



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104278024 B

(45)授权公告日 2016.12.28

(21)申请号 201310280808.5

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2013.07.05

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 101801993 A,2010.08.11,

申请公布号 CN 104278024 A

CN 101802213 A,2010.08.11,

(43)申请公布日 2015.01.14

CN 102471768 ,2012.05.23,

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病学研究所

秦成峰, 秦鄂德. 环介导的恒温扩增技术及其在病毒性疾病诊断中的应用.《生物技术通讯》.2007,第859-862页.

地址 100071 北京市丰台区东大街20号五
所一室病毒实验室

Manmohan Parida et al..Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique

(72)发明人 秦成峰 姜涛 刘娟 邓永强
朱舜亚 秦鄂德

perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases.《Rev. Med. Virol.》.2008,第407-421页.

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

审查员 沈晶晶

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

C12Q 1/70(2006.01)

序列表3页 附图3页

(54)发明名称

用于鉴定人类腺病毒55型的引物组合物以及它们的应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于鉴定人类腺病毒55型的引物组合物以及它们的应用。本发明提供的引物组合物,包括DNA片段-I、DNA片段-II、DNA片段-III和DNA片段-IV,均为单链DNA片段,依次如序列1、序列2、序列3、序列4所示。所述引物组合物还可包括单链DNA片段-V和/或单链DNA片段-VI,依次如序列5、序列6所示。本发明适用于对人类腺病毒55型进行特异性检测和定量分析。本发明的优点:(1)只需在恒定温度就能扩增反应,不需要特殊设备;(2)特异性高;(3)快速高效,扩增反应在短时间内即可完成;(4)灵敏度高;(5)鉴定方便简单。本发明特别适用于临床样本中病毒的快速检测。

1. 引物组合物,由DNA片段-I、DNA片段-II、DNA片段-III和DNA片段-IV组成;所述DNA片段-I、所述DNA片段-II、所述DNA片段-III和所述DNA片段-IV均为单链DNA片段;所述DNA片段-I如序列表的序列1所示,所述DNA片段-II如序列表的序列2所示,所述DNA片段-III如序列表的序列3所示,所述DNA片段-IV如序列表的序列4所示。

2. 引物组合物,由DNA片段-I、DNA片段-II、DNA片段-III、DNA片段-IV、DNA片段-V和DNA片段-VI组成;所述DNA片段-I、所述DNA片段-II、所述DNA片段-III、所述DNA片段-IV、所述DNA片段-V和所述DNA片段-VI均为单链DNA片段;所述DNA片段-I如序列表的序列1所示,所述DNA片段-II如序列表的序列2所示,所述DNA片段-III如序列表的序列3所示,所述DNA片段-IV如序列表的序列4所示;所述DNA片段-V如序列表的序列5所示,所述DNA片段-VI如序列表的序列6所示。

3. 权利要求1或2所述的引物组合物在制备辅助鉴定人类腺病毒55型的试剂盒中的应用。

4. 一种辅助鉴定人类腺病毒55型的试剂盒,包括权利要求1或2所述的引物组合物。

用于鉴定人类腺病毒55型的引物组合物以及它们的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于鉴定人类腺病毒55型的引物组合物以及它们的应用。

背景技术

[0002] 人腺病毒(Human Adenovirus, HAdV)是一群无包膜的双链DNA病毒,分为1~55个血清型,分别划入A~F共6个血清学分组。人腺病毒经呼吸道和消化道传播,引起多种感染,对小儿和免疫缺陷者危害严重。腺病毒感染人体可能引发的疾病包括:急性腺病毒肺炎、急性胃肠炎、眼角膜炎、乳糜泻和急性间质性肾炎等。在儿童急性下呼吸道感染患者中腺病毒感染阳性率可高达4.1%。在最近几十年的北美、欧洲及亚洲均认为人类腺病毒B组感染是导致急性呼吸系统感染(ARD)的重要因素。

[0003] HAdV11、HAdV14型属于腺病毒B组,传统的HAdV11型主要导致肾及泌尿系统的感染,HAdV14则引起人呼吸系统感染。新发现的人类腺病毒55型(HAdV55),在其现之初命名为HAdV11a,对人有较强的致病性,易在军队、学校等密集人群发生呼吸道传染病流行,在免疫低下的人群中甚至出现了死亡病例。基因分析表明HAdV55是HAdV14与HAdV11的Hexon区域重组并发生若干核苷酸突变得到的毒株。

