



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106987657 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201710264432.7

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2017.04.21

C12R 1/93(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106987657 A

(56)对比文件

CN 106191310 A,2016.12.07,

CN 105671201 A,2016.06.15,

US 2016215354 A1,2016.07.28,

(43)申请公布日 2017.07.28

Hiroka Aonuma et al..“A single

(73)专利权人 广西壮族自治区兽医研究所

地址 530001 广西壮族自治区南宁市友爱

北路51号广西兽医研究所

fluorescence-based LAMP reaction for

identifying multiple parasites in

mosquitoes”.《Experimental Parasitology》

.2010,第125卷

(72)发明人 谢芝勋 范晴 谢志勤 谢丽基

黄莉 黄娇玲 张艳芳 曾婷婷

王盛 罗思思 邓显文 刘加波

庞耀珊

商云鹏.“牛病毒性腹泻病毒RT-LAMP检测方法的建立及初步应用”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2013,(第S2期),

范晴等.“牛轮状病毒RT-LAMP快速检测方法的建立”.《畜牧与兽医》.2010,第42卷(第12期),

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

审查员 卢文倩

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表3页 附图3页

(54)发明名称

用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用。本发明提供的引物组合由序列表的序列1-8所示的单链DNA分子组成,在序列3所示的单链DNA分子的5'端连接有荧光基团A,在序列7所示的单链DNA分子的5'端连接有荧光基团B。本发明首次在LAMP方法中引入了荧光基团,建立了鉴定BVDV和BRV的二重荧光RT-LAMP方法,通过扩增产物颜色观察可同时鉴别诊断两种病毒。本发明建立的二重RT-LAMP方法特异性好,能高效扩增目的基因,而对其它病原核酸无扩增,敏感性好,最低能检测到100个混合模板拷贝/反应,是一种简便,快速,低成本的诊断方法,适用于大规模的流行病学调查。

1. 引物组合,由引物组I和引物组II组成;  
所述引物组I由引物BVDV-F3、引物BVDV-B3、引物BVDV-FIP和引物BVDV-BIP组成;  
所述引物BVDV-F3为序列表的序列1所示的单链DNA分子;  
所述引物BVDV-B3为序列表的序列2所示的单链DNA分子;  
所述引物BVDV-FIP为序列表的序列3所示的单链DNA分子;  
所述引物BVDV-BIP为序列表的序列4所示的单链DNA分子;  
所述引物组II由引物BRV-F3、引物BRV-B3、引物BRV-FIP和引物BRV-BIP组成;  
所述引物BRV-F3为序列表的序列5所示的单链DNA分子;  
所述引物BRV-B3为序列表的序列6所示的单链DNA分子;  
所述引物BRV-FIP为序列表的序列7所示的单链DNA分子;  
所述引物BRV-BIP为序列表的序列8所示的单链DNA分子。
2. 如权利要求1所述的引物组合,其特征在于:所述引物BVDV-FIP的5'端连接有荧光基团A;所述引物BRV-FIP的5'端连接有荧光基团B。
3. 如权利要求2所述的引物组合,其特征在于:所述荧光基团A为FITC,所述荧光基团B为CY5.5。
4. 权利要求1-3任一所述的引物组合的应用,为如下(c1)至(c6)中的任一种:
  - (c1) 鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒;
  - (c2) 制备用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的试剂盒;
  - (c3) 检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒;
  - (c4) 制备用于检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒的试剂盒;
  - (c5) 检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒;
  - (c6) 制备用于检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒的试剂盒;所述应用为在非疾病诊断和治疗中的应用。
5. 含有权利要求1-3任一所述的引物组合的试剂盒;所述试剂盒的用途为如下(d1)-(d3)中的至少一种:
  - (d1) 鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒;
  - (d2) 检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒;
  - (d3) 检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒。
6. 权利要求5所述试剂盒的制备方法,包括将各条引物单独包装的步骤。
7. 一种鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的方法,包括如下步骤:提取待测病毒的核酸;以所述核酸为模板,采用权利要求1所述引物组合进行二重荧光RT-LAMP,然后进行如下判断:如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物、待测病毒为牛病毒腹泻病毒,如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测病毒为牛轮状病毒;所述方法为非疾病诊断和治疗的方法。
8. 一种检测病毒是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒的方法,包括如下步骤:提取待测病原微生物的核酸;以所述核酸为模板,采用权利要求1所述引物组合进行二重荧光RT-LAMP,然后进行如下判断:如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物、待测病原微生物为牛病毒腹泻病毒,如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测病原微生物为牛轮状病毒,如果不能检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物且不能检

测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物,待测病原微生物为非牛病毒腹泻病毒且非牛轮状病毒;所述方法为非疾病诊断和治疗的方法。

