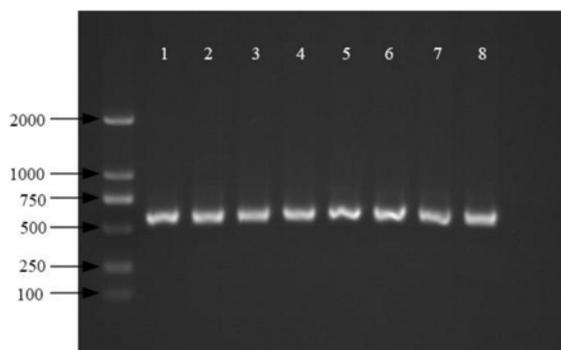
权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒,所述试剂盒包括:引物、Ex Taq buffer、Ex Taq Hot-start DNA聚合酶、MgCl₂、dNTP,其中引物序列为:Primer:F 5'-TAGAGGACGATACGATGGT-3',R 5'-CGAATGGCTACGGATGAA-3,本发明试剂盒引物是针对2018年在中国流行的非洲猪瘟病毒保守序列设计,可以更高效、灵敏的检测目前国内流行的非洲猪瘟病毒,且本发明试剂盒具有良好的特异性、敏感性和通用性。



1. 一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:引物、Ex Taq buffer、Ex Taq Hot-start DNA聚合酶、 $MgCl_2$ 、dNTP,其中引物序列为:Prime r:F 5' - TAGAGGACGATACGATGGT-3',R 5' -CGAATGGCTACGGATGAA-3。

2. 一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒的应用,其特征在于,包括以下步骤:

①提取待测样品的DNA;

②以待测样品的DNA为模板,采用本试剂盒建立PCR反应体系进行PCR扩增;

PCR反应的体系如下:总体积 $20\mu l$, $10\times$ Ex Taq buffer $2.0\mu l$ 、 $1.5U/\mu l$ Ex Taq Hot-start DNA聚合酶 $0.2\mu l$ 、 $10\mu M$ 引物 $1\mu l$ 、 $2.5\mu M$ dNTPs $2.0\mu l$ 、 $20mM$ $MgCl_2$ $2\mu l$ 、DNA $2\mu l$ 、 $3ddH_2O$ $10.8\mu l$;

PCR反应的程序为: $95^\circ C$ 5min, ($94^\circ C$ 1min, $50^\circ C$ 30s, $72^\circ C$ 1min) 35个循环; $72^\circ C$ 10min;

③对扩增产物进行分析,如果扩增产物出现241bp的条带,说明待测样品中含有非洲猪瘟病毒。

一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)引起的烈性传染病,世界动物卫生组织将其列为法定上报的动物疫病,在我国动物病原微生物名录中,也被列为一类动物疾病,给疫区国家造成巨大的经济损失。

[0003] 1921年,ASF最早在肯尼亚出现,最开始ASF主要局限于非洲地区,到2007年,该病爆发于格鲁吉亚,随后疫情迅速蔓延至整个高加索地区和俄罗斯联邦、白俄罗斯和乌克兰,最终于2014年传到了欧盟,2018年8月3日,中国确诊首例非洲猪瘟疫情,这次疫情给我国带来了巨大的经济损失,影响了我国国民生活质量。

[0004] PCR检测具有检测特异性高、灵敏度高、操作简单、可大批量检测等特点,用于检测各种组织、体液中病原微生物的核酸,与其它试验相比,此方法更加快速、敏感,且不需要分离培养病原微生物,并能进行大批量的流行病学调查,然而最近的两份研究报告分别显示OIE推荐的常规PCR敏感性和特异性降低,推测可能是因为病毒变异引起的,因此有必要针对现在主流病毒株保守序列设计新的PCR引物,本发明特别的选择2018年国内流行的非洲猪瘟病毒保守序列设计PCR引物,可以更高效、灵敏的检测目前国内流行的非洲猪瘟病毒。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供检测非洲猪瘟病毒的PCR引物,该引物是针对2018年在中国流行的非洲猪瘟病毒保守序列设计,可以更高效、灵敏的检测目前国内流行的非洲猪瘟病毒。

[0006] 本发明的目的之二是提供一种检测非洲猪瘟病毒的试剂盒。

[0007] 为达到上述目的,本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 本发明首先公开了检测非洲猪瘟病毒的PCR引物:

[0009] Primer:F:5'-TAGAGGACGATACGATGGT-3'(Seq ID No.1),R:5'-CGAATGGCTACGGATGAA-3'(Seq ID No.2),长度241bp;

