



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116445452 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 18

(21) 申请号 202210100303.5

C12Q 1/70 (2006.01)

(22) 申请日 2022.01.27

C12Q 1/6844 (2018.01)

(66) 本国优先权数据

202210007779.4 2022.01.06 CN

(71) 申请人 浙江善测禾骑士生物科技有限公司

地址 314100 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇
创业路555号C4幢101室

(72) 发明人 程奇 王金辉 胡东杰 陈军
邓子新

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33283

专利代理师 向庆宁 曹小燕

(51) Int. Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

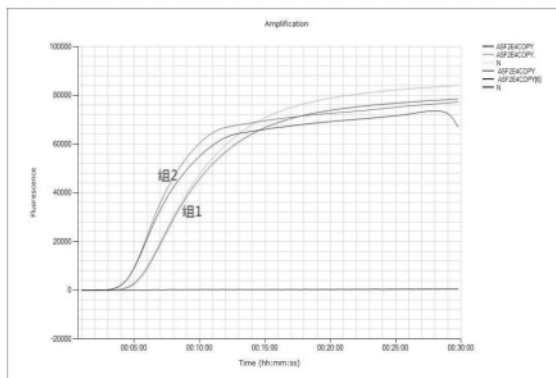
权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法,通过对重组酶RecA基因进行编辑,使其表达的RecA蛋白具有更好的可溶性和重组酶活性。利用该RecA蛋白制备重组酶干粉,进一步优化重组酶干粉的配方及比例关系,并针对ASFV P72基因设计特异性引物,用于非洲猪瘟病毒的快速核酸检测,显著提高检测灵敏度,检测时间更短,从而有效避免漏检、错检,帮助预防疫情扩散。



1. 一种重组酶RecA基因,其特征在于,具有如列表Seq ID NO.6所述的序列。
2. 一种重组酶干粉,其特征在于,含有如权利要求1所述的RecA基因表达的RecA蛋白。
3. 如权利要求2所述的重组酶干粉,其特征在于,还含有UvsY蛋白、ssb蛋白和Exo蛋白。
4. 如权利要求3所述的重组酶干粉,其特征在于,所述重组酶干粉包括20ng/ μ L~50ng/ μ L的RecA蛋白,10ng/ μ L~50ng/ μ L的UvsY蛋白,10ng/ μ L~50ng/ μ L的DNA聚合酶P,30ng/ μ L~100ng/ μ L的ssb蛋白,20ng/ μ L~60ng/ μ L的Exo蛋白。
5. 一种病毒核酸快速检测试剂盒,其特征在于,包含如权利要求2~4任一项所述的重组酶干粉。
6. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,还包括引物探针组合,反应Buffer、BufferB、阴性对照和阳性对照。
7. 如权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述病毒为非洲猪瘟病毒,所述引物探针组合包括:
 - (1) 上游引物,其序列如列表中Seq ID NO.1所示;
 - (2) 下游引物,其序列如列表中Seq ID NO.2所示;
 - (3) 荧光探针序列,其序列如列表中Seq ID NO.3所示。
8. 如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述反应Buffer为:10-30mM Tris-HCl (pH7.5),0.1mM-0.5mM dNTP,质量百分比3%-9%PEG8000或其它分子量的PEG,1-5mM DTT,10-20mM ATP,10-50mM磷酸烯醇丙酮酸,和500-1500ng/ μ L丙酮酸激酶。
9. 如权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述Buffer B:2-10mM Mg^{2+} ;所述阳性对照为含有ASFV p72基因片段的假病毒;所述阴性对照为生理盐水。
10. 采用权利要求5~9任一项所述的试剂盒进行病毒核酸快速检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 提取待测核酸,配制阳性对照和阴性对照;
 - (2) 配制重组酶干粉置于反应管中,并加入反应Buffer、上游引物、下游引物、荧光探针;
 - (3) 向反应管中加入待测核酸、阳性对照和阴性对照,再加入Buffer B,震荡混匀,离心;
 - (4) 等温扩增,荧光分析待测样品。

一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子诊断生物学技术领域,涉及一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法;尤其涉及一种针对非洲猪瘟病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引发家猪、野猪的一种急性、热性、高度接触性动物传染病,所有品种和年龄的猪均能被感染,发病率和死亡率可达100%。该病具有易感染、病发过程短、传播快、控制难、致死率高等特征,世界动物卫生组织将其列为法定报告动物疫病,我国将其列为一类动物疫病,一旦发生将造成养殖场出现成规模的猪死亡现象,对猪群健康和养殖场效益带来巨大损失。非洲猪瘟由于缺乏有效的免疫疫苗和治疗药物,目前只能以防控为主,通常采取扑杀和无公害处理的措施进行防控,这给当地农牧民的经济收入带来严重影响。

[0003]

[0004] 非洲猪瘟病毒(ASFV)是一种DNA病毒,主要检测的方法有酶联免疫吸附法(ELISA),聚合链式反应试验(PCR)、和实时荧光定量PCR法、以及胶体金试纸检测方法。胶体金试纸检测方法以胶体金作为示踪标志物,利用层析技术实现抗体抗原特异性检测的一种新型免疫检测技术,具有快速,灵敏、特异等优点,但是容易出现假阳性。PCR法准确率高,可以有效应用到检测,但是扩增时间较长,需要电泳检测,通量低,操作繁琐。实时荧光定量PCR方法,根据荧光信号定量检测目的基因,该方法灵敏度高,特异性强,已经逐步成为ASFV临床诊断、检疫、食品安全检验的重要方法,但是该方法对技术人员要求较高,检测时间1.5-2个小时,检测仪器昂贵,不利于在养猪场和偏远的地区推广。

[0005] 恒温核酸体外扩增技术的出现,再次扩大了PCR技术的应用范围,使其操作更便捷。现有的恒温核酸体外扩增方法主要有环介导基因恒温扩增技术(LAMP)、重组酶聚合酶扩增技术(RPA)和重组酶介导扩增技术(RAA)。

[0006] CN110699490B提供了一种非洲猪瘟病毒CD2V基因的RAA恒温荧光检测方法,但由于RAA扩增过程中重组酶介导效率不高,灵敏度仍然偏低,100copies/ μ L,2 μ L的模板量,相当于灵敏度为 $100 \times 2 = 200$ copies/test,且检测时间较长,扩增时间需要20-30min,在病毒含量较低的情况下,容易出现假阴性,从而造成漏检、错检。

[0007] 因此急需一种灵敏度更高的,并且更加方便快捷、特异性强的快速核酸检测方法,尤其是针对非洲猪瘟病毒快速核酸检测方法,避免漏检、错检的可能性,帮助预防疫情扩散。

发明内容

[0008] 为解决上述问题,本发明提供了一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试

剂盒及其检测方法,通过对重组酶RecA基因进行编辑,使其表达的RecA蛋白具有更好的可溶性和重组酶活性。利用该RecA蛋白制备重组酶干粉,进一步优化重组酶干粉的配方及比例关系,并针对ASFV p72基因设计特异性引物,用于非洲猪瘟病毒的快速核酸检测,显著提高检测灵敏度,检测时间更短,最低可以检测出5copies/ μL 的样本,经过计算灵敏度约为50copies/test,检测时间仅需5-20分钟,从而有效避免漏检、错检,解决现有非洲猪瘟检测产品或方法中灵敏度低、假阳性,操作繁琐,耗时长,检测仪器昂贵等问题,而且对仪器的依赖程度低,既适配于目前市场上使用的PCR扩增仪,也能在恒温PCR扩增仪上进行检测,适合在农村和或偏远的养殖场使用,具有很好的应用前景。

[0009] 本发明采用的重组酶扩增一种重组酶介导扩增(Recombinase-aid Amplification),是一种恒温核酸快速扩增技术,利用从细菌或真菌中获得的重组酶,在常温下,该重组酶可与引物紧密结合,形成酶和引物的聚合体,当引物在模板DNA上搜索到与之完全匹配的互补序列时,在单链DNA结合蛋白的帮助下,打开模板DNA的双链结构,并在DNA聚合酶的作用下,形成新的DNA互补链,扩增产物以指数级增长。利用荧光探针的标记和核酸外切酶酶切,可以实现定时定量的结果分析。

[0010] 一方面,本发明提供了一种重组酶RecA基因,所述RecA基因具有如序列表Seq ID NO.6所述的序列。

[0011] RecA蛋白是同源重组蛋白,来源于耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*),耐辐射异常球菌具有极端的耐辐射能力、高效DNA损伤修复机制,可以快速修复各种DNA损伤,RecA蛋白就是其中重要的DNA修复蛋白之一,进行DNA的同源重组修复,来源于耐辐射异常球菌的RecA蛋白,抗逆性强,但是从耐辐射异常球菌基因组克隆的表达的野生型RecA蛋白,在大肠杆菌表达体系中产物为包涵体,体外酶活性低。

[0012] 本发明通过在野生型的RecA基因(Seq ID NO.5)的基础上进行了基因编辑,在RecA蛋白中引入了T4噬菌体重组蛋白的部分结构域,获得了一种新型的RecA基因(Seq ID NO.6),利用该新型RecA基因表达获得的RecA蛋白,其可溶性和重组酶活性都得到明显提高。当利用该新型RecA基因表达获得的RecA蛋白进行重组酶介导扩增,从而进行病毒核酸检测时,可显著提高检测灵敏度,并缩短检测时间。

[0013] 另一方面,本发明提供了一种重组酶干粉,所述重组酶干粉含有如上所述的RecA基因表达的RecA蛋白。

[0014] 进一步地,所述重组酶干粉还含有uvsY蛋白和ssb蛋白(单链结合蛋白)。

[0015] 研究证明uvsY蛋白能辅助RecA蛋白,提高RecA蛋白的介导效率,从而提高检测核酸时的检测灵敏度。

[0016] RecA蛋白、uvsY蛋白和ssb蛋白共同介导模板解链以及实现模板和引物之间的链替换的效率。

[0017] 进一步地,所述重组酶干粉还含有Exo蛋白。

[0018] Exo蛋白能够识别探针的四氢呋喃键,切割探针,释放荧光,进行荧光检测。

[0019] 进一步地,所述重组酶干粉还含有DNA聚合酶P。

[0020] DNA聚合酶P来源于大肠杆菌的DNA聚合酶I,对链替换后的DNA实现特异的延伸。

[0021] 进一步地,所述重组酶干粉包括20ng/ μL ~50ng/ μL 的RecA蛋白,10ng/ μL ~50ng/ μL 的uvsY蛋白,10ng/ μL ~50ng/ μL 的DNA聚合酶P,30ng/ μL ~100ng/ μL 的ssb蛋白,20ng/ μL

