



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105861757 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610430961.5

(22)申请日 2016.06.17

(71)申请人 广西壮族自治区兽医研究所

地址 530001 广西壮族自治区南宁市友爱
北路51号

(72)发明人 谢芝勋 李丹 李孟 谢志勤

罗思思 谢丽基 黄莉 范晴
黄娇玲

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51)Int. Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书4页 说明书11页

序列表4页 附图1页

(54)发明名称

H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的二重RT-PCR试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组。利用本发明所提供的用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组建立的二重RT-PCR,可准确鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒,且特异性好,灵敏度高,对H9亚型禽流感病毒和H6亚型AIV的最小检出限均达到 5×10^4 拷贝。因此,本发明所提供的引物对组可同时检测H9亚型AIV和H6亚型AIV,具有重要的应用价值。

1. 用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组,由特异引物对甲和特异引物对乙组成;

所述特异引物对甲,由用于扩增特异DNA片段甲的两条引物组成;所述特异DNA片段甲中具有H9亚型禽流感病毒基因组中引物H9-F和引物H9-R组成的引物对的靶序列;

所述引物H9-F为如下a1)或a2):

a1)序列表的序列1所示的单链DNA分子;

a2)将序列1经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列1具有相同功能的单链DNA分子;

所述引物H9-R为如下a3)或a4):

a3)序列表的序列2所示的单链DNA分子;

a4)将序列2经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列2具有相同功能的单链DNA分子;

所述特异引物对乙,由用于扩增特异DNA片段乙的两条引物组成;所述特异DNA片段乙中具有H6亚型禽流感病毒基因组中引物H6-F和引物H6-R组成的引物对的靶序列;

所述引物H6-F为如下b1)或b2):

b1)序列表的序列3所示的单链DNA分子;

b2)将序列3经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列3具有相同功能的单链DNA分子;

所述引物H6-R为如下b3)或b4):

b3)序列表的序列4所示的单链DNA分子;

b4)将序列4经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列4具有相同功能的单链DNA分子。

2. 如权利要求1所述的引物对组,其特征在于:所述特异引物对甲由所述引物H9-F和所述引物H9-R组成;所述特异引物对乙由所述引物H6-F和所述引物H6-R组成。

3. 权利要求1或2所述引物对组的应用,为如下c1)或c2)或c3)或c4)或c5)或c6)或c7):

c1)制备用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

c2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒;

c3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或候选的H6亚型禽流感病毒;

c4)制备用于鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

c5)鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒;

c6)制备用于检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

c7)检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒。

4. 含有权利要求1或2所述引物对组的试剂盒;所述试剂盒的功能为如下c2)或c3)或c5)或c7):

c2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒;

c3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或候选的H6亚型禽流感病毒;

c5)鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒;

c7)检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒。

5. 权利要求4所述试剂盒的制备方法,为如下(I)或(II):

(I)权利要求1或2所述引物对组中各引物对各条引物分别单独包装;

(II)权利要求1或2所述引物对组中各引物对各条引物按比例混合在一起。

6. 一种鉴定待测RNA病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒的方法,包括如下步骤q1)或q2):

q1)提取待测RNA病毒的RNA,采用权利要求1或2所述引物对组进行RT-PCR扩增,得到RT-PCR扩增产物,然后进行如下判断:如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒为或候选为的H9亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒为或候选为的H6亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒不为或候选不为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒;

q2)检测待测RNA病毒的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段或序列列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,然后进行如下判断:如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒为或候选为的H9亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒为或候选为的H6亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测RNA病毒不为或候选不为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

7. 一种鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的方法,包括如下步骤s1)或s2):

s1)提取待测病毒的RNA,采用权利要求1或2所述引物对组进行RT-PCR扩增,得到RT-PCR扩增产物,然后进行如下判断:如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H6亚型禽流感病毒;所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒;

s2)检测待测病毒的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段或序列列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,然后进行如下判断:如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H6亚型禽流感病毒;所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

8. 一种检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的方法,包括如下步骤t1)或t2):

t1)提取待测样本的总RNA,采用权利要求1或2所述引物对组进行RT-PCR扩增,得到RT-PCR扩增产物,然后进行如下判断:如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末

端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H9亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H6亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中不含有或候选不含有H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒;

t2)检测待测样本的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段或序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,然后进行如下判断:如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H9亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H6亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中不含有或候选不含有H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

9.用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒的特异引物对甲或用于鉴定或辅助鉴定H6亚型禽流感病毒的特异引物对乙;

所述特异引物对甲由用于扩增特异DNA片段甲的两条引物组成;所述特异DNA片段甲中具有H9亚型禽流感病毒基因组中引物H9-F和引物H9-R组成的引物对的靶序列;

所述引物H9-F为如下a1)或a2):

a1)序列表的序列1所示的单链DNA分子;

a2)将序列1经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列1具有相同功能的单链DNA分子;

所述引物H9-R为如下a3)或a4):

a3)序列表的序列2所示的单链DNA分子;

a4)将序列2经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列2具有相同功能的单链DNA分子;

所述特异引物对乙由用于扩增特异DNA片段乙的两条引物组成;所述特异DNA片段乙中具有H6亚型禽流感病毒基因组中引物H6-F和引物H6-R组成的引物对的靶序列;

所述引物H6-F为如下b1)或b2):

b1)序列表的序列3所示的单链DNA分子;

b2)将序列3经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列3具有相同功能的单链DNA分子;

所述引物H6-R为如下b3)或b4):

b3)序列表的序列4所示的单链DNA分子;

b4)将序列4经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列4具有相同功能的单链DNA分子。

10.f1)或f2):

f1)权利要求9所述特异引物对甲的应用,为如下d1)或d2)或d3):

d1)制备用于检测或辅助检测H9亚型禽流感病毒的试剂盒;

- d2) 鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒；
- d3) 鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒；
- f2) 权利要求9所述特异引物对乙的应用,为如下e1)或e2)或e3):
 - e1) 制备用于检测或辅助检测H6亚型禽流感病毒的试剂盒；
 - e2) 鉴定或辅助鉴定H6亚型禽流感病毒；
 - e3) 鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H6亚型禽流感病毒。

