



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103205511 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201310154151. 8

(22) 申请日 2013. 04. 27

(73) 专利权人 金陵科技学院

地址 210000 江苏省南京市栖霞区中心村
130 号金陵科技学院幕府校区

(72) 发明人 张志成 庄林林 蒋加进 戴鼎震

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12R 1/93(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102256997 A, 2011. 11. 23, 全文.

刘建波等. 猪细小病毒流行病学与遗传变异

研究进展. 《动物医学进展》. 2012, 第 33 卷 (第 3 期), 第 89-93 页.

Hiroaki Okamoto et al. Genomic Characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. 《Journal of General Virology》. 2002, 第 83 卷第 1291-1297 页.

审查员 李谦

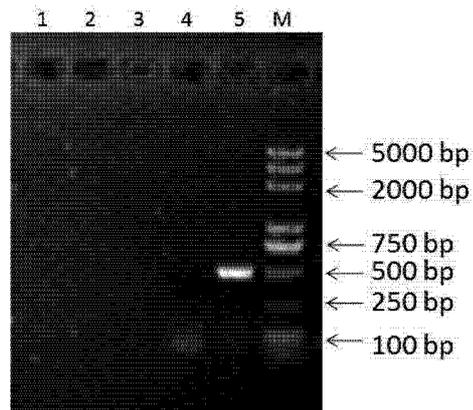
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于检测鸽细小环病毒的引物对其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测鸽细小环病毒的引物对, 所述引物对的核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3 ; 还公开了一种鸽细小环病毒的核苷酸序列及其制备方法, 该病毒的核苷酸序列是通过所述的引物对进行 PCR 得到, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 ; 还公开了一种包含上述引物对的鸽细小环病毒的检测试剂盒及其检测方法。本发明获得的一种应用于检测鸽细小环病毒的引物对, 在特异引物对的基础上, 优化了 PCR 条件, 扩增出了鸽细小环病毒的核苷酸序列, 并优化了检测条件和检测体系制备了检测该病毒的试剂盒。该试剂盒具有较高的特异性和稳定性, 灵敏度达 5pg, 可以快速准确检测鸽细小环病毒。该试剂盒可以作为快速检测鸽细小环病毒的有效工具。



1. 一种用于检测鸽细环病毒的引物对,其特征在于,所述引物对的核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3。
2. 一种鸽细环病毒的检测试剂盒,它包含权利要求 1 所述的引物对。
3. 根据权利要求 2 所述的鸽细环病毒的检测试剂盒,其特征在于包括:
 - 1) 预混剂 A :由核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 的上游引物 P115 μ L,核苷酸序列如 SEQ ID NO :3 的下游引物 P215 μ L,2 \times PCR pre-mix200 μ L, ddH₂O100 μ L 组成;
 - 2) 阴性对照 :非鸽细环病毒的 DNA 片段 600 μ L
 - 3) 阳性对照 :鸽细环病毒的 DNA 片段 600 μ L。

一种用于检测鸽细环病毒的引物对其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测领域,具体涉及一种用于检测鸽细环病毒的引物对其应用。

背景技术

[0002] 细环病毒(Torque teno virus, TTV)是近年来发现的一种新型的人畜共患 DNA 病毒,1997 年首次发现于人类肝炎病中,经输血及粪-口途径等感染,广泛存在于人类、家畜、野生动物及一些伴侣动物体内。细环病毒是细环病毒科细环病毒属,呈球形、无囊膜、环状单股负链 DNA 病毒。TTV 基因组 DNA 呈高度的差质性,同时由于 TTV 是单链 DNA 病毒(细环病毒属),在感染动物体内血清中滴度差别较大,这也可能是 GenBank 上目前 TTV 全基因序列屈指可数的原因。关于 TTV 的开放阅读框(ORF)位置以及各部分编码基因的功能等更是不甚了解。目前,我国用于细环病毒的实验室诊断手段比较落后,诊断主要依据临床症状进行判断,缺乏快速、简便的诊断方法。国内外已有很多利用 PCR 方法从活体组织、组织培养物中检测鸽细环病毒,但是并未扩增出该病毒的核苷酸序列,也没有针对此做相关研究,更未对该病毒的检测手段进行研究。