~60ng/ μ L的Exo蛋白。

[0022] 重组酶干粉中各蛋白的比例和浓度对于反应的灵敏度和特异性十分关键,尤其是介导模板的解链以及实现模板和引物之间的链替换的RecA蛋白、UvsY蛋白和ssb蛋白。

[0023] 进一步地,所述重组酶干粉包括30ng/ μ L的RecA蛋白,20ng/ μ L的UvsY蛋白,30ng/ μ L的DNA聚合酶P,50ng/ μ L的ssb蛋白,20ng/ μ L的Exo蛋白。

[0024] 再一方面,本发明提供了一种病毒核酸快速检测试剂盒,包含如上所述的重组酶干粉。

[0025] 进一步地,所述试剂盒还包括引物探针组合,反应Buffer、Buffer B、阴性对照和阳性对照。

[0026] 反应Buffer可以为反应提供盐离子和稳定的pH,影响酶的活性;重组酶干粉是多种酶的冻干粉,加入反应液,在25-42 $^{\circ}$ C条件下扩增目的片段;引物探针组合与反应灵敏度和特异性有关;Buffer B是反应激活剂。

[0027] 可以理解,本发明提供的试剂盒可用于任何病毒核酸的检测,仅需提供待测病毒核酸序列,都可通过本发明提供的试剂盒进行快速检测,且都能提高检测灵敏度和缩短检测时间。

[0028] 进一步地,所述病毒为非洲猪瘟病毒,所述引物探针组合包括:

[0029] (1)上游引物,其序列如序列表中Seq ID NO.1所示;

[0030] (2)下游引物,其序列如序列表中Seq ID NO.2所示;

[0031] (3)荧光探针序列,其序列如序列表中Seq ID NO.3所示。

[0032] 进一步地,所述引物探针组合包括引物探针:0.5-2 μ L的10mM上游引物ASF-FP,0.5-2 μ L的10mM下游引物ASF-RP,0.5-1 μ L的10mM探针ASF-P。

[0033] 进一步地,所述反应Buffer为:10-30mM Tris-HCl (pH7.5),0.1mM-0.5mM dNTP,质量百分比3%-9%PEG8000或其它分子量的PEG,1-5mM DTT,10-20mM ATP,10-50mM 磷酸烯醇丙酮酸,和500-1500ng/ μ L丙酮酸激酶。

[0034] 进一步地,所述Buffer B:2-10mM Mg^{2+} ;所述阳性对照为含有ASFV(非洲猪瘟) p72基因片段的假病毒;所述阴性对照为生理盐水。

[0035] 所述ASFV p72基因序列如序列表中Seq ID NO.4所示。

[0036] 再一方面,本发明提供了采用如上所述的试剂盒进行病毒核酸快速检测的方法,所述方法包括以下步骤:

[0037] (1)提取待测核酸,配制阳性对照和阴性对照;

[0038] (2)配制重组酶干粉置于反应管中,并加入反应Buffer、上游引物、下游引物、荧光探针;

[0039] (3)向反应管中加入待测核酸、阳性对照和阴性对照,再加入Buffer B,震荡混匀,离心;

[0040] (4)等温扩增,荧光分析待测样品。

[0041] 在一些方式中,所述病毒为非洲猪瘟病毒。

[0042] 在一些方式中,所述核酸为ASFV p72基因。

[0043] 本发明提供的重组酶扩增快速检测病毒方法,是在25 $^{\circ}$ C-42 $^{\circ}$ C条件下进行反应,仪器的依赖程度低,反应时间短,检测时间仅需要5-20分钟,具有灵敏度高,特异性强,检测

时间短,操作简便,仪器成本低等特点。

[0044] 在一些方式中,本发明利用等温扩增技术,在37-42℃恒温扩增检测非洲猪瘟病毒核酸。

[0045] 在一些方式中,重组酶介导扩增的反应程序如下:

步骤	温度	时间/循环	循环数	荧光信号收集
预热	37-42℃	40s	1	否
扩增	37-42℃	30s	40	是

[0047] 备注:扩增过程中,高浓度样本仅需10~20次循环即可以扩增出曲线,低浓度样本需30~40次循环。

[0048] 进一步地,本发明提供的一种快速非洲猪瘟核酸检测的方法,包括以下步骤:

[0049] ①核酸提取,按照病毒核酸提取试剂盒说明书进行提取,同时提取阳性对照和阴性对照;

[0050] ②在酶干粉管中加入10μL的反应Buffer,0.5-2μL的10mM上游引物,0.5-2μL的10mM下游引物,0.5-1μL的10mM探针;酶干粉制备:先加入液体酶50μL,然后冷冻干燥成固体粉末,每种蛋白含量为浓度*50μL;

[0051] ③在反应管中加入5-20μL的核酸提取产物,然后加入1-3μL Buffer B,用ddH₂O将反应体系补充到50μL,震荡混匀,快速离心5-10S;

[0052] ④将反应管放入PCR扩增仪中,25-42℃反应5-20分钟,每30s收集一次荧光信号;检测结束后,根据荧光信号判断是否为阳性样本。

[0053] 本发明的有益效果为:

[0054] 1、通过对野生型的RecA基因进行基因编辑,获得了新型RecA基因,利用该新型RecA基因表达获得的RecA蛋白,可溶性和重组酶活性都得到明显提高;当利用该新型RecA蛋白进行病毒核酸检测,可显著提高检测灵敏度,并缩短检测时间;

[0055] 2、利用该新型RecA蛋白,搭配UvsY蛋白和ssb蛋白制备重组酶干粉,进一步提高重组酶介导效率,从而提高检测核酸时的检测灵敏度,进一步缩短检测试剂;

[0056] 3、找出最适于利用该重组酶干粉检测非洲猪瘟p72基因的引物探针组,并优化反应体系,使最低可以检测出5copies/μL的样本,经过计算灵敏度约为50copies/test,检测时间仅需5-20分钟,检测速度快、灵敏度高,特异性强。

[0057] 4、操作简单,仪器的适应性广,既可以适配目前的市场上PCR扩增仪,也可以利用恒温扩增仪,不依赖于精密的核酸扩增仪器,检测时间短,灵敏度高,既可手工操作也可用于自动化平台,广泛适合客户快速、有效、经济的检测需求,干粉酶体系,可以常温运输,适应场景多,应用前景广阔。

附图说明

[0058] 图1~3为实施例3中的3组引物探针组的检测结果图,其中图1为引物探针组1的检测结果,图2为引物探针组2的检测结果,图3为引物探针组3的检测结果;

[0059] 图4~6为实施例6中的两组重组酶体系对不同浓度假病毒的检测结果图,其中图4为 2×10^4 copies/μL的假病毒检测结果,图5为 2×10^3 copies/μL的假病毒检测结果,图6为200copies/μL的假病毒检测结果;

[0060] 图7~9为实施例7中的不同浓度假病毒的检测结果,其中图7为采用高浓度(2×10^4 copies/ μ L, 2×10^3 copies/ μ L)样本的检测结果,图8为采用中浓度(200copies/ μ L,100copies/ μ L,50copies/ μ L)样本的检测结果,图9为采用低浓度(50copies/ μ L,20copies/ μ L,5copies/ μ L)样本的检测结果。

具体实施方式

[0061] 下面结合实施例对本发明作进一步详细描述,需要指出的是,以下所述实施例旨在便于对本发明的理解,而对其不起任何限定作用。本实施例中未特别指出的试剂均为已知产品,通过购买市售产品获得。

[0062] 实施例1本发明提供的RecA基因的编辑

[0063] 本实施例针对耐辐射异常球菌的野生型的RecA基因(Gene ID:68370659,Seq ID NO.5),其序列如下:

[0064] ATGAGCAAGGACGCCACCAAAGAAATCTCCGCCCCACCGACGCCAAGGAACGCAGCAAGGCCATCGA
AACAGCCATGA GCCAGATCGAAAAGGCCTTCGGCAAGGGCTCGATCATGAAACTGGGCGCCGAGAGCAAACCTCGA
CGTGCAGGTCGTCAG CACCGGCAGCCTCAGCCTTGACCTCGCACTGGGCGTGGGCGGCATTCCGCGTGGCCGCAT
CACCGAGATCTACGGCCCCG AGTCGGGCGGCAAGACCACCCTGGCCCTCGCCATCGTCGCGCAGGCCAGAAAGC
GGGCGGCACCTGTGCGTTTATCGA CGCCGAGCACGCGCTCGACCCGGTGTACGCCCGCGCCCTGGGCGTGAACAC
CGACGAACTGCTGGTGTGCGAGCCCGAC AACGGCGAGCAGGCGCTCGAAATCATGAACTGCTGGTGCCTTCGGG
CGCGATTGATGTGGTGGTTCGTGGACTCGGTGG CTGCTCTGACCCCCCGCGCGAAATCGAGGGCGACATGGGCGA
CAGCCTGCCCGGTCTTCAGGCCCGCCTGATGTCGAG GCGCTGCGCAAGCTGACGGCGATTCTCTCCAAGACCGG
CACCGCCGCCATCTTCATCAACCAGGTTTCGCGAGAAAATCGG CGTGATGTACGGCAACCCCGAAACCACCACCGG
GGGCGGGCGCTGAAGTTCTACGCCAGCGTGCCTCGACGTGCGT AAGATCGGCCAGCCCACCAAGGTCGGCAA
CGACGCGGTCGCCAACACCGTCAAGATCAAGACCGTGAAGAACAAGGTC GCCGCCCCCTTCAAGGAAGTCGAACT
CGCGCTGGTCTACGGCAAGGGCTTCGACCAGCTCAGCGACCTCGTGGGCTGG CCGCCGACATGGACATCATCAA
GAAGGCCGGCAGCTTCTACTCCTACGGCGACGAGCGCATCGGCCAGGGCAAGGAAAA GACCATCGCCTACATCGC
CGAGCGCCCCGAGATGGAGCAGGAAATCCGCGACCGGTGATGGCCGCATCCGCGCGGGC AACGCGGGCGAAGC
ACCGGCCCTGGCCCCCGCGCTGCCGCGCCCGAAGCCGCGAAGCGTAA