H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的二重RT-PCR试剂盒 及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的二重RT-PCR试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 禽流感病毒(Avian influenza virus,AIV)属于正黏病毒科,A型流感病毒属。目前的研究表明,AIV根据其表面的血凝素蛋白(Hemagglutinin,HA)和神经氨酸酶蛋白(Neuraminidase,NA)抗原的差异可以划分为16种HA亚型(H1~H16)和9种NA亚型(N1~N9)。另外,根据病毒对鸡致病性的强弱又可将其分为低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza,LPAIV)和高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza,HPAIV)。长期以来,因为LPAIV造成的家禽损失较小而往往被人们忽视和轻视。近年来的研究表明,LPAIV可以通过基因重组进而造成人类流感的大流行,其中H9亚型AIV和H6亚型AIV就是这类LPAIV中最重要的两个亚型之一。研究表明近年来新出现的可感染人的H7N9、H10N8、H6N1和H5N6亚型流感病毒的部分基因来自于H9N2亚型AIV。1997年香港地区发现的感染人的高致病性H5N1亚型AIV的7个基因来源于H6亚型AIV,这说明低致病性H6亚型AIV有可能为H5亚型HPAIV提供内部基因。2013年5月,台湾地区发现了首例H6N1亚型AIV直接感染人的案例。另外,血清学抗体调查表明H9亚型AIV和H6亚型AIV都可以感染人。因此,H9亚型AIV和H6亚型AIV对人类公共卫生安全具有重要意义,引起了广泛的关注。

[0003] 病毒分离鉴定是AIV检测的一种经典的方法,但该方法存在检测周期较长的缺点。目前检测AIV的方法主要是血清学和分子生物学方法,而血清学方法则需要标准阳性血清,具有一定的局限性。分子生物学检测方法具有快速准确等优点,特别是多重PCR具有操作简便,特异性高,敏感性好,省时省力等特点而得到了广泛的应用。

[0004] 研究表明,H6亚型AIV和H9亚型AIV在家禽中比较常见且有混合感染的情况存在。H9亚型AIV和H6亚型AIV混合感染具有相似的临床症状且传统的检测方法费时,难以及时准确的得到诊断结果。因此,建立一种可同时检测H9亚型AIV和H6亚型AIV的检测方法,不仅可以快速准确的鉴别两种亚型禽流感病毒,也为感染人的禽流感亚型的监测提供技术支撑,具有重要的公共卫生意义。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是如何鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组。

[0007] 本发明所提供的用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组,可由特异引物对甲和特异引物对乙组成。

[0008] 所述特异引物对甲,可由用于扩增特异DNA片段甲的两条引物组成。所述特异DNA片段甲中具有H9亚型禽流感病毒基因组中引物H9-F和引物H9-R组成的引物对的靶序列。

[0009] 所述引物H9-F可为如下a1)或a2):

[0010] a1)序列表的序列1所示的单链DNA分子;

[0011] a2)将序列1经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列1具有相同功能的单链DNA分子。

[0012] 所述引物H9-R可为如下a3)或a4):

[0013] a3)序列表的序列2所示的单链DNA分子;

[0014] a4)将序列2经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列2具有相同功能的单链DNA分子。

[0015] 所述特异引物对乙,可由用于扩增特异DNA片段乙的两条引物组成。所述特异DNA片段乙中具有H6亚型禽流感病毒基因组中引物H6-F和引物H6-R组成的引物对的靶序列。

[0016] 所述引物H6-F可为如下b1)或b2):

[0017] b1)序列表的序列3所示的单链DNA分子;

[0018] b2)将序列3经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列3具有相同功能的单链DNA分子。

[0019] 所述引物H9-R可为如下b3)或b4):

[0020] b3)序列表的序列4所示的单链DNA分子;

[0021] b4)将序列4经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列4具有相同功能的单链DNA分子。

[0022] 上述引物对组中,所述特异引物对甲可由所述引物H9-F和所述引物H9-R组成;所述特异引物对乙可由所述引物H6-F和所述引物H6-R组成。

[0023] 上述引物对组中,所述引物H9-F、所述引物H9-R、所述引物H6-F和所述引物H6-R的摩尔比具体可为5:5:8:8。

[0024] 上述任一所述引物对组的应用,可为如下c1)或c2)或c3)或c4)或c5)或c6)或c7):

[0025] c1)制备用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

[0026] c2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒;

[0027] c3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或候选的H6亚型禽流感病毒;

[0028] c4)制备用于鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

[0029] c5)鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒;

[0030] c6)制备用于检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的试剂盒;

[0031] c7)检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒。

[0032] 含有上述任一所述引物对组的试剂盒也属于本发明的保护范围;含有上述任一所述引物对组的试剂盒的功能可为如下c2)或c3)或c5)或c7):

[0033] c2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒;

[0034] c3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或候选的H6亚型禽

流感病毒；

[0035] c5)鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒；

[0036] c7)检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒。

[0037] 含有上述任一所述引物对组的试剂盒的制备方法也属于本发明的保护范围；含有上述任一所述引物对组的试剂盒的制备方法，具体可为如下(I)或(II)：

[0038] (I)上述任一所述引物对组中各引物对各条引物分别单独包装；

[0039] (II)上述任一所述引物对组中各引物对各条引物按比例混合在一起。

[0040] 所述(II)中，所述“各条引物按比例混合”具体可为所述引物H9-F、所述引物H9-R、所述引物H6-F和所述引物H6-R的摩尔比为5:5:8:8。

[0041] 为解决上述技术问题，本发明还提供了一种鉴定待测RNA病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒的方法。

[0042] 本发明所提供的鉴定待测RNA病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒的方法，可包括如下步骤q1)或q2)：

[0043] q1)提取待测RNA病毒的RNA，采用上述任一所述引物对组进行RT-PCR扩增，得到RT-PCR扩增产物，然后进行如下判断：如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒为或候选为的H9亚型禽流感病毒；如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒为或候选为的H6亚型禽流感病毒；如果所述RT-PCR扩增产物中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒不为或候选不为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒；

