



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101153341 B

(45) 授权公告日 2010.12.15

(21) 申请号 200710030430.8

(22) 申请日 2007.09.21

(73) 专利权人 珠海市疾病预防控制中心

地址 519000 广东省珠海市香洲区梅华东路
351 号

(72) 发明人 魏泉德 张彩虹 谭爱军 张丽荣

(74) 专利代理机构 广州新诺专利商标事务所有
限公司 44100

代理人 杨焕军

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1814807 A, 2006.08.09, 全文.

CN 1680593 A, 2005.10.12, 全文.

Shinji Fukuda 等. Rapid Detection
of Norovirus from Fecal Specimens
by Real-Time Reverse Transcription-Loop-
Mediated Isothermal Amplification Assay.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 44

4. 2006, 44(4), 1377.

Shinji Fukuda 等. Simultaneous
Detection and Genogroup-Screening Test
for Norovirus Genogroups I and II from
Fecal Specimens in Single Tube by Reverse
Transcription-Loop-Mediated Isothermal
Amplification Assay. MICROBIOLOGY and
IMMUNOLOGY 55 5. 2007, 55(5), 547-549.

Tomoko Yoda 等. Evaluation and
Application of Reverse Transcription Loop-
Mediated Isothermal Amplification
for Detection of Noroviruses. Journal of
Medical Virology 79 3. 2007, 79(3), 328-330.

审查员 李娟娟

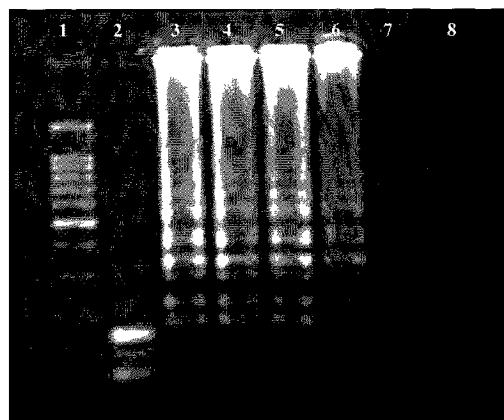
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

诺如病毒 G II 型检测用引物、检测方法、检测
试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种基于环介导等温扩增
(loop-mediated isothermal amplification,
LAMP) 技术的食源性病原体快速检测技术。一种
诺如病毒 GII 型检测用引物,能扩增靶基因的特
异碱基序列,所述靶基因为诺如病毒 GII 型的衣
壳蛋白 ---GenBank 登陆号 :X86557,所述引物与
所述靶基因的 5095 位 ---5319 位的核酸序列的
一部分或其互补链互补。本发明通过提供一种对
诺如病毒 GII 型特定基因片段具有特异性的引物
组,及其用包含有上述引物组的试剂盒检测标本
中是否存在诺如病毒 GII 型特定基因片段,进而
确定标本中是否存在诺如病毒 GII 型。



1. 一种诺如病毒 GII 型检测用引物组,其特征在于,所述引物组由下列引物组成:

正向外引物 F3-GII CGTCGAATG ACGCCAACC

反向外引物 B3-GII CGCTCCACA GTATCTCACCT

正向内引物 FIP-GII CGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATCTGATGGGTCCGCAG

反向内引物 BIP-GII

GGCGGGCCAACAAAACGTAATTGGGACACTGTGAACTCTCCA。

2. 根据权利要求 1 所述的一种诺如病毒 G II 型检测用引物组,其特征在于,所述引物组还包括:

正向环引物 LF-GII TTATTGACCTCTGGGACGAGG

反向环引物 LB-GII GAAACAATTTTGTACAAGCCCCTG。

3. 一种诺如病毒 GII 型检测用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒至少包括含有权利要求 1 中所述的引物组的扩增反应液、酶;

所述扩增反应液中包括如下试剂:

	成分	终浓度或量
扩 增 反 应 液	正向内引物 FIP-G II	1.0-2.0 uM
	反向内引物 BIP-G II	1.0-2.0 uM
	正向外引物 F3-G II	0.15-0.3 uM
	反向外引物 B3-G II	0.15-0.3 uM
	甜菜碱 betaine	0.8 -1.5 M
	dNTP	1.0-1.6mM
	mgs0 ₄	2-6 mM
	反应缓冲液 Bst DNA Polymerase Buffer 10×	1/10 预定反应体积 ul

其中 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液含有 200mM pH 8.8 的三羟基甲硫氨酸甲烷 - 盐酸、100mM 氯化钾、100mM 硫酸铵、20mM 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100;

所述酶包括每微升含 8 个活性单位、终浓度 0.16-0.64U/u1 的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位、终浓度 0.4U/u1 的 AMV 反转录酶。