[0003] 到目前为止,TTV 对宿主的致病性尚不清楚,但有数据显示其和其他病毒共感染会引起一些疾病。2006 年 kekarainen 等研究人员发现 TTV 和 PCV2 混合感染能导致仔猪断奶后多系统呼吸综合征(PMWS)的发生。2008 年另有报道 TTV 能促进 PRRS 的爆发。2009 年 Tuijak 等对商业化疫苗、药品及实验室常用酶进行猪 TTV 的检测,结果在猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒和猪肺炎支原体疫苗等中都检测到 TTV 的存在。

[0004] TTV 感染呈全球性分布,在人群以及家畜、家禽等动物中感染率较高。目前鸽养殖已成为畜牧业中相对独立的新兴产业,世界食品消费市场把肉鸽列为优质肉食。国内市场对乳鸽需求量日益增大,发展鸽养殖潜力巨大,市场前景十分广阔。但是国内尚无关于鸽细环病毒,在我国鸽群细环病毒明显高感染率的背景下,尽快建立我国鸽细环病毒的 PCR 检测方法及其试剂盒的研制以便调查和防控此病实乃当务之急,对我国鸽市场的稳定发展具有十分重要的现实意义和市场价值。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是一种用于检测鸽细环病毒的引物对。本发明还要解决的技术问题是提供一种鸽细环病毒的检测试剂盒。

[0006] 技术方案:为实现上述目的,本发明的一种用于检测鸽细环病毒的引物对,所述引物对的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3。

[0007] 一种鸽细环病毒的核苷酸序列,所述病毒的核苷酸序列是通过权利要求 1 所述的引物对进行 PCR 扩增得到,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1。

[0008] 一种鸽细环病毒的检测试剂盒,它包含权利要求 1 所述的引物对。

[0009] 所述的鸽细环病毒的检测试剂盒,其特征在于包括:

[0010] 1)预混剂 A :由核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 的上游引物 P115 μ L,核苷酸序列如 SEQ ID NO :3 的下游引物 P215 μ L,2 \times PCR pre-mix200 μ L, ddH₂O100 μ L 组成 ;

[0011] 2) 阴性对照 :非鸽细环病毒的 DNA 片段 600 μ L

[0012] 3) 阳性对照 :鸽细环病毒的 DNA 片段 600 μ L

[0013] 所述的鸽细环病毒核苷酸序列的制备方法,其特征在于,包括以下步骤 :

[0014] 1) 根据同源性利用引物设计软件设计引物对 ;

[0015] 2) 鸽细环临床病料中病毒 DNA 的提取 ;

[0016] 3) PCR 扩增 :PCR 反应体系为 25 μ L 体系,反应体系中含 PCR pre-mix12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L,病毒 DNA2 μ L, H₂O8.5 μ L,瞬时离心混匀,PCR 工作程序为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5min ;94 $^{\circ}$ C 变性 45s,58 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40s,40 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min 得到扩增序列如 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列 ;

[0017] 4) PCR 扩增产物分析 ;

[0018] 5) PCR 扩增产物基因测序得到鸽细环病毒的核苷酸序列。

[0019] 所述的鸽细环病毒的检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤 :

[0020] 1) 样品处理 :可疑病料的内脏组织进行无菌研钵,加生理盐水研磨,反复冻溶 2-3 次后 5000rpm 离心 5min,取上清 ;

[0021] 2) 病毒 DNA 提取 ;

[0022] 3) PCR 扩增 :PCR 反应体系为 25 μ L 体系,反应体系中含 PCR pre-mix12.5 μ L,上下游 Primer 各 1 μ L,上述病毒 DNA2 μ L, H₂O8.5 μ L,瞬时离心混匀 ;PCR 工作程序为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5min ;94 $^{\circ}$ C 变性 45s,58 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40s,40 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min,

[0023] 4) PCR 扩增产物分析。

[0024] 采用上述试剂盒的检测方法,具体步骤如下 :

[0025] (1) 样品处理 :取实验动物的内脏可疑病料组织于无菌研钵,加生理盐水研磨,反复冻融后离心,取上清 450 μ L ;

