



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104204231 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380011125. 8

代理人 彭家恩 彭愿洁

(22) 申请日 2013. 01. 15

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/70 (2006. 01)

PI2012700037 2012. 02. 27 MY

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/MY2013/000004 2013. 01. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/129906 EN 2013. 09. 06

(71) 申请人 马来亚大学

地址 马来西亚吉隆坡市 50603

(72) 发明人 苏巴·A/P·巴哈苏

诺芬娜·雅士明·宾蒂奥斯曼

华朋·楚 徒雷·昆

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有

限公司 44281

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

用于传染性皮下及造血器官坏死病毒的实时
病毒检测方法和试剂盒

(57) 摘要

一种用于定量检测生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的方法,包括:获得具有如 SEQIDNO :1 和 SEQIDNO :2 所示的核苷酸序列的引物对和如 SEQIDNO :3 所示的核苷酸序列的荧光探针的步骤;使用该引物对和荧光探针通过实时聚合酶链式反应(PCR)扩增生物样品中病毒的非结构蛋白编码区;以及参照阳性对照质粒,确定生物样品中该病毒的存在和数量。

1. 一种用于定量检测生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的方法,包括:

获得如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的引物对,和如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的荧光探针;

使用所述引物对和所述荧光探针,通过实时聚合酶链式反应(PCR)扩增生物样品中所述病毒的非结构蛋白编码区;以及

参照阳性对照质粒,确定所述生物样品中所述病毒的存在和数量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物样品是 DNA 或 cDNA 模板。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物样品来源于从不同生长环境中收集到的不同发育期的水生动物的组织或整个生物体。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述水生动物是罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 虾种。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述不同发育期包括成年、幼年和幼虫期。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述引物对和荧光探针是由 IHHNV 基因组的非结构蛋白编码区(ORF1)设计的。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述荧光探针被合成为在其 5' 末端带有报告荧光染料并在其 3' 末端带有非荧光淬灭剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述报告荧光染料是 5-羧基荧光素(FAM)。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述非荧光淬灭剂是小沟结合物(MGB)。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述阳性对照质粒是从用 IHHNV 基因组的 389bp 区域克隆的载体转化的感受态细胞中得到的。

11. 一对用于基于实时聚合酶链式反应(PCR)定量检测生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的引物对,包括如 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

12. 根据权利要求11所述的引物对,其特征在于,所述引物对设计成特异性识别和扩增 IHHNV 基因组中一个非结构蛋白编码区的保守的开放阅读框(ORF1)。

13. 一种用于基于实时聚合酶链式反应(PCR)定量检测生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的荧光探针,包括如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列。

14. 根据权利要求13所述的荧光探针,其特征在于,所述荧光探针设计成特异性识别和扩增 IHHNV 基因组中一个非结构蛋白编码区的保守的开放阅读框(ORF1)。

15. 根据权利要求13所述的荧光探针,其特征在于,在其 5' 末端具有报告荧光染料并在其 3' 末端具有非荧光淬灭剂。

16. 根据权利要求15所述的荧光探针,其特征在于,所述报告荧光染料是 5-羧基荧光素(FAM)。

17. 根据权利要求15所述的荧光探针,其特征在于,所述非荧光淬灭剂是小沟结合物(MGB)。

18. 一种用于定量检测生物样品中传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)的基于实

时聚合酶链式反应(PCR)的扩增试剂盒,包括:

引物对,具有如 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列;和
荧光探针,具有如 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列;以及
PCR 预混合物。

19. 根据权利要求 18 所述的基于实时 PCR 的扩增试剂盒,其特征在于,所述引物对和
荧光探针设计成特异性识别和扩增 IHHNV 基因组中一个非结构蛋白编码区的保守的开放
阅读框(ORF1)。

20. 根据权利要求 18 所述的基于实时 PCR 的扩增试剂盒,其特征在于,所述荧光探针
在其 5' 末端具有报道荧光染料并在其 3' 末端具有非荧光淬灭剂。

21. 根据权利要求 18 所述的基于实时 PCR 的扩增试剂盒,其特征在于,所述报告荧光
染料是 5- 羧基荧光素(FAM)。

22. 根据权利要求 18 所述的基于实时 PCR 的扩增试剂盒,其特征在于,所述非荧光淬
灭剂是小沟结合物(MGB)。

用于传染性皮下及造血器官坏死病毒的实时病毒检测方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测虾 (shrimps) 中由传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 引起的病毒感染的方法。更具体地, 本发明提供一种高通量实时病毒性检测方法, 用于筛选和鉴定虾中 IHHNV, 以及一种快速检测系统及其试剂盒。这能够控制虾中 IHHNV 的流行, 从而增强虾类养殖业中的育种计划, 特别是对于巨型淡水虾——罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)。

背景技术

[0002] 巨型淡水虾——罗氏沼虾, 是世界各地最常用的商业养殖虾种。作为富含蛋白质的好食物来源, 这种虾被称为高价值的水产养殖产品之一。此外, 作为一种有价值的出口产品, 它具有重要商业价值。然而, 虾养殖中的管理不善常引起广泛的病毒感染, 这也已成为罗氏沼虾养殖计划的主要限制因素。在更严重的程度上, 病毒感染导致急性流行病, 频繁地伴随虾种群的爆发性死亡, 导致商业水产业实际经济损失, 并对有价值的野生种群延续造成威胁。