[0004] 腺病毒的现有检测方法主要为普通PCR和实时荧光定量PCR等。普通RT-PCR和实时荧光定量RT-PCR等常需要花费较长时间或者需要特定的仪器,难以满足暴发疫情快速诊断的需要。

[0005] 环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法具有在等温条件下即可高速、高特异、高灵敏的扩增靶序列的特点。该方法利用4条特异引物(F3、FIP、B3和BIP)在高活性链置换DNA聚合酶作用下,不断复制扩增核酸。在反应体系中可添加2条环状引物LF和LB,它们也分别与茎环结构结合启动链置换合成,周而复始。扩增的最后产物是具有不同个数茎环结构、不同长度DNA的混合物。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种用于鉴定人类腺病毒55型的引物组合物以及它们的应用。

[0007] 本发明提供的第一组引物组合物(引物组合物甲),包括DNA片段-I、DNA片段-II、DNA片段-III和DNA片段-IV;所述DNA片段-I、所述DNA片段-II、所述DNA片段-III和所述DNA片段-IV均为单链DNA片段;所述DNA片段-I如序列表的序列1所示,所述DNA片段-II如序列表的序列2所示,所述DNA片段-III如序列表的序列3所示,所述DNA片段-IV如序列表的序列4所示。所述引物组合物甲具体可由所述DNA片段-I、所述DNA片段-II、所述DNA片段-III和所述DNA片段-IV组成。所述引物组合物甲还可包括DNA片段-V和/或DNA片段-VI;所述DNA片段-V和所述DNA片段-VI均为单链DNA片段;所述DNA片段-V如序列表的序列5所示,所述DNA片段-VI如序列表的序列6所示。所述引物组合物甲具体可由所述DNA片段-I、所述DNA片段-II、所述DNA片段-III、所述DNA片段-IV、DNA片段-V和DNA片段-VI组成。

[0008] 本发明提供的第二种引物组合物(引物组合物乙),包括DNA片段-VII、DNA片段-VIII、DNA片段-IX和DNA片段-X;所述DNA片段-VII、所述DNA片段-VIII、所述DNA片段-IX和所述DNA片段-X均为单链DNA片段;所述DNA片段-VII如序列表的序列1的反向互补序列所示,所述DNA片段-VIII如序列表的序列2的反向互补序列所示,所述DNA片段-IX如序列表的序列3的反向互补序列所示,所述DNA片段-X如序列表的序列4的反向互补序列所示。所述引物组合物乙具体可由所述DNA片段-VII、所述DNA片段-VIII、所述DNA片段-IX和所述DNA片段-X组成。所述引物组合物乙还可包括DNA片段-XI和/或DNA片段-XII;所述DNA片段-XI和所述DNA片段-XII均为单链DNA片段;所述DNA片段-XI如序列表的序列5的反向互补序列所示,所述DNA片段-XII如序列表的序列6的反向互补序列所示。所述引物组合物乙具体可由所述DNA片段-VII、所述DNA片段-VIII、所述DNA片段-IX、所述DNA片段-X、所述DNA片段-XI和所述DNA片段-XII组成。

[0009] 本发明还保护以上任一所述的引物组合物在辅助鉴定人类腺病毒55型中的应用。所述应用为非疾病诊断方法。

[0010] 本发明还保护一种辅助鉴定人类腺病毒55型的方法,依次包括如下步骤:

[0011] (1)以待测病毒的基因组DNA为模板,用以上任一所述的引物组合物进行环介导等温扩增;

[0012] (2)通过检测步骤(1)的扩增产物辅助鉴定待测病毒是否为人类腺病毒55型。

[0013] 所述环介导等温扩增的反应条件可为:60~65℃反应30~120min。所述环介导等温扩增的反应条件具体可为:63℃反应60~120min。所述环介导等温扩增反应体系中,F3和B3的浓度均为5pmol/L,BIP和FIP的浓度均为40pmol/L。所述环介导等温扩增反应体系中,F3和B3的浓度均为5pmol/L,BIP和FIP的浓度均为40pmol/L,LB和LF的浓度均为20pmol/L。

[0014] 可在环介导等温扩增的过程中通过实时浊度仪进行结果判断,如果观察到典型的扩增曲线,待测样本为候选的人类腺病毒55型,如果没有观察到典型的扩增曲线,待测样本为候选的非人类腺病毒55型。判断原理如下:核酸大量合成时,dNTP会析出大量的焦磷酸根离子,焦磷酸根离子与LAMP体系中的 Mg^{2+} (或 Mn^{2+})结合,产生焦磷酸镁或焦磷酸锰沉淀,从而引起反应液的浊度变化;基于该原理,可以根据反应液的浊度变化判断是否有核酸大量合成,从而判断模板是否为靶序列,因此可以采用实时浊度仪及其配套程序软件实时检测反应液的浊度变化。

