



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108624714 B

(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201810399711.9

C12Q 1/6844 (2018.01)

(22) 申请日 2018.04.28

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 季璇馨

申请公布号 CN 108624714 A

(43) 申请公布日 2018.10.09

(73) 专利权人 佛山科学技术学院

地址 528000 广东省佛山市南海区狮山镇

仙溪水库西路佛山科学技术学院

专利权人 仲恺农业工程学院

(72) 发明人 阳佑天 刘文俊 邓汝森 刘芳

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

代理人 王国标

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒及其应用。所述试剂盒包含引物组、LF Probe和核酸检测试纸条；所述引物组包含AIV上游引物、AIV下游引物和LF Probe三条引物。该RPA-LFD可视化试剂盒的应用方法包含步骤：1) 配制RPA-LFD反应体系；2) RPA-LFD反应；3) RPA-LFD反应结果的判读。本发明提供的RPA-LFD试剂盒可常温反应，静置10min即可完成反应，在13min内即可观察到结果，操作简便，无需借助任何仪器；反应结果易于观察，阳性反应试纸条出现两条红色条带，一条位于质控区(C线)，一条位于检测区(T线)；特异性好，对小鹅瘟、新城疫、黄病毒(坦布苏病毒)等都呈阴性反应；灵敏度高，最低可以检测到200fg的DNA模版，易于大范围推广应用。

1. 一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒,其特征在于,包含引物组和核酸检测试纸条;所述引物组包含AIV上游引物、AIV下游引物和LF Probe三条引物,其序列分别如SEQ ID No. 1~3所示。

2. 根据权利要求1所述的检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒,其特征在于,还包含反应缓冲液、醋酸镁、RPA酶。

3. 根据权利要求2所述的检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒,其特征在于,醋酸镁为280mM醋酸镁。

4. 根据权利要求2所述的检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒,其特征在于,所述反应缓冲液为Rehydration Buffer。

一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification,RPA)技术是一项由多种酶和蛋白参与,在恒定温度条件下实现核酸指数扩增的新技术,具有反应灵敏、高效、性价比高的特点。自2006年首次报道以来,RPA已经在医疗诊断、食品致病菌和转基因农作物等检测分析以及生物安全方面崭露头角。特别是在2014年,RPA商业化试剂盒的问世直接推动RPA技术突飞猛进的发展。RPA-LFD(侧流层析试纸条检测)探针的设计是通过一对特定的抗体固定含有两个抗原标签的物质(羧基荧光素FAM和生物素biotin)实现检测。其中,5'生物素引物及其互补的序列保证了与探针结合目标物的有效扩增。Nfo识别含有1个5'-FAM标签的探针、内部THF和1个3'保护基团的扩增双链序列中的THF位点,并进行剪切(形成聚合酶Bsu催化延伸的3'羟基底物,使探针剩余的部分延伸,以固定其与含生物素标签的对应链的结合)最终完成含有生物素以及FAM的双标记扩增子可以通过侧流层析实验鉴定实验结果。采用这两种探针在很大程度上减少了扩增中产生的非特异性信号,提高了RPA反应的灵敏度和特异性。RPA-LFD可视化试剂盒,具有检测速度快、敏感性高、操作简便,便携且结果容易判读等优点,适合基层人员使用,具有较高的应用价值和转化前景。

发明内容

[0003] 本发明首要目的是提供一具有高灵敏度、高特异性、高效、可视化、操作方法简单的适用于检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒。

[0004] 本发明所采取的技术方案是:

[0005] 一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒,包含引物组、LF Probe和核酸检测试纸条;

[0006] 所述引物组包含三条引物,所述三条引物为:

[0007] AIV上游引物:5'-atgagtcttctaaccgaggtcgaaacgtac-3'(SEQ IDNo.1);

[0008] AIV下游引物:5'-gaggtgacaggattggtcttgtcttttagcc-3'(SEQ IDNo.2);

[0009] LF Probe:5'-agatcgcgagagacatgaagatgtctttgcaggaaagaacaccgatc-3'(SEQ IDNo.3)。