[0010] 本引物是首先从NCBI上获得2018年在中国流行的非洲猪瘟序列(MK128995.1),通过NCBI Blast功能,获得保守序列,比对结果见图1;再使用Primer Premier 6设计引物;

[0011] 本发明还公开了一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒,包括:引物、Ex Taq buffer、Ex Taq Hot-start DNA聚合酶、MgCl₂、dNTP;

[0012] 本发明还公开了所述试剂盒在检测非洲猪瘟病毒中的应用,包括以下步骤:

[0013] ①提取待测样品的DNA;

[0014] ②以待测样品的DNA为模板,采用本试剂盒建立PCR反应体系进行PCR扩增;

[0015] 本发明PCR反应的体系如下:总体积20 μ l,10 \times Ex Taq buffer 2.0 μ l、1.5U/ μ l Ex Taq Hot-start DNA聚合酶0.2 μ l、10 μ M引物1 μ l、2.5 μ M dNTPs 2.0 μ l、20mM MgCl₂2 μ l、DNA

2 μ l、3ddH₂O 10.8 μ l;

[0016] 本发明PCR反应的程序为:95℃5min, (94℃1min,50℃30s,72℃1min) 35个循环;72℃10min;

[0017] ③对扩增产物进行分析,如果扩增产物出现241bp的条带,说明待测样品中含有非洲猪瘟病毒。

[0018] 本发明进一步对所建立的非洲猪瘟病毒检测试剂盒的特异性和敏感性进行分析,其中:

[0019] 特异性检测:本发明以猪伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PrV)、猪圆环病毒2型 (Porcine circovirus 2, PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRS)、猪乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、猪细小病毒 (Porcine parvovirus infection, PPI) 的DNA为模板,用本试剂盒进行PCR检测,均无阳性信号,说明了本试剂盒特异性良好;

[0020] 敏感性检测:将初始浓度为400ng/ μ l的标准模板ASFV DNA分别按1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100稀释,从每个稀释度各取2 μ l模板用本试剂盒进行检验,本试剂盒均能检出,说明本试剂盒敏感性良好;

[0021] ASFV不同毒株检测:本发明对来自8种不同毒株的DNA进行检测,均能得到阳性结果,说明本试剂盒通用性良好。

[0022] 本发明的有益效果是:

[0023] 本发明试剂盒引物是针对2018年在中国流行的非洲猪瘟病毒保守序列设计,可以更高效、灵敏的检测目前国内流行的非洲猪瘟病毒,且本发明试剂盒具有良好的特异性、敏感性和通用性。

附图说明

[0024] 图1序列对比图

[0025] 图2特异性检验结果图

[0026] 图3敏感性检验结果图

[0027] 图4不同毒株非洲猪瘟病毒检测

具体实施方式

[0028] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0029] 实施例1

[0030] 本实施例涉及的材料和试剂见表1,实验仪器见表2;

[0031] 表1实验材料和试剂

[0032]

Ex Taq Hot-start DNA酶	大连宝生生物工程有限公司
PCR Marker	大连宝生生物工程有限公司
dNTP	大连宝生生物工程有限公司
10 \times buffer	大连宝生生物工程有限公司
琼脂糖	大连宝生生物工程有限公司

	ASFV China/2018/AnhuiXCGQDNA	中国动物卫生与流行病学
[0033]	表2实验仪器设备	
[0034]	AB104-N电子分析天平	梅特勒-托利多上海有限公司
	PTC-200型PCR仪	美国MJ Research公司
	DYY-6D型核酸电泳仪	北京市六一仪器厂
	GelDoc凝胶成像系统	美国Bio-Rad公司
	Sigma 3K-15高速冷冻离心机	德国Sigma公司
	MilliQ Integral超纯水仪	美国Milipore公司

[0035] 1. 从NCBI上获得2018年在中国流行的非洲猪瘟序列 (MK128995.1), 通过NC BI Blast功能, 获得保守序列, 比对结果见图1;

[0036] 2. 使用Primer Premier 6.0针对保守序列设计引物, 设计的引物序列为: Primer: F5' -TAGAGGACGATACGATGGT-3' (Seq ID No.1), R 5' -CGAATGGCTACGGATGA A-3' (Seq ID No.2), 长度241bp;

