

检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的特异性引物、探针及快速检测试剂盒

技术领域

本发明属于靶 DNA 片断的快速检测领域，具体地说，涉及一种检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的特异性引物、探针及快速检测试剂盒。

背景技术

淡水鱼类桑提库珀蛙病毒 (Fish Santee-Cooper ranavirus, FSCRV) 是引起多种淡水鱼类大量死亡的致病性病毒，常引起大口黑鲈、乌鳢、鳊鱼、小带刺尾鱼和孔雀鱼发病死亡。其对大口黑鲈的致病力最高，常引起大口黑鲈体表溃疡，严重的肌肉深层溃烂，急性发病时，体表没有溃烂症状，解剖病鱼鳃丝出血或发白，少数病鱼肝脏有出血点，并伴有肾脏肿大或出现围心腔出血。其引起的疾病对大口黑鲈养殖产业危害极大。FSCRV 为双链 DNA 病毒，属于虹彩病毒科蛙病毒属，该病毒是蛙病毒属下一个独特的病毒种，与两栖类动物来源的蛙病毒存在较大差异。该病毒于 1991 年从美国佛罗里达州野生大口黑鲈中被发现，其造成野生大口黑鲈在养殖期大量死亡，死亡率一般为 30~40%，严重的达到 50% 以上，近几年造成的经济损失无法估量。该病毒在国内外未见报道，由于该病毒至今未有检测试剂盒和检测方法，严重阻碍了该病毒引起疾病的预防工作，因此该病毒检测试剂盒的开发和检测技术的研究显得尤为重要。

发明内容

有鉴于此，本发明针对上述问题，提供了一种检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的特异性引物、探针及快速检测试剂盒，本发明的引物、探针和试剂盒特异性强，敏感性高，能实现快速、有效且准确检测淡

水鱼类桑提库珀蛙病毒；本发明中的试剂盒分别为荧光定量检测试剂盒，该试剂盒在封闭的情况下判断结果，扩增产物不会对检测环境造成污染，可用于淡水鱼类桑提库珀蛙病毒病的监测和早期预防。本发明采用荧光定量技术，通过检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的衣壳蛋白基因，来检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒，这是目前国内外首次研制检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的试剂盒；该试剂盒的研制为淡水鱼类桑提库珀蛙病毒病的监测和预防奠定基础。

为了解决上述技术问题，本发明还公开了一种检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的引物探针混合物，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，探针 B 的 5' 端标记有荧光报告基团，3' 端标记有荧光淬灭基团。

进一步地，引物组 A 包含引物 FSCRV-q102F 和引物 FSCRV-q102R；

引物 FSCRV-q102F 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；

引物 FSCRV-q102R 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

探针的 B 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

进一步地，荧光报告基团选自 6-羧基荧光素、六氯-6-甲基荧光素、VIC 荧光染料、四氯-6-羧基荧光素、羧基-X-罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、磺酰罗丹明、6-羧基-4', 5'-二氯-2', 7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯、花菁 3、花菁 3.5、花菁 5 和花菁 5.5 中的一种或几种；所述荧光淬灭基团选自 6-羧基四甲基罗丹明、4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸、黑洞淬灭剂 1、黑洞淬灭剂 2 或黑洞淬灭剂 3 中的一种或几种。

本发明还公开了一种淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒，包括特异性引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B。

进一步地，Taqman 荧光探针 B 核苷酸序列 5' 端标记 6-FAM，3' 端标记 BHQ1。

进一步地，该试剂盒还包括独立包装的病毒裂解液、PCR 反应液、

阳性质控品、阴性质控品，其中病毒裂解液为含有 10 mM Tris、1% SDS、1.0 mM EDTA, pH8.0 的缓冲液，PCR 反应液为探针法荧光定量 PCR 反应液，阴性质控品为灭菌生理盐水，阳性质控品是含有淡水鱼类桑提库珀蛙病毒衣壳蛋白基因的载体。

本发明还公开了一种由上述检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒在检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒中的应用，包括以下步骤：

待检样品使用病毒裂解液采用煮沸裂解法提取 DNA，分别加入到引物探针混合液，再加入 PCR 反应液，混匀后进行荧光定量 PCR，反应条件为 95℃ 条件下反应 5-10 分钟；然后 95℃ 反应 5-15 秒，60℃ 反应 20-45 秒，共 38-45 个循环；荧光信号收集时设定为 FAM，荧光信号收集设在 60℃；

