



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105648114 B

(45)授权公告日 2020.04.10

(21)申请号 201610100093.4

(22)申请日 2016.02.22

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105648114 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(73)专利权人 深圳市易瑞生物技术股份有限公司

地址 518102 广东省深圳市宝安区西乡街道桃花源科技创新园11#研发中心(办公场所)

(72)发明人 黄超杰 朱海 游腾飞 付辉  
卢和华 汪凤林 严义勇 毕思远

(74)专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限公司 31224

代理人 吕伴

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/6851(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12R 1/93(2006.01)

(56)对比文件

CN 104745726 A,2015.07.01,

CN 104711369 A,2015.06.17,

CN 102220435 A,2011.10.19,

审查员 朱晓乐

权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物、探针和试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测国内2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针,所述引物和荧光探针为针对该变异型高致病性猪蓝耳病病毒NSP2基因相对缺失序列区域设计的一对特异性正反向引物和荧光探针。本发明还公开了用于检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒及检测方法。本发明对新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的NSP2基因相对缺失序列区域设计一对特异性探针和引物,PCR检测为阳性时即可确诊样本感染新变异型高致病性猪蓝耳病病毒,具有简便、快速、特异性高、灵敏度高的特点,可用于新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的辅助诊断和流行病学研究。

1. 一种用于检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针,其特征在于,荧光RT-PCR引物和荧光探针为针对新变异型高致病性猪蓝耳病病毒NSP2基因相对缺失序列区域设计的特异性新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正、反向引物和荧光探针,所述新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正向、反向引物和荧光探针序列分别是:

新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正向引物如下:

5'-CAGGACTGTGTCCCAACTGAAG-3'

新变异型高致病性猪蓝耳病病毒反 正向引物如下:

5'-GCACGCCAGAGTCCCTACC-3'

荧光探针:5'-CCAGCCCCTGTGCCCCGACCA-3';

所述荧光探针的3'端标记有荧光淬灭基团,5'端标记有荧光报告基团。

2. 如权利要求1所述的一种用于检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针,其特征在于,所述荧光探针的5'端标记的荧光报告基团选自FAM、JOE或ROX、TET、TAMRA、HEX、VIC、CY3、CY5或Texas Red;所述荧光探针的3'端标记的荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA、Eclipse、Dabcyl、Lowa Black™ RQ或Lowa Black™ FQ。

3. 一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,包含RT-PCR反应液、酶混合液、内标溶液、阴性质控品、阳性质控品,其中RT-PCR反应液含有dATP、dUTP、dGTP、dCTP四种核苷酸、内标正向、反向引物、内标探针和权利要求1至2任一项权利要求所述的检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的特异性正向、反向引物和荧光探针、含有镁离子的缓冲液。

4. 如权利要求3所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述内标正向、反向引物和内标探针序列分别是:

内标正向引物:5'-GCCTCCTGGTCTGTGATCCTC-3'

内标反向引物:5'-GAAGTGGGCACATCCATAGAGC-3'

内标探针:5'-TTCTTGACACCCTGCATCCATTACCTCC-3';

所述内标探针的5'端标记有荧光报告基团,3'端标记有荧光淬灭基团。

5. 如权利要求4所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述内标探针的5'端标记的荧光报告基团选自FAM、NEX、ROX、TET、TAMRA、JOE、VIC、CY3、CY5或Texas Red;所述内标探针的3'端标记的荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA、Eclipse、Dabcyl、Lowa Black™ RQ或Lowa Black™ FQ。

6. 如权利要求3所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述的酶混合液为包含有热启动的Taq DNA聚合酶、M-MLV逆转录酶、RNA酶抑制剂(RNasin)的缓冲液。

7. 如权利要求3所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述的阳性质控品为含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列的pUC57载体质粒的无菌TE缓冲液,所述阳性质控品的浓度为 $1.0 \times 10^6$  copies/ml。

8. 如权利要求7所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述的含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列的pUC57载体质粒的无菌TE缓冲液是将含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异

性保守序列的pUC57载体质粒转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中增殖后经提取纯化用分光光度计测定浓度和纯度后用无菌TE缓冲液稀释后得到。

9. 如权利要求7所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列为:

CAGGACTGTGTCCCAACTGAAGCCGTCACCGATGACGCCAGCCCCTGTGCCCGCACCACGACGAAGACTTCA  
GCAAATGGAGGGAACGGATTTGGCGGTAGGGACTCTGGCGTGC。

10. 如权利要求8所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述的无菌TE缓冲液采用DEPC水配制。

11. 如权利要求3所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述的内标溶液为含有插入人RNP基因特异型保守序列的pUC57载体质粒。

12. 如权利要求11所述的一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒,其特征在于,所述人RNP基因特异型保守序列为:

GAAGTGGGCACATCCATAGAGCACCCCAGGGAGGCAGAGGAGGTAATGGATGCAGGGTGTCAAGAATCGGCA  
GGGCCTGAGAGGATCACAGACCAGGAGGC。

## 检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物、探针和试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外核酸检测领域,尤其涉及一种用于检测样品中新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和探针和试剂盒及检测方法,可用于新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的辅助诊断和流行病学研究。

### 背景技术

[0002] 猪蓝耳病是1987年在美国被发现的,很快传到了加拿大、德国、欧洲国家。猪蓝耳病不是人畜共患病,不传染人,该病在上世纪90年代中期传入我国,世界动物卫生组织将其列为法定报告动物疫病,我国列为二类动物疫病。

[0003] 普通猪蓝耳病又称猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, 简写PRRS)是非变异美洲株毒株猪蓝耳病病毒引起的猪的接触性传染病,是以成年猪的生殖障碍、早产、流产、死胎为特征,一般发病率很高,死亡率较低。

[0004] 高致病性猪蓝耳病,是2006年我国发生“猪高热病”后才提出的新概念,是高致病性猪繁殖与呼吸综合征(High pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome)的俗称,是指由一定程度变异的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(High pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, HP-PRRSV)引起的一种高发病率、高死亡率、低治愈率的猪病,与经典的蓝耳病在临床特征和病原核酸分子水平有明显的区别,其变异主要表现在GP5基因的点突变和Nsp2基因缺失。

[0005] 2012年之后河南新乡、焦作、鹤壁、周口以及其他地区发现新的变异性高致病性猪蓝耳病病毒株,该新变异型病毒同样具有高致病性,同时与2006年的高致病性猪蓝耳病病毒具有明显不同的遗传背景,经研究表明新变异型病毒如HENAN-XINX、HENAN-XINX-1、HENAN-XINX-2、HENAN-JIAOZ、HENAN-HEB株与美国NADC30、MN184C等高度同源,与经典的PRRSV毒株相比存在较大的基因缺失,同时基因缺失部位和缺失的核苷酸数量又与2006年HP-PRRSV明显不同,在进化树中均位于美国NADC30、MN184c等毒株为代表的亚群3中。因此该变异型高致病性猪蓝耳病病毒可能是由于国外引种输入国内后再与中国经典高致病性猪蓝耳病病毒发生基因重组后产生的新变异型。目前市场的疫苗依然不能很好地控制蓝耳病的发生,PRRSV在不断的发生变异,新的变异型HP-PRRSV也在不断出现,其对我国养猪业发展的影响应当引起高度的关注,但是国内尚未研发出针对于这种新的变异型高致病性猪蓝耳病病毒快速检测试剂盒。

[0006] 目前国内申报的关于检测高致病性猪蓝耳病病毒检测试剂盒相关专利全都针对于2006年发现的的高致病性猪蓝耳病病毒株进行的设计,例如:

[0007] 公开号:CN101343670A专利名为《高致病性猪蓝耳病病毒RT-PCR快速检测试剂盒》针对于2006年高致病性猪蓝耳病病毒株相关序列设计一对普通的RT-PCR引物,建立了一套常规PCR检测方法试剂盒,该试剂盒并不能检测2012年之后新的变异型高致病性猪蓝耳病病毒。

[0008] 公开号:CN104711369A专利名为《高致病性猪蓝耳病病毒的检测引物、探针及检测方法》虽然采用实时荧光定量PCR技术,能够快速检测2006年高致病性猪蓝耳病病毒株,但是依旧不能检测之后新的变异型高致病性猪蓝耳病病毒,造成漏检和误检。

