



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102168148 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 24

(21) 申请号 201010122190. 6

CN 101545014 A, 2009. 09. 30, 全文.

(22) 申请日 2010. 02. 26

(73) 专利权人 宁波基内生物技术有限公司

地址 315200 浙江省宁波市中官路 777 号 8 楼

刘贵育. “同源序列 PCR 检测孕妇外周血白细胞中 HSV 感染”. 《安徽医科大学学报》. 2001, 第 36 卷 (第 6 期), 445-447.

审查员 刘芳

(72) 发明人 倪剑锋 赵珊珊 杨文辉 谢育媛
邓其涛

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 曹津燕

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1865451 A, 2006. 11. 22, 全文.

权利要求书1页 说明书10页

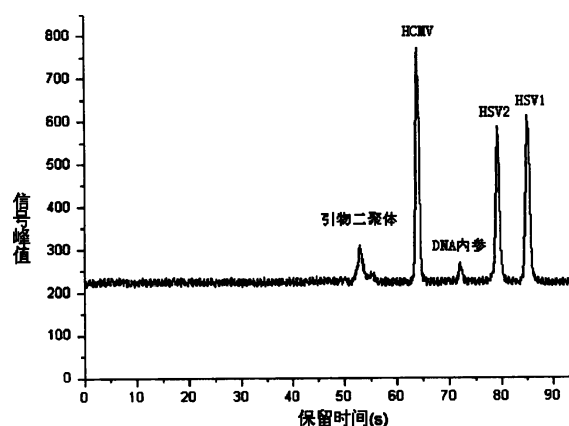
序列表3页 附图10页

(54) 发明名称

用于检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物、试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物、试剂盒及方法。一种用于检测人巨细胞病毒的引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :1, 下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :2 ; 用于检测单纯疱疹病毒 1 型的引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :3, 下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :4 ; 用于检测单纯疱疹病毒 2 型的引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :5, 下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :6。本发明所提供的利用引物或其组合物、工具、试剂盒检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的方法可以在基因水平上进行迅速判断, 灵敏度较高和特异性较好, 具有节约时间、技术成熟及检测结果稳定的优点。



1. 一种用于检测人巨细胞病毒的引物,该引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :1,下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :2。
2. 一种用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和单纯疱疹病毒 2 型的引物组合物,该引物组合物包括用于检测单纯疱疹病毒 1 型的上游引物核酸序列 SEQ ID NO :3、下游引物核酸序列 SEQ ID NO :4、用于检测单纯疱疹病毒 2 型的上游引物核酸序列 SEQ ID NO :5、下游引物核酸序列 SEQ ID NO :6 和权利要求 1 所述的引物,以及内参引物,该内参引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :7,下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :8。
3. 根据权利要求 1 所述的引物在制备用于检测人巨细胞病毒的试剂盒中的用途。
4. 根据权利要求 2 所述的引物组合物在制备用于检测人巨细胞病毒和单纯疱疹病毒的试剂盒中的用途。
5. 一种用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和单纯疱疹病毒 2 型的试剂盒,该试剂盒包括权利要求 2 所述的引物组合物。
6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括细胞裂解液、核酸结合液、核酸漂洗液、核酸洗脱液和 PCR 反应液。

用于检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域。具体地,本发明涉及一种用于检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物、试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 是一种 DNA 病毒,是新生儿包涵体病 (CID) 的病原体,其直径约 200nm,为最大的动物病毒。人类感染巨细胞病毒非常普遍,根据 1981 年中国医学科学院病毒学研究所等单位在北京市的调查研究,30 岁以下怀孕 26 周左右的妇女血清中抗 CMV 的补体结合抗体阳性率为 72.60% (115/208),怀孕 38 周者的阳性率为 76.84% (136/177) (以上均为北京市市内孕妇)。妊娠母体感染 CMV 可以通过胎盘侵袭胎儿引起先天性感染,少数造成早产、流产、死产或生后死亡。患儿可发生黄疸,肝脾肿大,血小板减少性紫斑及溶血性贫血。儿童常遗留永久性智力低下,神经肌肉运动障碍,耳聋和脉络视网膜炎等。

[0003] 单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV) 属于疱疹病毒科,有 HSV1 和 HSV 2 两个血清型。HSV 1 型感染常为口腔粘膜感染、上身皮肤感染、淋巴结肿大,约占 10%。其主要引起上半身皮肤、粘膜或器官疱疹,但极少感染胎儿。HSV 2 型为生殖器疱疹,约占 90%。HSV 1 好发于 1~14 岁儿童,HSV 2 好发于 14 岁以上人群。我国血清学调查发现成人中 90% 有 HSV 1 的 IgG,20% 有 HSV 2 的 IgG,说明成年人绝大多数既往感染过 HSV。单纯疱疹病毒可引起皮肤、粘膜及多种器官感染。它可以通过性接触感染而发生生殖器疱疹 (Genital herpes)。大多数生殖器疱疹由 HSV 2 引起,目前 HSV 成为不少国家和地区生殖器溃疡发病的首要病因,同时还与宫颈癌的发病及新生儿疱疹病的传染有关。

[0004] 世界许多国家已将巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus, HCMV) 和单纯疱疹病毒 1 型和 2 型 (Herpes simplex virus1/2, HSV1/2) 检测作为孕期筛查项目。对未孕前曾感染的妇女作预防接种,对未孕感染者进行治疗,建议治愈后怀孕。对孕早期急性感染者则建议终止妊娠。对孕中、晚期感染者酌情处理。我国部分医院开展的新生儿缺陷检测工作已将这两种病毒列入必检项目。

[0005] 目前已有的检测方法有病原学检测、酶联免疫检测、杂交和 PCR 检测等。病原学检测分离、培养费时长,费用高,不适用于常规检测。酶联免疫检测方法简单、易行,是目前普遍运用的方法,但是其灵敏度有限,对某些 IgM 的检出率不高。核酸原位杂交方法欠灵敏,特异性不高,不能作为临床的常规诊断。普遍认为 PCR 法具有重复性好、特异性强、敏感性高的特点,其检测病原体的关键是必须选择该病原体的特异且稳定存在的基因片段。

发明内容

[0006] 因此,本发明的目的是提供一种用于检测巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物或引物组合物。

[0007] 本发明的另一个目的是提供上述引物或引物组合物在制备用于检测巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的工具中的用途。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种用于检测巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的试剂盒。

[0009] 本发明的又一个目的是提供一种用于检测巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的方法。

[0010] 本发明的目的是采用以下技术方案来实现的。

[0011] 一方面,本发明提供一种用于检测巨细胞病毒的引物,该引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :1,下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :2。

[0012] 本发明提供一种用于检测单纯疱疹病毒 1 型的引物,该引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :3,下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :4。

[0013] 本发明提供一种用于检测单纯疱疹病毒 2 型的引物,该引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :5,下游引物的核苷酸序列为 SEQ ID NO :6。

[0014] 此外,本发明还提供一种用于检测巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 / 或单纯疱疹病毒 2 型的引物组合物,该引物组合物包括至少一种上述引物以及内参引物,该内参引物的上游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :7,下游引物核苷酸序列为 SEQ ID NO :8。

[0015] 本发明还提供上述引物或引物组合物在制备用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 / 或人单纯疱疹病毒 2 型的工具中的用途。

[0016] 另一方面,本发明提供一种用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 / 或单纯疱疹病毒 2 型的试剂盒,该试剂盒包括至少一种上述引物或上述引物组合物。该试剂盒还可以包括细胞裂解液、核酸结合液、核酸漂洗液、核酸洗脱液和 PCR 反应液。

[0017] 又一方面,本发明提供一种用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 / 或单纯疱疹病毒 2 型的方法,该方法包括以下步骤:

[0018] 1) 提取样本 DNA;

[0019] 2) 使用上述引物、引物组合物或试剂盒对步骤 1) 得到的 DNA 进行 PCR 扩增;

[0020] 3) 检测步骤 2) 得到的扩增产物。

[0021] 其中,步骤 1) 中的样本优选为人宫颈上皮细胞。步骤 3) 中的检测方法优选为微流体芯片检测法。

[0022] 在本发明的一个优选实施方案中,通过对患者宫颈组织细胞的 DNA 进行巨细胞病毒 (HCMV) 和单纯疱疹病毒 1 型 (HSV1)、单纯疱疹病毒 2 型 (HSV2) 检测,从而诊断患者是否感染了这 3 种病毒,具体包括以下步骤:

[0023] 1) 提取人临床样本的 DNA。

[0024] 2) 将巨细胞病毒特异性引物和两种单纯疱疹病毒特有基因的特异性引物混合,对被测样本的 DNA 进行多重 PCR 扩增,被扩增的目标基因片段大小各不相同。

[0025] 3) 扩增产物通过微流体芯片进行检测。

[0026] 4) 通过各检测峰的位置确定检测到的片段的大小,从而判断检测到的基因,鉴别临床样本所感染的病毒类别。

[0027] 5) 结果判断:a) 未出现任何特异性峰,说明临床样本的 DNA 没有提取出来,检测无效;b) 只出现 DNA 内参特异性峰,说明没有巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 (HSV1、HSV2) 感染;

c) 出现 DNA 内参和巨细胞病毒特异性峰,说明有巨细胞病毒感染;d) 出现 DNA 内参和单纯疱疹病毒 1(HSV1) 特异性峰,说明有单纯疱疹病毒 1 感染;e) 出现 DNA 内参和单纯疱疹病毒 2(HSV2) 特异性峰,说明有单纯疱疹病毒 2 感染;f) 出现 DNA 内参、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 1(HSV1) 特异性峰,说明有巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 1(HSV1) 感染;g) 出现 DNA 内参、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 2(HSV2) 特异性峰,说明有巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 2(HSV2) 感染;h) 出现 DNA 内参、单纯疱疹病毒 1 和 2(HSV1、HSV2) 特异性峰,说明有单纯疱疹病毒 1 和 2(HSV1、HSV2) 感染;i) 出现 DNA 内参、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 和 2(HSV1、HSV2) 特异性峰,说明有巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 和 2(HSV1、HSV2) 感染。