[0065] 对野生型的RecA基因进行基因编辑,在RecA蛋白中引入了T4噬菌体重组蛋白的部分结构域,主要通过野生型的“GGACATC”后面引入了序列“AAAAATGGCTGGTATGCTCGTGAA
TTTCTTGACGAAGAAACTGGCGAGATGATTC GCGAAGAAAAATCTTGGCGTGCAAAAGATACTAACTGCACTACA
TTCTGG”,获得新型的RecA基因(Seq ID NO.6):

ATGAGCAAGGACGCCACCAAAGAAATCTCCGCCCCACCGACGCCAAGGAACGAGCAAGGCCATCGAAACAGCCATG
 AGCCAGATCGAAAAGGCCTTCGGCAAGGGCTCGATCATGAAACTGGGCGCCGAGAGCAAACCTCGACGTGCAGTGCCTG
 AGCACCGGCAGCCTCAGCCTTGACCTCGCACTGGGCGTGGGCGGCATTCCGCGTGGCCGCATCACCGAGATCTACGGC
 CCCGAGTCGGGCGGCAAGACCACCTGGCCCTCGCCATCGTCGCGCAGGCCAGAAAGCGGGCGGCACCTGTGCGTTT
 ATCGACGCCGAGCACGCGCTCGACCCGGTGTACGCCCGCGCCCTGGGCGTGAACACCGACGAACTGCTGGTGTGCGAG
 CCCGACAACGGCGAGCAGGCGCTCGAAATCATGAACTGCTGGTGCCTTCGGGCGCGATTGATGTGGTGGTGTGCGAC
 TCGTGGCTGCTCTGACCCCGCGCGAAATCGAGGGCGACATGGGCGACAGCTGCCCGGTCTTCAGGCCCGCTG
 ATGTGCGAGGCGTGCACAAGCTGACGGCGATTCTCTCAAGACCGGCACCGCCGCATCTTCATCAACCAGTTTCGCG
 AGAAAATCGGCGTGATGTACGGCAACCCGAAACCACCACCGGGGGCCGGGCGCTGAAGTTCTACGCCAGCGTGCGCC
 TCGACGTGCGTAAGATCGGCCAGCCACCAAGGTCGGCAACGACGCGGTGCGCAACACCGTCAAGATCAAGACCGTGA
 AGAACAAAGGTCGCCGCCCTTCAAGGAAGTCGAACTCGCGCTGGTCTACGGCAAGGGCTTCGACCAGCTCAGCGACCT
 CGTGGGCTGGCCCGGACATG**GACATCAAAAATGGCTGGTATGCTCGTGAATTTCTTGACGAAGAAACTGGCGAGATG**
ATTCGCGAAGAAAATCTTGCGGTGCAAAAGATACTAAGTCACTACATTCTGGATCAAGAAGGCCGGCAGCTTCTACTC
 CTACGGCGACGAGCGCATCGGCCAGGGCAAGGAAAAGACCATCGCCTACATCGCCGAGCGCCCCGAGATGGAGCAGG
 AAATCCGCGACCGGTGATGGCCGCCATCCGCGGGCAACGCGGGCAAGCACCGGCCCTGGCCCCGCGCTGCCG
 CGCCCCGAAGCCGCCGAAGCGTAA

[0066] 委托上海生工进行基因合成,并利用该新型RecA基因在大肠杆菌中表达获得新型RecA蛋白。

[0068] 实施例2本发明提供的病毒核酸快速检测试剂盒及其用于病毒的检测

[0069] 本实施例利用实施例1提供的新型RecA蛋白,制备的试剂盒具体组成如下:

[0070] 1、酶干粉管:1.0 μ g-2.5 μ g(相当于20ng/ μ L-50ng/ μ L)的新型RecA蛋白(杭州禾 骑 士,lot:A20211011),0.5 μ g-2.5 μ g(相当于10ng/ μ L-50ng/ μ L)的uvsY(杭州禾 骑 士,lot:Y20111011),0.5 μ g-2.5 μ g(相当于10ng/ μ L-50ng/ μ L)的DNA聚合酶P(杭州禾 骑 士,lot:P20211014)和1.5 μ g-5 μ g(相当于30ng/ μ L-100ng/ μ L)的sbp蛋白(杭州禾 骑 士,lot:S20210910),1.0 μ g-3.0 μ g(相当于20ng/ μ L-60ng/ μ L)的Exo蛋白(杭州禾 骑 士,lot:E20210911)。

[0071] 2、反应Buffer:10-30mM Tris-HCl(pH7.5),0.1mM-0.5mM dNTP,质量百分比3%-9% PEG8000或其它分子量的PEG,1-5mM DTT,10-20mM ATP,10-50mM磷酸烯醇丙酮酸,500-1500ng/ μ l丙酮酸激酶;

[0072] 3、激活剂(Buffer B):2-10mM Mg²⁺;

[0073] 4、引物探针组:针对待测病毒,设计相应的上游引物、下游引物和探针,其配比为:0.5-2 μ L的10mM上游引物,0.5-2 μ L的10mM下游引物,0.5-1 μ L的10mM探针;

[0074] 5、阳性对照:含有待测病毒基因片段的假病毒;

[0075] 6、阴性对照为生理盐水。

[0076] 本实施例提供的试剂盒可以用于任何病毒的检测,检测方法为:

[0077] (1)提取待测核酸,配制阳性对照和阴性对照;

[0078] (2)向酶干粉管中加入反应Buffer、上游引物、下游引物、荧光探针;

[0079] (3)向反应管中加入待测核酸、阳性对照和阴性对照,再加入Buffer B,震荡混匀,离心;

[0080] (4)等温扩增,荧光分析待测样品。

[0081] 因篇幅有限,本实施例仅针对非洲猪瘟病毒进行举例说明。

[0082] 针对非洲猪瘟病毒的p72基因设计的引物探针组为:上游引物ASF-FP(SEQ ID

NO.1)、下游引物ASF-RP (SEQ ID NO.2) 和探针ASF-P (SEQ ID NO.3)。

[0083] 针对非洲猪瘟病毒核酸的快速检测试剂盒的具体组成如下：

[0084] 1、酶干粉管：1.0 μ g-2.5 μ g (相当于20ng/ μ L-50ng/ μ L) 的新型RecA蛋白 (杭州禾 骑 士, lot:A20211011), 0.5 μ g-2.5 μ g (相当于10ng/ μ L-50ng/ μ L) 的uvsY (杭州禾 骑 士, lot: Y20111011), 0.5 μ g-2.5 μ g (相当于10ng/ μ L-50ng/ μ L) 的DNA聚合酶P (杭州禾 骑 士, lot: P20211014) 和1.5 μ g-5 μ g (相当于30ng/ μ L-100ng/ μ L) 的ssb蛋白 (杭州禾 骑 士, lot: S20210910), 1.0 μ g-3.0 μ g (相当于20ng/ μ L-60ng/ μ L) 的Exo蛋白 (杭州禾 骑 士, lot: E20210911)。

[0085] 2、反应Buffer:10-30mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1mM-0.5mM dNTP, 质量百分比3%-9% PEG8000或其它分子量的PEG, 1-5mM DTT, 10-20mM ATP, 10-50mM磷酸烯醇丙酮酸, 500-1500ng/ μ l丙酮酸激酶；

[0086] 3、激活剂(Buffer B):2-10mM Mg²⁺；

[0087] 4、引物探针组:0.5-2 μ L的10mM上游引物ASF-FP (SEQ ID NO.1), 0.5-2 μ L的10mM 下游引物ASF-RP (SEQ ID NO.2), 0.5-1 μ L的10mM探针ASF-P (SEQ ID NO.3)；

[0088] 5、阳性对照:含有ASFV p72基因片段的假病毒,如SEQ ID NO.4所示；

[0089] 6、阴性对照为生理盐水。

[0090] 非洲猪瘟病毒核酸的快速检测试剂盒检测非洲猪瘟病毒的方法如下：

[0091] (1)核酸提取,按照病毒核酸提取试剂盒说明书进行提取,同时提取阳性对照和阴性对照；

[0092] (2)在酶干粉管中加入10 μ L的反应Buffer,1 μ L的10mM上游引物,1 μ L的10mM 下游引物,0.5 μ L的10mM探针；

[0093] (3)反应管中加入5 μ L的核酸提取产物、5 μ L阳性对照和5 μ L阴性对照,然后加入2.5 μ L Buffer B,用30 μ L ddH₂O将反应体系补充到50 μ L,震荡混匀,快速离心5-10S；

[0094] (4)将反应管放入PCR扩增仪中,25-42 $^{\circ}$ C反应5-20分钟,每30s收集一次荧光信号；检测结束后,根据荧光信号判断是否为阳性样本。

[0095] 恒温扩增的反应程序如表1：

[0096] 表1、恒温扩增的反应程序

[0097]

步骤	温度	时间/循环	循环数	荧光信号收集
预热	37-42 $^{\circ}$ C	40s	1	否
扩增	37-42 $^{\circ}$ C	30s	40	是

[0098] 备注:扩增过程中,高浓度样本仅需10~20次循环即可以扩增出曲线,低浓度样本需30~40次循环。

[0099] 实施例3检测非洲猪瘟病毒引物探针组的筛选

[0100] 与普通PCR利用退火过程中引物和模板互补结合不同,等温核酸技术是在常温条件下,利用重组酶和引物的聚合体,搜索模板DNA上与之完全匹配的互补序列,然后在单链DNA结合蛋白的帮助下,打开模板DNA的双链结构,并在DNA聚合酶P的作用下,形成新的DNA互补链。由于等温扩增技术和普通PCR扩增原理不同,在引物的设计上也完全不同,引物长度更长,约30nt,保证扩增过程中链的识别和特异性。由于引物较长,更容易形成二级结构,和引物二聚体,在37-42 $^{\circ}$ C下扩增,二级结构不容易打开,会影响扩增效率,所以设计

的难度较大。

[0101] 目前也没有针对重组酶介导扩增的引物探针的设计软件,需要进行广泛的筛选。重组酶介导扩增的探针设计也比较独特,在序列的内部进行荧光集团和淬灭集团的修饰,中间通过四氢呋喃键连接,外切酶识别四氢呋喃键,切割探针,释放荧光,探针的3'端进行磷酸化封闭。

