



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107312826 A

(43)申请公布日 2017. 11. 03

(21)申请号 201611200672.2

(22)申请日 2016.12.22

(71)申请人 华东医药(杭州)基因科技有限公司

地址 310051 浙江省杭州市江干区水湘路
341号(金骏大厦)1114室

(72)发明人 曹恺 罗海贝

(74)专利代理机构 无锡市汇诚永信专利代理事
务所(普通合伙) 32260

代理人 张欢勇

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

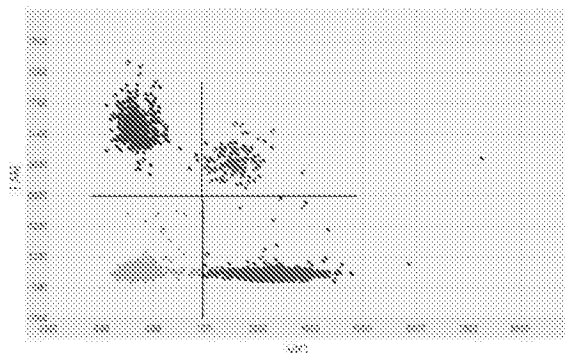
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法,在特定疾病的单拷贝待测基因以外,引入另一个单拷贝基因作为参比基因,在理想情况下,待测基因和参比基因的两种荧光信号的拷贝数比值应为1:1,然而实际扩增中,引物、探针等因素引起的基因间扩增效率的不同引起芯片微孔内的拷贝数不一致,进而导致了上述拷贝数比值为偏离A且偏离了1:1,本发明构建了与疾病待测基因和参比基因序列均高度相似的载体作为内参,待测基因和参比基因中载体的拷贝数的比值理论值为1:1,实际扩增出现了偏离B,多次实验确定了偏离A基本等于偏离B,可通过分别求得待测基因和参比基因的各模板的拷贝数比值来消除偏离,提高了数字PCR检测的准确性。



1. 一种基于扩增校正的数字PCR检测方法,其特征在于,所述方法通过如下步骤实现:

(1) 提取待检测者的全血基因组作为血样本模板,然后确定血样本模板的一个单拷贝基因作为待测基因,再确定血样本模板的另一个单拷贝基因作为参比基因,制备两个相同且等量的第一血样本模板和第二血样本模板;

(2) 设计合成包含待测基因和参比基因的序列作为载体模板,且载体模板上的待测基因数量等于参比基因的数量,制备两个相同且等量的第一载体模板和第二载体模板;

(3) 配置含有第一血样本模板的第一数字PCR反应混合液分散至第一芯片的微反应孔中,第一数字PCR反应混合液包括 $2 \times \text{Mix}$ 、待测基因引物、第一血样本模板及对应的探针、水、第一载体模板及对应的探针;

(4) 配置含有第二血样本模板的第二数字PCR反应混合液分散至第二芯片的微反应孔中作为内参,第二数字PCR反应混合液包括 $2 \times \text{Mix}$ 、参比基因引物、第二血样本模板及对应的探针、水、第二载体模板及对应的探针;

(5) 将第一芯片和第二芯片放在同一反应条件中进行PCR扩增并通过荧光信号读取值,第一芯片中得到待测基因的第一血样本模板拷贝数浓度 C_1 和第一载体模板拷贝数浓度 C_2 ,第二芯片中得到参比基因的第二血样本模板拷贝数浓度 C_3 和第二载体模板拷贝数浓度 C_4 ;

(6) 利用第一芯片中待测基因的第一血样本模板拷贝数浓度 C_1 和第二芯片中参比基因的第二血样本模板拷贝数浓度 C_3 的比值约等于第一芯片中第一载体模板拷贝数浓度 C_2 和

第二芯片中第二载体模板拷贝数浓度 C_4 的比值,即 $\frac{C_1/C_3}{C_2/C_4}$ 约等于1的原理,得出 C_1

校正后的值为 $C_3 \times C_2 \div C_4$ 。

2. 根据权利要求1所述的基于扩增校正的数字PCR检测方法,其特征在于所述待测基因为单拷贝致病基因。

3. 根据权利要求1所述的基于扩增校正的数字PCR检测方法,其特征在于所述载体模板是带有待测基因和参比基因的质粒或者DNA片段。

一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于PCR检测领域,具体涉及一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法。

