



(21)申请号 201910762004.6

(22)申请日 2019.08.19

(71)申请人 西南民族大学

地址 610041 四川省成都市武侯区一环路  
南四段16号

(72)发明人 岳华 汤承 王远微

(74)专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理  
事务所(普通合伙) 51264

代理人 陆岩

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6848(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

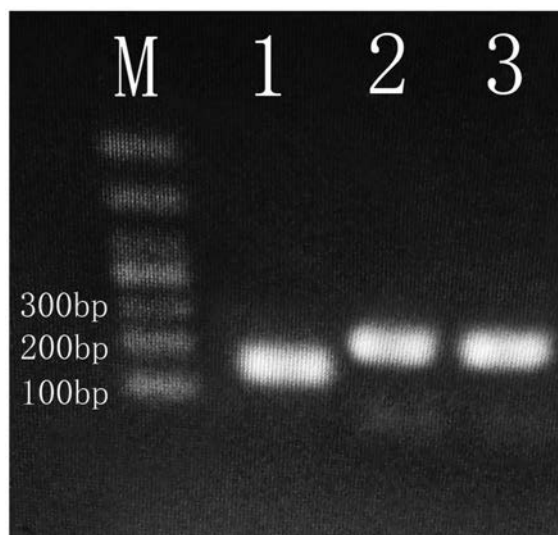
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种可区分污染的PCR阳性对照品的制备方法  
及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种PCR阳性对照品的制备方法,可以明显区分阳性对照品对核酸扩增体系的污染,提高PCR检测的准确性,降低假阳性。将PCR阳性片段的核酸序列从两个引物之间剔除一段序列,然后将其转化克隆工程菌,提取阳性质粒作为对照品,经改造的对照品不影响PCR引物的结合,也不影响PCR产物的扩增效率,而且由于片段长度小于正常阳性样本产物,所以在进行琼脂糖电泳的时候可以显著的区分开来,从而起到区别污染的作用。



1. 一种可区分污染的PCR阳性对照品,其特征在于,阳性对照品是通过将PCR阳性片段的核酸序列从两个引物之间剔除一段序列后获得。

2. 如权利要求1所述的PCR阳性对照品,其特征在于,所剔除的核酸序列的位置可以是两个引物之间的任何位置,但剔除重组后不能形成错配,产生非特异性扩增片段。

3. 如权利要求1所述的PCR阳性对照品,其特征在于,所剔除的核酸序列的长度可以是两个引物之间的任意长度,但重组序列长度要符合PCR扩增的要求,同时满足电泳时可以与原片段区分大小。

4. 根据权利要求1-3任一所述的PCR阳性对照品在所有普通PCR扩增反应中的应用。

5. 根据权利要求1-3任一所述的PCR阳性对照品在所有普通PCR检测试剂盒中的应用。

## 一种可区分污染的PCR阳性对照品的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,提供一种核酸扩增体系的阳性对照品的制备方法,用该方法制备的对照品与正常样本同时进行PCR扩增,目的条带可以有效区分。

### 背景技术

[0002] PCR是一种极灵敏的核酸扩增技术,易受污染的影响。阳性对照品是主要污染源之一。由于拷贝数量极大,在PCR扩增时的开盖、摇动、吸样过程中与空气接触形成气溶胶体,散步在实验区域环境中,造成严重的污染现象,产生假阳性结果,严重干扰PCR检测的准确性。为了解决这一难题,国内外的研究者提出了许多种PCR防污染技术,其中物理隔绝法,紫外照射法,水解法以及加强对操作人员的标准化操作培训等方法在目前的PCR实验中普遍应用。虽然这些技术已被实践证明能有效控制污染,但是这些方法都是只是起到预防的作用,对于已经产生了污染,则无法准确的区分。

[0003] 阳性对照品多采用经过纯化和规定浓度的阳性质粒、核酸扩增产物或者人工合成核酸片段,浓度高达 $10^8$ 拷贝/ $\mu$ l,因此在诊断试剂的研发和使用过程中阳性对照品对于正常样本的污染很难避免。

[0004] 因此研究出一种可以区分污染的PCR阳性对照品,对于检测的可靠性具有重要的意义。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明公开了一种PCR阳性对照品的制备方法,可以明显区分阳性对照品对核酸扩增体系的污染,提高PCR检测的准确性,降低假阳性。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明公开了一种可区分污染的PCR阳性对照品,阳性对照品是通过将PCR阳性片段的核酸序列从两个引物之间剔除一段序列后获得,然后将序列克隆到T载体上,提取阳性质粒制备而成。

[0007] 可选地,所述的PCR阳性对照品所剔除的核酸序列的位置可以是两个引物之间的任何位置,但剔除重组后不能形成错配,产生非特异性扩增片段。

[0008] 可选地,所述的PCR阳性对照品所剔除的核酸序列的长度可以是两个引物之间的任意长度,但重组序列长度要符合PCR扩增的要求,同时满足电泳时可以与原片段区分大小。

[0009] 本发明还公开了一种上述的PCR阳性对照品在所有普通PCR扩增反应中的应用。

[0010] 本发明还公开了一种上述的PCR阳性对照品在所有普通PCR检测试剂盒中的应用。

[0011] 与现有技术相比,本发明可以获得包括以下技术效果:

1) 本发明在普通PCR中的应用,电泳后可以一目了然的观察到是否有阳性质粒的污染存在,保证PCR检测的客观准确。

[0012] 2) 本发明阳性对照品的制备简单,核酸的合成、克隆以及质粒的提取都是阳性质粒的常规制备方法,不增加步骤,不增加成本。

[0013] 3) 本发明的适用面广泛,所有普通PCR方法都可以采用。

[0014] 4) 本发明与其它PCR防污染的方法相对,操作简单,可以有效区分PCR扩增体系中是否存在阳性质粒的污染。

[0015] 当然,实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

[0016]

## 附图说明

[0017] 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是非洲猪瘟普通PCR扩增序列以及剔除序列标记位置;

图2是非洲猪瘟重组序列的测序结果;

图3是制备的非洲猪瘟重组阳性质粒与未经过改造的原始质粒PCR扩增条带的比较;其中,M: DNA marker I;1:本发明制备的重组阳性质粒;2-3:未经过改造的阳性质粒。

## 具体实施方式

[0018] 以下将配合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。

[0019] 实施例1 一种检测非洲猪瘟普通PCR方法的阳性对照品的制备

该阳性对照品的制备包括以下步骤:

### (1) 剔除序列的选取及序列的合成

非洲猪瘟的普通PCR扩增片段大小是250bp(如图1所示),经对序列分析,选择从第43个碱基开始剔除,长度为70个碱基(如图1中标记下划线),剔除后序列长度为180bp,剔除后序列与引物不产生错配,没有非特异性扩增,长度相差70bp,在进行电泳的时候可以明显分开,符合剔除原则,将序列送到上海生工生物工程有限公司合成,备用。

### [0020] (2) 重组序列的克隆测序

将合成的重组片段与PMD19-T载体连接过夜,构建重组质粒,然后将重组质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,挑取白色阳性克隆菌进行扩繁,然后提取重组质粒。对重组质粒进行双酶切鉴定,双酶切反应采用20 $\mu$ L反应体系:其中含质粒16 $\mu$ L,酶S $\alpha$ I 0.5 $\mu$ L,XB $\alpha$ I 0.5 $\mu$ L,1.5 $\times$ T Buffer 3 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C反应2 h,观察结果。阳性样本送上海生工生物工程有限公司对重组质粒中的插入片段进行序列测定,测定结果如图2所示,测序结果与合成序列一致。然后按文献方法计算重组质粒的拷贝数,重组质粒即为本研究的阳性对照品。

### [0021] (3) 重组序列和原始序列的PCR扩增比较

将重组序列和原始序列的质粒浓度调整一致,然后进行PCR扩增,反应采用25 $\mu$ L反应体系;其中含质粒模板1 $\mu$ L,上下游引物各1 $\mu$ L (10 $\mu$ mol/L),dNTP 2 $\mu$ L (2.5mM),TaqDNA聚合酶 (5U/ $\mu$ L) 0.2 $\mu$ L,250mM MgCl<sub>2</sub> 2.0 $\mu$ L,5 $\times$ PCR buffer 2.5 $\mu$ L,用超纯水补足至25 $\mu$ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性10min,95 $^{\circ}$ C 15s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸10min,扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果如图3所示,重组序列和原始序列都有目的条带扩增,亮度接近,重组序列的扩增片段大小在DNA marker 的200bp位置以下,原始序列的扩增片段大小在DNA marker 的200bp和300bp中间的位置。可以明显区分出两个条带,从而达

到区分污染的目的。

[0022] 上述说明示出并描述了发明的优选实施例,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。

CTGCTCATGG	TATCAATCTT	ATCGATAAAT	TTCCATCAAA
GTTCTGCAGC	TCTTACATAC	CCTTCCACTA	CGGAGGCAAT
GCGATTAAAA	CCCCCGATGA	TCCGGGTGCG	ATGATGATTA
CCTTTGCTTT	GAAGCCACGG	GAGGAATACC	AACCCAGTGG
TCATATTAAC	GTATCCAGAG	CAAGAGAATT	TTATATTAGT
TGGGACACGG	ATTACGTGGG	GTCTATCACT	ACGGCTGATC
TTGTGGTATC			