[0102] 本实施例采用实施例2提供的试剂盒和检测方法检测非洲猪瘟病毒,其中重组酶干粉组成为:20ng/ μ L的新型RecA蛋白,10ng/ μ L的uvsY,30ng/ μ L的DNA聚合酶P和30ng/ μ L的ssb蛋白,20ng/ μ L的Exo蛋白,并针对非洲猪瘟病毒的p72基因设计了多组引物探针组,从中挑选了三组列于表2,分别为组1、组2,组3,然后在上海生工生物进行合成,按照引物探针中的稀释方法,将引物探针稀释到10mM。

[0103] 表2、针对非洲猪瘟病毒p72基因设计的引物探针组

组别	名称	序列
[0104] 组 1	ASF-FP	CAGATATAGATGAACATGCGTCTGGAAG (SEQ ID NO.1)
	ASF-RP	ATCCTCATCAACACCGAGATTGGCACA (SEQ ID NO.2)
	ASF-P	TATCTCTGCGTGGTGAGTGGGCTGCA/I6FAMdT/A/idSP//IBHQ1dT/GGCG TTAACAACAT (SEQ ID NO.3)
[0104] 组 2	ASF-FP1	TGTGCCAATCTCGGTGTTGATGAGGAT (SEQ ID NO.7)
	ASF-RP1	CCACACCAACAATAACCACCACGATG (SEQ ID NO.8)
	ASF-P1	GTTCCAGGTAGGTTTTAATCCTATAAACA/I6FAMdT/A/idSP/A/IBHQ1dT/T CAATGGGCCAT (SEQ ID NO.9)
[0104] 组 3	ASF-FP2	CCGAACCTTGTGCCAATCTCGGTGTTGATG (SEQ ID NO.10)
	ASF-RP2	AACGCAGGTGACCCACCAACAATAACC (SEQ ID NO.11)
	ASF-P2	TAGGTTTTAATCCTATAAACATATAT/I6FAMdT/C/idSP/A/IBHQ1dT/GGGCC ATTAAGAGC (SEQ ID NO.12)

[0105] 将合成的假病毒用生理盐水稀释不同的浓度梯度(0、50、100、200copies/ μ L),然后用购买的病毒核酸提取试剂盒进行提取[天根生化科技(北京)有限公司,病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒(DP315)],按照说明书取200 μ L的样本进行核酸提取,用100 μ L RNase-Free ddH₂O进行洗脱,然后取5 μ L的洗脱产物进行快速核酸检测。

[0106] 反应液体系为:

反应 buffer	10 μ L
DNA	5.0 μ L
激活剂	2.5 μ L
上游引物	1 μ L
[0107] 上游引物	1 μ L
探针	0.5 μ L
ddH ₂ O	30 μ L
总体积	50.0 μ L

[0108] 恒温扩增的反应程序如下:

步骤	温度	时间/循环	循环数	荧光信号收集
[0109] 预热	37-42 $^{\circ}$ C	40s	1	否
扩增	37-42 $^{\circ}$ C	30s	40	是

[0110] 备注:扩增过程中,高浓度样本仅需10~20次循环即可以扩增出曲线,低浓度样本

需30~40次循环。

[0111] 测试结果分别如图1~3所示,其中图1为引物探针组1的检测结果,图2为引物探针组2的检测结果,图3为引物探针组3的检测结果。

[0112] 由图1~3的结果可以看出,组1的引物探针进行检测时明显灵敏度更高,扩增曲线更好,成S型,且有较高的荧光强度(纵坐标值),当样本浓度低至50copies/ μ L时,依然能准确检测到,因此试剂盒的引物探针组优选组1。

[0113] 实施例4新型RecA蛋白与现有RecA蛋白对非洲猪瘟病毒检测的影响

[0114] 本实施例采用实施例2提供的试剂盒和检测方法检测非洲猪瘟病毒p72基因,重组酶干粉组成为:30ng/ μ L的RecA蛋白,20ng/ μ L的uvsY,30ng/ μ L的DNA聚合酶P和30ng/ μ L的ssb蛋白,50ng/ μ L的Exo蛋白,其中的RecA蛋白分别采用实施例1提供的新型RecA蛋白,以及现有的RecA蛋白(杭州禾骑士,lot:R20210912)。利用合成的假病毒用生理盐水稀释至0、5、20、50、100、150、200copies/ μ L进行检测,检测结果如表3所示。

[0115] 表3、新型RecA蛋白与现有RecA蛋白对非洲猪瘟病毒检测的影响

重组酶干粉	灵敏度(copies/ μ L)	检测时间
新型RecA蛋白	5	5-20min
现有RecA蛋白	150	20-30min

[0117] 由表3可见,由新型RecA基因表达的新型RecA蛋白,能显著提升非洲猪瘟病毒p72基因的检测灵敏度,使检测灵敏度达到5copies/ μ L,并缩短检测时间至5-20min。

[0118] 实施例5添加uvsY蛋白对非洲猪瘟病毒检测的影响

[0119] 本实施例采用实施例2提供的试剂盒和检测方法检测非洲猪瘟病毒p72基因,重组酶干粉组成为:30ng/ μ L的RecA蛋白,20ng/ μ L的uvsY,30ng/ μ L的DNA聚合酶P和50ng/ μ L的ssb蛋白,20ng/ μ L的Exo蛋白,其中重组酶干粉中分别加或者不加uvsY蛋白,考察uvsY蛋白对RecA蛋白是否具有辅助介导扩增的效果。利用合成的假病毒用生理盐水稀释至0、5、20、50、100、150、200copies/ μ L进行检测,检测结果如表4所示。

[0120] 表4、新型RecA蛋白与现有RecA蛋白对非洲猪瘟病毒检测的影响

重组酶干粉	灵敏度(copies/ μ L)	检测时间
加uvsY蛋白	5	5-20min
无uvsY蛋白	50	10-20min

[0122] 由表4可见,uvsY蛋白对新型RecA蛋白具有非常显著的辅助效果,加入uvsY蛋白能显著提升非洲猪瘟病毒p72基因的检测灵敏度,并能进一步缩短检测时间。其原因可能是因为新型RecA蛋白中引入了T4噬菌体重组蛋白的部分结构域,uvsY蛋白可以协助RecA蛋白与靶标片段结合,因此uvsY蛋白能够辅助新型RecA蛋白,提高重组酶介导效率,从而提高扩增效率,缩短扩增时间,并提高检测灵敏度。

[0123] 检测时间还需待测样本的病毒浓度密切相关,浓度较低时,扩增时间需要更长些,但当待测样本的病毒浓度一致时,添加uvsY蛋白能进一步缩短扩增时间,从而缩短检测时间。

[0124] 实施例6重组酶扩增体系的优化

[0125] 反应Buffer用于维持反应体系的pH值,提供DNA合成的原料,以及能量。Buffer B是反应的激活剂,加入适量的Buffer B启动反应进行。ssb蛋白是单链结合蛋白,RecA蛋白

是同源重组蛋白,克隆表达于耐辐射异常球(*Deinococcus radiodurans*),耐辐射异常球菌具有极端的耐辐射能力、高效DNA损伤修复机制,可以快速修复各种DNA损伤,RecA蛋白就是其中重要的DNA修复蛋白之一,进行DNA的同源重组修复,来源于耐辐射异常球菌的RecA蛋白,抗逆性强,但是从耐辐射异常球菌基因组克隆的表达的野生型RecA蛋白,在大肠杆菌表达体系中产物为包涵体,体外酶活性低。在野生型的recA基因(SEQ.N05)的基础上进行了基因编辑(SEQ.N06),提高了表达产物的可溶性和重组酶活性。新型RecA蛋白、UvsY和ssb蛋白介导模板的解链以及实现模板和引物之间的链替换,这一替换过程需要ATP来提供能量。DNA聚合酶P来源于大肠杆菌的DNA聚合酶I,对链替换后的DNA实现特异的延伸,Exo蛋白识别探针的四氢呋喃键,切割探针,释放荧光,进行荧光检测。

[0126] 本实施例采用实施例2提供的试剂盒和检测方法检测非洲猪瘟病毒p72基因,发现体系中各蛋白的比例和浓度对于反应的灵敏度和特异性十分关键,尤其是介导模板的解链以及实现模板和引物之间的链替换的ssb蛋白、新型RecA蛋白和UvsY蛋白。本实施例在已有反应体系的基础上,进行了进一步的优化,提高了ssb蛋白,新型RecA蛋白和UvsY蛋白的含量,明显提高了检测的灵敏度。

[0127] 重组酶干粉的配置:

[0128] 组1:20ng/ μ L新型RecA蛋白,10ng/ μ L uvsY蛋白,30ng/ μ L DNA聚合酶P和30ng/ μ L ssb蛋白,20ng/ μ LExo蛋白;

[0129] 组2:30ng/ μ L新型RecA蛋白,20ng/ μ L uvsY蛋白,30ng/ μ L DNA聚合酶P和50ng/ μ L ssb蛋白,20ng/ μ LExo蛋白。

[0130] 将合成的假病毒用生理盐水稀释不同的浓度梯度(20000、2000、200copies/ μ L),然后用购买的病毒核酸提取试剂盒进行提取[天根生化科技(北京)有限公司,病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒(DP315)],按照说明书取200 μ L的样本进行核酸提取,用100 μ L RNase-Free ddH₂O进行洗脱,然后取5 μ L的洗脱产物进行快速核酸检测。反应液体系和反应程序如实施例3所示。

[0131] 检测结果如图4~6所示,其中图4为 2×10^4 copies/ μ L的假病毒检测结果,图5为 2×10^3 copies/ μ L的假病毒检测结果,图6为200copies/ μ L的假病毒检测结果。根据图4~图6可以明显看出,不管对于病毒含量是在200copies/ μ L、2000copies/ μ L还是 2×10^4 copies/ μ L,采用组2的重组酶干粉体系时,都会明显比组1更早出峰,且有着更明显的指数期和平台期,扩增效果更好,灵敏度度高,出峰时间更快,因此优选采用组2的重组酶干粉体系,即30ng/ μ L新型RecA蛋白,20ng/ μ L uvsY蛋白,30ng/ μ L DNA聚合酶P和50ng/ μ L ssb蛋白,20ng/ μ LExo蛋白。