[0009] 公开号:CN104745726A专利名为《猪蓝耳病病毒、高致病性猪蓝耳病病毒和猪瘟病毒三重荧光定量检测试剂盒》采用三重实时荧光定量PCR技术,能够快速检测猪蓝耳病病毒、2006年高致病性猪蓝耳病病毒和猪瘟病毒,但是依旧不能区分2012年后新的变异型高致病性猪蓝耳病病毒,容易造成误检和误判。

[0010] 实时荧光定量PCR技术,通过引入特异性探针和荧光信号的动态监测使PCR产物的扩增及分析的全过程可以在单管内封闭完成,并且可以对PCR扩增产物进行实时动态监测及自动分析结果,具有实时、准确、快速、简便等特点,是一种先进的分子检测技术。

[0011] 本专利基于实时荧光PCR技术建立针对于2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒核酸快速检测方法以及检测试剂盒,能够快速准确的区分普通猪蓝耳病病毒、2006型高致病性猪蓝耳病病毒、2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒,对于进一步猪蓝耳病病毒分子流行病学研究、相关疾病防治等具有很好的促进作用。

## 发明内容

[0012] 本发明目的之一是针对于现有市场上提供的猪蓝耳病病毒检测试剂盒的不足,提供一种用实时荧光RT-PCR技术检测2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针,该荧光RT-PCR引物和荧光探针是针对于新变异型高致病性猪蓝耳病病毒NSP2基因相对缺失序列区域为靶标区域设计一对特异性引物及荧光探针。

[0013] 本发明目的之二是提供一种基于上述荧光RT-PCR引物和荧光探针建立的核酸检测试剂盒,该检测试剂盒可以快速、定性检测样本中的2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒。

[0014] 本发明目的之三是提供一种基于上述荧光RT-PCR引物和荧光探针建立的检测方法。

[0015] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0016] 一种用于检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针,其特征在于,荧光RT-PCR引物和荧光探针为针对新变异型高致病性猪蓝耳病病毒NSP2基因相对缺失序列区域设计的特异性新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正、反向引物和荧光探针。

[0017] 在本发明的一个优选实施例中,所述新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正向、反向引物和荧光探针序列分别是:

[0018] 新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正向引物如下:

[0019] 5'-CAGGACTGTGTCCCAACTGAAG-3'

[0020] 新变异型高致病性猪蓝耳病病毒正向引物如下:

[0021] 5'-GCACGCCAGAGTCCCTACC-3'

[0022] 荧光探针:5'-CCAGCCCCTGTGCCCGCACCA-3';

[0023] 所述荧光探针的3'端标记有荧光淬灭基团,5'端分别标记有不同的荧光报告基团。

[0024] 在本发明的一个优选实施例中,所述荧光报告基团选自FAM、JOE或ROX、TET、

TAMRA、HEX、VIC、CY3、CY5或Texas Red；所述荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA、Eclipse、Dabcyl、Lowa Black™ RQ或Lowa Black™ FQ。

[0025] 上述引物和探针的衍生序列也为本发明的保护范围，所述衍生序列包括引物序列的互补链序列，同时还可以向5'端和3'端方向延伸一至十个碱基或删减一至十个碱基得到的序列。

[0026] 一种TaqMan探针法荧光RT-PCR检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的试剂盒，其包含RT-PCR反应液、酶混合液、内标溶液、阴性质控品、阳性质控品，其中RT-PCR反应液含有dATP、dUTP、dGTP、dCTP四种核苷酸、内标正向、反向引物、内标探针和上述检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的特异性正向、反向引物和荧光探针、含有镁离子的缓冲液；

[0027] 在本发明的一个优选实施例中，所述内标正向、反向引物和内标探针序列分别是：

[0028] 内标正向引物：5'-GCCTCCTGGTCTGTGATCCTC-3'

[0029] 内标反向引物：5'-GAAGTGGGCACATCCATAGAGC-3'

[0030] 内标探针：5'-TTCTTGACACCCTGCATCCATTACCTCC-3'；

[0031] 所述内标探针的5'端标记有荧光报告基团，3'端标记有荧光淬灭基团。

[0032] 在本发明的一个优选实施例中，所述荧光报告基团选自FAM、NEX、ROX、TET、TAMRA、JOE、VIC、CY3、CY5或Texas Red；所述荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA、Eclipse、Dabcyl、Lowa Black™ RQ或Lowa Black™ FQ。