[0003] IHHNV 感染是虾病害的主要原因之一, 尤其在罗氏沼虾中, 它已被世界动物卫生组织 (OIE) 列为最显著的水产业病害之一。IHHNV 感染也出现在马来西亚的淡水虾——罗氏沼虾中, 并在 2009 年有所报道。最初通过常规的聚合酶链反应 (PCR) 并使用标准的 OIE 列出的引物扩增病毒基因组内 389bp 的特异性区域来检测这种感染 (OIE, 2003)。然而, 这种建议的引物的使用伴随着现有的实验程序显示出在 PCR 结果中的非特异性条带。这可能是由发生在 IHHNV 病毒基因组中的突变引起的, 或由样品中病毒载量水平低引起的。因此, 罗氏沼虾养殖中的一个主要目标集中于更特异性引物和更有效方法的研究和开发, 以获得对 IHHNV 的更精确和可靠的检测结果。

[0004] 现有技术中有几个专利技术涉及用于检测 IHHNV 的方法、系统或试剂盒。在这些现有技术, 美国专利第 2008293037 号披露了用于诊断检测 IHHNV 的引物序列。根据该文献, 分离的引物基于 IHHNV 基因组的一个新的部分, 并且可以在引物引导的扩增 (primer-directed amplification) 或核酸杂交测定法中使用。这种方法意在检测 IHHNV 的存在并量化该病毒。然而, 该专利技术仅使用简单的扩增和杂交方法, 并没有公开任何与其预定程序配套的特异性 PCR 引物以提供快速且特异性的检测结果。

[0005] 现有技术中也公开了 PCR 扩增检测 IHHNV 或有关虾病毒的其它例子。马来西亚专利申请号 PI2011002235 公开了一种通过巢式 PCR 技术检测生物样品中 IHHNV 的方法。此方法包括使用第一引物组通过第一 PCR 扩增生物样品中病毒的保守片段的步骤; 以及在第二 PCR 中使扩增的保守片段与第二引物组接触的步骤。然而, 这种巢式 PCR 方法对于检测发展阶段的 IHHNV 的存在可能并不足够敏感。

[0006] 此外, 中国专利第 1786711 号也提供了一种用于检测 IHHNV 的荧光定量 (FQ)-PCT 方法和试剂盒, 提供正向引物和反向引物以及荧光探针。这种荧光探针使用罗丹明 (TAM)

作为荧光基团、四甲基罗丹明 (TAMRA) 作为猝灭剂。然而,该文献没有披露所应用的 IHNV 引物的来源。该文献也没有披露这种方法和试剂盒的效率,以及是否不同种的 IHNV 可以在其不同发展阶段进行定量检测。

[0007] IHNV 是 20 至 22nm、二十面体、无包膜病毒,在 CsCl 中的密度为 $1.40\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,并含有单链线性 DNA 基因组。这种病毒能引起严重的生长迟延,在商业淡水虾养殖生产中导致严重阻碍。它可以持续存在于健康携带者中,并通过垂直传播传递给其子代,以及通过水平传播传递给其它种群。由于野生或池塘养殖的种系可能是无症状个体,它们不可避免地在虾养殖中造成生物安全风险。因此,需要开发对病毒病原体的健康携带者进行 IHNV 检测的方法。此外,对感染的对虾中病毒载量的定量允许养殖虾病的监控,因此可以在疾病爆发前采取有效措施。

[0008] 现有技术显示,现有的基于 PCR 的 IHNV 检测不能给出特异性且可靠的结果,以用于灵敏且准确地检测罗氏沼虾中的 IHNV,特别是在其各种发展阶段。此外,大多数现有技术中可用的检测方法和系统集中于受感染的虾而不是健康携带者。因此,本发明期望提供一种特别设计的方法、系统或试剂盒,用于实时定量检测 IHNV,以克服现有技术的缺点。

发明内容

[0009] 本发明的首要目的在于,提供一种用于虾样品尤其是罗氏沼虾中的实时定量检测 IHNV 的方法。

[0010] 本发明的另一个目的在于,提供一种诊断试剂盒,用于 IHNV 的快速检测,其基于专门设计的实时聚合酶链式反应 (PCR) 技术。

[0011] 本发明的又一个目的在于,提供一种用于检测 IHNV 的方法和试剂盒,其灵敏且可靠,并能在不同发展阶段检测罗氏沼虾中 IHNV 的存在。除了感染的个体,病毒病原体的健康携带者也将被检测到。

[0012] 本发明的再一个目的在于,提供一种系统或试剂盒,其能够准确且快速地检测虾中 IHNV 的存在,推动 IHNV 感染的监测系统及预防国家中潜在地引起严重经济损失的病毒性疾病的爆发。