[0132] 实施例7不同浓度梯度样本对检测的影响

[0133] 本实施例采用实施例2提供的试剂盒和检测方法检测非洲猪瘟病毒p72基因,重组酶干粉组成为:30ng/ μ L的RecA蛋白,20ng/ μ L的uvsY,30ng/ μ L的DNA聚合酶P和50ng/ μ L的ssb蛋白,20ng/ μ L的Exo蛋白,将合成的假病毒用生理盐水稀释不同的浓度梯度: 2×10^4 copies/ μ L、 2×10^3 copies/ μ L、200copies/ μ L、100copies/ μ L、50copies/ μ L、20copies/ μ L、5copies/ μ L,然后用购买的病毒核酸提取试剂盒进行提取[天根生化科技(北京)有限公司,病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒(DP315)],按照说明书取200 μ L的样本进行核酸提取,用100 μ L RNase-Free ddH₂O进行洗脱,然后取5 μ L的洗脱产物进行快速核酸检测。反应液

体系和反应程序如实施例3所示。

[0134] 测试结果如图7~9所示,其中图7为采用高浓度(2×10^4 copies/ μ L, 2×10^3 copies/ μ L)样本的检测结果,图8为采用中浓度(200copies/ μ L,100copies/ μ L,50copies/ μ L)样本的检测结果,图9为采用低浓度(50copies/ μ L,20copies/ μ L,5copies/ μ L)样本的检测结果。

[0135] 由图7~图9可以看出,在高浓度样本检测条件下,2-5分钟出现荧光信号,低浓度样本在5-10分钟出现荧光信号,在20分钟的时候,荧光信号达到平台期,最低可以检测出5copies/ μ L的样本,经过计算灵敏度约为50copies/test(灵敏度=[5copies/ μ L \times 200 μ L(样本)/100] \times 5 μ L),检测速度快、灵敏度高。

[0136] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但上述实施例是示例性的,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例中以合适的方式结合和组合,在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改、改进、替换或变型,均属于本发明要求保护的范围。

[0137] 序列表

[0138] SEG N01:

[0139] ASF-FP:

[0140] CAGATATAGATGAACATGCGTCTGGAAG

[0141] SEG N02:

[0142] ASF-RP:

[0143] ATCCTCATCAACACCGAGATTGGCACA

[0144] SEG N03:

[0145] ASF-P:

[0146] TATCTCTGCGTGGTGAGTGGGCTGCA/I6FAMdT/A/idSP//IBHQ1dT/GGCGTTAACAACAT

[0147] SEQ N04:

[0148] P72:

[0149] AGGTAATGTGATCGGATACGTAACGGGGCTAATATCAGATATAGATGAACATGCGTCTGGAAGAGCTG
TATCTCTATCTGA AAGCTTATCTCTGCGTGGTGAGTGGGCTGCATAATGGCGTTAACAACATGTCCGAACCTTGT
GCCAATCTCGGTGTTGATGA GGATTTTGATCGGAGATGTTCCAGGTAGGTTTTAATCCTATAAACATATATTCAA
TGGGCCATTTAAGAGCAGACATTAGTTT TTCATCGTGGTGGTTATTGTTGGTGTGGGTCACCTGCGTTTTATGGA
CACGTATCAGCGAAAAGCGAACGCGTTTTACAAA AAGGTTGTGTATTTACAGGGGTTACAAAACAGGTTAT

[0150] SEQ N05:

[0151] 野生RecA:

[0152] ATGAGCAAGGACGCCACCAAAGAAATCTCCGCCCCACCGACGCCAAGGAACGCAGCAAGGCCATCGA
AACAGCCATGA GCCAGATCGAAAAGGCCTTCGGCAAGGGCTCGATCATGAAACTGGGCGCCGAGAGCAAACCTCGA
CGTGCAGGTCGTCAG CACCGGCAGCCTCAGCCTTGACCTCGCACTGGGCGTGGGCGGCATTCCGCGTGGCCGCAT
CACCGAGATCTACGGCCCCG AGTCGGGCGGCAAGACCACCCTGGCCCTCGCCATCGTCGCGCAGGCCAGAAAAGC
GGGCGGCACCTGTGCGTTTATCGA CGCCGAGCACGCGCTCGACCCGGTGTACGCCGCGCCCTGGGCGTGAACAC
CGACGAACTGCTGGTGTGCGAGCCCGAC AACGGCGAGCAGGCGCTCGAAATCATGAACTGCTGGTGCCTTCGGG

CGCGATTGATGTGGTGGTTCGTGGACTCGGTGG CTGCTCTGACCCCCCGCGCCGAAATCGAGGGCGACATGGGCGA
 CAGCCTGCCCCGGTCTTCAGGCCCCCTGATGTCGCAG GCGCTGCGCAAGCTGACGGCGATTCTCTCCAAGACCGG
 CACCGCCGCATCTTCATCAACCAGGTTTCGCGAGAAAATCGG CGTGATGTACGGCAACCCCGAAACCACCACCGG
 GGGCCGGGCGCTGAAGTTCTACGCCAGCGTGCGCCTCGACGTGCGT AAGATCGGCCAGCCACCAAGGTCGGCAA
 CGACGCGGTGCCAACACCGTCAAGATCAAGACCGTGAAGAACAAGGTC GCCGCCCCCTTCAAGGAAGTCGAACT
 CGCGCTGGTCTACGGCAAGGGCTTCGACCAGCTCAGCGACCTCGTGGGCCTGG CCGCCGACATGGACATCATCAA
 GAAGGCCGGCAGCTTCTACTCCTACGGCGACGAGCGCATCGGCCAGGGCAAGGAAAA GACCATCGCCTACATCGC
 CGAGCGCCCCGAGATGGAGCAGGAAATCCGCGACCGCGTGATGGCCGCCATCCGCGCGGGC AACGCGGGCGAAGC
 ACCGGCCCTGGCCCCCGCGCTGCCGCGCCCGAAGCCGCCGAAGCGTAA

[0153] SEQ N06:

[0154] 新型RecA:

ATGAGCAAGGACGCCACCAAAGAAATCTCCGCCCCACCGACGCCAAGGAACGCAGCAAGGCCATCGAAACAGCCATG
 AGCCAGATCGAAAAGGCCTTCGGCAAGGGCTCGATCATGAAACTGGGCGCCGAGAGCAAACCTCGACGTGCAGGTGCTG
 AGCACCGGCAGCCTCAGCCTTGACCTCGCACTGGGCGTGGGCGGCATTCCGCGTGGCCGCATCACCGAGATCTACGGC
 CCCGAGTCGGGCGGCAAGACCACCTGGCCCTCGCCATCGTCGCGCAGGCCAGAAAGCGGGCGGCACCTGTGCGTTT
 ATCGACGCCGAGCACGCGCTCGACCCGGTGTACGCCGCGCCCTGGGCGTGAACACCGACGAACTGCTGGTGTGCGAG
 CCCGACAACGGCGAGCAGGCGCTCGAAATCATGGAAGTCTGGTGTGCGTTGGGCGCGATTGATGTGGTGGTGTGCGGAC
 TCGGTGGCTGCTCTGACCCCCGCGCCGAAATCGAGGGCGACATGGGCGACAGCCTGCCCGGTCTTCAGGCCCGCCTG
 ATGTGCGAGGCGCTGCGCAAGCTGACGGCGATTCTCTCAAAGACCGGCACCGCCGCATCTTCATCAACCAGGTTTCGCG
 AGAAAAATCGGCGTGATGTACGGCAACCCCGAAACCACCACCGGGGGCCGGGCGCTGAAGTTCTACGCCAGCGTGCGCC
 TCGAGTGTGTAAGATCGGCCAGCCACCAAGTTCGGCAACGACGCGGTGCGCAACACCGTCAAGATCAAGACCGTGA
 AGAACAAAGTTCGCCGCCCTTCAAGGAAGTGAAGTCTGCGTGGTCTACGGCAAGGGCTTCGACCAGCTCAGCGACCT
 CGTGGGCTGGCCGCCGACATG **GACATCAAAAATGGCTGGTATGCTCGTGAATTTCTTGACGAAGAACTGGCGAGATG**
ATTGCGGAAGAAAAATCTTGGCGTGCAAAGATACTAAGTCACTACATTCTGGATCAAGAAGGCCGGCAGCTTCTACTC
 CTACGGCGACGAGCGCATCGGCCAGGGCAAGGAAAAGACCATCGCCTACATCGCCGAGCGCCCCGAGATGGAGCAGG
 AAATCCGCGACCGCGTGATGGCCGCCATCCGCGCGGGCAACGCGGGCGAAGCACCGGCCCTGGCCCCGCGCTGCCG
 CGCCGAAGCCGCCGAAGCGTAA

[0155]

[0156] SEQ N07:

[0157] ASF-FP1:

[0158] TGTGCCAATCTCGGTGTTGATGAGGAT

[0159] SEQ N08:

[0160] ASF-RP1:

[0161] CCACACCAACAATAACCACCACGATG

[0162] SEQ N09:

[0163] ASF-P1:

[0164] GTTCCAGGTAGGTTTTAATCCTATAAACA/I6FAMdT/A/idSP/A/IBHQ1dT/TCAATGGGCCAT

[0165] SEQ N010:

[0166] ASF-FP2:

[0167] CCGAACTTGTGCCAATCTCGGTGTTGATG

[0168] SEQ N011:

[0169] ASF-RP2:

[0170] AACGCAGGTGACCCACACCAACAATAACC

[0171] SEQ N012:

[0172] ASF-P2:

[0173] TAGGTTTTAATCCTATAAACATATAT/I6FAMdT/C/idSP/A/IBHQ1dT/GGGCCATTTAAGAGC

序列表

<110> 浙江善测禾骑士生物科技有限公司

<120> 一种利用新型RecA酶制备的病毒快速核酸检测试剂盒及其检测方法

<160> 12

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cagatataga tgaacatgcg tctggaag 28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

atcctcatca acaccgagat tggcaca 27

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

tatctctgcg tggtgagtgg gctgcaamdt adsbhdtggc gttaacaaca t 51

<210> 4

<211> 362

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

aggtaatgtg atcggatacg taacggggct aatatcagat atagatgaac atgcgtctgg 60
 aagagctgta tctctatcct gaaagcttat ctctgcgtgg tgagtgggct gcataatggc 120
 gttaacaaca tgtccgaact tgtgccaatc tcggtgttga tgaggatttt gatcggagat 180
 gttccaggta ggttttaate ctataaacat atattcaatg ggccatttaa gagcagacat 240
 tagtttttca tcgtggtggt tattgttgggt gtgggtcacc tgcgtttttat ggacacgtat 300
 cagcgaaaaag cgaacgcggt ttacaaaaag gttgtgtatt tcaggggtta caaacaggtt 360
 at 362