[0033] 在本发明的一个优选实施例中，所述的酶混合液为包含有热启动的TaqDNA聚合酶、M-MLV逆转录酶、RNA酶抑制剂(RNasin)的缓冲液。

[0034] 在本发明的一个优选实施例中，所述的阳性质控品为含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列的pUC57载体质粒的无菌TE缓冲液，所述阳性质控品的浓度为 $1.0 \times 10^6$ copies/ml。

[0035] 在本发明的一个优选实施例中，所述的含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列的pUC57载体质粒的无菌TE缓冲液是将含有插入新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列的pUC57载体质粒转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中增殖后经提取纯化用分光光度计测定浓度和纯度后用无菌TE缓冲液稀释后得到。

[0036] 在本发明的一个优选实施例中，所述新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特异性保守序列为：

[0037] CAGGACTGTGTCCCAACTGAAGCCGTCACCGATGACGCCAGCCCCTGTGCCCCGACCACGACGAAGAC TTCAGCAAATGGAGGGAACGGATTTGGCGGTAGGGACTCTGGCGTGC。

[0038] 在本发明的一个优选实施例中，所述的无菌TE缓冲液采用DEPC水配制。

[0039] 在本发明的一个优选实施例中，所述的内标溶液为含有插入人RNP基因特异型保守序列的pUC57载体质粒质粒。

[0040] 在本发明的一个优选实施例中，所述含有插入人RNP基因特异型保守序列为：

[0041] GAAGTGGGCACATCCATAGAGCACCCCAGGGAGGCAGAGGAGGTAATGGATGCAGGGTGTCAAGAATC GGCAGGGCCTGAGAGGATCACAGACCAGGAGGC。

[0042] 本试剂盒保存于-20℃，尽量减少反复冻融。

[0043] 一种检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR方法，包括以下步骤：

[0044] (1) 样本RNA的提取：所述样本RNA可以采用深圳市易瑞生物技术有限公司生产病

毒RNA磁珠提取试剂盒,按照试剂盒说明书进行提取;

[0045] (2)以待检测样本RNA为模板,采用上述的RT-PCR反应液、酶混合液、内标溶液与待检测样本RNA一起配制RT-PCR反应体系,对RNA模板进行扩增,反应条件为:第一阶段:50℃ 15min,95℃ 2min,1个循环;第二阶段:95℃ 10s,60℃ 30s,40个循环;第二阶段每个循环结束后收集荧光信号;所述荧光探针和内标探针分别对应两个荧光检测通道,分别为目标荧光通道和内标荧光通道;

[0046] (3)反应结束后,读取并记录检测通道扩增曲线及扩增循环数Ct,根据扩增曲线和扩增循环数进行检测结果的判断:当FAM通道和NEX通道均有扩增曲线,且Ct值均 $\leq 37$ ,可判定新变异型高致病性猪蓝耳病病毒阳性;当FAM通道无扩增曲线,且Ct值显示为Undet或No Ct,NEX通道有扩增曲线,且Ct值均 $\leq 37$ 时可判定新变异型高致病性猪蓝耳病病毒阴性;当FAM通道有扩增曲线,但 $37 < Ct \leq 40$ ,NEX通道有扩增曲线,且Ct值均 $\leq 37$ 时建议重复一次实验,如果结果同上,可判定为阳性,如果无扩增,可判定为阴性;当FAM通道和NEX通道均无扩增曲线,且Ct值显示为Undet或No Ct,实验无效、建议更换一批试剂重新实验。

[0047] 在本发明的一个优选实施例中,所述RT-PCR反应体系中,RT-PCR反应液18 $\mu$ l、酶混合液1 $\mu$ l、内标溶液1 $\mu$ l、RNA模板5 $\mu$ l。

[0048] 在本发明的一个优选实施例中,步骤(3)中的分析条件设置如下:根据分析后图像调节基线(Baseline)的Start值、Stop值以及阈值(Threshold)的Value值(用户可根据实际情况自行调整,Start值可以在3-15、end值可以在5-20,调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线),使仪器给出正确的结果。

