[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910157409.3

[43] 公开日 2010 年 1 月 13 日

[11] 公开号 CN 101624629A

[22] 申请日 2009.7.24
[21] 申请号 200910157409.3
[71] 申请人 上海浩源生物科技有限公司
地址 201703 上海市青浦区沪青平公路 2933 弄 2 幢
[72] 发明人 张文艳 叶成果 龚华斐 杨国翠 李振勇 黄道培
[74] 专利代理机构 北京万科园知识产权代理有限责任公司
代理人 张亚军 孙张岩
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 4 页

[54] 发明名称

单管中多重靶核酸的 PCR 检测方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及在单个 PCR 反应容器中多重检测样品中一种或几种靶核酸的实时 PCR 方法，其包括，(1)在所述单个 PCR 反应容器中混合样品、DNA 聚合酶、dNTP、内对照核酸、靶核酸引物对、内对照核酸引物对、一种或几种靶核酸探针和内对照核酸探针，其中前述各种探针标记有荧光基团和淬灭基团，而且各种探针标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同；(2)进行 PCR 反应，并实时检测不同波长的荧光；和(3)根据荧光检测结果计算出的 Ct 值判断是否有一种或几种靶核酸存在于样品中。另外，本发明还涉及用于上述方法的检测试剂盒和相应检测试剂盒的制备应用等。该多重检测方法无需专门设备，因此可广泛用于实验室研究、食品安全、医药卫生等众多领域。

1，在单个 PCR 反应容器中多重检测样品中一种或几种靶核酸的实时 PCR 方法，其包括，

（1）在所述单个 PCR 反应容器中混合样品、DNA 聚合酶、dNTP、内对照核酸、靶核酸引物对、内对照核酸引物对、一种或几种靶核酸探针和内对照核酸探针，其中前述各种探针标记有荧光基团和淬灭基团，而且各种探针标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同；

（2）进行 PCR 反应，并实时检测不同波长的荧光；

（3）根据荧光检测结果计算出的 Ct 值判断是否有一种或几种靶核酸存在于样品中。

2，前述任一权利要求所述的方法，其中在步骤（1）中所述单个 PCR 反应容器中还进一步混合有反转录酶。

3，前述任一权利要求所述的方法，其中靶核酸优选有一种、两种或三种，其中每种靶核酸分别是 RNA 或 DNA，优选是病原体 RNA 或 DNA，更优选是病毒 RNA 或 DNA，最优选是 HCV RNA、HIV RNA 或 HBV DNA。

4，前述任一权利要求所述的方法，其中样品是经过磁珠提取法处理过的样品。

5，前述任一权利要求所述的方法，其中内对照核酸是新霉素抗药性基因或其片段，优选所述基因或其片段被包装在病毒样颗粒内。

6，前述任一权利要求所述的方法，其中各种探针标记有不同的荧光基团。

7，前述任一权利要求所述的方法，其中靶核酸探针的核苷酸序列选自 HCV 的 5’非编码区中的连续序列或其互补序列、HIV 的 gag 基因中的连续序列或其互补序列、和 HBV 的编码 S 抗原的基因中的连续序列或其互补序列。

8，前述任一权利要求所述的方法，其中 PCR 反应的每个循环的条件为 94℃10 秒、50℃10 秒以及 65℃45 秒。

9，前述任一权利要求所述的方法，其中一种靶核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值≤45，则这种靶核酸存在于样品中；一种靶核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值>45，而且相应内对照核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值<30，则这种靶核酸不存在于样品中。

10，用于权利要求 1 所述方法的检测试剂盒，其包括 DNA 聚合酶、dNTP、内对照核酸、靶

核酸引物对、内对照核酸引物对、一种或几种靶核酸探针和内对照核酸探针，其中前述各种探针标记有荧光基团和淬灭基团，而且各种探针标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同。

11，前述任一权利要求所述的检测试剂盒，其中还进一步包括反转录酶。

12，前述任一权利要求所述的检测试剂盒，其中还进一步包括磁珠提取法所需试剂。

13，前述任一权利要求所述的检测试剂盒，其中内对照核酸是新霉素抗药性基因或其片段，优选所述基因或其片段被包装在病毒样颗粒内。

14，前述任一权利要求所述的检测试剂盒，其中各种探针标记有不同的荧光基团；其中靶核酸探针的核苷酸序列选自 HCV 的 5’非编码区中的连续序列或其互补序列、HIV 的 gag 基因中的连续序列或其互补序列、和 HBV 的编码 S 抗原的基因中的连续序列或其互补序列；和/或，其中内对照核酸探针的核苷酸序列选自新霉素抗药性基因中的连续序列或其互补序列。

15，前述任一权利要求所述的检测试剂盒在制备用于前述任一权利要求所述的方法的检测试剂产品中的应用。

单管中多重靶核酸的 PCR 检测方法及其试剂盒

技术领域

本发明属于核酸检测技术领域，具体而言，本发明涉及在单个 PCR 反应容器中多重检测样品中靶核酸的 PCR 方法。另外，本发明还涉及上述 PCR 方法中所涉及的试剂，如内对照、引物、探针等，以及用于上述方法的检测试剂盒和相应检测试剂盒的制备应用等。

背景技术

聚合酶链反应（PCR）是当今核酸检测中最常用的技术之一，其中实时（Real Time）PCR 技术采用了诸如荧光标记等可实时检测的标记，在核酸检测、临床诊断及分子生物学研究等方面的功用显得越来重要。这类技术目前应用领域非常广泛，已经在实验室研究、食品安全、医药卫生等众多行业中得以使用了。除了常规的实时 PCR 检测，近年来人们对实时 PCR 检测也做了大量改进工作。例如，中国专利申请 CN1768151A、CN101189505A、CN101273262A、CN101302473A 等均记载了对传统的实时 PCR 的改进。但是，传统和改进的实时 PCR（尤其是实时荧光 PCR）在进行实际样品的检测时，即使仅检测单一靶核酸，也必须面对样品中可能存在的多种核苷酸对检测结果的干扰；当在单个 PCR 反应容器中进行多重靶核酸检测（即同时检测多种靶核酸）时，由于要同时引入检测不同种靶核酸的引物和探针，因此还进一步需要面对不同的引物和探针的相互干扰的问题。而面对这些难题，现有技术中往往采用操作复杂、成本高的处理手段，甚至某些无法引入内对照监测系统来排除假阴性，或者引入的内对照（分子）本身（通常是核酸）进一步加剧了与多种靶核酸、引物及其探针之间的相互干扰。

为了克服现有技术的不足，经过长期艰苦努力，本发明人令人惊讶地通过优选结果判别方法、优化样品处理方法、选择内对照基因并任选包装成病毒样颗粒、和/或筛选出了引物和不同波长区域的荧光标记的探针，开发出了在单个 PCR 反应容器（如，单个 PCR 反应管）中多重检测样品中靶核酸的 PCR 方法，克服了实时荧光 PCR 开发中普遍遇到的多重引物/探针容易交叉污染及灵敏度相对低的技术难点，而且对于单管检测，操作方便并节省成本，同时采用全程内对照监控系统，保证试验的准确性。经过大量样本的验证，结果可靠，而且使