[0013] 本发明进一步的目的在于,开发一种有效控制虾中水性病毒性疾病流行尤其是 IHNV 感染的系统,从而提高虾养殖业的生产效率和育种计划。

[0014] 本发明另一个进一步的目的在于,生产对环境安全的高品质驯化的潜在种系,以及可安全消费的高品质水产食物。

[0015] 通过本发明能够全部或部分地实现至少一个前述目的,其中本发明的一个实施例描述了一种用于定量检测生物样品中 IHNV 的方法,包括:获得具有如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的引物对和如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的荧光探针的步骤;使用该引物对和荧光探针通过实时 PCR 扩增生物样品中病毒的非结构蛋白编码区;以及参照阳性对照质粒,确定生物样品中该病毒的存在和数量。

[0016] 根据本发明的一个优选实施例,所述生物样品是 DNA 或 cDNA 模板。该生物样品优选地来源于从不同生长环境中收集到的不同发育期的水生动物的组织或整个生物体。根据本发明的另一个优选实施例,水生动物是罗氏沼虾种;并且不同的发育期优选地包括成年、幼年和幼虫期。

[0017] 本发明的另一个优选实施例公开了引物对和荧光探针是从 IHNV 基因组的非结构蛋白编码区设计的。

[0018] 本发明的又一个优选实施例公开了在荧光探针 5' 末端带有报告荧光染料, 在其 3' 末端带有非荧光淬灭剂合成荧光探针。优选地, 该报告荧光染料是 5- 羧基荧光素 (FAM), 而非荧光淬灭剂是小沟结合物 (MGB)。

[0019] 本发明的再一个优选实施例公开了阳性对照质粒是从用 IHNV 基因组的 389bp 区域克隆的载体转化的感受态细胞中得到的。

[0020] 本发明的进一步实施例是一对引物对, 用于基于实时 PCR 定量检测生物样品中的 IHNV, 包括 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。本发明的另一个进一步实施例是荧光探针, 用于基于实时 PCR 定量检测生物样品中的 IHNV, 包括 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列。

[0021] 优选地, 所述引物对和荧光探针设计成特异性识别和扩增 IHNV 基因组中一个非结构蛋白编码区的保守的开放阅读框 (ORF1)。如前述实施例所示, 该荧光探针优选在其 5' 末端具有一个报道荧光 FAM 染料并在其 3' 末端具有一个非荧光 MGB 淬灭剂。

[0022] 本发明的又一个进一步实施例公开了一种基于实时 PCR 的扩增试剂盒, 用于定量检测生物样品中的 IHNV, 包括: 引物对, 具有 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列; 荧光探针, 具有 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列; 以及 PCR 预混合物。优选地, 所述引物对和荧光探针设计成特异性识别和扩增 IHNV 基因组中一个保守的 ORF1。然而, 该荧光探针优选在其 5' 末端具有一个报道荧光 FAM 染料并在其 3' 末端具有一个非荧光 MGB 淬灭剂。

[0023] 为了提高病毒检测系统的快速性、灵敏性和特异性, 通过将荧光 TaqMan 探针合并到 5' 核酸酶 PCR 检测中而开发出基于 TaqMan 的实时定量 PCR 检测。所建立的 IHNV 实时检测可评估其灵敏度和特异性。所发明的方法和试剂盒允许高通量筛选程序, 具有高灵敏度、特异性和再现性。此外, 已经证实该 IHNV 实时技术在监控不同来源以及不同发育期, 甚至幼虫期的虾的病毒性感染中是可行的, 无论是感染的虾或健康的病原体携带虾。根据实时检测提供的精确信息, 可采取适当的预防措施, 以避免病毒性疾病暴发。此外, 由于所发明的方法和系统的高灵敏度, 可实现无特定病原体 (SPF) 虾的开发, 这能满足当前在各种繁殖计划中对高质量驯养的无病毒种系的生产和维持的需要, 以维持依据世界食物安全 and 环境法规的食物来源和环境生物安全。

[0024] 本领域技术人员将容易理解的是, 本发明非常适合实现提及的目的, 获得提及的目标和优点, 以及其中固有的那些。本文所描述的实施例并非旨在作为对本发明范围的限制。

附图说明

[0025] 为便于理解本发明的目的, 本发明在附图中示出了优选实施例, 根据这些实施例并结合下面的描述, 本发明的结构、操作和许多优点将是易于理解的。

[0026] 图 1 是本发明的一个优选实施例描述的 IHNV 实时 PCR 定量检测中应用的引物对 (SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2) 和探针 (SEQ ID NO:3) 的核苷酸序列。

[0027] 图 2(A) 是本发明的一个优选实施例描述的使用一系列 10 倍稀释的纯化 DNA 进行

实时 IHHNV qPCR 灵敏度测试的对数扩增曲线,示出了临界循环值相对于 IHHNV 质粒拷贝数的对数的标准曲线。数值点代表三份平行准备的每个质粒标准。示出了系数、 R^2 和线性回归方程的相互关系。

[0028] 图 2(B) 是实时 PCR 扩增的 ΔR_n 相对于 PCR 循环数的对数曲线,其中基线循环范围设定在 3 至 11 周期之间。 R_n (归一化报告) 是报告染料的荧光强度对 ROX 参比染料的荧光强度的比值; ΔR_n 是 R_n 减去基线。该曲线示出三份平行质粒标准的扩增结果,其中各标准的拷贝数标示在曲线上。