## 用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用。

### 背景技术

[0002] 牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea disease virus, BVDV) 和牛轮状病毒 (Bovine Rotavirus, BRV) 是两种常见牛腹泻病毒, 症状相似, 难以区分。BVDV临床上常出现发热、腹泻、黏膜损伤和趾部损伤, 但大多数感染BVDV的牛以持续性感染不表现临床症状存在, 持续感染的牛一旦再次接触抗原相似性抗原便会继发为黏膜病, 死亡率100%。持续性感染的牛可通过血液、排泄物等多种途径水平传播病毒, 还可通过生殖道垂直传播, 它们终身带毒, 持续排毒, 成为重要传染源, 是养牛业潜在的危害。牛轮状病毒感染1-7日龄的犊牛, 可引起犊牛消化道机能紊乱, 临床上以呕吐、腹泻、脱水和酸碱平衡为特征。两种病毒感染后都会引起严重的经济损失, 因此急需建立牛病毒性腹泻和牛轮状病毒的快速检测技术, 为我国BVDV和BRV的防控提供技术支持。

[0003] 目前常用的BVDV和BRV的诊断方法主要有: 病原分离, 血清学方法和分子生物学方法 (RT-PCR和荧光RT-PCR)。环介导的体外等温扩增检测技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 在PCR方法上发展起来的新兴核酸检测技术, 突破了恒温扩增的技术难点, 6条引物同效率扩增, 敏感性高, 特异性好, 已在多种疾病的检测上得到应用。多重LAMP是一种高效的LAMP形式, 一次LAMP反应, 可同时检测、鉴别多种病原体。但目前国内的多重LAMP方法都有一定的局限性, 不能确定具体到底是哪一种病原引起的阳性结果, 不能实现真正意义上的鉴别诊断。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用。

[0005] 本发明首先保护引物组合, 由引物组I和引物组II组成;

[0006] 所述引物组I由引物BVDV-F3、引物BVDV-B3、引物BVDV-FIP和引物BVDV-BIP组成;

[0007] 所述引物BVDV-F3为如下 (a1) 或 (a2):

[0008] (a1) 序列表的序列1所示的单链DNA分子;

[0009] (a2) 将序列1经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列1具有相同功能的DNA分子;

[0010] 所述引物BVDV-B3为如下 (a3) 或 (a4):

[0011] (a3) 序列表的序列2所示的单链DNA分子;

[0012] (a4) 将序列2经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列2具有相同功能的DNA分子;

[0013] 所述引物BVDV-FIP为如下 (a5) 或 (a6):

[0014] (a5) 序列表的序列3所示的单链DNA分子;

- [0015] (a6) 将序列3经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列3具有相同功能的DNA分子；
- [0016] 所述引物BVDV-BIP为如下 (a7) 或 (a8)：
- [0017] (a7) 序列表的序列4所示的单链DNA分子；
- [0018] (a8) 将序列4经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列4具有相同功能的DNA分子；
- [0019] 所述引物组II由引物BRV-F3、引物BRV-B3、引物BRV-FIP和引物BRV-BIP组成；
- [0020] 所述引物BRV-F3为如下 (b1) 或 (b2)：
- [0021] (b1) 序列表的序列5所示的单链DNA分子；
- [0022] (b2) 将序列5经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列5具有相同功能的DNA分子；
- [0023] 所述引物BRV-B3为如下 (b3) 或 (b4)：
- [0024] (b3) 序列表的序列6所示的单链DNA分子；
- [0025] (b4) 将序列6经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列6具有相同功能的DNA分子；
- [0026] 所述引物BRV-FIP为如下 (b5) 或 (b6)：
- [0027] (b5) 序列表的序列7所示的单链DNA分子；
- [0028] (b6) 将序列7经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列7具有相同功能的DNA分子；
- [0029] 所述引物BRV-BIP为如下 (b7) 或 (b8)：
- [0030] (b7) 序列表的序列8所示的单链DNA分子；
- [0031] (b8) 将序列8经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列8具有相同功能的DNA分子。
- [0032] 所述引物BVDV-FIP的5' 端连接有荧光基团A。
- [0033] 所述引物BRV-FIP的5' 端连接有荧光基团B。
- [0034] 所述荧光基团A可为FITC。
- [0035] 所述荧光基团B可为CY5.5。
- [0036] 所述引物组合的用途为如下 (c1) 至 (c6) 中的任一种：
- [0037] (c1) 鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒；
- [0038] (c2) 制备用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的试剂盒；
- [0039] (b3) 检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒；
- [0040] (c4) 制备用于检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒的试剂盒；
- [0041] (c5) 检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒；
- [0042] (c6) 制备用于检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒的试剂盒。
- [0043] 本发明还保护所述引物组合的应用,为如下 (c1) 至 (c6) 中的任一种：
- [0044] (c1) 鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒；
- [0045] (c2) 制备用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的试剂盒；