[0028] 本发明的检测方法属于 PCR 类检测方法,检测手段采用微流体芯片,比起传统的电泳检测法,检测时间短、结果清晰明了,更容易判断。此外,本发明所提供的检测方法操作简单,成本较低,适宜推广应用。具体地,本发明具有以下有益效果:

[0029] 首先,本发明分别提供了用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型或单纯疱疹病毒 2 型的引物,它们可以分别特异性扩增出人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型或单纯疱疹病毒 2 型的保守序列。其次,本发明提供了用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型或单纯疱疹病毒 2 型的引物组合物,其中包括至少一种上述用于检测人巨细胞病毒的引物、用于检测单纯疱疹病毒 1 型的引物或用于检测单纯疱疹病毒 2 型的引物,以及优选的人 DNA 保守序列特有基因的特异性引物作为内参引物。该内参引物的设计选用了人 β 球蛋白(β -globin) 基因,因为人体细胞中都含有此基因,引入该内参基因可以确定模板的提取质量,避免扩增结果的假阴性。

[0030] 相应地,本发明提供了用于人巨细胞病毒和/或单纯疱疹病毒的工具、试剂盒和方法,其中均采用了至少一种上述用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型或单纯疱疹病毒 2 型的引物,或者包括至少一种上述用于检测人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型或单纯疱疹病毒 2 型,以及内参引物的引物组合物,是具有较高灵敏度和特异性的检测工具或方法,能够高效、特异性地扩增出目的 DNA。

[0031] 本发明提供了一种可快速便捷检测巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型和 2 型的方法,可以在基因水平上进行迅速的判断,具有较好的灵敏度和特异性。该方法可直接对患者的临床样本(例如血液、体液等)进行检测,不需要对样本进行培养后再对病毒株进行检测,节约了时间。同时,微流体芯片检测法比传统的 DNA 电泳检测法更简单、快捷、直观,可以为临床用药提供准确、及时的指导。本发明所提供的方法技术成熟,检测结果稳定,比传统的滤纸片法、凝胶法等更快捷、灵敏、准确。

附图说明

[0032] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0033] 图 1 为本发明实施例 2 中单独使用 B297 引物扩增 DNA 样品的电泳结果图。

[0034] 图 2 为本发明实施例 2 中单独使用 B658 引物扩增 DNA 样品的电泳结果图。

[0035] 图 3A~图 3H 为本发明实施例 3 中 DNA 样品的电泳检测结果图,其中图 3A 为未感染病毒的样品,图 3B 为感染 HCMV 的样品,图 3C 为感染 HSV1 的样品,图 3D 为感染 HSV2 的样品,图 3E 为感染 HCMV 和 HSV1 的样品,图 3F 为感染 HCMV 和 HSV2 的样品,图 3G 为感染 HSV1 和 HSV2 的样品,图 3H 为感染 HCMV、HSV1 和 HSV2 的样品。

[0036] 图 4A ~图 4H 为本发明实施例 6 中 DNA 样品的微流体芯片检测结果图,其中图 4A 为未感染病毒的样品,图 4B 为感染 HCMV 的样品,图 4C 为感染 HSV1 的样品,图 4D 为感染 HSV2 的样品,图 4E 为感染 HCMV 和 HSV1 的样品,图 4F 为感染 HCMV 和 HSV2 的样品,图 4G 为感染 HSV1 和 HSV2 的样品,图 4H 为感染 HCMV、HSV1 和 HSV2 的样品。

[0037] 图 5A ~图 5D 为检测引物组合物灵敏度的微流体芯片检测结果图,其中图 5A 为 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^7 、B297 拷贝数为 1×10^4 ,图 5B 为 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^4 、B297 拷贝数为 1×10^3 ,图 5C 为 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^3 、B297 拷贝数为 1×10^2 ,图 5D 为 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^2 、B297 拷贝数为 1×10^1 。

[0038] 图 6A 和图 6B 为检测引物组合物特异性的微流体芯片检测结果图,其中图 6A 为阳性结果,其中 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^8 、B297 拷贝数为 1×10^5 ,图 8B 为阴性结果。

[0039] 图 7A ~图 7C 为检测引物组合物重复性的微流体芯片检测结果图,其中图 7A 为第一批次,图 7B 为第二批次,图 7C 为第三批次,且其中 HCMV、HSV1 和 HSV2 的拷贝数分别为 1×10^6 、B299 拷贝数为 1×10^5 。

具体实施方式

[0040] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0041] 以下实施例中所使用的技术,除非特别说明,均为本领域的技术人员已知的常规技术;所使用的仪器设备、试剂等,除非是本说明书特别说明,均为本领域的研究和技术人员可以通过公共途径获得的。

[0042] 实施例 1:临床样本的制备

[0043] 本实施例制备本发明检测方法所使用的人体宫颈组织样本 DNA,具体详述如下。

[0044] 1、提取试剂:

[0045] A 液:细胞裂解液,15ml/瓶,每次用 $200 \mu\text{l}$ 。

[0046] 成份 终浓度

[0047] Tris-HCl (pH8.0) 0.01mol/l

[0048] NaCl 0.1mol/l

[0049] EDTA (pH8.0) 0.01mol/l

[0050] SDS $2\% (\text{g/ml})$

[0051] B 液:核酸结合液,25ml/瓶,每次用 $400 \mu\text{l}$ 。

[0052] 成份 终浓度

[0053] GuSCN 5mol/l

[0054] Tris-HCl (pH6.4) 0.05mol/l

[0055] EDTA (pH8.0) 0.02mol/l

[0056] TritionX-100 $2.5\% (\text{g/ml})$

[0057] C 液:核酸漂洗液,20ml/瓶,每次用 $300 \mu\text{l}$ 。

[0058] 成份 含量

| | | |
|--------|-------------------------------------|-----------|
| [0059] | GuSCN | 5mol/l |
| [0060] | Tris-HCl (pH6.4) | 0.05mol/l |
| [0061] | D 液 :核酸洗脱液, 5ml/ 瓶, 每次用 50 μ l。 | |
| [0062] | 成份 | 终浓度 |
| [0063] | Tris-HCl (pH8.0) | 0.01mol/l |
| [0064] | NaCl | 0.1mol/l |
| [0065] | EDTA (pH8.0) | 0.01mol/l |

[0066] 2、提取方法：

[0067] 1) 取样 :样本取自于 20 ~ 50 岁的女性子宫颈上皮细胞。对于被测者有皮损且有疣状体增生的患者,用生理盐水湿润的棉拭子,用力来回在疣体表面擦拭 3 次,以取得脱落细胞 ;对于无皮损的被测者则采集分泌物标本,要求患者在采样前 2h 不排尿,采样前用棉拭子将阴道或宫颈口过多的分泌物轻轻擦拭干净,更换用生理盐水湿润的棉拭子,紧贴阴道或宫颈口粘膜,稍用力转动 2 周,以取得脱落细胞。然后将棉拭子放入备有 1ml 无菌生理盐水的样本管中,充分漂洗,然后将棉拭子贴管壁挤干丢弃。

[0068] 2) 裂解 :在 1.5ml 的离心管中加入步骤 1) 中采集的样本液 1ml, 5000 转 / 分钟离心 15 分钟, 去上清, 在沉淀中加入 A 液 200 μ L, 混匀后于沸水中煮沸 10 ~ 15 分钟, 直到 A 液变得澄清。

[0069] 3) 吸附 :先在吸附柱中加入 B 液 400 μ l, 然后将裂解液缓慢倾倒入吸附柱中 (若裂解 15min 后仍有杂质, 勿将杂质倒入)。振荡混匀后放置 2 分钟, 然后 12000 转 / 分钟离心 2 分钟。

[0070] 4) 漂洗 :去废液, 在吸附柱中加入 C 液 300 μ l, 12000 转 / 分钟离心 2 分钟, 去废液 ;再加入 70% (V/V) 的乙醇 700 μ l, 12000 转 / 分钟离心 2 分钟去废液 ;最后以 12000 转 / 分钟离心 2 分钟, 彻底去废液。

[0071] 5) 洗脱 :换一个干净的 1.5ml EP 管, 套住吸附柱, 在吸附柱中央加入 D 液 50 μ L, 于 56℃ 放置 10 分钟, 12000 转 / 分钟离心 2 分钟。流出液即为提取的 DNA 样品, 可直接用于 PCR 反应。

[0072] 实施例 2 :内参引物序列的确定

[0073] 本实施例为采用根据人 DNA 保守序列 β 球蛋白特有基因设计的两对 DNA 扩增引物扩增实施例 1 所制备的 DNA 样品, 并用凝胶电泳检测这两对引物的扩增效果, 以筛选出内参引物。