[0044] q2)检测待测RNA病毒的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段或序列列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，然后进行如下判断：如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒为或候选为的H9亚型禽流感病毒；如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒为或候选为的H6亚型禽流感病毒；如果所述cDNA中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，则所述待测RNA病毒不为或候选不为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

[0045] 为解决上述技术问题，本发明还提供了一种鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的方法。

[0046] 本发明所提供的鉴别H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的方法，可包括如下步骤s1)或s2)：

[0047] s1)提取待测病毒的RNA，采用上述任一所述引物对组进行RT-PCR扩增，得到RT-PCR扩增产物，然后进行如下判断：如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段，则所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒；如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段，则所述待测病毒为H6亚型禽流感病毒；所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒；

[0048] s2)检测待测病毒的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位

所示的DNA区段或序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,然后进行如下判断:如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测病毒为H6亚型禽流感病毒;所述待测病毒为H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

[0049] 为解决上述技术问题,本发明还提供了一种检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的方法。

[0050] 本发明所提供的检测待测样本中是否含有H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的方法,可包括如下步骤t1)或t2):

[0051] t1)提取待测样本的总RNA,采用上述任一所述引物对组进行RT-PCR扩增,得到RT-PCR扩增产物,然后进行如下判断:如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H9亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H6亚型禽流感病毒;如果所述RT-PCR扩增产物中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中不含有或候选不含有H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒;

[0052] t2)检测待测样本的cDNA中是否含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段或序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,然后进行如下判断:如果所述cDNA中含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H9亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中含有或候选含有H6亚型禽流感病毒;如果所述cDNA中不含有序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示的DNA区段且不含有序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示的DNA区段,则所述待测样本中不含有或候选不含有H9亚型禽流感病毒或H6亚型禽流感病毒。

[0053] 为解决上述技术问题,本发明还提供了用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒的特异引物对甲或用于鉴定或辅助鉴定H6亚型禽流感病毒的特异引物对乙。

[0054] 所述特异引物对甲可由用于扩增特异DNA片段甲的两条引物组成。所述特异DNA片段甲中具有H9亚型禽流感病毒基因组中引物H9-F和引物H9-R组成的引物对的靶序列。

[0055] 所述引物H9-F可为如下a1)或a2):

[0056] a1)序列表的序列1所示的单链DNA分子;

[0057] a2)将序列1经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列1具有相同功能的单链DNA分子。

[0058] 所述引物H9-R可为如下a3)或a4):

[0059] a3)序列表的序列2所示的单链DNA分子;

[0060] a4)将序列2经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列2具有相同功能的单链DNA分子。

[0061] 所述特异引物对乙可由用于扩增特异DNA片段乙的两条引物组成。所述特异DNA片段乙中具有H6亚型禽流感病毒基因组中引物H6-F和引物H6-R组成的引物对的靶序列。

- [0062] 所述引物H6-F可为如下b1)或b2):
- [0063] b1)序列表的序列3所示的单链DNA分子;
- [0064] b2)将序列3经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列3具有相同功能的单链DNA分子。
- [0065] 所述引物H9-R可为如下b3)或b4):
- [0066] b3)序列表的序列4所示的单链DNA分子;
- [0067] b4)将序列4经过一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加且与序列4具有相同功能的单链DNA分子。
- [0068] 所述特异引物对甲具体可由所述引物H9-F和所述引物H9-R组成。
- [0069] 所述特异引物对乙具体可由所述引物H6-F和所述引物H6-R组成。
- [0070] 所述特异引物对甲中所述引物H9-F、所述引物H9-R的摩尔比具体可为1:1。
- [0071] 所述特异引物对乙中所述引物H6-F、所述引物H6-R的摩尔比具体可为1:1。
- [0072] f1)所述特异引物对甲的应用也属于本发明的保护范围;所述特异引物对甲的应用可为如下d1)或d2)或d3):
- [0073] d1)制备用于检测或辅助检测H9亚型禽流感病毒的试剂盒;
- [0074] d2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒;
- [0075] d3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒;
- [0076] f2)所述特异引物对乙的应用也属于本发明的保护范围;所述特异引物对乙的应用可为如下e1)或e2)或e3):
- [0077] e1)制备用于检测或辅助检测H6亚型禽流感病毒的试剂盒;
- [0078] e2)鉴定或辅助鉴定H6亚型禽流感病毒;
- [0079] e3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H6亚型禽流感病毒。
- [0080] 含有所述特异引物对甲的试剂盒甲或含有所述特异引物对乙的试剂盒乙也属于本发明的保护范围。
- [0081] 所述试剂盒甲的功能可为如下d2)或d3):
- [0082] d2)鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒;
- [0083] d3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H9亚型禽流感病毒。
- [0084] 所述试剂盒乙的功能为如下e2)或e3):
- [0085] e2)鉴定或辅助鉴定H6亚型禽流感病毒;
- [0086] e3)鉴定或辅助鉴定待测病毒是否为候选的H6亚型禽流感病毒。
- [0087] 本发明所提供的用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组建立的二重RT-PC的反应体系(25 μ L)为:2 \times TransTaq-T PCR SuperMix12.5 μ L, H9-F(浓度为25pmol/ μ L)和H9-R(浓度为25pmol/ μ L)各0.5 μ L, H6-F(浓度为25pmol/ μ L)和H6-R(浓度为25pmol/ μ L)各0.8 μ L,模板2 μ L(DNA浓度至少为100fg/ μ L以上),用去离子水补至25 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C变性5min;95 $^{\circ}$ C变性1min,53 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,于4 $^{\circ}$ C保存。
- [0088] 上述任一所述H6亚型禽流感病毒具体可为H6N8亚型禽流感病毒、A/Duck/Guangxi/GXd-5/2010(H6N1)或A/Duck/Guangxi/Gxd-3/2009(H6N2)。
- [0089] 上述任一所述H9亚型禽流感病毒具体可为A/turtledove/Guangxi/49B6/2013

(H9N2)。

[0090] 实验证明,利用本发明所提供的用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组建立的二重RT-PCR,可准确鉴定H9亚型AIV和/或H6亚型AIV,且特异性好,灵敏度高,对H9亚型AIV和H6亚型AIV的最小检出限均达到 5×10^4 拷贝。因此,本发明所提供的用于鉴定或辅助鉴定H9亚型禽流感病毒和/或H6亚型禽流感病毒的引物对组可同时检测H9亚型AIV和H6亚型AIV,具有重要的应用价值。