- [0046] (b3) 检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒；
- [0047] (c4) 制备用于检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒的试剂盒；
- [0048] (c5) 检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒；
- [0049] (c6) 制备用于检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒的试剂盒。
- [0050] 本发明还保护含有所述引物组合的试剂盒；所述试剂盒的用途为如下(d1)-(d3)中的至少一种：
- [0051] (d1) 鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒；
- [0052] (d2) 检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒；
- [0053] (d3) 检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒。
- [0054] 本发明还保护所述试剂盒的制备方法，包括将各条引物单独包装的步骤。
- [0055] 本发明还保护一种鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的方法，包括如下步骤：提取待测病毒的核酸；以所述核酸为模板，采用所述引物组合进行二重荧光RT-LAMP，然后进行如下判断：如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物、待测病毒为牛病毒腹泻病毒，如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测病毒为牛轮状病毒。
- [0056] 所述方法中，当所述荧光基团A为FITC时，所述荧光基团B为CY5.5时，如果所述扩增产物可以在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段、待测病毒为牛病毒腹泻病毒，如果所述扩增产物可以在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测病毒为牛轮状病毒。
- [0057] 所述方法中，所述待测病毒为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒。
- [0058] 本发明还保护一种检测待测病原微生物是否为牛病毒腹泻病毒或牛轮状病毒的方法，包括如下步骤：提取待测病原微生物的核酸；以所述核酸为模板，采用所述引物组合进行二重荧光RT-LAMP，然后进行如下判断：如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物、待测病原微生物为牛病毒腹泻病毒，如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测病原微生物为牛轮状病毒，如果不能检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物且不能检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物，待测病原微生物为非牛病毒腹泻病毒且非牛轮状病毒。
- [0059] 所述方法中，当所述荧光基团A为FITC时，所述荧光基团B为CY5.5时，如果所述扩增产物可以在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段、待测病原微生物为牛病毒腹泻病毒，如果所述扩增产物可以在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测病原微生物为牛轮状病毒，如果所述扩增产物无法在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段且无法在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测病原微生物为非牛病毒腹泻病毒且非牛轮状病毒。
- [0060] 所述方法中，所述待测病原微生物为牛支原体、牛病毒性腹泻病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、蓝舌病病毒、牛轮状病毒或小反刍兽疫病毒。
- [0061] 所述牛支原体具体可为牛支原体GL-1株。
- [0062] 所述牛病毒性腹泻病毒具体可为牛病毒性腹泻病毒Oregon株或牛病毒性腹泻病毒GX-041株(BVDV-2型)。
- [0063] 所述口蹄疫病毒具体可为口蹄疫病毒A型。

[0064] 所述水泡性口炎病毒具体可为水泡性口炎病毒NJ型或水泡性口炎病毒IND型。

[0065] 所述蓝舌病病毒具体可为蓝舌病病毒血清4型。

[0066] 所述牛轮状病毒具体可为牛轮状病毒NCDV株。

[0067] 所述小反刍兽疫病毒具体可为小反刍兽疫病毒Nigeria75/1株。

[0068] 本发明还保护一种检测待测样本中是否含有牛病毒腹泻病毒和/或牛轮状病毒的方法,包括如下步骤:提取待测样本的核酸;以所述核酸为模板,采用所述引物组合进行二重荧光RT-LAMP,然后进行如下判断:如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物、待测样本中含有牛病毒腹泻病毒,如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测样本中含有牛轮状病毒,如果能够检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物且如果能够检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测样本中含有牛病毒腹泻病毒且含有牛轮状病毒,如果不能检测到具有荧光基团A对应的荧光的扩增产物且不能检测到具有荧光基团B对应的荧光的扩增产物、待测样本中不含有牛病毒腹泻病毒且不含有牛轮状病毒。

[0069] 所述方法中,当所述荧光基团A为FITC时,所述荧光基团B为CY5.5时,如果所述扩增产物可以在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段、待测样本中含有牛病毒腹泻病毒,如果所述扩增产物可以在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测样本中含有牛轮状病毒,如果所述扩增产物可以在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段并且可以在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测样本中含有牛病毒腹泻病毒且含有牛轮状病毒,如果所述扩增产物无法在520nm的紫外光下观察到绿色的DNA片段并且无法在670nm的紫外光下观察到红色的DNA片段、待测样本中不含有牛病毒腹泻病毒且不含有牛轮状病毒。

[0070] 所述方法中,所述待测样本为离体的动物组织,例如牛肉、牛肉加工制成的食品、牛内脏,牛内脏加工制成的食品等等。

[0071] 以上任一所述核酸为DNA、RNA、或DNA和RNA的混合物。

[0072] 以上任一所述提取待测样本的核酸或待测病毒的核酸为使用RNA/DNA共提试剂盒提取得到的核酸。

[0073] 以上任一所述二重荧光RT-LAMP的初始反应体系为(25 $\mu$ L):模板1 $\mu$ L、10 $\times$ buffer 2.5 $\mu$ L、Bst DNA聚合酶15U、AMV逆转录酶20U、引物BVDV-FIP-2 40pmol、引物BVDV-BIP 40pmol、引物BRV-FIP-2 40pmol、引物BRV-BIP 40pmol、引物BVDV-F3 5pmol、引物BVDV-B3 5pmol、引物BRV-F3 5pmol、引物BRV-B3 5pmol,余量为水。