[0010] 为了进一步实现本发明,还包含反应缓冲液、醋酸镁、RPA酶。

[0011] 为了进一步实现本发明,醋酸镁为280mM醋酸镁。

[0012] 为了进一步实现本发明,所述反应缓冲液为Rehydration Buffer。

[0013] 本发明的另一目的在于,提供实现上述检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒的应用方法。

[0014] 包含以下步骤:

[0015] 1) 配制RPA-LFD反应体系:反应缓冲液的体积为29.5 μ L;LF Probe的体积为0.6 μ L;AIV上游引物的体积为2.1 μ L;AIV下游引物的体积为2.1 μ L;水的体积为12.2 μ L;待测样品DNA的体积为1 μ L;醋酸镁的体积为2.5 μ L;

[0016] 2) RPA-LFD反应:将步骤1)配制好的RPA-LFD反应体系置于30-37 $^{\circ}$ C恒温下反应;

[0017] 3) RPA-LFD反应结果的判读:通过一次性核酸检测装置判读。

[0018] 判读时,若一次性核酸检测装置的核酸测试纸条出现两条红色条带,一条位于质控区,一条位于检测区,说明待测样品含有禽流感病毒;若一次性核酸检测装置的核酸测试纸条出现一条位于质控区的红色条带,说明待测样品不含禽流感病毒。

[0019] 为了进一步实现本发明,步骤2)中,所述RPA-LFD反应体系的反应时间为10min;

[0020] 为了进一步实现本发明,步骤2)中,所述RPA-LFD反应体系的反应温度为在37 $^{\circ}$ C。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有以下优点和有益效果:

[0022] 1) 本发明提供的RPA-LFD试剂盒可常温反应,静置10min即可完成反应,反应迅速,在13min内即可观察到结果,操作简便,无需借助任何仪器。

[0023] 2) 本发明提供的RPA-LFD试剂盒得到的反应结果易于观察,阳性反应试纸条出现两条红色条带,一条位于质控区(C线),一条位于检测区(T线)。

[0024] 3) 本发明提供的RPA-LFD试剂盒特异性好,对小鹅瘟、新城疫、黄病毒(坦布苏病毒)等都呈阴性反应;灵敏度高,最低可以检测到200fg的DNA模版,即使是几个病毒粒子,也能被快速准确地检测。

[0025] 4) 本发明提供的RPA-LFD试剂盒可快速、灵敏地检测禽流感病毒,其操作简单、成本低廉,反应结果易于观察,特异性好,非常适用于出口检疫、食品卫生以及养殖场的现场检测,易于大范围推广应用。

附图说明

[0026] 图1为优化RPA-LFD检测体系反应条件的结构图,其中A为不同温度的反应结果,B为不同时间的反应结果;

[0027] 图2为RPA-LFD特异性反应结果图;

[0028] 图3为RPA-LFD检测体系的灵敏性对比图,其中A为不同浓度的RPA-LFD反应结果,B为不同浓度的PCR反应结果图。

具体实施方式

[0029] 下面通过具体实施方式对本发明作进一步详细说明。但本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0030] 以下实施例中所用的引物、探针由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。RPA聚合酶、Rehydration Buffer和醋酸镁购自TwistDx公司;一次性核酸检测装置购自优思达公司。

[0031] 一、基因的选择和引物设计

[0032] 依据RPA-LFD引物设计原则,根据GenBank中已经公布的AIV VP3基因保守序列设计引物,用primer5.0设计一套引物(如表1所示),该套引物包括1对AIV引物(AIV上游引物和AIV下游引物)和探针。该套引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,合成后的引物用灭菌三蒸水稀释成10 μ mol/L溶液,-20℃保存。

[0033] 表1可视化RPA-LFD的引物

	引物名称	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
	AIV 上游引物	5'- atgagtcttctaaccgaggtcgaaacgtac -3'	30
[0034]	AIV 下游引物	5' - (biotin)ctctgactaaagggatgtgggattgtat-3'	30
	LF Probe (探针)	5'-(FAM) agatcgcgagagacatgaagatgtctttg (ids p) caggaaagaacaccgatc (spc3)-3'	48