背景技术

[0002] 数字PCR即Digital PCR (dPCR),它是一种核酸分子绝对定量技术,数字PCR技术是一种新型分子诊断技术,具有高灵敏度、高准确性、绝对定量等特点。芯片法数字PCR和普通PCR相比,特殊性在于数字PCR的反应体系被分配到芯片上的微孔内,理论上每个微孔中只含一个DNA模板片段,并在扩增结束后才对每个微孔进行荧光信号检测。基于该特殊性,当数字PCR的扩增效率较低时,某些微孔内的模板在初期循环中延伸失败,使得模板实际循环数少于理论循环数,导致最终的荧光信号成指数型降低,在芯片上体现出最终结果的偏差。该偏差降低了基于数字PCR技术的高精密度诊断试剂盒的检测灵敏度,甚至会出现漏检或假阴性结果。本专利通过在PCR反应体系中加入人工合成的矫正质粒来校正这种结果偏差,对于推广数字PCR技术、提高临床诊断准确率有着深远的意义。

发明内容

[0003] 如上所述,为了克服因不同基因和引物之间扩增效率不同带来的数字PCR结果偏差,本发明提供了一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法,可以减少或消除两个基因之间扩增效率不同带来的结果偏差,也可以增加检测方法对不同提取和样本处理条件的耐受能力,使结果更加可靠。

[0004] 为达到上述目标提供了一种基于扩增矫正的数字PCR检测方法,所述方法通过如下步骤实现:

[0005] (1) 提取待检测者的全血基因组作为血样本模板,然后确定血样本模板的一个单拷贝基因作为待测基因,再确定血样本模板的另一个单拷贝基因作为参比基因,制备两个相同且等量的第一血样本模板和第二血样本模板;

[0006] (2) 设计合成包含待测基因和参比基因的序列作为载体模板,载体模板可以是带有待测基因和参比基因的质粒或者DNA片段,且质粒或者DNA片段上的待测基因数量等于参比基因的数量,制备两个相同且等量的第一载体模板和第二载体模板;

[0007] (3) 配置含有第一血样本模板的第一数字PCR反应混合液分散至第一芯片的微反应孔中,第一数字PCR反应混合液包括 $2\times Mix$ 、待测基因引物、第一血样本模板及对应的探针、水、第一载体模板及对应的探针;

[0008] (4) 配置含有第二血样本模板的第二数字PCR反应混合液分散至第二芯片的微反应孔中作为内参,第二数字PCR反应混合液包括 $2\times Mix$ 、参比基因引物、第二血样本模板及对应的探针、水、第二载体模板及对应的探针;

[0009] (5) 将第一芯片和第二芯片放在同一反应条件中进行PCR扩增并通过荧光信号读取值,第一芯片中得到待测基因的第一血样本模板拷贝数浓度 C_1 和第一载体模板拷贝数浓度 C_2 ,第二芯片中得到参比基因的第二血样本模板拷贝数浓度 C_3 和第二载体模板拷贝数浓

度C4;

[0010] (6) 利用第一芯片中待测基因的第一血样本模板拷贝数浓度C1和第二芯片中参比基因的第二血样本模板拷贝数浓度C3的比值约等于第一芯片中第一载体模板拷贝数浓度

C2和第二芯片中第二载体模板拷贝数浓度C4的比值,即 $\frac{C1/C3}{C2/C4}$ 约等于1的原理,

得出C1矫正后的值为 $C3 \times C2 \div C4$ 。

[0011] 本发明所述方法的原理:首先在特定疾病的待测基因(单拷贝基因)以外,在与待测基因同血样模板中确定并引入另一个单拷贝基因作为参比基因,在理想情况下,待测基因和参比基因的两种荧光信号的拷贝数比值应为1:1,然而实际扩增中,引物、探针等因素引起的基因间扩增效率的不同引起芯片微孔内的拷贝数不一致,进而导致了上述拷贝数比值偏离了1:1,本发明构建了与疾病待测基因和参比基因序列均高度相似的载体作为内参,所述载体是均包含了待测基因和参比基因的序列,载体可以是带有待测基因和参比基因的质粒或者DNA片段,且质粒或者DNA片段上的待测基因数量等于参比基因的数量,如上所述,待测基因和参比基因中载体的拷贝数的比值理论值为1:1,实际扩增出现了偏离,通过多次实验,确定了不同操作条件下待测基因中的血样模板的拷贝数和参比基因中的血样模板拷贝数的比值约等于待测基因中载体的拷贝数和参比基因中载体的拷贝数的比值,因此可以通过分别求得待测基因和参比基因的各模板的拷贝数比值来消除这个偏离。

