



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111286552 B

(45) 授权公告日 2022. 06. 24

(21) 申请号 202010175854.9

(22) 申请日 2020.03.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111286552 A

(43) 申请公布日 2020.06.16

(73) 专利权人 广东省农业科学院动物卫生研究所
地址 510640 广东省广州市天河区五山路白石岗

(72) 发明人 董嘉文 吴彩艳 孙敏华 李林林
孙铭飞 张春红 张建峰 徐志宏

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205
专利代理师 郑莹

(51) Int.Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106086186 A, 2016.11.09

CN 107287304 A, 2017.10.24

CN 104560853 A, 2015.04.29

审查员 周怡婷

权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株的PCR-HRM引物及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株的PCR-HRM引物和方法。本发明首次建立了一种可快速区分鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株的PCR-HRM检测方法,操作简单,高通量,显著缩短了鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株鉴别与检测所需时间,并且准确度高、特异性好、重复性佳,有利于在临床实践中推广应用。

1. 一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株的PCR-HRM试剂盒,其特征在于,包括引物和阳性对照;

所述引物核苷酸序列如下:

引物P1:5' - CTAAGCAAGATACCGTAGAAT -3' ;

引物P2:5' - GGTTAGCAAGAAGYTCGT -3' ;

所述阳性对照为鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1和鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株阳性质粒p-RA2。

2. PCR-HRM引物在制备鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株的试剂盒中的应用,其特征在于,所述试剂盒的使用步骤如下:

(1) 采集菌株样品,提取DNA;

(2) 使用PCR-HRM引物进行PCR扩增,得到扩增产物;

(3) 对扩增产物进行HRM分析,对比阳性对照,判定菌株型;

其中,HRM分析方法具体操作如下:

(1) 若样品扩增产物熔解温度与鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1的熔解温度的 ΔT_m 值的绝对值小于 1.0°C ,则判定样品为鸭疫里默氏杆菌野毒株;

(2) 若样品扩增产物熔解温度与鸭疫里默氏杆菌疫苗株GD12阳性质粒p-RA2的熔解温度的 ΔT_m 值的绝对值小于 1.0°C ,则判定样品为鸭疫里默氏杆菌疫苗株GD12;

所述PCR-HRM引物核苷酸序列如下:

引物P1:5' - CTAAGCAAGATACCGTAGAAT -3' ;

引物P2:5' - GGTTAGCAAGAAGYTCGT -3' ;

所述阳性对照为鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1和鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株阳性质粒p-RA2。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(2)中扩增体系如下:

2×Taq Plus Master Mix	5.0μL
10 μmol/L 引物 P1	0.4μL
10 μmol/L 引物 P2	0.4μL
DNA 模板	1.0μL
SYTO-9 染料	0.4μL
ddH ₂ O	2.8μL
总量	10μL。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,步骤(2)中扩增体系反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性20s,56℃退火20s,72℃延伸20s;循环35次;72℃终延伸8min。

5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,HRM分析条件为:95℃变性10s,40℃退火120s,采集荧光信号进行分析;

其中,荧光信号采集温度为70℃~80℃,采集频率为0.3℃/步。

一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株的PCR-HRM引物及方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种快速鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和GD12疫苗株的PCR-HRM引物和方法。

背景技术

[0002] 鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)感染是鸭、鹅、火鸡和野禽的一种接触传染性疾病,又称鸭传染性浆膜炎,主要侵害1~8周龄(尤其2~3周龄)雏鸭、雏鹅及雏火鸡等。鸭疫里默氏杆菌的血清型比较复杂,共有21个血清型,不同血清型之间无明显的交叉免疫保护作用,这给鸭传染性浆膜炎的防治带来一定的困难。

[0003] 由于临床上抗生素的滥用,细菌的耐药性越来越严重,目前能用于治疗鸭传染性浆膜炎的药物非常少,接种疫苗是预防该疾病流行的最有效途径。目前市面上的鸭疫里默氏杆菌疫苗包括鸭疫里默氏杆菌多价灭活疫苗以及鸭疫里默氏杆菌多价多联灭活疫苗,另外还有本单位在2018年12月临床试验申请获批的鸭传染性浆膜炎活疫苗(1型GD12株)。由于活疫苗在临床使用可能会对该疾病的准确诊断带来一定的难度,使得难以区分在临床上分离得到的鸭疫里默氏杆菌是野毒株还是疫苗株,所以有必要建立针对鸭疫里默氏杆菌野毒株与疫苗株的鉴别检测方法。

