



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106381344 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610807133.9

(22)申请日 2016.09.07

(71)申请人 林勤

地址 361003 福建省厦门市思明区镇海路  
55号

申请人 胡斌 孙鸣 洪国焱

(72)发明人 林勤 胡斌 孙鸣 洪国焱

骆启聪 廖希一 王紫晶

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11363

代理人 逯长明 许伟群

(51)Int. Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12R 1/93(2006.01)

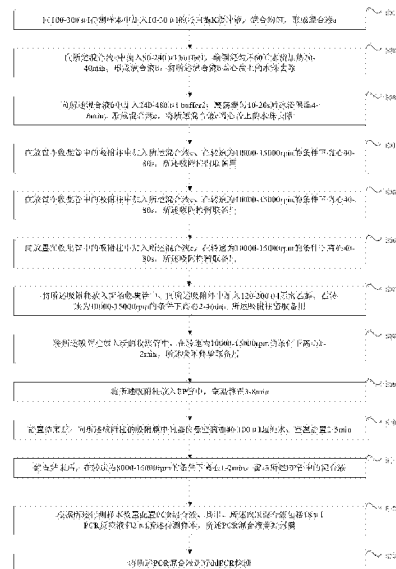
权利要求书2页 说明书7页  
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测  
试剂盒及使用方法

(57)摘要

本发明提供一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒及使用方法,试剂盒包括DNA抽提缓冲液、PCR引物及探针、PCR反应液和EBV阴、阳性对照。使用本发明提供的试剂盒进行ddPCR检测时,能有效排除PCR设备、标准品等影响,进而实现高灵敏绝对定量。本发明提供的EBV DNA定量检测试剂盒通过ddPCR技术能够对血清、血浆中的EBV进行高灵敏精确定量,为EBV相关疾病的诊断和疗效监测提供参考依据。本发明还通过ddPCR确立EBV DNA国际标准物质的国际单位与常用单位之间的函数关系为1IU/ml=2.5Copy/ml,实现EBV DNA国际溯源,实现检测结果和定量单位的国际可比性。



1. 一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括DNA抽提缓冲液、PCR引物及探针、PCR反应液和EBV阴、阳性对照,其中,

所述DNA抽提缓冲液包括蛋白酶K缓冲液、buffer1、buffer2、buffer3和buffer4;

所述buffer1包括Tris-HCl、EDTA和盐酸胍;所述buffer2包括异丙醇、Tris-HCl和EDTA;所述buffer3和buffer4分别包括浓度均不同的无水乙醇、Tris-HCl和EDTA;

所述PCR反应液包括5×PCR反应缓冲液,0.8-1.2mmol/L脱氧核糖核苷三磷酸,1-7U/μl H-Taq DNA聚合酶;

所述PCR引物及探针包括700nmol/L-1.0μmol/L用于扩增靶多核苷酸的上下游引物和0.2mol/L-0.5μmol/L用于检测靶多核苷酸的探针;

所述用于检测靶多核苷酸的探针的碱基对序列为:

5' FAM-CACACACTACACACACCCACCCGTCTC-BHQ1 3'。

2. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述用于扩增靶多核苷酸的上下游引物的碱基序列为:

上游引物:5' -CCCAACTCCACCACACC-3' ;

下游引物:5' -TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG-3'。

3. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述蛋白酶K缓冲液包括浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl,浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA和浓度为10ug/ml的所述蛋白酶K,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

4. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述buffer1包括浓度为40-70mmol/L的所述Tris-HCl,浓度为2.0-4.0mmol/L的所述EDTA和浓度为4.0-6.0mol/L的所述盐酸胍,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

5. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述buffer2包括浓度为30%-60%的所述异丙醇,浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

6. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述buffer3包括浓度为50%-60%的所述无水乙醇,浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

7. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述buffer4包括浓度为60%-70%的所述无水乙醇,浓度为8-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为0.5-2.0mmol/L的所述EDTA,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为8.0。

8. 根据权利要求1所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,其特征在于,所述EBV阴性对照为阴性人造血清,所述EBV阳性对照为B958细胞培养上清。

9. 一种如权利要求1-8中任意一项所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述使用方法包括:

向100-300μl待测样本中加入10-30μl的蛋白酶K缓冲液,混合均匀,形成混合液a;

向所述混合液a中加入80-240μl buffer1,颠倒混匀后60℃水浴加热20-40min,形成混合液b,将所述混合液b离心盖上的水珠去除;

向所述混合液b中加入240-480μl buffer2,震荡混匀10-20s后冰浴保温4-6min,形成混合液c,将所述混合液c离心盖上的水珠去除;

