



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104099428 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201410327903. 0

(22) 申请日 2014. 07. 10

(71) 申请人 北京出入境检验检疫局检验检疫技  
术中心

地址 100026 北京市朝阳区甜水园街 6 号

申请人 中国检验检疫科学研究院  
北京海森通生物科技有限公司

(72) 发明人 张利峰 李江宇 凌凤俊 任彤  
高志强 谷强 张伟 王树云  
刘艳华 王娜 景宏丽 张旻  
贾佩峤 江育林

(74) 专利代理机构 北京正理专利代理有限公司  
11257

代理人 赵晓丹

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

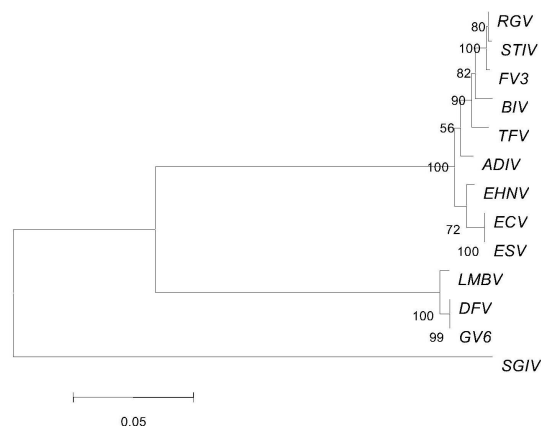
权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图9页

### (54) 发明名称

一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR  
引物、探针和试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物、探针和试剂盒。所述引物如序列 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :2 所示,所述探针如序列 SEQ ID NO :3 至 SEQ ID NO :5 所示。本发明试剂盒灵敏、快速、准确,能同时对 13 种蛙病毒属病毒进行检测,这项技术在外来重大水生疫病蛙病毒属病毒的监控中具有非常大的应用前景。



1. 一组鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物和探针,其特征在于,所述引物如序列 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :2 所示,所述探针如序列 SEQ ID NO :3 至 SEQ ID NO :5 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物和探针,其特征在于,所述序列 SEQ ID NO :3 为鉴别沼泽绿牛蛙虹彩病毒、中华鳖虹彩病毒、虹彩病毒 3 型、饰纹汀蟾(穴居蛙)虹彩病毒、虎纹蛙病毒、大鲵虹彩病毒、流行性造血器官坏死症病毒、欧洲鲕鱼病毒和欧鲶病毒的探针,并且 5' 端标记 FAM 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团;

所述序列 SEQ ID NO :4 为鉴别大口黑鲈病毒、裂唇鱼病毒和孔雀鱼病毒 6 型的探针,并且 5' 端标记 HEX 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团;

所述序列 SEQ ID NO :5 为鉴别新加坡石斑鱼虹彩病毒的探针,并且 5' 端标记 CY5 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ3 淬灭基团。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物和探针在制备鉴别蛙病毒属病毒的实时荧光 PCR 试剂盒中的应用。

4. 一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 试剂盒,其特征在于,其包括以下组分:

(1)DNA 提取试剂;

(2)PCR 反应液:包括如序列表 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO :2 所示的用于鉴别蛙病毒属病毒的引物,如序列表 SEQ ID NO :3 至 SEQ ID NO :5 所示的探针;

(3)Taq DNA 聚合酶;

(4) 无菌双蒸水;

(5) 阴性对照;

(6) 阳性对照。

5. 根据权利要求 4 所述的鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 试剂盒,其特征在于,所述序列 SEQ ID NO :3 为鉴别沼泽绿牛蛙虹彩病毒、中华鳖虹彩病毒、虹彩病毒 3 型、饰纹汀蟾(穴居蛙)虹彩病毒、虎纹蛙病毒、大鲵虹彩病毒、流行性造血器官坏死症病毒、欧洲鲕鱼病毒和欧鲶病毒的探针,并且 5' 端标记 FAM 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团;

所述序列 SEQ ID NO :4 为鉴别大口黑鲈病毒、裂唇鱼病毒和孔雀鱼病毒 6 型的探针,并且 5' 端标记 HEX 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团;

所述序列 SEQ ID NO :5 为鉴别新加坡石斑鱼虹彩病毒的探针,并且 5' 端标记 CY5 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ3 淬灭基团。

6. 根据权利要求 4 所述的鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 试剂盒,其特征在于,所述 PCR 反应液还包括缓冲液、MgCl<sub>2</sub> 和 dNTP。

7. 一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 检测方法,所述方法包括:

(1) 用 DNA 提取试剂同时提取阳性对照、阴性对照以及待测样本中的核酸 DNA 作为 PCR 检测模板;

(2) 进行 PCR 反应;

(3) 结果判定。

## 一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物、探针和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物、探针和试剂盒,可同时筛查 13 种蛙病毒属病毒,属于检验检疫领域。

### 背景技术

[0002] 近年来,由虹彩病毒科蛙病毒属引起的鱼类、两栖类和爬行类的疾病遍布全球,涉及许多组织系统性感染疾病,出现病症后的宿主动物死亡率高达 100%,给水产业造成了非常大的经济损失。在亚洲、大洋洲、欧洲、北美洲和南美洲等地区从自然生存、养殖、健康以及死亡的蛙中均分离到了蛙病毒属病毒,蛙病毒属已被世界动物卫生组织 (OIE) 规定为必须申报的水生动物疫病之一。

[0003] 蛙病毒属属于虹彩病毒科,为裸露或有囊膜的二十面体病毒粒子,病毒直径约 150 ~ 170nm,基因组是单一线状双链 DNA,全长为 150 ~ 170kb,GC 含量为 49% ~ 55%,在细胞核和细胞质中都能复制。其结构蛋白主衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 占整个病毒粒子多肽的 40 ~ 45%,具有高度的保守性,又具有足够的变异性,氨基酸同源性达 65.9%,是虹彩病毒进化和分类的重要依据,所以本发明利用 MCP 的同源性差异进行蛙病毒属病毒的鉴别和区分,该方法是可靠的。

[0004] 由于蛙病毒属病毒的基因序列相似性达 90% 以上,所以设计特异的引物和探针对于区分和鉴别蛙病毒属病毒非常关键。目前,研究者们建立了虹彩病毒蛙病毒属实时荧光 PCR 的检测方法、虎纹蛙病毒 (tiger frog virus, TFV) 的普通 PCR 方法、大口黑鲈虹彩病毒 (Largemouth bass virus, LMBV) 的双重 PCR 检测方法以及大鲵虹彩病毒 ADIV (Andrias davidianus iridovirus) TaqMan 实时荧光定量 PCR 的检测方法,上述方法,对于同一个检测样本,最多能鉴别和区分 2 种蛙病毒属病毒,而本发明第一次建立了蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 方法,对于同一个检测样本,可同时鉴别和区分 13 种蛙病毒属病毒,降低了检测成本,节省了检测时间,实现了高通量处理样本的简便性,该方法具有快速性、准确性和高灵敏性的特点。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种简便、快速、灵敏、特异和高效的鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物、探针和试剂盒。该方法检测覆盖蛙病毒属病毒种类多,是一种特异性强,准确性高、灵敏性高的检测方法。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 本发明提供一组鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物和探针,其中,采用一对通用引物,正向引物为 5' -ATGGTGCARAACGTCA-3' (SEQ ID NO:1),反向引物为 5' -GCTCCA KSACSGTGTT-3' (SEQ ID NO:2)。