用目前常规的市售实时荧光 PCR 设备，无需改造，就能使其特异性、灵敏度、重复性等技术指标均达到国际先进水平。另外，本发明人还发明了用于上述方法的试剂，如内对照、引物、探针等，以及检测试剂盒和相应检测试剂盒的制备应用等。

发明内容

本发明的目的在于提供在单个 PCR 反应容器中多重检测样品中靶核酸的实时 PCR 方法，该方法通过优化结果判别方法、优化样品处理方法、优化内对照基因并优化其包装形式、和/或优化出互不干扰的引物、探针以及荧光标记，可以在单个 PCR 反应容器中同时分辨出样品中是否存在的不同种靶核酸，尤其可以同时分辨出 RNA 和 DNA 靶核酸，而无需专门设备或试剂，也无需引入复杂实验步骤，就能得到高特异性、灵敏度和重复性的结果。另外，本发明的目的还在于提供上述方法的检测试剂盒和相应检测试剂盒的制备应用等。

具体而言，在第一方面，本发明提供了在单个 PCR 反应容器中多重检测样品中一种或几种靶核酸的实时 PCR 方法，其包括，

（1）在所述单个 PCR 反应容器中混合样品、DNA 聚合酶、dNTP（即 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP）、内对照核酸、靶核酸引物对、内对照核酸引物对、一种或几种靶核酸探针和内对照核酸探针，其中前述各种探针标记有荧光基团和淬灭基团，而且各种探针标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同；

（2）进行 PCR 反应，并实时检测不同波长的荧光；和

（3）根据荧光检测结果计算出的 Ct 值判断是否有一种或几种靶核酸存在于样品中。

在本发明的第一方面，所述实时 PCR 方法所检测的样品是潜在可能含有靶核酸的离体样品，如食品、血液、血液制品、唾液、医疗用品或药品等。所述实时 PCR 方法仅限于对离体样品的检测，检测的直接结果是靶核酸的存在性与否。即使对于利用本发明的检测方法检测人或动物的血液样品中病原体（如，病毒）上的靶核酸，也只能直接得出靶核酸的存在与否，还需要有经验的医生或取样人员判断检测出的靶核酸是来自于血液中的病原体还是取样时不慎污染的病原体，而不能直接得到疾病的诊断结果或健康状况；即使靶核酸来自于血液中的病原体，也只能说明相应人或动物是相应病原体的携带者，还需要有经验的医生根据相应人或动物的体质、病史、临床症状等综合情况才能判断出是否会造成疾病或对健康状况有影响。优选在本发明的第一方面的方法中，样品是经过预处理而富集了核酸（如靶核酸）的样品，

如样品是经过磁珠提取法处理过的样品。非特异性的磁珠提取法采用表面涂有非特异性核酸吸附类物质的顺磁性颗粒，在低 pH(如，pH 值 5~7)和高盐浓度的情况下核酸可以吸附到顺磁性颗粒表面，在进行磁分离和充分洗涤后，在高 pH(如，pH 值 8~9)、低盐浓度的条件下可将核酸洗脱下来，由此富集了核酸（如靶核酸）的样品可用于 PCR 试验；另外还可以采用特异性吸附（如杂交吸附和免疫吸附）的磁珠提取法。这些处理过程对于本领域技术人员来说是熟知的，也可参见郑秀芬等，模板 DNA 磁珠提取法.中国法医学杂志，18（3）：107-108；中国专利申请 200610030229.5 等。

在本文中，“单个 PCR 反应容器”指所述实时 PCR 方法在技术上是在同一个容器中进行的，没有必要更换容器。最优选其中所述容器是 PCR 反应管，其它可以进行 PCR 反应并可进行实时荧光检测的容器也在本发明的保护范围内。在本发明第一方面的实时 PCR 方法中，在同一个容器中就可以完成 PCR 扩增和实时检测的步骤，整个过程不必更换容器，因而方便了操作者。操作者只需要向容器中加入样品与各种试剂即可，就可以通过市售的普通实时荧光 PCR 仪来自动完成，整个过程操作者只需添加样品和试剂即可，非常方便。尤其是，整个过程只需添加样品和试剂的步骤干预，便于实现全自动操作，如使用中国专利申请 2007100030261 公开的自动微量加液系统（即，吸取和分配实验液体的移液装置及带有该装置的 PCR 仪），即可完成本发明检测方法的全过程自动化，从而节约了人力成本并最大程度降低了人为失误的可能性，因此本发明的检测方法便于自动化所带来的成本和可靠性优势是可以预期的。

在本文中，“多重检测”指的是同时检测的核酸有多种，即至少两种。在本发明的第一方面的方法中，由于至少检测了内对照核酸和一种靶核酸，因此检测的核酸至少有两种。当要检测的靶核酸种类不止一种时，和/或作为内对照的内对照核酸种类不止一种时，则同时检测的核酸相应增加。其中，每种核酸可以是 RNA，也可以是 DNA。在本发明的具体实施方式中，优选进行二重检测、三重检测、四重检测、或五重检测。多种靶核酸中优选既有 RNA 靶核酸，也有 DNA 靶核酸。同样，多种内对照核酸中优选既有 RNA 内对照核酸，也有 DNA 内对照核酸。

优选在本发明的第一方面的方法中，在步骤（1）中所述单个 PCR 反应容器中还进一步混合有 PCR 反应所需的其他试剂，如 pH 缓冲剂和盐。另外，还优选了甘油浓度，用以延长 PCR 条件下酶活耐久力。在本发明的具体实施方式中，pH 缓冲剂优选是 Tris.HCl；盐优选是 KCl。本领域技术人员还可以容易地选择出其他 pH 缓冲剂（如磷酸缓冲液等）来调节到合适的 pH，

也可以容易地选择出其他可溶性盐（如氯化镁等）来调节离子强度。另外，还可以进一步混合有抗氧化剂（还原剂）、蛋白（酶）保护剂（如，牛血清白蛋白（BSA）、人血清白蛋白（HSA）等）。这些成分的选择对于本领域技术人员来说都是熟知的。

优选在本发明的第一方面的方法中，在步骤（1）中所述单个 PCR 反应容器中还进一步混合有反转录酶，例如，常见的反转录酶有禽类成髓细胞病毒（AMV）反转录酶或 Moloney 鼠白血病病毒（MLV）反转录酶。这样，本发明的第一方面的方法除了可以进行常规 PCR 反应（扩增），用以扩增 DNA 类靶核酸和内对照核酸，而且可以进行反转录 PCR（RT-PCR），用以扩增 RNA 类靶核酸和内对照核酸。此时，步骤（2）进行的 PCR 反应就是 RT-PCR 反应。更优选在步骤（1）中所述单个 PCR 反应容器中还混合有 RNA 酶抑制剂，如 RNasin。这样，在 RT-PCR 反应中能防止 RNA 模板降解。