附图说明

[0091] 图1为二重RT-PCR的特异性试验结果电泳图。

[0092] 图2为二重RT-PCR的灵敏度试验结果电泳图。

[0093] 图3为二重RT-PCR对临床样本检测结果电泳图。

具体实施方式

[0094] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0095] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0096] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0097] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0098] SPF鸡胚为北京梅里亚维通实验动物技术有限公司产品。MLV反转录酶、dNTP和RNA酶抑制剂、DNA Marker DL2000、PMD18-T载体均为TaKaRa公司产品。DNA/RNA抽提试剂盒、 $2 \times$ TransTaq-T PCR SuperMix、胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均为北京全式金生物技术有限公司产品。

[0099] A/Sparrow/Guangxi/GXs-1/2012(H1N2)记载在如下文献中:郭捷,谢芝勋,彭宜等.一株鸟源H1N2型禽流感病毒全基因序列分析[J].中国兽医学报,2014,34(6):874-820.公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得,以重复本实验。在下文中,A/Sparrow/Guangxi/GXs-1/2012(H1N2)简称H1N2。

[0100] H3N2亚型禽流感病毒和H6N8亚型禽流感病毒均记载在如下文献中:Visual detection of H3subtype avian influenza viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay.Virol J,2011,8:337.公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得,以重复本实验。在下文中,H3N2亚型禽流感病毒简称H3N2,H6N8亚型禽流感病毒以下简称H6N8。

[0101] A/duck/Guangxi/125D17/2012(H4N2)记载在基因库中,登录号为KJ881013-KJ881020.公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得,以重复本实验。在下文中,A/duck/Guangxi/125D17/2012(H4N2)简称为H4N2。

[0102] A/Duck/Guangxi/GXd-5/2010(H6N1)记载在如下文献中:Xie Z,Xie L,Zhou C,et al.Complete genome sequence analysis of an H6N1avian influenza virus isolated from Guangxi pockmark ducks.J.Virol.2012,86:13868-3869.公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得,以重复本实验。在下文中,A/Duck/Guangxi/GXd-5/2010(H6N1)简称为H6N1。

[0103] A/Turkey/GA/209092/02(H5N2)、A/Duck/Guangxi/Gxd-3/2009(H6N2)、A/Chicken/NY/273874/03(H7N2)和鸡毒霉形体(MG)S6株均记载在如下文献中: Peng Y, Xie Z, Liu J, et al. Epidemiological Surveillance of Low Pathogenic Avian Influenza Virus (LPAIV) from Poultry in Guangxi Province, Southern China. [J]. PLOS ONE, 2013, 8(10): 1-6. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, A/Turkey/GA/209092/02(H5N2)简称H5N2, A/Duck/Guangxi/Gxd-3/2009(H6N2)简称H6N2, A/Chicken/NY/273874/03(H7N2)简称H7N2, 鸡毒霉形体(MG)S6株简称MG。

[0104] A/turtledove/Guangxi/49B6/2013(H9N2)记载在如下文献中: Xu Q, Xie Z, Xie L, et al. Characterization of an avian influenza virus H9N2 strain isolated from a wild bird in southern China. Genome Announc. 2014, 2:e00600-14. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, A/turtledove/Guangxi/49B6/2013(H9N2)简称为H9N2。

[0105] H2N3亚型禽流感病毒、H8N4亚型禽流感病毒、H10N3亚型禽流感病毒、H11亚型禽流感病毒、H12N5亚型禽流感病毒、H13N5亚型禽流感病毒和H15N9亚型禽流感病毒均记载在如下文献中: 罗思思, 谢芝勋, 谢志勤, 邓显文, 刘加波, 黄莉, 黄娇玲, 曾婷婷. H6N1亚型禽流感病毒二重RT-PCR检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2015, 08: 24-27. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, H2N3亚型禽流感病毒简称H2N3, H8N4亚型禽流感病毒简称H8N4, H10N3亚型禽流感病毒简称H10N3, H11亚型禽流感病毒简称H11, H12N5亚型禽流感病毒简称H12N5, H13N5亚型禽流感病毒简称H13N5, H15N9亚型禽流感病毒简称H15N9。

[0106] 新城疫病毒(NDV)F48E9株记载在如下文献中: 陈安莉, 谢芝勋, 周辰瑜, 等. 新城疫病毒强弱毒株LAMP鉴别检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(09): 917-922. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, 新城疫病毒(NDV)F48E9株简称为NDV。

[0107] 鸡传染性支气管炎病毒(IBV)H52株记载在如下文献中: 罗思思, 谢芝勋, 庞耀珊, 等. 鸡传染性支气管炎病毒RT-LAMP可视化检测方法的建立[J]. 中国农学通报, 2012, 28(20): 83-87. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, 鸡传染性支气管炎病毒(IBV)H52株简称为IBV。

[0108] 鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)北京株记载在如下文献中: 谢志勤, 谢芝勋, 邓显文, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒LAMP检测方法的建立[J]. 兽医科技, 2012, 44(11): 52-55. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, 鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)北京株简称为ILTV。

[0109] 禽呼肠孤病毒(ARV)S1733株记载在如下文献中: 谢志勤, 谢芝勋, 刘加波, 等. 禽呼肠孤病毒S1733株单克隆抗体的制备及夹心ELISA检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(5), 49-52. 公众可从广西壮族自治区兽医研究所获得, 以重复本实验。在下文中, 禽呼肠孤病毒(ARV)S1733株简称为ARV。

[0110] 实施例1、引物的设计与合成

[0111] 根据GenBank中H9亚型AIV的HA基因(GenBank号: KU762372)的序列(如序列表中序列5所示), 设计并由北京六合华大基因科技股份有限公司合成引物对甲, 引物对甲由引物

H9-F和引物H9-R组成,用于扩增H9亚型AIV。

[0112] 根据GenBank中H6亚型AIV的HA基因(GenBank号:JX304762)的序列(如序列表中序列6所示),设计并由北京六合华大基因科技股份有限公司合成引物对乙,引物对乙由引物H6-F和引物H6-R组成,用于扩增H6亚型AIV。