[0029] 图 3(A) 是本发明的一个优选实施例描述的 (a) 1×10^9 拷贝 IHHNV 质粒, (b) 10 拷贝 IHHNV 质粒, (c) NTC, (d) 感染 HPV 的对虾样品和 (e) MrNV 基因组克隆的对数扩增曲线。

[0030] 图 3(B) 是实时 PCR 产物电泳凝胶结果,其中泳道 M:20bp 的 DNA 梯度标准;泳道 1: 1×10^9 拷贝质粒 DNA;泳道 2:NTC;泳道 3:HPV 的 DNA 样本;泳道 4:MrNV 基因组克隆。

具体实施方式

[0031] 本发明涉及一种用于检测虾中由传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHHNV) 引起的病毒感染的方法。更具体地,本发明提供一种高通量实时病毒性检测方法,用于筛选和鉴定虾中 IHHNV,以及一种快速检测系统及其试剂盒。这能够控制虾中 IHHNV 的流行,从而增强虾类养殖业中的育种计划,特别是对于巨型淡水虾——罗氏沼虾。

[0032] 在下文中,将根据本发明的优选实施例并参照所附的描述和附图对本发明进行。然而,应当理解的是,将描述限制于本发明的优选实施例和附图仅仅是为了便于讨论本发明,可以设想,本领域的技术人员在不脱离所附的权利要求的范围内,可以作出各种修饰变形。

[0033] 本发明公开了一种用于定量检测生物样品中 IHHNV 的方法,包括:获得具有如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的引物对和如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列的荧光探针的步骤;使用该引物对和荧光探针通过实时 PCR 扩增生物样品中病毒的非结构蛋白编码区;以及参照阳性对照质粒,确定生物样品中该病毒的存在和数量。

[0034] 如本发明的一个优选实施例描述的,图 1 示出了所设计和构建的用于实时 PCR 定量检测 IHHNV 的引物对和荧光探针的核苷酸序列。相应地,SEQ ID NO:1 表示与 IHHNV 的非结构蛋白编码区侧翼连接的正向引物的核苷酸序列,而 SEQ ID NO:2 表示反向引物的核苷酸序列。同时,所提供的荧光探针具有如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列。

[0035] 根据本发明的优选实施例,定量检测生物样品中 IHHNV 存在和数量的方法可由虾样品采集步骤开始。该生物样品优选来自于水生动物的组织或整个生物体,所述水生动物是在不同发展阶段从不同的生长环境中收集到的。根据本发明的优选实施例,水生动物是罗氏沼虾虾种。该种虾样品可从不同生长环境,包括河流、孵化场和养成场,在其不同的发育期采集,包括成年虾、幼虾和幼虫阶段。实施例 1 中进一步详述了虾样品采集步骤的一个例子。所采集到的虾样品可以是无症状的病毒病原携带者或感染疾病的个体。

[0036] 根据本发明的一个优选实施例,生物样品是 DNA 或由样品的 RNA 衍生的 cDNA 模板。实施例 2 中进一步详述了用于提取 DNA 的一种简单技术,其中可商购的裂解缓冲液可用于裂解虾样品的样品组织或整个生物体。可选地,如果提取了 RNA,可由反转录过程来获得 cDNA。

[0037] 引物对和探针设计过程在基于实时 PCR 的扩增过程之前进行。根据本发明的另一个优选实施例,引物对由 IHHNV 基因组的非结构蛋白编码区设计。实施例 3 提供了用于设计引物对和探针序列的方法。相应地,IHHNV 基因组可以从可用的公共数据库中获得,如 GenBank 中。然后引物和探针序列设计过程可通过互联网上可用的公共软件来完成。优选地,引物对和荧光探针专门设计用于识别和扩增 IHHNV 基因组中非结构蛋白编码区的保守 ORF1 的 65bp DNA 片段。

[0038] 本发明的另一个优选实施例公开了一种用于构建用于实时 PCR 检测的荧光探针的技术。优选地,优选构造商业上称为 TaqMan 探针的荧光探针。根据优选实施例,探针被合成为在其 5' 末端带有报告荧光染料并在其 3' 末端带有非荧光淬灭剂。更优选地,该报告荧光染料是 FAM;而非荧光淬灭剂可以是 MGB。然而,本发明并不意在限制使用除 FAM 以外的其它类型的荧光基团,只要它们适合用于实时 PCR 检测。同样,不同类型的非荧光淬灭剂,也可用于本发明中。

[0039] 除引物对和荧光探针,本发明的实时 PCR 检测还需要阳性对照质粒。本发明的再一个优选实施例公开了阳性对照质粒是从用 IHHNV 基因组的 389bp 区域克隆的载体转化的感受态细胞中得到的。作为一个例子,如在实施例 4 中进一步描述的那样,IHHNV 的 389bp 的区域,可以从使用 OIE 手册中列出的正向和反向引物 (389F/R) 扩增出的扩增子获得。可以采用适当类型的克隆载体,只要它们与感受态宿主细胞相容。转化和传代培养后,可进行琼脂糖凝胶电泳以确认从宿主细胞中分离出的质粒。纯化的质粒可进一步测序以确保正确的核苷酸序列的存在。此外,也可确定所构建的阳性对照质粒的浓度,用于进一步应用,包括在稍后阶段定量检测 IHHNV 病毒。