[0026] (2)DNA 提取 :在上清 450 μ L 中加入蛋白酶 K 至终浓度 500 μ g/mL,加入 SDS 至终浓度 10g/L,55 $^{\circ}$ C 水浴 30-50min,用苯酚、苯酚 - 氯仿 (体积比 1 : 1) 混合液及氯仿各抽提 1 次,吸取水相,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2) 及 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀,12000r/min4 $^{\circ}$ C 离心 15-20min,沉淀悬浮于超纯水中得到 DNA 提取液 ;

[0027] (3) PCR 扩增 :在 PCR 试剂管内加入 1-2 μ L DNA 提取液,预混剂 A23-24 μ L,瞬时离心混匀,置 PCR 仪内进行扩增,94 $^{\circ}$ C 预变性 5min ;94 $^{\circ}$ C 变性 45s,58 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40s,40 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min,同时设立阴性和阳性对照。

[0028] (4)PCR 扩增产物分析 :取 5-10 μ L PCR 扩增产物加于 1-1.5% 琼脂糖凝胶孔中,放于电压为 100 ~ 130V 的电泳槽里电泳 45min,于紫外投射仪中观察结果。如果扩增出一条约 500bp 的片段,则表明待检组织鸽细环病毒阳性,如果没有扩增出 500bp 的片段,则表明待检组织鸽细环病毒阴性。

[0029] 有益效果 :与现有技术相比,本发明的优点如下 :本发明获得的一种应用于检测鸽细环病毒的引物对,在特异引物对的基础上,优化了 PCR 条件,扩增出了鸽细环病毒的核苷酸序列,并优化了检测条件和检测体系制备了检测该病毒的试剂盒。该试剂盒具有较高的特异性和稳定性,灵敏度达 5pg,可以快速准确检测鸽细环病毒。因此该试剂盒可以作为

快速检测鸽细环病毒的有效工具。

附图说明

[0030] 图 1 :PCR 方法特异性实验的电泳图。

[0031] 图 2 :PCR 方法敏感性实验的电泳图。

具体实施方式

[0032] 实施例 1 :试剂盒的制备。

[0033] 1、病毒及病料的来源和处理

[0034] 鸽细环临床病料于 2009 年 10 月采自江苏丹阳、安徽等地病鸽内脏器官。取 0.5-2.0g 内脏组织于无菌研钵,加生理盐水研磨,反复冻溶 2-3 次后 5000rpm 离心 5min,取上清于 -20℃ 保存。鸽圆环阳性病料,鸡贫血阳性病料,猪圆环阳性病料由实验室保存。

[0035] 2、试剂

[0036] PCR pre-mix、蛋白酶 K 购自大连 Takara 公司 ;DNA Marker、GoldView 购自南京上高生物公司 ;引物由上海英俊合成。其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

[0037] 1、引物的设计与合成

[0038] 根据 GenBank 中 TTV 的全基因序列,使用引物设计软件 Primer5.0 设计一对检测引物。

[0039] TTV 引物为 :pTTV1 (5' -GATACCCAGCTTCCACTTTGC-3') ;

[0040] pTTV2 (5' -GTGTTATTGCTGTCGGGTCGT-3'),预期扩增片段大小约为 512bp。

[0041] 2、阳性对照 :即含有鸽细环病毒的 DNA 片段

[0042] 3、阴性对照 :非鸽细环病毒的 DNA 片段

[0043] 实施例 2 :检测方法

[0044] 按照以下步骤进行检测 :

[0045] (1)样品处理 :取鸽细环临床病料于 2009 年 10 月采自江苏丹阳、安徽等地病鸽内脏器官,取 0.5-2.0g 内脏组织于无菌研钵,加生理盐水研磨,反复冻溶 2-3 次后 5000rpm 离心 5min,取上清于 -20℃ 保存。鸽圆环阳性病料,鸡贫血阳性病料,猪圆环阳性病料由实验室保存。