[0113] 引物序列详见表1。

[0114] 表1. 鉴定H9亚型AIV和H6亚型AIV的引物序列

引物对名称	引物名称	引物序列(5'→3')	在序列表中的位置	扩增大小
[0115] 引物对甲	H9-F	GGTTGGTCAGGATTAGTTGCTG	序列表中序列1	551bp
	H9-R	GATGAGGCGACAGTCGAAT	序列表中序列2	
引物对乙	H6-F	TGACCTAGGGAATGGGTGCT	序列表中序列3	222bp
	H6-R	GCCATGATCAGCCCTACCAA	序列表中序列4	

[0116] 实施例2、二重RT-PCR鉴定H9亚型AIV和H6亚型AIV

[0117] 一、模板的获得

[0118] 参照DNA/RNA抽提试剂盒使用说明书,分别提取H1N2、H3N2、H6N1、H6N2、H6N8、H9N2、NDV、IBV、MG、ARV、H2N3、H4N2、H8N4、H10N3、H11、H12N5、H13N5、H5N2、H7N2和H15N9的RNA;然后参照MLV反转录酶的说明书反转录合成cDNA,依次得到cDNA浓度为1057μg/μL的H1N2cDNA溶液、946μg/μLH3N2cDNA溶液、1066μg/μLH6N1cDNA溶液、1232μg/μLH6N2cDNA溶液、1027μg/μLH6N8cDNA溶液、1825μg/μLH9N2cDNA溶液、864μg/μLNDV cDNA溶液、899μg/μLIBV cDNA溶液、968μg/μLMG cDNA溶液、892μg/μLARV cDNA溶液、964μg/μLH2N3cDNA溶液、1567μg/μLH4N2cDNA溶液、1072μg/μLH8N4cDNA溶液、1100μg/μLH10N3cDNA溶液、982μg/μLH11cDNA溶液、1125μg/μLH12N5cDNA溶液、1304μg/μLH13N5cDNA溶液、890μg/μLH5N2cDNA溶液、1057μg/μLH7N2cDNA溶液和1035μg/μLH15N9cDNA溶液。

[0119] 参照DNA/RNA抽提试剂盒使用说明书,提取ILTV的DNA,得到DNA浓度为924μg/μL的ILTV DNA溶液。

[0120] 二、二重RT-PCR反应体系的建立及条件优化

[0121] 1、二重RT-PCR反应体系(25μL)为:2×TransTaq-T PCR SuperMix 12.5μL,步骤(1)得到的cDNA溶液2μL,H9-F(浓度为25pmol/μL)和H9-R(浓度为25pmol/μL)各0.1μL、0.2μL、0.3μL、0.4μL、0.5μL、0.6μL、0.7μL、0.8μL、0.9μL或1.0μL,H6-F(浓度为25pmol/μL)和H6-R(浓度为25pmol/μL)各0.1μL、0.2μL、0.3μL、0.4μL、0.5μL、0.6μL、0.7μL、0.8μL、0.9μL或1.0μL,用去离子水补至25μL。

[0122] 2、将上述反应体系置于PCR仪,然后按照反应程序进行扩增。反应程序为:95℃变性5min;95℃变性1min,50~60℃(如50℃、53℃、55℃、57℃或60℃)退火30s,72℃延伸30s,共35个循环;最后72℃延伸10min,于4℃保存。

[0123] 3、PCR扩增结束后,取RT-PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外光下观察拍照,与DNA Marker DL2000作比较,分析并记录结果。

[0124] 4、结果判定方法:如果所述RT-PCR扩增产物中含有大小为551bp(序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示)的DNA片段,则待测样品中含有或候选含有H9亚型AIV,反之则所述待测样品中不含有或候选不含有H9亚型AIV;如果所述RT-PCR扩增产物中含有大小为222bp(序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示)的DNA片段,则待测样品中含有或候选含有H6亚型AIV,反之则所述待测样品中不含有或候选不含有H6亚型AIV。

[0125] 结果表明,实施例1合成的引物对甲可用于鉴定H9亚型AIV,引物对乙可用于鉴定H6亚型AIV。最佳的反应体系(25 μ L):2 \times TransTaq-T PCR SuperMix 12.5 μ L,H9-F(浓度为25pmol/ μ L)和H9-R(浓度为25pmol/ μ L)各0.5 μ L,H6-F(浓度为25pmol/ μ L)和H6-R(浓度为25pmol/ μ L)各0.8 μ L,模板2 μ L(浓度至少为100fg/ μ L以上),用去离子水补至25 μ L。最佳反应程序为:95 $^{\circ}$ C变性5min;95 $^{\circ}$ C变性1min,53 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,于4 $^{\circ}$ C保存。

[0126] 三、二重RT-PCR的特异性实验

[0127] 1、按照步骤二中1和2优化后的PCR反应条件进行RT-PCR扩增,模板分别如下:由H6N1cDNA溶液和H9N2cDNA溶液(体积比为1:1)组成的混合液(作为阳性对照),H6N1cDNA溶液,H6N2cDNA溶液,H6N8cDNA溶液,H9N2cDNA溶液,H1N2cDNA溶液,H2N3cDNA溶液,H3N2cDNA溶液,H4N2cDNA溶液,H5N2cDNA溶液,H7N2cDNA溶液,H8N4cDNA溶液,H10N3cDNA溶液,H11cDNA溶液、H12N5cDNA溶液,H13N5cDNA溶液,H15N9cDNA溶液,NDV cDNA溶液,IBV cDNA溶液,ARV cDNA溶液,ILTV DNA溶液,MG cDNA溶液,去离子水。

[0128] 2、完成步骤1后,取RT-PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外光下观察拍照,与DNA Marker DL2000作比较,分析并记录结果。然后在紫外灯下用刀片切割目的片段,然后用胶回收试剂盒纯化回收。分别取适量纯化回收的RT-PCR扩增产物,与PMD18-T载体连接并测序。实验重复三次。

