



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103614495 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201310638192. 4

CN 101942525 A, 2011. 01. 12, 全文.

(22) 申请日 2013. 12. 02

徐昌平等. 双重荧光定量 RT-PCR 快速检测 A、B 型流感病毒的研究. 《中国卫生检验杂志》. 2007, 第 17 卷 (第 9 期), 第 38 段.

(73) 专利权人 上海之江生物科技股份有限公司
地址 201201 上海市浦东新区张江高科技园区瑞庆路 528 号 20 幢乙号 1 层、21 幢甲号 1 层

审查员 王超

(72) 发明人 朱旭平 朱勤玮 卢忠鹰 王凯
邵俊斌

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 许亦琳 余明伟

(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 102251061 A, 2011. 11. 23, 第 4 — 6 页.

权利要求书 2 页 说明书 7 页
序列表 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物检测技术领域, 具体涉及一种利用双重荧光 PCR 法对甲型和乙型流感病毒在单管联合进行检测的引物、探针及试剂盒。本发明的针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物及探针, 其核苷酸序列如 SEQIDNO:1-6 所示; 本发明的甲型和乙型流感病毒联合检测的双重 PCR 试剂盒, 包括甲乙型流感病毒检测混合液, 所述甲乙型流感病毒检测混合液中含有前述的引物和探针。利用本发明的试剂盒和引物探针能快速检测甲型和乙型流感病毒, 具有操作简便、灵敏度高、特异性好等优点; 可及时发现和确诊可疑病例, 提高对该类疾病的监测水平。

1. 一种针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物及探针,其特征在于,所述引物和探针的组成如下:

甲型流感病毒

IFVA 上游引物:5'-GCTCTCATGGAGTGGMTA-3'

IFVA 下游引物:5'-CGTGAACACAAAYCCYAA-3'

IFVA 探针:5'-荧光报告基团-ACAAGACCAATCCTGTACCTCTG-荧光淬灭基团-3' 乙型流感病毒

IFVB 上游引物:5'-GTTGGTTTGGTGGGAAAG-3'

IFVB 下游引物:5'-GATAAGGGYTCTGTGATGAA-3'

IFVB 探针:5'-荧光报告基团-TGACCTAGACTCTGCCTTGAATG-荧光淬灭基团-3'

其中,M = A/C, Y = T/C;

所述 IFVA 探针标记的荧光报告基团为 FAM 荧光基团, IFVB 探针标记的荧光报告基团为 VIC 荧光基团;所述荧光淬灭基团为 BHQ1。

2. 一种甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,包括甲乙型流感病毒检测混合液,所述甲乙型流感病毒检测混合液中含有权利要求 1 所述针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物及探针。

3. 如权利要求 2 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述甲乙型流感病毒检测混合液中还含有 RT-PCR MIX 和 H₂O。

4. 如权利要求 2 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述甲乙型流感病毒检测混合液的组成为:IFVA 上游引物 0.75 μl/test;IFVA 下游引物 0.75 μl/test;IFVA 探针 0.1 μl/test;IFVB 上游引物 0.75 μl/test;IFVB 下游引物 0.75 μl/test;IFVB 探针 0.1 μl/test;RT-PCR MIX 12.5 μl/test;双蒸水 3.3 μl/test。

5. 如权利要求 2 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述双重 PCR 检测试剂盒还包括 RT-PCR 酶、阴性对照品、阳性对照品中的至少一种。

6. 如权利要求 5 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述阳性对照品为含有 SEQ ID NO:7 所示 IFVA 目的扩增片段的质粒,和/或含有 SEQ ID NO:8 所示 IFVB 目的扩增片段的质粒。

7. 如权利要求 2 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述双重 PCR 试剂盒所采用的荧光 PCR 法的 PCR 检测体系如下:

甲乙型流感病毒检测混合液	19μl
RT-PCR 酶	1μl
待测品	5μl
反应总体积为 25μl。	

8. 如权利要求 7 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述待测品为样本核酸提取液、阳性对照品或阴性对照品。

9. 如权利要求 2 所述的甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的 PCR 扩增程序为:45℃ 10min;95℃ 15min;95℃ 15sec 和 60℃ 60sec 交替循环 45 次。

10. 权利要求1所述针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光PCR检测用引物及探针, 权利要求2-9任一权利要求所述甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒在制备甲型和/或乙型流感病毒检测试剂中的应用。

甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物、探针及试剂盒。

背景技术

[0002] 流感病毒属正粘病毒科,系 RNA 病毒。根据病毒膜蛋白和核蛋白的差异,可将流感病毒分为甲、乙、丙三型。甲、乙、丙不仅反映了病毒被发现先后顺序,也反映了对人类、动物的危害程度的大小。流感病毒特点是容易发生变异,其中甲型流感病毒最容易发生变异,可感染人和多种动物,为人类流感的主要病原,常引起大流行和中小流行。乙型流感病毒变异较少,能否感染人以外的其他动物至今不肯定,引起爆发或小流行。丙型较稳定,可感染人类,多为散发病例,目前已证实猪也可被感染。根据病毒表面血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的结构及其基因特性的不同,可分为不同亚型。甲型流感病毒可分为 15 个 H 亚型和 9 个 N 亚型,仅 3 个 H 亚型(H1、H2、H3)和 2 个 N 亚型(N1、N2)在人间传播。一些低等动物和禽鸟类是自然宿主。乙型流感病毒间同样有变异,但未划分成亚型转变。

[0003] 流感病毒主要依靠实验室进行确切诊断,传统的诊断方法主要包括血清学检测及病毒的分离和鉴定两个方面。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,分子生物学技术也已广泛应用于流感病毒的检测,其中又以实时荧光 PCR 技术在流感病毒分子诊断领域发展最快。荧光 RT-PCR 技术是上世纪九十年代末才发展起来的新技术,它具有快速、特异性、灵敏度高、成本相对低等优点,被广泛应用于临床检测的各个方面。但是由于流感型别较多,检测一份标本需要同时做多种型别流感的检测,既麻烦又浪费成本,加上单一型别的检测方法不能满足所有流感病毒检测的要求,因此建立单管多重荧光 PCR 同时检测甲、乙、丙型流感病毒的方法具有非常重要的意义