4. 根据权利要求 3 所述的一种诺如病毒 GII 型检测试剂盒,其特征在于,所述扩增反应液还包括:

正向环引物 LF-GII 0.6-1.0uM

反向环引物 LB-GII 0.6-1.0uM。

5. 根据权利要求 4 所述的一种诺如病毒 GII 型检测试剂盒,其特征在于,所述扩增反应液,包含 1/10 预定反应体积的 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液、3.6mM 硫酸镁、1.6uM 正向内引物 FIP-GII、1.6uM 反向内引物 BIP-GII、0.2uM 的正向外引物 F3-GII、0.2uM 的反向外引物 B3-GII、0.8uM 正向环引物 LF-GII、0.8uM 反向环引物 LB-GII、1.4mM dNTP 和 1M 甜菜碱;

所述酶:每微升含 8 个活性单位、终浓度 0.32U/u1 的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位、终浓度 0.4U/u1 的 AMV 反转录酶。

6. 根据权利要求 4 所述的一种诺如病毒 GII 型检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括阴性及阳性对照模板,所述阴性对照模板为双蒸水;所述阳性对照模板为 1 ~ 100nM 诺如病毒 GII 型基因组 cDNA。

诺如病毒 G II 型检测用引物、检测方法、检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术的食源性病原体快速检测技术。特别涉及对诺如病毒 G II 型特定基因片段具有特异性的引物及引物组;还涉及将所述引物及引物组用环介导等温扩增法检测诺如病毒 G II 型的检测方法和检测试剂盒。

背景技术

[0002] 食源性疾病发病率较高,由沙门氏菌,志贺氏菌,金黄色葡萄球菌,变形杆菌,霍乱弧菌,副溶血性弧菌以及 E. coli O157:H7, 轮状病毒以及诺如病毒 G II 型引起的食物中毒,其发病率在我国食源性疾病发病率中占非常高的比例,是一个严重的公共卫生问题。

[0003] 目前对食源性病原体的检测主要依靠病原体分离法、免疫学方法和各种 PCR 方法。病原体分离虽然是金标准,但繁琐费时,一般需要 5 天时间,最长需要一个月时间,而且免疫学方法的特异性和敏感性均较低。

[0004] 随着分子生物学技术的发展,人们采用 PCR 技术应用于细菌的诊断。例如 PCR 中国专利公开号 CN1526825 的专利申请,披露了一种利用副溶血性弧菌 PR72H 序列的特异性,通过 DNA 提取、PCR 扩增、电泳观察等分子生物学手段检测副溶血性弧菌的方法。虽然该方法敏感、准确、快速,但由于需要昂贵的仪器设备、较高检测费用以及对检测人员较高的技术要求而使其不适用于现场快速检测及基层普及应用。

[0005] 环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术 (国际专利公开号 WO 00/28082) 是 2000 年 Notomi 等开发出一种核酸扩增新技术,即针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物 (如有需要还可以添加有环引物对),利用一种链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在 65°C 左右恒温条件保温约 60 分钟,即可完成核酸扩增反应,扩增结果可直接对扩增副产物焦磷酸镁沉淀通过肉眼进行判断或者对其浊度进行检测,也可用结合双链 DNA 的荧光染料 SYBR Green I 染色,通过肉眼进行判定。用于 LAMP 技术扩增的 2 对引物乃针对基因 6 个区段,因而具有比 PCR 更高的特异性,同时也具备不需要热循环、其单位时间内扩增效率更高、且不需特殊仪器等优点。但是目前未有利用环介导等温扩增法检测诺如病毒 GII 型的检测方法和检测试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于,提供一种对诺如病毒 G II 型特定基因片段具有特异性的引物。

[0007] 上述目的是通过如下技术方案实现的:

[0008] 一种诺如病毒 G II 型检测用引物,其特征在于,能扩增靶基因的特异碱基序列,所述靶基因为诺如病毒 G II 型的衣壳蛋白 ---GenBank 登陆号 :X86557,所述引物与所述靶基因的 5095 位 ---5319 位的核酸序列的一部分或其互补链互补。

[0009] 本发明的另一个目的在于,提供一种对诺如病毒 G II 型特定基因片段具有特异性

的引物组。

[0010] 上述目的是通过如下技术方案实现的：

[0011] 一种诺如病毒 G II 型检测用引物组，其特征在于，所述引物组由下列引物组成：

[0012] 正向外引物 F3-G II CGTCGAATGACGCCAACC

[0013] 反向外引物 B3-G II CGCTCCACAGTATCTCACCT

[0014] 正向内引物 FIP-G IICGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATCTGATGGGTCCGCAG 反向内引物 BIP-G II

