



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110684862 B

(45) 授权公告日 2023.05.26

(21) 申请号 201810737235.7

C12Q 1/6851 (2018.01)

(22) 申请日 2018.07.06

C12N 15/11 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 汪豪杰

申请公布号 CN 110684862 A

(43) 申请公布日 2020.01.14

(73) 专利权人 苏州云泰生物医药科技有限公司

地址 215130 江苏省苏州市相城区经济开

发区华元路9号6号楼

专利权人 武汉百泰基因工程有限公司

(72) 发明人 严晓锋 刘凤麟 熊慧

(74) 专利代理机构 北京和信华成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11390

专利代理师 胡剑辉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR
试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明属于病毒核酸检测领域,具体涉及一种用于定量检测乙肝病毒的微滴数字PCR试剂盒及检测方法。本发明的微滴数字PCR试剂盒包括微滴数字PCR检测试剂,包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;探针的两端标记有荧光基团。本发明微滴数字PCR试剂盒的特异性好、灵敏度高、能快速检测到极低含量的病毒,而且可直接定量,无需标准曲线。技术操作简便、自动化程度高,为低浓度乙肝病毒检测和定量提供了一种切实可行的方法。

1. 一种用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR试剂盒,其特征在于,所述微滴数字PCR试剂盒包括微滴数字PCR检测试剂,

所述微滴数字PCR检测试剂中含有用于检测乙型肝炎病毒核酸的引物和探针;所述用于检测乙型肝炎核酸的引物和探针包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;所述探针的两端标记有荧光基团;

微滴数字PCR检测试剂中含有DEPC处理水用量2 μ L、数字PCR缓冲液10 μ L、SEQ ID NO:1所示的正向引物0.013nmol、SEQ ID NO:2所示的反向引物0.013nmol、SEQ ID NO:3所示的探针0.004nmol。

2. 根据权利要求1所述的微滴数字PCR试剂盒,其特征在于,所述探针的5'端标记有FAM,3'端标记有BHQ。

3. 根据权利要求1所述的微滴数字PCR试剂盒,其特征在于,所述微滴数字PCR试剂盒中还包括微滴生成油、微滴生成卡、96孔板和铝箔热封膜。

用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于病毒核酸检测领域,具体涉及一种用于定量检测乙肝病毒的微滴数字PCR试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)属嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae),基因组长约3.2kb,为部分双链环状DNA。乙型肝炎病毒复制的特点是:肝细胞核内有稳定的共价闭合环状DNA(cccDNA)存在;有一个逆转录步骤。乙型肝炎病毒基因组中已确定的开放读框有4个,分别编码病毒的核壳(C)和包膜(S)蛋白,病毒复制酶(聚合酶)及一种似乎与病毒基因表达有关的蛋白质X。乙肝病毒具有传染性强、传播途径复杂、感染过程多样化、流行面广、发病率高、治疗困难等特点。由其引起的乙型病毒性肝炎广泛流行于世界各国,主要侵犯儿童及青壮年。人体感染乙肝病毒后常可导致急、慢性乙型病毒性肝炎,长期的慢性感染可发展成肝硬化、甚至肝细胞癌,是一种潜在的严重威胁人类健康的传染病。因此要求对乙型肝炎病毒感染尽快针对不同病情给以恰当的治疗。快速灵敏的乙型肝炎病毒检测是及时诊断及治疗的必要条件

[0003] 数字PCR(Digital PCR-dPCR)技术是最新的核酸检测及定量技术,基于单分子PCR方法来进行计数的核酸定量,是一种绝对定量的方法。其基本原理是,将适度稀释的低浓度核酸样本分装进若干个独立的微反应体系中,由于稀释后靶核酸分子浓度极低,使有些微反应体系中无靶核酸分子,有些微反应体系中含有至少1个靶核酸分子。经过PCR扩增,无靶核酸分子的微反应呈阴性,有靶核酸分子的微反应呈阳性。计数阳性微反应的数量,再结合泊松分布概率密度函数,可得到每个微反应体系中靶核酸分子的平均含量,进而获得样品中靶核酸分子的原始浓度。