[0074] 所述10 $\times$ buffer的成分为:Tris-HCl (pH 8.8) 200mM、KCl 100mM、MgSO<sub>4</sub> 80mM、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100mM、1% (体积百分比) Tween 20、甜菜碱8M、dNTPs 14M。

[0075] 以上任一所述二重荧光RT-LAMP的反应程序为:42 $^{\circ}$ C 20min,62 $^{\circ}$ C 90min,80 $^{\circ}$ C 5min。

[0076] 本发明首次在LAMP方法中引入了荧光基团,建立了鉴定BVDV和BRV的二重荧光RT-LAMP方法,通过扩增产物颜色观察可同时鉴别诊断两种病毒。本发明建立的二重RT-LAMP方法特异性好,能高效扩增目的基因,而对其它病原核酸无扩增,敏感性好,最低能检测到100个混合模板拷贝/反应,是一种简便,快速,低成本的诊断方法,适用于大规模的流行病学调查。

## 附图说明

- [0077] 图1为引物组I和引物组II示意图。  
 [0078] 图2为实施例3的结果。  
 [0079] 图3为实施例5的电泳结果。  
 [0080] 图4为实施例5的浊度检测结果。  
 [0081] 图5为实施例6的结果。

## 具体实施方式

[0082] 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。

[0083] 实施例中用到的各个毒株见表1。

[0084] 表1

	牛支原体 GL-1 株	记载于如下文献: 马春霞等; 牛呼吸道疾病综合征病例的病原分析; 中国畜牧兽医; 2015, 42 (9): 2481-2486
	牛病毒性腹泻病毒 Oregon 株	中国兽药监察所, AV69
[0085]	牛病毒性腹泻病毒 GX-041 株 (BVDV-2 型)	记载于如下文献: Fan Q, Xie Z, Xie L, et al. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of bovine viral diarrhea virus[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 186(1-2):43-48.
	牛轮状病毒 NCDV 株	中国兽医药品监察所, AV51
	口蹄疫病毒 A 型 (FMDV A 型灭活病毒)	
	水泡性口炎病毒 NJ 型 (VSV NJ 型灭活病毒)	
	水泡性口炎病毒 IND 型 (VSV IND 型灭活病毒)	
	蓝舌病病毒血清 4 型 (BTV 4 型灭活病毒)	
	小反刍兽疫病毒 Nigeria75/1 株 (PPRV 疫苗)	
	牛传染性鼻气管炎病毒	中国兽医微生物菌种保藏管理中心, AV21。

[0086] 10×buffer:SIGMA公司。成分为:Tris-HCl (pH8.8) 200mM、KCl 100mM、MgSO<sub>4</sub> 80mM、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100mM、1% (体积百分比) Tween 20、甜菜碱8M、dNTPs 14M。

[0087] Bst DNA聚合酶:new England。

[0088] AMV逆转录酶:Takara。

[0089] pEASY-T1载体:全世金生化科技(北京)有限公司。

- [0090] 牛肾细胞(MDBK):中国兽医药品监察所。
- [0091] 实施例1、引物组合的设计和制备
- [0092] 进行大量序列分析、比对获得了用于鉴别牛病毒腹泻病毒(BVDV)和牛轮状病毒(BRV)的若干引物。将各个引物进行预实验,比较灵敏度、特异性等性能,最终得到用于鉴别BVDV和BRV的2套引物组。每套引物组由外引物F3、外引物B3、内引物FIP(F1c+F2)和内引物BIP(B1c+B2)组成。
- [0093] 用于鉴定BVDV的引物组由如下四条引物组成(5'→3'):
- [0094] BVDV-F3(序列表的序列1):TGCCCTTAGTAGGACTAGCA;
- [0095] BVDV-B3(序列表的序列2):AGCACCTATCAGGCTGTA;
- [0096] BVDV-FIP(序列表的序列3):CGAACCACTGACGACTACCCTGGGTAGCAACAGTGGTGAGTT;
- [0097] BVDV-BIP(序列表的序列4):CAAGCCTCGAGATGCCACGTCCGTTTTTCACTGAACGACC;
- [0098] 在引物BVDV-FIP的5'端连接荧光基团FITC。
- [0099] 用于鉴定BRV的引物组由如下四条引物组成(5'→3'):
- [0100] BRV-F3(序列表的序列5):ACTCATGTGCAATAAACGC;
- [0101] BRV-B3(序列表的序列6):GTTTAGTAGAACTCTATTTCAACG;
- [0102] BRV-FIP(序列表的序列7):TCTTTCTGCATCTGGTAAAAGAGTTTAATACGCAACAATTTGAGCA;
- [0103] BRV-BIP(序列表的序列8):CCAAGAGTGATTAATTCAGCTGACGGGTCTAAGAATCACTGGATTG;
- [0104] 在引物BRV-FIP的5'端连接荧光基团CY5.5。
- [0105] 用于鉴定BVDV的引物组命名为引物组I,示意图如图1A所示。
- [0106] 用于鉴定BVDV的引物组命名为引物组II,示意图如图1B所示。
- [0107] 上述各条引物组成引物组合。
- [0108] 实施例2、检测方法的建立
- [0109] 1、采用RNA/DNA共提试剂盒提取待测样本的核酸。
- [0110] 2、取步骤1得到的核酸作为模板,采用实施例1制备的引物组合进行二重荧光RT-LAMP。
- [0111] 初始反应体系为(25 $\mu$ L):模板1 $\mu$ L、10 $\times$ buffer 2.5 $\mu$ L、Bst DNA聚合酶15U、AMV逆转录酶20U、引物BVDV-FIP 40pmol、引物BVDV-BIP 40pmol、引物BRV-FIP 40pmol、引物BRV-BIP 40pmol、引物BVDV-F3 5pmol、引物BVDV-B3 5pmol、引物BRV-F3 5pmol、引物BRV-B3 5pmol,余量为水。
- [0112] 反应程序为:42 $^{\circ}$ C 20min,62 $^{\circ}$ C 90min,80 $^{\circ}$ C 5min。
- [0113] 3、取步骤2的产物,进行1%琼脂糖凝胶电泳,分别在波长为520nm和670nm的紫外灯下观察。
- [0114] 实施例3、特异性实验
- [0115] 待测样本为:表1中的牛病毒性腹泻病毒Oregon株、牛病毒性腹泻病毒GX-041株(BVDV-2型)、牛轮状病毒NCDV株、牛病毒性腹泻病毒Oregon株和牛轮状病毒NCDV株的混合物(混合物I)、口蹄疫病毒A型、水泡性口炎病毒NJ型、水泡性口炎病毒IND型、蓝舌病病毒血清4型、小反刍兽疫病毒Nigeria75/1株、牛传染性鼻气管炎病毒和牛支原体GL-1株。