[0040] 实时 PCR 扩增过程可按照如实施例 5 中进一步描述的方案进行。以阳性对照质粒为参考,所检测的生物样品中 IHHNV 的存在和数量可从通过实时 PCR 检测产生的 S 形曲线来确定。

[0041] 本发明的进一步实施例是用于基于实时 PCR 定量检测生物样品中 IHHNV 的引物对,包括如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列。所设计的引物对可通过商业构建。本发明的另一个进一步实施例是用于基于实时 PCR 定量检测生物样品中 IHHNV 的荧光探针,包括如 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列。如前面描述的那样,该引物对和荧光探针优选地设计成用于特异性识别和扩增 IHHNV 基因组中非结构蛋白编码区的保守 ORF1。更优选地,所述荧光探针其 5' 末端具有报道荧光染料 FAM 并在其 3' 末端具有非荧光 MGB 淬灭剂。

[0042] 本发明的又一个进一步实施例公开了一种基于实时 PCR 的扩增试剂盒,用于定量检测生物样品中的 IHHNV,包括如前面描述的引物对和荧光探针;并提供 PCR 预混合物。该 PCR 预混合物可含有通常使用的 PCR 酶和缓冲液。优选地,本发明的扩增试剂盒的 PCR 预混合物中含有预先确定量的氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸、Taq DNA 聚合酶和带有氯化钾的 Taq 缓冲液。

[0043] 如前面描述的那样,荧光探针优选地其 5' 末端具有报道荧光染料 FAM 并在其 3' 末端具有非荧光 MGB 淬灭剂。在实时检测中,序列特异性的 TaqMan 探针的使用是格外引人注意的。在本发明中,完整的 TaqMan 探针中 FAM 染料的荧光由邻近的 MGB 淬灭剂吸收。随后,在引物延伸阶段期间通过 Taq 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性切割探针,而在空间上分离

FAM 报告染料和 MGB 淬灭染料, 导致荧光信号产生。FAM 报告荧光基团从内部杂交探针的释放以及扩增循环期间荧光信号的增加与产生的扩增子的数量成比例。

[0044] 所建立的 IHHNV 实时 PCR 检测能够评价其灵敏度和特异性。在实施例 6 中进一步详述了一个评估试验的例子。实时 TaqMan qPCR 的灵敏度可使用一系列 10 倍稀释的所构建的纯化质粒来确定。如实验所揭示的那样, 通过本发明提供的方法和系统可具有 10 个 DNA 拷贝的检测限。已证实, 高度再现性对数线性范围可达 1×10^8 拷贝。同时, 实时引物对和荧光探针的特异性, 可在生物样品上检测, 优选由其他类型病毒感染的虾样品中提取的 DNA 样本。已发现, 该引物对和探针仅对 IHHNV 具有特异性, 而不会与诸如肝胰腺细小病毒 (HPV) 和罗氏沼虾诺达病毒 (MrNV) 的基因组序列交叉反应。

[0045] 本发明的方法和试剂盒可以用于定量分析从不同地点和不同发育期采集的罗氏沼虾中的 IHHNV。已经证实, 所发明的方法和试剂盒能够在野生抱卵雌成年虾、孵化场孵化的幼虫和饲养场饲养 6 周的幼虾中检测出达到 10^3 拷贝每微克 DNA。在饲养场饲养 15 周的亚成年虾中, 病毒滴度显示 10 倍至 100 倍增加, 相当于 10^3 至 10^4 拷贝每微克 IHHNV DNA。

[0046] 本发明的实时 qPCR 方法和试剂盒允许定量检测 IHHNV 的快速性和准确性。除了具有高水平的灵敏度, 该实时 PCR 检测建立了 9 个数量级的宽动力学对数线性量化范围, 相关系数具有高相关性 ($R^2 > 0.99$)。使用该实时 IHHNV PCR 检测, 可以高精度和再现性地定量宽范围的模板量。引物和探针也特异性针对 IHHNV DNA, 不表现与其它病毒和虾宿主的基因组的交叉反应性。

[0047] 本发明包括包含在所附权利要求以及前面描述的内容。虽然本发明以具有一定程度特殊性的优选形式进行了描述, 应该理解的是, 本发明的优选形式仅通过举例的方式公开, 在不脱离本发明的范围下, 本发明的构成细节以及各部分的组合和重排可以作各种变形。

[0048] 实施例

[0049] 下面提供实施例来说明本发明的不同方面和实施方案。这些实施例并非旨在以任何方式限制所公开的发明, 本发明仅由权利要求限定。

[0050] 实施例 1 对虾样品采集

[0051] 采集马来西亚 Perak 地区的不同发育期 (成年虾、幼虫和幼年虾) 和生长环境 (河流、孵化场和养成场) 的罗氏沼虾对虾样品, 用于定量研究。从 Rubana 河获取三个野生抱卵雌种系的无症状个体用于 IHHNV 分析。来自同一样本的野生捕捞种系也在当地的对虾孵化中心产卵孵化。随后取样进行研究由在孵化场的野生雌性生产的幼虫。剩下的幼虫养殖到后幼虫期, 在该时间点将虾转移到马来西亚 Kuala Kangsar 地区的私人、本土经营养殖场进一步发展成幼年虾和亚成年虾。转以后, 分别在 6 和 15 周采集幼年虾和亚成年虾。