[0015] GGCGGGCCAACAAAACGTAATTGGGACACTGTGAACTCTCCA

[0016] 可以扩增诺如病毒 G II 型的衣壳蛋白 (X86557) 基因序列的 5095 位 ---5319 位的核酸序列的一部分或其互补链。

[0017] 特别地，为了加快扩增反应速度，所述引物组还可以包括：

[0018] 正向环引物 LF-G II TTATTGACCTCTGGGACGAGG

[0019] 反向环引物 LB-G II GAAACAATTTTGTACAAGCCCCTG

[0020] 本发明的另一个目的在于，提供一种利用上述引物或引物组基于环介导等温扩增法检测诺如病毒 G II 型的检测方法。

[0021] 上述目的是通过如下技术方案实现的：

[0022] 一种诺如病毒 G II 型的检测方法，该方法用于检测标本中是否存在诺如病毒 G II 型，其特征在于，以诺如病毒 G II 型的衣壳蛋白 (X86557) 基因序列的 5095 位 ---5319 位的核酸序列的一部分或其互补链为靶，通过 LAMP 法用上述引物组选择性扩增上述靶区域，确认是否存在有扩增产物。

[0023] 具体检测方法为：

[0024] 1) 样品处理和模板提取，样品范围适用于细胞培养上清液、粪便、呕吐物等病毒待检标本；取粪便、腹泻物用适量生理盐水稀释，离心取上清液用于 RNA 抽提 (QIAamp Viral RNAMini Kit)；

[0025] 2) 诺如病毒 G II 型的环介导等温扩增 (LAMP)

[0026] 取扩增反应液，先加待检模板，再加酶，最后加双蒸水，形成如下总体积为 20u1 ~ 100u1 的反应体系，混匀点离后在约 65℃ 条件下恒温保温约 60--90 分钟，然后置于 80℃ 的环境下 2 分钟灭活酶。

[0027] 反应体系为 (反应总体积 20u1 ~ 100u1)：

	成分	终浓度或量	
[0028]	待检模板	核酸模板	
			1-10ul
	扩 增 反 应 液	正向内引物 FIP-G II	1.0-2.0 uM
		反向内引物 BIP-G II	1.0-2.0 uM
		正向外引物 F3-G II	0.15-0.3 uM
		反向外引物 B3-G II	0.15-0.3 uM
		甜菜碱 betaine	0.8-1.5 M
		dNTP	1.0-1.6mM
		mgsO ₄	2-6 mM
		反应缓冲液 Bst DNA Polymerase Buffer 10×	1/10 反应体积(ul)
酶	Bst DNA Polymerase	0.16-0.64U/ul	
反转录酶	AMV 反转录酶	0.4 U/ul	
双蒸水	ddH ₂ O	加至预定反应体积(ul)	

[0029] 3) LAMP 反应产物的检测：

[0030] A) 肉眼检测：与阴性对照管比较显示，检测管出现明显浑浊为阳性，未见浑浊为阴性；或，

[0031] B) 加染料后检测：每 25ul 体系的反应管加 1000×SYBR Green I (invitrogen) 1-2ul, 1-5 分钟观察结果，反应液变绿为阳性，保持无色或棕色为阴性；或，

[0032] C) 电泳检测：2-3% 琼脂糖凝胶，70V 电泳约 60-100 分钟，电泳图片显示 LAMP 特征性梯状条带，最小片段在 180bp 左右，则结果为阳性；如无任何条带则结果为阴性。

[0033] 特别地，为了加快扩增反应速度，所述扩增反应液还可以包括：

[0034] 正向环引物 LF-G II 0.6-1.0uM

[0035] 反向环引物 LB-G II 0.6-1.0uM

[0036] 本发明的另一个目的在于，提供一种利用上述引物或引物组基于环介导等温扩增法检测诺如病毒 G II 型的检测试剂盒。

[0037] 上述目的是通过如下技术方案实现的：

[0038] 一种诺如病毒 G II 型检测用试剂盒，其特征在于，所述试剂盒至少包括含有上述引物或引物组的扩增反应液、酶。

[0039] 所述扩增反应液中包括如下试剂：

[0040]

	成分	终浓度或量
扩 增 反 应 液	正向内引物 FIP-G II	1.0-2.0 uM
	反向内引物 BIP-G II	1.0-2.0 uM
	正向外引物 F3-G II	0.15-0.3 uM
	反向外引物 B3-G II	0.15-0.3 uM
	甜菜碱 betaine	0.8-1.5 M
	dNTP	1.0-1.6mM
	mgsO ₄	2-6 mM
	反应缓冲液 Bst DNA Polymerase Buffer 10×	1/10 预定反应体积(ul)

