

## 检测正呼肠孤病毒的染料荧光定量引物及试剂盒

### 技术领域

本发明属于病毒检测技术领域，具体涉及一种检测哺乳动物正呼肠孤病毒的染料荧光定量 RT-PCR 引物及试剂盒。

### 背景技术

呼肠孤病毒(Reovirus)是 1954 年由 Sabin, Ramos-Alvarez 等从健康儿童的呼吸道与胃肠道中分离得到的，最初认为该病毒与任何疾病都不相关，因此将其命名为呼吸道(Respiratory)、肠道(enteric)、孤儿(orphan)病毒，取 3 个英文单词的词头，缩写为——呼肠孤病毒(Reovirus)。近年来，哺乳动物正呼肠孤病毒作为呼吸道和消化道疾病的病原受到各国学者的关注。自 20 世纪 50 年代起，MRV（哺乳动物正呼肠孤病毒）先后在人类、狗、牛、水貂、果子狸、蝙蝠等哺乳动物上被分离到。MRV 被证实不仅能引起人类出血性肠炎、急性呼吸道感染、脑炎等疾病，还能导致其他哺乳动物如狗、水貂等腹泻。

目前，能准确、快捷、有效的检测哺乳动物正呼肠孤病毒对于提高对该病毒的防控是至关重要的。根据研究数据表明，该病毒的基因序列变异快，不同毒株之间基因序列差异大，目前国外已有研究者建立了该病毒的检测体系，但其方法在国内并不适用，而国内已有的普通 PCR 和荧光检测试剂盒又常常出现假阳性问题，因此其检测结果的准确性有待考究。由此可见，我国对于该病毒的检测技术还需要进一步的完善。

### 发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一种检测哺乳动物正呼肠孤病毒的荧光定量 RT-PCR 引物及试剂盒，该特异性引物及试剂盒可对哺乳动物正呼肠

## 说明书

---

孤病毒进行快速、准确地鉴别，具有简单、快速、灵敏度高和特异强的特点。

本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一种检测哺乳动物正呼肠孤病毒的染料荧光定量 RT-PCR 引物，包括上游引物 MRV F 和下游引物 MRV R，并且所述上游引物 MRV F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，所述下游引物 MRV R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

第二个方面，本发明提供一种检测哺乳动物正呼肠孤病毒的试剂盒，包括上述染料荧光定量 RT-PCR 引物。

进一步的，所述试剂盒还包括：（1）基因扩增试剂、（2）PCR 纯化试剂盒、（3）质粒提取试剂盒。

采用上述检测哺乳动物正呼肠孤病毒的试剂盒进行哺乳动物正呼肠孤病毒检测的方法，包括以下步骤：提取待检测样品的 RNA，以待检测样品的 RNA 为模板，反转录得到 cDNA，用上述的引物对 cDNA 进行染料荧光定量 RT-PCR 扩增；通过实时荧光定量 PCR 仪进行结果的读取，判断 S 型扩增曲线和 CT 值，在扩增曲线正常的情况下，若  $0 < \text{CT 值} < 35$  时，则可记为阳性，若 CT 值 = 0 时，则可记为阴性。

进一步的，所述的反转录步骤包括：将 RNA 模板 4  $\mu\text{L}$ 、1 号 5 $\times$ Prime Script Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、2 号 Prime Script RT Enzyme Mix 1  $\mu\text{L}$ 、4 号 Random 6 mers 2  $\mu\text{L}$  和 5 号 RNase Free dH<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{L}$  混匀，放入 PCR 仪上进行反转录。

进一步的，所述的反转录反应条件为：37 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 16 $^{\circ}\text{C}$  10 min。

进一步的，所述的染料荧光定量 RT-PCR 扩增的反应检测体系为：TB Green II 10  $\mu\text{L}$ ，上游引物 MRV F、下游引物 MRV R 各 0.5  $\mu\text{L}$ ，cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ，用 ddH<sub>2</sub>O 补齐到 20  $\mu\text{L}$ 。

进一步的，所述的染料荧光定量 RT-PCR 扩增的反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min；PCR: 95 $^{\circ}\text{C}$  反应 15 sec, 56 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 sec 进行 40 个循环。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