[0052] 实施例 2 DNA 提取

[0053] DNA 提取前, 将几双腹肢从幼年虾、亚成年虾和成年虾切下来, 并固定在水乙醇中。对于幼虫的实验, 使用整个身体。将同一种群的十五到二十个幼虫汇集到单个管中。按照制造商说明, 使用从 IQ2000™ 诊断试剂厂商 (Farming IntelliGene Technology Corporation) 购买的裂解缓冲液裂解样品组织或整个身体。细胞裂解后通过异丙醇沉淀, 随后在 $50 \mu\text{l}$ TE 缓冲液中溶解 DNA 沉淀。

[0054] 实施例 3 实时 PCR 引物和探针设计

[0055] 使用 Primer Express software version 3.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) 从 GenBank AF218266 的 IHHNV 基因的非结构蛋白编码区 (ORF1) 设计用于 IHHNV 定量检测的特异性引物和探针序列。引物产生 65bp 的扩增子。用报告荧光染料 5-羧基荧光素 (FAM) 连到 5' 末端并且非荧光小沟结合物 (MGB) 淬灭剂连到 3' 末端, 合成内部 TaqMan 探针。引物和探针的序列以及它们在基因组 AF218266 中的相对核苷酸位置示于表 1 中。

[0056] 表 1

[0057]

引物/ 探针	序列 (5' - 3')	核苷酸位置 (AF218266)
正向引物	GAC ACC CAA CCA ATA AGA CCA GA	1615-1637
反相引物	GCA GCA AAG GTA ACT CCC AAA T	1660-1681
探针	ATA GAG CTA CAA TCC TCG CC	1639-1658

[0058] 实施例 4 构建阳性对照质粒

[0059] 用列于 OIE 手册的正向和反向引物 (389F/R) 所扩增的 389 bp 的 PCR 扩增子克隆到 yTA 载体中, 并命名为 pTA-IHHNV。将质粒 DNA 转化到 ECOS™101 感受态细胞 (Yeastern Biotech) 中, 并在含有氨苄青霉素和 X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃半乳糖苷) 的选择性 Luria Bertani 琼脂培养基上培养。选择凝胶平板上单个分离的白色菌落, 使用高产量质粒小提试剂盒 (Yeastern Biotech) 纯化质粒。质粒制备物进一步使用 plasmid-safe™ ATP-dependent DNase (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) 处理以选择性消除由细菌基因组 DNA 污染造成的线性双链 DNA。为确定纯度, 将一部分质粒 DNA 在 1% 溴化乙锭-琼脂糖凝胶上进行电泳, 并使用 Alphamager™ (Alpha Innotech) 进行拍照。对纯化的质粒进行测序以确保正确的核苷酸序列的存在, 并通过光密度在 260nm 处测定浓度。

[0060] 实施例 5 实时定量 PCR 检测

[0061] 实时 qPCR 在 25 μl 的反应体系中进行, 反应体系包括 0.15 μM 每个 IHHNV 引物和 TaqMan 探针, 10 ng DNA, 和用 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶优化的 1×Taqman 通用 PCR 预混合物, 有 dUTP 的 dNTPs, ROX 阴性参比染料, 和优化的缓冲液组分 (Applied Biosystems)。实时扩增采用 7500 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems) 进行, 使用以下热循环条件: 95°C 下激活 AmpliTaq Gold 10 分钟, 随后 95°C 变性 15s, 60°C 退火和延伸 1min, 进行 40 个循环。实时荧光测量采用内置的电荷耦合元件 (CCD) 监测, 并使用 SDS 软件 1.3.1 版进行数据分析。当基线的标准偏差在循环 3-15 个周期时, 临界循环 (Ct) 值由软件自动定义。当最丰度样品和标准的 Ct 值低于 15 个周期时, 基线循环范围相应地变化。该实时 PCR 检测具有 40 个周期的分离点 (cut-off) 值。具有 S 形曲线特征并且 Ct < 40 的样品解释为阳性样品, 反之亦然。为了确认检测结果, 进行 4% 的 EtBr-琼脂糖凝胶电泳。

[0062] 实施例 6 实时 PCR 的灵敏度和特异性

[0063] 使用一系列 10 倍稀释的纯化质粒, pTA-IHHNV 来确定实时 TaqMan qPCR 的灵敏度。测试的质粒标准的浓度从 10 拷贝至 10^9 拷贝。用三份平行标准的 Ct 值的平均值, 使用 SDS 软件生成标准曲线。通过 10 倍系列稀释的质粒标准产生 IHHNV 特异性标准曲线。图 2 示出了对数扩增曲线和标准曲线, 显示检测限为 10 拷贝的 IHHNV DNA, 并且对数线性范围达 1×10^9 拷贝。该实时 TaqMan 检测具有 9 个数量级的动力学定量范围, 并且跨越该范围的标准曲线具有大于 0.99 ($R^2 = 0.998$) 的衰减系数, 并且三份质粒标准在每一浓度的标准偏差不超过 0.23, 如表 2 所示。结果证明: Ct 值与 IHHNV 拷贝数间的线性、9-对数关系具有再现性和统计学显著性。