[0004] 目前针对鸭疫里默氏杆菌的检测方法主要有细菌分离鉴定、凝集试验、琼脂扩散试验、ELISA、免疫荧光技术、普通PCR以及荧光定量PCR等,但没有针对鸭疫里默氏杆菌野毒株与疫苗株的鉴别检测方法,关键原因在于目前还未有可靠有效的扩增引物能够用于鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株与疫苗株。因此,提供一种有效的可用于鉴别野毒株与疫苗株的扩增引物并建立一套鉴别检测方法及体系,具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种快速鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的PCR-HRM引物及方法。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

[0007] 本发明的第一个方面,提供:

[0008] 一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株的引物,引物核苷酸序列如下:

[0009] 引物P1:5'-CTAAGCAAGATACCGTAGAAT-3'(SEQ ID NO:1);

[0010] 引物P2:5'-GGTTAGCAAGAAGYTCGT-3'(SEQ ID NO:2)。

[0011] 在一些实例中,上述疫苗株为鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株。

[0012] 本发明的第二个方面,提供:

[0013] 一种快速鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株的PCR-HRM试剂盒,包括上述引物。

[0014] 在一些实例中,其还包括阳性标准品;

[0015] 其中,阳性对照为鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1和鸭疫里默氏杆菌GD12

疫苗株阳性质粒p-RA2。

[0016] 本发明的第三个方面,提供:

[0017] 一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株GD12的PCR-HRM鉴定方法,具体步骤如下:

[0018] (1) 采集菌株样品,提取DNA;

[0019] (2) 使用上述引物进行PCR扩增,得到扩增产物;

[0020] (3) 对扩增产物进行HRM分析,对比阳性对照,判定菌株型。

[0021] 在一些实例中,上述步骤(2)中扩增体系为

2×Taq Plus Master Mix	5.0μl
引物 P1 (10 μmol/L)	0.4μl
引物 P2 (10 μmol/L)	0.4μl
[0022] DNA 模板	1.0μl
SYTO-9 染料	0.4μl
ddH ₂ O	2.8μl
总量	10μl。

[0023] 在一些实例中,上述步骤(2)中扩增体系反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性20s,56℃退火20s,72℃延伸20s;循环35次;72℃终延伸8min。

[0024] 在一些实例中,上述HRM分析条件为:95℃变性10s,40℃退火120s,采集荧光信号进行分析;其中,荧光信号采集温度为70℃~80℃,采集频率为0.3℃/步。

[0025] 在一些实例中,上述HRM分析方法具体操作如下:

[0026] (1) 若样品扩增产物熔解温度与鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1的熔解温度的ΔT_m值的绝对值小于1.0℃,则判定样品为鸭疫里默氏杆菌野毒株;

[0027] (2) 若样品扩增产物熔解温度与鸭疫里默氏杆菌疫苗株GD12阳性质粒p-RA2的熔解温度的ΔT_m值的绝对值小于1.0℃,则判定样品为鸭疫里默氏杆菌疫苗株GD12。

[0028] 本发明的有益效果是:

[0029] (1) 本发明首次建立了一种可快速鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的PCR-HRM的引物和方法,该检测方法操作简单,只需一个反应即可实现鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的鉴别检测;检测速度快且高通量,全部操作过程在2小时以内,显著缩短了野毒株与疫苗株检测与鉴别所需时间,并且准确度高、特异性好,重复性好,可以准确、快速、高通量地进行分析,有利于在临床实践中推广应用。

[0030] (2) 本发明的PCR-HRM引物对P1和P2,对鸭疫里默氏杆菌可特异性扩增,有助于提高PCR的效率,减少细菌鉴别分型的时间;同时引物对P1和P2,均不与其他常见鸭的病原核酸结合,有利于提高本发明对结果分析的正确性。