## 说明书

1) 引物针对的基因靶标较比现有荧光定量 PCR 的引物针对的基因靶标更为精准: 本发明设计的引物是基于 MRV L1 基因, 在动物呼肠孤病毒中 L1 序列相对保守, 更加适合用做引物的设计靶点。

2) 引物设计的可检测范围更为广泛: 本发明设计的引物是根据国内外公布的所有 MRV 病毒序列, 能够同时对国内外现有的毒株进行检测, 而设计范围在高度保守的 L1 序列。

3) 本发明操作步骤少, 只需要常规的提取核酸, 进行反转录后就能进行染料荧光定量 PCR 检测; 整个扩增只需要 2 h 即可完成, 检测的灵敏度达到  $7.58 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

4) 本发明的阳性结果鉴定便捷, 只需要判断其 CT 值是否小于“35”即可; 比现有检测 MRV 的核酸电泳或荧光定量 PCR 的方法更加快捷、准确, 为哺乳动物呼肠孤病毒快速诊断和流行病学调查奠定了基础。

### 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解, 构成本发明的一部分, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

图 1 是本发明实施例 3 中引物灵敏度实验的检测结果图, 其中 A:  $7.58 \times 10^9$ copies/ $\mu\text{L}$ ; B:  $7.58 \times 10^3$ copies/ $\mu\text{L}$ ; C:  $7.58 \times 10^4$ copies/ $\mu\text{L}$ ; D:  $7.58 \times 10^5$ copies/ $\mu\text{L}$ ; E:  $7.58 \times 10^6$ copies/ $\mu\text{L}$ ; F:  $7.58 \times 10^7$ copies/ $\mu\text{L}$ ; G:  $7.58 \times 10^8$ copies/ $\mu\text{L}$ 。

图 2 是本发明实施例 3 中标准曲线图, 在  $7.58 \times 10^3 \sim 7.58 \times 10^8$ copies 之间有良好的线性关系, 标准曲线斜率为-3.2782, Y 轴截距为 47.316。

图 3 是本发明实施例 3 中引物特异性实验结果图; 其中, 1: 哺乳动物呼肠孤病毒, 2: 牛冠状病毒, 3: 牛轮状病毒样品, 4: 猪瘟病毒样品, 5: 猪蓝耳病毒样品, 6: 大肠杆菌, 7: 沙门氏菌。

## 具体实施方式

本发明实施例采用的基因扩增试剂 TB Green II 购自 TaKaRa 公司。

本发明实施例采用的荧光定量 PCR 仪购自中国 BIOER 公司。

本发明实施例采用的反转录反应试剂为 PrimeScript<sup>TM</sup>RT 试剂，购自宝生物工程（大连）有限公司。

本发明实施例采用的高速冷冻离心机 TGL-16 购自中国蜀科公司。

本发明实施例采用的凝胶成像系统 Doc2000 购自美国 Bio-Red 公司。

本发明实施例采用的倒置生物显微镜购自奥林巴斯公司。

本发明实施例采用的-20℃医用冰箱、-80℃超低温冰箱购自美菱公司。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

## 实施例 1

### 引物设计

根据 NCBI 登陆的 MRV 基因的国内外已经发表的毒株序列（AF368033.1, DQ664184.1, DQ997719.1, EF494435.1, GQ468266.1, GU196306.1, HM159613.1, JN799426.1），应用 Beacon Designer 7.7 软件设计针对 MRV 的 L1 基因的特异性引物，所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物 MRV F: TATATTGATGCTCTAAATCGTGTG, SEQ ID NO:1;

下游引物 MRV R: TTCTGGCTTGGCTATCTCC, SEQ ID NO:2。

### 实施例 2

检测哺乳动物正呼肠孤病毒的染料荧光定量 RT-PCR 方法的建立:

该方法包括以下步骤:

(1)待检测样品 RNA 提取:

将粪便阳性样本与 PBS (1:5)充分重悬混匀, -80℃冰箱中反复冻融三次, 3,000 rpm 离心 10 min, 弃沉淀, 再以 12,000 rpm 离心 30 min, 取上清, 然后按照 Trizol Reagent 说明书提取总 RNA, 并按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20 °C 保存备用。细菌 DNA 采用酚-氯仿法提取, -20 °C 保存备用。

