



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113897458 A

(43) 申请公布日 2022.01.07

(21) 申请号 202110613236.2

(22) 申请日 2021.06.02

(71) 申请人 浙江省淡水水产研究所

地址 313001 浙江省湖州市杭长桥南路999号

(72) 发明人 潘晓艺 蔺凌云 沈锦玉 巩金鹏
姚嘉赞 尹文林 黄雷 袁雪梅

(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 韩晓银

(51) Int.Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

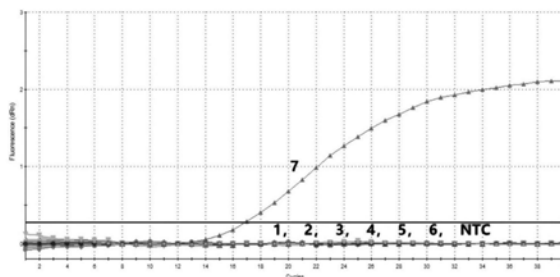
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

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

(57) 摘要

本发明公开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,其中,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;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引物组和试剂盒。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。



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

2. 根据权利要求1所述的引物探针混合物, 其特征在于, 所述引物组A包含引物FSCRV-q102F和引物FSCRV-q102R;

所述的引物FSCRV-q102F的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

所述的引物FSCRV-q102R的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;

所述Taqman荧光探针B的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

3. 根据权利要求1所述的淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测探针B, 其特征在于, 所述荧光报告基团选自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。

4. 一种淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 包括特异性引物组A和Taqman荧光探针B。

5. 根据权利要求4所述的检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, Taqman荧光探针B核苷酸序列5'端标记6-FAM, 3'端标记BHQ1。

6. 根据权利要求4所述的检测淡水鱼类桑提库珀蛙病毒荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒还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, 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, qPCR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。

7. 一种由权利要求4所述的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, 其特征在于, 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10分钟; 然后95℃反应15秒, 60℃反应45秒, 共40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。

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

[0001] 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

[0002] 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

[0003] 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,能够实现快速、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。

[0004] 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。

[0005] 进一步地,引物组A包含引物FSCRV-q102F和引物FSCRV-q102R;

[0006] 引物FSCRV-q102F的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0007] 引物FSCRV-q102R的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;

[0008] 探针的B的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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10mM Tris、1%SDS、1.0mM 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。

[0013] 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:

[0014] 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℃;

[0015] 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判定为阳性。

[0016] 与现有技术相比,本发明可以获得包括以下技术效果:

[0017] 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;

[0018] 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;

[0019] 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;

[0020] 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;

[0021] 8)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。

[0022] 当然,实施本发明的任一产品不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

[0023] 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:

[0024] 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;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;

[0025] 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

[0026] 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。

[0027] 实施例1

[0028] 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。

[0029] 该引物组A包含引物FSCR V-q102F和引物FSCR V-q102R;

[0030] 所述的引物FSCR V-q102F序列如SEQ ID NO:1所示;

[0031] 所述的引物FSCR V-q102R序列如SEQ ID NO:2所示;

[0032] 所述探针B的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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

[0037] 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。

[0038] 实施例2

[0039] 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。

[0040] 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 μ M,探针终浓度为0.1 μ M。

[0041] Taqman荧光探针B,其核苷酸序列5'端标记6-FAM,3'端标记BHQ1;

[0042] 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；

[0043] 所述的病毒裂解液为含有10mM Tris、1%SDS、1.0mM EDTA,pH8.0 的缓冲液；

[0044] 所述的qPCR反应液为探针法荧光定量PCR反应液,含有PCR酶、dNTP、Mg²⁺和Tli RNase H。

[0045] 实施例3

[0046] 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℃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℃;

[0047] 结果判断:

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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

[0051] (1) DNA抽提:

[0052] 取大口黑鲈肝脏或脾脏组织10-20mg于1.5mL离心管中,加入200μL 病毒裂解液混匀用研磨棒研磨粉碎后,56℃水浴10min后,12000rpm离心 5分钟;上清即为提取的病毒核酸,作为待检模板。

[0053] (2) 荧光定量PCR:

[0054] 在9个反应管中分别加入PCR反应液14.5μL,引物探针混合液5.5μ L配制成反应体系,然后分别加入5.0μL待检模板。

[0055] 荧光定量PCR反应条件:95℃,10分钟;95℃,15秒,60℃,45秒, 40个循环。

[0056] 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℃。

[0057] 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)。

[0058] (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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