[0037] 3. PCR扩增

[0038] ASFV China/2018/AnhuiXCGQ DNA为模板, 配制总体积20 μ l的PCR反应体系, 10 \times Ex Taq buffer 2.0 μ l、1.5U/ μ l Ex Taq Hot-start DNA聚合酶0.2 μ l、10 μ M引物1 μ l、2.5 μ M dNTPs 2.0 μ l、20mM MgCl₂2 μ l、DNA 2 μ l、3ddH₂O 10.8 μ l; PCR反应的程序为: 95 $^{\circ}$ C 5min, (94 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min) 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min;

[0039] 4. 对扩增产物进行分析, 如果扩增产物出现241bp的条带, 说明待测样品中含有非洲猪瘟病毒。

[0040] 实验一试剂盒特异性检验

[0041] 1. 用本试剂盒以非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV)、猪伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PrV)、猪圆环病毒2型 (Porcine circovirus 2, PCV2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRS)、猪乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、猪细小病毒 (Porcine parvovirus infection, PPI) 的DNA为模板, 用设计的引物PCR扩增, 观察结果, 结果见图2。

[0042] 1泳道为ASFV、2泳道为PrV、3泳道为PCV2、4泳道为PRRS、5泳道为JEV、6泳道为PPI, 根据实验结果可以看出, 本试剂盒在猪瘟病毒样品中可以扩增出特异条带, ASFV cDNA为模板的体系扩增出了特异性条带, 在PrV、PCV2、PRRS、JEV、PPI cDNA为模板的PCR体系中未扩增出特异性条带, 说明本试剂盒特异性良好。

[0043] 实验二: 试剂盒敏感性检验

[0044] 将初始浓度为400ng/ μ l的标准模板ASFV DNA分别按1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100稀释, 从每个稀释度各取2 μ l模板用ASFV PCR试剂盒进行检测, 观察结果, 实验结果见图3。

[0045] 结果显示1%稀释的ASFV DNA模板也能用本试剂盒检测出来。

[0046] 实验三: 不同基因型的非洲猪瘟病毒能力检测

[0047] 从NCBI上查找相差比较大的非洲猪瘟病毒序列 (MN715134.1、LS478113.1、MN913970.1、AY261363.1、MN336500.2、AY261365.1、MH025919.1、MN270969.1), 人工合成相关的4Kb的DNA序列, 插入pGEM-T载体, 瞬时转染大肠杆菌DH5a, 挑选克隆测序, 测序正确的

菌株,扩大培养,提取DNA,用本试剂盒PCR检测,实验结果见图4。

[0048] 1泳道为MN715134.1、2泳道为LS478113.1、3泳道为MN913970.1、4泳道为AY261363.1、5泳道为MN336500.2、6泳道为AY261365.1、7泳道为MH025919.1、8泳道为MN270969.1,从实验结果可以看出,均出现了目的条带,说明本试剂盒能够很好的检测不同基因型的非洲猪瘟病毒,具有很好的通用性。

序列表

<110> 广州博识生物科技有限公司
<120> 一种非洲猪瘟病毒的PCR检测试剂盒
<160> 2
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 1
tagaggacga tacgatggt 19
<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 2
cgaatggcta cggatgaa 18