[0116] 按照实施例2建立的方法进行检测。

[0117] 设置用ddH<sub>2</sub>O作为模板作为待测样本的空白对照。

[0118] 设置用牛肾细胞(MDBK)的核酸作为待测样本的阴性对照。

[0119] 结果如图2所示。图2A为520nm通道的电泳图,条带为黄绿色。图2B为670nm通道的电泳结果,条带为大红色。图2C为520nm和670nm双通道的电泳结果,条带为红绿混合色。泳道1对应牛病毒性腹泻病毒Oregon株,泳道2对应牛病毒性腹泻病毒GX-041株(BVDV-2型),泳道3对应牛轮状病毒NCDV株,泳道4对应牛病毒性腹泻病毒Oregon株和牛轮状病毒NCDV株的混合物(混合物I),泳道5对应口蹄疫病毒A型,泳道6对应水泡性口炎病毒NJ型,泳道7对应水泡性口炎病毒IND型,泳道8对应蓝舌病病毒血清4型,泳道9对应小反刍兽疫病毒Nigeria75/1株,泳道10对应牛传染性鼻气管炎病毒,泳道11对应牛支原体GL-1株,泳道12对应空白对照,泳道13对应阴性对照。

[0120] 结果表明,采用实施例2建立的方法只扩增BVDV和BRV核酸,以及BVDV和BRV混合模板。BVDV阳性呈黄绿色,仅在520通道下能看到;BRV阳性呈红色,仅在670通道下能看到;BVDV和BRV混合模板呈红绿混合色,且在520和670通道下都能观察到。而对其它牛病毒和阴性对照均无扩增,特异性好。

[0121] 实施例4、标准品制备

[0122] BVDV标准品:将序列表的序列9所示的双链DNA分子与pEASY-T1载体连接,得到重组质粒,参照T7体外转录试剂盒(Fermentas)说明书将重组质粒酶切线性化,用DNA酶消除其中DNA的污染,体外转录为RNA,测定RNA浓度,根据阿弗加德罗常数将浓度转换为拷贝数,得到BVDV标准品。

[0123] BRV标准品:将序列表的序列10所示的双链DNA分子与pEASY-T1载体连接,得到重组质粒,参照T7体外转录试剂盒(Fermentas)说明书将重组质粒酶切线性化,用DNA酶消除其中DNA的污染,体外转录为RNA,测定RNA浓度,根据阿弗加德罗常数将浓度转换为拷贝数,得到BRV标准品。

[0124] 实施例5、敏感性实验

[0125] 1、将实施4制备的BVDV标准品和BRV标准品等拷贝数混合,得到混合液。

[0126] 2、用ddH<sub>2</sub>O10倍梯度稀释步骤2得到的混合液,得到各个稀释液。

[0127] 3、将步骤2得到的稀释液作为模板,采用实施例2建立的方法进行检测。

[0128] 由于采用的稀释液的稀释度不同,形成如下不同的反应体系:

[0129] 反应体系1中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10<sup>6</sup>拷贝/μL;

[0130] 反应体系2中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10<sup>5</sup>拷贝/μL;