[0031] (3) 本发明的用于区分鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的PCR-HRM检测方法的最低检测限可达到每个反应单拷贝,灵敏度较高。

附图说明

[0032] 图1为鸭疫里默氏杆菌标准化样品的熔解曲线图；

[0033] 图2为鸭疫里默氏杆菌PCR-HRM检测方法特异性试验熔解曲线图；样品分别为鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1和鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株阳性质粒p-RA2、大肠杆菌(EC)、巴氏杆菌(PM)、鸭瘟病毒(DPV)、鸭细小病毒(MPV)、鹅细小病毒(GPV)以及鸭圆环病毒(DuCV)；其中，鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性质粒p-RA1和鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株阳性质粒p-RA2作为阳性对照，水作为阴性对照；

[0034] 图3为鸭疫里默氏杆菌核酸的灵敏度试验熔解曲线图；

[0035] 图4为鸭疫里默氏杆菌临床样品的熔解曲线图。

具体实施方式

[0036] 下面将结合说明书附图和具体的实验对本发明所展示的内容进行进一步详细的阐述。本实验实施过程和附图仅用于解释本发明，并非用于限制本发明的范围。实施过程中所使用的实验方法如果没有特别说明，均为常规实验方法。

[0037] 所使用的实验材料和试剂，若无特别说明，均为常规可从商业途径所获得的耗材和试剂。

[0038] 一、引物设计、标准样品的制备、PCR扩增及熔解曲线分析

[0039] (1) 引物设计

[0040] 经过对所设计的大量引物进行筛选后，发现引物碱基序列SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2对PCR-HRM方法区分鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的效果最好，其碱基序列如下：

[0041] 引物P1:5'-CTAAGCAAGATACCGTAGAAT-3'(SEQ ID NO:1)；

[0042] 引物P2:5'-GGTTAGCAAGAAGYTCGT-3'(SEQ ID NO:2)。

[0043] (2) 鸭疫里默氏杆菌DNA的制备

[0044] 取所保存的菌株样品(菌株样品分离自患病家禽且经过筛选鉴定)，煮沸5min后，10000rpm离心1min，取上清备用，即为样品DNA。

[0045] (3) 标准阳性样品的制备

[0046] 为了验证本发明方法可行性，构建了标准阳性样品(经序列测定正确)，为临床样品检测提供阳性对照，本实施例中优先制备鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准样品p-RA1与GD12疫苗株的阳性标准样品p-RA2。

[0047] 鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准样品p-RA1与GD12疫苗株的阳性标准样品-RA2的制备步骤如下：取经过测序确定为野毒株和GD12疫苗株的菌液，分别制备上述野毒株和疫苗株的DNA，并以引物P1和引物P2为扩增引物进行PCR扩增。分别回收纯化扩增的产物，克隆至PMD18T-Vector中作为鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准样品p-RA1和GD12疫苗株的阳性对照样品p-RA2。

[0048] (4) 阳性标准样品的PCR-HRM

[0049] 分别以上述获得的两种阳性标准样品为DNA模板，进行PCR-HRM扩增反应和熔解曲线分析；

[0050] 按以下组份配制PCR反应液进行试验。

	Vazyme 2×Taq Plus Master Mix	5.0μl
	引物 P1 (10 μmol/L)	0.4μl
	引物 P2 (10 μmol/L)	0.4μl
[0051]	DNA 模板	1.0μl
	SYTO-9 染料	0.4μl
	ddH ₂ O	2.8μl
	总量	10μl。

[0052] PCR扩增的反应程序为:

[0053] 94℃预变性5min;94℃变性20s,56℃退火20s,72℃延伸20s;循环35次;72℃终延伸8min。

[0054] 熔解曲线分析程序为:

[0055] 95℃变性10s,40℃退火120s,升温至70℃时以0.3℃/步的速率开始采集荧光信号,直至80℃结束,进行熔解曲线分析。

[0056] (5) 阳性标准样品熔解曲线分析的结果分析

[0057] PCR扩增产物用Rotor-Gene Q分析仪进行分析。鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的阳性标准样品熔解曲线分析结果如图1所示。

[0058] 结合图1可得到以下结果:

[0059] (1) 鸭疫里默氏杆菌野毒株的熔解温度为 77.50 ± 0.15 ;