[0012] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:1.可以减少或消除两个基因之间扩增效率不同带来的结果偏差;2.可以增加检测方法对不同提取和样本处理条件的耐受能力,使结果更加可靠。

附图说明

[0013] 图1是实施例1的1号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0014] 图2是实施例1的2号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0015] 图3是实施例1的3号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0016] 图4是实施例2的1号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0017] 图5是实施例2的2号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0018] 图6是实施例2的3号芯片的数字PCR结果的散点图,

[0019] 图中,横纵两条辅助线将附图分为左上区、左下区、右上区和右下区共四个区,左上区中的圆点是FAM荧光信号,右下区中的圆点是VIC荧光信号,右上区中的圆点是FAM+VIC荧光信号,左下区中的圆点是ROX荧光信号。

具体实施方式

[0020] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0021] 实施例1

[0022] 人乳腺癌基因扩增矫正

[0023] 一、正常人全血基因组提取(参考货号为DP348的天根生化科技(北京)有限公司血液基因组DNA提取试剂盒)

[0024] (一)处理血液样品(本产品适用于处理100 μ l-1ml血液样品):

[0025] 1.提取200 μ l血液样品时,可直接进行下一步实验。

[0026] 2.提取小于200 μ l血液样品时,可加缓冲液GS补足体积至200 μ l,再进行下一步实验。

[0027] 3.提取大于200 μ l血液样品时,需细胞裂解液CL处理,具体步骤如下:在样品中加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL,颠倒混匀,10,000rpm(\sim 11,500 \times g)离心1min,吸去上清,留下细胞核沉淀(如果裂解不彻底,可加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL重复裂解一次),向细胞核沉淀中加200 μ l缓冲液GS,振荡至彻底混匀,再进行下一步实验。

[0028] 4.当处理血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的抗凝血液,红细胞有核细胞,因此处理量为5-20 μ l,加缓冲液GS补足200 μ l,再进行下一步实验。

[0029] 5.当处理血样为血凝块,可选择液化柱CX1(TIANGEN,RK165)(需自备)对血凝块进行液化处理,具体步骤如下:

[0030] (1).取血凝块至液化柱CX1中,12,000rpm(\sim 11,500 \times g)离心1min,收集滤液(若血凝块量大可分批多次过柱离心,收集滤液)。

[0031] (2).取100 μ l-1ml滤液加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL,颠倒混匀,10,000rpm(\sim 11,500 \times g)离心1min,吸去上清,留下细胞核沉淀(如果裂解不彻底,可加入1-2.5倍血液样品体积的细胞裂解液CL重复裂解一次),向收集到的细胞核沉淀中加200 μ l缓冲液GS,振荡至彻底混匀,再进行下一步实验。

[0032] 6.加入200 μ l缓冲液GB和20 μ l Proteinase K的预混溶液至上述处理获得的200 μ l样品中,充分颠倒混匀,56 $^{\circ}$ C放置10min,其间颠倒混匀数次,溶液应变清亮(如溶液未彻底变清亮,请延长裂解时间至溶液清亮为止)。

[0033] 7.室温放置2-5min后加入350 μ l缓冲液BD,充分颠倒混匀,此时可能会出现絮状沉淀。

[0034] 8.将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱CG2中(吸附柱CG2放入收集管中),12,000rpm(\sim 13,400 \times g)离心30sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CG2放入收集管中。

[0035] 9.向吸附柱CG2中加入500 μ l缓冲液GDB,12,000rpm(\sim 13,400 \times g)离心30sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CG2放入收集管中。

[0036] 10.向吸附柱CG2中加入600 μ l漂洗液PWB(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),12,000rpm(\sim 13,400 \times g)离心30sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CG2放入收集管中。

[0037] 11.重复操作步骤6。

[0038] 12. 12,000rpm(\sim 13,400 \times g)离心2min,倒掉废液。将吸附柱CG2置于室温放置2min,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

[0039] 13.将吸附柱CG2转入1.5ml离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加50-200 μ l洗脱

缓冲液TB,室温放置2min,12,000rpm (~13,400×g)离心2min,将溶液收集到离心管中。

[0040] (二)引物及矫正质粒溶液配置

[0041] 1.引物及质粒12000rpm离心60s;