[0049] 在本发明的一个优选实施例中,步骤(3)中的质量控制条件如下:

[0050] 1).阴性对照:FAM通道无扩增曲线,NEX通道有扩增曲线,且Ct值均 $\leq 32$ ;

[0051] 2).阳性对照:FAM通道和NEX通道均有扩增曲线,且Ct值均 $\leq 32$ ;

[0052] 以上两个要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需要重新进行实验。

[0053] Ct值(cycle threshold,Ct)的定义为:每个反应管内荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。阈值的设定一般是将其设定为恰好可以覆盖住阴性对照和空白对照的荧光值处,因此可以很好的去除反应管荧光值即背景。

[0054] 本发明可以实现快速、特异的单管检测样本中是否含有2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒,与其它检测技术相比具有以下优点:

[0055] 1、全封闭反应,实时监控荧光数据,无需后续处理,避免污染,保证检测结果的可靠性。

[0056] 2、快速,操作简单,全程3个小时即可出诊断结果,大大缩短检测时间。

[0057] 3、实现单管双重检测,同时引入了内标质控,提高了检测人员的检测效率,监控抽提效率和排除抑制剂干扰。

[0058] 4、探针法荧光定量PCR技术特有的优势,即特异性更强、灵敏度更高,完全满足2012年后新变异型高致病性猪蓝耳病病毒流行病学诊断和疫情监控,为降低病死率以及控制疫情争取时间。

## 附图说明

[0059] 图1为新变异型高致病性猪蓝耳病病毒检测试剂盒的FAM通道线性实验数据。图中S1-S9表示浓度为 $1.0 \times 10^{10}$ copies/ml、 $1.0 \times 10^9$ copies/ml、 $1.0 \times 10^8$ copies/ml、 $1.0 \times 10^7$ copies/ml、 $1.0 \times 10^6$ copies/ml、 $1.0 \times 10^5$ copies/ml、 $1.0 \times 10^4$ copies/ml、 $1.0 \times 10^3$ copies/ml、 $1.0 \times 10^2$ copies/ml的阳性质控品扩增曲线,各3个重复数据,CK为阴性质控品,横坐标cycle表示扩增循环数,纵坐标 $\Delta Rn$ 表示荧光强度。通过该图可以说明该试剂盒的在 $1.0 \times 10^{10}$ copies/ml至 $1.0 \times 10^3$ copies/ml之间具有很好的线性关系。

[0060] 图2为新变异型高致病性猪蓝耳病病毒核酸检测试剂盒的FAM通道标准曲线示意图。该试剂盒拟合的线性方程为: $Y = -3.3625x + 45.657$ ,相关系数 $R^2 = 0.99725$ ,其中Y代表Ct值,x代表阳性参考品的对数值。

[0061] 图3为新变异型高致病性猪蓝耳病病毒检测试剂盒的检出限实验示意图。其中S7-S9分别为 $1.0 \times 10^4$ copies/ml、 $1.0 \times 10^3$ copies/ml、 $1.0 \times 10^2$ copies/ml,各20次重复数据,该图说明该试剂盒的检测限达到5copies/反应。

[0062] 图4为新变异型高致病性猪蓝耳病病毒检测试剂盒的精密度实验示意图。其中S4和S6分别为 $1.0 \times 10^7$ copies/ml、 $1.0 \times 10^5$ copies/ml,各10次重复数据。

[0063] 图5为新变异型高致病性猪蓝耳病病毒检测试剂盒的特异性实验数据。图中横坐标cycle表示扩增循环数,纵坐标 $\Delta Rn$ 表示荧光强度,CK代表阴性质控品,A表示阳性对照扩增曲线,B表示内标扩增曲线,其中特异性参考品分别为经典猪蓝耳病病毒、06型猪蓝耳病病毒、猪瘟病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒、沙门氏菌、大肠杆菌。这8种特异性参考品均未有典型的“S”型扩增曲线,说明该试剂盒特异性良好。