[0060] (2) 鸭疫里默氏杆菌GD12疫苗株的熔解温度为 75.01 ± 0.25 。

[0061] 因此,通过熔解曲线峰型以及T_m值差异可以完全区分鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株。

[0062] 二、特异性试验

[0063] 为了检测本申请用于区分鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的引物以及方法的特异性,进行了以下试验:

[0064] 分别提取大肠杆菌(EC)、巴氏杆菌(PM)、鸭瘟病毒(DPV)、鸭细小病毒(MPV)、鹅细小病毒(GPV)以及鸭圆环病毒(DuCV)的核酸,将上述病毒的核酸作为PCR模板,水作阴性对照,以上述PCR扩增反应和熔解曲线分析方法进行分析,并与鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准样品p-RA1与GD12疫苗株的阳性标准样品p-RA2进行对比分析,熔解曲线峰型化图如图2所示。

[0065] 从图2可以看出,本发明的检测方法只能特异性扩增并形成鸭疫里默氏杆菌的野毒株与GD12疫苗株的熔解峰,而对EC、PM、DPV、MPV、GPV及DuCV核酸都没有扩增并形成特异熔解峰,表明本发明设计的引物P1和P2具有很好的特异性,可以用于鸭疫里默氏杆菌疫苗株GD12及野毒株的PCR-HRM检测。本发明检测方法有良好的特异性。

[0066] 三、灵敏度试验

[0067] 为了检测本申请的用于区分鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株的引物以及方法的灵敏度,进行了以下试验:

[0068] 将鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准样品p-RA1与GD12疫苗株的阳性标准样品p-

RA2做核酸检测,换算质粒数,做10倍梯度稀释,形成 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^0 copies/ μ l共10个梯度,按上述PCR扩增反应和熔解曲线分析方法进行分析,熔解曲线峰型化图如图3所示。

[0069] 从图3可以看出,本发明检测方法针对的鸭疫里默氏杆菌野毒株与GD12疫苗株均随着质粒浓度的降低呈现明显的下降,最低检出限为 1.0×10^0 copies/反应,说明本发明的方法可用于区分鸭疫里默氏杆菌野毒株及GD12疫苗株,该方法的灵敏度较高。

[0070] 四、临床样品检测

[0071] (1) 从12个鸭疫里默氏杆菌的临床分离株提取DNA:方法同一的步骤(4)中核酸提取方法。

[0072] (2) 以提取的细菌DNA为模板,使用本发明设计的引物P1和P2引物进行扩增,同时以鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性标准品p-RA1与GD12疫苗株阳性标准品p-RA2作为阳性对照。

[0073] (3) 临床样品熔解曲线分析

[0074] 本发明检测了12个鸭疫里默氏杆菌的临床分离株,熔解曲线分析结果如图4所示,其中阳性标准品作为阳性对照,水为阴性对照。

[0075] 从图4所示的鸭疫里默氏杆菌临床分离株峰型化熔解曲线图上可以看出,12个临床分离株与鸭疫里默氏杆菌野毒株阳性对照p-RA1的 ΔT_m 值的绝对值均小于 1.0°C ,均为鸭疫里默氏杆菌野毒株。

[0076] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 广东省农业科学院动物卫生研究所
- [0003] <120> 一种鉴别鸭疫里默氏杆菌野毒株和疫苗株的PCR-HRM引物及方法
- [0004] <130>
- [0005] <160> 2
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] ctaagcaaga tacgtagaa t 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 18
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] ggtagcaag aagtcgt 18