[0004] 数字PCR在进行结果判读时仅判断有/无两种扩增状态,完全不依赖于Ct值,受扩增效率的影响大大降低,对PCR反应抑制物的耐受能力大大提高;另外,数字PCR采用绝对定量的方式,不依赖于标准曲线和参照样本,直接检测目标序列的拷贝数。相比于传统的荧光PCR,拥有更加出色的灵敏度、特异性和精确性,其在极微量核酸样本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达量微小差异分析方面展现出的优势已被普遍认可。

[0005] 为了应对临床上日益增长的乙型肝炎病毒检测高灵敏度和高准确性检测的需求,开发基于dPCR的乙型肝炎病毒检测方法,具有十分重要的意义。

[0006] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0007] 本发明的发明目的在于提出一种用于定量检测乙肝病毒核酸的数字PCR试剂盒及检测方法。

[0008] 本发明的又一发明目的在于提出一种采用数字PCR检测乙肝病毒核酸的引物和探

针。

[0009] 为了完成本发明的目的,采用的技术方案为:

[0010] 本发明涉及一种用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR试剂盒,所述微滴数字PCR试剂盒包括微滴数字PCR检测试剂,所述微滴数字PCR检测试剂中含有用于检测乙型肝炎病毒核酸的引物和探针;所述用于检测乙型肝炎核酸的引物和探针包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;所述探针的两端标记有荧光基团。

[0011] 可选的,所述探针的5'端标记有FAM,3'端标记有BHQ。

[0012] 可选的,所述正向引物还选自SEQ ID NO:1所示核苷酸的5'端和/或3'端连接有延长的核苷酸片段的核苷酸序列,或者选自与SEQ ID NO:1所示核苷酸互补的核苷酸序列;所述反向引物还选自SEQ ID NO:2所示核苷酸的5'端和/或3'端连接有延长的核苷酸片段的核苷酸序列,或者选自与SEQ ID NO:2所示核苷酸互补的核苷酸序列。

[0013] 可选的,所述微滴数字PCR检测试剂中还含有数字PCR缓冲液。

[0014] 可选的,所述微滴数字PCR检测试剂中含有DEPC处理水用量1~3 μ L、数字PCR缓冲液8~12 μ L、SEQ ID NO:1所示的正向引物0.01~0.015nmol、SEQ ID NO:2所示的反向引物0.01~0.015nmol、SEQ ID NO:3所示的探针0.002~0.06nmol;

[0015] 优选的,微滴数字PCR检测试剂中含有DEPC处理水用量2 μ L、数字PCR缓冲液10 μ L、SEQ ID NO:1所示的正向引物0.013nmol、SEQ ID NO:2所示的反向引物0.013nmol、SEQ ID NO:3所示的探针0.004nmol。

[0016] 可选的,所述微滴数字PCR试剂盒中还包括微滴生成油、微滴生成卡、96孔板和铝箔热封膜。

[0017] 本发明还涉及一种利用上述的微滴数字PCR试剂盒定量检测乙肝病毒核酸的方法,至少包括以下步骤:

[0018] (1)提取待测样本DNA;

[0019] (2)配制微滴数字PCR反应混合液:将所述微滴数字PCR检测试剂和待测样本DNA模板混合,得到所述微滴数字PCR反应混合液;

[0020] (3)将所述微滴数字PCR反应混合液和微滴生成油加入微滴生成卡中,置于微滴生成仪中生成微滴,然后进行PCR扩增反应;

[0021] (4)读取荧光信号:将扩增后的96孔板置于微滴读取仪中,利用软件直接进行结果读取和分析;按照泊松分布原理自动计算获得微滴PCR反应体系内乙型肝炎病毒DNA的拷贝数。

[0022] 可选的,所述生成微滴的方法至少包括以下步骤:

[0023] (1)将微滴生成卡固定在卡托中,取8个所述微滴数字PCR反应混合液加入到微滴发生卡中间一排的8个孔内;

[0024] (2)在微滴发生卡最底下一排8个孔中加入微滴生成油,盖上胶垫;

[0025] (3)将卡托放置于微滴生成仪中,开始生成微滴;微滴生成于微滴发生卡最上面一排孔内,将生成的微滴转移至96孔板相应位置孔内;