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种利用多重荧光 PCR 法对甲型和乙型流感病毒在单管联合检测的引物、探针、试剂盒及检测方法等,可用于临床可疑感染患者的病原学鉴别诊断。

[0005] 本发明首先公开了一种针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物及探针,所述引物和探针的组成如下:

[0006] 甲型流感病毒:

[0007] IFVA 上游引物:5'-GCTCTCATGGAGTGGMTA-3' (SEQ ID NO:1)

[0008] IFVA 下游引物:5'-CGTGAACACAAAYCCYAA-3' (SEQ ID NO:2)

[0009] IFVA 探针:5'-荧光报告基团-ACAAGACCAATCCTGTACCTCTG-荧光淬灭基团-3' (SEQ ID NO:3)

[0010] 乙型流感病毒

[0011] IFVB 上游引物:5'-GTTGGTTTGGTGGGAAAG-3' (SEQ ID NO:4)

- [0012] IFVB 下游引物 :5' -GATAAGGGYTCTGTGATGAA-3' (SEQ ID NO :5)
- [0013] IFVB 探针 :5' - 荧光报告基团 -TGACCTAGACTCTGCCTTGAATG- 荧光淬灭基团 -3' (SEQ ID NO :6);
- [0014] 其中, M=A/C, Y=T/C。
- [0015] 针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物具体包括两对引物及其各自对应的探针, 分别扩增甲型流感病毒和乙型流感病毒。
- [0016] 本发明探针的设计为现有技术, 探针一端标记有荧光报告基团, 探针另一端标记有荧光淬灭基团。优选的, 所述 IFVA 探针标记的荧光报告基团为 FAM 荧光基团, IFVB 探针标记的荧光报告基团为 VIC 荧光基团; 所述荧光淬灭基团为 BHQ1。
- [0017] 本发明第二方面公开了一种甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒, 包括甲乙型流感病毒检测混合液, 所述甲乙型流感病毒检测混合液中含有前述的引物和探针。
- [0018] 较优的, 所述甲乙型流感病毒检测混合液中还含有 RT-PCR MIX 和 H₂O。
- [0019] 最优的, 所述甲乙型流感病毒检测混合液的组成为: IFVA 上游引物 0.75 μ l/test; IFVA 下游引物 0.75 μ l/test; IFVA 探针 0.1 μ l/test; IFVB 上游引物 0.75 μ l/test; IFVB 下游引物 0.75 μ l/test; IFVB 探针 0.1 μ l/test; RT-PCR MIX 12.5 μ l/test; 双蒸水 3.3 μ l/test。
- [0020] 所述甲乙型流感病毒检测混合液的组成中, IFVA 上游引物、IFVA 下游引物、IFVB 上游引物, 和 IFVB 下游引物的浓度分别为 600nM/L, IFVA 探针和 IFVB 探针的浓度分别为 100nM/L。
- [0021] 较优的, 所述双重 PCR 检测试剂盒中还包括 RT-PCR 酶、阴性对照品 (DEPC-H₂O)、阳性对照品中的至少一种。
- [0022] 本发明所述阳性对照品为含有 SEQ ID NO :7 所示 IFVA 目的扩增片段的质粒, 和/或含有 SEQ ID NO :8 所示 IFVB 目的扩增片段的质粒。
- [0023] 并且, IFVA 目的扩增片段的序列为:
- [0024] 5' -GCTCTCATGGAGTGGATAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGGGTTTGTGTTACAG-3' (SEQ ID NO :7)
- [0025] IFVB 目的扩增片段的序列为:
- [0026] 5' -GTTGGTTTGGTGGGAAAGAATTTGACCTAGACTCTGCCTTGAATGGATAAAAAACAAAAGATGCTTAAGTATACAAAAAGCACTAATTGGTGCCTCTATATGCTTTTTAAAAACCCAAAGACCAGGAAAGAAAAAGAA GATTCATCACAGAGCCCTTATC-3' (SEQ ID NO :8)
- [0027] 较优的, 本发明甲型和乙型流感病毒联合检测的双重 PCR 试剂盒所采用的荧光 PCR 法的 PCR 检测体系如下:
- [0028] 甲乙型流感病毒检测混合液 19 μ l
- [0029] RT-PCR 酶 1 μ l
- [0030] 待测品 5 μ l
- [0031] 反应总体系为 25 μ l。
- [0032] 较优的, 本发明试剂盒的 PCR 体系中, 所述待测品为样本核酸提取液、阳性对照品或阴性对照品 (DEPC-H₂O)。
- [0033] 本发明的阳性对照品中, IFVA 质粒和 IFVB 质粒可以单独包装, 也可以混合包装。

[0034] 本发明样本核酸提取液的制备方法可参考现有病毒 RNA 提取技术,具体可采用下述方法具体制备:取 100 μ l 样品置于 1.5ml 离心管中,加入 300 μ l 裂解液 (Trizol),再加入 100 μ l 氯仿,混匀器上振荡混匀 5s 或颠倒混匀 15 次;13000rpm 离心 15min,吸取上层液体,加入等体积异丙醇,颠倒混匀室温静置 10min,13000rpm 离心 10min,轻轻倒去上清;加入 700 μ l 75% 乙醇,颠倒洗涤,13000rpm 离心 5min,轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,弃尽液体或 4000rpm 离心 5s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量加样器尽量吸干液体,加入 20 μ l DEPC-H₂O 溶解 RNA,即获得样本核酸提取液。

[0035] 制备本发明所述样本核酸提取液的样本来自人体鼻腔或咽部分泌物。

[0036] 本发明试剂盒的 PCR 扩增程序为:45 °C 10min;95 °C 15min;95 °C 15sec 和 60 °C 60sec 交替循环 45 次。单点荧光检测在 60 °C。

[0037] 荧光通道检测选择 FAM 和 VIC 通道。

[0038] 备注:如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪,请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

[0039] 本发明试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0040] 1) 样本核酸提取液的制备;

[0041] 2) 试剂制备:向甲乙型流感病毒检测混合液中加入 RT-PCR 酶,振荡、离心,获得反应混合液;

[0042] 3) 加样:将步骤 2) 的反应混合液置于 PCR 管中,将样本核酸提取液、阳性对照品或阴性对照品分别加入装有反应混合液的不同 PCR 管,获得对应的样本反应管、阳性反应管和阴性对照反应管;