<210> 5

<211> 1092

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

atgagcaagg acgccaccaa agaaatctcc gccccaccg acgccaagga acgcagcaag 60
gccatcgaaa cagccatgag ccagatcgaa aaggccttcg gcaagggtc gatcatgaaa 120
ctgggcgccg agagcaaact cgacgtgcag gtcgtcagca ccggcagcct cagccttgac 180
ctcgcactgg gcgtgggcgg cattccgcgt ggccgcatca ccgagatcta cggccccgag 240
tcgggcggca agaccaccct ggccctcgcc atcgtcgcgc aggcccagaa agcgggcggc 300
acctgtgcgt ttatcgacgc cgagcacgcg ctgacccgg tgtacgcccg cgccctgggc 360
gtgaacaccg acgaactgct ggtgtcgcag cccgacaacg gcgagcaggc gctcgaaatc 420
atggaactgc tgggtgcgttc gggcgcgatt gatgtggtgg tcgtggactc ggtggctgct 480
ctgaccccc gcgccgaaat cgagggcgac atgggcgaca gctgcccgg tcttcaggcc 540
cgctgatgt cgcaggcgct gcgcaagctg acggcgattc tctccaagac cggcaccgcc 600
gccatcttca tcaaccaggt tcgcgagaaa atcggcgtga tgtacggcaa ccccgaaacc 660
accaccgggg gccgggcgct gaagttctac gccagcgtgc gcctcgacgt gcgtaagatc 720
ggccagccca ccaaggtcgg caacgacgcg gtcgccaaca ccgtcaagat caagaccgtg 780
aagaacaagg tcgcccccc cttcaaggaa gtcgaactcg cgctggtcta cggcaagggc 840
ttcgaccagc tcagcgacct cgtgggcctg gccgccgaca tggacatcat caagaaggcc 900
ggcagcttct actcctacgg cgacgagcgc atcggccagg gcaaggaaaa gaccatcgcc 960
tacatcgccg agcgcgccga gatggagcag gaaatccgcg accgcgtgat ggccgccatc 1020
cgcgccgggca acgcgggcga agcaccggcc ctggcccccg cgctgccgc gcccgaaacc 1080
gccgaagcgt aa 1092

<210> 6

<211> 1197

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

atgagcaagg acgccaccaa agaaatctcc gccccaccg acgccaagga acgcagcaag 60
gccatcgaaa cagccatgag ccagatcgaa aaggccttcg gcaagggtc gatcatgaaa 120
ctgggcgccg agagcaaact cgacgtgcag gtcgtcagca ccggcagcct cagccttgac 180
ctcgcactgg gcgtgggcgg cattccgcgt ggccgcatca ccgagatcta cggccccgag 240
tcgggcggca agaccaccct ggccctcgcc atcgtcgcgc aggcccagaa agcgggcggc 300
acctgtgcgt ttatcgacgc cgagcacgcg ctgacccgg tgtacgcccg cgccctgggc 360
gtgaacaccg acgaactgct ggtgtcgcag cccgacaacg gcgagcaggc gctcgaaatc 420
atggaactgc tgggtgcgttc gggcgcgatt gatgtggtgg tcgtggactc ggtggctgct 480
ctgaccccc gcgccgaaat cgagggcgac atgggcgaca gctgcccgg tcttcaggcc 540
cgctgatgt cgcaggcgct gcgcaagctg acggcgattc tctccaagac cggcaccgcc 600
gccatcttca tcaaccaggt tcgcgagaaa atcggcgtga tgtacggcaa ccccgaaacc 660
accaccgggg gccgggcgct gaagttctac gccagcgtgc gcctcgacgt gcgtaagatc 720
ggccagccca ccaaggtcgg caacgacgcg gtcgccaaca ccgtcaagat caagaccgtg 780

aagaacaagg tcgccgcccc cttcaaggaa gtcgaactcg cgctggtcta cggcaagggc 840
ttcgaccagc tcagcgacct cgtgggcctg gccgcccgaca tggacatcaa aaatggctgg 900
tatgctcgtg aatttcttga cgaagaaact ggcgagatga ttcgcaaga aaaatcttgg 960
cgtgcaaaaag atactaactg cactacattc tggatcaaga aggccggcag cttctactcc 1020
tacggcgacg agcgcacatcg ccagggcaag gaaaagacca tcgcctacat cgccgagcgc 1080
cccgagatgg agcaggaaat ccgcgaccgc gtgatggccc ccatccgcbc gggcaacgcb 1140
ggcgaagcac cggccctggc ccccgcgct gccgcccgc aagccgccga agcgtaa 1197

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

tgtgccaatc tcggtgttga tgaggat 27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

ccacaccaac aataaccacc acgatg 26

<210> 9

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

gttccaggta ggttttaatc ctataaacia mtdadsabhd ttcaatgggc cat 53

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

ccgaacttgt gccaatctcg gtgttgatg 29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