## 具体实施方式

[0064] 本发明具有用于检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的荧光RT-PCR引物和荧光探针的试剂盒及检测方法采用Taqman探针法荧光PCR检测技术,快速检测样品中新变异型高致病性猪蓝耳病病毒特有序列,从而判断样品中是否存在新变异型高致病性猪蓝耳病病毒。下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特色将会随着描述而更加清楚。这些实施例仅是示范性,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,凡是利用本发明内容所做的等效结构或等效流程变换,直接或间接运用于其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。试剂盒在检测新变异型高致病性猪蓝耳病病毒的使用方法即检测方法,下面以试剂盒为例进行线性实验、最低检出限实验、精密度实验和特异性实验。

[0065] 实施例1试剂盒的线性实验

[0066] 目标靶标探针标记为FAM荧光基团,该试剂盒的线性参比品,由含有目的片段的质粒组成,采用TE缓冲液将阳性质粒进行10倍的梯度稀释得到下列梯度溶液(S1: $1.0 \times 10^{10}$ copies/ml、S2: $1.0 \times 10^9$ copies/ml、S3: $1.0 \times 10^8$ copies/ml、S4: $1.0 \times 10^7$ copies/ml、S5: $1.0 \times 10^6$ copies/ml、S6: $1.0 \times 10^5$ copies/ml、S7: $1.0 \times 10^4$ copies/ml、S8: $1.0 \times 10^3$ copies/ml、S9: $1.0 \times 10^2$ copies/ml)作为的线性参比品,通过该实验表明该试剂盒的在 $1.0 \times 10^{10}$ copies/ml至 $1.0 \times 10^3$ copies/ml之间具有很好的线性关系,同时该试剂盒拟合的线性方程为: $Y = -3.3625x + 45.657$ ,相关系数 $R^2 = 0.9973$ ,其中Y代表Ct值,x代表阳性参考

品的对数值。实验结果参考图1,标准曲线参考图2。

[0067] 实施例2试剂盒的最低检出限实验

[0068] 该实验验证试剂盒的最低检出限,采用线性参比品中的S7: $1.0 \times 10^4$ copies/ml、S8: $1.0 \times 10^3$ copies/ml、S9: $1.0 \times 10^2$ copies/ml等浓度的阳性质粒作为检出限参比品,每个浓度进行20个重复样品,其中检出限参比品S7和S8全部表现为扩增曲线,为阳性数据,S9参比品仅有8个样品扩增出S型曲线,不满足要求,因此通过该实验表明该试剂盒的检出限为 $1.0 \times 10^3$ copies/ml,即达到5copies/反应,实验结果参考图3。

[0069] 实施例3试剂盒的精密度实验

[0070] 该实验验证试剂盒的批内精密度,采用线性参比品中的S4: $1.0 \times 10^7$ copies/ml、S6: $1.0 \times 10^5$ copies/ml等两个高低浓度的阳性质粒作为精密度参比品,各做十个重复样本,结果两个浓度数据变异系数均小于5%,实验结果参考图4。

[0071] 实施例4试剂盒的特异性实验

[0072] 该实验选择与新变异型高致病性猪蓝耳病病毒具有相同感染感染部位的常见病原体作为特异性参考品,采用的是灭活阳性样本。特异性参考品分别为经典猪蓝耳病病毒、06型猪蓝耳病病毒、猪瘟病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒、沙门氏菌、大肠杆菌。利用深圳市易瑞生物技术有限公司研发的通用性病毒DNA/RNA提取试剂盒提取以上灭活样本中的DNA/RNA作为模板进行实验,实验数据表明这8种特异性参考品均未有典型的“S”型扩增曲线,说明该试剂盒特异性良好,实验结果参考图5。