[0074] 1、单引物 PCR 扩增

[0075] 1) 在 200 μ L Eppendorf 管内配制 25 μ l 反应体系如下, 其中提取的 DNA 样品分别为 10 份不同的细胞样本 DNA :

| | | |
|--------|--------------------------|---------------|
| [0076] | 成份 | 体积 (μ l) |
| [0077] | ddH ₂ O | 18.3 |
| [0078] | 5U/ μ l Taq 酶 | 0.2 |
| [0079] | Taq 酶 10 \times buffer | 2.5 |
| [0080] | 10 μ M 内参上、下游引物 | 各 0.5 |
| [0081] | 2.5mM dNTP | 2 |

[0082] 提取的 DNA 样品 1

[0083] 内参引物的具体序列如表 1 所示。

[0084] 表 1 PCR 扩增内参引物序列

[0085]

| 基因名称 | 片段长度 | 基因信息 | 引物信息方向 5' → 3' |
|------|-------|--------------|--|
| B297 | 297bp | NC_000007.13 | 上游 :TGACAAGGCCATGAGGCTGGTGTA (SEQ ID NO :7) 下游 :GAGTCCATCACGATGCCAGTGGTA (SEQ ID NO :8) |
| B658 | 658bp | NC_000007.13 | 上游 :CGCCCTTCTCACTGGTTCTCTCT (SEQ ID NO :9) 下游 :CCTTAATGTCACGCACGATTCCC (SEQ ID NO :10) |

[0086] 2) 混合引物 PCR 扩增

[0087] 在 200 μ L Eppendorf 管内配制 25 μ l 反应体系如下,其中提取的 DNA 样品为经过 PCR 鉴定含有病毒的细胞样本 :

| 成份 | 体积 / μ l |
|----------------------------------|--------------|
| [0089] ddH ₂ O | 17.0 |
| [0090] 5U/ μ l Taq 酶 | 0.5 |
| [0091] Taq 酶 10 \times buffer | 2.5 |
| [0092] 10 μ M 内参上、下游引物各 | 0.5 |
| [0093] 10 μ M 三种病毒上、下游引物混合物各 | 0.5 |
| [0094] 2.5mM dNTP | 2 |
| [0095] 提取的 DNA 样品 | 1 |

[0096] 3)PCR 条件 :

[0097] 第一阶段 :94 $^{\circ}$ C, 2 分钟 ;

[0098] 第二阶段 :94 $^{\circ}$ C, 20 秒 ;54 $^{\circ}$ C, 30 秒 ;72 $^{\circ}$ C, 45 秒 ;35 个循环 ;

[0099] 第三阶段 :72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

[0100] 2、琼脂糖凝胶电泳

[0101] 1) 制胶 (2% 琼脂糖凝胶)

[0102] 称取琼脂糖 0.8g 于三角瓶中,加入 50ml 电泳缓冲液 TAE (购自上海生工生物工程技术服务有限公司,规格为 50 \times TAE,稀释 50 倍使用),混匀后于微波炉上高火煮 2 分钟 (TAE 挥发约 10ml)。取出后冷却到 60 $^{\circ}$ C 以下,加入 0.3 μ l 核酸荧光染料 Goldview (购自上海赛百盛基因技术有限公司,规格 1ml/ 支),混匀后倒入两端封闭的胶板中,插入电泳齿梳。待彻底冷却后,去掉两端的封闭,拔掉齿梳,将胶板放入电泳槽中,倒入适量的 TAE 溶液,以刚好浸没胶板为宜。

[0103] 2) 点样

[0104] 取以上得到的 PCR 产物 $5\mu\text{L}$, 加入 $1\mu\text{L}$ $6\times$ 上样缓冲液 (含溴酚蓝染料, 购自北京全式金生物技术有限公司, 规格 $1\text{mL}/\text{支}$), 混匀后点入胶孔中。同时, 点 DNA marker (购自于北京全式金生物技术有限公司, 产品代码 MD101-01) $2\mu\text{L}$ 作为参照。

[0105] 3) 电泳

[0106] 电泳条件: 100V , 100mA , 25 分钟。

[0107] 4) 拍照

[0108] 电泳结束后, 将胶板中的胶块取出, 放在紫外仪下用透射光照射, 同时用照相机拍照。对照 DNA marker, 看是否有相应的内参条带, 其中 B297 引物扩增临床样本的电泳结果图如图 1 所示, 而 B658 引物扩增临床样本的电泳结果图如图 2 所示。在图 1 和图 2 中, 1、2、……、10 分别为提取的 10 个不同细胞样本 DNA 的扩增结果; “-” 为 PCR 扩增阴性对照。由图 1 和图 2 对比可知, B297 引物能够扩增出 10 个样品的内参条带, 而 B658 仅能扩增出 4 个样品的内参条带, 说明单引物扩增临床样本时, B297 引物扩增结果明显优于 B658 引物。因此, 本发明确定内参引物采用 B297 引物, 即如 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列。

[0109] 实施例 3: 用混合引物扩增 DNA

[0110] 本实施例为采用本发明所提供的 DNA 序列扩增实施例 1 所提取的 DNA 样品, 并采用凝胶电泳检测 PCR 产物的正确性。

[0111] 1、混合引物 PCR 扩增

[0112] 1) 在 $20\mu\text{L}$ Eppendorf 管内配制 $25\mu\text{L}$ 反应体系:

[0113] 成份 体积 / μL

[0114] ddH₂O 10.3

[0115] $2\times$ buffer 12.5

[0116] 混合引物 1.2

[0117] 提取的临床样本 DNA 1

[0118] 注: $2\times$ buffer 中含有 Tris-HCl (pH 8.4) 40mM , MgCl_2 20mM , KCl 50mM , $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ 10mM , 每个 dNTP 0.2mM , Taq DNA 多聚酶 $0.08\text{U}/\mu\text{L}$, 引物组合物含有: B297 上、下游引物各 $0.08\mu\text{M}$, HCMV 上、下游引物各 $0.32\mu\text{M}$, HSV1 上、下游引物各 $0.12\mu\text{M}$, HSV1 上、下游引物各 $0.6\mu\text{M}$, 各引物的具体序列如表 2 所示。

[0119] 表 2 PCR 扩增的各引物序列

[0120]

| 基因名称 | 选取长度 | 基因信息 | 引物信息 |
|------|------|------|------------------------|
| | | | 方向 $5' \rightarrow 3'$ |

| | | | |
|------|-------|--------------|---|
| HCMV | 211bp | AY446894.2 | 上游 :ACAGCACCCGACAGAACTCACTT (SEQ ID NO :1) 下游 :CCTGATGATGATGAGATTATGGC (SEQ ID NO :2) |
| HSV1 | 469bp | E03113 | 上游 :ATGGTGAACATCGACATGTACGG (SEQ ID NO :3) 下游 :CCTCGCGTTCGTCCTCGTCCTCC (SEQ ID NO :4) |
| HSV2 | 391bp | EU281626 | 上游 :ATGGTGAACATCGACATGTACGG (SEQ ID NO :5) 下游 :CCTCCTTGTCGAGGCCCGAAAC (SEQ ID NO :6) |
| B297 | 297bp | NC_000007.13 | 上游 :TGACAAGCCATGAGGCTGGTGTA (SEQ ID NO :7) 下游 :GAGTCCATCACGATGCCAGTGGTA (SEQ ID NO :8) |

[0121] 2)PCR 条件 :

[0122] 第一阶段 94℃,5 分钟 ;

[0123] 第二阶段 94℃,30 秒 ;60℃,30 秒 ;72℃,1 分钟 ;32 个循环 ;

[0124] 第三阶段 72℃,10 分钟。

[0125] 2、琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的正确性。

[0126] 1) 制胶 (2%琼脂糖凝胶)

[0127] 称取琼脂糖 0.8g 于三角瓶中,加入 50ml 电泳缓冲液 TAE(购自上海生工生物工程技术服务有限公司,规格为 50×TAE,稀释 50 倍使用),混匀后于微波炉上高火煮 2 分钟(TAE 挥发约 10ml)。取出后冷却到 60℃以下,加入 0.3 μl 核酸染料 Goldview(购自上海赛百盛基因技术有限公司,规格 1ml/支),混匀后倒入两端封闭的胶板中,插入电泳齿梳。待彻底冷却后,去掉两端的封闭,拔掉齿梳,将胶板放入电泳槽中,倒入适量的 TAE 溶液,以刚好浸没胶板为宜。

[0128] 2) 点样

[0129] 取 PCR 产物 6 μl,加入 1 μl 6× 上样缓冲液(含溴酚蓝染料,购自北京全式金生物技术有限公司,规格 1ml/支),混匀后点入胶孔中。同时,点 DNA marker(购自北京全式金生物技术有限公司,规格 100bp,50 次)2 μl 作为参照。

[0130] 3) 电泳

[0131] 电泳条件 :100V,100mA,25 分钟。

[0132] 4) 拍照

[0133] 电泳结束后,将胶板中的胶块取出,放在紫外仪下用透射光照射,同时用照相机拍照。对照标准品,看是否有相应的病毒条带,其中未感染病毒的样品的电泳结果图如图 3A 所示,感染 HCMV 的样品的电泳结果图如图 3B 所示,感染 HSV1 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3C 所示,感染 HSV2 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3D 所示,感染 HCMV 和 HSV1 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3E 所示,感染 HCMV 和 HSV2 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3F 所示,感染 HSV1 和 HSV2 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3G 所示,感染 HCMV、HSV1 和 HSV2 的 DNA 样品的电泳结果图如图 3H 所示。

[0134] 实施例 4:微流体芯片检测样本的方法

[0135] 本实施例采用微流体芯片检测实施例 3 中所扩增出的 DNA 样品。微流体芯片检测样本具体包括以下操作步骤:

[0136] 1) 接通 MS-CE-1 型毛细管电泳仪(购自宁波美生医疗器材有限公司)电源,仪器预热 30 分钟。

[0137] 2) 连接检测池与主机箱正面输出接口,在缓冲溶液瓶中加入新配制好的缓冲溶液(2% HPMC-50,80mM MES,40mM Tris),将电极和毛细管的两端浸在缓冲溶液中,保持毛细管两端出口在同一水平面上,且毛细管内必须充满缓冲溶液,关好仪器正门,确认仪器各部分连接正确后,按动高压启动按钮,如果发生异常应立即按动高压关断钮,检查并排除故障后,再重新加压。

[0138] 3) 电进样:用样品瓶更换样品支架上的缓冲溶液瓶,插入电极及毛细管,关好正门后施加 380 伏的电压,达到预定时间 30 秒后断开高压,换上缓冲溶液瓶后即可开始实验。

[0139] 4) 流体压差进样:将样品瓶放在高度差进样部件上,根据需要调整进样高度,然后把毛细管的进样端插入样品池中,待达到预定时间后取出放入有缓冲溶液的进样支架中即可开始实验。

[0140] 5) 根据实验需要设定仪器工作参数。其中进样电压为 380v,电泳电压为 700v。

[0141] 6) 等待仪器各部分工作正常后,将微流体芯片置于支架上,调节芯片位置,使检测光束通过距芯片进样点 1cm 处。运行进样及电泳程序,当 DNA 条带通过检测点时,其信息由数据采集系统记录下来,并转化为电信号,即开始样品的分析工作。

[0142] 7) 实验结束后关闭电源,用蒸馏水冲洗毛细管 30 分钟,或将缓冲溶液保持在毛细管中,即将毛细管置于压力清洗装置中。

[0143] 按照上述方法检测实施例 3 中所扩增出的 DNA 样品,其中未感染病毒的样品的微流体芯片检测结果图如图 4A 所示,感染 HCMV 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4B 所示,感染 HSV1 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4C 所示,感染 HSV2 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4D 所示,感染 HCMV 和 HSV1 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4E 所示,感染 HCMV 和 HSV2 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4F 所示,感染 HSV1 和 HSV2 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4G 所示,感染 HCMV、HSV1 和 HSV2 的 DNA 样品的微流体芯片检测结果图如图 4H 所示。

[0144] 实施例 5:本发明的引物组合物的灵敏度、特异性和重复性

[0145] 本实施例对本发明所提供引物组合物的灵敏度、特异性和重复性进行了检测。

[0146] 1、引物组合物的灵敏度

[0147] 参照实施例 4 中的方法对含有不同 HCMV、HSV1、HSV2 和 B297 拷贝数的质粒（质粒构建：委托上海捷瑞生物工程有限公司合成，连接至 PGH 载体）进行稀释并扩增验证混合引物的灵敏度，所得到的微流体芯片检测结果见图 5A～图 5D。

[0148] 由图可知，本发明提供的引物组合物能够检测出 HCMV、HSV1、HSV2 的最低拷贝数为 1×10^4 。

[0149] 2、引物组合物的特异性

[0150] 参照实施例 4 中的方法对含有 HCMV、HSV1、HSV2 和 B297 的质粒进行稀释并扩增验证混合引物的特异性，具体结果如图 6A 和图 6B 所示，其中图 6A 为阳性结果，即用混合引物对 4 种质粒进行扩增，结果显示可全部扩增出来。图 6B 为阴性结果，即用混合引物对阴性对照（ddH₂O）进行扩增，显示没有任何扩增条带。以上结果说明，混合引物的特异性良好。

[0151] 由图可知，本发明提供的混合引物能够特异性的扩增出目标产物。

[0152] 3、引物组合物的重复性

[0153] 参照实施例 4 中的方法对含有 HCMV、HSV1、HSV2 和 B297 的质粒进行稀释并扩增不同批次以验证混合引物的重复性，具体结果如图 7A、图 7B 和图 7C 所示。