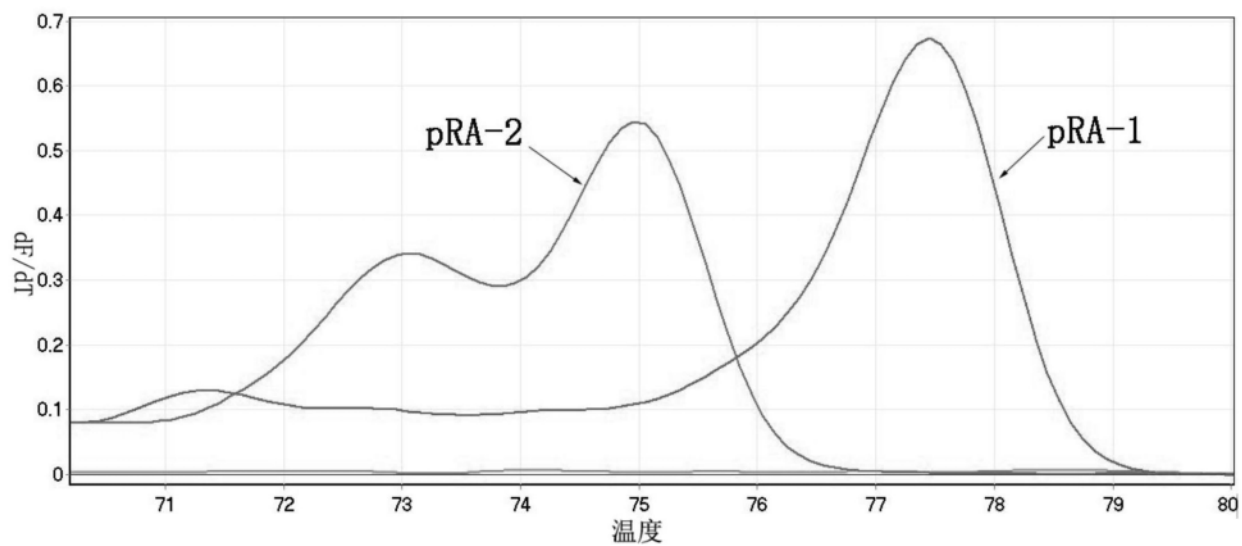


图1

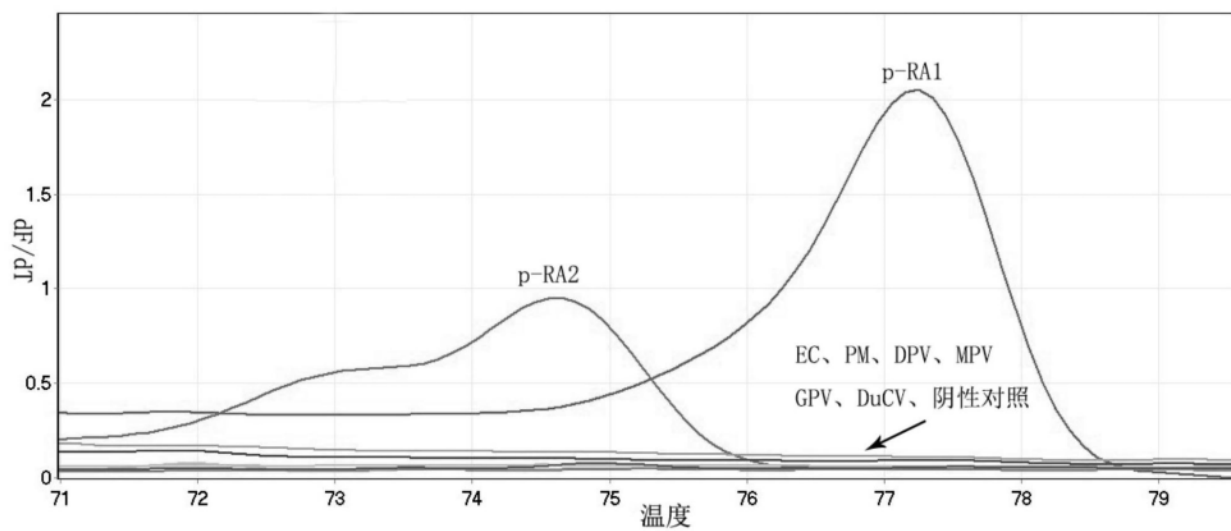


图2