向放置在收集管中的吸附柱中加入所述混合液c,在转速为10000-15000rpm的条件下离心40-80s,所述吸附柱留取备用;

将所述吸附柱放入所述收集管中,向所述吸附柱中加入80-150 $\mu$ l buffer3,在转速为6000-12000rpm的条件下离心40-80s,所述吸附柱留取备用;

将所述吸附柱放入所述收集管中,向所述吸附柱中加入100-200 $\mu$ l buffer4,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,所述吸附柱留取备用;

将所述吸附柱放入新的收集管中,向所述吸附柱中加入120-200 $\mu$ l无水乙醇,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,所述吸附柱留取备用;

将所述吸附柱放入新的收集管中,在转速为10000-15000rpm的条件下离心1-2min,所述吸附柱留取备用;

将所述吸附柱放入EP管中,室温静置3-8min;

静置结束后,向所述吸附柱的吸附膜中间部位悬空滴加40-100 $\mu$ l超纯水,室温静置2-5min;

静置结束后,在转速为8000-15000rpm的条件下离心1-2min,留取所述EP管中的混合液;

根据所述待测样本数量配置PCR混合液,其中,所述PCR混合液包括18 $\mu$ l PCR反应液和2 $\mu$ l所述待测样本,所述PCR混合液盖好封膜;

将所述PCR混合液进行ddPCR检测。

10. 根据权利要求9所述的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述ddPCR检测包括:

将所述PCR混合液进行微滴化处理,将处理后的体系转移到PCR板中,封膜后进行PCR扩增反应。

## 一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒及使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及DNA检测领域,具体涉及一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒及使用方法。

### 背景技术

[0002] EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)又称人类疱疹病毒VI型(Human herpesvirus type4),属于 $\gamma$ 疱疹病毒亚科淋巴滤泡病毒属,在人群的携带率高达90%以上,且EBV一旦感染将终身携带。EBV主要感染人类鼻咽上皮细胞和B淋巴细胞,研究表明EBV初次感染后就终身定居人类B淋巴细胞中。EBV相关疾病范围较广,大致分为血液系统和非血液系统两大类。EBV相关血液系统疾病主要包括传染性单核细胞增多症(Infected mononucleosis)、burkitt淋巴瘤、原发性淋巴瘤、T细胞淋巴瘤等;EBV相关非血液系统疾病主要包括胃癌、鼻咽癌、肺癌、平滑肌肉瘤等,因此EBV的检测对EBV相关疾病的诊断和治疗意义重大。

[0003] 目前的学术观点认为EBV DNA的存在形式有三种:①EBV DNA存在于完整EB病毒粒子的病毒基因组中;②游离的环状或线状EBV DNA;③游离EBV DNA。由于EBV DNA的存在形式有三种,因此,提取EBV DNA对于EBV的检测具有重要的影响。目前,EBV DNA提取的常用方法为煮沸裂解法、酚-氯仿法、磁珠法和亲和层析法。煮沸裂解法需要反复加热,容易发生爆管并产生污染;酚-氯仿法操作繁琐,对设备和人员操作要求高,低病毒载量的标本检出率低,且所用试剂具有一定的毒性;磁珠法对于片段大小在82-181bp的小分子片段抽提效果不好;亲和层析法操作繁琐,需要频繁换离心管,但是抽提效率高。而对于三种存在形式的EBV DNA,现有的EBV检测试剂盒并不能完全将DNA提取出来,进而影响EBV的检测。

[0004] 诊断EBV的方法通常为免疫学方法和分子生物学,其中,免疫学方法主要包括采用ELISA(enzyme linked immunosorbent assay,酶联免疫吸附试验)检测血清中特异性EBV抗体;分子生物学方法主要通过RTFQ PCR(realtime fluorescence quantitative Polymerase Chain Reaction,荧光定量PCR)技术对样本中EBV DNA载量进行定性或定量检测。ELISA的试剂成本低,需要待测血清用量少,已作为临床上主要的筛查方法;但ELISA存在诊断灵敏度低、特异性较差的缺点,因而不能对EBV相关疾病的筛查起到早期预警或早期诊断的目的,同时,也不能用于疾病治疗的疗效观察及预后预测。RTFQ PCR能够定量检测EBV的DNA,RTFQ PCR定量检测时,定量检测的结果影响因素包括DNA抽提、目的基因选取、引物和探针设计、PCR设备、预混酶试剂成分、循环数及标准品选择等,因此,RTFQ PCR的定量检测结果影响因素众多,不易标准化,从而从多方面影响定量结果。