[0035] 二、RPA-LFD反应

[0036] 1、病毒RNA的抽提及其反转录:

[0037] 在病毒RNA抽提的过程中所用离心管等耗材均经0.1%DEPC处理,确保所用离心管等耗材均无RNA酶的污染:

[0038] (1)取250 μ L病毒置于1.5ml离心管,紧接着往该离心管加入750 μ L Trizol,盖好离心管盖子,剧烈震荡离心管50-100次,室温静置5min;

[0039] (2)往步骤(1)中的离心管加入0.2ml氯仿,震荡30s,静置5-10min;

[0040] (3)将步骤(2)处理后的离心管置于离心机中以12000rpm,4℃离心10min;

[0041] (4)将步骤(3)处理后的离心管的上清液(450 μ L)置于另一个新的离心管,然后加入相等体积的异丙醇,将离心管中的液体轻轻混匀,冰上静置10min;

[0042] (5)将步骤(4)处理后的离心管置于离心机中以12000rpm,4℃离心10min,弃上清液;

[0043] (6)紧接着往步骤(5)处理后的离心管加入1ml70%乙醇,轻轻洗涤沉淀,并将该离心管置于离心机中以12000rpm,4℃离心5min,弃上清液;

[0044] (7)将步骤(6)处理后的离心管真空干燥3-5min,再往离心管加入7 μ LDEPC H2O和1 μ L RNA酶抑制剂;

[0045] (8)反转录:将提取的RNA再反转录成cDNA,反转录体系如表2所示,

[0046] 表2反转录体系

	成分	用量
	5 $\times$ buffer	4 μ L
	dNTPs	6 μ L
[0047]	随机引物	1 μ L
	反转录酶 AMV	1 μ L
	提取的 RNA	8 μ L
	Total	20 μ L

[0048] 反应条件:42℃,1h。

[0049] 2、RPA-LFD检测体系的建立:

[0050] 参照TwistDx提供的方法构建50 μ L RPA-LFD检测体系的RPA-LFD反应体系,该反应

体系如表3所示：

[0051] 表3反应体系

[0052]	成分	用量
	AIV 上游引物	2.1 μ L
	AIV 下游引物	2.1 μ L
	Rehydration Buffer	29.5 μ L
	LF Probe (探针)	0.6 μ L
	H ₂ O	12.2 μ L
	待测 DNA	1 μ L
	醋酸镁	2.5 μ L
	RPA 酶	干粉
	Total	50 μ L

[0053] 3、RPA-LFD检测体系反应条件的优化：

[0054] 为了得到最优化的反应温度，将配制好的RPA-LFD反应体系分别置于30℃、35℃、37℃、40℃、45℃及50℃的温度下，反应时间为10min，反应体系如表2所示，经过多次重复试验，确定最佳反应温度。每次配置RPA-LFD反应体系的同时设水为阴性对照，结果如图1A所示，图1A的结果说明最佳反应温度为37℃。

[0055] 在最佳反应温度(37℃)下，将配置好的RPA-LFD反应体系的反应时间分别设置为5min、10min、15min、20min、25min，RPA-LFD反应体系如表2所示，经过多次重复试验，确定最佳反应时间，结果如图1B所示。

[0056] 图1B的结果说明，RPA-LFD检测体系的最佳反应时间是10min。

[0057] 综上，优化后RPA-LFD检测体系的反应条件为37℃恒温，放置10min。

[0058] 4、RPA-LFD检测体系特异性、灵敏性分析：

[0059] (1) RPA-LFD检测体系的特异性分析

[0060] 使用新城疫病毒、禽流感病毒、小鹅瘟、黄病毒(坦布苏病毒)为模版检测RPA-LFD检测体系的特异性。本发明所用到的新城疫病毒、小鹅瘟、H9禽流感病毒、黄病毒(坦布苏病毒)的病毒DNA模板均采用上述RPA-LFD反应步骤中的病毒DNA的抽提过程获得的。