[0041] 其中 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液含有 200mM pH 8.8 的三羟基甲硫氨酸甲烷 - 盐酸 (Tris-HCl)、100mM 氯化钾、100mM 硫酸铵、20mM 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100 ;

[0042] 所述酶为包括,每微升含 8 个活性单位的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位的 AMV 反转录酶。

[0043] 特别地,为了加快扩增反应速度,所述扩增反应液还可以包括:

[0044] 正向环引物 LF-G II 0.6-1.0uM

[0045] 反向环引物 LB-G II 0.6-1.0uM

[0046] 所述试剂盒还包括阴性及阳性对照模板,所述阴性对照模板为双蒸水;所述阳性对照模板为诺如病毒 G II 型基因组 cDNA (1 ~ 100nM)。

[0047] 本发明通过提供一种对诺如病毒 G II 型特定基因片段具有特异性的引物组,及其用包含有上述引物组的试剂盒检测标本中是否存在诺如病毒 G II 型特定基因片段,进而确定标本中是否存在诺如病毒 G II 型。本发明检测试剂和检测方法具有敏感性高、特异性强、方便快捷、不需特殊仪器、适用范围广等优点,可解决食源性病原体的现场快速检测和基层普及应用难题;特别是现场检测及战时野外应用。同时,与现有的 PCR 方法相比具有特异性强、敏感性比 PCR 高或相当、比 PCR 省时约 2 小时、不需特殊仪器(扩增反应在水浴锅中即可完成)等优点。

附图说明

[0048] 图 1 本发明所述引物组合进行环介导等温扩增 (LAMP) 后通过肉眼观察的结果。图例:1、阳性扩增结果;2、阴性扩增结果。

[0049] 图 2 本发明所述引物组合进行环介导等温扩增 (LAMP) 后加入染料观察的结果。图例:1、阴性扩增结果;2,3、阳性扩增结果。

[0050] 图 3 本发明所述引物组合进行环介导等温扩增 (LAMP) 结果的电泳图;

[0051] 图例:1:100bp marker;3-6:分别为诺如病毒 G II 病毒标本;7-8:分别为轮状病毒 A 组 G 1 和 G 3 型毒株(标准毒株)对照。

具体实施方式

[0052] 下面通过具体的诺如病毒 G II 型检测过程来对本发明进行说明,但本发明并不局

限于这些实施例。

[0053] 实施例一对已知诺如病毒 G II 病毒标本衣壳蛋白基因的扩增

[0054] 一) 引物组的设计

[0055] 通过查阅文献和用 BLAST 软件分析筛选出诺如病毒 G II 型特异性衣壳蛋白基因的 5095---5319bp 核酸序列, 针对该片段的六个位点 (这六个位点分别 :5095-5112bp、5113-5130bp、5158-5178bp、5207-5228bp、5267-5286bp、5300-5319bp) 设计出 LAMP 引物并合成, 得到如下的引物。引物设计通过 LAMP 专用引物设计软件结合分子生物学分析软件 Advance Vector NTI 完成。

[0056] 序列编号 1

[0057] 正向外引物 F3-G II CGTCGAATGACGCCAACC

[0058] 序列编号 2

[0059] 反向外引物 B3-G II CGCTCCACAGTATCTCACCT

[0060] 序列编号 3

[0061] 正向内引物 FIP-G II CGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATCTGATGGGTCCGCAG

[0062] 序列编号 4

[0063] 反向内引物 BIP-G II

[0064] GGCGGGCCAACAAAACGTAATTGGGACACTGTGAACTCTCCA

[0065] 所述 6 个位点的序列分别为 :

[0066] 5095-5112bp :cgtcgaatgacgcccaacc

[0067] 5113-5130bp catctgatgggtccgcag

[0068] 5158-5178bp aggttatggctctggagccccg

[0069] 5207-5228bp ggcgggccaacaaaacgtaatt

[0070] 5267-5286bp tgga gagttcacagtgtccc

[0071] 5300-5319bp aggtgagatactgtggagcg

[0072] 其中,

[0073] 所述正向外引物 F3 :扩增始于 5095-5112bp(cgtcgaatgacgcccaacc) ;

[0074] 所述正向内引物 FIP :扩增始于 5158-5178bp(aggttatggctctggagccccg) 的互补序列和 5113-5130bp(catctgatgggtccgcag) ;

[0075] 所述反向外引物 B3 :扩增始于 5300-5319bp(aggtgagatactgtggagcg) 的互补序列 ;

[0076] 反向内引物 BIP :扩增始于 5207-5228bp(gcgggccaacaaaacgtaatt) 和 5267-5286bp(tggagagttcacagtgtccc) 的互补序列。