(2)提取的 RNA 加入到反转录试剂盒进行反转录, 得到 cDNA 模板:

反转录步骤为: 将 RNA 模板 4 μL、1 号 5×PrimeScript Buffer 4 μL、2 号 PrimeScriptRT Enzyme Mix 1 μL、4 号 Random 6 mers 2 μL 和 5 号 RNase Free dH<sub>2</sub>O 9 μL 混匀, 放入 PCR 仪上进行反转录。其反应条件: 37℃ 15 min, 85℃ 15 s, 16℃ 10 min。

(3)染料荧光定量 RT-PCR 扩增反应: 扩增反应 20 μL 反应体系含有: TB Green II 10 μL, 上游引物 MRV F、下游引物 MRV R 各 0.5 μL, cDNA 模板 1μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补齐到 20 μL。然后:95℃预变性 2 min; PCR: 95℃反应 15 sec, 56℃反应 30 sec 进行 40 个循环。

(4)结果判断: 通过实时荧光定量 PCR 仪进行结果的读取, 判断 S 型扩增曲线和 CT 值, 在扩增曲线正常的情况下, 若 0<CT 值<35 时, 则可记为阳性, 若 CT 值=0 时, 则可记为阴性。

### 实施例 3

退火温度、引物浓度和探针浓度的优化、灵敏度、稳定性和特异性的测定

(1)退火温度的优化: MRV F/R 引物反应条件中的退火温度设置 48℃-56℃, 对荧光定量 PCR 仪的扩增峰图进行观察, 选取 CT 值最小的为最佳

退火温度，本发明的最佳退火温度为 56℃。

(2) 引物浓度的优化：PCR 按 20  $\mu\text{L}$  反应体系，上下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ~1  $\mu\text{L}$ 。选取 CT 值最小的引物浓度为最佳引物浓度，最佳引物浓度为 0.5  $\mu\text{L}$ 。

(3) 灵敏度评价：

克隆转化和重组阳性质粒：RT-PCR 扩增出目的基因，进行电泳观测分析。电泳筛选出来的 MRV 阳性样本用购自 OMGA 公司 PCR 纯化试剂盒进行 PCR 产物纯化，将纯化的 PCR 产物与 TMD-19T 载体连接，放入金属浴 3 h 后取出。得到的连接产物加入感受态细胞（大肠杆菌 DH5 $\alpha$  株）后液体加入 1 mL LB 液体中，放入 37℃摇菌箱 2~3 h，然后 5000 r/min 4 min 离心，弃 800  $\mu\text{L}$  上清液，剩下 200  $\mu\text{L}$  吹打混匀。吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液滴于含有氨苄青霉素的 LB 的培养基，并用涂布棒把菌液均匀的分布在培养基上，放 37℃细菌培养箱 12 h~16 h。挑取单菌落溶于 10  $\mu\text{L}$  灭菌水中混匀，取 2  $\mu\text{L}$  菌液为 PCR 模板做 PCR 扩增，将 PCR 产物做电泳检测后挑取亮条带的菌液加到 2 mL LB+AMP 液体中摇菌 12 h。用质粒提取试剂盒对已摇好的菌液进行质粒的提取，得到的质粒即阳性模板，放-20℃ 保存。

将上述制备得到的阳性模板用无菌水做 10 倍连续稀释： $10^{-1}$ - $10^{-11}$ ，取 G: $1.0\times 10^{-3}$ 、F: $1.0\times 10^{-4}$ 、E: $1.0\times 10^{-5}$ 、D: $1.0\times 10^{-6}$ 、C: $1.0\times 10^{-7}$ 、B:  $1.0\times 10^{-8}$  稀释的质粒，按以上最优的荧光 RT-PCR 反应体系和反应条件进行扩增，对荧光 PCR 结果数据进行分析，发现检测其最低浓度见如图 1 所示，所建立的荧光定量 RT-PCR 反应最低检测量分别为：MRV 毒株  $7.58\times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ，表明灵敏性好。