[0026] (4)使用封膜仪进行封膜,封好膜之后在96孔PCR仪内进行PCR反应。

[0027] 可选的,所述PCR扩增反应的条件为:首先在95 $^{\circ}$ C条件下保温5~7分钟;然后95 $^{\circ}$ C

保温10~15秒、60℃保温30~35秒,共进行38~42个循环;最后在98℃条件下保温9~11min,降温至4℃结束反应;

[0028] 优选为,首先在95℃条件下保温5分钟;然后95℃保温10秒、60℃保温30秒,共进行40个循环;最后在98℃条件下保温10min,降温至4℃结束反应;

[0029] 更优选的,升降温的速度 $\leq 2^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 。

[0030] 本发明还涉及一种采用微滴数字PCR检测乙肝病毒核酸的引物和探针,所述引物和探针的序列包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;所述探针的两端标记有荧光基团;优选的,SEQ ID NO:3所示核苷酸序列的5'端标记有FAM、3'端标记有BHQ。

[0031] 本发明的技术方案至少具有以下有益的效果:

[0032] 本发明微滴数字PCR试剂盒的特异性好、灵敏度高、能快速检测到极低含量的病毒,而且可直接定量,无需标准曲线。技术操作简便、自动化程度高,为低浓度乙肝病毒检测和定量提供了一种切实可行的方法。

附图说明

[0033] 图1是本发明实施例1中提供的实验结果图;其中,横坐标表示循环数(Cycle number),纵坐标表示荧光值(Delta Rn)。

[0034] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

具体实施方式

[0035] 本发明实施例涉及一种用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR试剂盒及检测方法,具有操作简单、结果准确的技术优势。该试剂盒所适用的数字PCR系统包括微滴发生器和微滴分析仪及其相关的耗材。微滴发生器可将待测DNA分区成20000个均匀的纳升级微滴。将微滴转移至96孔PCR板上,使用热循环仪进行PCR扩增DNA,在每个微滴中PCR反应都独立进行。扩增后采用微滴分析仪进行荧光读取,逐个分析样品中的每个微滴。微滴被吸入后,管路将分解乳化的微滴,并使它们依次通过光学检测系统。有荧光信号的微滴为阳性,没有荧光信号的微滴为阴性,计算阳性和阴性微滴的数量及阳性微滴的比例。最终根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例,分析软件可计算出待检靶分子的浓度或拷贝数。本发明实施例通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)在线工具获得乙型肝炎病毒8个基因型的S基因序列,并在www.ebi.ac.uk/在线分别对8个基因型的S基因序列进行序列比对。针对8种基因型S基因的同源序列,进行适用于ddPCR的特异性引物和设计,确保乙型肝炎病毒引物、探针序列能检测全部8个基因型序列。本发明实施例选择用软件并筛选获得特异性强、适用于数字PCR的引物和探针序列。

[0036] 本发明实施例的微滴数字PCR试剂盒包括微滴数字PCR检测试剂,微滴数字PCR检测试剂中含有用于检测乙型肝炎病毒核酸的引物和探针用于检测乙型肝炎核酸的引物和探针包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;探针的两端标记有荧光基团。

[0037] 可选的,探针的5'端标记有FAM,3'端标记有BHQ。

[0038] 具体的,引物和探针的序列如表1所示:

[0039] 表1

名称	核苷酸序号	核苷酸序列(5'-3')	修饰
正向引物	SEQ ID NO:1	gcgttttatcatcttcctc	—
反向引物	SEQ ID NO:2	tggaattagaggacaaacgg	—
探针	SEQ ID NO:3	cctgctgctatgcctca	5'-FAM、3'-BHQ

[0041] 按照上表的设计结果,由宝生物工程(大连)有限公司合成。

[0042] 可选的,正向引物还可以选自SEQ ID NO:1所示核苷酸的5'端连接有延长的核苷酸片段的核苷酸序列,例如SEQ ID NO:7所示的序列:5'-ggcgttttatcatcttcctc-3';或者选自与SEQ ID NO:1所示核苷酸互补的核苷酸序列,例如SEQ ID NO:8所示的序列:5'-gaggaagatgataaaacgc-3'。