### 发明内容

[0005] 本发明提供一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒及使用方法,使用本发明提供的试剂盒能够解决现有检测试剂盒检测效果较差、灵敏度低的问题;同时对EBV DNA的抽提方法及PCR扩增过程进行标准化,实现检测结果和定量单位的国际可比性。

[0006] 本发明提供一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,所述试剂盒包括

DNA抽提缓冲液、PCR引物及探针、PCR反应液和EBV阴、阳性对照,其中,

[0007] 所述DNA抽提缓冲液包括蛋白酶K缓冲液、buffer1、buffer2、buffer3和buffer4;

[0008] 所述buffer1包括Tris-HCl、EDTA和盐酸胍;所述buffer2包括异丙醇、Tris-HCl和EDTA;所述buffer3和buffer4分别包括浓度均不同的无水乙醇、Tris-HCl和EDTA;

[0009] 所述PCR反应液包括5×PCR反应缓冲液,0.8-1.2mmol/L脱氧核糖核苷三磷酸,1-7U/ $\mu$ l H-Taq DNA聚合酶;

[0010] 所述PCR引物及探针包括700nmol/L-1.0 $\mu$ mol/L用于扩增靶多核苷酸的上下游引物和0.2mol/L-0.5 $\mu$ mol/L用于检测靶多核苷酸的探针;所述用于检测靶多核苷酸的探针的碱基对序列为:

[0011] 5' FAM-CACACACTACACACACCCACCCGTCTC-BHQ1 3'。

[0012] 优选地,所述用于扩增靶多核苷酸的上下游引物的碱基序列为:

[0013] 上游引物:5' -CCCAACTCCACCACACC-3' ;

[0014] 下游引物:5' -TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG-3' 。

[0015] 优选地,所述蛋白酶K缓冲液包括浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl,浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA和浓度为10ug/ml的所述蛋白酶K,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

[0016] 优选地,所述buffer1包括浓度为40-70mmol/L的所述Tris-HCl,浓度为2.0-4.0mmol/L的所述EDTA和浓度为4.0-6.0mol/L的所述盐酸胍,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

[0017] 优选地,所述buffer2包括浓度为30%-60%的所述异丙醇,浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

[0018] 优选地,所述buffer3包括浓度为50%-60%的所述无水乙醇,浓度为10-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为1.0-3.0mmol/L的所述EDTA,其中,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为7.5。

[0019] 优选地,所述buffer4包括浓度为60%-70%的所述无水乙醇,浓度为8-20mmol/L的所述Tris-HCl和浓度为0.5-2.0mmol/L的所述EDTA,所述Tris-HCl和所述EDTA的pH值均为8.0。

[0020] 优选地,所述EBV阴性对照为阴性人造血清,所述EBV阳性对照为B958细胞培养上清。

[0021] 一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用方法,所述使用方法包括:

[0022] 向100-300 $\mu$ l待测样本中加入10-30 $\mu$ l的蛋白酶K缓冲液,混合均匀,形成混合液a;

[0023] 向所述混合液a中加入80-240 $\mu$ l buffer1,颠倒混匀后60℃水浴加热20-40min,形成混合液b,将所述混合液b离心盖上的水珠去除;

[0024] 向所述混合液b中加入240-480 $\mu$ l buffer2,震荡混匀10-20s后冰浴保温4-6min,形成混合液c,将所述混合液c离心盖上的水珠去除;

[0025] 向放置在收集管中的吸附柱中加入所述混合液c,在转速为10000-15000rpm的条件下离心40-80s,所述吸附柱留取备用;

[0026] 将所述吸附柱放入所述收集管中,向所述吸附柱中加入80-150 $\mu$ l buffer3,在转速为6000-12000rpm的条件下离心40-80s,所述吸附柱留取备用;

[0027] 将所述吸附柱放入所述收集管中,向所述吸附柱中加入100-200 $\mu$ l buffer4,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,所述吸附柱留取备用;

[0028] 将所述吸附柱放入新的收集管中,向所述吸附柱中加入120-200 $\mu$ l无水乙醇,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,所述吸附柱留取备用;

[0029] 将所述吸附柱放入新的收集管中,在转速为10000-15000rpm的条件下离心1-2min,所述吸附柱留取备用;

[0030] 将所述吸附柱放入EP管中,室温静置3-8min;

[0031] 静置结束后,向所述吸附柱的吸附膜中间部位悬空滴加40-100 $\mu$ l超纯水,室温静置2-5min;