[0043] 4) PCR 扩增:反应管置于定量荧光 PCR 仪上,设置循环参数,进行 PCR 扩增;

[0044] 5) PCR 反应结束后,检测 PCR 反应体系的荧光信号值,阈值设定原则以阈值线刚好超过 DEPC-H₂O 的最高点,荧光通道选用 FAM 通道和 VIC 通道。

[0045] 试剂盒质量控制:试剂盒各对照品须达到以下表 1 中的要求,否则实验视为无效。

[0046] 表 1 试剂盒质量标准

[0047]

样品	Ct 值	
	FAM 通道	VIC 通道
阴性对照	Undetermined (ABI7500) 或 N/A (CFX96) 或 No Ct (SLAN)	Undetermined (ABI7500) 或 N/A (CFX96) 或 No Ct (SLAN)

[0048]

阳性对照	≤35	≤35
------	-----	-----

[0049] 样本核酸提取液结果的判断标准如表 2 所示:

[0050] 表 2 检测结果判断标准

[0051]

	FAM 通道	VIC 通道	结果判断
1	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	甲、乙型流感病毒阴性
2	Ct 值 $\leq$ 42	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	甲型流感病毒阳性
3	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值 $\leq$ 42	乙型流感病毒阳性
4	Ct 值 $\leq$ 42	Ct 值 $\leq$ 42	甲、乙型流感病毒均阳性

[0052] 如待检样本 Ct 值在 42 ~ 45 之间,需重复测定,如仍在 42 ~ 45 之间,则判为低于检测限,报告为阴性。

[0053] 本发明最后公开了前述针对甲型和乙型流感病毒的双重荧光 PCR 检测用引物及探针、前述甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒在制备甲型流感病毒和 / 或乙型禽流感病毒检测试剂中的应用。

[0054] 本发明涉及了两对 PCR 引物分别特异性扩增甲型流感病毒和乙型流感病毒基因序列,2 对 PCR 引物可在同一 PCR 反应管里同时进行扩增,实现双重检测,大大缩短检测时间,操作简便。特异性引物和和探针的设计保证了引物和探针的高度保守和特异性,避免了两对引物和探针之间无互补配对或交叉扩增的情况。本发明选用的两个荧光基团的荧光波长相差较大且信号强度相近,避免了信号之间的相互干扰。

附图说明

[0055] 图 1 :FAM 通道甲型流感灵敏度扩增曲线图

[0056] 图 2 :VIC 通道乙型流感灵敏度扩增曲线图

[0057] 图 3 :样本 1 扩增曲线图

[0058] 图 4 :样本 2 扩增曲线图

[0059] 图 5 :样本 3 扩增曲线图

[0060] 图 6 :样本 4 扩增曲线图

[0061] 图 7 :样本 5 扩增曲线图

[0062] 图 8 :样本 6 扩增曲线图

具体实施方式

[0063] 下面结合具体实施例进一步阐述本发明,应理解,以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围。

[0064] 实施例 1 甲型和乙型双重荧光 PCR 检测试剂盒检测引物探针的设计和合成

[0065] 在 IFVA 探针的 5' 标记 FAM 荧光基团,IFVA 探针的 3' 标记 BHQ1 荧光淬灭基团;在 IFVB 探针的 5' 标记 VIC 荧光基团,IFVB 探针的 3' 标记 BHQ1 荧光淬灭基团。合成 IFVA 和 IFVB 的引物和探针。

[0066] 甲型流感病毒

[0067] IFVA 上游引物 :5' -GCTCTCATGGAGTGGMTA-3' (SEQ ID NO :1)

[0068] IFVA 下游引物 :5' -CGTGAACACAAAAYCCYAA-3' (SEQ ID NO :2)

[0069] IFVA 探针 :FAM-ACAAGACCAATCCTGTACCTCTG-BHQ13' (SEQ ID NO :3)

[0070] 乙型流感病毒

[0071] IFVB 上游引物 :5' -GTTGGTTTGGTGGGAAAG-3' (SEQ ID NO :4)

[0072] IFVB 下游引物 :5' -GATAAGGGYTCTGTGATGAA-3' (SEQ ID NO :5)

[0073] IFVB 探针 :5' VIC-TGACCTAGACTCTGCCTTGAATG-BHQ1-3' (SEQ ID NO :6)

[0074] 其中, IFVA 的上下游引物为兼并引物, 兼并引物中, M=A/C ;Y=T/C。

[0075] 实施例 2 甲乙型流感病毒检测混合液的制备

[0076] 将 IFVA 上游引物 0.75 μ l/test ;IFVA 下游引物 0.75 μ l/test ;IFVA 探针 0.1 μ l/test ;IFVB 上游引物 0.75 μ l/test ;IFVB 下游引物 0.75 μ l/test ;IFVB 探针 0.1 μ l/test ;RT-PCR MIX (购自 Qiagen 公司) 12.5 μ l/test ;双蒸水 3.3 μ l/test 混匀即为甲乙型流感病毒检测混合液。制备的所述甲乙型流感病毒检测混合液的组成中, IFVA 上游引物、IFVA 下游引物、IFVB 上游引物, 和 IFVB 下游引物的终浓度分别为 600nM/L, IFVA 探针和 IFVB 探针的终浓度分别为 100nM/L。

[0077] 实施例 3 甲型和乙型流感病毒联合检测的双重 PCR 试剂盒的灵敏度分析

[0078] 1、实验方法

[0079] 1) 样品的准备 :

[0080] IFVA 质粒的构建方法 :采用 PCR 法对甲型流感病毒样本的核酸进行扩增, 获得含甲型流感病毒目的扩增序列 (SEQID NO :7 所示序列) 的核酸片段, 引物序列如 SEQ ID NO :1-2 所示。将扩增的片段纯化后, 通过 TA 克隆至 pMD8-T 载体上, 经测序鉴定, 测序结果正确的重组载体转化入 DH5 α , 扩增, 获得 IFVA 质粒。