结果判断：如果检测通道没有出现 S 型扩增曲线，判为淡水鱼类桑提库珀蛙病毒阴性；如果检测通道出现 S 型扩增曲线，Ct 值 ≤ 35 ，则淡水鱼类桑提库珀蛙病毒别判定为阳性。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 采用本发明的引物组对淡水鱼类桑提库珀蛙病毒进行检测，因为特异性高，所以可以根据是否扩增就能判断目标基因的存在与否；

2) 本发明的快速诊断试剂盒是利用荧光定量技术快速检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒，检测灵敏度高，扩增模板仅需 36.6 个病毒拷贝；

3) 本发明的快速诊断试剂盒扩增快速且高效，在不到 1h 即可完成扩增，且效率高；

4) 本发明的快速诊断试剂盒操作简单，对检测人员的技术素质要求较低，可建立成本低廉的快速筛选体系，实现现场高通量快速检测；

5) 本发明的快速诊断试剂盒不但使得淡水鱼类桑提库珀蛙病毒定性检测更加简便快速、特异性高、灵敏度高，而且该试剂盒是检测

淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的第一个试剂盒，填补了淡水鱼类桑提库珀蛙病毒无检测方法的缺口，具有很高的科研和经济价值。

当然，实施本发明的任一产品必不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

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 是本发明淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒特异性检测图；其中，1：嗜水气单胞菌； 2：鲫鱼疱疹病毒病毒； 3：鲤鱼浮肿病毒； 4：大口黑鲈动脉炎病毒 5：草鱼出血病病毒； 6：锦鲤疱疹病毒； 7：淡水鱼类桑提库珀蛙病毒； NTC：正常大口黑鲈 DNA 阴性对照；

图 2 是本发明淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒灵敏度检测图；其中 1-10 分别代表 3.66×10^9 copies、 3.66×10^8 copies、 3.66×10^7 copies、 3.66×10^6 copies、 3.66×10^5 copies、 3.66×10^4 copies、 3.66×10^3 copies、 3.66×10^2 copies、 3.66×10^1 copies、 3.66×10^0 copies。

具体实施方式

以下将配合附图及实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。下述所用到的试剂和材料若非特殊说明均为本领域人员的公知常识。

实施例 1

检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的引物探针混合物，其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成，探针 B 的 5' 端标记有荧光报告基团，3' 端标记有荧光淬灭基团。

该引物组 A 包含引物 FSCR V-q102F 和引物 FSCR V-q102R;

所述的引物 FSCR V-q102F 序列如 SEQ ID NO: 1 所示;

所述的引物 FSCR V-q102R 序列如 SEQ ID NO: 2 所示;

所述探针 B 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

其中, 荧光报告基团选自 6-羧基荧光素、六氯-6-甲基荧光素、VIC 荧光染料、四氯-6-羧基荧光素、羧基-X-罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、磺酰罗丹明、6-羧基-4', 5'-二氯-2', 7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯、花菁 3、花菁 3.5、花菁 5 和花菁 5.5 中的一种或几种; 所述荧光淬灭基团选自 6-羧基四甲基罗丹明、4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸、黑洞淬灭剂 1、黑洞淬灭剂 2 或黑洞淬灭剂 3 中的一种或几种。

更优选地, 按照下表 1 所示来选择荧光报告基团和荧光淬灭基团。

表 1

荧光淬灭基团	荧光报告基团
DABCYL	6-FAM、TET、JOE、HEX、Cy3 中的至少一种
TAMRA	6-FAM、TET、JOE、HEX 中的至少一种
BHQ1	6-FAM、TET、JOE、HEX、Cy3 中的至少一种
BHQ2	TAMRA、Cy3、ROX、Texas Red 中的至少一种
BHQ3	Cy5 或 Cy5.5

最优选地, 所述荧光报告基团为 6-FAM ; 所述荧光淬灭基团为 BHQ1。

实施例 2

淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒, 包括独立包装的病毒裂解液、qPCR 反应液、阳性质控品、阴性质控品和引物探针混合液。