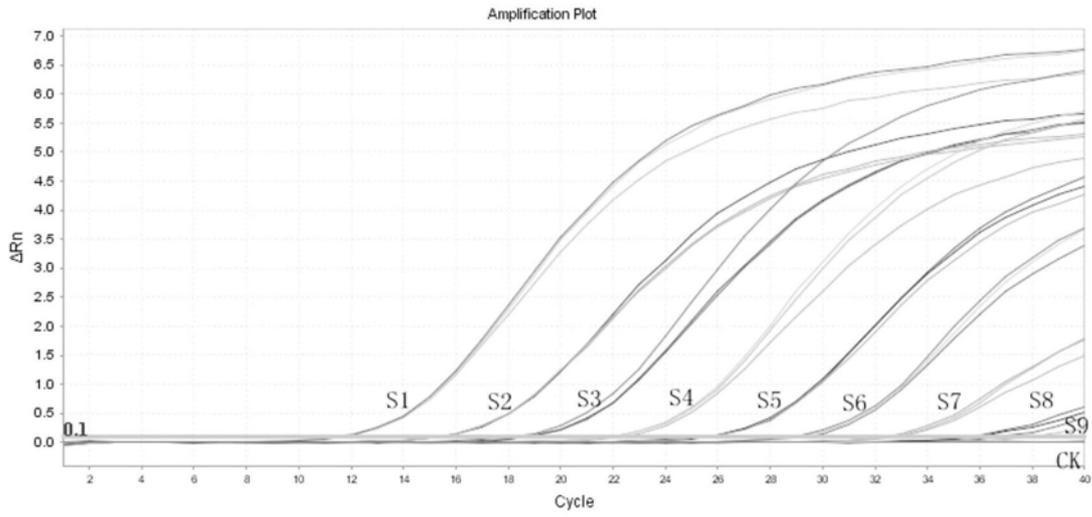


图1

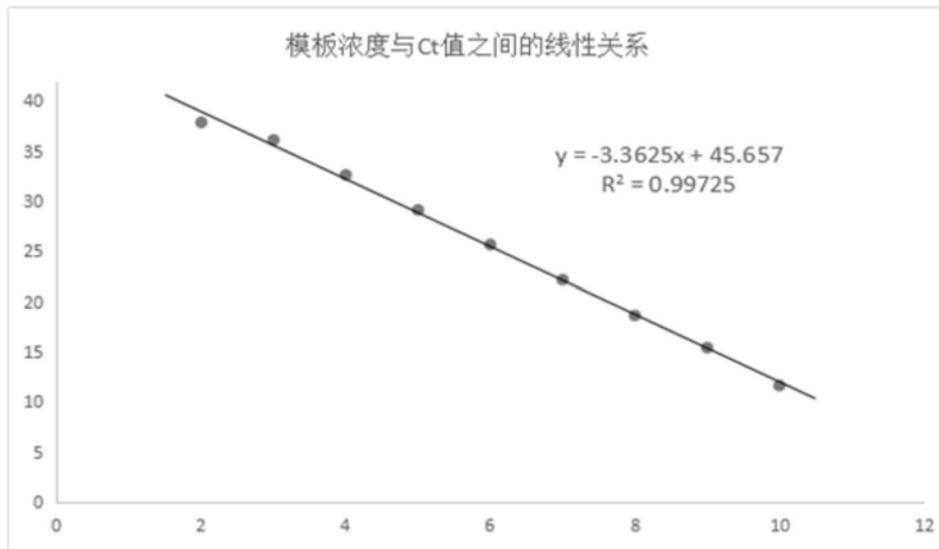


图2

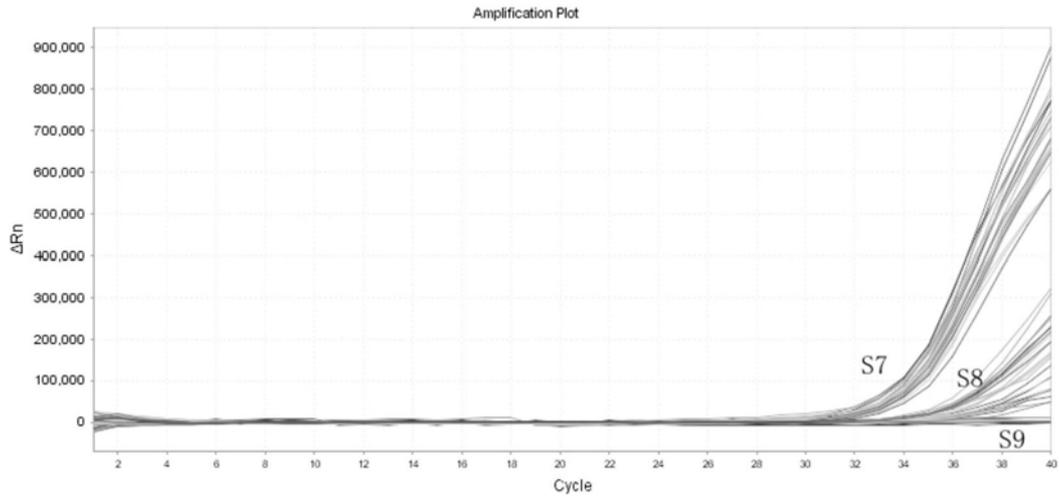