[0154] 由图可知，本发明提供的混合引物对不同的扩增均具有较好的重复性。

序列表

<110> 宁波基内生物技术有限公司

<120> 用于检测人巨细胞病毒和 / 或单纯疱疹病毒的引物、试剂盒及方法

<130> DIC09110171

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

acagcacccg acagaactca ctt

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

cctgatgatg atgagattat ggc

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atggtgaaca tcgacatgta cgg

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400>4

cctcgcgttc gtcctcgtec tcc

23

<210>5

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>5

atggtgaaca tcgacatgta cgg

23

<210>6

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>6

cctccttgte gaggccccga aac

23

<210>7

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>7

tgacaaggcc atgaggctgg tgta

24

<210>8

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>8

gagtccatca cgatgccagt ggta

24

<210>9

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>9

cgccctttct cactggttct ctct

24

<210>10

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<400>10

ccttaatgtc acgcacgatt tccc

24

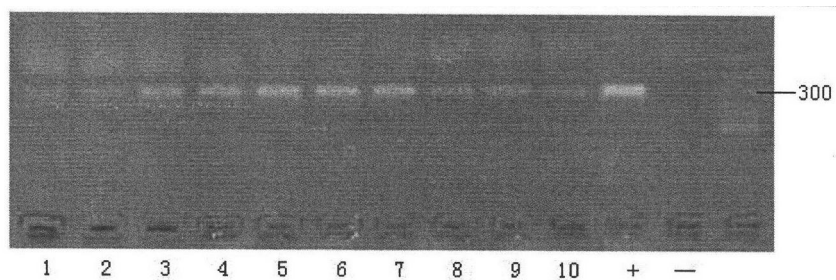


图 1

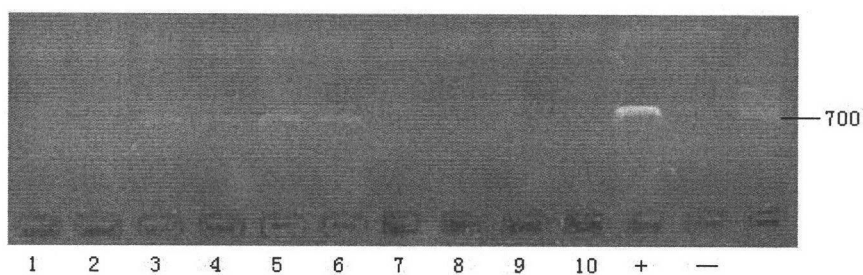