[0042] 2.慢慢打开管盖,加入适量的缓冲溶液或水,使引物终浓度为10Mm;质粒终浓度为500copies/uL,血样模板浓度2ng/uL;

[0043] 3.盖上盖子后充分震荡混匀;

[0044] 4.放入-20℃保存待用。

[0045] (三)数字PCR检测

[0046] 1.试验设计方法如下表:

[0047]

名称	1号芯片	2号芯片	3号芯片
模板	血样模板、矫正质粒	血样模板、矫正质粒	血样模板
引物	HER2-F、 HER2-R	RPS27A-F、 RPS27A-R	HER2-F、HER2-R、 RPS27A-F、RPS27A-R
探针	HER2-FAM-probe、 HER2'-HEX-probe	RPS27A-VIC-probe、 RPS27A'-FAM-probe	HER2-FAM-probe、 RPS27A-VIC-probe

[0048] 2.三块芯片数字PCR反应混合液的配比如下表:

[0049]

	1号芯片	2号芯片	3号芯片
组分	体积 (uL)	体积 (uL)	体积 (uL)
2×Mix	7.5	7.5	7.5
HER2-F	1	0	1
HER2-R	1	0	1
RPS27A-F	0	1	1
RPS27A-R	0	1	1
HER2-FAM-probe	0.5	0	0.5
HER2'-HEX-probe	0.5	0	0
RPS27A-VIC-probe	0	0.5	0.5
RPS27A'-FAM-probe	0	0.5	0
血样模板	1	1	1
矫正质粒	1	1	0
水	2.5	2.5	1.5

[0050] 3. (1) PCR反应液的配制,步骤如下:

[0051] ①将配制PCR反应液所需的试剂从冰箱取出,置于冰上解冻,待各试剂完全解冻后方可使用。

[0052] ②解冻后将试剂放在涡旋仪上震荡15s以上,或轻轻颠倒反复10次,使其充分混匀。

[0053] ③反应液按表2中配比配制:

[0054] ④反应液配制后在涡旋仪上震荡15s以上,充分混匀

[0055] (2) 进样

[0056] ①打开进样器(iLoader),同时将所需耗材:样本加载叶片(Blade)、芯片(20K chip)、芯片盖(Chip Lid)准备好,并分别放置在进样器的相应位置上,确认摆放牢固、方向正确。

[0057] ②待进样器左上角指示灯变蓝,先对反应液进行简短的离心,将管盖、管壁上附着的液体甩下,再用移液器取样14.5 μ l,取样时需将混匀的反应液再次反复吹吸。

[0058] ③压下进样按钮开始进样,仔细观察加载叶片与芯片的相对位置,以免进样不完美(加载叶片起始终始位置、左右服帖度等)对实验结果造成影响。

[0059] ④进样结束后,即加载叶片离开芯片表面,恢复到初始位置时,立马将准备好的油相浸液(Immersion Fluid)注射到芯片上,使之完全覆盖芯片表面,以防反应液受热蒸发。

[0060] ⑤旋转进样器装载臂,使芯片盖与芯片基座粘合,用力按压15s以上,以确保两者粘合紧密。

[0061] ⑥取下芯片,从两侧夹住芯片握稳,使芯片呈45°角进行排气。从排气孔注射油相浸液,尽量不要产生气泡,以免影响扩增的热均匀性。油液注满直至芯片腔内空气排尽,用无尘纸擦拭排气孔周围,保证排气孔周围洁净、干燥、无油无绒,然后粘贴3M密封胶以封闭排气孔。

[0062] 4. PCR扩增

[0063] (1) 打开PCR扩增舱,用无尘布擦拭加热模块,保证模块洁净、干燥后,打开PCR仪电源开关,准备PCR扩增。

[0064] (2) 将芯片按顺序放入芯片适配器中,并盖上白色硅胶散热垫(Thermal Pads),将反应架固定于PCR仪相应位置,确保芯片排气孔统一朝上后,合上PCR仪热盖。

[0065] (3) 设置PCR反应条件如下:

Step 1	Step 2		Step 3	
	×39			
96°C	62°C	98°C	62°C	25°C
10min	1min	30s	1min	∞

[0067] 热盖温度设定为75°C。

[0068] 5. 结果呈现及分析

[0069] (1) 数字PCR结果汇总

[0070] ①散点图如图1、图2和图3所示,HER2基因的FAM信号对应人血,VIC信号对应载体;RPS27A基因的FAM信号对应载体,VIC信号对应人血,

[0071] ②软件结果

[0072]