优选在本发明的第一方面的方法中，其中靶核酸优选有一种、两种或三种，其中每种靶核酸分别是 RNA 或 DNA，优选是病原体 RNA 或 DNA，更优选是病毒 RNA 或 DNA，如优选是 HCV（丙型肝炎病毒，其为 RNA 病毒） RNA、HIV（人免疫缺陷病毒，其为 RNA 病毒） RNA 或 HBV （乙型肝炎病毒，其为 DNA 病毒）DNA，最优选是 HCV 的 5’非编码区 RNA、HIV 的 gag 基因 RNA 或 HBV 的编码 S 抗原的基因 DNA。例如，检测的靶核酸可以是 HCV RNA、HIV RNA 和 HBV DNA 中的一种、两种或三种。在本发明的具体实施方式中，靶核酸的示例有 HCV 的 5’非编码区 RNA、HIV 的 gag 基因 RNA 和 HBV 的编码 S 抗原的基因 DNA。

在本发明的第一方面的方法中，内对照核酸是不结合靶核酸探针的核酸，优选是新霉素抗药性基因或其片段，也优选内对照核酸被包装在病毒样颗粒内。内对照核酸的种类优选与靶核酸的种类相同。如，靶核酸是 DNA，则相应的内对照核酸是 RNA；而靶核酸是 RNA，则相应的内对照核酸是 DNA；多种靶核酸中既有 DNA 也有 RNA，则内对照核酸有两种，分别是 DNA 和 RNA，分别用于作为 DNA 和 RNA 类靶核酸的内对照。本发明人经过核酸序列数据库的比对以及长期检测实践，发现新霉素抗药性基因与 HCV 的 5’非编码区 RNA、HIV 的 gag 基因 RNA 和 HBV 的编码 S 抗原的基因 DNA 的序列差别很大，难以互相结合对方的探针，从而难以互相干扰，因而可以用于作为有效排除假阴性结果的对照。优选 DNA 内对照核酸的核苷酸序列包括 Seq ID NO：16 所示的序列或如 Seq ID NO：16 所示；优选 RNA 内对照核酸的核苷酸序列包括 Seq ID NO：17 所示的序列或如 Seq ID NO：17 所示。为了使内

对照核酸更加类似于病原体，优选内对照核酸被包装在病毒样颗粒（包括假病毒）内，优选被包装在噬菌体病毒样颗粒内，如 RNA 内对照核酸可以被包装在 MS2 噬菌体或 TMV 等中，DNA 内对照核酸可以被包装在 M13 噬菌体等中。本领域技术人员已知这些包装技术，如可参见张玉松等，假病毒的最新应用研究进展。医学研究杂志，37（6）：116-118；张括等，RNA 噬菌体病毒样颗粒包装机制及其应用研究进展. 微生物与感染，3（2）：111-114；陈信忠等，实时荧光定量 RT-PCR 检测石斑鱼病毒性神经坏死病. 高技术通讯，16（4）：431-434；18（3）：107-108 等。

在本发明的第一方面的方法中，不同种探针（包括不同种靶核酸探针、不同种内对照核酸探针）之间所标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同，这样能够同时或快速地顺序扫描不同的检测波长，分别记录下各种荧光基团的荧光变化，从而能够进行同时检测。在本文中，探针具有本领域技术人员所熟知的含义，其由为能与扩增出的靶核酸单链结合的单链 DNA。通常，在每种探针的核苷酸序列的 5’端标记荧光基团，3’端标记淬灭基团。优选其中各种探针标记有不同的荧光基团。优选荧光基团及其淬灭基团是市售的，如可以采用 FAM™/SYBR® Green I、 VIC®/JOE/HEX、NED™/ TAMRA™/ Cy3®、ROX™/Texas Red®和 Cy5®等常规产品，它们的检测波长互不相同，也可以委托公司合成标记有荧光标记的探针。在本发明的具体实施方式中，其中采用的标记有不同检测波长的荧光标记的探针都是委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成的，纯度达到 HPLC 纯，不含杂带。

对于在本发明的第一方面的方法中优选针对的靶核酸，也优选针对这些优选的靶核酸设计靶核酸探针的核苷酸序列，更优选靶核酸探针的核苷酸序列选自 HBV 的编码 S 抗原的基因中的连续序列或其互补序列、HCV 的 5’非编码区中的连续序列或其互补序列、和 HIV 的 gag 基因中的连续序列或其互补序列，最优选选自 Seq ID No：11 或其互补序列、Seq ID No：12 或其互补序列、和 Seq ID No；13 或其互补序列。这些最优选的探针的核苷酸序列在同时检测时不会结合其他靶核酸和内对照核酸。相应地，对于在本发明的第一方面的方法中优选针对的靶核酸，也优选针对这些优选的靶核酸设计引物对。在本文中，引物对具有本领域技术人员所熟知的含义，其由分别为单链 DNA 的上游引物和下游引物组成，能用于扩增相应基因或其片段。优选靶核酸引物所扩增的基因或片段选自 HBV 的编码 S 抗原的基因或之中、HCV 的 5’非编码区或之中、和 HIV 的 gag 基因或之中，最优选的靶核酸引物对选自 Seq ID No：1 和 2、Seq ID No：3 和 4、以及 Seq ID No：5 和 6。

另外，对于在本发明的第一方面的方法中优选使用的内对照核酸，也优选针对这些优选的内对照核酸设计内对照核酸探针的核苷酸序列，更优选内对照核酸探针的核苷酸序列选自新霉素抗药性基因中的连续序列或其互补序列，最优选内对照核酸探针的核苷酸序列是 Seq ID No：14 或 15，Seq ID No：14 针对 DNA 内对照核酸，Seq ID No：15 针对 RNA 内对照核酸。这些最优选的探针的核苷酸序列在同时检测时不会结合其他内对照核酸和靶核酸。相应地，对于在本发明的第一方面的方法中优选使用的内对照核酸，也优选针对这些优选的内对照核酸设计引物对。优选内对照核酸引物所扩增的基因或片段选自新霉素抗药性基因或之中，最优选的内对照核酸引物对选自 Seq ID No：7 和 8、以及 Seq ID No：9 和 10。

本领域技术人员能够根据引物及相应需要 PCR 扩增的核酸来设计 PCR 反应条件。对于多重检测，为了平衡不同种核酸的扩增条件，本发明人经过长期摸索，优化出的条件为：PCR 反应的每个循环的条件为 94℃10 秒、50℃10 秒以及 65℃45 秒。在本发明的具体实施方式中，PCR 反应优选先 50℃保温 2 分钟并 94℃变性 3 分钟，然后进行上述条件的 45 个循环；对于需要进行 RT-PCR 的反应来说，在前述 PCR 反应前还进行 42℃保温 30 分钟，以进行反转录。