[0043] 可选的,反向引物还选自SEQ ID NO:2所示核苷酸的5'端连接有延长的核苷酸片段的核苷酸序列,例如SEQ ID NO:9所示的序列:5'-ctggaattagaggacaaacgg-3';或者选自与SEQ ID NO:2所示核苷酸互补的核苷酸序列,例如SEQ ID NO:10所示的序列:5'-ccgtttgtcctctaattcca-3'。

[0044] 可选的,微滴数字PCR检测试剂中还含有数字PCR缓冲液。具体的,数字PCR缓冲液可选用BioRad公司2×QX200Biorad ddPCR Supermix for Probes产品。

[0045] 可选的,微滴数字PCR检测试剂中含有DEPC处理水用量1~3μL、数字PCR缓冲液8~12μL、SEQ ID NO:1所示的正向引物0.01~0.015nmol、SEQ ID NO:2所示的反向引物0.01~0.015nmol、SEQ ID NO:3所示的探针0.002~0.06nmol;

[0046] 优选的,微滴数字PCR检测试剂中含有DEPC处理水用量2μL、数字PCR缓冲液10μL、SEQ ID NO:1所示的正向引物0.013nmol、SEQ ID NO:2所示的反向引物0.013nmol、SEQ ID NO:3所示的探针0.004nmol。

[0047] 可选的,微滴数字PCR试剂盒中还包括微滴生成油、微滴生成卡、96孔板和铝箔热封膜。具体的,微滴生成油可选用BioRad公司的Droplet Generation Oil for Probes(#1863005),微滴生成卡可选用BioRad公司的DG8Cartridges and Gaskets(#1864007)。

[0048] 可选的,微滴数字PCR试剂盒所适用的样本选自血清或血浆。

[0049] 本发明实施例还涉及一种利用上述微滴数字PCR试剂盒定量检测乙肝病毒核酸的方法,至少包括以下步骤:

[0050] (1)提取待测样本DNA;

[0051] 具体可采用商用市售试剂盒进行提取;

[0052] (2)配制微滴数字PCR反应混合液:将微滴数字PCR检测试剂和样本DNA模板混合,得到微滴数字PCR反应混合液;

[0053] 可选的,微滴数字PCR检测试剂和所述待测样本DNA模板的体积比为13~16:4~7;并优选为3:1,即在20μL反应体系中,含有15μL的微滴数字PCR检测试剂、5μL的待测样本DNA模板。

[0054] (3)将微滴数字PCR反应混合液和微滴生成油加入微滴生成卡中,置于微滴生成仪中生成微滴,然后进行数字PCR扩增反应;

[0055] 可选的,数字PCR扩增反应条件如表2所示:

[0056] 表2

	第一步	第二步		第三步	第四步
[0057]	95℃	95℃	60℃	98℃	4℃
	5min	10 秒	30 秒	10 min	∞
[0058]	—	×40 个循环		—	—

[0059] 优选的,升降温的速度 $\leq 2^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 。

[0060] (4) 读取荧光信号:将扩增后的96孔板置于微滴读取仪中,利用QuantaSoft软件直接进行结果读取和分析;含有扩增产物的阳性微滴与不含扩增产物的阴性微滴会呈现出荧光信号强度的差异,以阴性微滴簇荧光幅度的最高点为界来设定阈值线;按照泊松分布原理自动计算获得微滴PCR反应体系内乙型肝炎病毒DNA的拷贝数。

[0061] 无效结果的判定:每个反应管的总微滴数应 ≥ 8000 ,若总微滴数 < 8000 ,则该反应孔的微滴生成不理想,需重新进行微滴生成。

[0062] 可选的,生成微滴的方法至少包括以下步骤:

[0063] (1) 将微滴生成卡固定在卡托中,取8个微滴数字PCR反应混合液加入到微滴发生卡中间一排的8个孔内;不足8个样品时空孔用20 μL BX ddPCR Buffer Control补足;

[0064] (2) 在微滴发生卡最底下一排8个孔中加入微滴生成油,盖上胶垫;同样不能有空着的孔;