图3

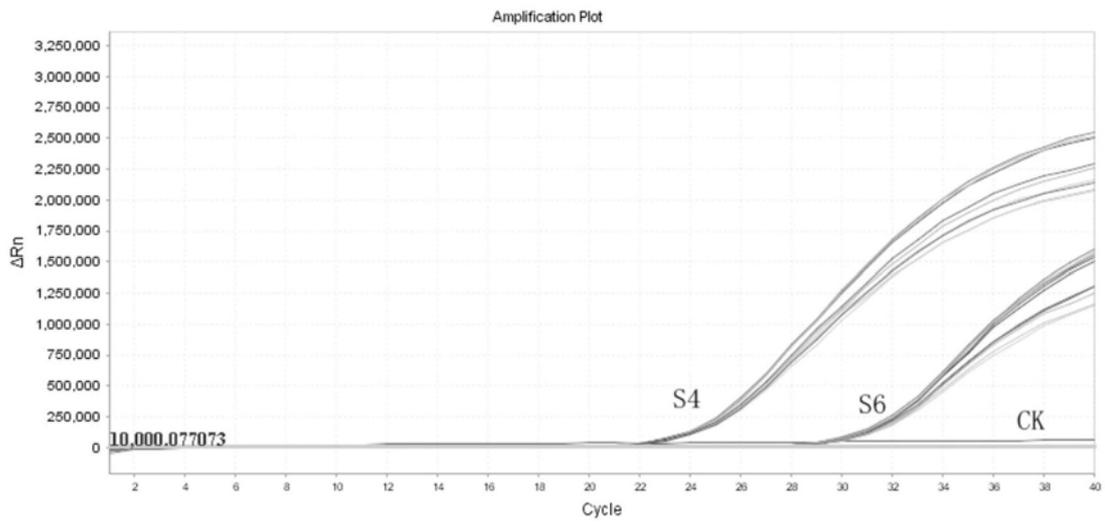


图4

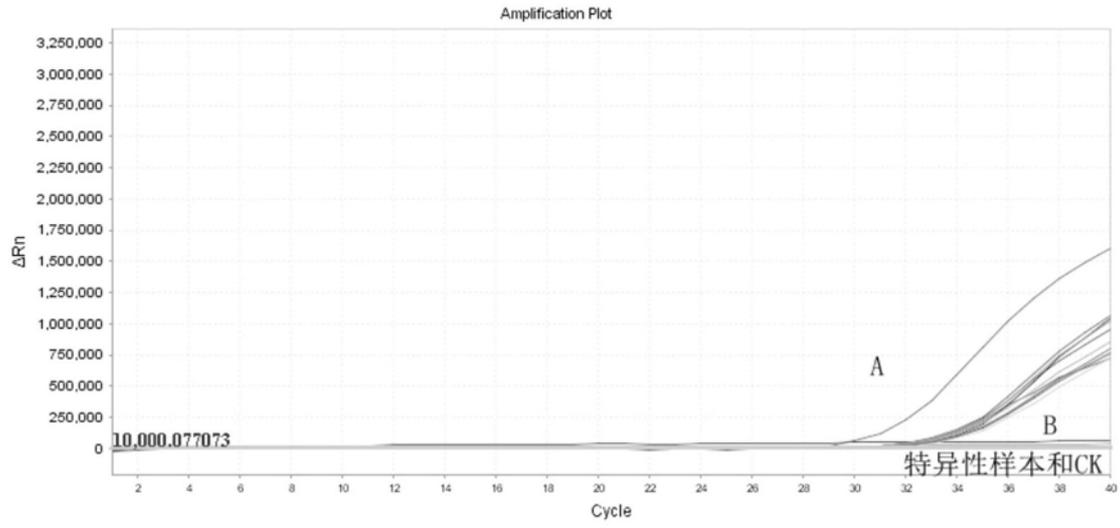


图5