[0032] 静置结束后,在转速为8000-15000rpm的条件下离心1-2min,留取所述EP管中的混合液;

[0033] 根据所述待测样本数量配置PCR混合液,其中,所述PCR混合液包括18 $\mu$ l PCR反应液和2 $\mu$ l所述待测样本,所述PCR混合液盖好封膜;

[0034] 将所述PCR混合液进行ddPCR检测。

[0035] 优选地,所述ddPCR检测包括:将所述PCR混合液进行微滴化处理,将处理后的体系转移到PCR板中,封膜后进行PCR扩增反应。

[0036] 本发明的实施例提供的技术方案可以包括以下有益效果:

[0037] 本发明提供一种基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒,所述试剂盒包括DNA抽提缓冲液、PCR引物及探针、PCR反应液和EBV阴性对照,其中,所述缓冲液包括蛋白酶K缓冲液、buffer1、buffer2、buffer3和buffer4;所述buffer1包括Tris-HCl、EDTA和盐酸胍;所述buffer2包括异丙醇、Tris-HCl和EDTA;所述buffer3和buffer4分别包括浓度均不同的无水乙醇、Tris-HCl和EDTA;所述PCR反应液包括5 $\times$ PCR反应缓冲液,0.8-1.2mmol/L脱氧核糖核苷三磷酸,1-7U/ $\mu$ l H-Taq DNA聚合酶;PCR引物及探针、700nmol/L-1.0 $\mu$ mol/L用于扩增靶多核苷酸的上下游引物和0.2mol/L-0.5 $\mu$ mol/L用于检测靶多核苷酸的探针;所述用于检测靶多核苷酸的探针的碱基对序列为:5' FAM-CACACACTACACACACCCACCCGCTCTC-BHQ1 3'。同时,本发明还提供了基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用方法。本发明提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒通过蛋白酶K缓冲液将样本中的蛋白质降解,通过温和的化学裂解液buffer1将样本中的DNA和RNA完全裂解出来,进而通过buffer2、buffer3和buffer4分步层析出全部形式存在的DNA和RNA,提高EBV DNA的纯度,进而提高EBV DNA定量检测试剂盒的灵敏度;同时选取国际组织推荐的EBV定量扩增区域(BamHI-W区域)的上下游引物和探针,通过PCR反应液将所选取的上下游引物和探针进行扩增,进而提高EBV DNA定量检测试剂盒的特异性。本发明提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒在使用时,将制备好的待测样本进行ddPCR检测,由于ddPCR只与DNA的提取和目的基因的选取有关,因此,使用ddPCR对所提取的EBV DNA进行扩增,能够有效排除PCR设备、扩增效率、标准品以及干扰物质、预混酶试剂成分等的影响,进而实现绝对定量,使待测结果更加准确。本发明提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒通过ddPCR技术能够对血清、血浆样品中的EBV进行精确定量,为EBV相关疾病的诊断和疗效监测提供参考依据。本

发明还通过ddPCR技术确立EBVDNA国际标准物的国际单位IU与常用单位Copy/ml之间的函数关系,实现EBV DNA定量的国际可比性。本发明通过DNA抽提、目的基因选择、ddPCR绝对定量及EBV DNA国际标准品等实现EBV DNA定量检测的标准化和国际溯源。

[0038] 应当理解的是,以上的一般描述和后文的细节描述仅是示例性和解释性的,并不能限制本发明。

## 附图说明

[0039] 图1是本发明实施例中提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用方法流程图;

[0040] 图2是本发明实施例中提供的ddPCR对EBV DNA国际标准物质的检测结果图。

## 具体实施方式

[0041] 这里将详细地对示例性实施例进行说明,其示例表示在附图中。下面的描述涉及附图时,除非另有表示,不同附图中的相同数字表示相同或相似的要素。以下示例性实施例中所描述的实施方式并不代表与本发明相一致的所有实施方式。相反,它们仅是与如所附权利要求书中所详述的、本发明的一些方面相一致的装置的例子。

[0042] 本说明书中的各个实施例均采用递进的方式描述,各个实施例之间相同相似的部分互相参见即可,每个实施例重点说明的都是与其它实施例的不同之处。

[0043] 实施例一

[0044] 本发明实施例提供的基于ddPCR(Droplet digital PCR,微滴数字PCR)的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒包括DNA抽提缓冲液、PCR引物及探针、PCR反应液和EBV阴、阳性对照。