[0077] 上述引物组中各引物的共性在于 :与诺如病毒 G II 型特异性基因衣壳蛋白的 5095---5319bp 核酸序列互补。

[0078] 二) 本实施例实验的毒株与各毒株的扩增结果如下表一

[0079] 表一 (为了便于理解, 本申请人将下列序号与图 1 中编号设置成一致)

[0080]

序号	分子量标准品及扩增产物	结果

1	100bp marker	
2	阳性扩增产物酶切鉴定	符合理论预测
3	诺如病毒 G II 型阳性标本 (经荧光-PCR 验证)	阳
4	诺如病毒 G II 型阳性标本 (经荧光-PCR 验证)	阳
5	诺如病毒 G II 型阳性标本 (经荧光-PCR 验证)	阳
6	诺如病毒 G II 型阳性标本 (经荧光-PCR 验证)	阳
7	轮状病毒 A 组 G 1 型 (Wa 标准株)	阴
8	轮状病毒 A 组 G 3 型 (W178 标准株)	阴

[0081] 上述供试毒株部分为标准毒株,购自中国典型培养物保藏中心;部分为检测毒株标本(经深圳太太基因荧光 PCR 试剂盒验证)由本申请人保存。“阴”表示无扩增反应,“阳”表示有扩增反应。

[0082] 三) 上述各毒株基因 RNA 的提取

[0083] 取细胞培养上清液、粪便、腹泻物用适量生理盐水稀释,离心取上清液用于 RNA 抽提(QIAamp Viral RNA Mini Kit)。

[0084] 四) 基于 LAMP 法的基因扩增

[0085] 取扩增反应液 14.6ul,加 2.0ul 待检模板,加 1ul 的聚合酶和 0.5ul 的反转录酶,再加 6.9ul ddH₂O,形成如下表总体积为 25ul 的反应体系,在温度为 65℃ 的恒温水浴锅保温约 90 分钟,然后置于 80℃、2 分钟灭活酶。

[0086] 反应体系为:(反应总体积为 25ul)

成分	储存液浓度	量(ul)	终浓度
核酸模板		2.0	
FIP-G II	40 uM	1.0	1.6 uM
BIP-G II	40 uM	1.0	1.6 uM
F3-G II	10 uM	0.5	0.2 uM
B3-G II	10 uM	0.5	0.2 uM
[0087] betaine	5 M	5.0	1 M
dNTP	10 mM	3.5	1.4mM
mgs0 ₄	150 mM	0.6	3.6mM
Bst DNA Polymerase Buffer	10×	2.5	
Bst DNA Polymerase	8U/ul	1.0	0.32U/ul
AMV 反转录酶	20U/ul	0.5	0.4U/ul
ddH ₂ O		6.9	

[0088] 除核酸模板外,上述反应体系可以简化为扩增反应液,酶和双蒸水。

[0089] 扩增反应液:包含 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液、3.6mM 硫酸镁、1.6uM 正向内引物 FIP-G II、1.6uM 反向内引物 BIP-G II、0.2uM 的正向外引物 F3-G II、0.2uM 的反向外引物 B3-G II、1.4mM dNTP 和 1M 甜菜碱 (betaine) ;

[0090] 其中 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液含有 200mM pH 8.8 的三羟基甲硫氨酸甲烷 - 盐酸 (Tris-Hcl)、100mM 氯化钾、100mM 硫酸铵、20mM 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100 ;

[0091] 酶:每微升含 8 个活性单位的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位的 AMV 反转录酶。

[0092] 双蒸水的加入原则是,在其他试剂的量确定后,加入双蒸水使反应体积到达预定的反应体积。

[0093] 五) 扩增产物的检测

[0094] 随着扩增反应的进行,从 dNTP 析出的焦磷酸根离子和反应液中存在的镁离子将形成焦磷酸镁沉淀。因此,只有在发生核酸扩增的反应液中才会出现白色浑浊。这样可以通过如下方式进行判断。

[0095] A) 肉眼检测:与阴性对照管比较显示,检测管出现明显浑浊为阳性,未见浑浊为阴性;(参见图 1) 或,

[0096] B) 加染料后检测:每 25ul 体系的反应管加 1000×SYBR Green I (invitrogen) 1-2ul, 1-5 分钟观察结果,反应液变绿为阳性,保持无色或棕色为阴性;(参见图 2) 或,

[0097] C) 电泳检测:2-3% 琼脂糖凝胶,70V 电泳约 60-100 分钟,电泳图片显示 LAMP 特征性梯状条带,最小片段在 180bp 左右,则结果为阳性;如无任何条带则结果为阴性。(参见图 3)