芯片号数	Copies (VIC)	Copies (FAM)
1	367.71	49.614
2	46.833	346.33
3	52.505	47.568

[0073] (2) 计算方法

$$[0074] \quad \textcircled{1} \text{校正后结果计算方法: } Result_Of_Correction = \frac{C(HER2)/C(HER2')}{C(RPS27A)/C(RPS27A')}$$

[0075] C (HER2) :1号芯片中FAM信号拷贝数浓度,即HER2基因拷贝数浓度,C (HER2') :1号芯片中VIC信号拷贝数浓度,即HER2' 基因拷贝数浓度,C (RPS27A) :2号芯片中FAM信号拷贝数浓度,即RPS27A基因拷贝数浓度,C (RPS27A') :2号芯片中VIC信号拷贝数浓度,即RPS27A' 基因拷贝数浓度。

$$[0076] \quad \textcircled{2} \text{校正前结果计算方法: } Result_Of_Common = \frac{C(HER2)}{C(RPS27A)}$$

[0077] C (HER2) :3号芯片中FAM信号拷贝数浓度,即HER2基因拷贝数浓度,C (RPS27A) :3号芯片中VIC信号拷贝数浓度,即RPS27A基因拷贝数浓度。

[0078] (3) 结果比较

[0079] 根据结果计算确定:校正前结果为:1.1037,校正后结果为0.9977;由于所用的所有全血样本都来源于正常人,所以这些样本的真实检测结果应该为1。由此可以确定本专利中所述方法可以极大程度地降低不同基因及引物之间扩增效率差异对数字PCR结果的影响。

[0080] 实施例2

[0081] 二、外胚层神经皮层基因扩增矫正

[0082] (一) 试验设计方法:

[0083]

名称	1号芯片	2号芯片	3号芯片
模板	血样模板、矫正质粒	血样模板、矫正质粒	血样模板
引物	ENC1 -F、 ENC1-R	RNF213 -F、 RNF213-R	ENC1 -F、ENC1-R、 RNF213 -F、RNF213 -R
探针	ENC1-FAM-probe、 ENC1'-HEX-probe	RNF213-VIC-probe、 RNF213'-FAM-probe	ENC1-FAM-probe、 RNF213-VIC-probe

[0084] (二) 数字PCR结果汇总

[0085] 1. 散点图如图4、图5和图6所示,ENC1基因的FAM信号对应人血,VIC信号对应载体;RNF213基因的FAM信号对应载体,VIC信号对应人血,

[0086] 2. 结果

[0087]