[0045] 其中,DNA抽提缓冲液包括蛋白酶K缓冲液、buffer1(缓冲液)、buffer2、buffer3和buffer4;PCR反应液包括5×PCR反应缓冲液,浓度为0.8-1.2mmol/L的脱氧核糖核苷三磷酸,浓度为1-7U/μl的H-Taq DNA聚合酶(Thermusaquaticus,H-耐热DNA聚合酶);PCR引物及探针包括浓度为700nmol/L-1.0μmol/L的用于扩增靶多核苷酸的上下游引物和浓度为0.2mol/L-0.5μmol/L的用于检测靶多核苷酸的探针;EBV阴性对照为阴性人造血清,EBV阳性对照为B958细胞培养上清。

[0046] 在本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒中,在EBV基因组的保守区域内BamHI-W内选取用于检测靶多核苷酸的探针的碱基对序列及扩增靶多核苷酸的上下游引物的碱基序列,进而提高EBV DNA定量检测试剂盒的特异性。在本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒中,EBV基因组的保守区域内BamHI-W的基因序列为:CCCAACTCCACCACACCCAGGCACACACTACACACACCCACCCGTCTCAGGGTCCCCTCGGACAGCTCCTAAGAAGGCACCGGTCGCCAGTCCTACCAGAGGGGCCAAGAACCCAGACGAGTCCGTAGAAGGGTCTC;所选取的用于检测靶多核苷酸的探针的碱基对序列为:5' FAM-CACACTACACACACCCACCCGTCTC-BHQ1 3';用于扩增靶多核苷酸的上下游引物的碱基序列为:

[0047] 上游引物:5' -CCCAACTCCACCACACC-3' ;

[0048] 下游引物:5' -TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG-3' 。

[0049] 进一步,蛋白酶K缓冲液包括浓度为10-20mmol/L的Tris-HCl(Tris

(hydroxymethyl) aminomethane, 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐), 浓度为1.0-3.0mmol/L的EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, 乙二胺四乙酸) 和浓度为10ug/ml的蛋白酶K, 其中, Tris-HCl和EDTA的pH值均为7.5。

[0050] buffer1包括Tris-HCl、EDTA和盐酸胍, 其中, Tris-HCl的浓度为40-70mmol/L, EDTA的浓度为2.0-4.0mmol/L, 盐酸胍的浓度为4.0-6.0mol/L, Tris-HCl和EDTA的pH值均为7.5。

[0051] buffer2包括异丙醇、Tris-HCl和EDTA, 其中, 异丙醇的浓度为30%-60%, Tris-HCl的浓度为10-20mmol/L和EDTA的浓度为1.0-3.0mmol/L, 其中, Tris-HCl和EDTA的pH值均为7.5。

[0052] buffer3和buffer4的成分均为无水乙醇、Tris-HCl和EDTA, 其中, buffer3包括浓度为50%-60%的无水乙醇, 浓度为10-20mmol/L的Tris-HCl和浓度为1.0-3.0mmol/L的EDTA, 其中, Tris-HCl和EDTA的pH值均为7.5; buffer4包括浓度为60%-70%的无水乙醇, 浓度为8-20mmol/L的Tris-HCl和浓度为0.5-2.0mmol/L的EDTA, Tris-HCl和EDTA的pH值均为8.0。

[0053] 本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒通过缓冲液中的蛋白酶K缓冲液将待测样本中的蛋白质进行降解, 通过温和的化学裂解液buffer1将待测样本中的DNA和RNA完全裂解出来, 进而通过buffer2、buffer3和buffer4分步层析出全部的各种存在形式的DNA和RNA, 提高EBV DNA的纯度, 进而提高EBV DNA定量检测试剂盒的灵敏度。同时通过在EBV保守区域内选取用于扩增靶多核苷酸的上下游引物和用于检测靶多核苷酸的探针, 通过PCR反应液对所选取的上下游引物和探针进行扩增, 进而提高EBV DNA定量检测试剂盒的特异性。

[0054] 实施例二

[0055] 本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒能够应用于检测血浆、血清样本中EBV DNA的含量, 检测的操作具体步骤如下:

[0056] 一、待测样本准备

[0057] 1、血浆样本准备

[0058] 在转速为2000r/min的条件下, 将EDTA抗凝全血在2h内离心分离3min, 取分离后的上清液, 上清液在转速为20000g/min的条件下离心10min以去除破碎的细胞碎片, 收取上清液得到血浆样本, 若血浆样本暂时不使用, 则将血浆样本于-20℃条件下冷冻保存, 备用。

[0059] 2、血清样本准备

[0060] 将新鲜的EDTA抗凝全血常温静置30min后在转速为20000g/min的条件下离心分离3min, 取分离后的上清液, 该上清液为血清样本, 若血清样本暂时不使用, 则将血清样本于-20℃条件下冷冻保存, 备用。