Distribution of the top 200 Blast Hits on 100 subject sequences



图1

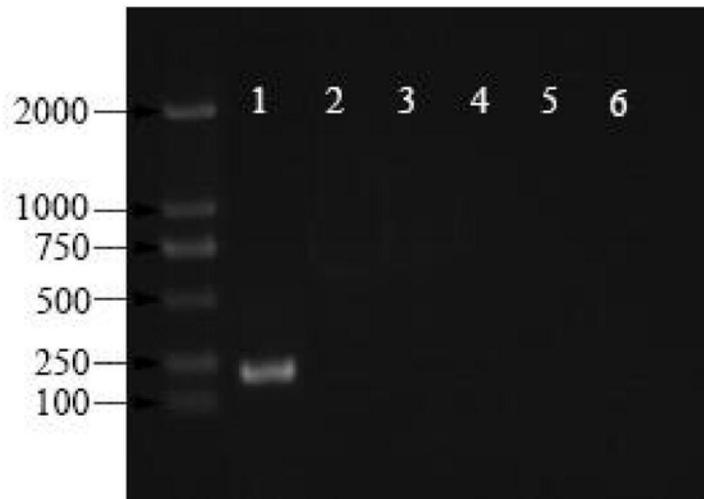


图2

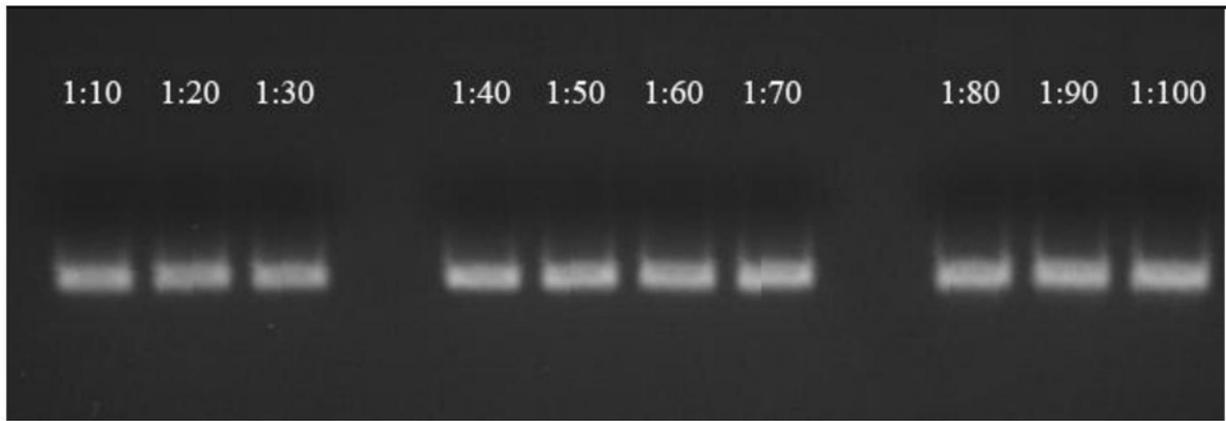


图3

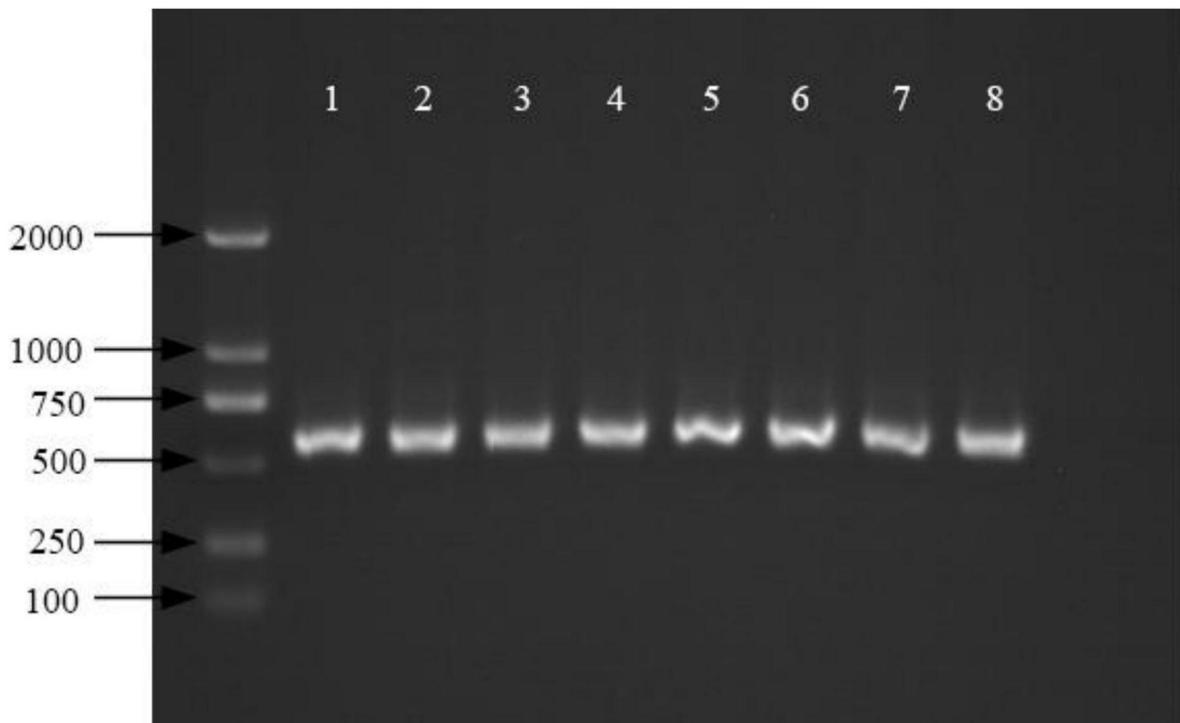


图4