引物探针混合液, 其由引物组 A 和 Taqman 荧光探针 B 组成, 其

中引物组 A 上下游引物终浓度均为 0.15 μM , 探针终浓度为 0.1 μM 。

Taqman 荧光探针 B, 其核苷酸序列 5' 端标记 6-FAM, 3' 端标记 BHQ1;

阴性质控品为灭菌生理盐水; 阳性质控品是以提纯的淡水鱼类桑提库珀蛙病毒基因组为模板, 由引物组 A 进行 PCR 扩增, 扩增产物连接载体, 经基因测序确认正确后包装所得的假病毒;

所述的病毒裂解液为含有 10 mM Tris、1% SDS、1.0 mM EDTA, pH8.0 的缓冲液;

所述的 qPCR 反应液为探针法荧光定量 PCR 反应液, 含有 PCR 酶、dNTP、 Mg^{2+} 和 Tli RNase H。

实施例 3

淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒进行应用, 待检样品使用病毒裂解液采用煮沸裂解法提取 DNA, 分别加入到引物探针混合液, 再加入 qPCR 反应液, 混匀后进行荧光定量 PCR, 反应条件为 95°C 条件下反应 5-10 分钟; 然后 95°C 反应 5-15 秒, 60°C 反应 20-45 秒, 共 38-45 个循环; 荧光信号收集时设定为 FAM, 荧光信号收集设在 60°C ;

结果判断:

如果检测通道没有出现 S 型扩增曲线, 判为淡水鱼类桑提库珀蛙病毒阴性; 如果检测通道出现 S 型扩增曲线, Ct 值 ≤ 35 , 则淡水鱼类桑提库珀蛙病毒别判定为阳性。

本发明所述的所述的引物组 A 和探针 B 是针对淡水鱼类桑提库珀蛙病毒衣壳蛋白基因进行设计的, 采用特异性探针的荧光基团捕获来进行结果检测, 具有灵敏度高, 使用方便的特点, 也是国际检测用试剂盒的通用标准。

实施例 4 淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒的应用例

(1) DNA 抽提:

取大口黑鲈肝脏或脾脏组织 10-20mg 于 1.5mL 离心管中, 加入 200 μ L 病毒裂解液混匀用研磨棒研磨粉碎后, 56 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后, 12000rpm 离心 5 分钟; 上清即为提取的病毒核酸, 作为待检模板。

(2) 荧光定量 PCR:

在 9 个反应管中分别加入 PCR 反应液 14.5 μ L, 引物探针混合液 5.5 μ L 配制成反应体系, 然后分别加入 5.0 μ L 待检模板。

荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 分钟; 95 $^{\circ}$ C, 15 秒, 60 $^{\circ}$ C, 45 秒, 40 个循环。

采用 LightCycler 96 System 荧光定量 PCR 仪, 荧光信号收集时设定为 FAM 荧光素, 荧光信号收集设在 60 $^{\circ}$ C。

每批次反应均设置阴性质控品(灭菌生理盐水)、阳性质控品(淡水鱼类桑提库珀蛙病毒假病毒)。

(3) 结果判断: 检测通道没有出现 S 型扩增曲线, 判定为淡水鱼类桑提库珀蛙病毒阴性; 如果检测通道出现 S 型扩增曲线, Ct 值 ≤ 35 , 则淡水鱼类桑提库珀蛙病毒别判定为阳性。

结果验证: 将检测阳性的扩增产物进行基因测序, 测序结果应与淡水鱼类桑提库珀蛙病毒衣壳蛋白基因序列一致。

采用上述淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒和方法进行快速检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒的特异性和灵敏性试验结果如附图 1 和附图 2 所示。

图 1 淡水鱼类桑提库珀蛙病毒特异性检测图, 如图所示, 经 Real-time RT-PCR 定量检测后, 仅淡水鱼类桑提库珀蛙病毒具有特异扩增曲线, 其它病毒和细菌都没有出现扩增曲线, 表明该方法特异性良好。

图 2 淡水鱼类桑提库珀蛙病毒灵敏性检测图, 如图所示, 经 Real-time PCR 定量后的淡水鱼类桑提库珀蛙病毒 DNA 系列稀释的扩增图, 当反应体系中加入 36.6 个病毒拷贝的 DNA, 扩增显色结果就为

阳性。

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内。