序列表

<110> 浙江省淡水水产研究所

<120> 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

<130> 2021

<141> 2021-06-02

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 1

actggccacc acctctactc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 2

agacacgttg atgcttgctg 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 3

acgccctgag cctcaacgat cc 22

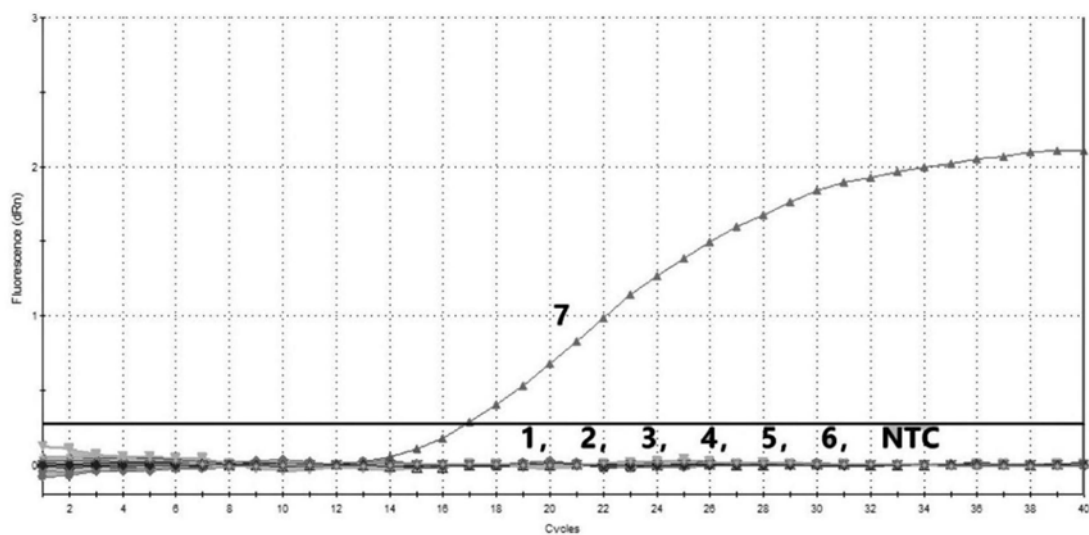


图1

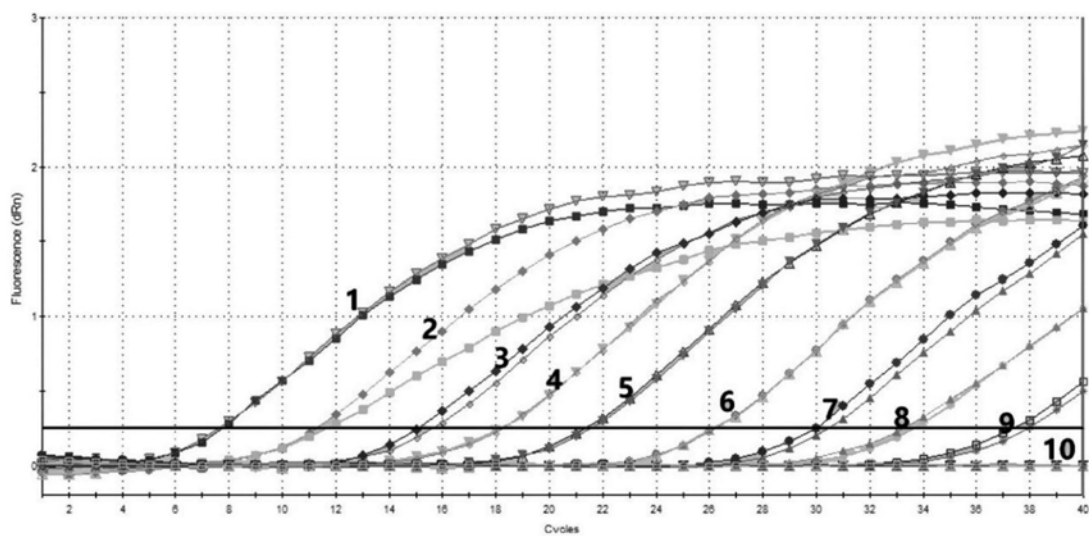


图2