[0046] (2)病毒 DNA 的提取 :将可疑病料组织悬浮液冻融 3 次,离心取上清 450 μ L,加入蛋白酶 K 至终浓度 500 μ g/mL,加入 SDS 至终浓度 10g/L,55℃ 水浴 30min,用苯酚、苯酚-氯仿 (体积比 1 : 1) 混合液及氯仿各抽提 1 次,吸取水相,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2) 及 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀,12000r/min 4℃ 离心 15min,沉淀悬浮于超纯水中,-20℃ 保存备用。

[0047] (3)PCR 扩增 :PCR 反应体系为 25 μ L 体系,反应体系中含 PCR pre-mix 12.5 μ L,上下游 Primer 各 1 μ L, DNA 2 μ L, H₂O 8.5 μ L,瞬时离心混匀。PCR 工作程序为 :94℃ 预变性 5min ;94℃ 变性 45s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s,40 个循环 ;72℃ 再延伸 10min,4℃ 保存。

[0048] (4)PCR 扩增产物分析 :结束后取 8 μ L PCR 扩增产物加于 1% 琼脂糖凝胶孔中放于电压为 100 ~ 130V 的电泳槽里电泳 45min,于紫外投射仪中观察结果。

[0049] 从图 1 可以看出 :只有鸽细环病毒扩增出了一条约 500bp 的片段,鸽圆环阳性病

料,鸡贫血阳性病料,猪圆环阳性病料均未扩增出片段。

[0050] 实施例 3 :特异性实验

[0051] 用与实施例 2 相同的方法提取鸽细环阳性病料、鸽圆环阳性病料、鸡贫血阳性病料,猪圆环阳性病料的 DNA,并以此为模板,用设计的引物进行 PCR 扩增。用 1% 的琼脂糖进行凝胶电泳,只有鸽细环病毒扩增出一条约 500bp 的片段(见图 1),将鸽细环阳性病料的 PCR 产物进行基因测序,与 GenBank 中已发表的序列进行比较,结果与已发表的人细环和猪细环基因序列达 55-75% 的同源性,考虑到鸽细环病毒不同物种间的高度差质性,可表明所扩增的片段为鸽细环病毒,而鸽圆环病毒病料、鸡贫血病毒病料、猪圆环病毒病料和鸽腺病毒病料均未扩增出条带来,这表明该方法所扩增的片段为鸽细环病毒的特异性片段。

[0052] 实施例 4 :敏感性实验

[0053] 以鸽细环病料提取的 DNA 为模板,从 500ngDNA 开始按 10 倍递减稀释总共有 6 个浓度,其浓度分别为 500ng、50ng、5ng、500pg、50pg、5pg,同时设置一个阴性对照。用鸽细环 PCR 反应程序进行扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,见图 2,其中第 1 泳道为 Maker5000,第 2 至第 8 泳道分别表示模板浓度为 5pg、50pg、500pg、5ng、50ng、500ng 的实验结果,结果表明 PCR 方法可检测出 5pg 的模板 DNA,具有较高的敏感性。

[0054] 实施例 5 :稳定性实验

[0055] 将试剂保存于 -20℃,经过一年的保存和反复冻融后,对鸽细环病毒的模板重新进行检测,结果表明,该试剂盒的稳定性较好,可以长期保存。

[0056] 实施例 6 :临床病料检测

[0057] 使用实施例 2 的方法对来自于六个不同省份的鸽场,总计 144 份临床病料进行检测。144 份鸽子血清所提的 DNA 中,其中有 67 份检测为阳性,总感染率为 46.5%,说明鸽细环病毒在我国鸽群中普遍存在。

[0058] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001]

核苷酸或氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 金陵科技学院

<120>一种用于检测鸽细环病毒的引物对及其应用

<130> 20130415

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211>

<212> DNA

<213> 鸽细环病毒

<221> gene

<222> (1).. (512)