[0081] IFVB 质粒的构建方法 :采用 PCR 法对乙型流感病毒样本的核酸进行扩增, 获得含 IFVB 目的扩增序列 (SEQID NO :8 所示序列) 的核酸片段, 引物序列如 SEQ ID NO :4-5 所示。将扩增的片段纯化后, 通过 TA 克隆至 pMD8-T 载体上, 经测序鉴定, 测序结果正确的重组载体转化入 DH5 α , 扩增, 获得 IFVB 质粒。

[0082] 取 2×10^6 copies/ml 的甲型流感阳性对照品 (IFVA 质粒) 及 2×10^6 copies/ml 的乙型流感阳性对照品 (IFVB 质粒) 等体积混合, 获得 1×10^6 copies/ml 检测样品 S1。按 1 :10、1 :100、1 :1000 稀释, 获得 S2 (1×10^5 copies/ml)、S3 (1×10^4 copies/ml)、S4 (1×10^3 copies/ml)。将 S1—S4 共 4 份作为检测样品。

[0083] 2) 试剂配制 :

[0084] 取 $n \times 19 \mu$ l 实施例 2 的甲乙型流感病毒检测混合液与 $n \times 1 \mu$ l 的 RT-PCR 酶 (购自 Life technology 公司, 商品名 One-Step RT-PCR 试剂盒), 振荡混匀数秒, 3000rpm 离心数秒 (n 为反应管数)。

[0085] 3) 加样 :

[0086] 取上述各混合液各 20 μ l 置于 PCR 管中, 然后将 S1-S4 各 5 μ l 分别加入 PCR 反应管中, 盖好 PCR 反应管盖, 立即进行 PCR 扩增反应。

[0087] 4) PCR 扩增 :

[0088] 反应管置于定量荧光 PCR 仪上, 推荐循环参数设置 :

[0089] $45^\circ\text{C} \times 10\text{min}$; $95^\circ\text{C} \times 15\text{min}$;再按 $95^\circ\text{C} \times 15\text{sec} \rightarrow 60^\circ\text{C} \times 60\text{sec}$, 循环 45 次 ;单

点荧光检测在 60℃。反应体系为 25 μl。

[0090] 荧光通道检测选择 FAM 和 VIC 通道。

[0091] 备注：如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

[0092] 2. 检测结果：

[0093] 表 3 试剂盒灵敏度检测结果

[0094]

样本	检测 Ct 值	
	FAM	VIC
S1	24.80	24.07
S2	28.34	27.70
S3	31.37	30.83
S4	34.32	33.91

[0095] 荧光 PCR 扩增曲线结果见图 1-2，检测结果见表 3。该实验结果表明：S1—S4 在 FAM 和 VIC 通道检测均为阳性，表明试剂盒检测甲型流感和乙型流感的检测灵敏度都能达到 1×10^3 copies/ml。

[0096] 实施例 4 甲型和乙型流感病毒双重荧光 PCR 检测试剂盒的使用

[0097] 1、实验方法

[0098] 1) 样本来源：

[0099] 对 6 例样本进行甲型、乙型流感病毒核酸检测。6 例样本编号 1-6，1-4 号样本经测序确认分别为甲型流感病毒 H1 亚型、甲型流感病毒 H3 亚型、甲型流感病毒 H1N1、乙型流感病毒；5-6 号样本为流感病毒阴性。

[0100] 2) 样本处理：

[0101] 取 100 μl 样本，置于 1.5ml 离心管中，加入 300 μl 裂解液 (Trizol)，再加入 100 μl 氯仿，混匀器上振荡混匀 5sec 或颠倒混匀 15 次；13000rpm 离心 15min，吸取上层液体，加入等体积异丙醇，颠倒混匀室温静置 10min，13000rpm 离心 10min，轻轻倒去上清；加入 700 μl 75% 乙醇，颠倒洗涤，13000rpm 离心 5min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，弃尽液体或 4000rpm 离心 5sec，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量加样器尽量吸干液体，加入 20 μl DEPC-H₂O 溶解 RNA，获得样本核酸提取液。

[0102] 3) 试剂配制：

[0103] 取 $n \times 19 \mu l$ 甲乙型流感病毒检测混合液 (n 为反应管数) 与 $n \times 1 \mu l$ RT-PCR 酶 (购自 Life technology 公司，商品名 One-Step RT-PCR 试剂盒)，振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。

[0104] 4) 加样：

[0105] 取上述各混合液 20 μl 置于 PCR 管中，然后将 1-6 号样本核酸提取液各 5 μl 分别加入 PCR 反应管中，盖好 PCR 反应管盖，立即进行 PCR 扩增反应。

[0106] 5) PCR 扩增：

[0107] 反应管置于定量荧光 PCR 仪上,推荐循环参数设置:

[0108] 45℃ ×10min ;95℃ ×15min ;再按 95℃ ×15sec → 60℃ ×60sec,循环 45 次;单点荧光检测在 60℃。反应体系为 25 μ l。

[0109] 荧光通道检测选择 FAM 和 VIC 通道。

[0110] 备注:如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪,请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

[0111] 6) 阈值设定:

[0112] 阈值设定原则以阈值线刚好超过 DEPC-H₂O 的最高点。

[0113] 2、试验结果:

[0114] 表 4 试剂盒检测结果

[0115]	样本	检测结果		
		FAM	VIC	
[0116]	标本 1	31.04	N/A	甲型流感病毒阳性
	标本 2	33.78	N/A	甲型流感病毒阳性
	标本 3	32.86	N/A	甲型流感病毒阳性
	标本 4	N/A	27.00	乙型流感病毒阳性
	标本 5	N/A	N/A	甲、乙型流感病毒阴性
	标本 6	N/A	N/A	甲、乙型流感病毒阴性

[0117] 荧光 PCR 扩增曲线结果见图 3-8,检测结果见表 4。可见本发明甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒的多重荧光 PCR 检测结果与测序结果一致,本发明的引物、探针以及试剂盒可用于甲型流感病毒和乙型流感病毒的鉴定和检测。

[0001]

序列表

<110> 上海之江生物科技股份有限公司

<120> 一种甲型和乙型流感病毒联合检测试剂盒及其应用

<130> PCNGS

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVA 上游引物

<400> 1

gcctctcatgg agtggmta

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

[0002]

<213> Artificial

<220>

<223> IFVA 下游引物

<400> 2

cgtgaacaca aayccyaa

18

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVA 探针

<400> 3

acaagaccaa tectgtcacc tctg

24

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

[0003]