[0129] 琼脂糖凝胶电泳结果见图1(M为DNA Marker DL2000,泳道1为混合液,泳道2为H6N1cDNA溶液,泳道3为H6N2cDNA溶液,泳道4为H6N8cDNA溶液,泳道5为H9N2cDNA溶液,泳道6为H9N2cDNA溶液,泳道7为H1N2cDNA溶液,泳道8为H2N3cDNA溶液,泳道9为H3N2cDNA溶液,泳道10为H5N2cDNA溶液,泳道11为H7N2cDNA溶液,泳道12为H8N4cDNA溶液,泳道13为H10N3cDNA溶液,泳道14为H12N5cDNA溶液,泳道15为H13N5cDNA溶液,泳道16为H4N2cDNA溶液,泳道17为H15N9cDNA溶液,泳道18为NDV cDNA溶液,泳道19为IBV cDNA溶液,泳道20为ARV cDNA溶液,泳道21为ILTV DNA溶液,泳道22为MG cDNA溶液,泳道23为去离子水)。结果表明,所有含有H9亚型AIV和H6亚型AIV模板的样品均能扩增出与试验设计大小相符的扩增条带,即H9亚型AIV扩增得到大小为551bp的目的条带,H6亚型AIV扩增得到大小为222bp的目的条带;而其它模板在相同位置却无任何扩增条带。测序结果进一步证实了H9亚型AIV和H6亚型AIV的RT-PCR扩增产物,大小分别为551bp和222bp,与试验设计大小相符,且RT-PCR扩增产物的核苷酸序列与引物设计模板的基因对应片段的完全一致,即大小为551bp的DNA片段的核苷酸序列为序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示,大小为222bp的DNA片段的核苷酸序列为序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示。这一结果表明,利用该二重RT-PCR检测H9亚型AIV和H6亚型AIV具有较强的特异性。

[0130] 四、二重RT-PCR的灵敏度实验

[0131] 1、标准品的制备

[0132] 标准品的制备参考Hoffmann E,Stech J,Guan Y,et al.Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J].Arch Virol,2001,146:2275-2289.的方法。具体步骤如下:

[0133] (1)以H9N2cDNA溶液为模板,以人工合成的5'-agcaaaagcagggg-3'和5'-agtagaaacaagggtgtttt-3'为引物进行RT-PCR的扩增,得到PCR扩增产物1;以H6N2cDNA溶液

为模板,以人工合成的5'-agcaaaagcagggg-3'和5'-agtagaacaagggtgtttt-3'为引物进行RT-PCR的扩增,得到PCR扩增产物2。

[0134] (2)完成步骤(1)后,用胶回收试剂盒纯化回收PCR扩增产物1,然后与PMD18-T载体连接,得到重组质粒H9-T;用胶回收试剂盒纯化回收PCR扩增产物2,然后与PMD18-T载体连接,得到重组质粒H6-T。

[0135] (3)完成步骤(2)后,用质粒抽提试剂盒分别提取重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒,并用NanoDrop ND-1000微量核酸检测仪对其进行浓度的测定,根据分子量和核酸浓度计算对应的拷贝数,将重组质粒H9-T和重组质粒H6-T等拷贝数混合,用超纯水稀释,得到标准品1(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^9 拷贝/ μL)、标准品2(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^8 拷贝/ μL)、标准品3(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^7 拷贝/ μL)、标准品4(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^6 拷贝/ μL)、标准品5(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^5 拷贝/ μL)、标准品6(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^4 拷贝/ μL)、标准品7(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^3 拷贝/ μL)、标准品8(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10^2 拷贝/ μL)和标准品9(重组质粒H9-T和重组质粒H6-T的质粒DNA浓度均为 2.5×10 拷贝/ μL)。

[0136] 2、灵敏度实验

[0137] (1)制备反应体系(25 μL):2 \times TransTaq-T PCR SuperMix 12.5 μL ,H9-F(浓度为25pmol/ μL)和H9-R(浓度为25pmol/ μL)各0.5 μL ,H6-F(浓度为25pmol/ μL)和H6-R(浓度为25pmol/ μL)各0.8 μL ,模板2 μL ,用去离子水补至25 μL 。最佳反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性1min,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30s,共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0138] 实验设计10个不同处理,模板分别为标准品1、标准品2、标准品3、标准品4、标准品5、标准品6、标准品7、标准品8、标准品9和去离子水。

[0139] (2)完成步骤(1)后,取RT-PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外光下观察拍照,与DNA Marker DL2000作比较,分析并记录结果。然后在紫外灯下用刀片切割目的片段,然后用胶回收试剂盒纯化回收。分别取适量纯化回收的RT-PCR扩增产物,与PMD18-T载体连接并测序。实验重复三次。

[0140] 琼脂糖凝胶电泳结果见图2(M为DNA Marker DL2000,泳道1为标准品1,泳道2为标准品2,泳道3为标准品3,泳道4为标准品4,泳道5为标准品5,泳道6为标准品6,泳道7为标准品7,泳道8为标准品8,泳道9为标准品9,泳道10为去离子水)。结果表明,该二重RT-PCR最低能检出 5×10^4 拷贝重组质粒H9-T和 5×10^4 拷贝重组质粒H6-T。最低检测线以上各浓度的模板中H9亚型AIV均扩增出大小为551bp的条带,H6亚型AIV均扩增出大小为222bp的条带,且测序结果进一步证实了H9亚型AIV和H6亚型AIV的RT-PCR扩增产物,大小分别为551bp和222bp,与试验设计大小相符,且PCR产物的核苷酸序列与引物设计模板的基因对应片段的完全一致,即大小为551bp的DNA片段的核苷酸序列为序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示,大小为222bp的DNA片段的核苷酸序列为序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示。小于最低检测线各浓度的模板中H9亚型AIV均不能扩增出大小为551bp的条带,H6亚型AIV均不能扩增出大小为222bp的条带。以上结果表明,利用该二重RT-PCR同时检测H9亚型AIV和H6亚型AIV具有较高的灵敏度,对H9亚型AIV和H6亚型AIV的最小检出限均为