[0065] (3) 将卡托轻轻的平稳放置于微滴生成仪中,开始生成微滴;微滴生成于微滴发生卡最上面一排孔内,将生成的微滴转移至96孔板相应位置孔内;

[0066] (4) 使用封膜仪进行封膜,封好膜之后在96孔PCR仪内进行PCR反应。

[0067] 本发明实施例还涉及一种采用微滴数字PCR检测乙肝病毒核酸的引物和探针,引物和探针的序列包括由SEQ ID NO:1所示的正向引物、由SEQ ID NO:2所示的反向引物、由SEQ ID NO:3所示的探针;探针的两端标记有荧光基团;优选的,SEQ ID NO:3所示核苷酸序列的5'端标记有FAM、3'端标记有BHQ。

[0068] 实施例1引物及探针的设计

[0069] 1、引物、探针设计:

[0070] 从美国国家生物技术信息中心(NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),获得乙型肝炎病毒8个基因型的S基因序列,并在www.ebi.ac.uk/在线分别对8个基因型的S基因序列进行序列比对。针对8种基因型S基因的同源序列,进行适用于ddPCR的特异性引物和的设计。确保乙型肝炎病毒引物、探针序列能检测全部8个基因型序列。利用专业设计软件BeaconDesigner7.0进行特异性引物和探针的设计。

[0071] 本实施例给出了筛选最佳引物的过程,选择用软件设计出的其中几对备选引物进行筛选,备选引物如表3所示。

[0072] 表3

核苷酸序号	名称	核苷酸序列
SEQ ID NO:1	F1	5' -gcgttttatcatcttctctc-3'
SEQ ID NO:4	F2	5' -gcgttttatcatcttctcttcat-3'

SEQ ID NO:2	R1	5'-tggaattagaggacaaacgg-3'
SEQ ID NO:5	R2	5'-tagaggacaaacgggcaacatacc-3'
SEQ ID NO:6	R3	5'-gcaacataccttgatagtccag-3'
SEQ ID NO:3	P	5'-cctgctgctatgcctca-3'

[0074] 2、引物的筛选

[0075] 2.1引物随机配为六对:F1R1、F1R2、F1R3、F2R1、F2R2、F2R3;特异性探针P:5'端荧光报告基因为FAM,3'端淬灭基团为BHQ。

[0076] 2.2然后做荧光定量PCR,PCR体系配方:Takara Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2×) 25μL,正向引物0.018nmol,反向引物0.018nmol,探针0.01nmol,DEPC水15.4μL,模板5μL。

[0077] 荧光PCR的扩增条件为50℃,2min;95℃,3min;95℃,10sec,60℃,60sec收集荧光,共40个循环;结束反应。

[0078] 2.3实验结果如图1所示。

[0079] 根据图1结果分析,选择扩增效果最佳的引物对F1R1。

[0080] 实施例2试剂盒组成

[0081] 本发明实施例试剂盒的具体组成如表4所示:

[0082] 表4:

试剂	组成
[0083] 微滴数字PCR检测试剂	2×QX200 Bio-rad ddPCR™ Supermix for Probes 10μL; 浓度为10μmol/L的正向引物 SEQ ID NO:1 1.3μL、浓度为10μmol/L的反向引物 SEQ ID NO:2 1.3μL、浓度为10μmol/L的探针
	SEQ ID NO:3 0.4μL
[0084] 微滴生成油	Droplet Generation Oil for Probes (#1863005) 购自 BioRad 公司
微滴生成卡	DG8 Cartridges and Gaskets (#1864007) 购自 BioRad 公司
96孔板	购自 BioRad 公司
铝箔热封膜	购自 BioRad 公司

[0085] 实施例3检测方法的建立

[0086] 1、提取待测样本DNA,采用商用市售试剂盒进行提取;

[0087] 2、配制微滴数字PCR反应混合液:将微滴数字PCR检测试剂15μL和样本DNA模板5μL混合,得到微滴数字PCR反应混合液;

[0088] 3、将微滴数字PCR反应混合液和微滴生成油加入微滴生成卡中,置于微滴生成仪中生成微滴,然后进行PCR扩增反应,PCR扩增反应条件如表2所示,其中,升降温的速度≤2℃/秒;