<220>

<223> IFVB 上游引物

<400> 4

gttggtttgg tgggaaag

18

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVB 下游引物

<400> 5

gataaggggt ctgtgatgaa

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVB 探针

[0004]

<400> 6

tgacctagac tctgccttgg aatg

24

<210> 7

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVA 目的扩增片段

<400> 7

gctctcatgg agtggataaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta

60

gggtttgtgt tcacg

75

<210> 8

<211> 163

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> IFVB 目的扩增片段

[0005]

<400> 8

gttggtttgg tgggaaagaa ttgacctag actctgcctt ggaatggata aaaaacaaaa 60

gatgcttaac tgatatacaa aaagcactaa ttggtgcctc tatatgcttt taaaaccca 120

aagaccagga aagaaaaaga agattcatca cagagccctt atc 163

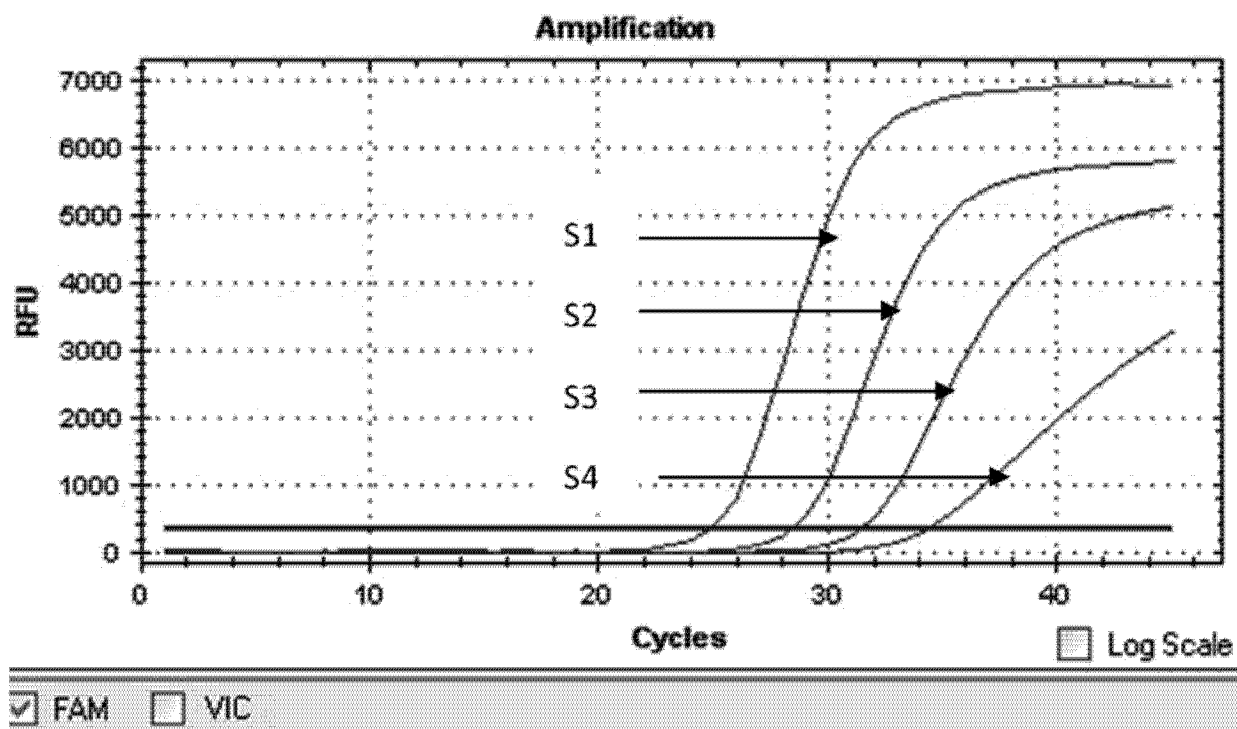


图 1

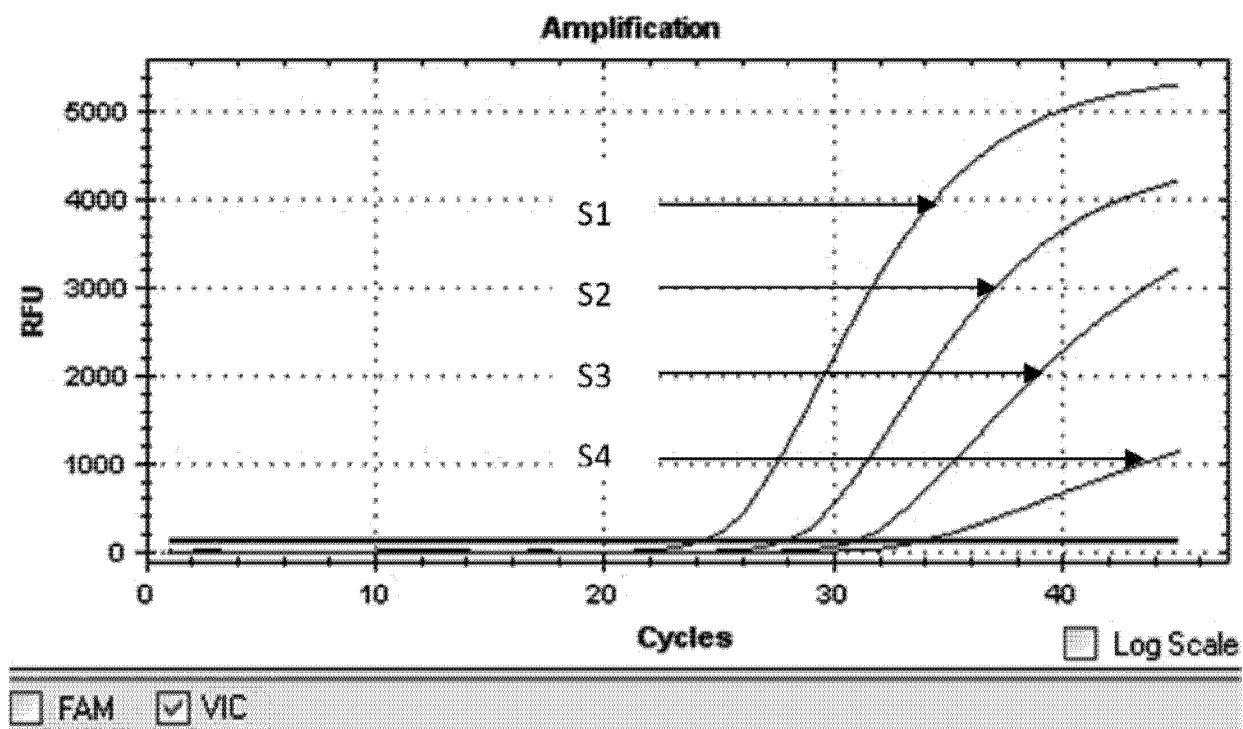


图 2