在实时荧光 PCR 反应中，Ct 值表示每个 PCR 反应管内荧光信号到达实时荧光 PCR 仪所默认设定的阈值时所经历的循环数，其具有良好的再现性，因此可以用于作为判读结果的优良指标。默认设定的阈值优选为 3~15 循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。优选在本发明的第一方面的方法中，对于步骤（3），其中一种靶核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值≤45，则这种靶核酸存在于样品中；一种靶核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值>45，而且相应内对照核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值<30，则这种靶核酸不存在于样品中。这是我们经过长期大量试验摸索出来的经验。其他情况，即一种靶核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值>45，而且相应内对照核酸的荧光检测结果计算出的 Ct 值≥30，则需要重新测量。这样简单的判读用人工即可完成，避免了很复杂的试剂或仪器的使用。

在第二方面，本发明提供了用于本发明第一方面所述方法的检测试剂盒，其包括 DNA 聚合酶、dNTP、内对照核酸、靶核酸引物对、内对照核酸引物对、一种或几种靶核酸探针和内对照核酸探针，其中前述各种探针标记有荧光基团和淬灭基团，而且各种探针标记的荧光基团的荧光检测波长互不相同。其中，不同的试剂可以分装在不同容器中，也可以选择几种长期保存而不发生化学反应的试剂合并保存在相同的容器中。容器可以是瓶、盒、注射器等能容纳上述试剂的容器，例如常规用于装 PCR、酶或核酸试剂的容器。检测试剂盒中还可以有

标签或说明书，用以指示按照本发明第一方面所述方法进行操作。标签可以贴在上述容器上，或者直接打印到上述容器上，也可以提供独立的说明书。根据需要，如方便运输、存放的需要，试剂盒还可以进一步包装进更大的包装中，这样的产品也在本发明的范围内。

对于本发明第二方面的检测试剂盒，其中优选的各成分如本发明第一方面所述的那样优选。优选诸如，其中还进一步包括反转录酶；其中还进一步包括磁珠提取法所需试剂，如磁珠、裂解液、洗涤液等；其中内对照核酸是新霉素抗药性基因或其片段，优选所述基因或其片段被包装在病毒样颗粒内；各种探针标记有不同的荧光基团；其中靶核酸探针的核苷酸序列选自 HCV 的 5’非编码区中的连续序列或其互补序列、HIV 的 gag 基因中的连续序列或其互补序列、HBV 的编码 S 抗原的基因中的连续序列或其互补序列；和/或，其中内对照核酸探针的核苷酸序列选自新霉素抗药性基因中的连续序列或其互补序列。最优选其中内对照核酸、各种探针、各种引物的核苷酸序列选自本说明书所附的序列表中的序列。

在第三方面，本发明提供了本发明第二方面所述的检测试剂盒在制备用于本发明第一方面所述方法的检测试剂产品中的应用。检测试剂产品可以是检测试剂盒本身，也可以是合并装有多个检测试剂盒的更大包装产品。根据前文所述，本领域技术人员很容易理解其中检测试剂盒的成分以及其中方法的流程。

为了便于理解，以下将通过具体的附图、实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是，这些描述仅仅是示例性的描述，并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述，本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见的。另外，本发明引用了公开文献，这些文献是为了更清楚地描述本发明，它们的全文内容均纳入本文进行参考，就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

附图说明

图 1 显示了示例性的本发明实施例中的二重实时 PCR 的检测图谱。

图 2 显示了示例性的本发明实施例中的三重实时 PCR 的检测图谱。

图 3 显示了示例性的本发明实施例中的四重实时 PCR 的检测图谱。

图 4 显示了示例性的本发明实施例中的五重实时 PCR 的检测图谱。

具体实施方式

以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处，可根据本领域技术人员所熟悉的《分子可隆实验指南》（第三版）（Cold Spring Harbor laboratory Press）、《细胞实验指南》（科学出版社，北京，中国，2001 年）、《RNA 实验技术手册》(科学出版社,北京,中国,2004年)、《免疫检测技术》(科学出版社,北京,中国,1991)等实验手册以及本文所引用的参考文献中所列方法来实施。其中所用的探针、引物可以委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

实施例 1 双重实时 PCR 反应

1. DNA 类靶核酸双重 Real Time(实时)PCR 反应

用于检测 HBV DNA 和 DNA 内对照核酸(Seq ID No:16)

引物

扩增 HBV DNA 的引物为 HBV-FQ-L1（Seq ID No：1）和 HBV-FQ-R1（Seq ID No：2)；扩增 DNA 内对照核酸的引物为 IC309L1（Seq ID No：7）和 IC309R1（Seq ID No：8）

荧光探针

HBV 的荧光探针的核苷酸序列为 HBV-FQ-P1（Seq ID No：11），其 5'端采用 FAM 标记，3'端标记相应的淬灭基团；DNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-FQ-P1（Seq ID No：14），其 5'端采用 ROX 标记，3'端标记相应的淬灭基团。

PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v)；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸样品均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

50℃ 2分钟	94℃ 3分钟			
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM 和 ROX 检测波长。

结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值<30，则判定为HBV DNA阴性；如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值≥30，则需要重检；

如 FAM 层 Ct 值≤45，则判定为 HBV DNA 阳性。具体检测图谱如图 1A 所示。

2. RNA 类靶核酸双重实时 PCR 反应

用于检测 HCV RNA 和 RNA 内对照核酸(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

引物

扩增 HCV RNA 的引物为 HCV-F-L1（Seq ID No：3）和 HCV-F-R1（Seq ID No：4）；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10）。

荧光探针

HCV 的荧光探针的核苷酸序列为 HCV-FQ-P1（Seq ID No：12），其 5’端采用 FAM 标记，3’端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5’端采用 HEX 标记，3’端标记相应的淬灭基团。

PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v）；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸样品均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM 和 HEX 检测波长。

结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15个循环的荧光信号的标准偏差的10倍。。如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HCV RNA阴性；如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HCV RNA阳

性。具体检测图谱如图1B所示。

用于检测 HIV-1 RNA 和 RNA 内对照核酸(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

引物

扩增 HCV RNA 的引物为 HIV-F-L1（Seq ID No：5）和 HIV-F-R1（Seq ID No：6)；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10)。

荧光探针

HIV 的荧光探针的核苷酸序列为 HIV-F-P1（Seq ID No：13），其 5’端采用 FAM 标记，3’端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5’端采用 HEX 标记，3’端标记相应的淬灭基团。

PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v)；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸样品均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM 和 HEX 检测波长。

结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，值荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HIV-1 RNA阴性；如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HIV-1 RNA阳性。具体检测图谱如图1C所示。

实施例 2 三重实时 PCR 反应

1. RNA 类靶核酸三重实时 PCR 反应

用于检测 HCV RNA、HIV-1 RNA 和 RNA 内对照核酸(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

引物

扩增 HCV RNA 的引物为 HCV-F-L1（Seq ID No：3）和 HCV-F-R1（Seq ID No：4）；扩增 HCV RNA 的引物为 HIV-F-L1（Seq ID No：5）和 HIV-F-R1（Seq ID No：6）；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10）。

荧光探针

HCV 的荧光探针的核苷酸序列为 HCV-FQ-P1（Seq ID No：12），其 5’端采用 FAM 标记，3’端标记相应的淬灭基团；HIV 的荧光探针的核苷酸序列为 HIV-F-P1（Seq ID No：13），其 5’端采用 ROX 标记，3’端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5’端采用 HEX 标记，3’端标记相应的淬灭基团。

PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v）；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸样品均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM、ROX 和 HEX 检测波长。

结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HCV RNA阴性；如FAM层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HCV RNA阳性。如ROX层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HIV-1 RNA阴性；如ROX层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如ROX层Ct值≤45，则判定为HIV-1 RNA阳性。具体检测图谱如图2所示。

实施例 3 四重实时 PCR 反应

1. DNA/RNA 类靶核酸四重实时 PCR 反应

1.1 用于检测 HBV DNA、HCV RNA、 DNA 内对照核酸(Seq ID No:16)和 RNA 内对照核酸

(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

1.1.1 引物

扩增 HBV DNA 的引物为 HBV-FQ-L1（Seq ID No：1）和 HBV-FQ-R1（Seq ID No：2）；扩增 HCV RNA 的引物为 HCV-F-L1（Seq ID No：3）和 HCV-F-R1（Seq ID No：4）；扩增 DNA 内对照核酸的引物为 IC309L1（Seq ID No：7）和 IC309R1（Seq ID No：8）；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10）。

1.1.2 荧光探针

HBV 的荧光探针的核苷酸序列为 HBV-FQ-P1（Seq ID No：11），其 5’端采用 FAM 标记，3’端标记相应的淬灭基团；HCV 的荧光探针的核苷酸序列为 HCV-FQ-P1（Seq ID No：12），其 5’端采用 TAMRA 标记，3’端标记相应的淬灭基团；DNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-FQ-P1（Seq ID No：14），其 5’端采用 ROX 标记，3’端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5’端采用 HEX 标记，3’端标记相应的淬灭基团。

1.1.3 PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v）；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM、ROX、TAMRA 和 HEX 检测波长。

1.1.4 结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值<30，则判定为HBV DNA阴性；如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HBV DNA阳性。如TAMRA层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HCV RNA阴性；如TAMRA层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如TAMRA层Ct值≤45，则判定为HCV RNA阳性。具体检测

图谱如图3A所示。

1.2 用于检测 HBV DNA、HIV-1 RNA、 DNA 内对照核酸(Seq ID No:16)和 RNA 内对照核酸(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

1.2.1 引物

扩增 HBV DNA 的引物为 HBV-FQ-L1（Seq ID No：1）和 HBV-FQ-R1（Seq ID No：2）；扩增 HIV RNA 的引物为 HIV-F-L1（Seq ID No：5）和 HIV-F-R1（Seq ID No：6）；扩增 DNA 内对照核酸的引物为 IC309L1（Seq ID No：7）和 IC309R1（Seq ID No：8）；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10）。

1.2.2 荧光探针

HBV 的荧光探针的核苷酸序列为 HBV-FQ-P1（Seq ID No：11），其 5’端采用 FAM 标记，3’端标记相应的淬灭基团；HIV 的荧光探针的核苷酸序列为 HIV-F-P1（Seq ID No：13），其 5’端采用 Cy5 标记，3’端标记相应的淬灭基团；DNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-FQ-P1（Seq ID No：14），其 5’端采用 ROX 标记，3’端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5’端采用 HEX 标记，3’端标记相应的淬灭基团。

1.2.3 PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v）；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		*45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM、ROX、Cy5 和 HEX 检测波长。

1.2.4 结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值<30，则判定为HBV DNA阴性；如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HBV DNA阳

性。如Cy5层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HIV-1 RNA阴性；如Cy5层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如Cy5层Ct值≤45，则判定为HIV-1 RNA阳性。具体检测图谱如图3B所示。

实施例 4 五重实时 PCR 反应

1. DNA/RNA 类靶核酸五重实时 PCR 反应

1.1 用于检测 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA、 DNA 内对照核酸(Seq ID No:16)和 RNA 内对照核酸(其转录的 DNA 序列同 Seq ID No:17)

1.1.1 引物

扩增 HBV DNA 的引物为 HBV-FQ-L1（Seq ID No：1）和 HBV-FQ-R1（Seq ID No：2）；扩增 HCV RNA 的引物为 HCV-F-L1（Seq ID No：3）和 HCV-F-R1（Seq ID No：4）；扩增 HIV RNA 的引物为 HIV-F-L1（Seq ID No：5）和 HIV-F-R1（Seq ID No：6）；扩增 DNA 内对照核酸的引物为 IC309L1（Seq ID No：7）和 IC309R1（Seq ID No：8）；扩增 RNA 内对照核酸的引物为 IC-F-L2（Seq ID No：9）和 IC-F-R2（Seq ID No：10）。

1.1.2 荧光探针

HBV 的荧光探针的核苷酸序列为 HBV-FQ-P1（Seq ID No：11），其 5'端采用 FAM 标记，3'端标记相应的淬灭基团；HCV 的荧光探针的核苷酸序列为 HCV-FQ-P1（Seq ID No：12），其 5'端采用 TAMRA 标记，3'端标记相应的淬灭基团；HIV 的荧光探针的核苷酸序列为 HIV-F-P1（Seq ID No：13），其 5'端采用 Cy5 标记，3'端标记相应的淬灭基团；DNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-FQ-P1（Seq ID No：14），其 5'端采用 ROX 标记，3'端标记相应的淬灭基团；RNA 内对照核酸探针的核苷酸序列为 IC-F-P2（Seq ID No：15），其 5'端采用 HEX 标记，3'端标记相应的淬灭基团。

1.1.3 PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积为 60μl，其中各组分的浓度分别为：Tris.HCl pH8.3 10mM；KCl 50mM；dNTP 各 0.2mM；Taq DNA 聚合酶 2U；M-MLV 反转录酶 25U；RNasin 10U；各种引物各 15pM/种；各种荧光探针各 5pM/种；甘油 5%（v/v）；内对照核酸各 100 个拷贝数；各种靶核酸均为国家卫生部临检中心标准样品。

反应热循环条件如下：

42℃ 30分钟	50℃ 2分钟	94℃ 3分钟		
（94℃ 10秒	50℃ 10秒	65℃ 45秒）		45个循环

使用 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪，荧光采集 FAM、ROX、TAMRA、Cy5 和 HEX 检测波长。

1.1.4 结果判断

结果分析条件设定：ABI 7500荧光仪的基线自动设定，荧光阈值设定为3~15循环的荧光信号的标准偏差的10倍。如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值<30，则判定为HBV DNA阴性；如FAM层Ct值>45且ROX层Ct值≥30，则需要重检；如FAM层Ct值≤45，则判定为HBV DNA阳性。如TAMRA层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HCV RNA阴性；如TAMRA层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如TAMRA层Ct值≤45，则判定为HCV RNA阳性。如Cy5层Ct值>45且HEX层Ct值<30，则判定为HIV-1 RNA阴性；如Cy5层Ct值>45且HEX层Ct值≥30，则需要重检；如Cy5层Ct值≤45，则判定为HIV-1 RNA阳性。具体检测图谱如图4所示。