[0008] 所述探针如下所示:

[0009] 探针 1 :5' -CTTCCGTCGGCTCCAATTACACC-3' (SEQ ID NO :3)

[0010] 探针 2 :5' -CCAACAACAGGAGTGACGCAAGTG-3' (SEQ ID NO :4)

[0011] 探针 3 :5' -CTGTGGGTTCAAATTATACGTGTGT-3' (SEQ ID NO :5)

[0012] 其中,所述序列 SEQ ID NO :3 为鉴别沼泽绿牛蛙虹彩病毒 RGV(Rana grylio virus)、中华鳖虹彩病毒 STIV(Soft-shelled Turtle iridovirus)、虹彩病毒 3 型 FV3(frog virus3)、饰纹汀蟾(穴居蛙)虹彩病毒 BIV(Limnodynastes ornatus or boheli iridovirus)、虎纹蛙病毒 TFV(tiger frog virus)、大鲵虹彩病毒 ADIV(Andrias davidianus iridovirus)、流行性造血器官坏死症病毒 EHN(Epizootic hematopoietic necrosis virus)、欧洲鲶鱼病毒 ECV(European catfish iridovirus) 和欧鲶病毒 ESV(European sheatfish iridovirus) 的探针,并且 5' 端标记 FAM 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团。

[0013] 所述序列 SEQ ID NO :4 为鉴别大口黑鲈病毒 LMBV(Largemouth bass virus)、裂唇鱼病毒 DFV(doctor fish virus) 和孔雀鱼病毒 6 型 GV6(guppy virus6) 的探针,并且 5' 端标记 HEX 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ1 淬灭基团;LMBV、DFV 和 GV6 统称为 SCR(Santee-Cooper ranavirus)。

[0014] 所述序列 SEQ ID NO :5 为鉴别新加坡石斑鱼虹彩病毒 SGIV(Singapore grouper iridovirus) 的探针,并且 5' 端标记 CY5 荧光报告基团,3' 端标记 BHQ3 淬灭基团。

[0015] 我们采用 TaqMan 荧光 PCR 检测技术建立了鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 方法,对反应的各种条件进行了优化,其中包括引物探针的筛选,Mg<sup>2+</sup> 浓度的优化,引物和探针浓度的优化,得到以下试剂盒。

[0016] 鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 试剂盒,由以下组分组成:

[0017] 1)DNA 提取试剂:可以使用现有技术中已知的提取试剂,也可以采用商业化的提取试剂盒,本发明的 DNA 提取试剂购自天根生化科技有限公司。

[0018] 2)PCR 反应液,表 1 为优化后的 PCR 反应液配方。

[0019] 表 1PCR 反应液配方

[0020]

组分	终浓度
10×recreation buffer	1×recreation buffer
25mM MgCl <sub>2</sub>	3.0mM
10mM dNTP	0.2mM
正向引物	0.8 μ M
反向引物	0.8 μ M
探针 1	0.25 μ M
探针 2	0.25 μ M

探针 3	0.25 $\mu$ M
------	--------------

[0021] 10×recreation buffer, 25mM  $MgCl_2$  购于 Promega 公司 ;10mM dNTP 购自生工生物工程（上海）股份有限公司,引物和探针均委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

[0022] 3) Taq DNA 聚合酶 5U/ $\mu$  L, 购自 Promega 公司。

[0023] 4) 无菌双蒸水 :用自来水两次蒸馏,经过 Millipore MILLI-Q PF PLUS 纯水仪纯化,收取电阻率 $\geq 18.0 M\Omega \cdot cm$  的水,151 bf/in<sup>2</sup> ( $1.034 \times 10^5 Pa$ ) 高压蒸汽灭菌 15 分钟。

[0024] 5) 阴性对照 :无菌双蒸水。

[0025] 6) 阳性对照 :灭活的病毒培养液。

[0026] 一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 检测方法,其步骤如下 :

[0027] 1) 用 DNA 提取试剂同时提取试剂盒中的阳性对照、阴性对照以及待测样本中的核酸 DNA 作为 PCR 检测模板 ;

[0028] 2) PCR 反应体系配置 :加入上述表 1 中的荧光定量 PCR 反应液 ;Taq DNA 聚合酶 2.5U ;模板 10  $\mu$  L ;用无菌双蒸水补足总体积至 25  $\mu$  L ;

[0029] 3) PCR 扩增参数设置 :

[0030] 我们针对 Roche Light Cycler480 II 荧光 PCR 检测仪,扩增参数如下 :第一阶段 :94 $^{\circ}C$  /3min ;第二阶段 :94 $^{\circ}C$  /15s, 54 $^{\circ}C$  /15s, 60 $^{\circ}C$  /30s, 40 个循环,60 $^{\circ}C$  延伸时收集荧光 ;

[0031] 4) 质控标准 :阴性对照无  $C_t$  值并且无扩增曲线 ;阳性对照的  $C_t \leq 30.0$ , 并出现典型的“S”型扩增曲线。如阴性对照和阳性对照条件不满足以上条件,此次实验视为无效。

[0032] 5) 结果的判定 :在 FAM 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且  $C_t \leq 30.0$ , 判断为 RGV、STIV、FV3、BIV、TFV、ADIV、EHNV、ECV 和 ESV 病毒中的某一种为阳性,如图 2,具体鉴定到种可通过 PCR 或酶切等方法进行进一步鉴定 ;在 HEX 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且  $C_t \leq 30.0$ , 判断为 LMBV、DFV 和 GV6 病毒中某一种为阳性,如图 3,具体鉴定到种可通过 PCR 或酶切等方法进行进一步鉴定 ;在 CY5 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且  $C_t \leq 30.0$ , 判断为 SGIV 病毒阳性,如图 4 ;无典型的“S”型扩增曲线或  $C_t > 30.0$  判断为蛙病毒属病毒阴性。

[0033] 本发明的试剂盒采用三重荧光 PCR 技术,设计了 3 种特异性探针,在同一反应体系中实现同时鉴别 13 种蛙病毒属病毒。引物和探针的设计采用 oligo6 生物软件设计,将设计的引物和探针在 NCBI 的 GenBank 中进行 Blast 比对,检测引物和探针的特异性。