<400> 1

```

gataaccagc tttccacttt gcttcacgcc tagaaaagag agaaacgacc aaacttagct      60
agagccacac agcacagctt cctgctccca ccacgcacag acccacttgc ttccggcget      120
cggctcgcct ectcctcgtt ctctttcgtg ccaagttgtc cctctgeatc tgaaccaag      180
gtattcaaca agttacceag gagctcatca acagcttgac cattccacrg gtctgettct      240
tattcaggaa tcccacaaca aggtctaatt gactcccaca gaccactggg gaacggaetg      300
tccgctcccc tgcaccagge tactcctgct cagatgaccg cacaacctet gcctacgcag      360
gataacatgt ccacagatca atcgtggact cctaaactca gtcgccegc tctaactct      420
acacctccgg gcagagcage tccgagccaa acgcgcacgt gcttagacag atgetccaca      480
caacattata gacgaccga cagcaataac ac                                          512

```

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

[0002]

核苷酸或氨基酸序列表

<220>

<223> 上游引物 P1

<400> 2

gatacccagctttccactttgc

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 下游引物 P2

<400> 3

gtgttattgctgtcgggtcgt

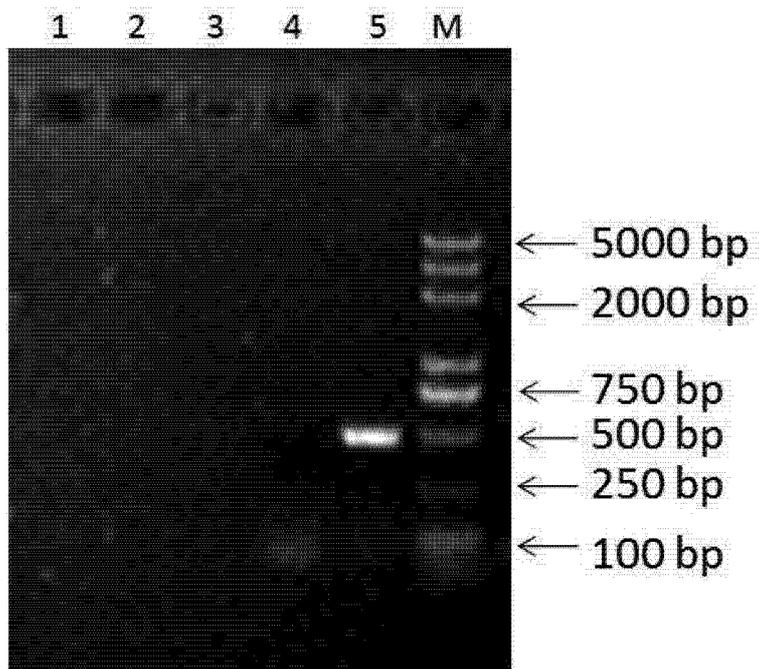


图 1

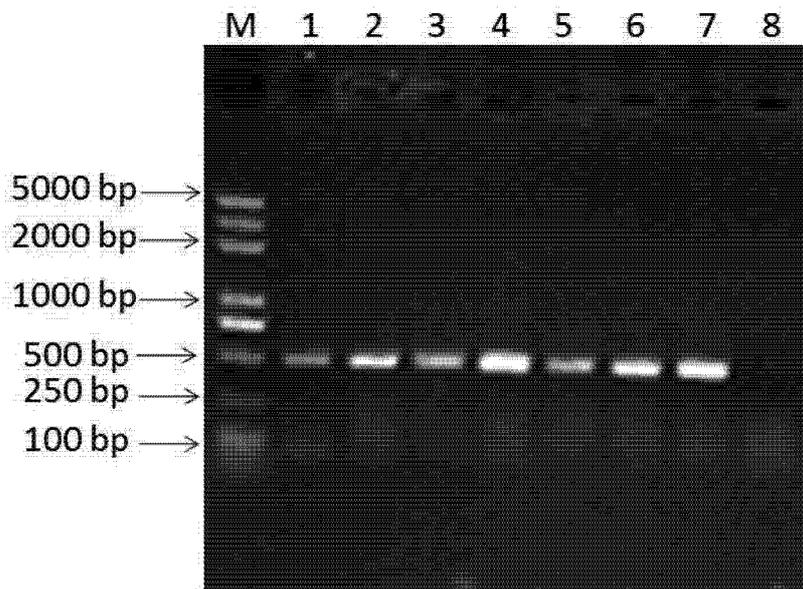


图 2