[0061] 二、测样样本处理

[0062] S01: 将100-300μl待测样本中加入到EP (Epoxy resin, 环氧树脂) 管中, 向EP管中加入10-30μl蛋白酶K缓冲液, 混合均匀后形成混合液a;

[0063] S02: 向混合液a中加入80-240μl buffer1, 充分颠倒混匀后在60℃水浴中加热20-40min形成混合液b, 加热结束后将离心盖上的水珠去除;

[0064] S03: 向混合液b中加入240-480μl buffer2, 充分震荡混匀10-20s后冰浴保温4-



6min,形成混合液c,冰浴保温结束后将离心盖上的水珠去除;

[0065] S04:将吸附柱套入到收集管中后,将混合液c加入到吸附柱中,在转速为10000-15000rpm的条件下离心40-80s,离心结束后弃除收集管中的废液,吸附柱留取备用;

[0066] S05:将吸附柱放入收集管中,向吸附柱中加入80-150 $\mu$ l buffer3,在转速为6000-12000rpm的条件下离心40-80s,离心结束后弃除收集管中的废液,吸附柱留取备用;

[0067] S06:将吸附柱放入收集管中,向吸附柱中加入100-200 $\mu$ l buffer4,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,离心结束后弃除收集管中的废液,吸附柱留取备用;

[0068] S07:将吸附柱放入新的收集管中,向吸附柱中加入120-200 $\mu$ l无水乙醇,在转速为10000-15000rpm的条件下离心2-4min,离心结束后弃除收集管中的废液,吸附柱留取备用;

[0069] S08:将吸附柱放入新的收集管中,在转速为10000-15000rpm的条件下离心1-2min,离心结束后弃除收集管中的废液,吸附柱留取备用;

[0070] S09:将吸附柱放入干净的EP管中,室温静置3-8min;

[0071] S10:静置结束后,向吸附柱的吸附膜中间部位悬空滴加40-100 $\mu$ l超纯水,室温静置2-5min;

[0072] S11:静置结束后,在转速为8000-15000rpm的条件下离心1-2min,留取EP管中的混合液,若混合液暂时不用,则将混合液于-20 $^{\circ}$ C条件下冷冻保存,备用;

[0073] S12:根据待测样本数量配置PCR混合液,其中,PCR混合液包括18 $\mu$ l PCR反应液和2 $\mu$ l待测样本,阴性对照中还需要加入2 $\mu$ lDDW(deuterium depleted water,超轻水),将配置好的PCR混合液盖好封膜;

[0074] S13:将封膜后的PCR混合液进行微滴化处理,并将微滴化处理后的体系转移到96孔PCR板中,96孔PCR板封膜后进行ddPCR扩增反应。

[0075] 三、ddPCR反应

[0076] 1、将PCR反应管放入扩增仪样品槽,按对应顺序设置待测样品名称和阴、阳性对照。

[0077] 2、荧光检测通道选择:选择FAM(Reportere:FAM,Quencher:None)检测通道。

[0078] 3、ddPCR反应条件请参见表1:

[0079] 表1:ddPCR反应条件

	步骤	温度	时间	循环数
	1 预变性	94 $^{\circ}$ C	10分钟	1
[0080]	2 变性	94 $^{\circ}$ C	15 秒	45
	3 退火,延伸,及荧光采集	60 $^{\circ}$ C	60 秒	
	4 仪器冷却	25 $^{\circ}$ C	10 秒	1

[0081] 四、结果分析

[0082] 反应结束后,利用检测仪器自带软件进行自动分析,记录出待测样本的绝对定量数,绝对定量数单位为Copy/ $\mu$ l。

[0083] 目前,国际上已有EBV DNA的国际标准物(NIBSC code:09/260),本发明实施例提供了使用ddPCR技术对EBV DNA国际标准物进行检测的测定试验,根据测定试验能够得到

EBV DNA的国际标准品量值与绝对定量数之间的函数关系,所得结果请参考附图2。

[0084] 从附图2中能够得知,使用本发明实施例提供的ddPCR技术对EBV DNA国际标准物进行检测的检测结果为 $1.25 \times 10^4$ Copy/u1,而EBV DNA国际标准物的国际标准品量值为 $5.0 \times 10^3$ IU/u1,因此,EBV DNA的国际标准品量值与绝对定量数之间存在的函数关系为 $5.0 \times 10^3$ IU/u1= $1.25 \times 10^4$ Copy/u1,即1IU/u1=2.5Copy/u1。在本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒的使用中,通过EBV DNA国际标准品应用到ddPCR的定量检测中,能够实现高灵敏度、标准化的EBV DNA定量检测,实现EBV DNA定量的国际可比性。