序列表

<110> 上海浩源生物科技有限公司
<120> 单管中多重靶核酸的 PCR 检测方法及其试剂盒
<160> 17

<210> 1
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 1
tgtcctggtt atcgctg 17

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 2
cagaagaacc aacaagaaga 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 3
ttcacgcaga aagcgtctag 20

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 4
aattccggtg tactcaccgg tt 22

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 5
agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 6
tactagtagt tcctgctatg tcacttcc 28

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 7
tcactgaagc gggagggac tggc 23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
gcaggtagcc ggatcaagcg tat 23

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
cttcagcaat atcacgggt agc 23

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
gatgcctgct tgccgaatat cat 23

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
tgtgtctgcg gcgttttatc a 21

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 12
atggcgttag tatgagtgtc gtg 23

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 13
accatcaatg aggaagctgc agaatggg 28

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 14
ccgccgcatt gcatcagcca tgatg 25

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 15
cctgatagcg gtccgccaca ccc 23

<210> 16
<211> 142
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 16
gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga tggatacttt 60
ctcggcagga gcaaggtgag atgacaggag atcctgcccc ggcacttcgc ccaatagcag 120
ccagtcccttc ccgcttcagt ga 142

<210> 17
<211> 124
<212> RNA
<213> 人工序列
<400> 17
cuucagcaau aucacgggu agccaacgcu auguccugau agcgguccgc cacacccagc 60
cggccacagu cgaugaaucc agaaaagcgg ccauuuucca ccaugauauu cggcaagcag 120
gcauc 124

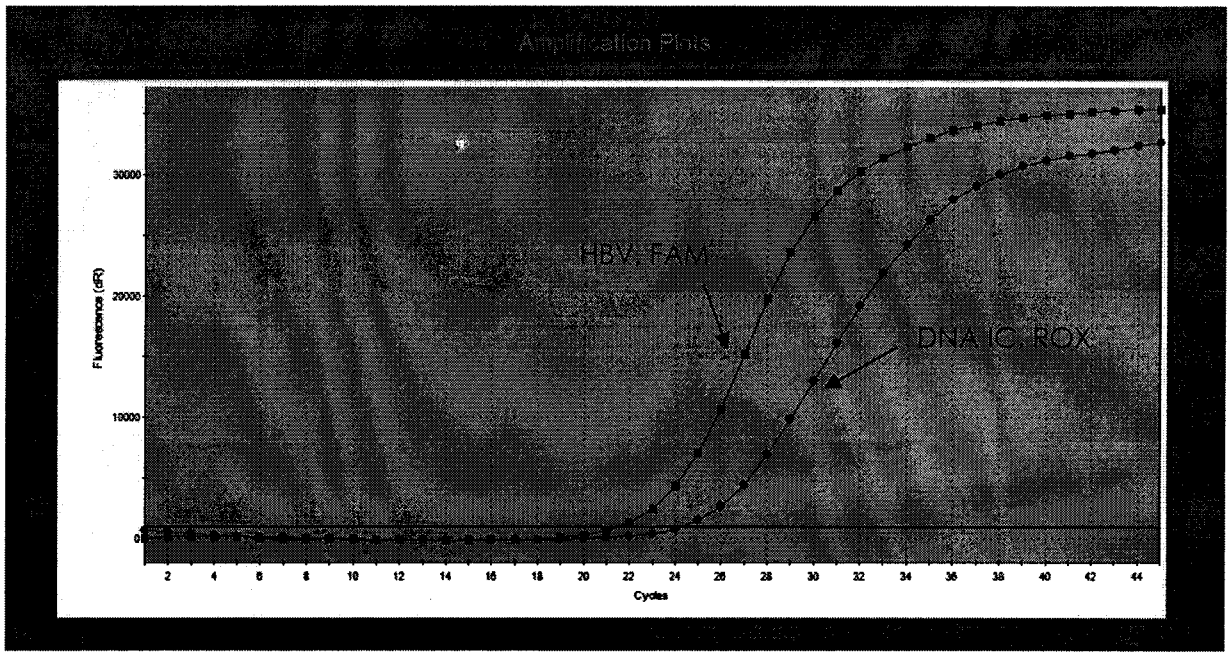

Amplification Plots
Fluorescence (dR)
30000
20000
10000
0
HBV, FAM
DNA IC, ROX
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
Cycles

图 1A

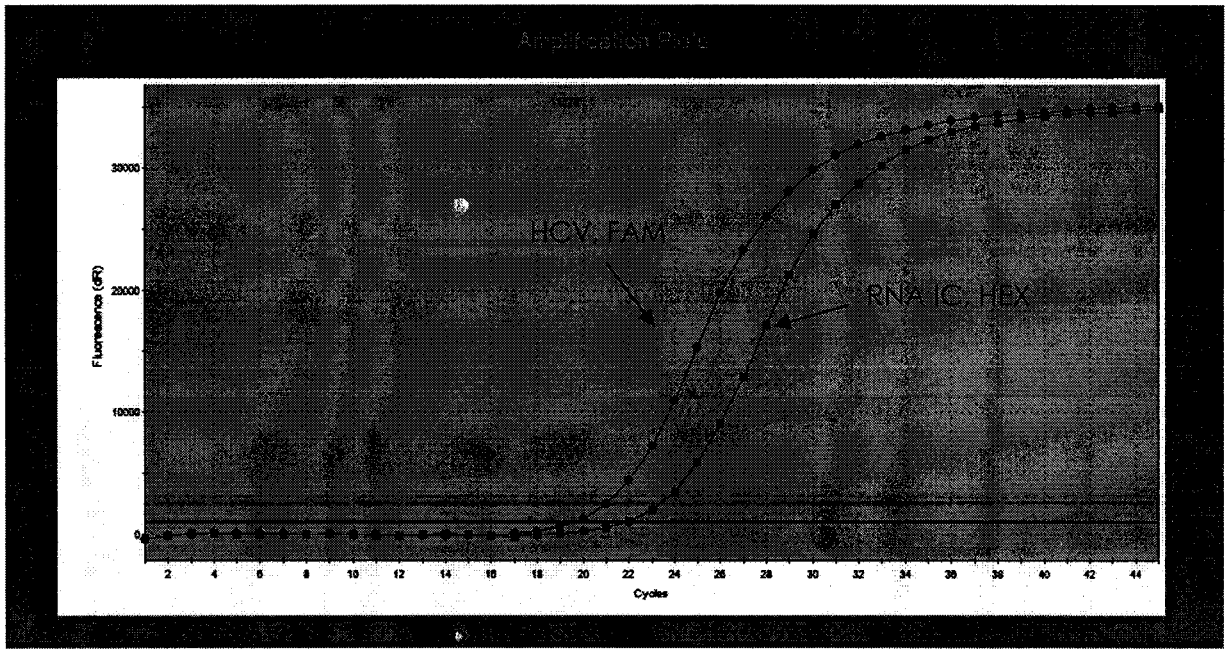

Amplification Plots
Fluorescence (dR)
30000
20000
10000
0
HCV, FAM
RNA IC, HEX
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
Cycles