图 2

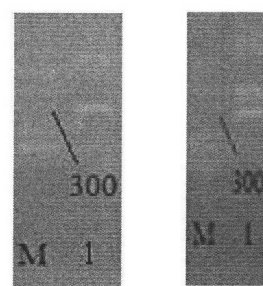


图 3A

图 3B

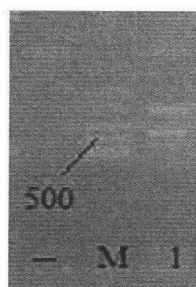


图 3C



图 3D

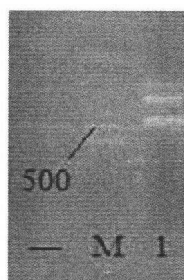


图 3E

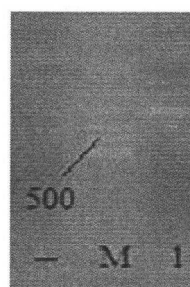


图 3F

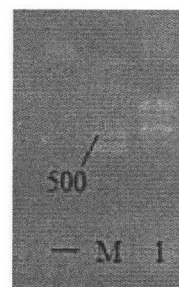


图 3G

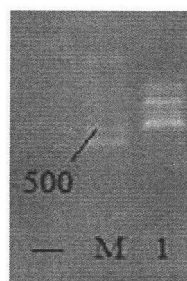


图 3H

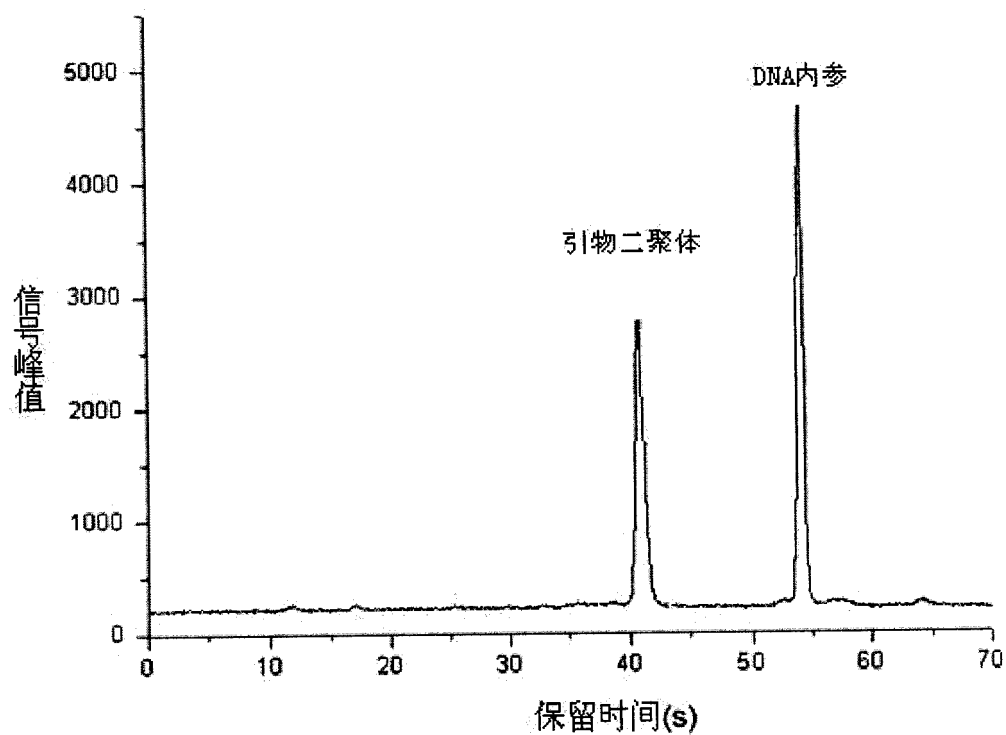


图 4A

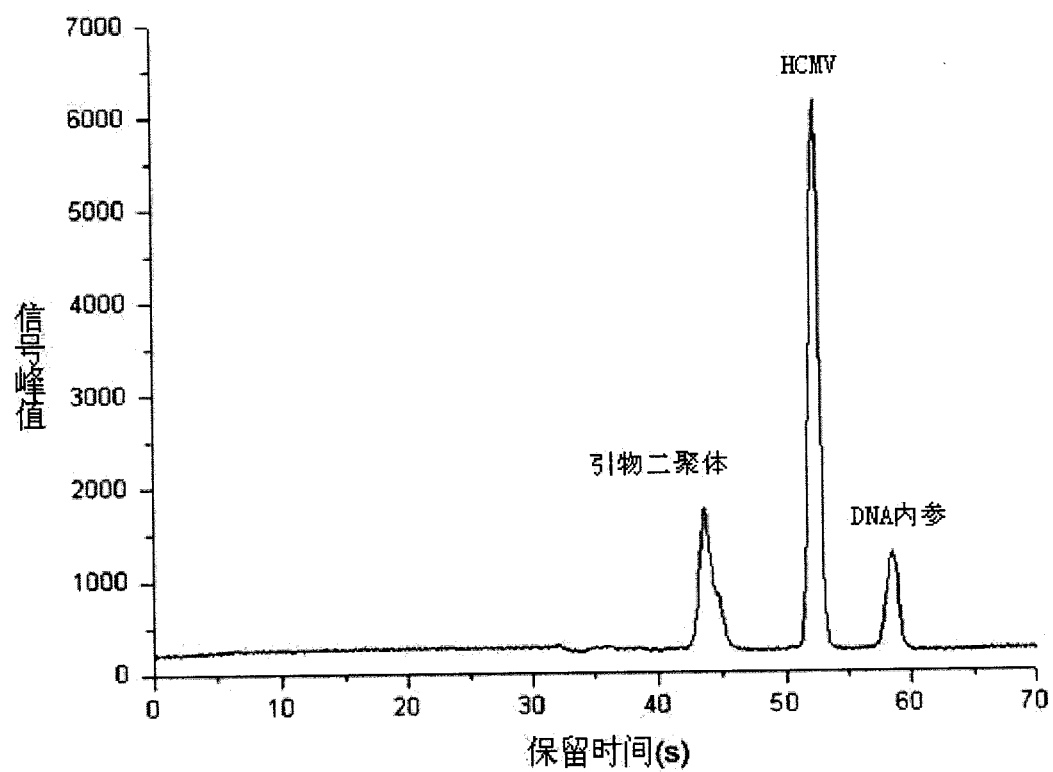


图 4B

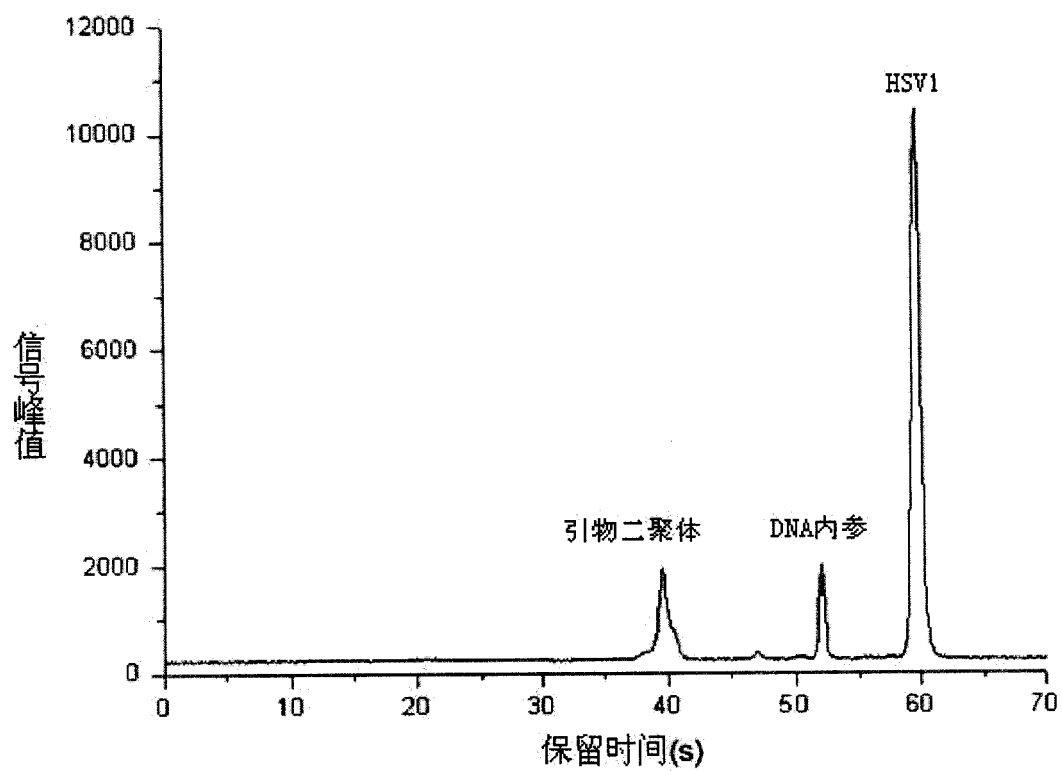


图 4C

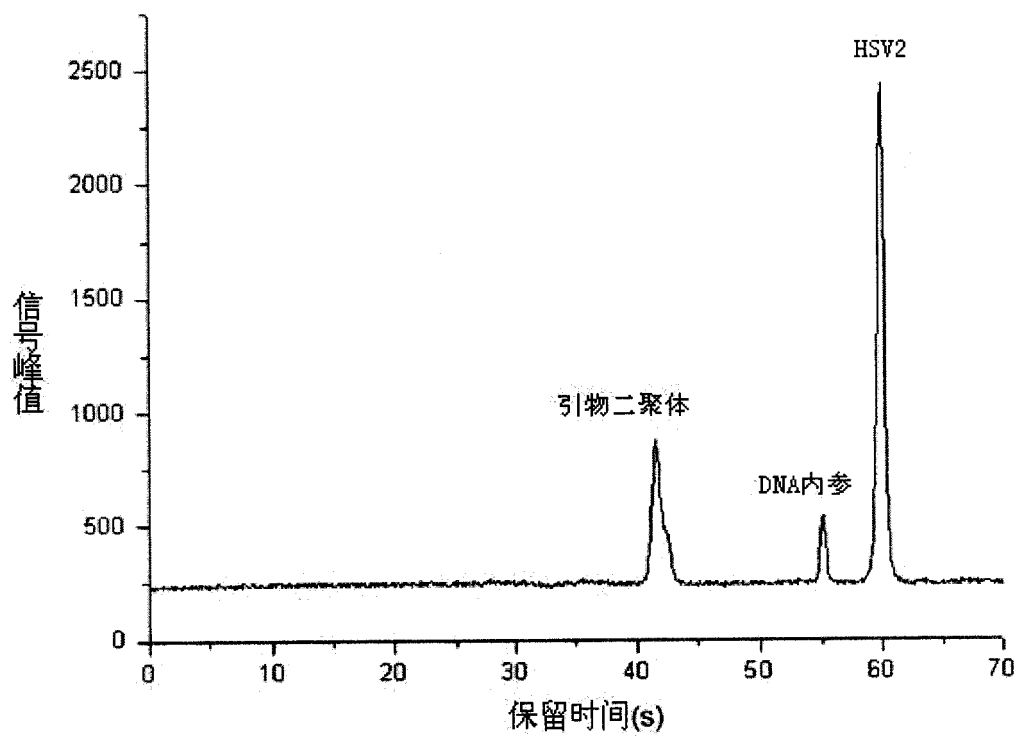


图 4D

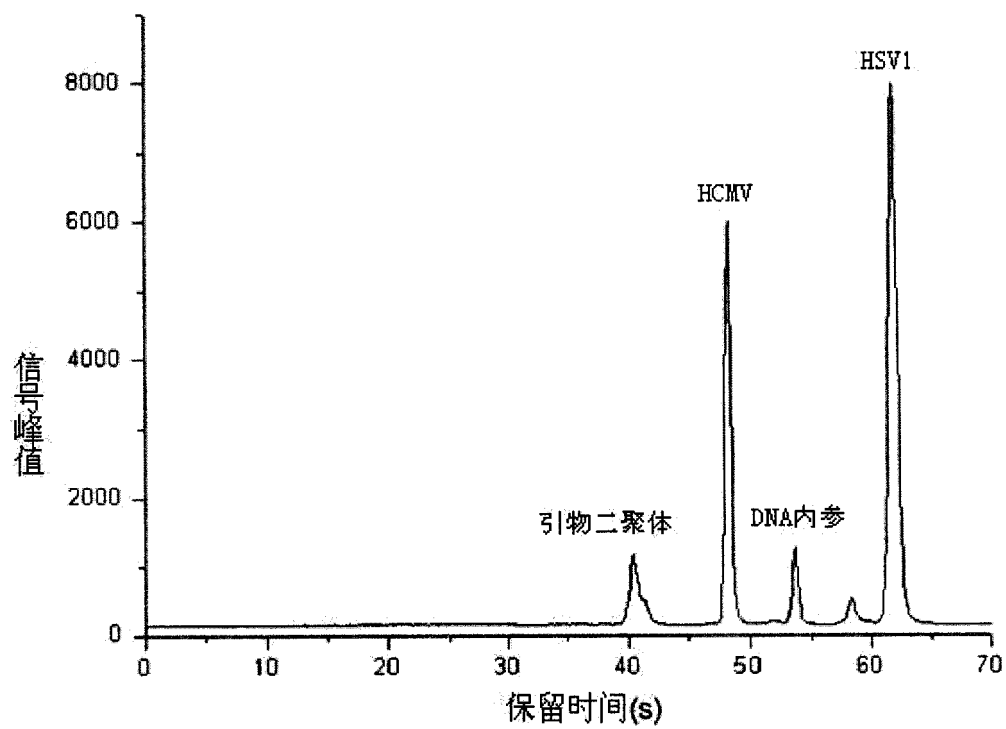