aacgcaggtg acccacacca acaataacc 29

<210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

taggttttaa tcctataaac atatamdt cdsabhtgg gccatttaag agc 53

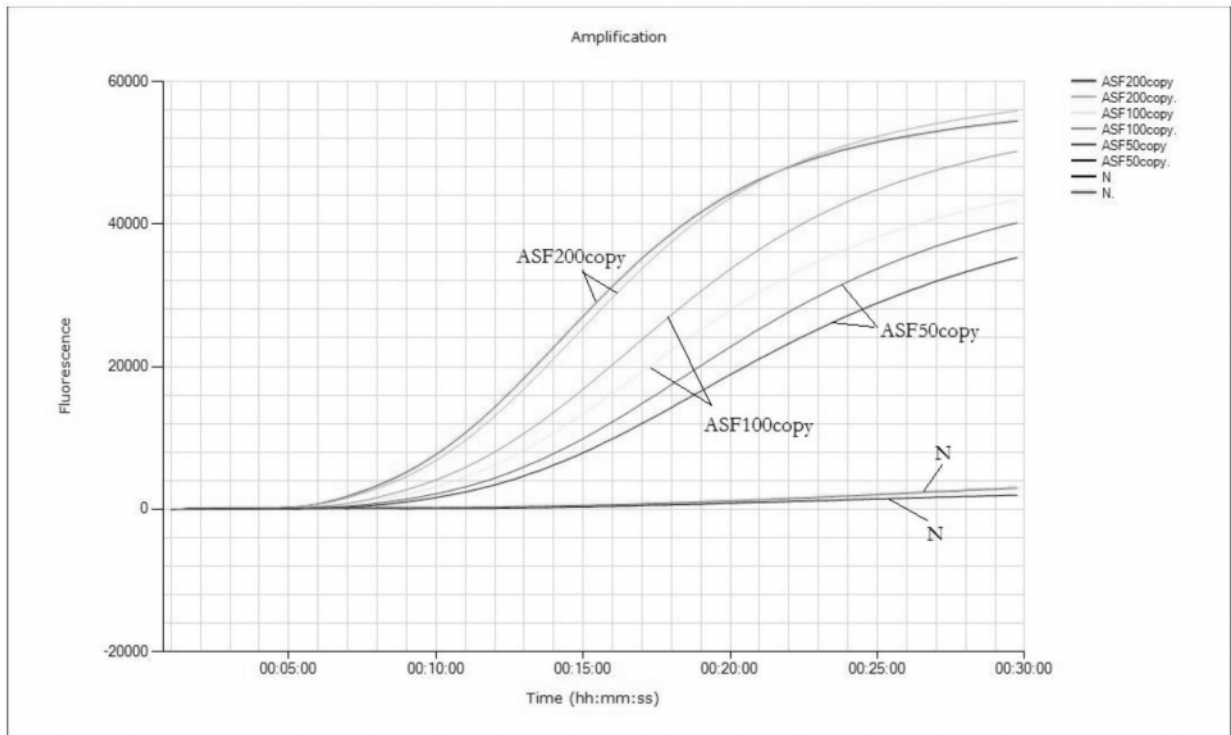


图1

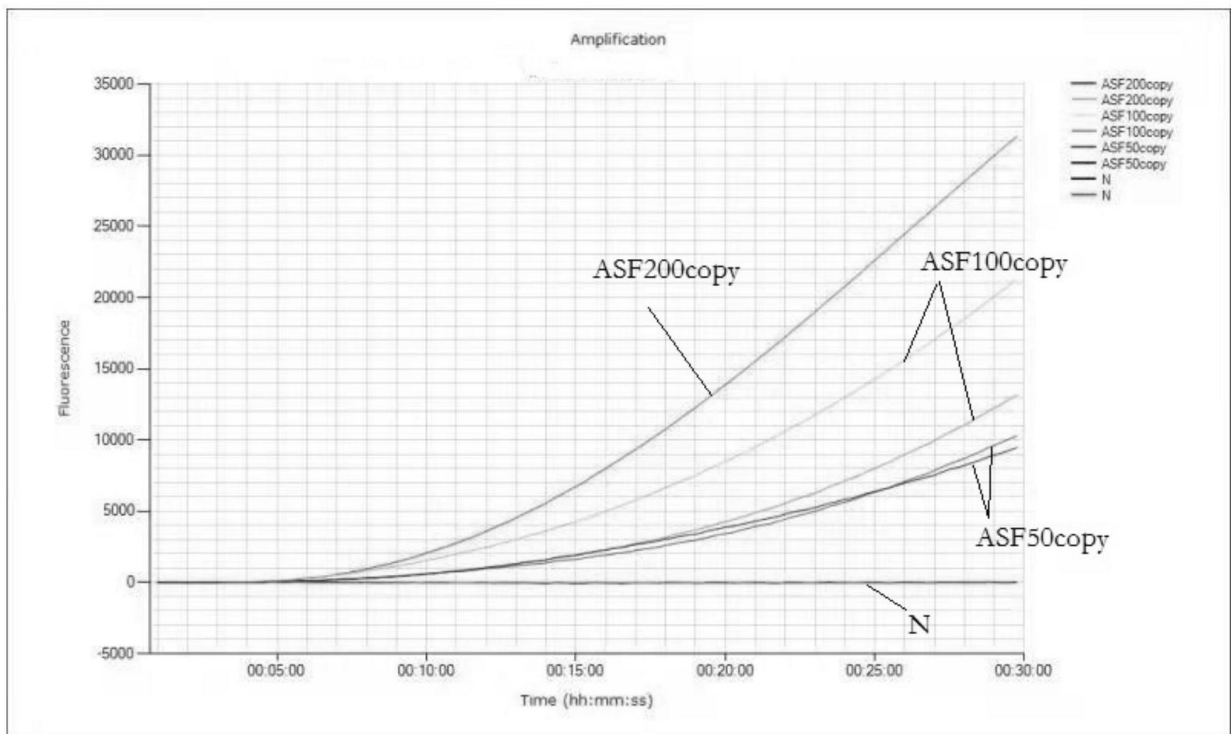


图2

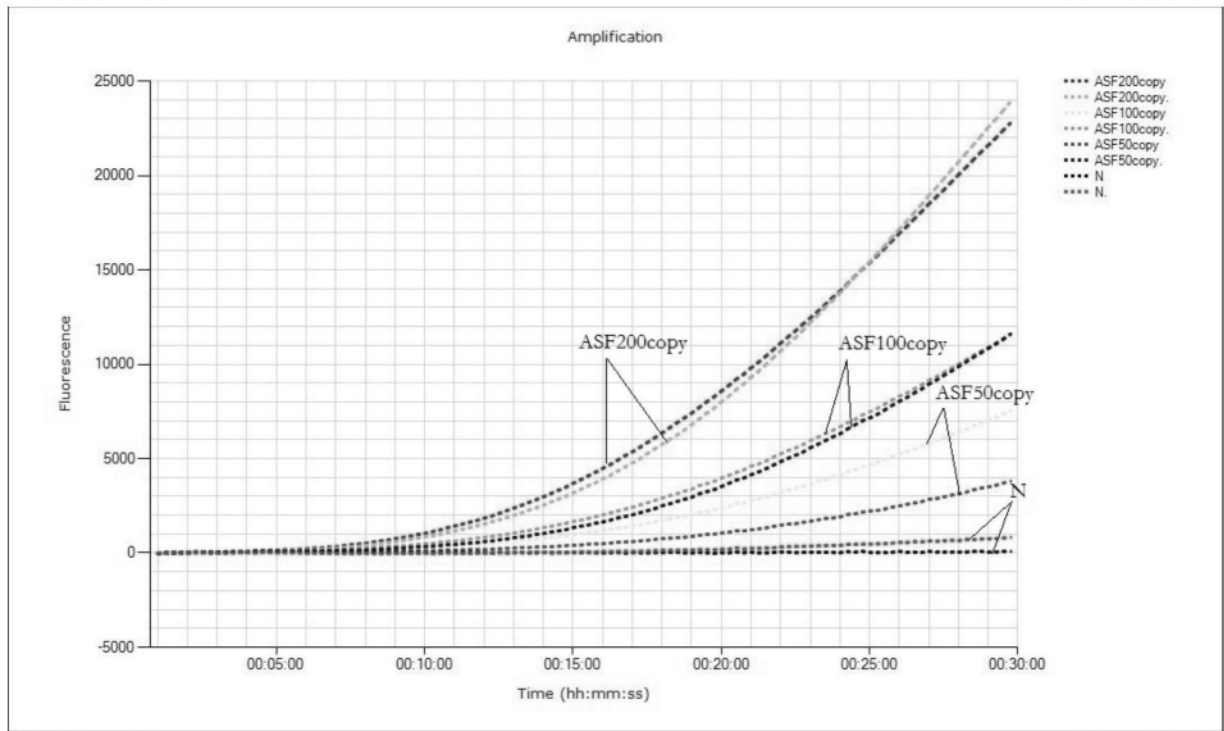