[0034] 我们发明的三重荧光定量 PCR 技术是在同一反应体系中同时加入 3 条不同荧光标记的探针 ( 针对靶基因 1 的探针标记 FAM, 针对靶基因 2 的探针标记 HEX, 针对靶基因 3 的探针标记 CY5)。PCR 反应过程中,若待检样本包含靶基因 1, 则标记 FAM 的探针产生荧光信号 ;若待检样本包含靶基因 2, 则标记 HEX 的探针产生荧光信号 ;若待检样本包含靶基因 3, 则标记 CY5 的探针产生荧光信号。所以,同一管反应可确定 3 种靶基因 ( 图 2、图 3、图 4), 实现了高通量检测的简便性,解决了现有蛙病毒属病毒的检测方法中一管反应中只能检测一种病毒的问题。这项技术在外来重大水生疫病蛙病毒属病毒的监控中具有非常大的应用前景。

## 附图说明

- [0035] 图 1 是蛙病毒属病毒的系统发育树；  
[0036] 图 2 是 FV3 等病毒的三重荧光 PCR 扩增曲线图；  
[0037] 图 3 是 LMBV 病毒的三重荧光 PCR 扩增曲线图；  
[0038] 图 4 是 SGIV 病毒的三重荧光 PCR 扩增曲线图；  
[0039] 图 5 是 FV3 病毒的灵敏度试验结果；  
[0040] 图 6 是 LMBV 病毒的灵敏度试验结果；  
[0041] 图 7 是 SGIV 病毒的灵敏度试验结果；  
[0042] 图 8 是 FV3 病毒的特异性试验结果；  
[0043] 图 9 是 LMBV 病毒的特异性试验结果；  
[0044] 图 10 是 SGIV 病毒的特异性试验结果。

## 具体实施方式

- [0045] 实施例 1：三重荧光 PCR Taqman 探针和引物的设计  
[0046] 根据 Genbank 中登陆的 RGV、STIV、FV3、BIV、TFV、ADIV、EHNV、ECV、ESV、SCRV (LMBV、DFV、GV6) 和 SGIV 的 MCP 基因保守区域,应用 DNAMAN 软件进行多重比对分析,应用 oligo6 软件设计能够鉴别 13 种蛙病毒属病毒的 Taqman 探针和引物,分别用 FAM、HEX 和 CY5 荧光报告基团标记 5' 端,淬灭基团用 BHQ1 和 BHQ3 标记。具体如上所述。  
[0047] 引物和探针均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。  
[0048] 实施例 2：三重实时荧光 PCR 的建立  
[0049] (1) 探针和引物浓度的优化  
[0050] 将通用引物浓度从 0.1  $\mu\text{M}$  至 0.9  $\mu\text{M}$  以每 0.1  $\mu\text{M}$  递增,探针浓度从 0.025  $\mu\text{M}$  至 0.4  $\mu\text{M}$  以每 0.025  $\mu\text{M}$  递增。对引物和探针不同浓度进行了组合比较,进行多次重复试验,结果发现引物浓度为 0.8  $\mu\text{M}$ ,探针浓度为 0.25  $\mu\text{M}$  时荧光增幅相对较高。  
[0051] (2) 镁离子浓度的优化  
[0052] 将  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度从 1mM 至 5.0mM 以每 0.5mM 递增,对不同  $\text{Mg}^{2+}$  浓度条件下的扩增进行了比较,优化后的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 3.0mM。  
[0053] (3) TaqDNA 聚合酶用量的优化  
[0054] 分别以 1.25U、2.5U、3.75U 和 5U 的 TaqDNA 聚合酶用量,进行重复试验,最终优化后聚合酶的用量为 2.5U。  
[0055] (4) 我们针对 Roche Light Cycler480 II 荧光 PCR 检测仪,对该实验中对变性温度和时间、退火和延伸温度及时间进行了优化实验,在综合考虑特异性和灵敏性的前提下,最终确定的扩增参数如下:第一阶段:94 $^{\circ}\text{C}$  /3min;第二阶段:94 $^{\circ}\text{C}$  /15s,54 $^{\circ}\text{C}$  /15s,60 $^{\circ}\text{C}$  /30s,40 个循环,60 $^{\circ}\text{C}$  延伸时收集荧光。  
[0056] 经过上述反应组分的优化,最终确定的优化反应体系组成见表 2。  
[0057] 表 2 优化反应体系组成  
[0058]

组分	体积 (μL)
10×recreation buffer	2.5
25mM MgCl <sub>2</sub>	3.0
10 mM dNTP	0.5
正向引物 (20μM)	1
反向引物 (20μM)	1

[0059]

探针 (25μM)	0.25
探针 (25μM)	0.25
探针 (25μM)	0.25
模板 DNA	10
TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL)	0.5
补无菌双蒸水至 25μL	

[0060] 实施例 3 :鉴别蛙病毒属病毒的荧光 PCR 检测试剂盒及其使用

[0061] 一、试剂盒的组成 (保存于 -20℃)

[0062] 1)DNA 提取试剂 :购自天根生化科技有限公司。

[0063] 2)PCR 反应液见表 3,每 14.5 μ L 荧光 PCR 反应液组成如下 :

[0064] 表 3 荧光 PCR 反应液组成

[0065]

组分	体积 (μL)
10×recreation buffer	2.5
25mM MgCl <sub>2</sub>	3.0
10mM dNTP	0.5
正向引物 (20 μ M) (SEQ ID NO :1)	1
反向引物 (20 μ M) (SEQ ID NO :2)	1
探针 (25 μ M) (SEQ ID NO :3)	0.25
探针 (25 μ M) (SEQ ID NO :4)	0.25
探针 (25 μ M) (SEQ ID NO :5)	0.25

无菌双蒸水	5.75
-------	------

[0066] 10×recreation buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub> 购于 Promega 公司 ; 10mM dNTP 购自宝生物工程 ( 大连 ) 有限公司, 引物和探针均委托生工生物工程 ( 上海 ) 股份有限公司合成。

[0067] 3) Taq DNA 聚合酶 5U/μL, 0.5 μL/ 检测, 购自 Promega 公司。

[0068] 4) 无菌双蒸水 : 用自来水两次蒸馏, 经过 Millipore MILLI-Q PF PLUS 纯水仪纯化, 收取电阻率 ≥ 8.0MΩ·cm 的水, 15l bf/in<sup>2</sup> (1.034×10<sup>5</sup>Pa) 高压蒸汽灭菌 15 分钟。

[0069] 5) 阴性对照 : 无菌双蒸水。

[0070] 6) 阳性对照 : 灭活的病毒培养液。

[0071] 二、试剂盒的应用

[0072] (1) 提取样品的 DNA, 即模板 DNA ;

[0073] (2) 进行实时荧光 PCR 反应, 最适反应体系如下 :

[0074] 表 4 实时荧光 PCR 反应体系组成

[0075]

组分	体积 (μL)
荧光 PCR 反应液 ( 表 3 )	14.5
TaqDNA 聚合酶 (5U/μL)	0.5
模板 DNA	10

[0076] (3) 最适反应条件 :