图1

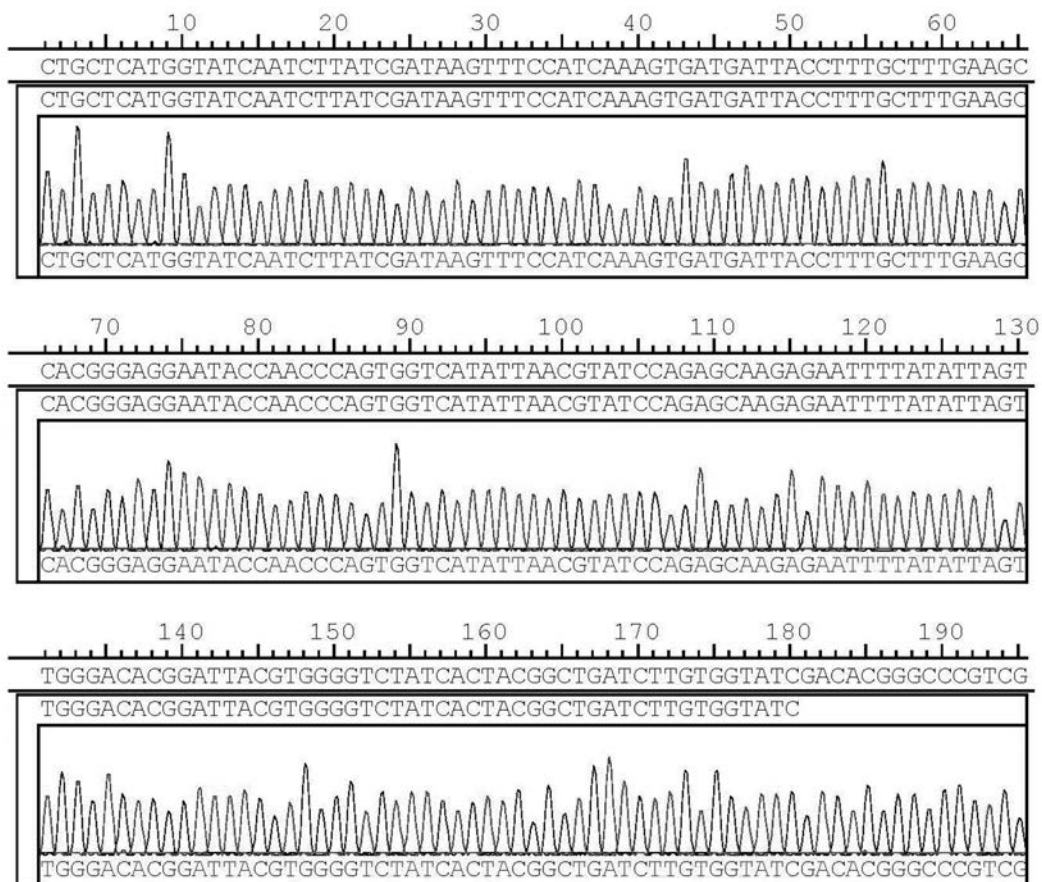


图2

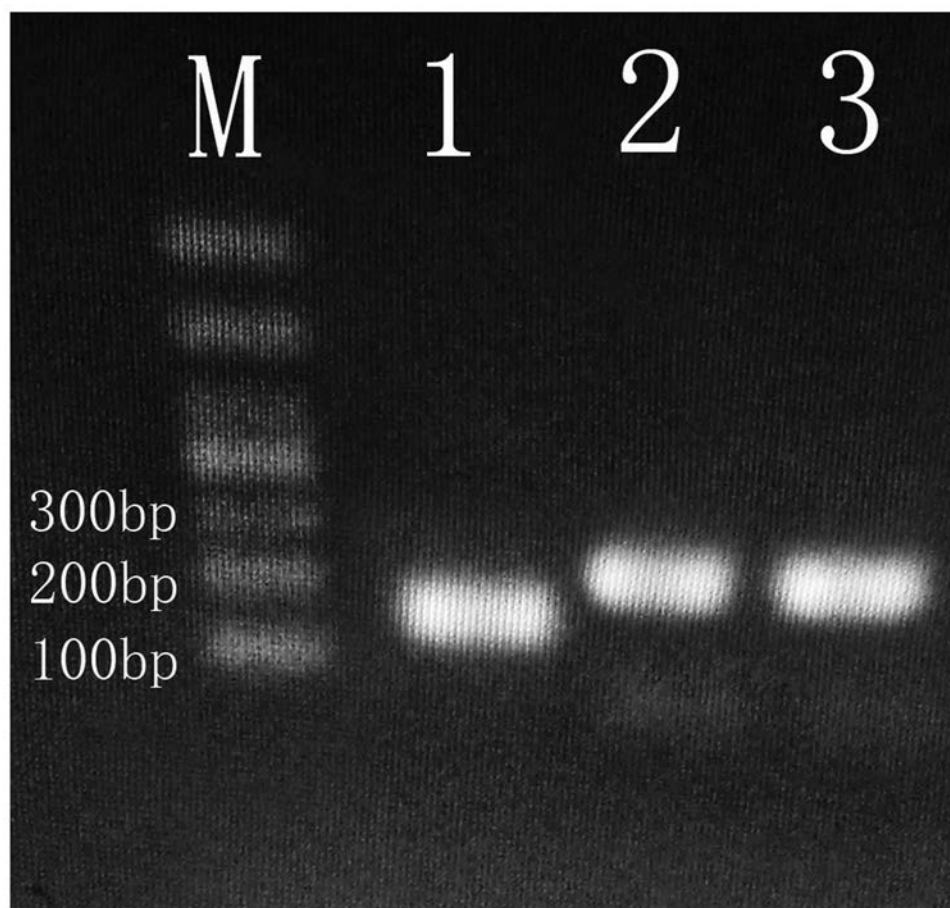


图3