[0089] 具体步骤为:

[0090] 3.1将微滴生成卡固定在卡托中,取8个所述微滴数字PCR反应混合液加入到微滴发生卡中间一排的8个孔内;不足8个样品时空孔用20μL BX ddPCR Buffer Control1补足;

[0091] 3.2在微滴发生卡最底下一排8个孔中加入微滴生成油,盖上胶垫;同样不能有空

着的孔；

[0092] 3.3将卡托放置于微滴生成仪中,开始生成微滴;微滴生成于微滴发生卡最上面一排孔内,将生成的微滴转移至96孔板相应位置孔内;

[0093] 3.4使用封膜仪进行封膜,封好膜之后在96孔PCR仪内进行PCR反应。

[0094] 4、读取荧光信号:将扩增后的96孔板放置于微滴读取仪中,利用QuantaSoft软件直接进行结果读取和分析;含有扩增产物的阳性微滴与不含扩增产物的阴性微滴会呈现出荧光信号强度的差异,以阴性微滴簇荧光幅度的最高点为界来设定阈值线;软件按照泊松分布原理自动计算获得微滴PCR反应体系内乙型肝炎病毒DNA的拷贝数。

[0095] 实施例4灵敏度检测

[0096] 工作标准品制备:以含有乙型肝炎病毒片段的重组牛痘病毒VP-12为模板,利用引物SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:2,扩增出100bp的特异性片断,包含ddPCR扩增靶基因;构建重组质粒,经宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定,并将测序结果与乙型肝炎病毒S基因序列进行同源性分析,其同源性达100%。该重组质粒转化大肠杆菌DH5 α 增殖后用碱裂解法提取,经DNA纯化试剂盒纯化,用分光光度计测A260定量,然后根据公式换算并稀释至 1.0×10^6 copy/mL。-20 $^{\circ}$ C保存,作为工作标准品。

[0097] 将 1.0×10^6 copy/mL的工作标准品用生理盐水稀释至浓度为200 copy/mL、100 copy/mL、50 copy/mL、25 copy/mL、10 copy/mL、5 copy/mL、2 copy/mL;

[0098] 使用本发明实施例试剂盒及检测方法,对每个浓度梯度重复检测25次,确定各浓度下本试剂盒的检出率,确定最低检出限。得到的结果如表5所示。

[0099] 表5

浓度 (copy/mL)	条件		结果	
	重复检测次数	检测出来的次数	检出率 (%)	
2	25	20	80	
5	25	24	96	
10	25	25	100	
25	25	25	100	
50	25	25	100	
100	25	25	100	
200	25	25	100	

[0101] 实验结果显示,本发明实施例试剂盒对5 copy/mL标准品的检出率可达96%,为最低检出限。

[0102] 实施例5重复性检测

[0103] 将实施例4制备得到 1.0×10^6 copy/mL的工作标准品用生理盐水稀释至3个不同的浓度: 2.00×10^4 copy/mL、 2.00×10^3 copy/mL、 2.00×10^2 copy/mL。

[0104] 使用本发明实施例试剂盒及检测方法,对每个浓度的标准品分别用3批试剂盒重复检测10次。通过计算变异系数来判断试剂盒的重复性:以同一浓度样品的定量检测结果

计算变异系数(CV, %) ($CV = \text{STD} / \text{平均值} \times 100\%$, 即分别计算定量检测结果的标准偏差和平均值, 然后用标准偏差除以平均值得到变异系数), 同一批次试剂盒的检测结果用于计算批内重复性。得到的实验结果如表6所示。

[0105] 表6

标准品 (copy/mL)	第一批次			第二批次			第三批次		
	定量结果 log 平均值	标准 偏差	CV%	定量结果 log 平均值	标准 偏差	CV%	定量结果 log 平均值	标准偏 差	CV%
2.00×10^4	2.00×10^4	1.60	0.01%	2.00×10^4	1.61	0.01%	1.99×10^4	1.90	0.03%
2.00×10^3	1.99×10^3	1.01	0.05%	1.99×10^3	1.14	0.06%	1.99×10^3	1.66	0.08%
2.00×10^2	2.02×10^2	2.27	1.12%	2.01×10^2	2.31	1.15%	1.99×10^2	2.58	1.30%