[0077] 针对 Roche Light Cycler480 II 荧光 PCR 检测仪, 第一阶段 : 94℃ / 3min ; 第二阶段 : 94℃ / 15s, 54℃ / 15s, 60℃ / 30s, 40 个循环, 60℃ 延伸时收集荧光。

[0078] (4) 结果的判定 : 在 FAM 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且 Ct ≤ 30.0, 判断为 RGV、STIV、FV3、BIV、TFV、ADIV、EHN、ECV 和 ESV 病毒中的某一种为阳性, 如图 2, 具体鉴定到种需要进一步的实验确认 ; 在 HEX 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且 Ct ≤ 30.0, 判断为 LMBV、DFV 和 GV6 病毒中某一种为阳性, 如图 3, 具体鉴定到种需要进一步的实验确认 ; 在 CY5 通道内荧光 PCR 扩增曲线呈典型的“S”型曲线且 Ct ≤ 30.0, 判断为 SGIV 病毒阳性, 如图 4 ; 无典型的“S”型扩增曲线或 Ct > 30.0 判断为蛙病毒属病毒阴性。

[0079] 实施例 4 : 三重荧光 PCR 的灵敏性试验

[0080] 采用实施例 3 试剂盒的方法, 提取 FV3、BIV、EHN、ADIV、STIV、LMBV、SGIV 等毒株的核酸 DNA, 十倍连续梯度稀释 DNA, Ct 值随 DNA 浓度梯度减少而呈梯度改变, 如图 5 为 FV3 核酸十倍连续梯度稀释后的 PCR 扩增曲线图, 可检测到核酸的最低浓度为 10<sup>2</sup> 拷贝 / μl, 病毒 BIV、EHN、ADIV 和 STIV 的灵敏性试验结果与 FV3 的灵敏性试验结果一致, 可检测到的最低浓度均为 10<sup>2</sup> 拷贝 / μl ; 图 6 为 LMBV 核酸十倍连续梯度稀释后的 PCR 扩增曲线图, 可检测到核酸的最低浓度为 10<sup>2</sup> 拷贝 / μl ; 图 7 为 SGIV 核酸十倍连续梯度稀释后的 PCR 扩增曲线图, 可检测到核酸的最低浓度为 10<sup>2</sup> 拷贝 / μl。试验结果表明, 本发明的试剂盒对于蛙病毒属病毒的诊断具有高度的灵敏性。



[0081] 实施例 5 :三重荧光 PCR 的特异性试验

[0082] 采用实施例 3 试剂盒的方法,为了进行特异性实验,提取其他水生动物病毒包括鱼类病毒 IHNV、VHSV、ISA 核酸 RNA,然后反转录为 cDNA 作为三重荧光 PCR 扩增的模板,检测结果表明,FAM 通道仅对 FV3、BIV、EHNV、ADIV、STIV 病毒进行扩增,如图 8 为 FV3 的特异性试验结果图,BIV、EHNV、ADIV 和 STIV 的特异性试验结果与 FV3 的特异性试验结果一致;HEX 通道仅对 LMBV 病毒进行扩增(图 9);CY5 通道仅对 SGIV 病毒进行扩增(图 10)。表明本发明检测试剂盒能对蛙病毒属病毒进行特异性扩增,不仅设计的 3 条探针无交叉反应,而且不与其他病毒核酸发生交叉反应。