芯片号数	Copies (VIC)	Copies (FAM)
1	32.043	29.97
2	31.421	29.641
3	27.638	27.442

[0088] 3. 结果比较

[0089] 根据结果计算确定:校正前结果为0.9353,校正后结果为0.9929,由于所用的所有

全血样本都来源于正常人,所以这些样本的真实检测结果应该为1。由此可以确定本专利中所述方法可以极大程度地降低不同基因及引物之间扩增效率差异对数字PCR结果的影响。

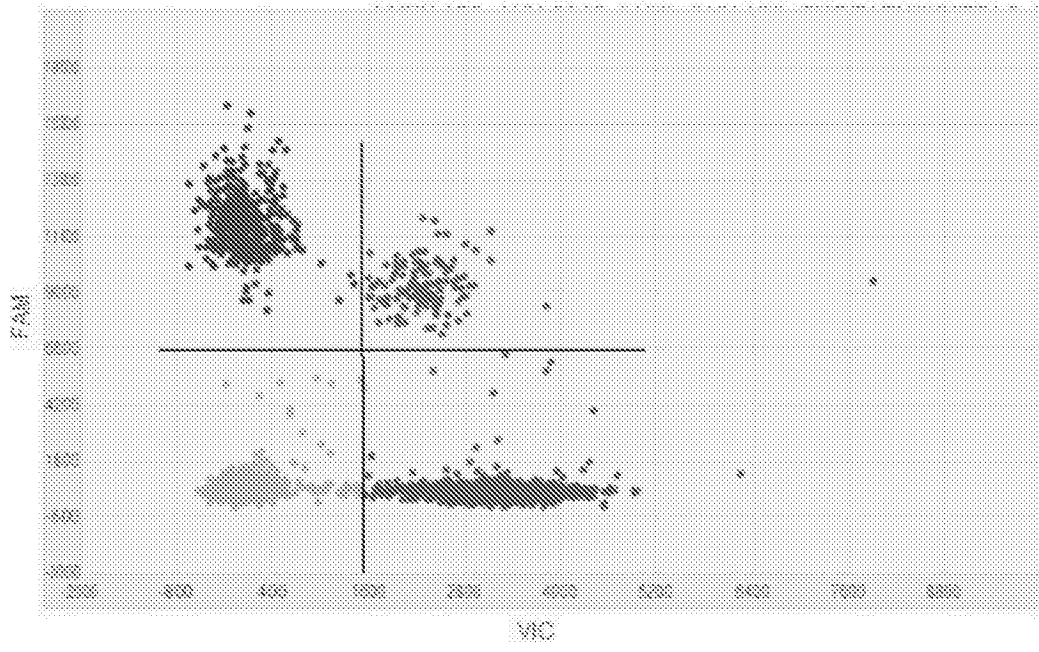


图1

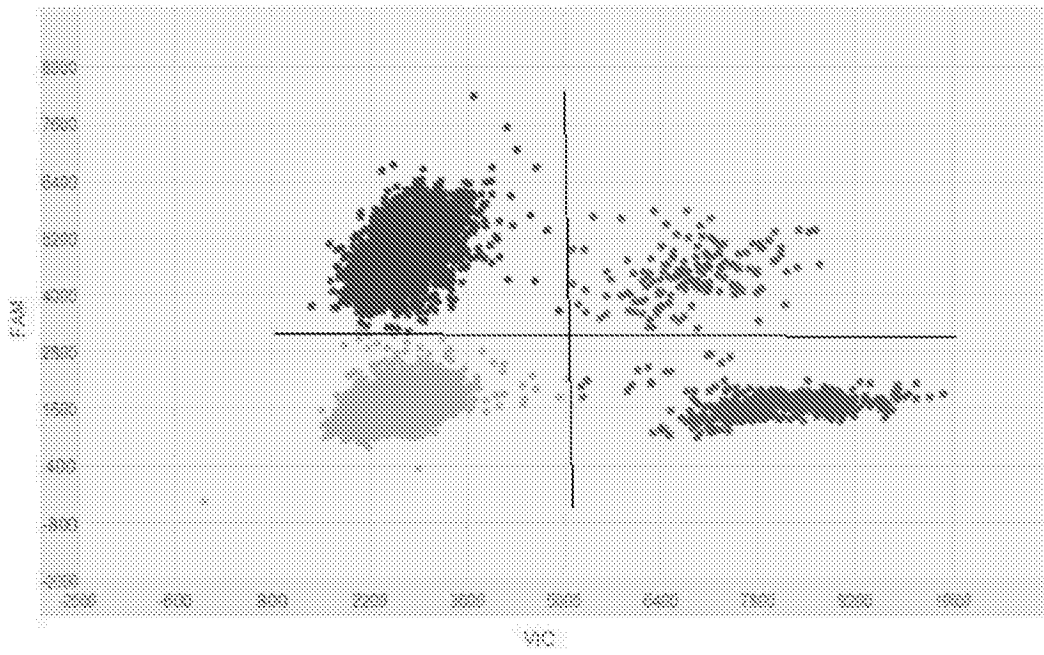


图2

