



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106148481 A

(43) 申请公布日 2016. 11. 23

(21) 申请号 201510107681. 6

(22) 申请日 2015. 03. 12

(71) 申请人 成都大学

地址 610106 四川省成都市龙泉驿区外东十陵镇

申请人 四川出入境检验检疫局检验检疫技术中心
成都农业科技职业学院

(72) 发明人 肖艳 林华 陈世界 陈晓春
杨苗

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

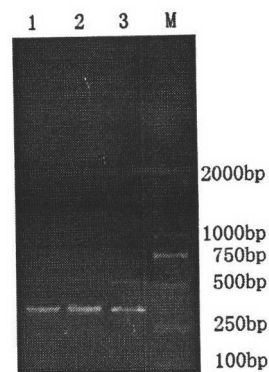
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于聚合酶链式反应检测方法及其试剂盒的阳性对照组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于聚合酶链式反应检测方法及其试剂盒的阳性对照组合物及其制备方法, 其特征在于提供一种或多种与靶序列片段大小不同, 但能被检测引物扩增的模板作为阳性扩增对照, 经引物扩增后的片段长度与目的基因长度不相同; 同时, 在阳性对照组合物中含有与目的基因长度一致的非目标序列的指示分子; 通过电泳检测, 判断电泳条带大小进行结果判定。本发明方法所制备的阳性扩增对照和指示分子既能准确的对检测结果进行准确判定, 也能够避免因阳性模板的污染而产生的干扰。



1. 一种用于聚合酶链式反应检测方法及试剂盒的阳性对照组合物及其制备方法,其具体特征如下:

(1) 提供一种或多种与目标序列片段大小不同,但能被检测引物扩增的模板作为阳性扩增对照;

(2) 该对照组合物包含一种与目的基因长度一致的非目标序列的指示分子。

2. 权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于体系中扩增引物能够与阳性扩增对照进行有效识别,能够引起扩增反应;体系中的扩增引物不能与指示分子识别,不能引起核酸扩增反应。

3. 权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于阳性扩增对照序列长度与目标序列不同;指示分子与目标序列长度相同,核酸碱基序列可以是部分相同或全部不相同。

4. 权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于用于扩增体系的阳性扩增对照,在一个扩增体系中可以是一种也可以是多种,因此,阳性扩增体系经扩增后的片段,可以是一条或多条片段;指示分子有且只有一条。

5. 权利要求 1 和 4 所述的制备方法,其特征在于阳性对照组合物经体系中的指示分子可以在阳性对照扩增之前加入扩增体系中,扩增反应结束后直接进行电泳检测;也可以在扩增反应结束后,与阳性扩增对照扩增产物按一定比例混合后进行检测;也可以阳性扩增对照和指示分子分别进行电泳检测;阳性对照组合物中也可以不含有指示分子,单独使用阳性扩增对照;检测结果根据阳性对照组合物各片段大小进行判定。

一种用于聚合酶链式反应检测方法及试剂盒的阳性对照组 合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于核酸检测领域,涉及一种用于聚合酶链式反应方法和试剂盒的阳性对照,特别涉及一种用于聚合酶链式反应方法和试剂盒的阳性对照组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术具有灵敏度高,特异性强,操作简单快捷等优点,已在多个领域得到广泛地应用。PCR 的整个技术过程经若干个循环组成,一个循环经过变性、退火、延伸 3 个连续过程后,合成了新链,新链又可作为 DNA 模板参与下一轮的复制,由此循环进行。一般单一拷贝的基因进行 25-30 次循环扩增后, DNA 分子可增加 100 万 -200 万倍。由于 PCR 灵敏度特别高,在扩增过程中容易受到多种因素的影响,例如有时在样品中包含有抑制性物质,可产生假阴性结果,或者是由于污染产生假阳性结果。因此,为了将检测过程中的假阳性和假阴性结果最小化,通常均需要使用阳性和阴性对照。在每次 PCR 检测过程中,只有在阳性对照和阴性对照都成立的前提下,才能对检测样品进行判定。引物与目标序列的结合是 PCR 反应中最关键的影响因素之一,因此,应尽量使用与目标序列具有相同引物结合位点的阳性对照,已验证 PCR 检测体系是否能够进行有效的扩增。但与此同时,由于阳性对照的引入,又使得聚合酶链式反应存在潜在的污染风险。由于现在的阳性对照与目标序列扩增大小一致,一旦阳性对照污染后,通过普通凝胶电泳无法对污染阳性和检测样品阳性进行区分,从而造成假阳性结果的判断。因此,亟需一种既能反应 PCR 检测体系是否正常扩增,能够快速排除阳性对照污染的阳性对照。