[0015] 可通过荧光染料的颜色变化进行结果判断。应用本方法进行判定时,LAMP体系中需要有钙黄绿素、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 。判断原理如下:反应初始时钙黄绿素与 Mg^{2+} 结合,反应液显示透明的橙色,核酸大量合成时,会生成副产物焦磷酸根,焦磷酸根离子的存在,使得 Mg^{2+} 游离出来,钙黄绿素和 Mn^{2+} 结合,反应液显示微浊的黄绿色。基于该原理,可以根据反应液的颜色变化判断是否有核酸大量合成,从而判断模板是否为靶序列。自然光下,如果反应液由透明橙色变为微浊的黄绿色,则表明待测样本为候选的人类腺病毒55型。紫外光下,如果反应液显示强荧光则表明待测样本为候选的人类腺病毒55型。

[0016] 所述方法用于为非疾病诊断。

[0017] 本发明还保护以上任一所述的引物组合物在制备辅助鉴定人类腺病毒55型的试剂盒中的应用。

[0018] 本发明还保护一种辅助鉴定人类腺病毒55型的试剂盒,包括以上任一所述的引物

组合物。

[0019] 以上任一所述引物组合物中,每条引物的5'端和/或3'端还可根据靶序列进行延长。以上任一所述引物组合物中,每条引物还可进行碱基的替换和/或取代和/或插入,保持85%的同源性即可。

[0020] 本发明适用于对人类腺病毒55型进行特异性检测和定量分析。本发明的优点:(1)只需在恒定温度就能扩增反应,不需要特殊设备;(2)特异性高;(3)快速高效,扩增反应在短时间内即可完成;(4)灵敏度高;(5)鉴定方便简单。本发明特别适用于临床样本中病毒的快速检测。

附图说明

[0021] 图1为实施例2的步骤三中自然光下试管的照片。

[0022] 图2为实施例2的步骤三中紫外灯照射下试管的照片。

[0023] 图3为实施例2的步骤四中实时浊度仪扩增曲线。

[0024] 图4为实施例2的步骤五中实时浊度仪扩增曲线。

[0025] 图5为实施例3的步骤三中自然光下试管的照片。

[0026] 图6为实施例3的步骤三中紫外灯照射下试管的照片。

[0027] 图7为实施例3的步骤四中实时浊度仪扩增曲线。

具体实施方式

[0028] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0029] LAMP试剂盒:DNA Amplification Kit,日本荣研公司,CodeNo:LMP204。LAMP荧光检测试剂:Fluorescent Detection Reagent,日本荣研公司,CodeNo:LMP221。LA-320C实时浊度仪,日本荣研公司产品。DNA提取试剂盒(DNeasy[®]Blood&Tissue Kit):QIAGEN公司产品,CodeNo:69504。

[0030] 人类腺病毒3型(Human adenovirus3):ATCC,ATCC编号为VR-3。

[0031] 人类腺病毒5型(Human adenovirus5):ATCC,ATCC编号为VR-5。

[0032] 人类腺病毒7型(Human adenovirus7):ATCC,ATCC编号为VR-7。

[0033] 人类腺病毒14型(Human adenovirus14):ATCC,ATCC编号为VR-15。

[0034] 人类腺病毒55型(HAdV55病毒液):参考文献:利用计算机分析鉴定人类腺病毒55型:一种再次出现的呼吸道传染病病原体(Computational Analysis Identifies Human Adenovirus Type55as a Re-Emergent Acute Respiratory Disease Pathogen)J Clin Microbiol.2010,48(3):991-993.。

[0035] H1N1禽流感病毒:参考文献:刘志辉,姜涛,刘娟,等.大流行甲型H1N1流感病毒变异株的小鼠感染实验研究.军事医学.2012,36(7):508-511.。

[0036] H5N1禽流感病毒:参考文献:李靖,刘伯华,夏玉坤,等.高致病性禽流感病毒血凝素基因定点突变及其原核表达.医学分子生物学杂志,2006,3(1):8-12.。

[0037] H3N2禽流感病毒:参考文献:刘娟,姜涛,徐莉娟,等.实时RT-PCR检测甲型H3N2流感病毒R292K耐药位点.军事医学.2011,35(6):432-436.。