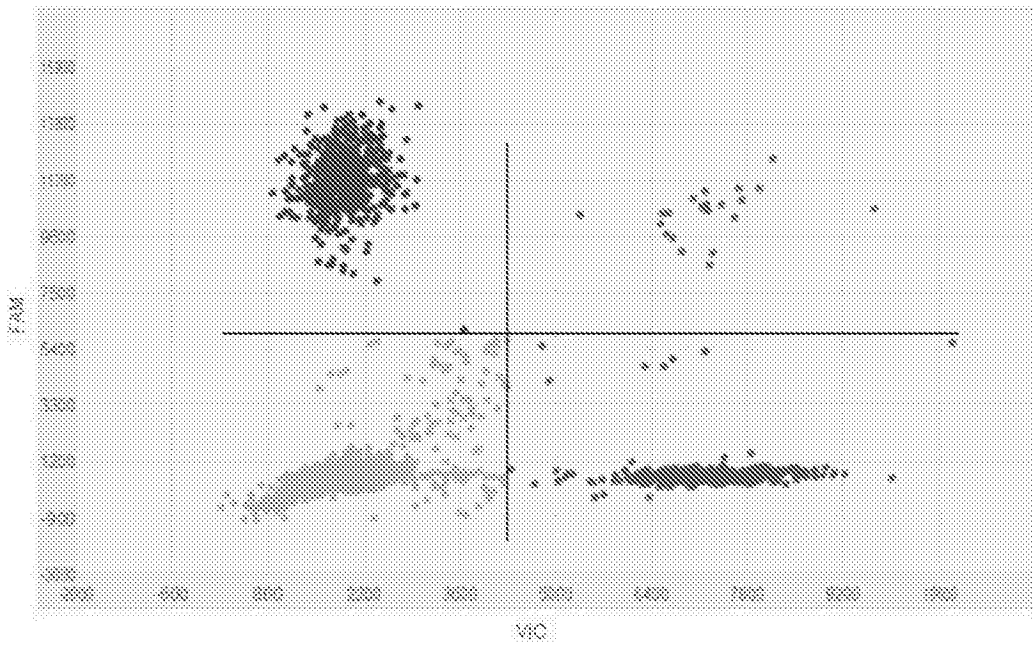


图3

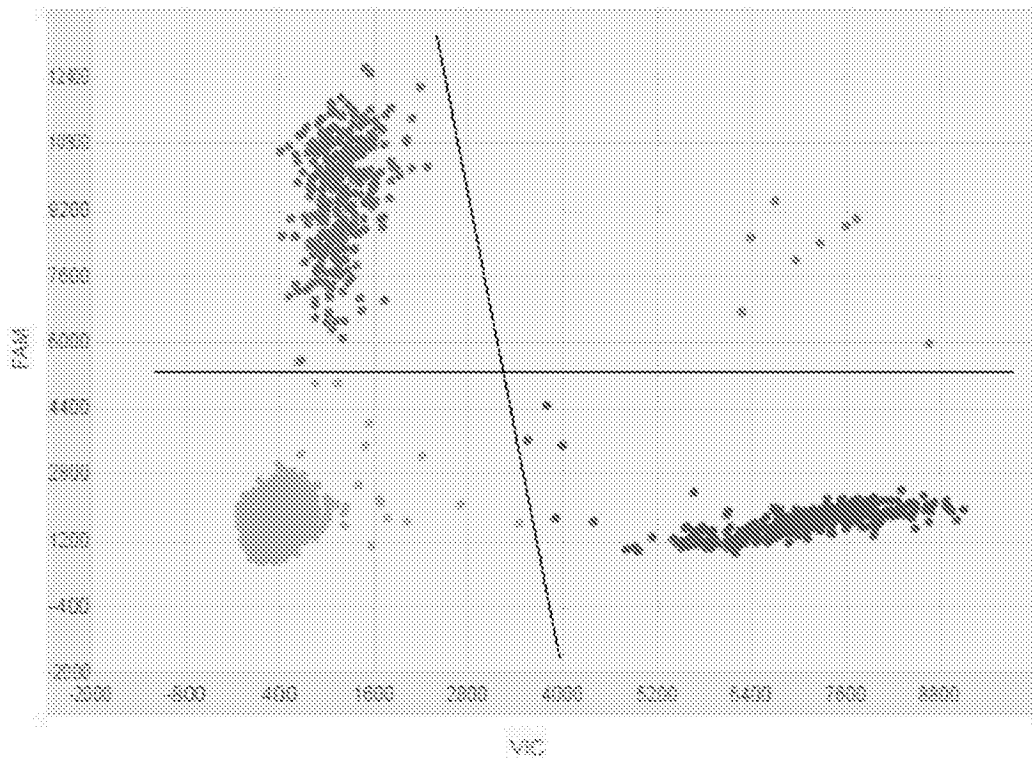


图4

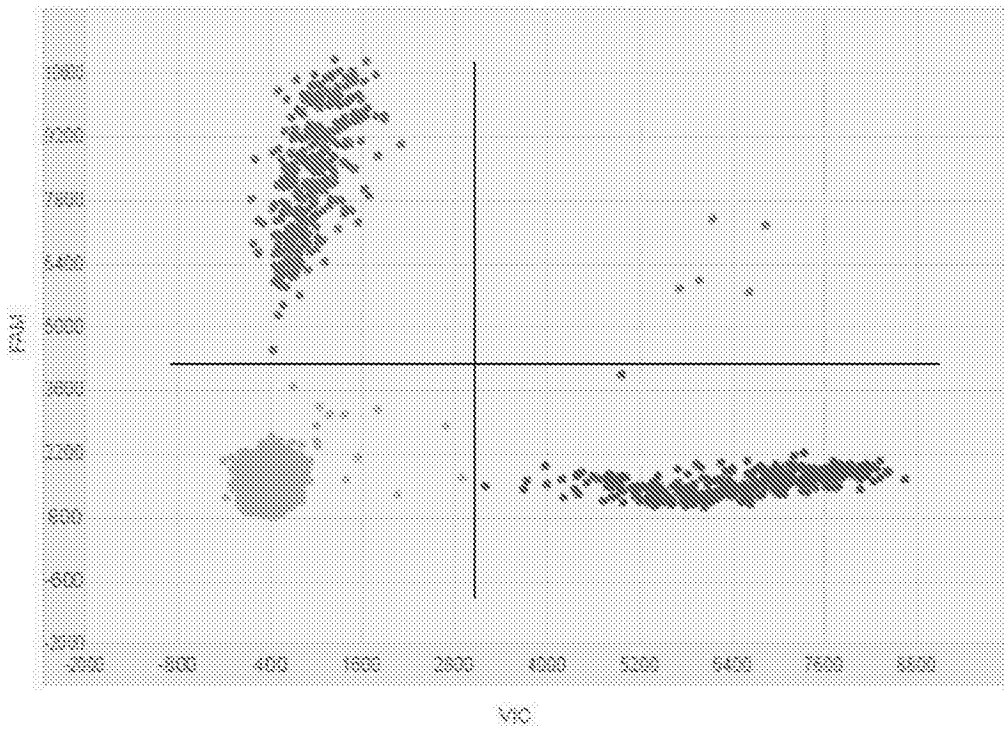


图5

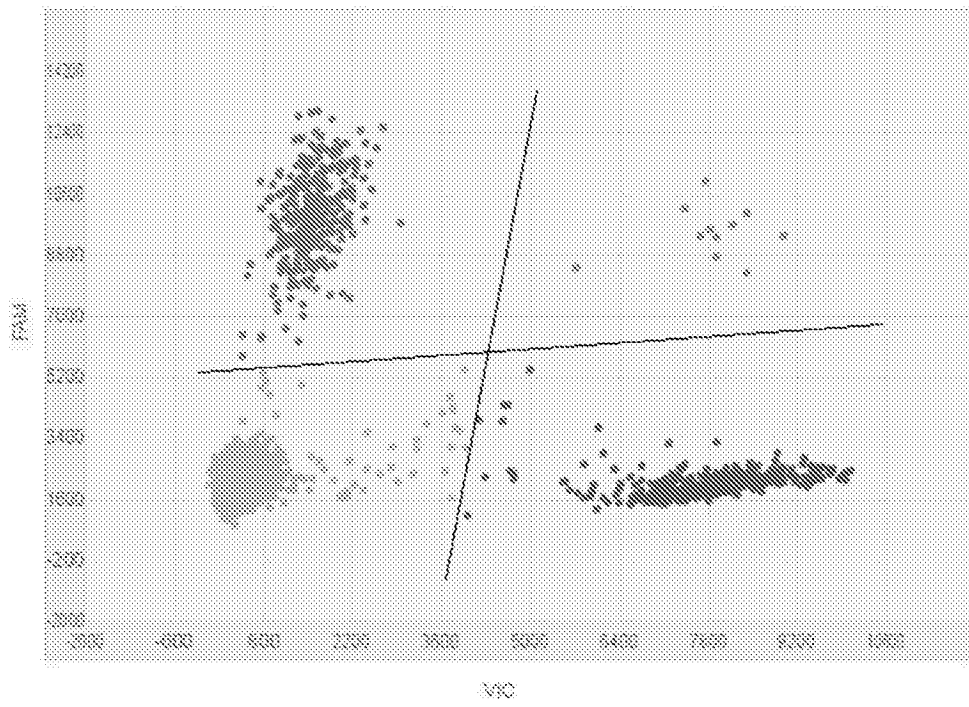


图6