[0064] 表 2

[0065]

IHHNV 质粒拷贝数	Ct 平均值	标准偏差
10	37.37	0.23
50	35.69	0.02
1×10^2	34.59	0.10
1×10^3	31.59	0.12
1×10^4	28.26	0.11
1×10^5	24.16	0.18
1×10^6	20.65	0.05
1×10^7	17.09	0.03
1×10^8	13.46	0.04
1×10^9	11.03	0.05

[0066]

[0067] 用从感染 HPV 的罗氏沼虾中提取的 DNA 样品和含有 MrNV 全基因组 (Lab-Ind Resource&UPM, 马来西亚) 的质粒克隆 (pET) 测试实时引物和探针的特异性。只有在 IHHNV 质粒 DNA (图 3A 中 a 和 b; 图 3B 中 1) 中发生扩增。HPV DNA、MrNV 的基因组克隆和无模板对照 (NTC) 显示阴性结果 (图 3A 中 c-e), 并且在琼脂糖凝胶电泳上没有观察到条带 (Figure 3B 中 2-4)。证明引物和 TaqMan 探针对 IHHNV 具有特异性。

[0068] 采用实时 TagMan PCR 定量检测从每个发育期采集的三个样品。如表 3 所示, 结果显示所有在不同地点采集和培养的样品均感染 IHHNV。从野生捕捞抱卵雌性的腹肢和幼虫的整个个体中提取的 DNA 所含有的 IHHNV DNA 量的范围分别是 2.9×10^3 至 5.2×10^3 拷贝每微克 DNA 和 2.1×10^3 至 3.4×10^3 拷贝每微克 DNA。养殖场饲养 6 周的幼年虾和养殖场饲养 15 周的亚成年虾的 IHHNV 量分别达到 9.5×10^3 拷贝每微克 DNA 和 5.0×10^4 拷贝每微

克 DNA。

[0069] 表 3

[0070]

拷贝数每微克 DNA	组织类型	来源	发育期	样品
2.9×10^3	腹肢	野生捕捞	抱卵成年雌性	1
5.2×10^3	腹肢	野生捕捞	抱卵成年雌性	2

[0071]

3.0×10^3	腹肢	野生捕捞	抱卵成年雌性	3
2.1×10^3	15-20 个整个个体	孵卵场	幼虫	4
3.4×10^3	15-20 个整个个体	孵卵场	幼虫	5
2.8×10^3	15-20 个整个个体	孵卵场	幼虫	6
2.2×10^3	腹肢	池塘	幼年虾	7
2.4×10^3	腹肢	池塘	幼年虾	8
9.5×10^3	腹肢	池塘	幼年虾	9
5.0×10^4	腹肢	池塘	亚成年虾	10
1.2×10^5	腹肢	池塘	亚成年虾	11
3.8×10^4	腹肢	池塘	亚成年虾	12