[0098] 经对扩增产物的检测,表明上述引物组只对诺如病毒 G II 型阳性标本出现 LAMP 扩增反应,对照毒株未出现扩增反应,显示了良好的特异性。

[0099] 6) 灵敏度比较:

[0100] 以诺如病毒 G II 型阳性标本为检测毒株,将所提 RNA 反转录成 cDNA 后做一系列稀释: 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 分别用 LAMP 方法和 PCR 方法(上下游引物分别为 F3-G II、B3-G II) 来检测, 检测结果表明 LAMP 反应敏感性达 10^{-4} ; PCR 反应敏感性达 10^{-3} ; 结果显示 LAMP 反应敏感性比 PCR 反应敏感 10 倍。

[0101] 实施例二

[0102] 本实施例与实施例一的区别在于, 本实施例中, 基于 LAMP 法的基因扩增阶段, 为了加快扩增反应速度, 在所述扩增反应液还包括有:

[0103] 序列编号 5

[0104] 正向环引物 LF-G II TTATTGACCTCTGGGACGAGG

[0105] 序列编号 6

[0106] 反向环引物 LB-G II GAAACAATTTTGTACAAGCCCCTG

[0107] 此时:

[0108] 所述正向环引物 LF-G II: 扩增始于 5135-5155bp (cctcgtcccagaggtcaataa) 的互补序列;

[0109] 所述反向环引物 LB-G II: 扩增始于 5242-5265bp

[0110] (gaaacaatTTTGTACAAGCCCCTG)

[0111] 此时反应体系为:(反应总体积为 25u1)

成分	储存液浓度	量(ul)	终浓度
核酸模板		1.0	
FIP-G II	40 uM	1.0	1.6 uM
BIP- G II	40 uM	1.0	1.6 uM
[0112] F3- G II	10 uM	0.5	0.2 uM
B3- G II	10 uM	0.5	0.2 uM
LF- G II	20 uM	1.0	0.8 uM
LB- G II	20 uM	1.0	0.8 uM
betaine	5 M	5.0	1 M
dNTP	10 mM	3.5	1.4mM
mgs0 ₄	150 mM	0.6	3.6mM
Bst DNA Polymerase Buffer	10×	2.5	
[0113] Bst DNA Polymerase	8U/ul	1.0	0.32U/ul
AMV 反转录酶	20U/ul	0.5	0.4 U/ul
ddH ₂ O		5.9	

[0114] 在加入上述正向环引物 LF-G II 和反向环引物 LB-G II 后只需在温度为 65°C 的恒温水浴锅保温约 60 分钟, 然后置于 80°C、2 分钟灭活酶。

[0115] 实施例三

[0116] 本实施例与实施例二的区别在于, 本实施例中, 基于 LAMP 法的基因扩增使用的反应体系为:

[0117] 反应体系为:(反应总体积为 25u1)

[0118]

成分	储存液浓度	量(ul)	终浓度
核酸模板		1.0	
FIP-G II	25 uM	1.0	1.0 uM
BIP-G II	25 uM	1.0	1.0 uM
F3- G II	7.5 uM	0.5	0.15 uM
B3- G II	7.5 uM	0.5	0.15 uM
LF- G II	20 uM	0.75	0.6 uM
LB- G II	20 uM	0.75	0.6 uM
betaine	4 M	5.0	0.8 M
dNTP	10 mM	2.5	1.0mM
mgsO ₄	100 mM	0.5	2.0mM
Bst DNA Polymerase Buffer	10×	2.5	
Bst DNA Polymerase	8U/ul	0.5	0.16U/ul
AMV 反转录酶	20U/ul	0.5	0.4 U/ul
ddH ₂ O		8.0	

[0119] 除核酸模板外,上述反应体系可以简化为扩增反应液,酶和双蒸水。

[0120] 扩增反应液:包含 10×BstDNAPolymerase Buffer 反应缓冲液、2mM 硫酸镁、1.0uM 正向内引物 FIP-G II、1.0uM 反向内引物 BIP-G II、0.15uM 的正向外引物 F3-G II、0.15uM 的反向外引物 B3-G II、1.0mM dNTP、0.6uM 正向环引物 LF-G II、0.6uM 反向环引物 LB-G II 和 0.8M 甜菜碱 (betaine);其中 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液含有 200mM PH 8.8 的三羟基甲硫氨酸甲烷 - 盐酸 (Tris-Hcl)、100mM 氯化钾、100mM 硫酸铵、20mM 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100;

[0121] 酶:每微升含 8 个活性单位的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位的 AMV 反转录酶。