[0131] 反应体系3中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10<sup>4</sup>拷贝/μL;

[0132] 反应体系4中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10<sup>3</sup>拷贝/μL;

[0133] 反应体系5中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10<sup>2</sup>拷贝/μL;

[0134] 反应体系6中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为10拷贝/μL。

[0135] 反应体系7中,BVDV标准品和BRV标准品的初始浓度均为1拷贝/μL。

[0136] 设置用ddH<sub>2</sub>O作为模板作的空白对照。

[0137] 结果如图3所示。图3A为520nm通道的电泳图,条带为黄绿色。图3B为670nm通道的电泳结果,条带为大红色。图3C为520nm和670nm双通道的电泳结果,条带为红绿混合色。泳

道1-7依次对应反应体系1-7,泳道8对应空白对照。

[0138] 将反应产物使用实时浊度仪loopam LA-320C生成650nm下的实时浊度图,如图4所示。曲线1-7依次对应反应体系1-7,曲线8对应空白对照。

[0139] 上述结果表明,采用实施例2建立的方法检测BVDV和BRV混合模板标准品,当检测体系中模板浓度低至100拷贝/ $\mu\text{L}$ 时,也可以检测出BVDV和BRV,方法灵敏性高。

[0140] 实施例6、干扰性实验

[0141] 1、将实施4制备的BVDV标准品和BRV标准品等拷贝数混合,得到混合液。

[0142] 2、用ddH<sub>2</sub>O10倍梯度稀释步骤2得到的混合液,得到各个稀释液。

[0143] 3、将步骤2得到的稀释液作为模板,采用实施例2建立的方法进行检测。

[0144] 由于采用的稀释液的稀释度不同,形成如下不同的反应体系:

[0145] 反应体系1中,BVDV标准品的初始浓度均为 $10^5$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,BRV标准品的初始浓度均为 $10^2$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;

[0146] 反应体系2中,BVDV标准品的初始浓度均为 $10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,BRV标准品的初始浓度均为 $10^3$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;

[0147] 反应体系3中,BVDV标准品的初始浓度均为 $10^2$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,BRV标准品的初始浓度均为 $10^6$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;

[0148] 反应体系4中,BVDV标准品的初始浓度均为 $10^3$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ,BRV标准品的初始浓度均为 $10^6$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

[0149] 结果如图5所示。图5A为520nm通道的电泳图,条带为黄绿色。图5B为670nm通道的电泳结果,条带为大红色。图5C为520nm和670nm双通道的电泳结果,条带为红绿混合色。泳道1-4依次对应反应体系1-4。

[0150] 结果表明,对不同浓度混合标准品进行检测,当一个模板浓度高而另一个模板浓度较低时,二重荧光RT-LAMP仍然可同时检测到两个模板,不影响彼此扩增效率,干扰性小。

[0151] 实施例7、临床样品检测

[0152] 待测样本为:144份临床样本(腹泻牛的粪便棉拭子)。

[0153] 提取待测样本的核酸,按照实施例2的方法进行检测。同时将阳性扩增产物进行测序以验证结果的正确性。

[0154] 采用实施例2的方法进行检测,共检测出14份BVDV阳性样本和9份BRV阳性样本。将阳性样本进行测序,所有阳性结果均为真阳性,无非特异性扩增的假阳性。

- [0001] <110> 广西壮族自治区兽医研究所
- [0002] <120> 用于鉴别牛病毒腹泻病毒和牛轮状病毒的引物组合及其应用
- [0003] <160> 10
- [0004] <210> 1
- [0005] <211> 20
- [0006] <212> DNA
- [0007] <213> 人工序列
- [0008] <220>
- [0009] <223>
- [0010] <400> 1
- [0011] tgcccttagt aggactagca 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列
- [0016] <220>
- [0017] <223>
- [0018] <400> 2
- [0019] agcacctat caggctgta 19
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 42
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <220>
- [0025] <223>
- [0026] <400> 3
- [0027] cgaaccactg acgactaccc tgggtagcaa cagtggtagag tt 42
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 40
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223>
- [0034] <400> 4
- [0035] caagcctcga gatgccacgt ccgttttcac ctgaacgacc 40
- [0036] <210> 5
- [0037] <211> 19
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列  
[0040] <220>  
[0041] <223>  
[0042] <400> 5  
[0043] actcatgtgc aataaacgc 19  
[0044] <210> 6  
[0045] <211> 25  
[0046] <212> DNA  
[0047] <213> 人工序列  
[0048] <220>  
[0049] <223>  
[0050] <400> 6  
[0051] gtttagtaga aactctatatt caacg 25  
[0052] <210> 7  
[0053] <211> 46  
[0054] <212> DNA  
[0055] <213> 人工序列  
[0056] <220>  
[0057] <223>  
[0058] <400> 7  
[0059] tctttctgca tcttgtaaaa gagtttaata cgcaacaatt tgagca 46  
[0060] <210> 8  
[0061] <211> 46  
[0062] <212> DNA  
[0063] <213> 人工序列  
[0064] <220>  
[0065] <223>  
[0066] <400> 8  
[0067] ccaagagtga ttaattcagc tgacgggtct aagaatcact ggattg 46  
[0068] <210> 9  
[0069] <211> 228  
[0070] <212> DNA  
[0071] <213> 人工序列  
[0072] <220>  
[0073] <223>  
[0074] <400> 9  
[0075] tgcccttagt aggactagca aaacaaggag ggtagcaaca gtggtgagtt cgttgatgg 60  
[0076] ctgaagccct gactacaggg tagtcgtcag tggttcgacg ctttgtgcga caagcctcga 120  
[0077] gatgccacgt ggacgagggc atgcccacag cacatcttaa cctgagcggg ggtcgttcag 180