图 1B

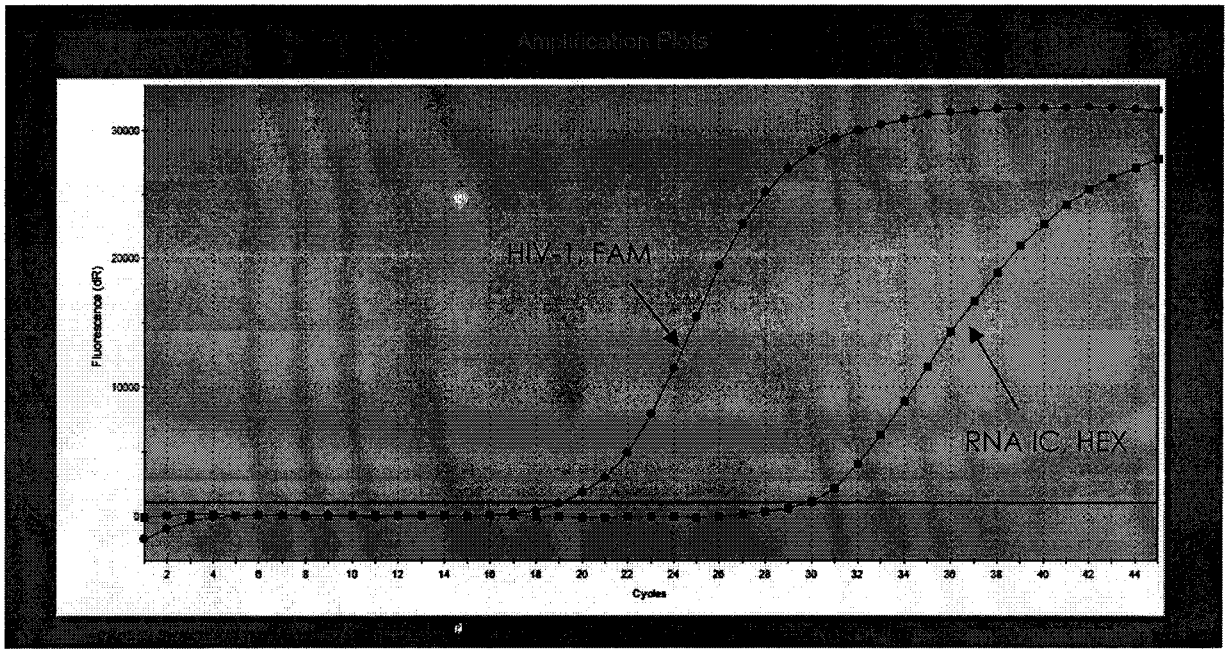

Amplification Plots
Fluorescence (dR)
Cycles
HIV-1, FAM
RNA IC, HEX

图 1C

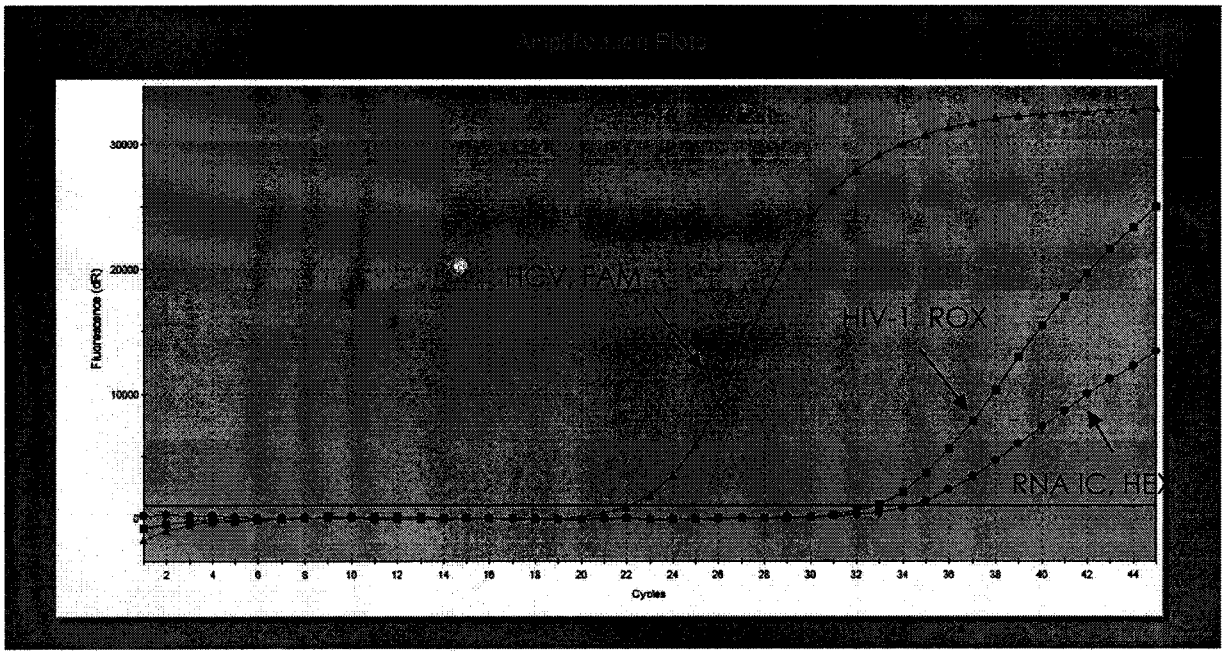

Amplification Plots
Fluorescence (dR)
Cycles
HCV, FAM
HIV-1, ROX
RNA IC, HEX

图 2

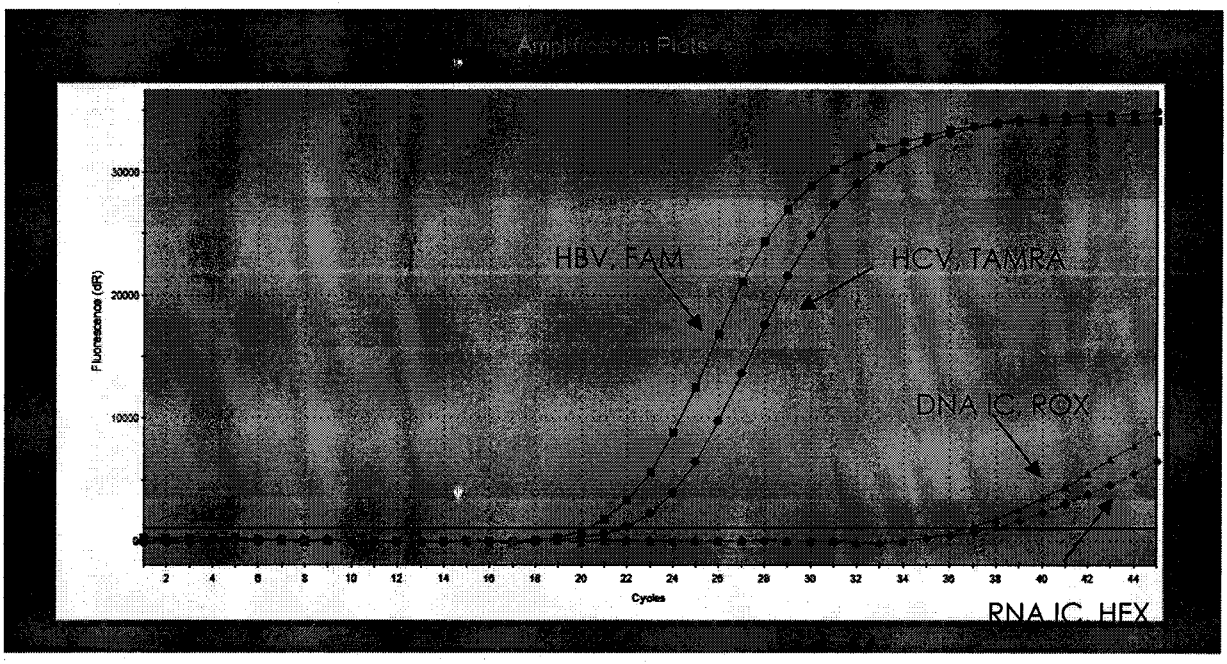

Amplification Plots
HBV, FAM
HCV, TAMRA