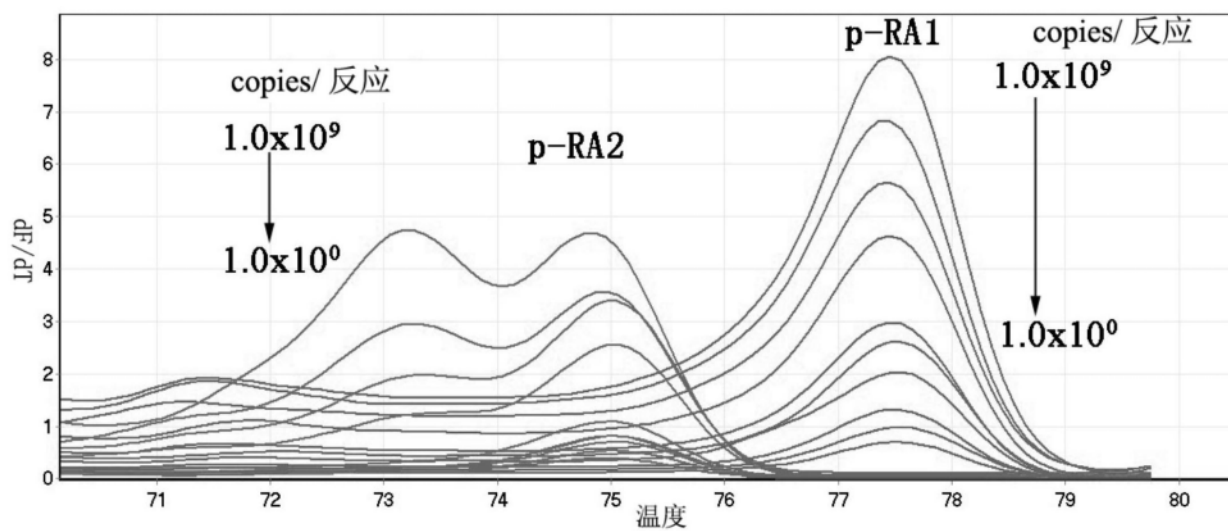


图3

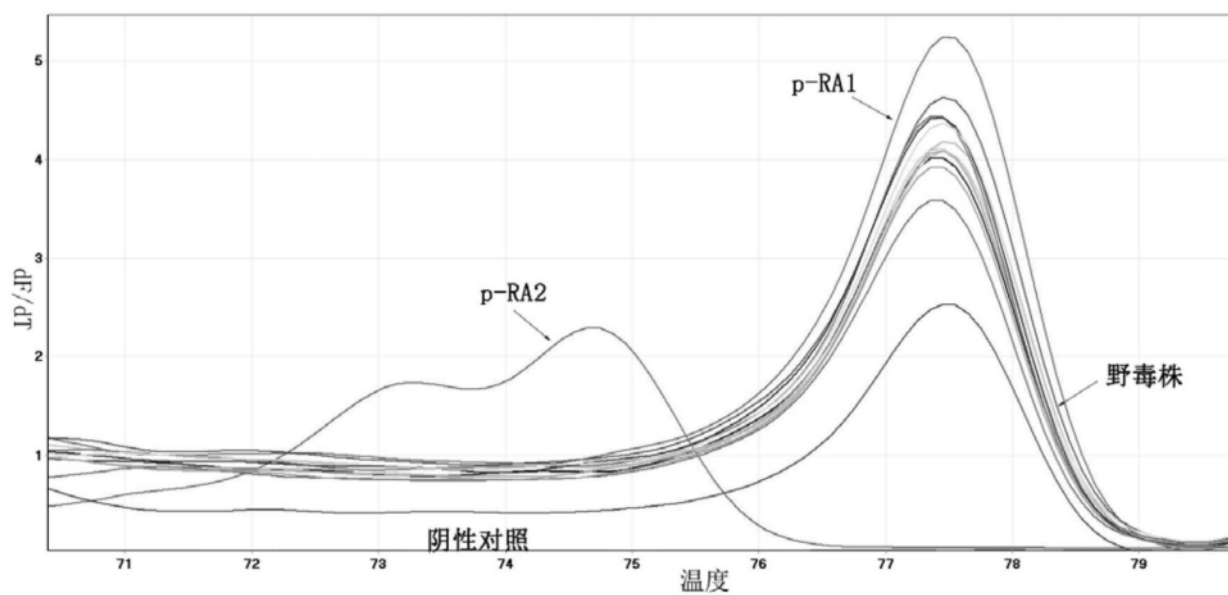


图4