[0122] 双蒸水的加入原则是,在其他试剂的量确定后,加入双蒸水使反应体积到达预定的反应体积。

[0123] 反应条件:在温度为 60℃ 的恒温水浴锅保温约 75 分钟,然后升温至 80℃、2 分钟灭活酶。

[0124] 实施例四

[0125] 本实施例与实施例二的区别在于,本实施例中,基于 LAMP 法的基因扩增使用的反应体系为:

[0126] 反应体系为:(反应总体积为 25ul)

[0127]

成分	储存液浓度	量(ul)	终浓度
核酸模板		1.0	
FIP-G II	50 uM	1.0	2.0 uM
BIP-G II	50 uM	1.0	2.0 uM
F3-G II	15 uM	0.5	0.3 uM
B3-G II	15 uM	0.5	0.3uM
LF-G II	25 uM	1.0	1.0uM
LB-G II	25 uM	1.0	1.0 uM
betaine	7.5 M	5.0	1.5 M
dNTP	10 mM	4.0	1.6mM
mgs0 ₄	150 mM	1.0	6.0mM
Bst DNA Polymerase Buffer	10×	2.5	
Bst DNA Polymerase	16U/ul	1.0	0.64U/ul
AMV 反转录酶	20U/ul	0.5	0.4U/ul
ddH ₂ O		5.0	

[0128] 除核酸模板外,上述反应体系可以简化为扩增反应液,酶和双蒸水。扩增反应液 A:包含 10×Bst DNAPolymerase Buffer 反应缓冲液、6mM 硫酸镁、2.0uM 正向内引物 FIP-G II、2.0uM 反向内引物 BIP-G II、0.3uM 的正向外引物 F3-G II、0.3uM 的反向外引物 B3-G II、1.6mM dNTP、1.0uM 正向环引物 LF-G II、1.0uM 反向环引物 LB-G II 和 1.5M 甜菜碱 (betaine)。

[0129] 其中 10×Bst DNA Polymerase Buffer 反应缓冲液含有 200mM pH 8.8 的三羟基甲硫氨酸甲烷 - 盐酸 (Tris-HCl)、100mM 氯化钾、100mM 硫酸铵、20mM 硫酸镁和 1% 曲拉通 X-100。

[0130] 酶:每微升含 16 个活性单位的 Bst DNA 聚合酶和每微升含 20 个活性单位的 AMV 反转录酶。

[0131] 双蒸水的加入原则是,在其他试剂的量确定后,加入双蒸水使反应体积到达预定的反应体积。

[0132] 反应条件:在温度为 65℃ 的恒温水浴锅保温约 60 分钟,然后置于 80℃、2 分钟灭活酶。

[0133] 实施例五从腹泻物中分离的毒株的检测

[0134] 毒株基因 DNA 的提取及扩增、检测

[0135] 1) 样品处理和模板提取,样品范围适用于细胞培养上清液、粪便、呕吐物等病毒待检标本;取粪便、腹泻物用适量生理盐水稀释,离心取上清液用于 RNA 抽提 (QIAamp Viral RNAMini Kit);

[0136] 对上述提取的 RNA 与实施例一同样的通过 LAMP 法进行核酸扩增并对扩增产物进行检测及酶切鉴定。扩增结果与阳性扩增产物的酶切鉴定结果之比较,如下表二。

[0137]

序号	LAMP 检测	扩增产物的酶切鉴定
粪便样品 1	阳性	符合理论预测
粪便样品 2	阳性	符合理论预测

[0138] 基于阳性扩增产物的酶切鉴定

[0139] 将 LAMP 检测为阳性的扩增产物进行酶切鉴定：靶基因序列上含限制性内切酶 Hae III 位点，位于 5211-5214bp，用 Hae III 来酶切 LAMP 阳性扩增产物，结果显示酶切片断有 3 个，分别为 155bp、121bp、90bp 大小，与理论预测值相符（参见电泳图 3 第 2 道），因而确定阳性扩增为特异性扩增。