[0078] gtgaaaacgg tttaaccaac cgctacgaat acagcctgat aggggtgct 228  
[0079] <210> 10  
[0080] <211> 215  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> 人工序列  
[0083] <220>  
[0084] <223>  
[0085] <400> 10  
[0086] actcatgtgc aataaacgcg ccagctaata cgcaacaatt tgagcatatt gtacagcttc 60  
[0087] gaggggtggt gactacagct acaataactc ttttaccaga tgcagaaaga tttagttttc 120  
[0088] caagagtgat taattcagct gacggagcga ctacatggta cttcaatcca gtgattctta 180  
[0089] gaccaaataa cgttgaaata gagtttctac taaac 215

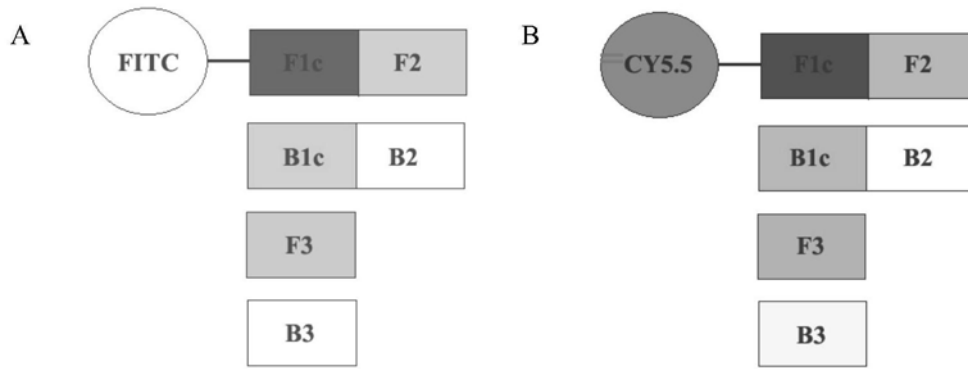


图1

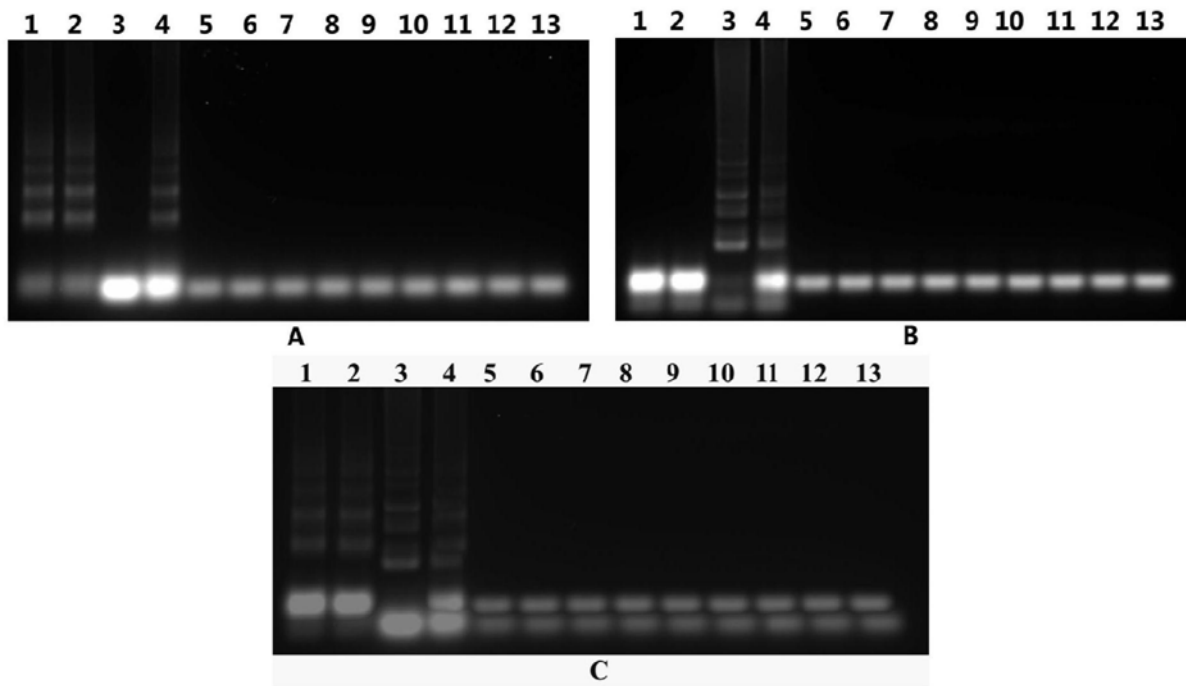


图2

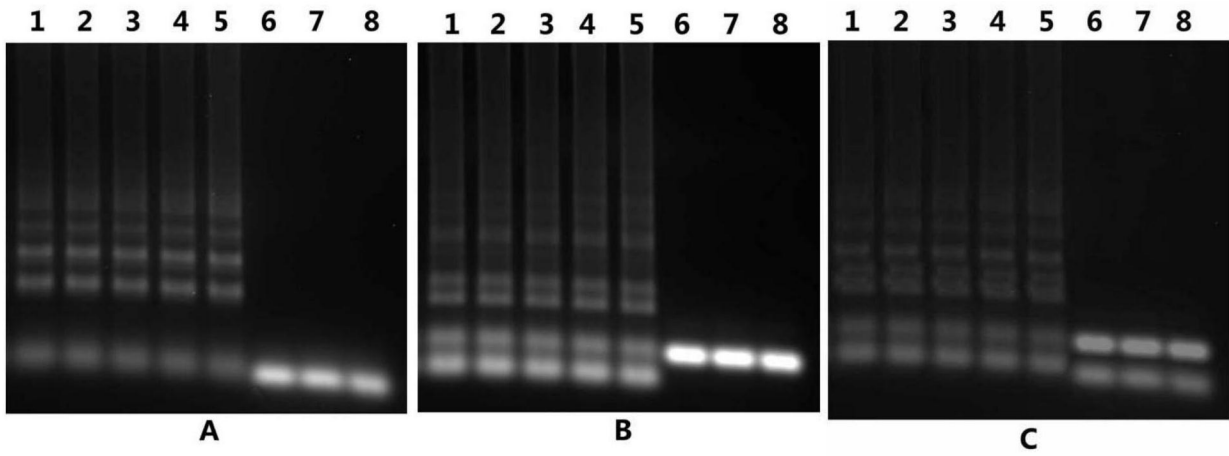


图3

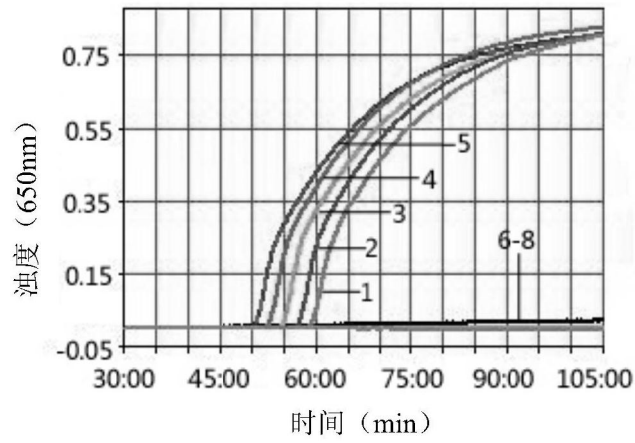


图4

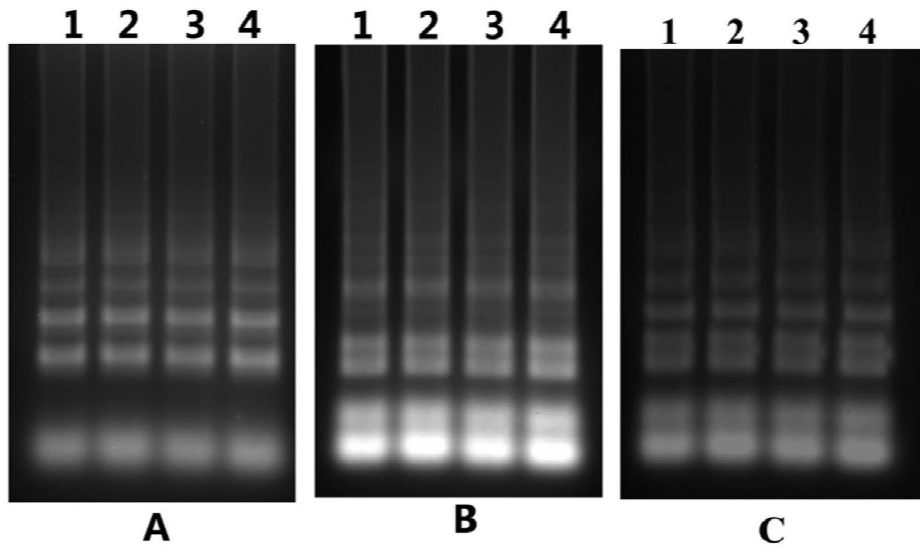


图5