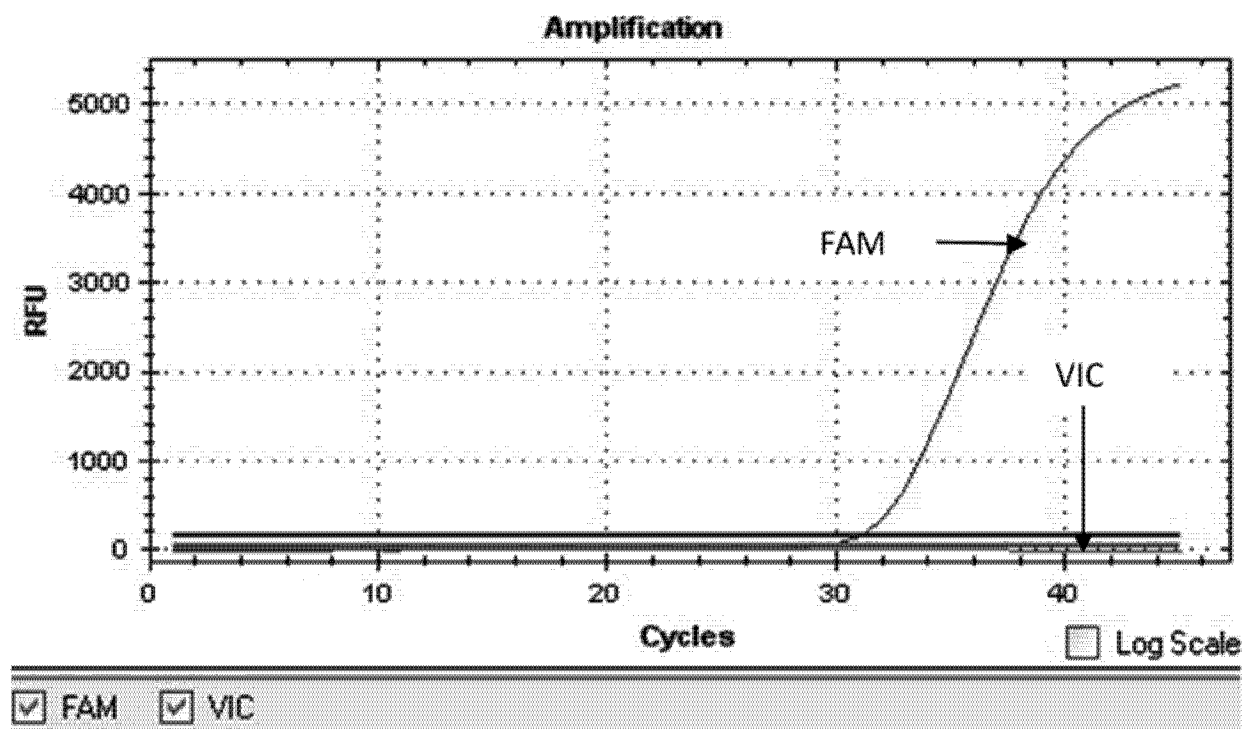


图 3

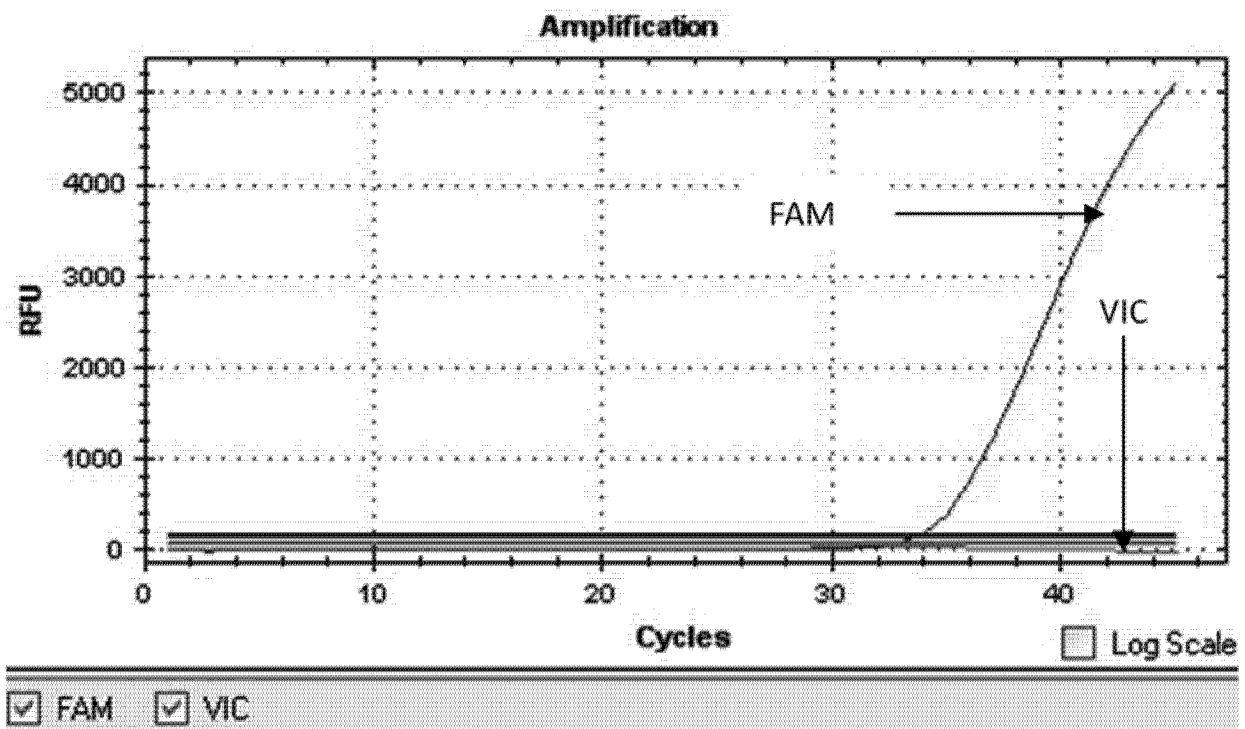


图 4

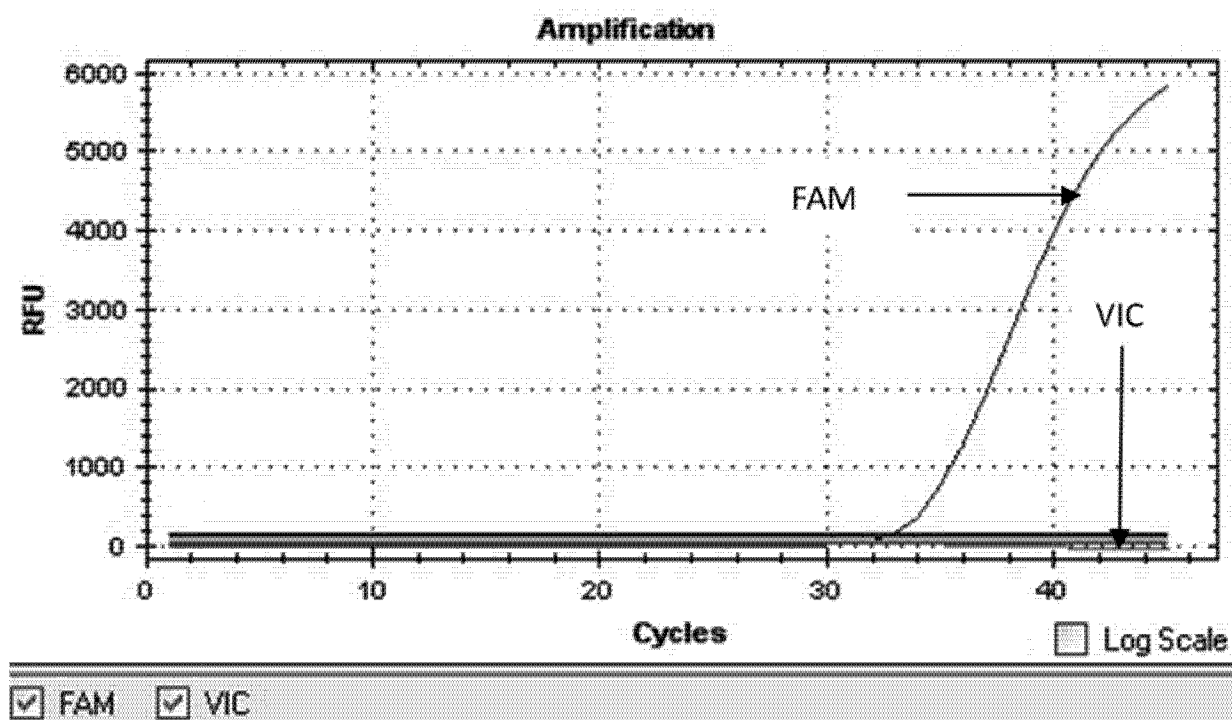


图 5

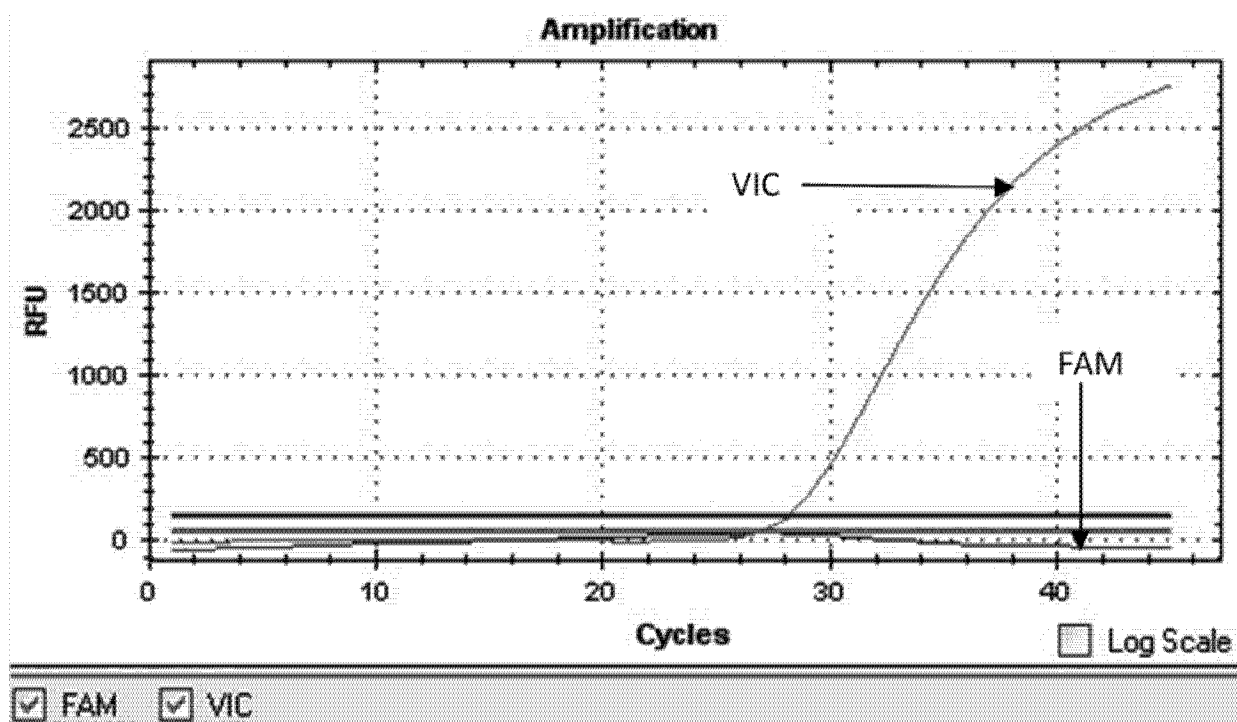


图 6

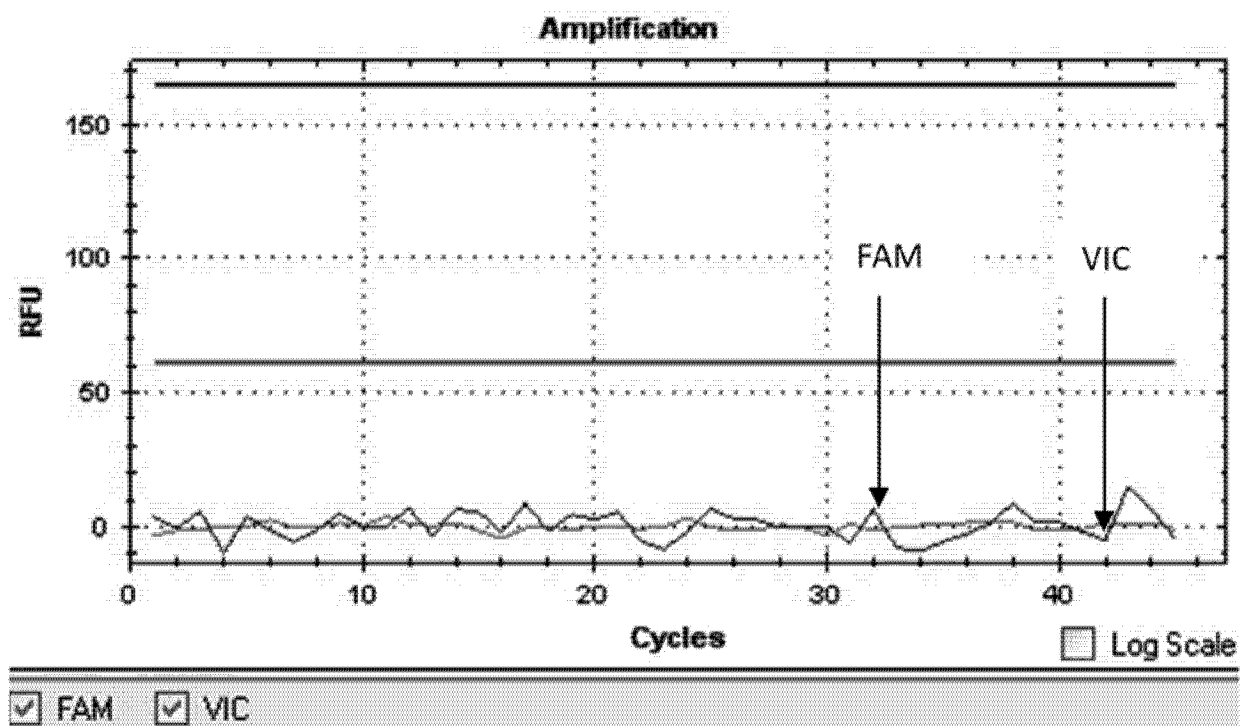


图 7

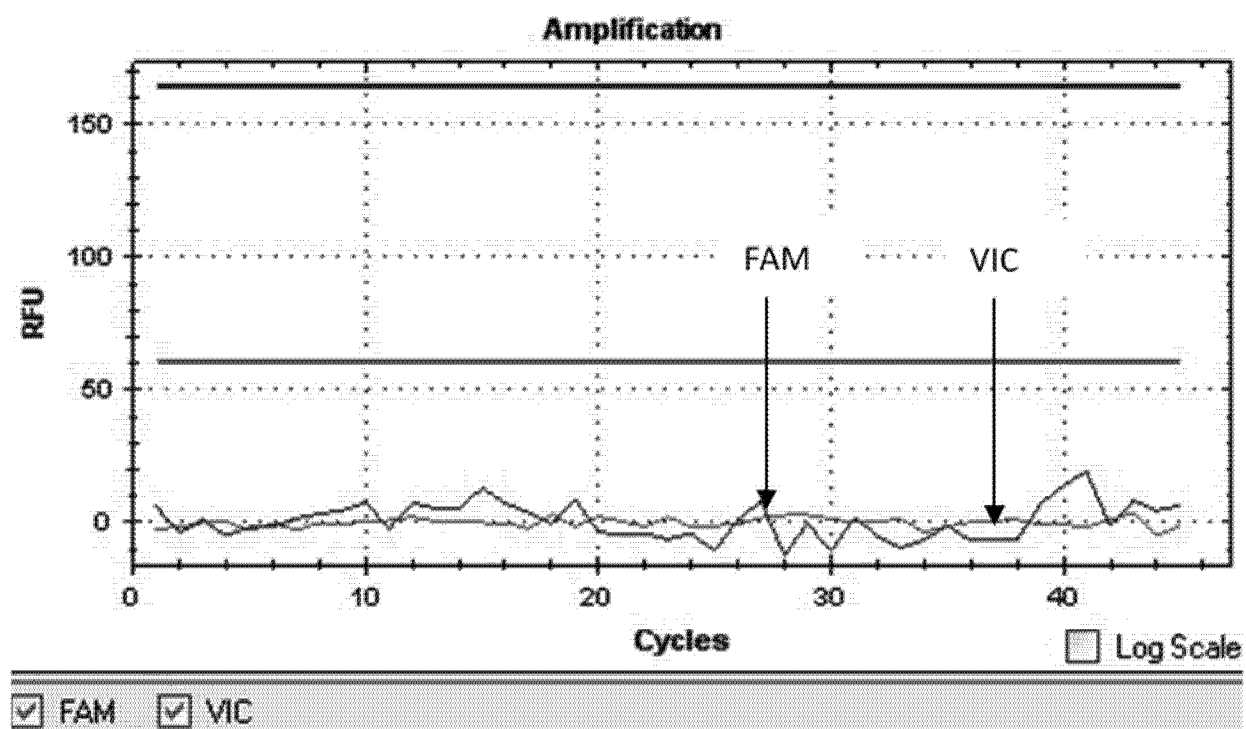


图 8