[0140] 如表二所示，阳性扩增产物的酶切鉴定符合理论预测片段大小及片段数，只有检测标本的 LAMP 特异性扩增才观察到上述结果。

[0141] 序列表

[0142] <110> 珠海市疾病预防控制中心

[0143] <120> 诺如病毒 G II 型检测用引物、检测方法、检测试剂盒

[0144] <160>7

[0145] <210>1

[0146] <211>18

[0147] <212>DNA

[0148] <213> 人工序列

[0149] <5320>

[0150] <223> 引物

[0151] <400>1

[0152] CGTCGAATGACGCCAACC 18

[0153] <210>2

[0154] <211>20

[0155] <212>DNA

[0156] <213> 人工序列

[0157] <5320>

[0158] <223> 引物

[0159] <400>2

[0160] CGCTCCACAGTATCTCACCT 20

[0161] <210>3

[0162] <211>39

[0163] <212>DNA

[0164] <213> 人工序列

[0165] <5320>

[0166] <223> 引物

[0167]	<400>3	
[0168]	CGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATCTGATGGGTCCGCAG	39
[0169]	<210>4	
[0170]	<211>42	
[0171]	<212>DNA	
[0172]	<213> 人工序列	
[0173]	<5320>	
[0174]	<223> 引物	
[0175]	<400>4	
[0176]	GGCGGGCCAACAAAACGTAATTGGGACACTGTGAACTCTCCA	42
[0177]	<210>5	
[0178]	<211>21	
[0179]	<212>DNA	
[0180]	<213> 人工序列	
[0181]	<5320>	
[0182]	<223> 引物	
[0183]	<400>5	
[0184]	TTATTGACCTCTGGGACGAGG	21
[0185]	<210>6	
[0186]	<211>24	
[0187]	<212>DNA	
[0188]	<213> 人工序列	
[0189]	<5320>	
[0190]	<223> 引物	
[0191]	<400>6	
[0192]	GAAACAATTTTGTACAAGCCCCTG	24
[0193]	<210>7	
[0194]	<211>225	
[0195]	<212>RNA	
[0196]	<213> 诺如病毒 G II 型	
[0197]	<400>7	
[0198]	5095 cgtcga	
[0199]	5101 atgacgcaa cccatctgat ggtccgcag ccaacctcgt cccagaggtc	
[0200]	aataatgagg	
[0201]	5161 ttatggctct ggagcccgtt gttggtgccg ctattgcggc acctgtggcg	
[0202]	ggccaacaaa	
[0203]	5221 acgtaattga cccctggatt agaaacaatt ttgtacaagc ccctggtgga	
[0204]	gagttcacag	
[0205]	5281 tgtcccctag aaacgctcca ggtgagatac tgtggagcg	

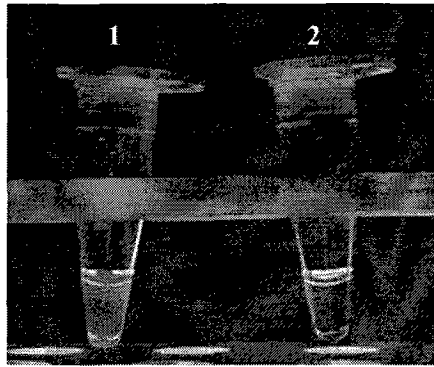


图 1

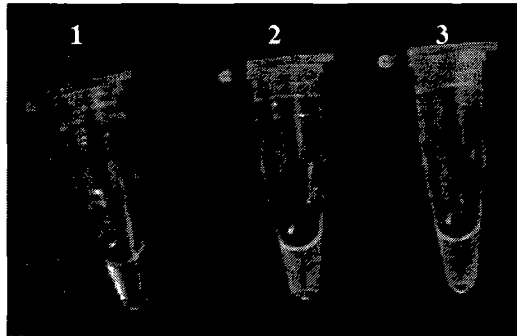


图 2

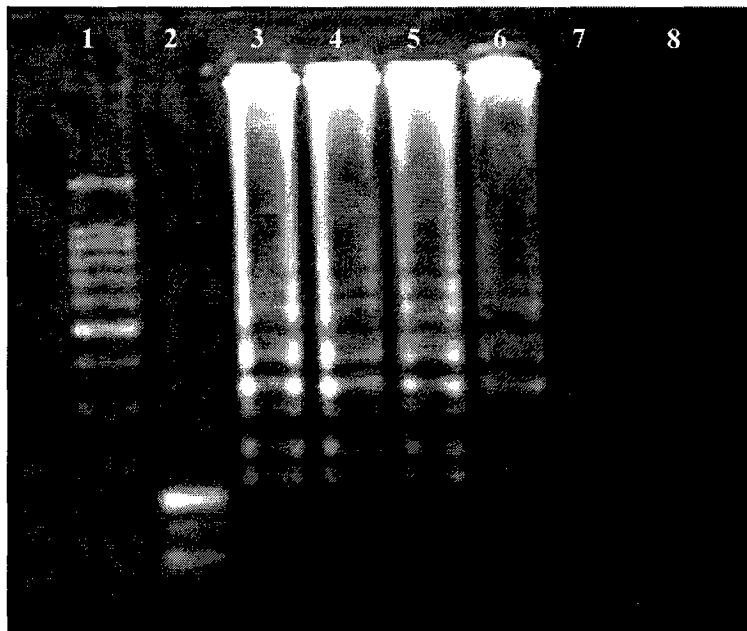


图 3