[0061] RPA-LFD检测体系的反应体系如表3所示，RPA-LFD检测体系的反应条件为步骤3中RPA-LFD检测体系的反应条件优化确定的条件，RPA-LFD反应体系反应后通过一次性核酸检测装置判读结果，结果如图2所示。泳道1是以禽流感病毒基因组为模版的RPA-LFD反应产物；泳道2是以H9禽流感病毒基因组为模版的RPA-LFD反应产物；泳道3是以黄病毒(坦布苏病毒)基因组为模版的RPA-LFD反应产物；泳道4是以新城疫病毒基因组为模版的RPA-LFD反应产物。

[0062] 图2结果显示RPA-LFD检测体系的特异性良好，可特异地检测到禽流感病毒。

[0063] (2) RPA-LFD检测体系的灵敏性分析

[0064] 将鹅的禽流感病毒液通过上述二 (RPA-LFD反应) 中步骤1 (病毒DNA的抽提) 的过程提取禽流感病毒DNA,在紫外分光光度计上测定其DNA的含量,将禽流感病毒DNA样品进行稀释,使稀释后的样品浓度分别为:20ng、2ng、200pg、20pg、2pg、200fg。

[0065] 以不同浓度的禽流感病毒cDNA (其浓度分别为20ng、2ng、200pg、20pg、2pg、200fg) 为模版,用AIV上游引物和AIV下游引物进行RPA-LFD检测。

[0066] RPA-LFD检测的反应体系如表3所示,RPA-LFD检测体系的反应条件为步骤3中RPA-LFD检测体系的反应条件优化确定的条件,RPA-LFD反应体系反应后通过一次性核酸检测装置判读结果,结果如图3中A所示。

[0067] 以不同浓度的禽流感病毒DNA (其浓度分别为20ng、2ng、200pg、20pg、2pg、200fg) 为模版,用AIV上游引物和AIV下游引物进行PCR检测,PCR体系如表4所示:

[0068] 表4PCR体系

	成分	用量
	ddH ₂ O	9μL
	AIV 上游引物(10μmol/L)	0.75μL
[0069]	AIV 下游引物(10μmol/L)	0.75μL
	2.0×Ex-Taq	12.5μL
	禽流感病毒 DNA(20ng/μL)	2μL
	Total	25μL

[0070] PCR程序如下:94℃预变性2min;94℃30s,50℃30s,72℃2min为一个循环,运行30个循环,之后72℃延伸5min,最后4℃保存;该PCR程序反应的产物经琼脂糖凝胶电泳后在紫外线检测仪的照射下得到如图3中B的结果图。

[0071] 比较两种检测方法的灵敏度,如图3所示,结果表明可视化的RPA-LFD检测体系能检测到的AIV基因组DNA的最低限度比PCR高100倍,最低可以检测到200fg的AIV DNA。可见,本发明提供的可视化RPA-LFD更灵敏,而且用时更短,操作更加简单,结果比较直观,易于检测,无需电泳。

[0072] 5、RPA-LFD检测体系的结果鉴定:

[0073] 若核酸试纸条上出现两条红色条带,一条位于质控区 (C线),一条位于检测区 (T线),则RPA-LFD检测体系的检测结果为阳性;若只在核酸试纸条的质控区 (C线) 有一条色条带,则RPA-LFD检测体系的检测结果为阴性。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 佛山科学技术学院;仲恺农业工程学院