[0038] 实施例1、引物组合物的设计和制备

[0039] 根据人腺病毒55型的Hexon蛋白设计特异性引物序列如下:

[0040] F3(序列1):5'-AACCTCAGCTGGGAGATG-3';

[0041] B3(序列2):5'-TTTTCTGTGATGCCGCAT-3';

[0042] FIP(序列3):5'-ACCCGTAGCATGGTTTCATTTTAGTTTTTCTTGACTGACCTTGATGG-3';

[0043] BIP(序列4):5'-GCGGTCAGGCAAAACCAAAATTTCCATGTCAATATCATATTCGACTT-3';

[0044] LF(序列5):5'-TGCCCCATACTTTTCGGTC-3';

[0045] LB(序列6):5'-CAACGGAGCAGCCAAATCA-3'。

[0046] 实施例2、引物组合物的灵敏度

[0047] 一、病毒样本的制备

[0048] 使用1640培养基将人类腺病毒55型的病毒液进行梯度稀释,得到8种不同浓度的HAdV55病毒液(HAdV55病毒浓度分别为400000PFU/ml、40000PFU/ml、4000PFU/ml、

[0049] 400PFU/ml、40PFU/ml、4PFU/ml、0.4PFU/ml和0.04PFU/ml)。

[0050] 样本1:浓度为400000PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0051] 样本2:浓度为40000PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0052] 样本3:浓度为4000PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0053] 样本4:浓度为400PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0054] 样本5:浓度为40PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0055] 样本6:浓度为4PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0056] 样本7:浓度为0.4PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0057] 样本8:浓度为0.04PFU/ml的HAdV55病毒液。

[0058] 二、提取基因组DNA

[0059] 采用DNA提取试剂盒并按试剂盒说明书提取100微升待测样本液(分别将步骤一制备的样本1至样本8作为待测样本液)的基因组DNA,具体方法如下:

[0060] 在1.5ml的EP管中加入20 μ l的QIAGEN protease(试剂盒组分),然后加入100 μ l待测样本液,然后加入200 μ l的Buffer AL(试剂盒组分),振荡器混匀15秒,56 $^{\circ}$ C放置10分钟;加入200 μ l无水乙醇,振荡器混匀15秒后将液体转至滤柱中,8000rpm离心1分钟;将滤柱转至新的收集管中,加入500 μ l的AW1Buffer(试剂盒组分),8000rpm离心1分钟;将滤柱转至新的收集管中,加入500 μ l的AW2Buffer(试剂盒组分),14000rpm离心3分钟后弃滤出液,再次离心2分钟;将滤柱转至新的EP管中,加入100 μ l的无菌水,室温放置3分钟,8000rpm离心2分钟,收集的洗脱液(约100 μ l)即为含有病毒基因组DNA的溶液,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0061] 三、应用专用引物检测人类腺病毒55型

[0062] 用实施例1设计的引物组合物检测步骤二得到的含有病毒基因组DNA的溶液,采用LAMP试剂盒并按试剂盒说明书在试管中进行反应。2 \times Enzyme Buffer、Enzyme和Fluorecent Detection Reagent均为试剂盒组分。

[0063] LAMP反应体系(25 μ l):F3和B3的浓度均为5pmol/L,BIP和FIP的浓度均为40pmol/L, LB和LF的浓度均为20pmol/L,2 \times Enzyme Buffer12.5 μ l(含Mg²⁺和Mn²⁺),Enzyme1 μ l,

Fluorecent Detection Reagent $1\mu\text{l}$ (含钙黄绿素), $2\mu\text{l}$ 待测DNA(步骤二得到的含有病毒基因组DNA的溶液),用无核酸酶和脱氧核酶的去离子水定容。

[0064] LAMP反应体系在 63°C 反应70min,然后 75°C 、2min终止反应。

[0065] 终止反应后,自然光下试管的照片见图1,1至8依次代表样本1至样本8。终止反应后,紫外灯照射下试管的照片见图2,1至8依次代表样本1至样本8。图1中,样本1至样本6为阳性,样本7和样本8为阴性。图2中,样本1至样本6为阳性,样本7和样本8为阴性。

[0066] 待测DNA中病毒DNA的浓度 $=4\text{PFU}/\text{ml} \times 100 \times 10^{-3}\text{ml} \div 100\mu\text{l} = 0.004\text{PFU}/\mu\text{l}$ 。每个LAMP反应体系中病毒DNA的含量 $=0.004\text{PFU}/\mu\text{l} \times 2\mu\text{l} = 0.008\text{PFU}$ 。即灵敏度为 $0.008\text{PFU}/\text{反应体系}$ 。