5×10^4 拷贝。

[0141] 实施例3、二重RT-PCR检测临床样本

[0142] 一、临床样本RNA的提取

[0143] 从广西省南宁市活禽市场采集禽类(鸡或鸭)的咽喉和泄殖腔拭子样本,共计120份,依次编号为Q1~Q120。参照DNA/RNA抽提试剂盒和MLV反转录酶的使用说明书,提取各样本的RNA并反转录合成cDNA,得到cDNA浓度均为 $234 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的各样本的cDNA溶液。

[0144] 二、病料处理后接种SPF鸡胚进行病毒分离鉴定

[0145] 参考文献(彭宜等.2006-2008年华东地区家禽不同HA亚型低致病性禽流感的病原学监测.中国人兽共患病学报.2009年.)中记载的方法,对步骤一中采集的样本的有关病毒进行分离和鉴定。

[0146] 三、二重RT-PCR检测临床样本

[0147] 1、分别以步骤一得到的各样本的cDNA溶液为模板,按照实施例2步骤二中1和2优化后的PCR反应条件进行RT-PCR扩增。以去离子水为阴性对照。

[0148] 2、完成步骤1后,取RT-PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外光下观察拍照,与DNA Marker DL2000作比较,分析并记录结果。然后在紫外灯下用刀片切割目的片段,然后用胶回收试剂盒纯化回收。分别取适量纯化回收的RT-PCR扩增产物,与PMD18-T载体连接并测序。实验重复三次。

[0149] 实验结果如下:120份样本中,6份样本为H9亚型AIV和H6亚型AIV阳性,33份样本为H9亚型AIV阳性,15份样本为H6亚型AIV阳性,这一实验结果与步骤二中病毒分离鉴定结果100%相符。

[0150] 部分琼脂糖凝胶电泳结果见图3(M为DNA Marker DL2000,泳道1至22为编号为Q1~Q22的样本,泳道23为去离子水):编号为Q9和Q15的样本可以扩增出大小为222bp的条带,为H6亚型AIV阳性;编号为Q2、Q12、Q19、Q21和Q22的样本扩增出大小为551bp的条带,为H9亚型AIV阳性;编号为Q4、Q16的样本可以扩增出两条条带且大小分别为222bp和551bp,为H9亚型AIV和H6亚型AIV混合感染;其余样本和阴性对照一样均为阴性。进一步,经过测序,H9亚型AIV阳性样本的RT-PCR扩增产物的核苷酸序列为序列表中序列5自5'末端起第1051至1601位所示,H6亚型AIV阳性样本的RT-PCR扩增产物的核苷酸序列为序列表中序列6自5'末端起第1442至1663位所示。

[0151] 上述结果表明,利用该二重RT-PCR可准确鉴定H9亚型AIV和H6亚型AIV。

[0001]

<110> 广西壮族自治区兽医研究所

<120> H9亚型禽流感病毒和H6亚型禽流感病毒的二重RT-PCR试剂盒及其应用

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

ggttggtcag gattagttgc tg

22

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

gatgaggcga cagtcgaat

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

tgacctaggg aatgggtget

20

<210> 4

[0002]

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

gccatgatca gccctaccaa 20

<210> 5

<211> 1683

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

atggaagtag taccactaat aactatacta ctagtaataa caggaageaa tgcggataaa	60
atctgcattg gctaccaatc acaaaactcc acagaaactg tagacacact aaccgaaaac	120
aatgttctctg tgacacatgc taaagaattg cttcacacag agcacaatgg gatgctatgt	180
gcaacaaacc tggggettcc tettatteta gacacctgta ccattgaagg attaatctat	240
ggcaaccctt cttgtgatat accgctggaa gggagagaat ggtcctacat tgtcgaaaga	300
ccateggctg ttaatggagt gtgctacccc ggaaatgtag aaaacctgga agaattaagg	360
tactttttta gttecgctag ttettaceaa agaatccaga tctttccaga ttcaatctgg	420
aatgtatctt acagtggaac aagcaaagea tgttcagatt cattctacag aagcatgagg	480
tggttgactc aaaagaacaa caattatcet gtteaagacg cccaatacac aaataataga	540
ggaaagaaca ttcttttcat gtggggcata aatcaccac ccactgatac ggcacagaca	600
aatctgtaca caaggactga cacaacaaca agtgtggcaa cggaagacat aaataggacc	660
tttaaaccat tgatagggcc aaggectctt gteaatggtc tacaaggaag gattgattat	720
tattgggcgg tgctaaaacc aggtcagaca ttgcgagtta gatecaatgg gaatetaatc	780
gctccatggt atggacacat tetettaggg gagagtcacg gaagaatcct gaaaacggat	840
ttaaagagtg gtaactgtgt agtgcaatgt caaacagaaa gaggtggttt gaacactaca	900
ttgceatttc acaacgtgag caagtacgea ttcggaaatt gcccaaaata tattggagta	960
aagagtctca aattggcagt cggctgagg aatgtgcctg ctagatcaag tagaggacta	1020
ttfaggagcea tagcgggttt catagagga ggttggtcag gattagttgc tggttggtat	1080

[0003]

ggattccagc attcaaatga tcaaggaacc ggaatggctg cagatagaga ctcaactcaa	1140
aaggcaattg acaaaatcac gtteaaagta aataatatag tegacaaaat gaacaaacag	1200
tatgaaattia ttgaccatga attcagcgaa attgaaacta gactcaatat gatcaatgat	1260
aagattgatg accaaattca agacatatgg gcatataatg ctgaattget agtactgctt	1320
gaaaatcaaa aaactetega tgagcatgac gcaaatgtaa acaatctata caacaaagtg	1380
aagagggcac tgggttccaa tgcagtggaa gatgggaaag gatgettega tctataccat	1440
aatgcgata accagtgcac ggagacaatt cgaaacggga cctataatag aagaaagtat	1500
caggaggaat caagactaga gagacagaaa atagaggggg tcaaactgga atctgaagga	1560
acctacaaaa tctcaccat ttattcgact gtcgectcat ctcttgttat tgcaatgggg	1620
ttegctgcct tcttgttctg ggccatgtct aatggatctt gcagatgcaa catttgtata	1680
taa	1683