[0003] <120> 一种检测禽流感病毒的RPA-LFD可视化试剂盒及其应用

[0004] <130> 2018

[0005] <160> 3

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 30

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 人工序列

[0011] <400> 1

[0012] atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtac 30

[0013] <210> 2

[0014] <211> 30

[0015] <212> DNA

[0016] <213> 人工序列

[0017] <400> 2

[0018] ctctgactaa agggatgttg ggatttgtat 30

[0019] <210> 3

[0020] <211> 48

[0021] <212> DNA

[0022] <213> 人工序列

[0023] <400> 3

[0024] agatcgcgca gagacatgaa gatgtctttg caggaaagaa caccgatc 48

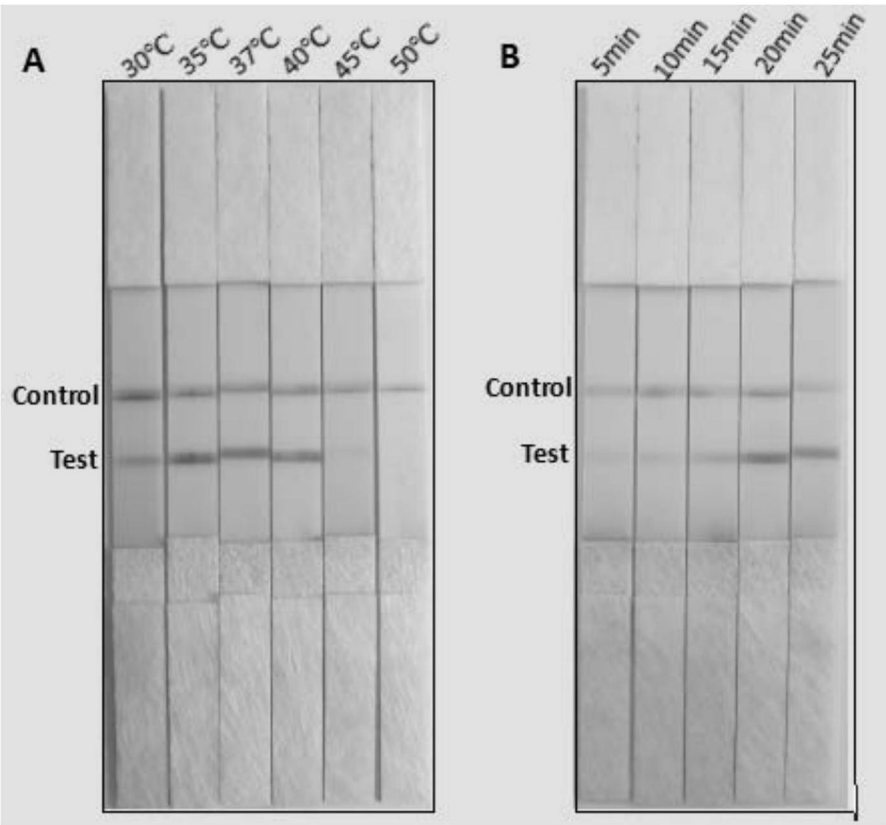


图1

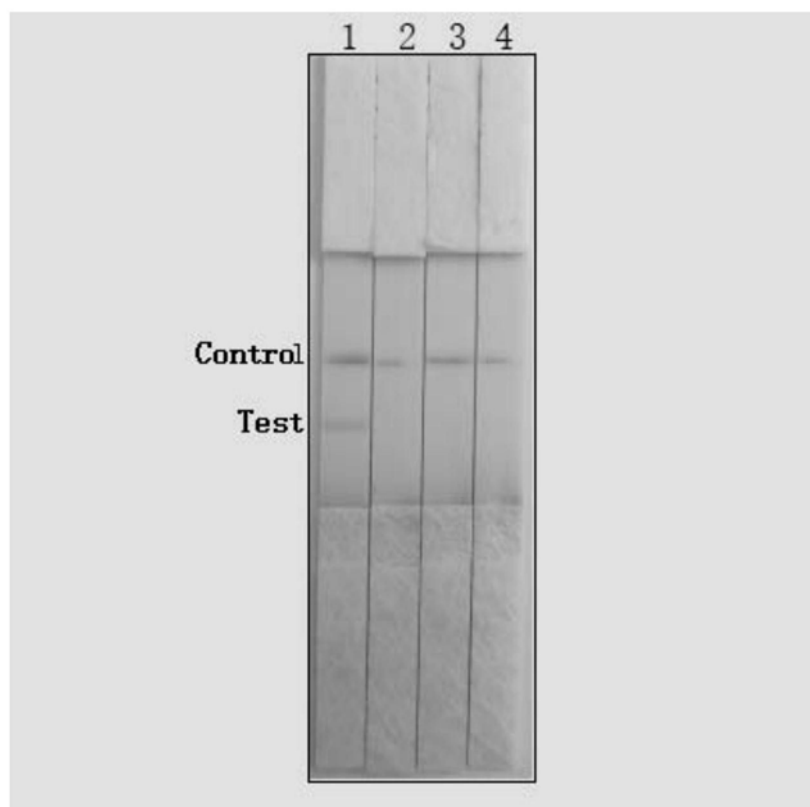


图2

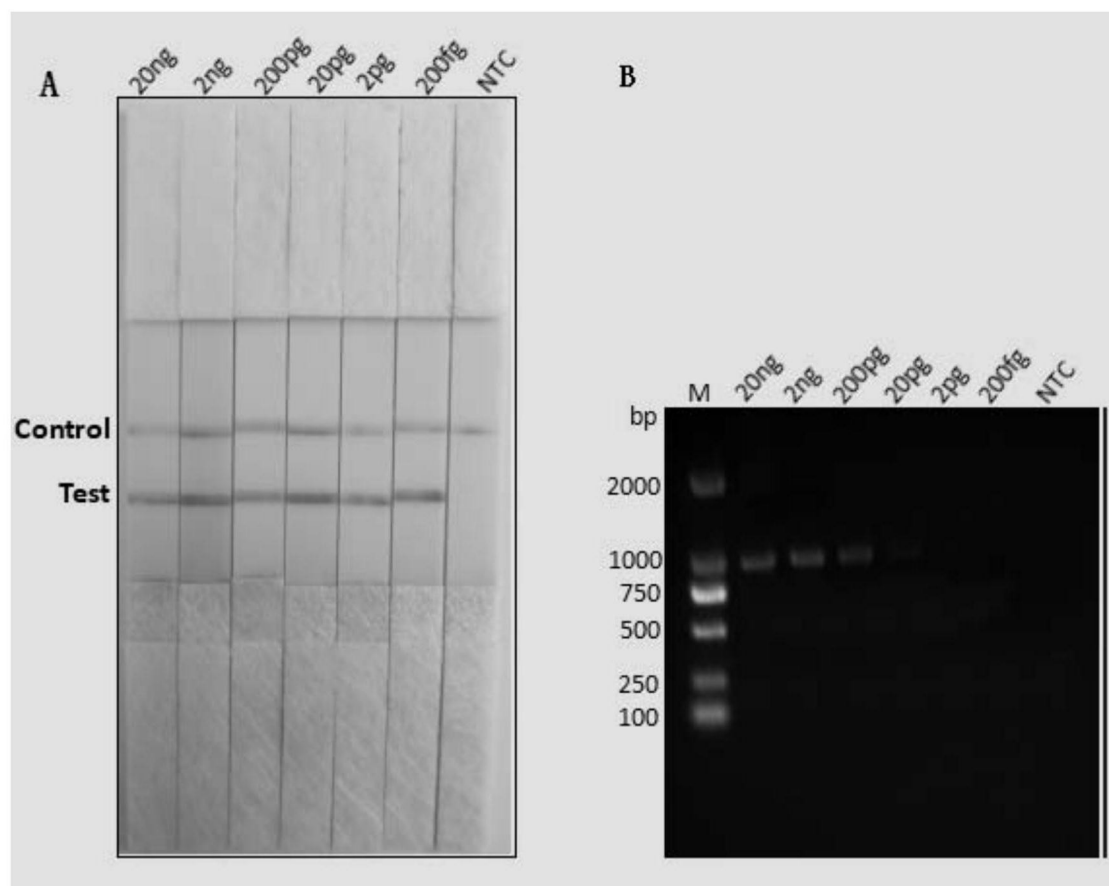


图3