## [0001]

## 序列表

<110> 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心

中国检验检疫科学研究院

北京海森通生物科技有限公司

<120> 一种鉴别蛙病毒属病毒的三重实时荧光 PCR 引物、探针和试剂盒

<130>

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工合成正义引物

<400> 1

atggtgcara acgtca

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工合成反义引物

<400> 2

gctccaksac sgtgtt

16

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工合成探针

## [0002]

<400> 3

cttccgctcgg ctccaattac acc

23

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工合成探针

<400> 4

ccaacaacag gagtgacgca agtg

24

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成探针

<400> 5

ctgtgggttc aaattatacg tgtgt

25

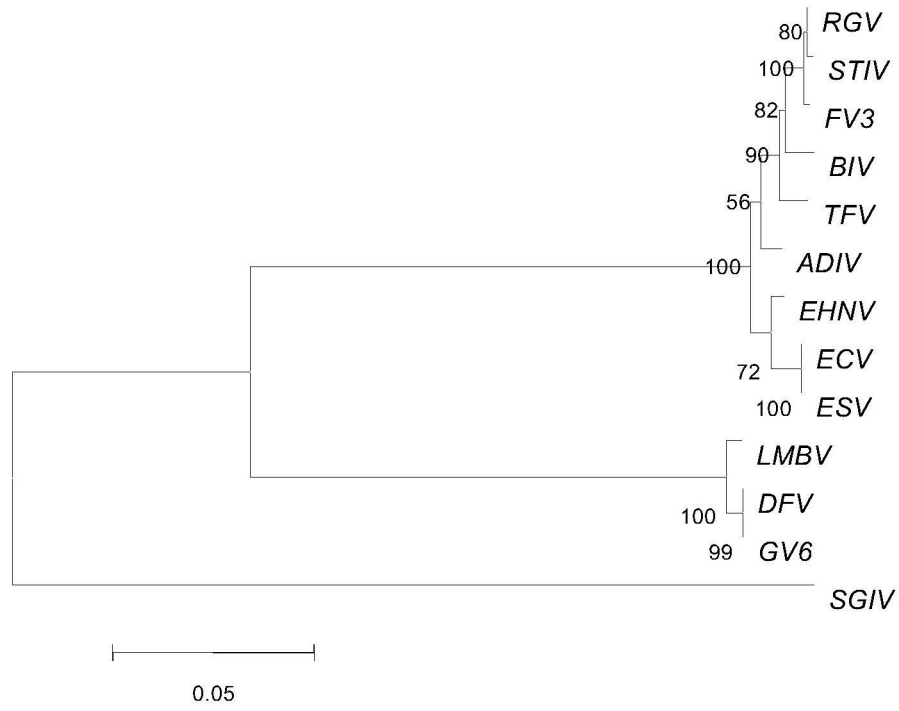


图 1

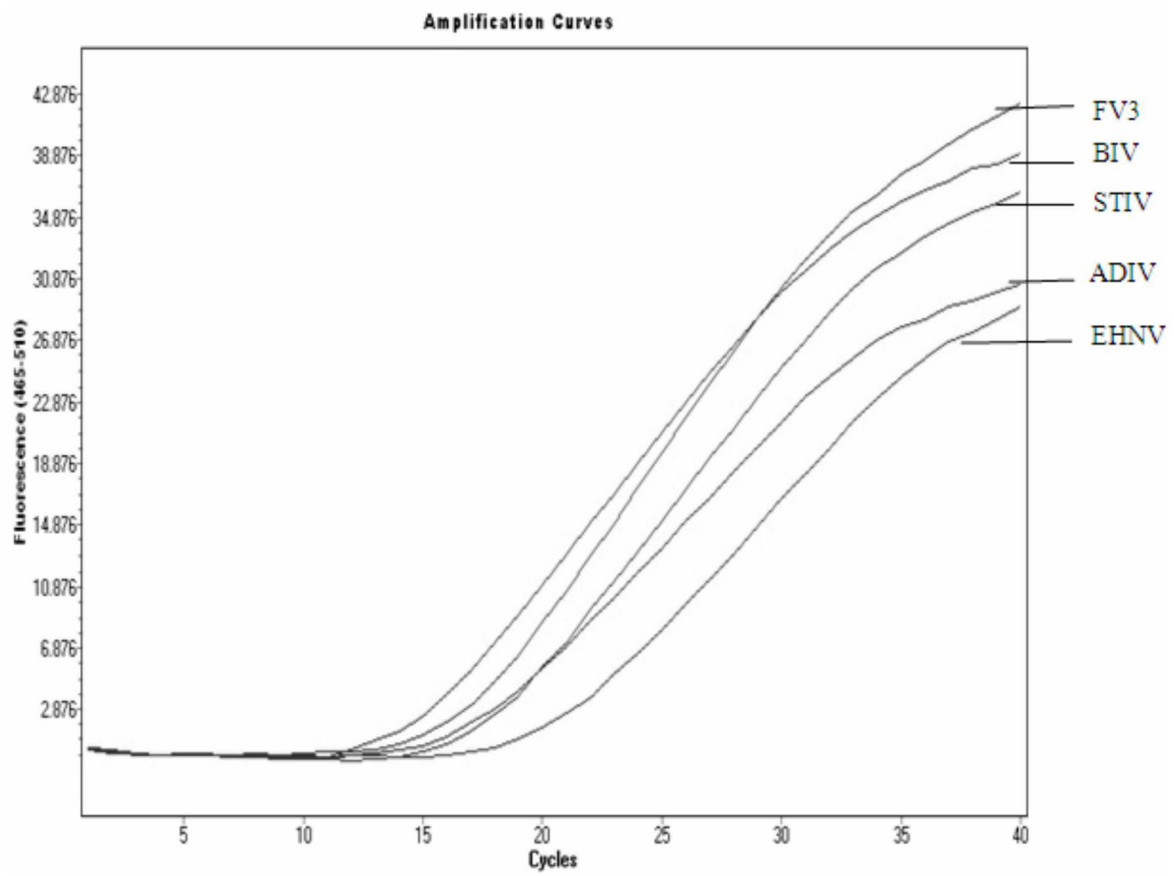


图 2

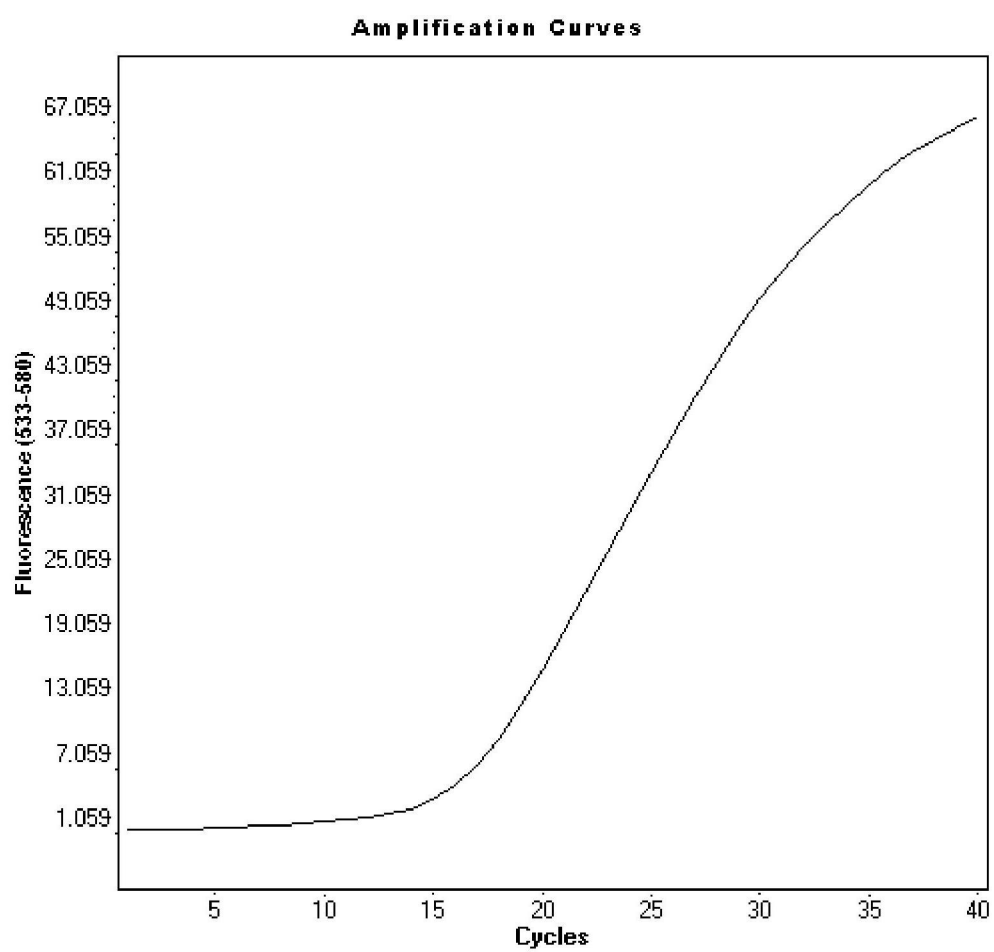


图 3

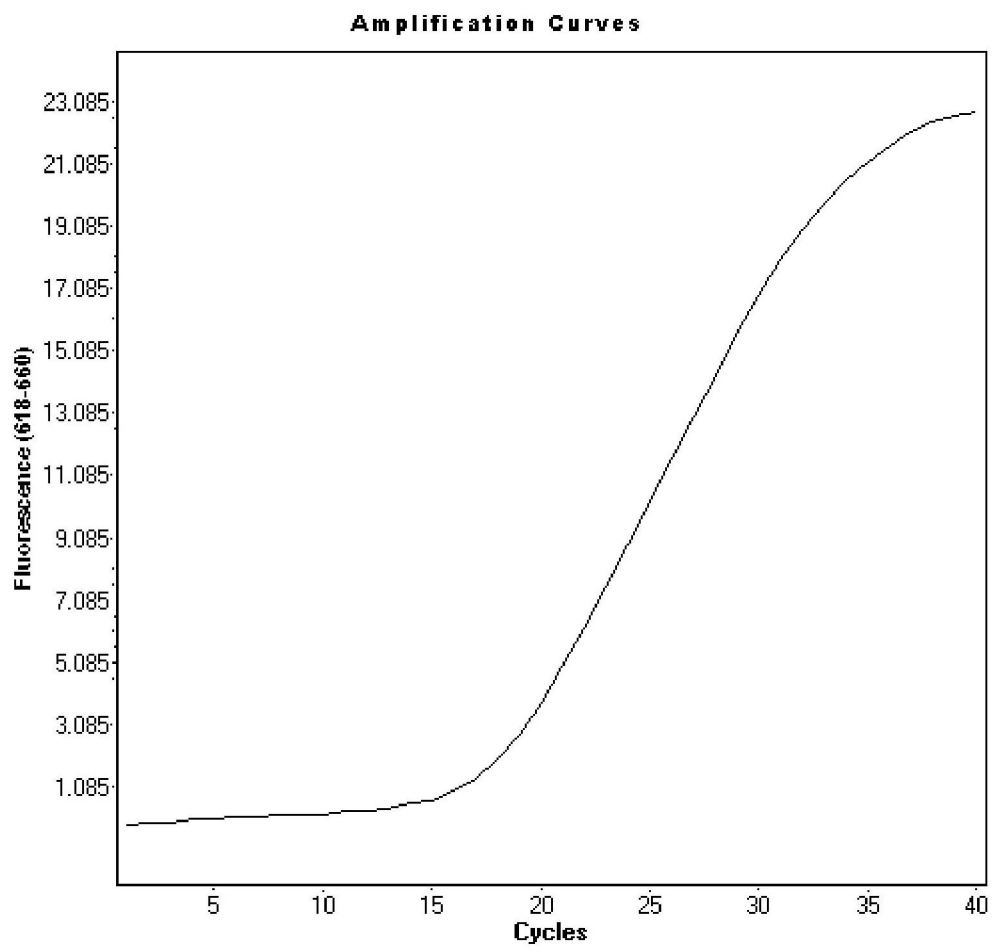


图 4