[0067] 采用紫外灯照射下观察,检测方法的灵敏度为 $0.008\text{PFU}/\text{反应体系}$ 。

[0068] 四、用引物组合物检测人类腺病毒55型(实时浊度仪)

[0069] LAMP反应体系中不含有Fluorecent Detection Reagent,其它同步骤三的LAMP反应体系。

[0070] 将LAMP反应体系置于LA320C实时浊度仪, 63°C 反应70min,然后 75°C 、2min终止反应。

[0071] 实时浊度仪扩增曲线见图3。60min内出现扩增曲线的判断为阳性样本,样本1至样本6为阳性,样本7至样本8为阴性。检测方法的灵敏度为 $0.008\text{PFU}/\text{反应体系}$ 。

[0072] 浊度仪观察的灵敏度为 $0.008\text{PFU}/\text{反应体系}$ 。

[0073] 五、用引物组合物检测人类腺病毒55型(实时浊度仪)

[0074] LAMP反应体系中不含有Fluorecent Detection Reagent、LB和LF,其它同步骤三的RT-LAMP反应体系。

[0075] 将LAMP反应体系置于LA320C实时浊度仪, 63°C 反应120min,然后 75°C 、2min终止反应。

[0076] 实时浊度仪扩增曲线见图4。如果将80min内出现扩增曲线的判断为阳性样本,样本2至样本5为阳性,样本6至样本8为阴性。检测方法的灵敏度为 $0.08\text{PFU}/\text{反应体系}$ 。

[0077] 实施例3、引物对和探针的组合物的特异性

[0078] 一、病毒样本的制备

[0079] 样本1:使用1640培养基将人类腺病毒55型配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0080] 样本2:使用1640培养基将人类腺病毒3型配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0081] 样本3:使用1640培养基将人类腺病毒5型配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0082] 样本4:使用1640培养基将人类腺病毒7型配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0083] 样本5:使用1640培养基将人类腺病毒14型配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0084] 样本6:使用1640培养基将H1N1禽流感病毒配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0085] 样本7:使用1640培养基将H5N1禽流感病毒配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0086] 样本8:使用1640培养基将H3N2禽流感病毒配制为浓度为 $10^2\text{PFU}/\text{ml}$ 的病毒液。

[0087] 样本9:1640培养基。

[0088] 二、提取基因组DNA

[0089] 方法同实施例2的步骤二。

[0090] 三、应用专用引物检测人类腺病毒55型

[0091] 方法同实施例2的步骤三。

[0092] 终止反应后,自然光下试管的照片见图5。

[0093] 终止反应后,紫外灯照射下试管的照片见图6。

[0094] 人类腺病毒3型、人类腺病毒5型、人类腺病毒7型、人类腺病毒14型、H1N1禽流感病毒、H5N1禽流感病毒和H3N2禽流感病毒均为阴性结果,人腺病毒55型为阳性结果,说明本发明的方法和引物组合物具有良好特异性。

[0095] 三、用引物组合物检测人类腺病毒55型(实时浊度仪)

[0096] 方法同实施例2的步骤四。

[0097] 实时浊度仪扩增曲线见图7。人类腺病毒3型、人类腺病毒5型、人类腺病毒7型、人类腺病毒14型、H1N1禽流感病毒、H5N1禽流感病毒和H3N2禽流感病毒均为阴性结果,人腺病毒55型为阳性结果,说明本发明的方法和引物组合物具有良好特异性。

[0001]

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

<120> 用于鉴定人类腺病毒 55 型的引物组合物以及它们的应用

<130> CCGNAY132697

<160> 6

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

aacctcagct gggagatg

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

[0002]