(4) 标准曲线的绘制：将阳性模板用无菌水做 10 倍连续稀释： $10^{-1}$ - $10^{-11}$ ，取  $1.0\times 10^{-3}$ - $1.0\times 10^{-8}$  稀释的质粒，按以上最优的荧光 RT-PCR 反应体系和反应条件进行扩增，对荧光 PCR 结果数据进行分析，绘制标准曲线图。在  $7.58\times 10^3$ ~ $7.58\times 10^8$ copies 之间有良好的线性关系，标准曲线斜率为-3.2782，Y 轴截距为

47.316, 相关系数为 0.9959, 扩增效率为 90 % (如图 2 所示)。

(5) 重复性评价: 将已稀释好的质粒, 都统一按照 (3) 的操作方式进行 3 个平行试验, 结果表明方法具有高度稳定性和可重复性 (表 1)

表 1 荧光定量 RT-PCR 的重复性

标准样品 (拷贝/ $\mu\text{L}$ )	Ct			平均值 (临界 循环值 Ct)	标准差
	1st	2nd	3rd		
$1.0 \times 10^{-3}$	15.61	15.23	15.48	15.44	0.16
$1.0 \times 10^{-6}$	22.12	22.35	21.95	22.14	0.16
$1.0 \times 10^{-8}$	32.30	32.37	32.31	32.33	0.03

(6) 特异性的评价: 用上述优化好的体系对待样品进行检测, 按照实施例 2 同等的方法对样本进行 RNA 提取, 所检测的样品分别为 1.哺乳动物呼肠孤病毒、2.牛冠状病毒; 3.牛轮状病毒样品; 4.猪瘟病毒样品; 5.猪蓝耳病毒样品; 6.大肠杆菌; 7.沙门氏菌, 以上病毒样本均由西南民族大学提供。特异性检测结果如图 3 所示, 除了 1 号样本呼肠孤病毒有扩增曲线外, 其余相关的病毒和细菌样本均无扩增曲线, 表明该方法特异性好。

#### 实施例 4

使用本发明的染料荧光定量 RT-PCR 检测方法与现有的探针荧光定量 RT-PCR 方法 (周安, 2011) 及 RT-套式 PCR 检测方法 (何小明, 2013) 分别检测 20 份奶牛腹泻样本、20 份牦牛腹泻样本、20 份猪腹泻样本, 检测结果见表 2。结果显示, 探针荧光定量 RT-PCR 方法阳性检出率 5.00% (3/60), 能检出牦牛及奶牛阳性样本; RT-套式 PCR 检测方阳性检出率 1.67% (1/60), 仅能检出猪阳性样本; 本方法对样本检测阳性率为 28.33% (17/60), 牦牛、奶牛及猪阳性样本均可检出, 阳性样本经克隆测序验证都为 MRV。说明本方法对于哺乳动物

## 说明书

临床样本的通用性优于其他已发表检测方法（表 2）。

表 2 本发明与常规 PCR 鉴定方法对临床标本检测的结果比较

方法	阳性结果	阴性结果	阳性率
探针荧光定量 RT-PCR 方法（周安，2011）	3	57	5.00%
RT-套式 PCR（何小明，2013）	1	59	1.67%
染料荧光定量 RT-PCR	17	43	28.33%

综上，基于对现有哺乳动物正呼肠孤病毒的研究发现，MRV 基因中的碱基突变也会发生于基因组中最为保守的 L1 基因，从而导致已有的检测正呼肠孤病毒的荧光定量 RT-PCR 方法不能高效准确地检测牦牛源正呼肠孤病毒，本发明对多株正呼肠孤病毒 L1 基因序列进行了比对，并选取了 L1 基因比对后的高度保守片段设计了特异性引物，扩增目的片段位于 222-396 bp 处，长度为 175 bp。运用 Oligo.7 软件对设计的引物进行分析，结果表明本发明设计的引物中 GC% 为 33.3%，引物 3' 端不存在碱基配对， $\Delta G = -0.7$  kcal/mol。证明本发明设计的引物可用，并可以对哺乳动物正呼肠孤病毒进行快速、准确地鉴别，提高牦牛源 MRV 的检出率。

上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围。