[0085] 本发明实施例还对已经确诊但还没有治疗的非角化型鼻咽癌患者血浆进行检测,检测结果请参考表2。

[0086] 表2:鼻咽癌患者血浆检测结果

[0087]

分组	例数	中位数 (IU/ml)	检出率 (%)
鼻咽癌组	67	1250	100
对照组	75	0	0

[0088] 从表2中能够看出,本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒能够对非角化型鼻咽癌进行检测,且阳性率为100%。

[0089] 同时,本发明实施例还对正常人血浆样本、血清样本、HAV、HBV、HCV、HEV、HIV-1和HCMV感染样本进行检测,检测结果均为阴性,且阴性符合率为100%。结合对非角化型鼻咽癌患者血浆的检测结果可知,本发明实施例提供的基于ddPCR的高灵敏EBV DNA定量检测试剂盒具有良好的特异性。

[0090] 以上所述仅是本发明的具体实施方式,使本领域技术人员能够理解或实现本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

## SEQUENCE LISTING

<110> 胡斌

<120> 一种基于 ddPCR 的高灵敏 EBV DNA 定量检测试剂盒

<130> --

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

[0001] <211> 19

<212> DNA

<213> Human herpesvirus 4

<400> 1

cccaacactc caccacacc

19

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Human herpesvirus 4

<400> 2

[0002]

cacacactac acacacccac ccgtctc	27
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Human herpesvirus 4	
<400> 3	
tcttaggagc tgtccgaggg	20
<210> 4	
<211> 142	
<212> DNA	
<213> Human herpesvirus 4	
<220>	
<223>	
<400> 4	
cccaacactc caccacacce aggcacacac tacacacacc caccctctc agggtcacct	60
cggacagctc ctaagaaggc accggtcgcc cagtcctacc agagggggcc aagaaccag	120
acgagtcctg agaagggtcc tc	142