ttttctgtga tgecgcat 18

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

acccgtagca tggtttcatt ttagtttttc ttggactgac ctgcatgg 48

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

gcggtcaggc aaaaccaaaa ttttccatgt caatatcata ttgaatt 48

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223>

<400> 5

tgeccccata cttttteggtc

20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

caacggagca gccaaatca

19

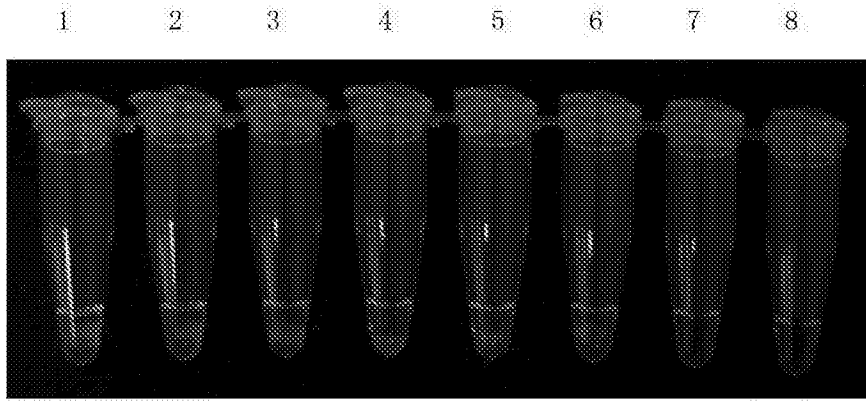


图1

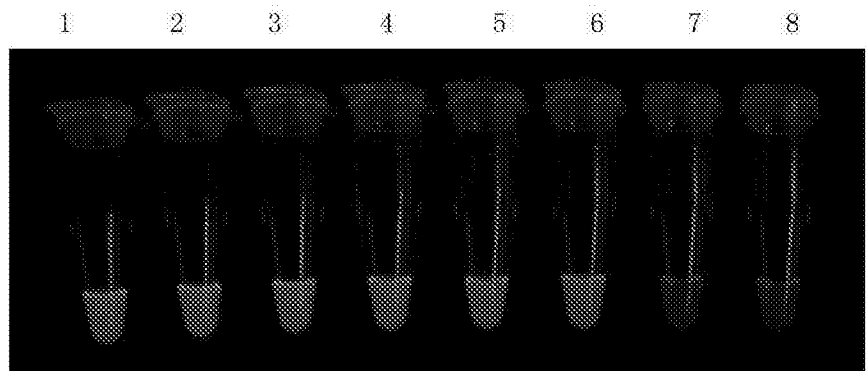