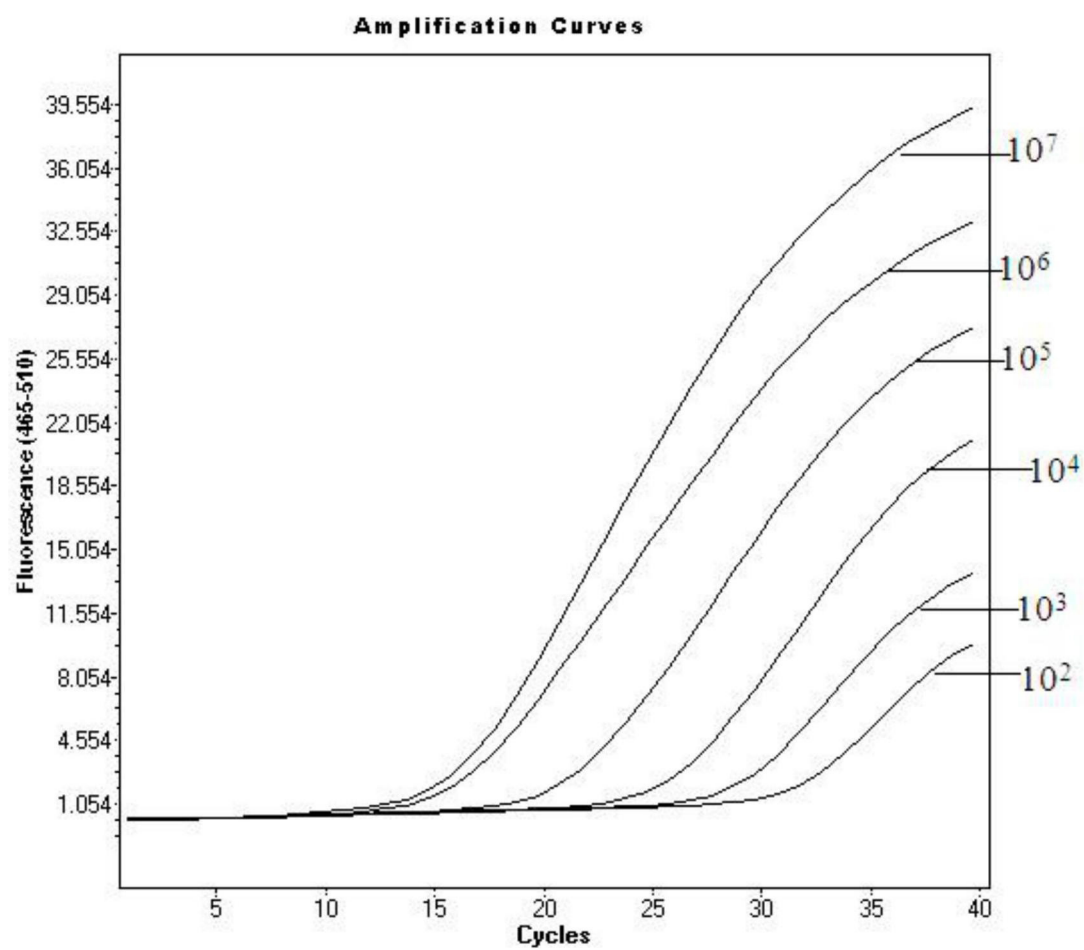


图 5

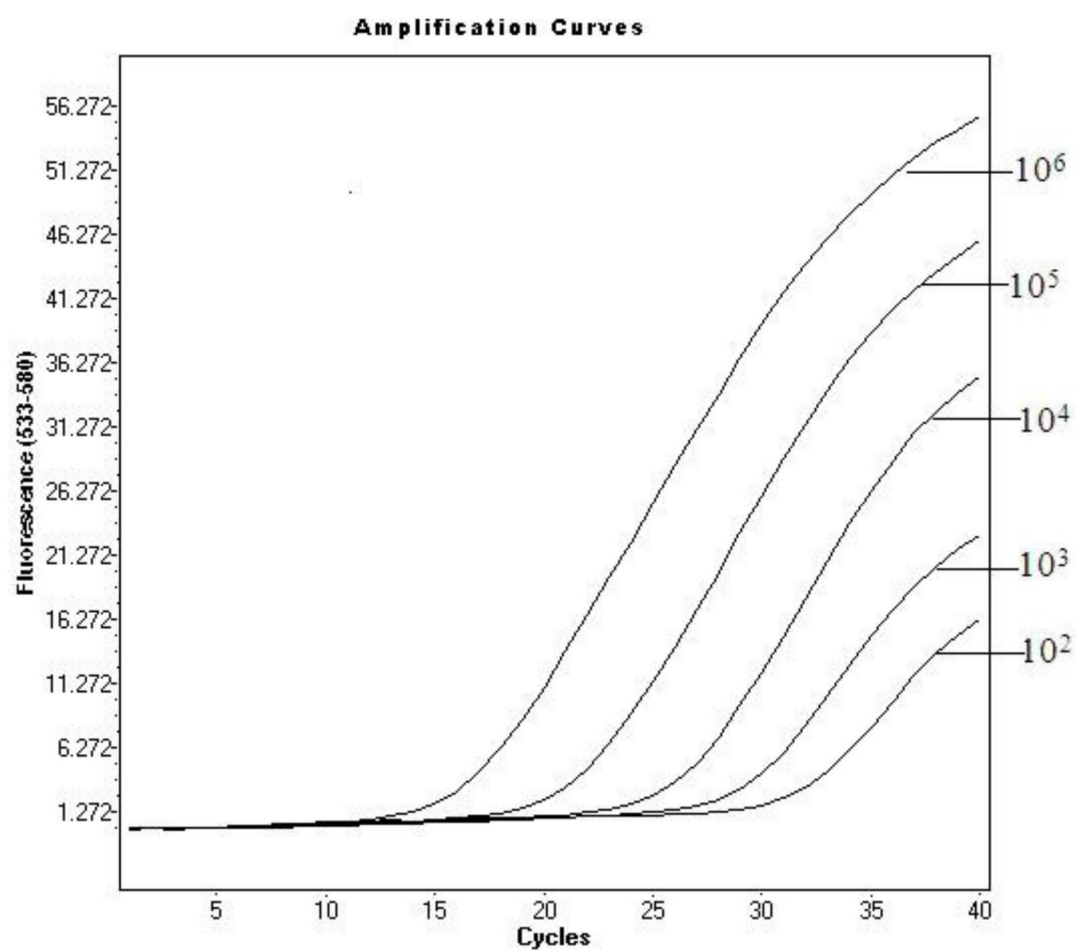


图 6



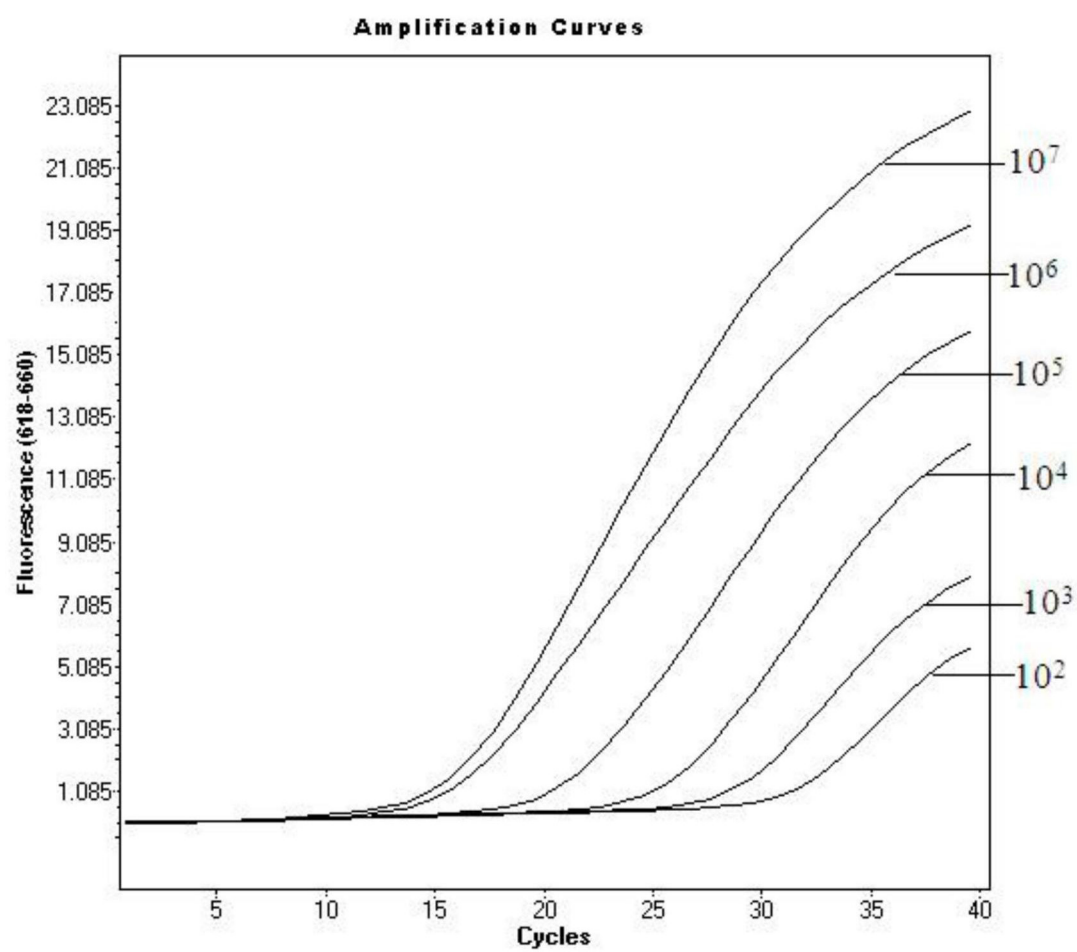


图 7

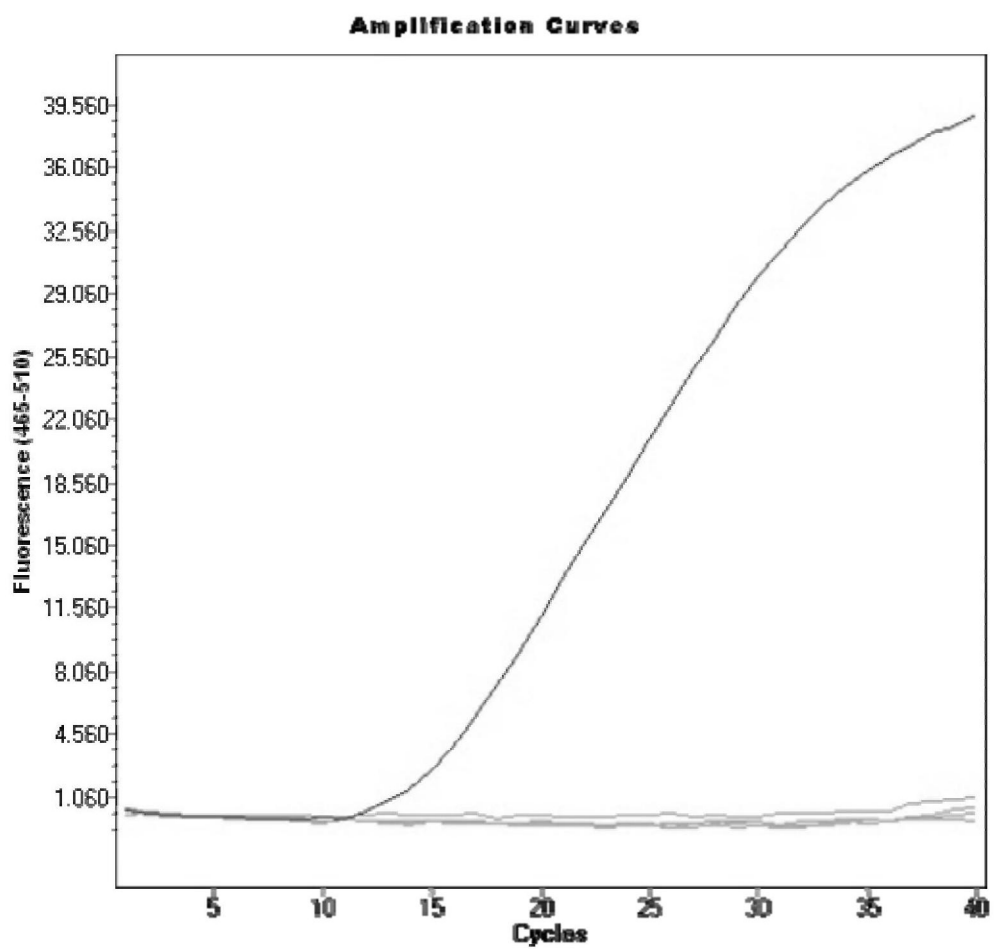


图 8

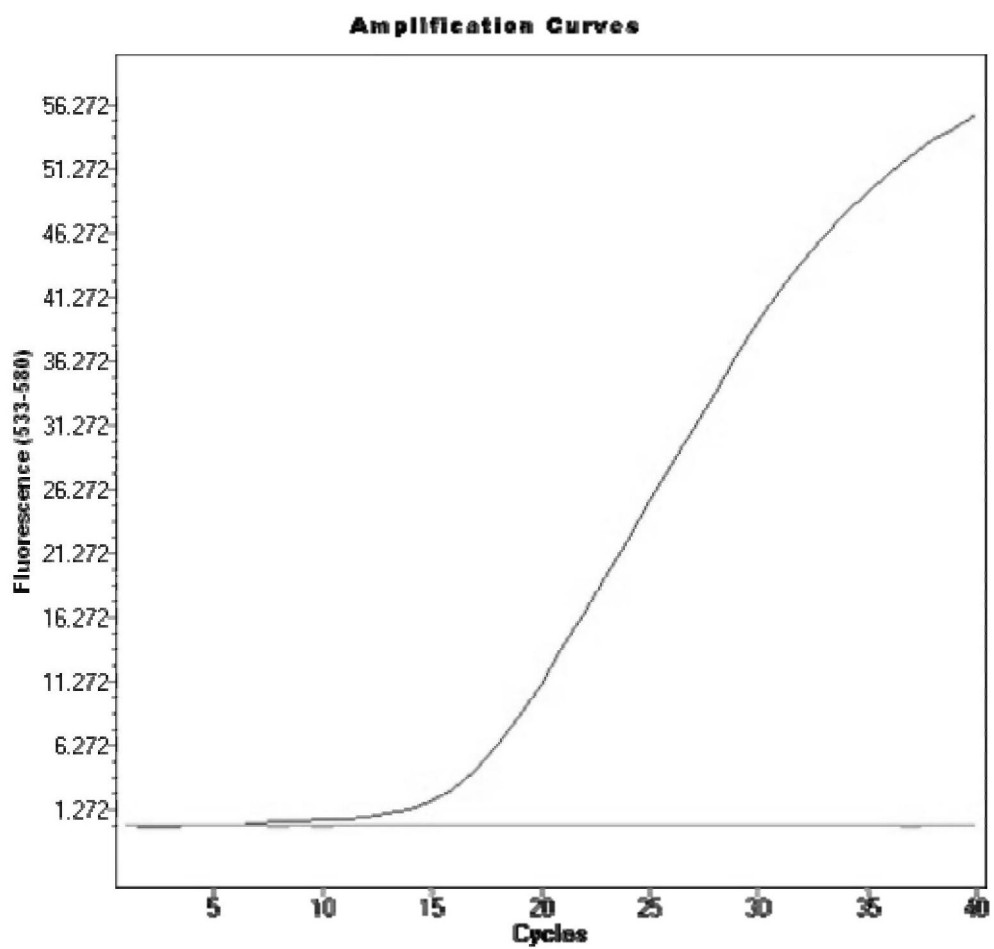


图 9

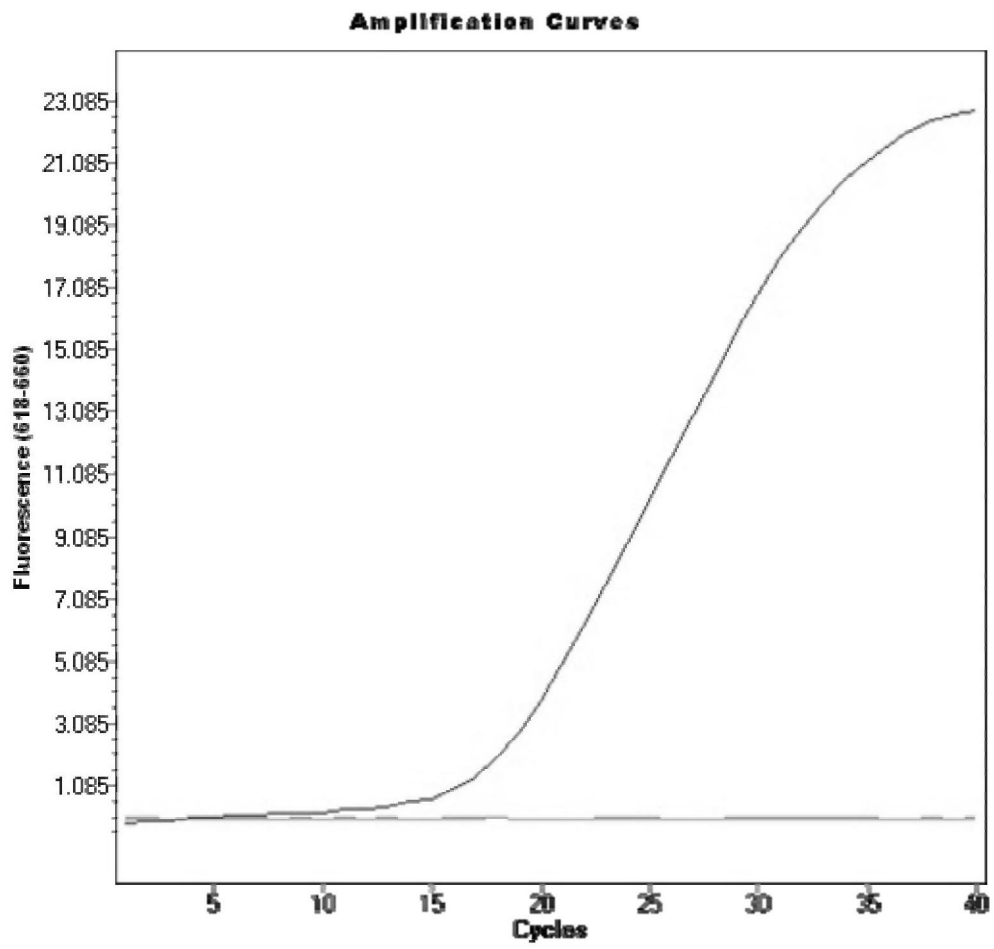


图 10