[0107] 实验结果显示, 本发明实施例试剂盒检测的三个浓度的标准品的变异系数(CV%)均小于5%。

[0108] 本发明虽然以较佳实施例公开如上, 但并不是用来限定权利要求, 任何本领域技术人员在不脱离本发明构思的前提下, 都可以做出若干可能的变动和修改, 因此本发明的保护范围应当以本发明权利要求所界定的范围为准。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 苏州云泰生物医药科技有限公司
- [0003] 武汉百泰基因工程有限公司
- [0004] <120> 用于定量检测乙型肝炎病毒的微滴数字PCR试剂盒及检测方法
- [0005] <160> 10
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 19
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] gcgttttatac atcttctc 19
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] tggaattaga ggacaaacgg 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 17
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] cctgctgcta tgcctca 17
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 24
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] gcgttttatac atcttctct tcat 24
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 24
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] tagaggacaa acgggcaaca tacc 24
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 22

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0041] <400> 6
[0042] gcaacatacc ttgatagtcc ag 22
[0043] <210> 7
[0044] <211> 20
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0047] <400> 7
[0048] ggcgttttat catcttcctc 20
[0049] <210> 8
[0050] <211> 19
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0053] <400> 8
[0054] gaggaagatg ataaaacgc 19
[0055] <210> 9
[0056] <211> 21
[0057] <212> DNA
[0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0059] <400> 9
[0060] ctggaattag aggacaaacg g 21
[0061] <210> 10
[0062] <211> 20
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0065] <400> 10
[0066] ccgtttgtcc tctaattcca 20

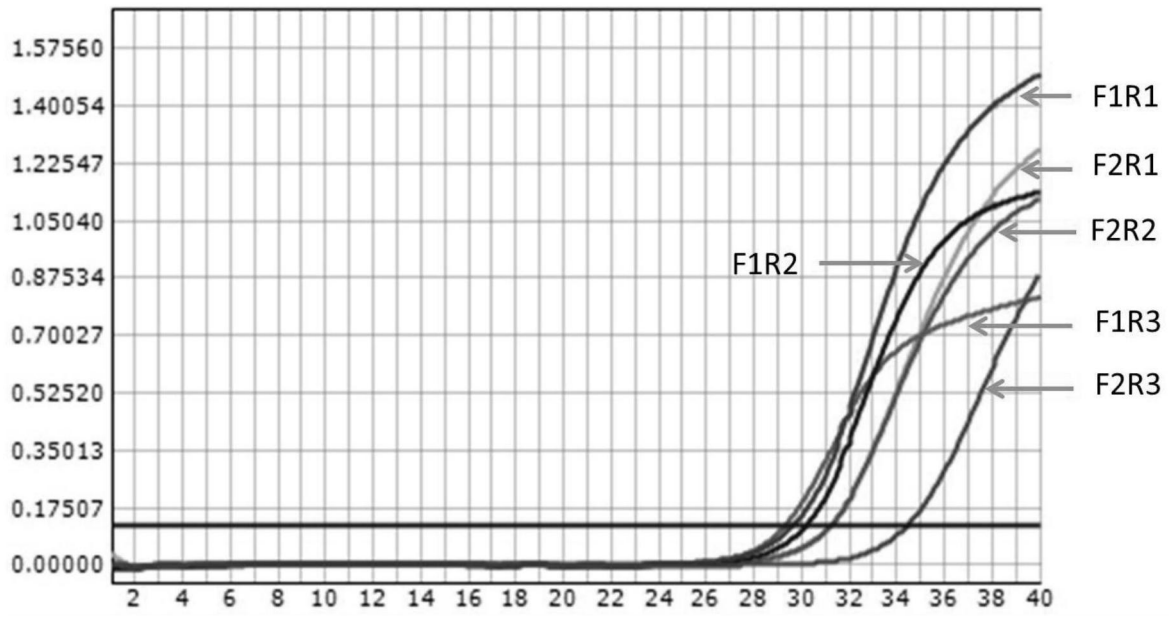


图1