图3

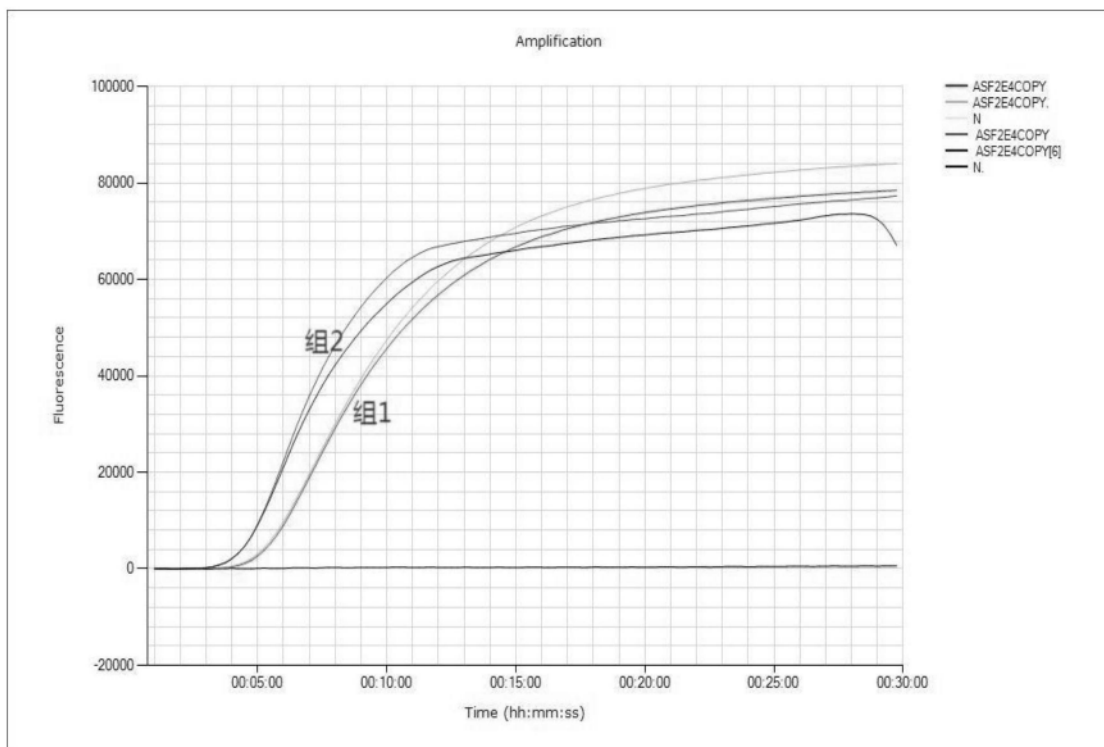


图4

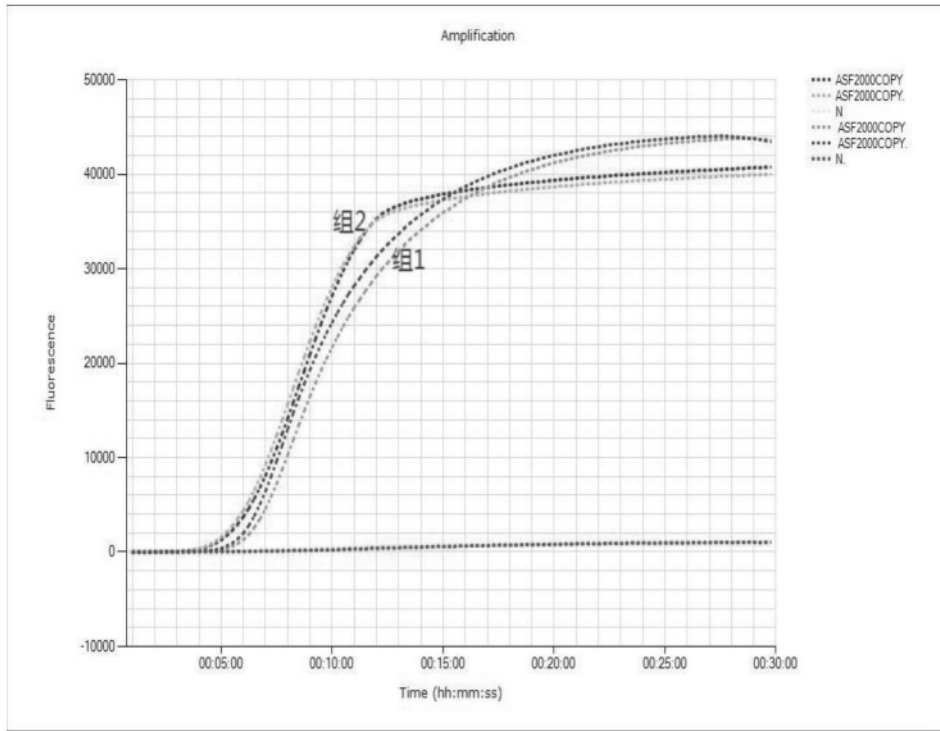


图5

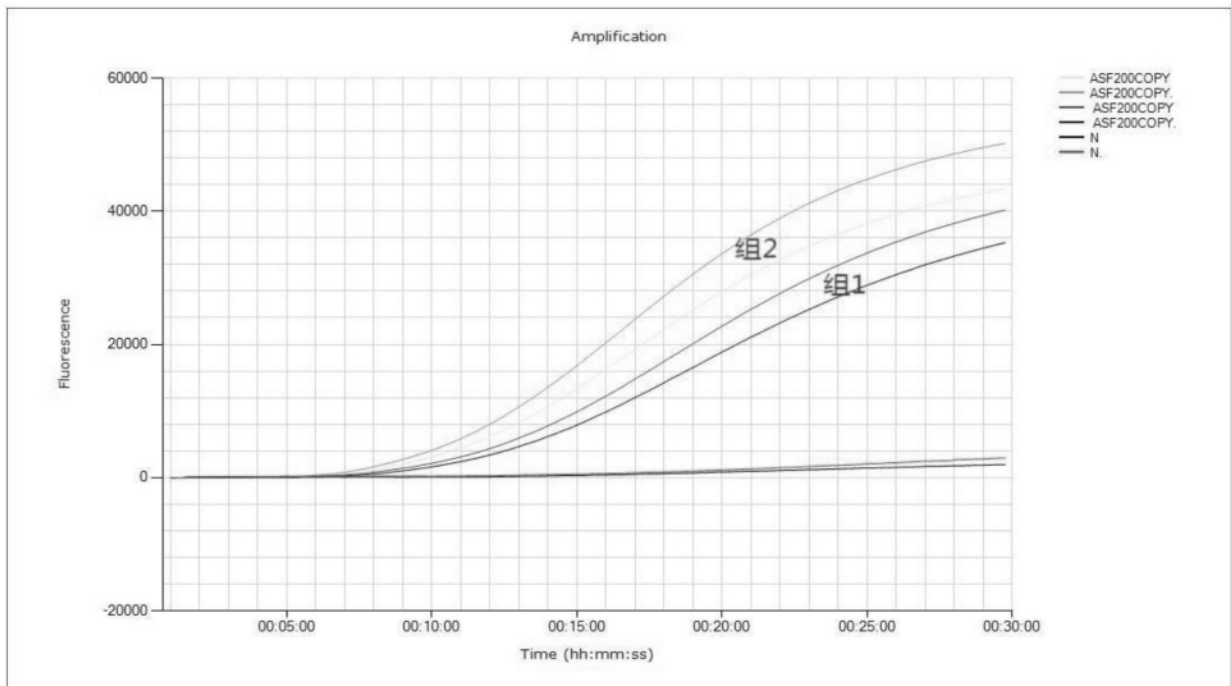


图6

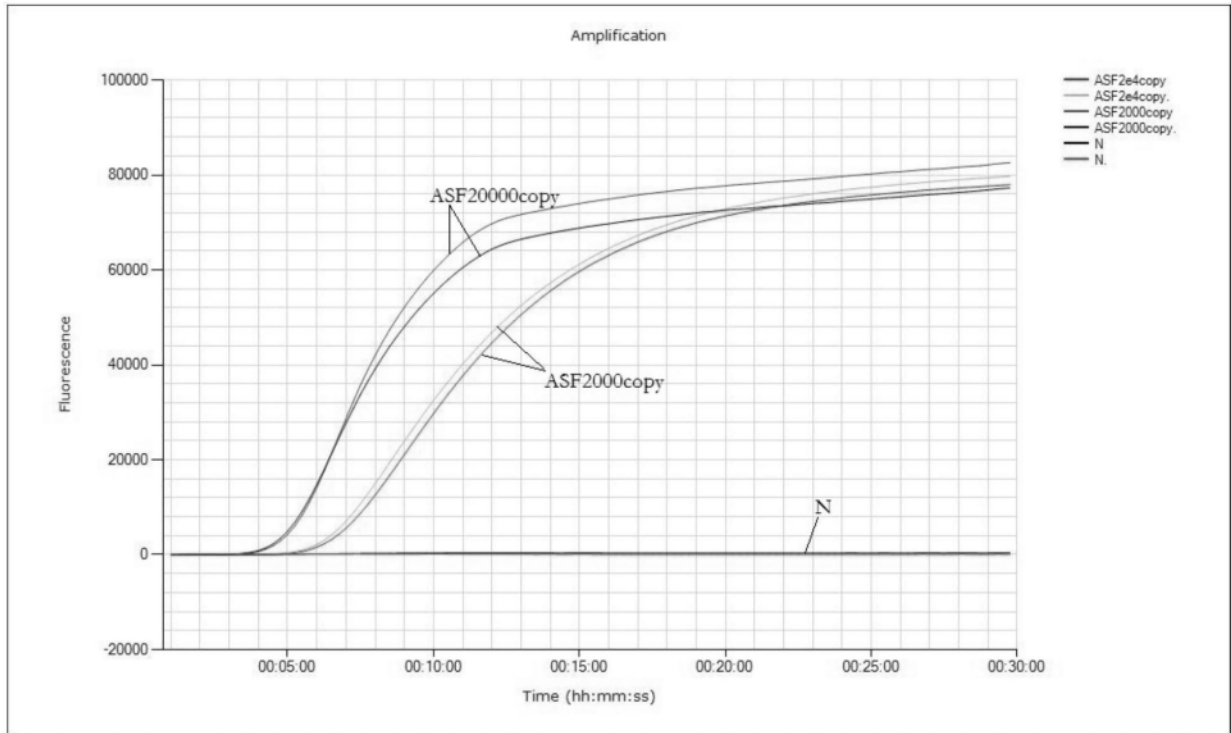


图7

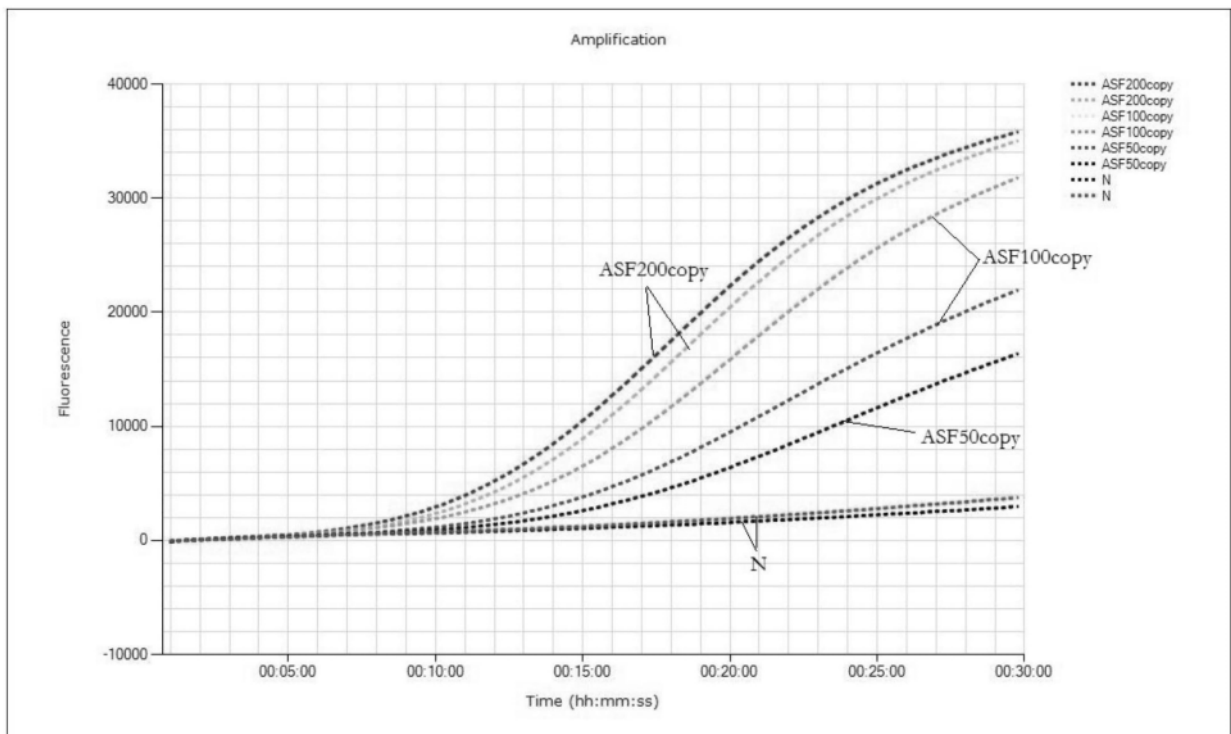


图8

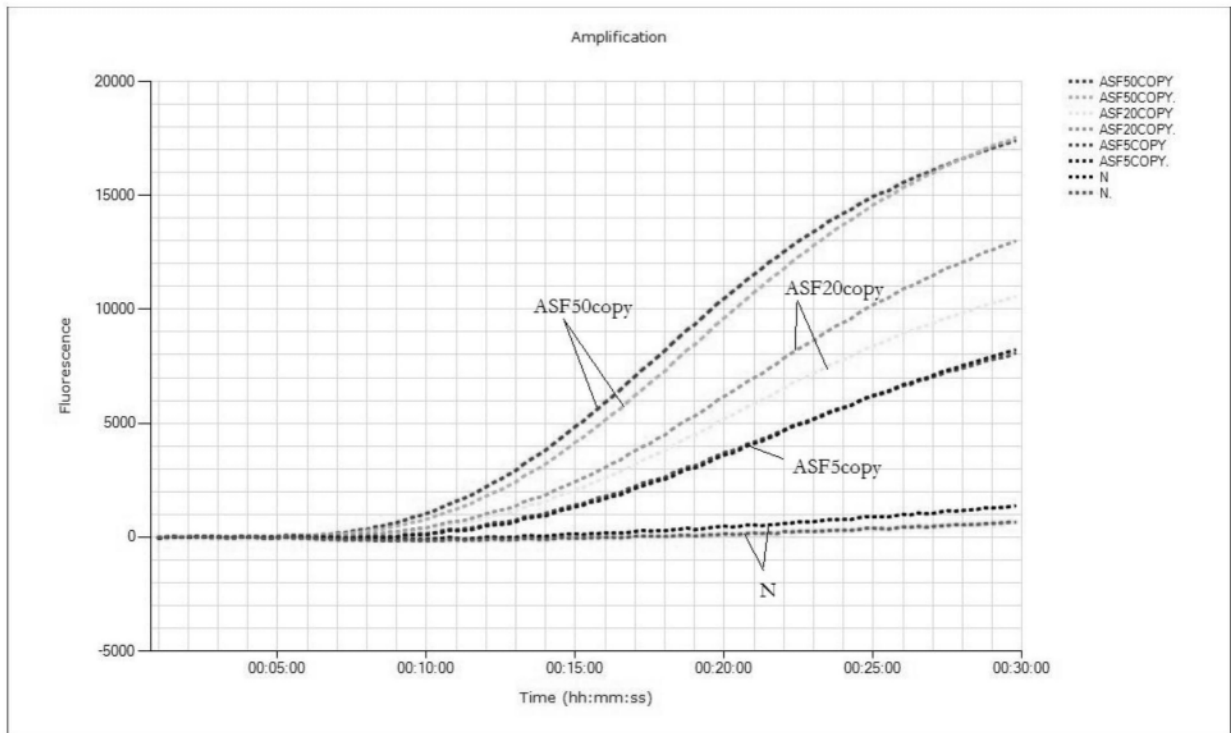


图9