SEQ ID NO: 1

GAC ACC CAA CCA ATA AGA CCA GA

SEQ ID NO: 2

GCA GCA AAG GTA ACT CCC AAA T

SEQ ID NO: 3

ATA GAG CTA CAA TCC TCG CC

图 1

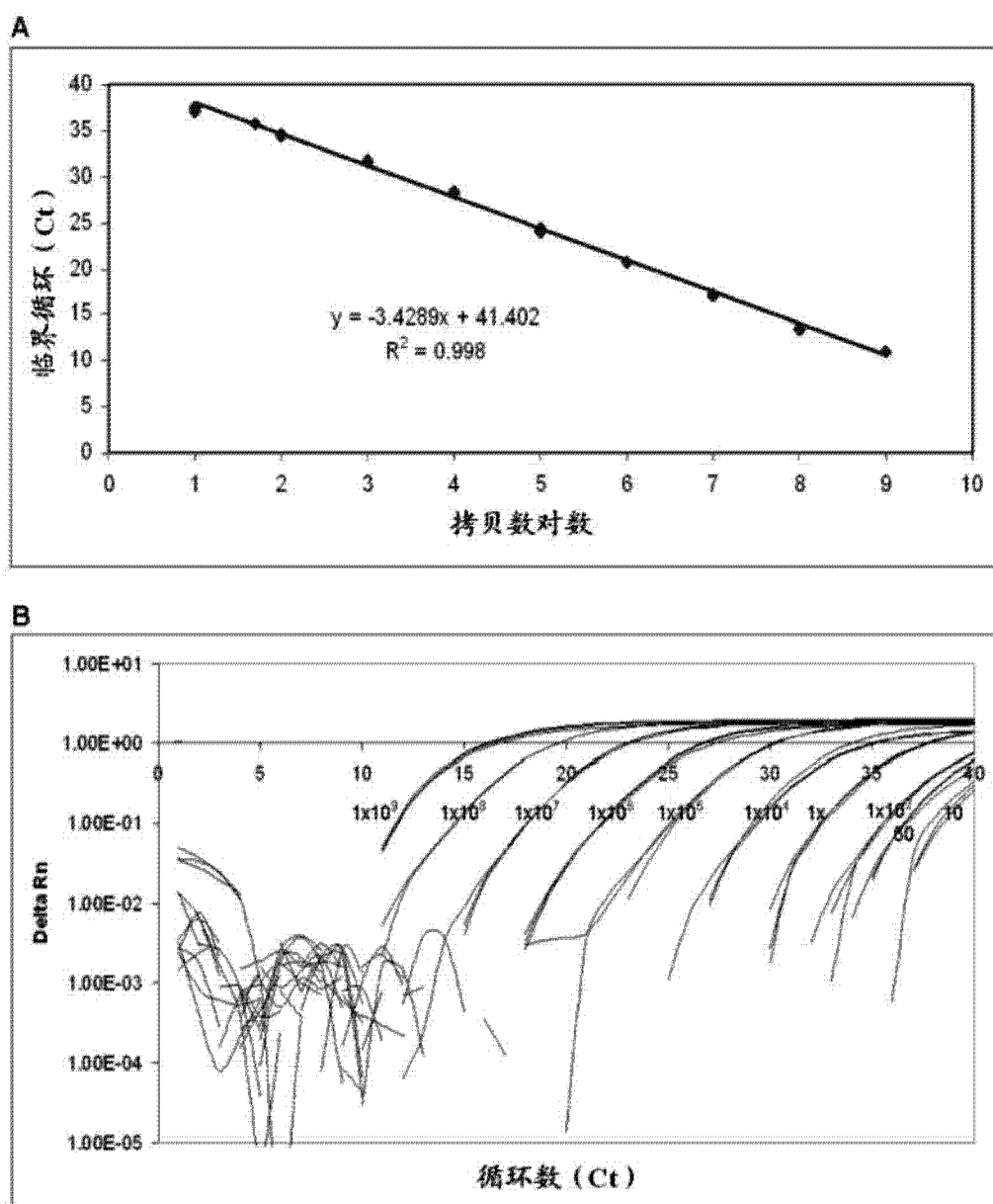


图 2

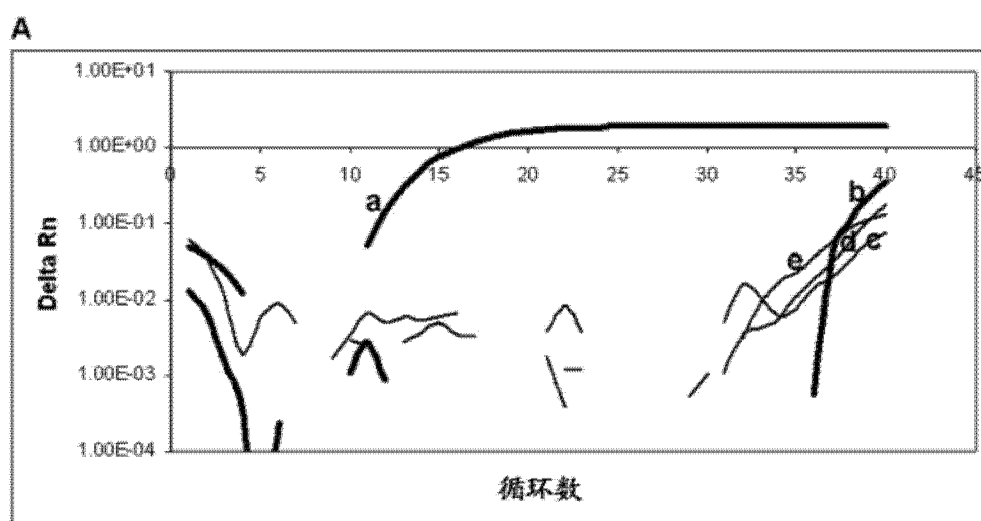
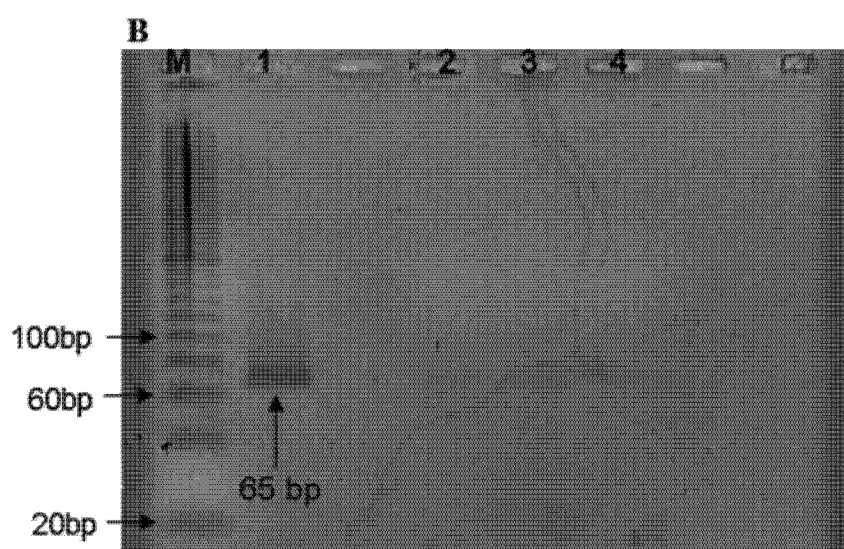


图 3