图2

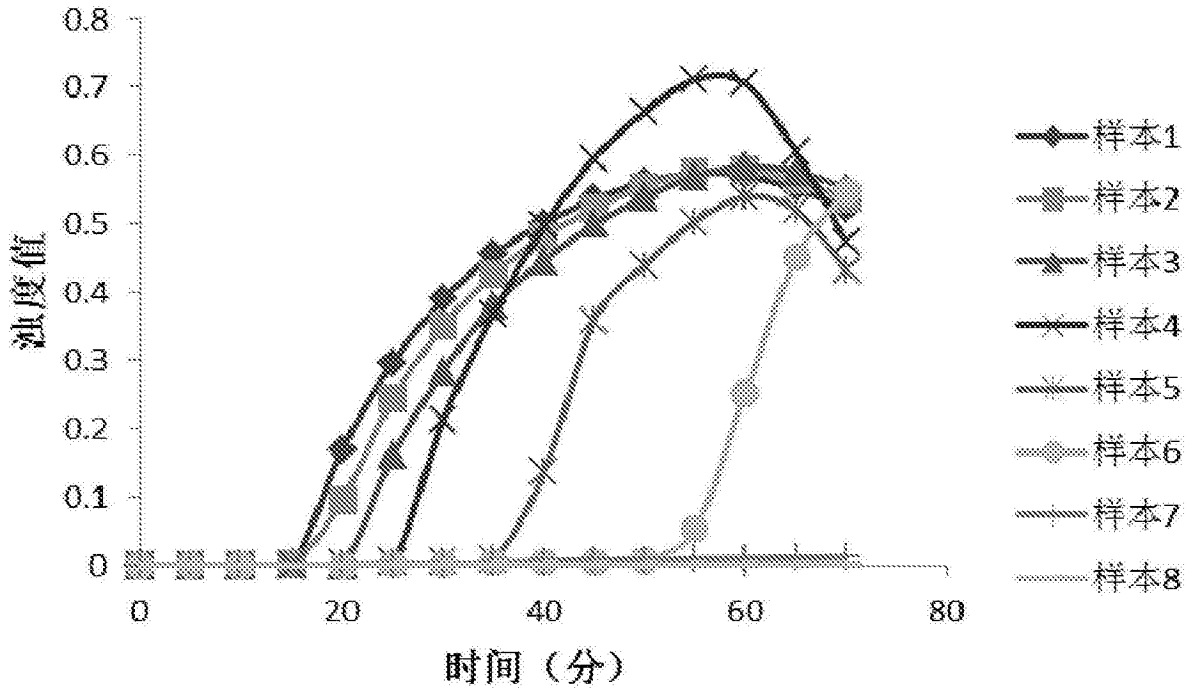


图3

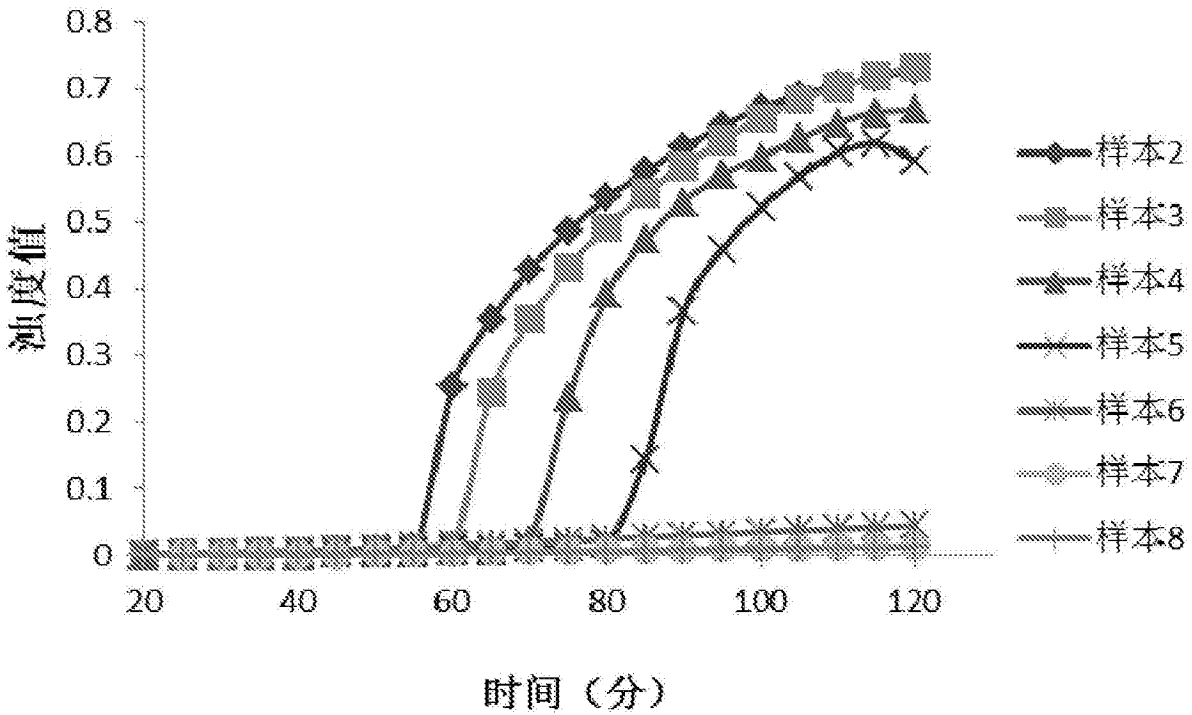


图4

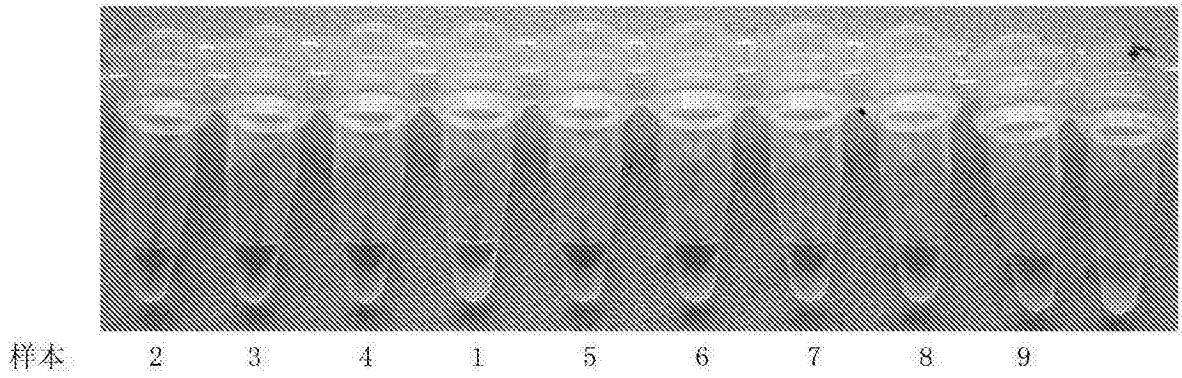


图5

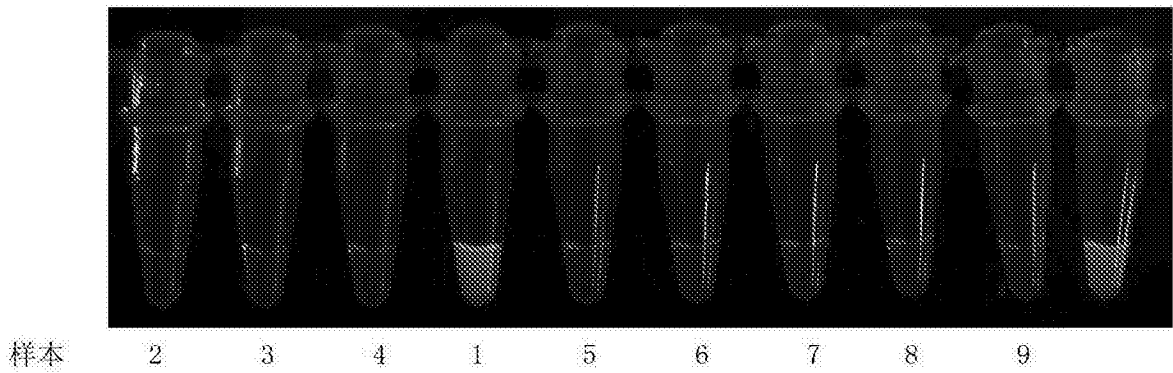


图6

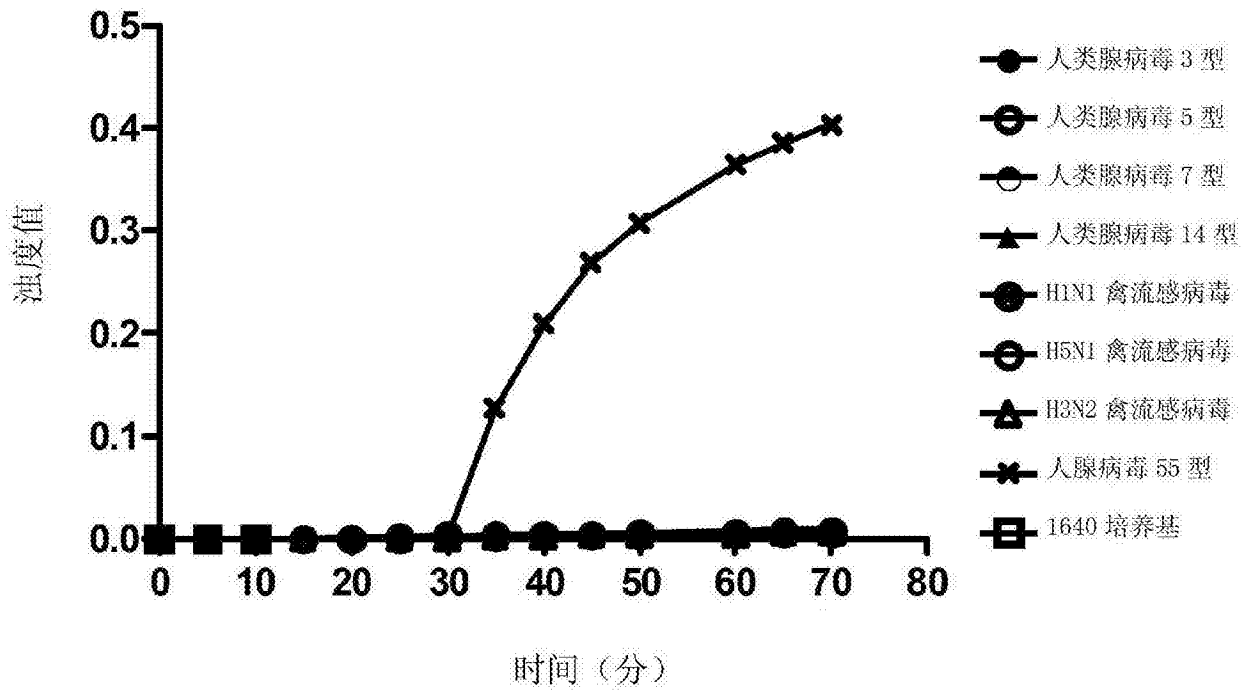


图7