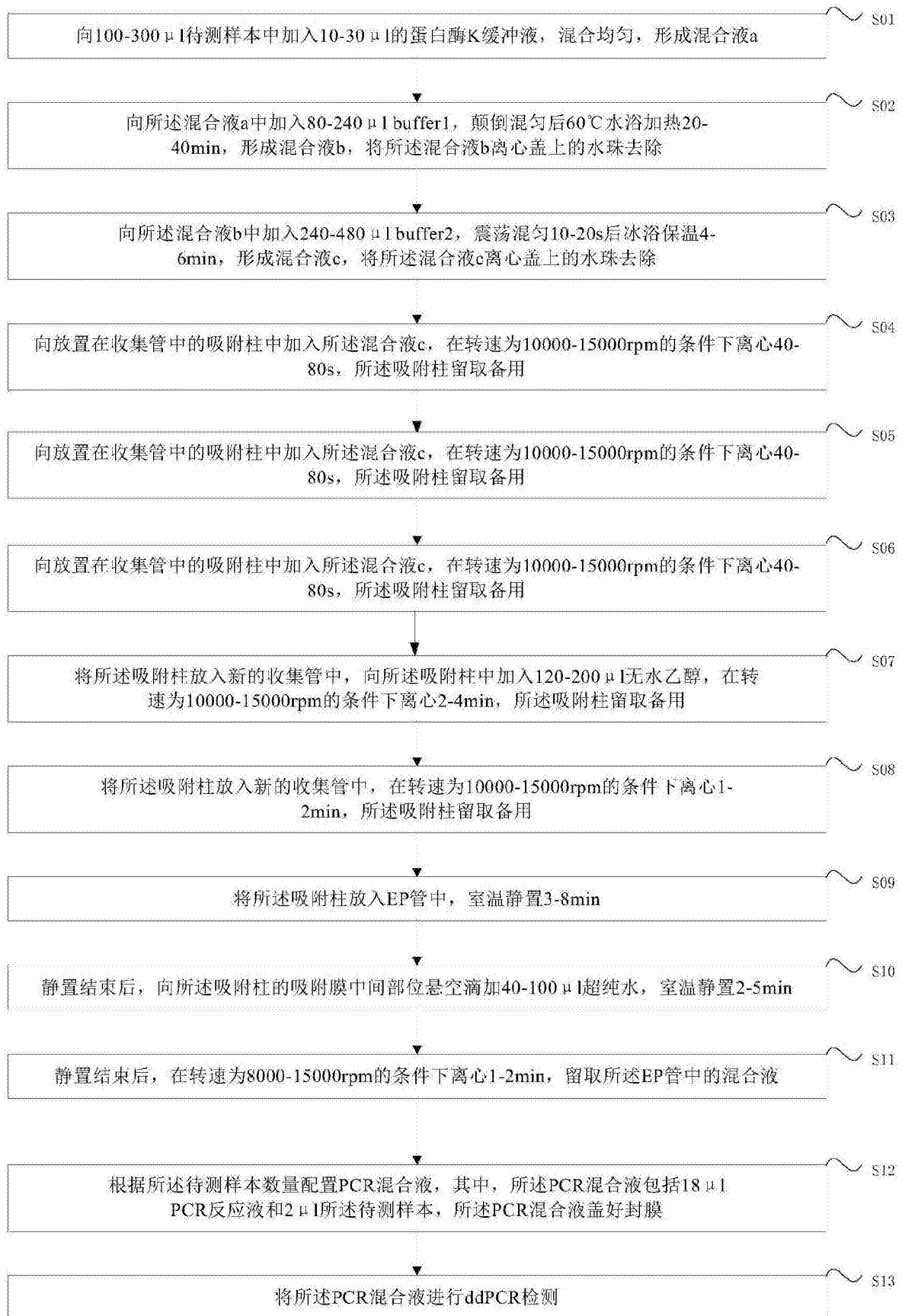


图1

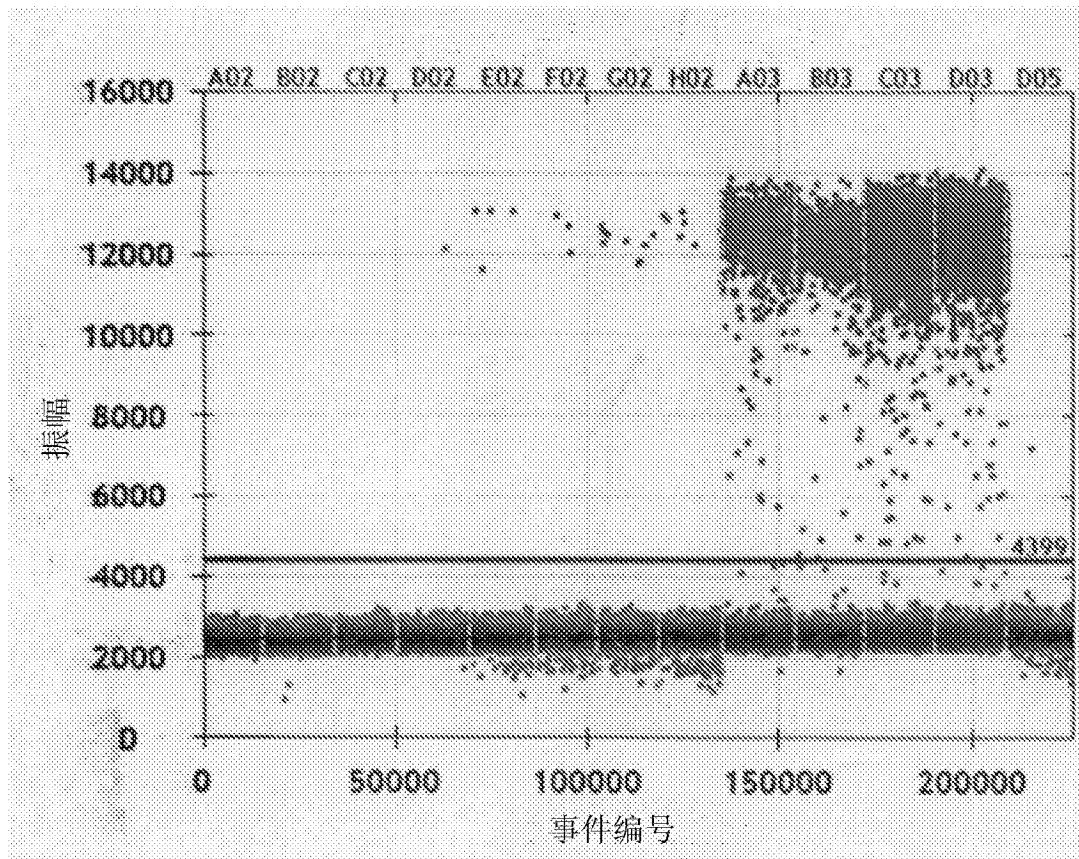


图2