DNA IC, ROX
RNA IC, HEX
Fluorescence (dR)
Cycles

图 3A

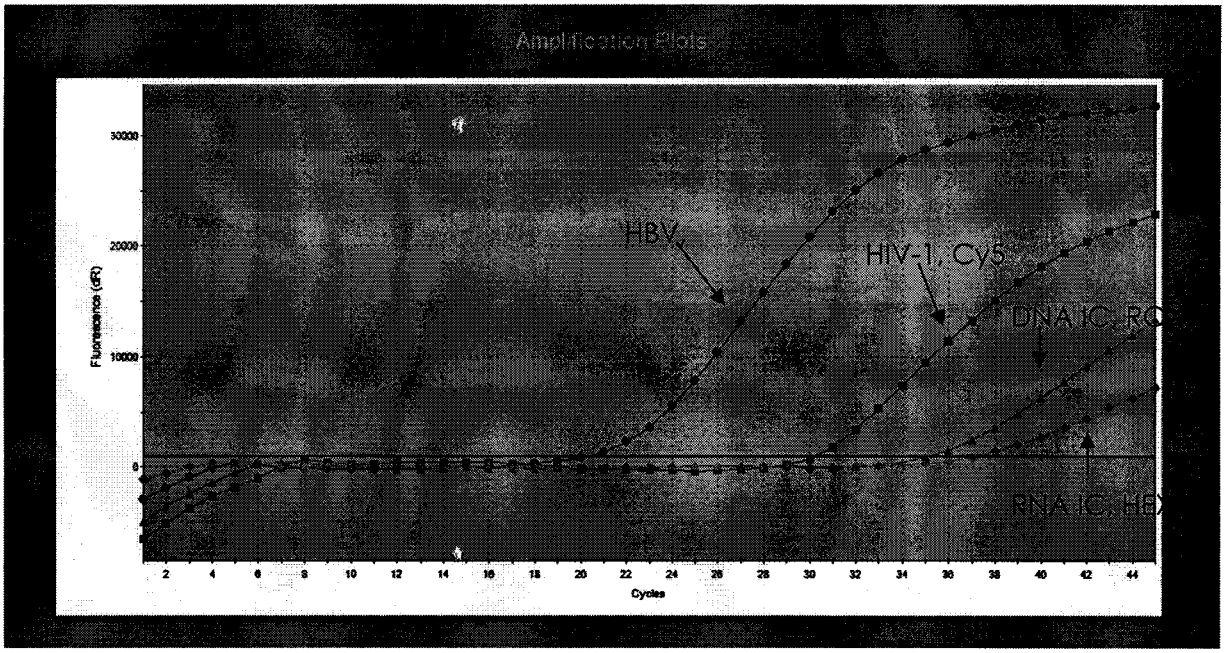

Amplification Plots
HBV
HIV-1, Cy5
DNA IC, ROX
RNA IC, HEX
Fluorescence (dR)
Cycles

图 3B

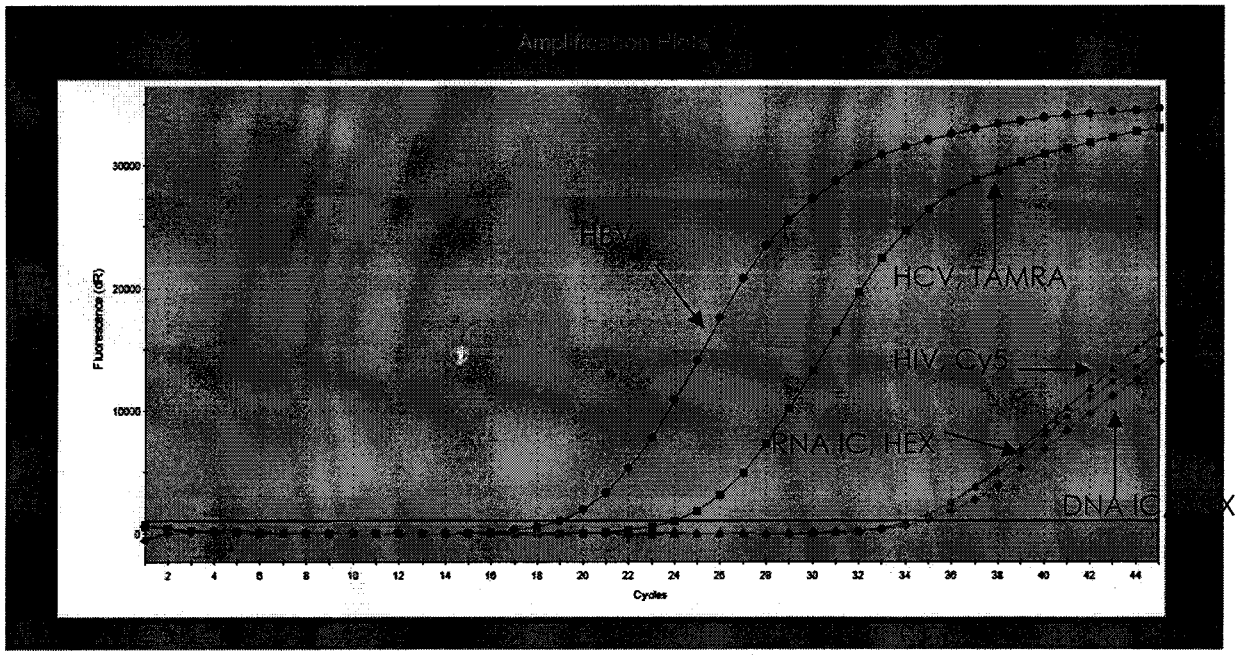

Amplification Plots
Fluorescence (dR)
Cycles
HBV
HCV-TAMRA
HIV-Cy5
RNA IC-HEX
DNA IC

图 4