发明内容:

[0003] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足,提供一种既能满足聚合酶链式反应阳性对照设置要求,又能排除阳性对照污染的阳性组合物对照,特别是阳性对照组合物及其制备方法,该方法制得的阳性对照既满足聚合酶链式反应对阳性对照的要求,同时又能够通过琼脂糖电泳发现和判别由阳性对照引入的污染。

[0004] 本发明的目的是通过如下技术方法实现的。本发明提供了一种普通聚合酶链式反应试剂盒的阳性对照组合物的制备方法,其特征在于选取一种与目标序列具有相同引物结合位点,但扩增片段大小有差异的阳性对照模板,同时引入与目标序列大小相同的非扩增片段作为指示分子。

[0005] 本发明的一个方面,普通聚合酶链式反应试剂盒的阳性对照组合物的制备方法,选取与目标序列具有相同引物结合位点,但扩增片段大小有差异的基因序列作为阳性对照模板。该模板可以在靶序列的引物结合位点外任意位点进行缺失、插入等操作,并且突变后的序列不能干扰引物与靶序列相关位点的结合,也不能引起引物的非特异性扩增。该模板经引物扩增后,片段大小与目标序列大小不一致。

[0006] 本发明的另一个方面,与目标序列大小相同的非扩增片段作为指示分子选取与引

物扩增序列大小一致,且对反映体系不能产生干扰。指示分子可以与阳性模板混合使用,也可以在扩增结束后,加入阳性对照体系中进行电泳或单独进行电泳。

[0007] 本发明在具体实施过程中该阳性对照模板的存在形式,可以装载于各类基因工程载体,如质粒载体、病毒载体、细菌人工染色体载体等,也可以是经酶切、聚合酶链式反应扩增后的线性形式存在。非扩增片段指示分子的存在形式为线性 DNA 分子。

[0008] 本发明的具体实施方式中,适用于聚合酶链式反应方法和试剂盒,也适用于反转录聚合酶链式反应方法和试剂盒。

[0009] 与现有技术相比,本发明制备的阳性对照既能够反应检测体系中引物与模板的结合及扩增情况,扩增大小与目标序列大小不同,从而能够快速识别阳性对照引起的污染,同时指示分子的引入也利于对检测结果进行判断,从而避免了现有技术中阳性模板对检测结果污染后难以判别的缺点。

附图说明

[0010] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作进一步的详细描述,其中:

[0011] 图 1. 本发明聚合酶链式反应扩增结果在电泳检测的图谱,其中:M 为 DL2000mark DNA,1. 为 PCV 检测阳性样品,大小为 386bp,2. 236bp 阳性扩增对照和 386bp 指示分子 3. 586bp 阳性扩增对照和 386bp 指示分子。

具体实施方式:

[0012] 下面结合附图和具体实例对本发明做进一步说明,但不作为对本发明的限定。

[0013] 1. 试验材料

[0014] 1.1 主要试验仪器

[0015] 伯乐 C-1000PCR 仪、伯乐 C1000PCR 仪、超低温冰箱、紫外分光光度计、高速离心机、电泳仪、化学发光凝胶成像系统

[0016] 1.2 试验材料

[0017] 病毒 DNA/RNA 磁珠法提取试剂盒购自成都拓洋科技有限公司;PCR 产物纯化试剂盒、Taq Plantinum PCR MasterMix 购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA 分子量标准、琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒 pGFP-n3 由四川出入境检验检疫局技术中心保存;其他试剂均为国产分析纯。圆环病毒疫苗株由海利公司生产提供。引物送成都擎科生物科技有限公司合成,见下表。

[0018]

名称	序列	长度 bp
----	----	-------

[0019]

PCV-F	CAACGGTCACCAGACTCC	18
PCV-R	AAGAAGCGGACCCCAACCAC	20

eGFP-F	GAACCATCTTCTTCAAGGACGAC	23
eGFP-R	CACGAAGTCCAGCAGGACCAT	21

[0020] 阳性模板送成都擎科生物科技有限公司进行基因合成。

[0021] 2 实验方法

[0022] 2.1 阳性模板的制备

[0023] 2.1.1 阳性模板 1 的制备

[0024] 在目标序列内部插入 200bp 非 PCV 基因序列,通过基因合成方式合成阳性模板,阳性扩增对照 1 大小为 586bp,具体序列如下:

[0025] CAACGGTCACCAGACTCCCGCTCTCCAACAAGGTACTCACAGCAGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCCTTGAGATCGAGGAGCTCCACATTCAATAAGTAAGTTGCCTTCTTTACTGCAATATTCTTTATTCTGCTGATCAGTTCTTTGGCTTTCTCGATGTGGCAG

AGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG

CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCC

CGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTTATTAAGTTTGTCTTCTTCAAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTGTCCTTCCTCATTACCCTCCTCGCCACAATAAAATAATCAAACAGGGAGATTGGGAGCTCCCGTATTTTCTTGCCTCGTCTTCGGAAGGATTATTACGCGTGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGGGGTCCGCTTCTT

[0026] 合成的基因序列克隆到 pMDT-18 载体,转化大肠杆菌 TOP10,经培养后进行质粒提取,使用微量紫外分光光度计测定出质粒的浓度,并经过计算,确定其拷贝数,置于 -20℃ 低温保存。

[0027] 2.1.2 阳性模板 2 的制备

[0028] 在目标序列内部删除 150bp 非 PCV 基因序列,通过基因合成方式合成阳性模板,阳性扩增对照 2 片段大小为 236bp,具体序列如下:

[0029] C A A C G G T C A C C A G A C T C C C G C T C T C C A A C A A G G T A C T C **ACAGCAGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCCTTGAGATCGAG**

GAGCTCCACATTCAATAAGTAAGTTGCCTTCTTTACTGCAATATTCTTTATTCTGCTGATCAGTTCTTTGGCTTTCTCGAT

GTGGCAGCGGGCACCCAAATACCACTTCACTTTATTAAGTTTGCTTCTTCAAAAATTAGCGAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTGTCCTTCCTCATTACCCTCCTCGCCACAAT AAATAATCAAACAGGGAGATTGGGAGCTCCCGTATTTTCTTGCCTCGTCTTCGGAAGGATTATTACGCGTGAACACCCACCTTTTATGTGGTTGGGGTCCGCTTCTT

[0030] 合成的基因序列克隆到 pMDT-18 载体,转化大肠杆菌 TOP10,经培养后进行质粒提取,使用微量紫外分光光度计测定出质粒的浓度,并经过计算,确定其拷贝数,置于 -20℃ 低温保存。

[0031] 2.2 指示分子的制备

[0032] 以适当浓度 pGFP-n3 质粒为模板,采用引物 eGFP-F 和 eGFP-R 进行 PCR 扩增,反应体系为:25 μl 体系, Taq Plantinum PCR MasterMix 12.5 μL,模板 2 μL,上下游引物各 0.5 μL,,其余用灭菌蒸馏水补足 25 μL。反应条件为 94℃ 3min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;72℃ 5min。PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后,置于 -20℃ 低温保存。

[0033] 3.3 PCR 反应操作程序

[0034] 以适当阳性模板 1 或阳性模板 2 质粒为模板,采用引物 PCV-F 和 PCV-R 进行 PCR 扩增,反应体系为:25 μ l 体系,Taq Plantinum PCR MasterMix 12.5 μ l,模板 2 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,,其余用灭菌蒸馏水补足 25 μ l。反应条件为 94℃ 3min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;72℃ 5min。

[0035] 4 试验结果

[0036] 将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,阳性扩增对照 1 出现预期的 586bp 扩增带,阳性扩增对照 2 出现 236bp,指示分子大小 386bp。可以取阳性扩增对照、指示分子混合后,进行电泳,也可以分别进行阳性扩增对照和指示分子的电泳。结果见图 1。

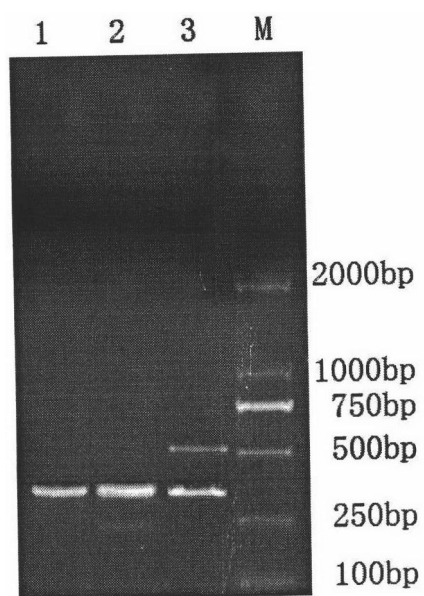


图 1