<210> 6

<211> 1744

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

agcaaaagca ggggaaaatg attgcattca ttgfaatagc aatactggta gcgaccggaa	60
aatcagacaa gatatgcatt ggatatcatg ccaacaatte gacaacaaag gtagatacga	120
tactcgagaa gaacgtaacc gtcacacact cagttgaact gctggagaac cagaaagaag	180
aaagattctg caaaatetca aacaaagecc ctctcgatct aagggattgt accatagagg	240
gttggatctt gggaaatecc cgatggegca tactgcttgc tgaccaaagc tggtcataca	300
tagtggaaacg gcctaattgcc cgaaatggga tttgctacc tggaacattg aatgaagcag	360
aagaattgaa ggcacttatt ggatcagggg aaagggtaga aaggtttgag atgtttccca	420
aaagtacatg ggcaggggtg gacaccaaca gtggagtatc aagtgettgt cctttgggta	480
atggtecate tttctacagg aatcttetat ggataataaa actcaagtca tcagaatate	540
cagtaattag aggaacttcc aacaacaetg gggacaagtc agttctctat ttttgggggtg	600
tacaccatcc tctgtcaca actgaacaag atgctctgta tggttctggt aatcgatatg	660
ttagaatggg tactgaaagc atgaattttg ccagaaacce agaaattgca gcaaggcctg	720
ctgtgaatgg tcagagagge agaategatt atttctggtc catcttaaaa ccaggggaaa	780
ccfcgaatgt agaatctaac gggaatttaa tagccccctg gtatgcatac agatttgtca	840

[0004]

acaaagatag taaaggagcc atattcagat ctaacttacc aattgaaaac tgtgatgcc	900
catgccagac tgctgaagga gtgataagaa ccaacaaaac atttcagaat gtgagcctc	960
tgtggattgg agaatgcccc aagtatgtaa aaagtaagag tetaaggett gcaactggac	1020
taaggaatgt tccacaaata gaaactagag gactttttgg agetattgca ggcttcattg	1080
aaggaggatg gactggaatg attgatgggt ggtatggeta ccatcatgaa aattctcaag	1140
gctcaggata tgcagctgat agagaaagea ctcaaaaggc tatagacgga attacgaaca	1200
aggtcattc catcattgat aaaatgaaca cacaatttga ggctgtaggt catgagtttt	1260
caaacctgga gagaaggatt gacaacctga acaaaaagaat ggaagatgga tttctggatg	1320
tetggacata caacgccgaa ctattggttc ttcttgaaaa cgagagaaca ctagacctac	1380
atgatgcaaa tgtgaagaac ctacatgaaa aggtcaaate acaactaagg gataatgcta	1440
atgacctagg gaatgggtgc tttgaatttt ggcataagtg tgacaatgaa tgtatggagt	1500
ctgtaaaaaa tggtaacctat gactacceca agtatcaaaa agagagtagg ttaaacagac	1560
agaaaataga atcggtaaaa etggagaact ttgatgtgta tcaaatcett gccatttata	1620
gtacggtatc gagcagtcta gttttggtag ggctgatcat ggcaataggt ctttggatgt	1680
gttcaaatgg ttcaatgeaa tgcaagatat gtatataatt gagaaaaaca cccttgtttc	1740
tact	1744

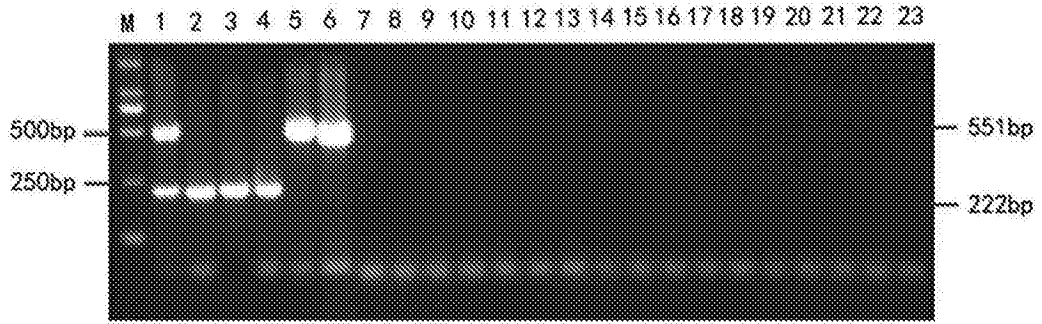


图1

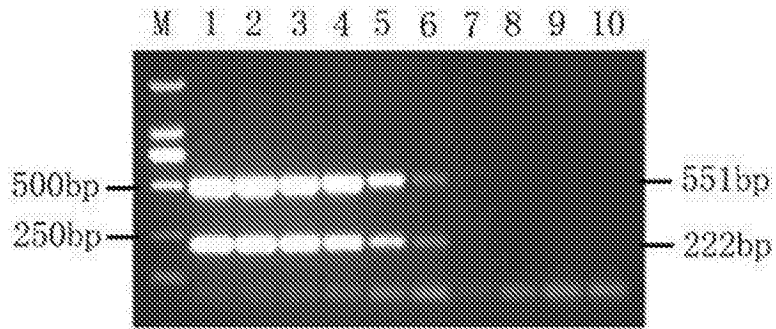


图2

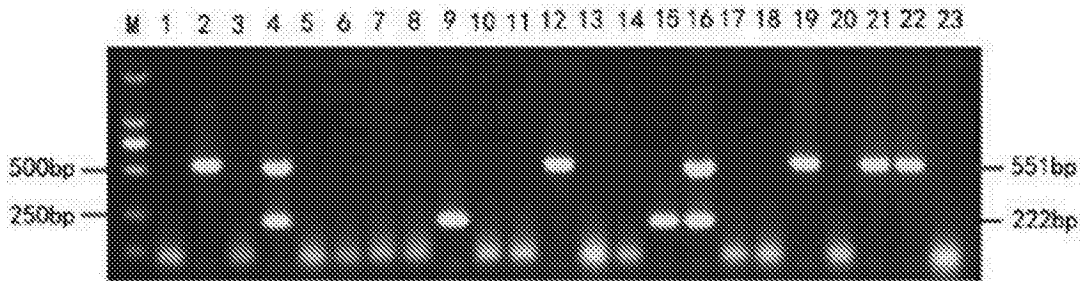


图3