图 4E

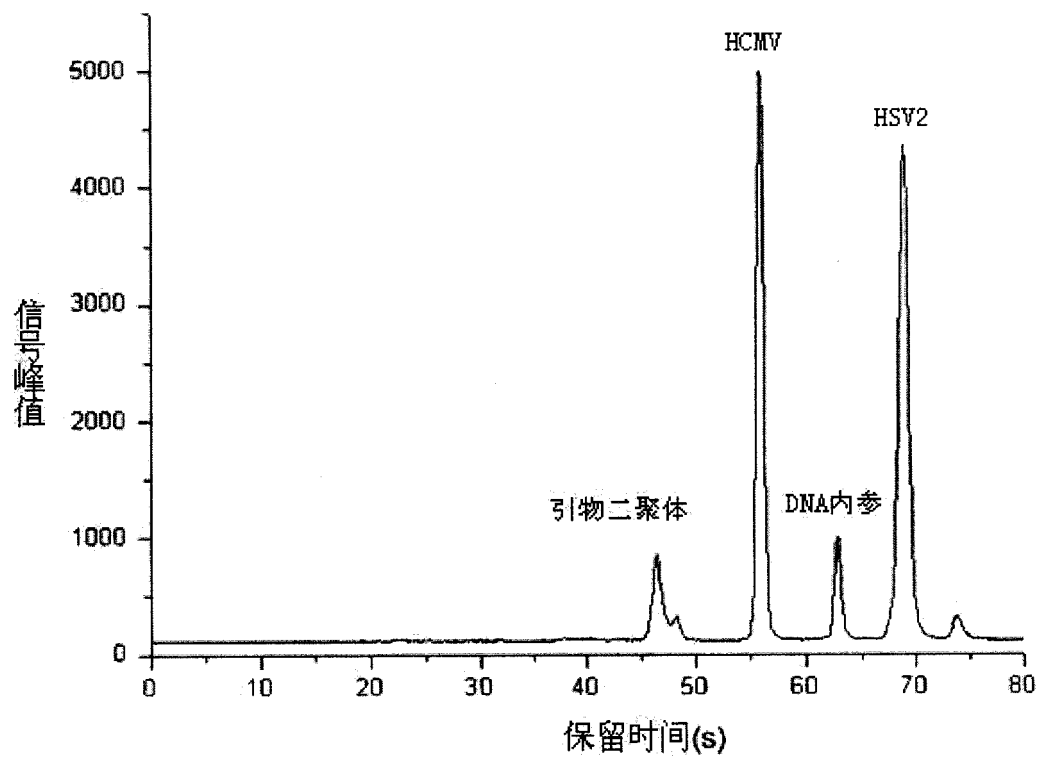


图 4F

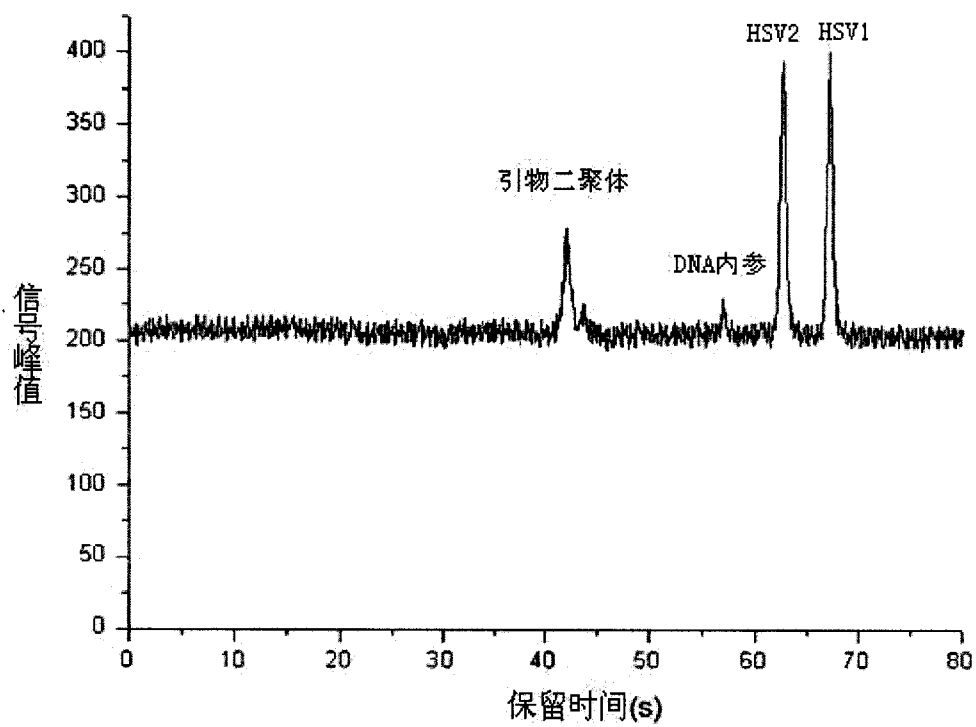


图 4G

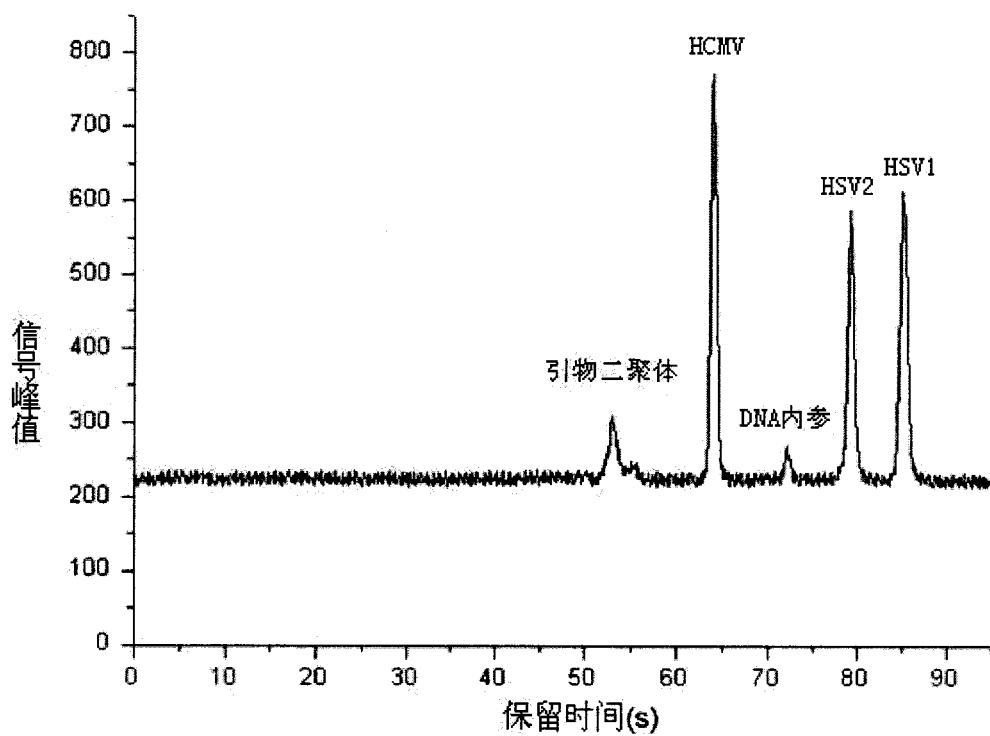


图 4H

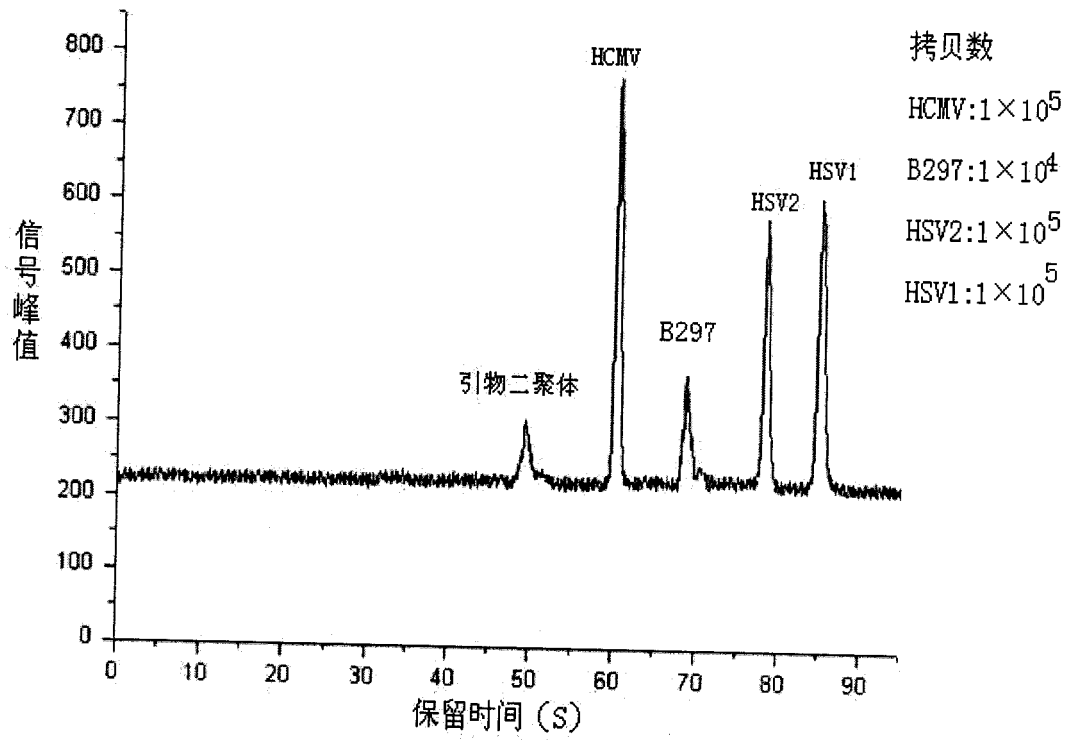


图 5A

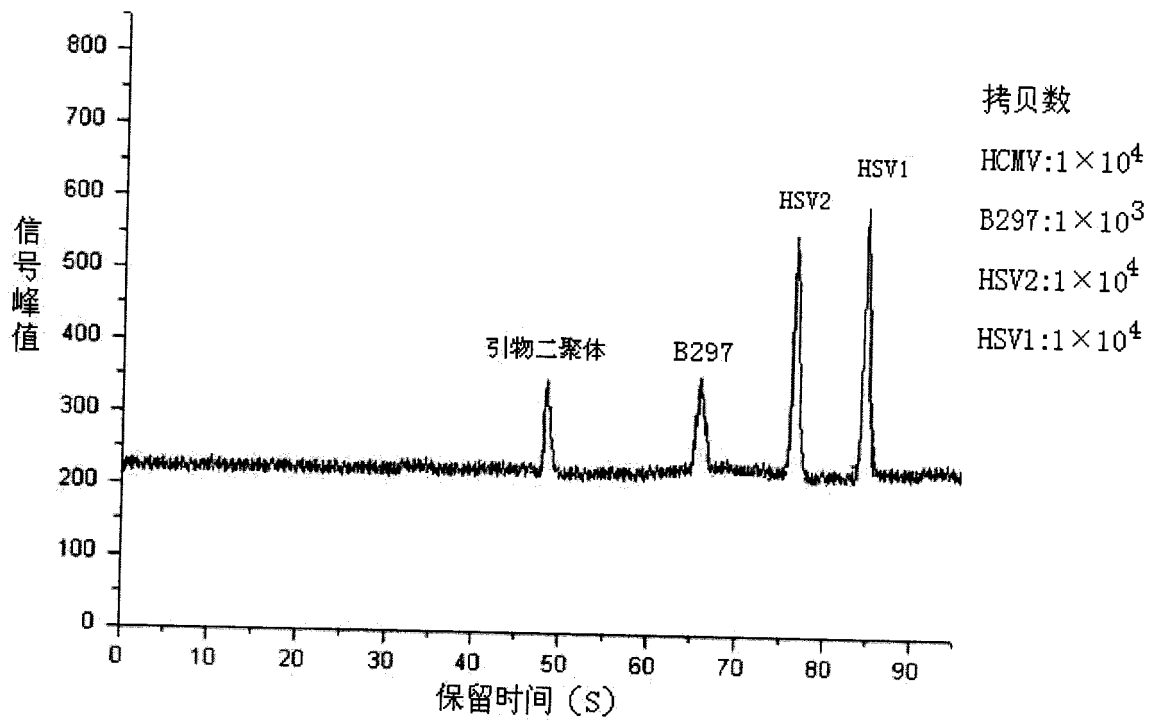


图 5B

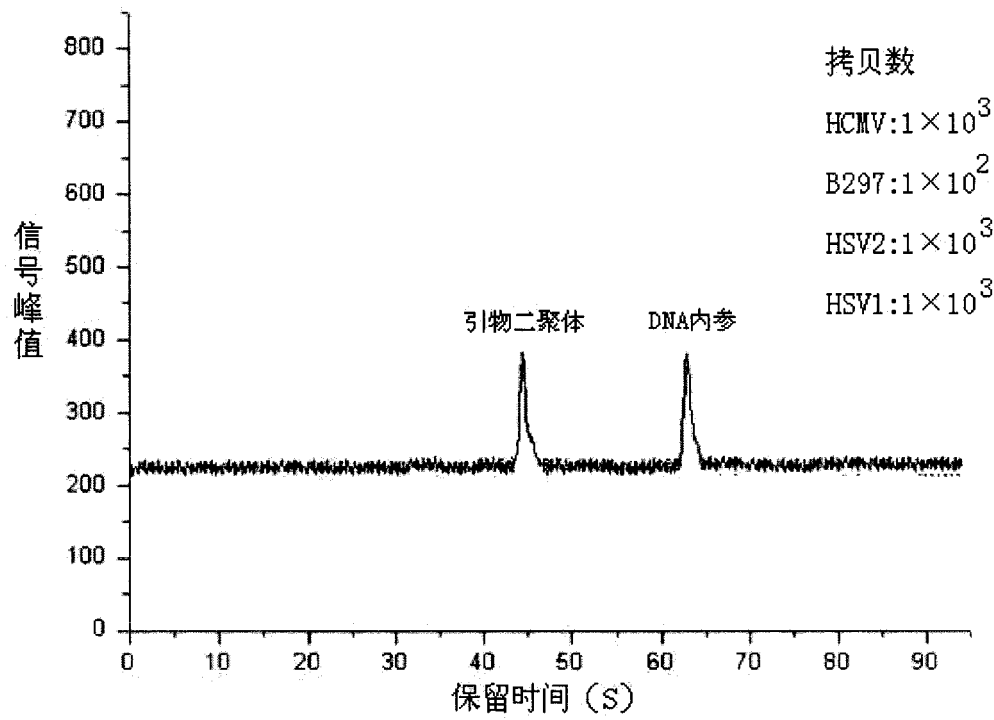


图 5C

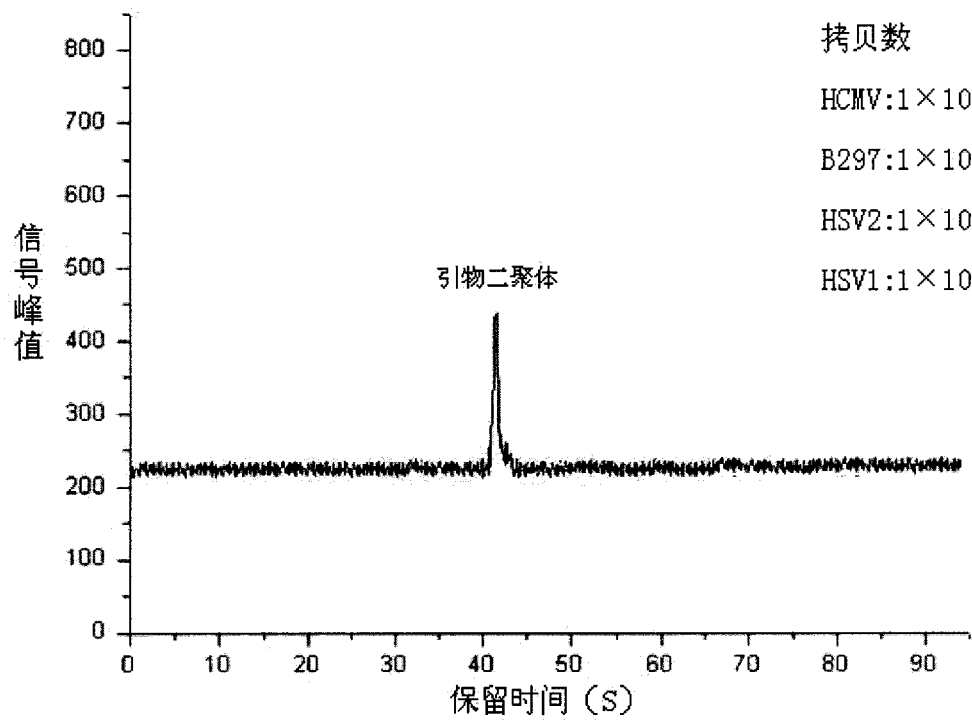


图 5D

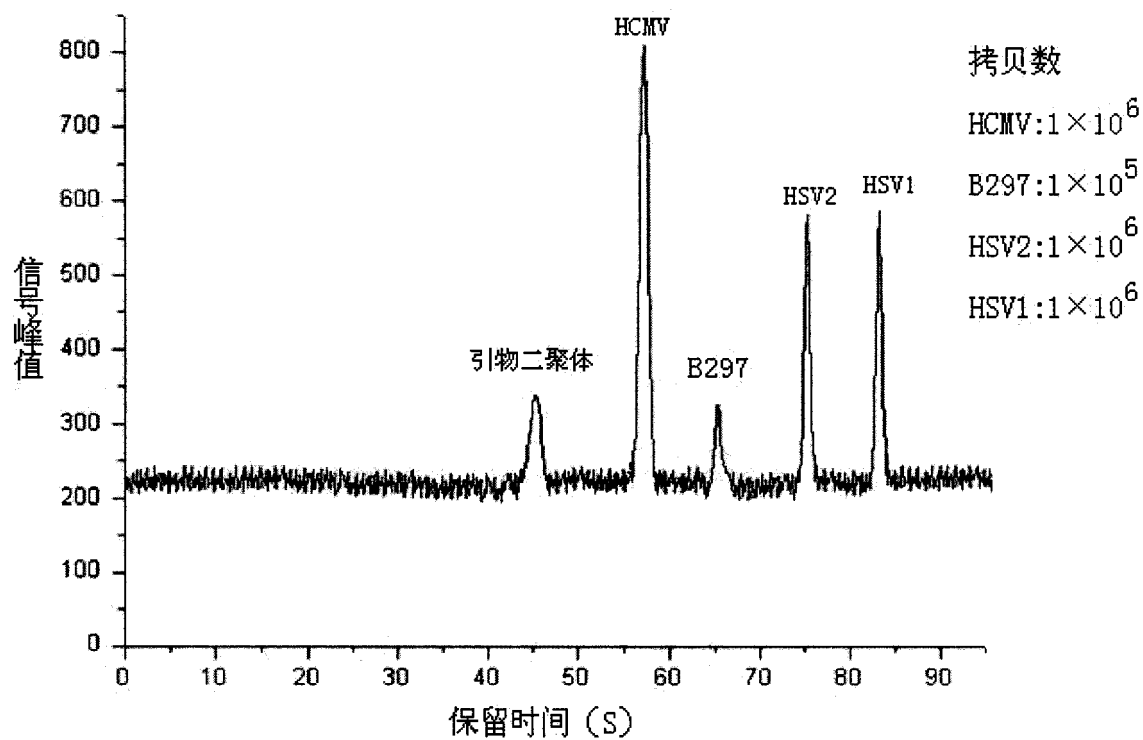


图 6A

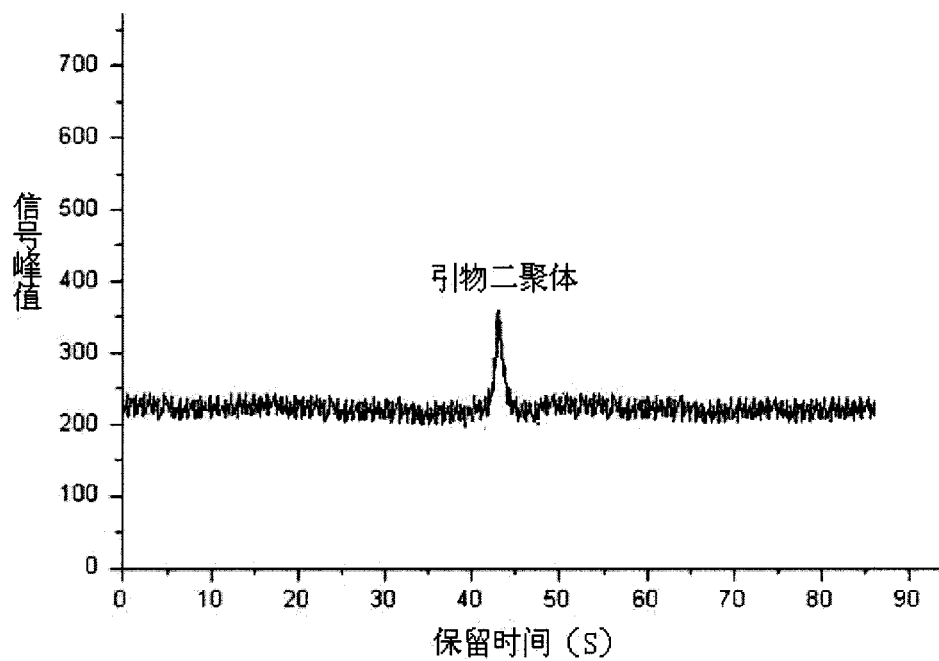


图 6B

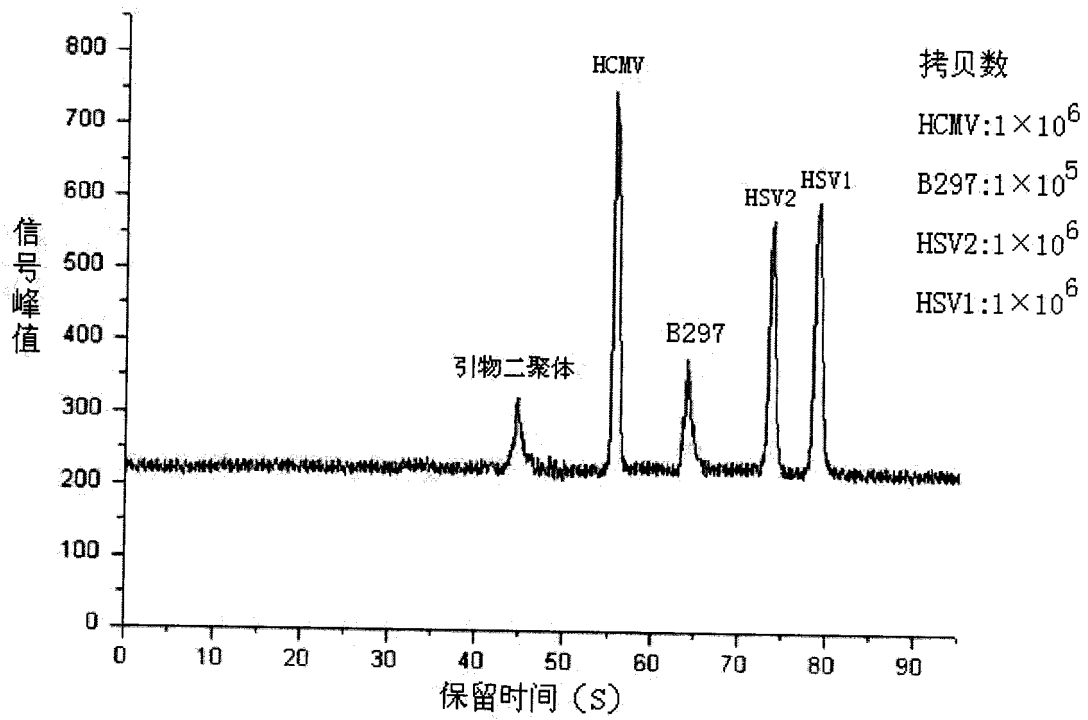


图 7A

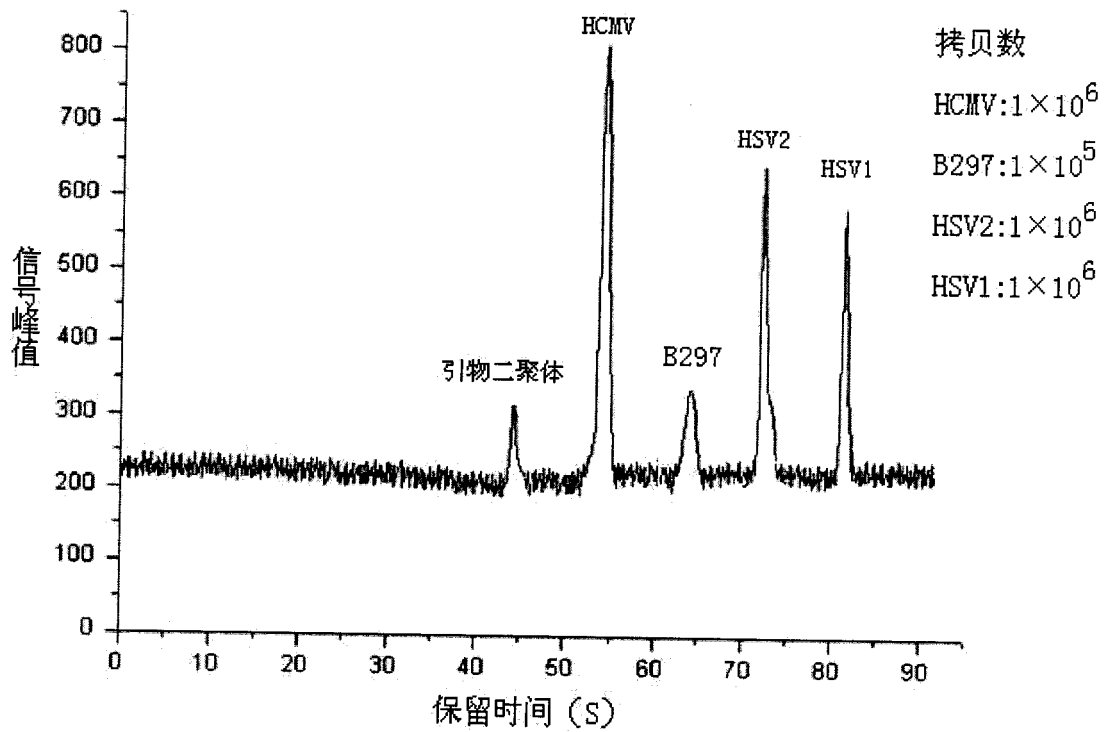


图 7B

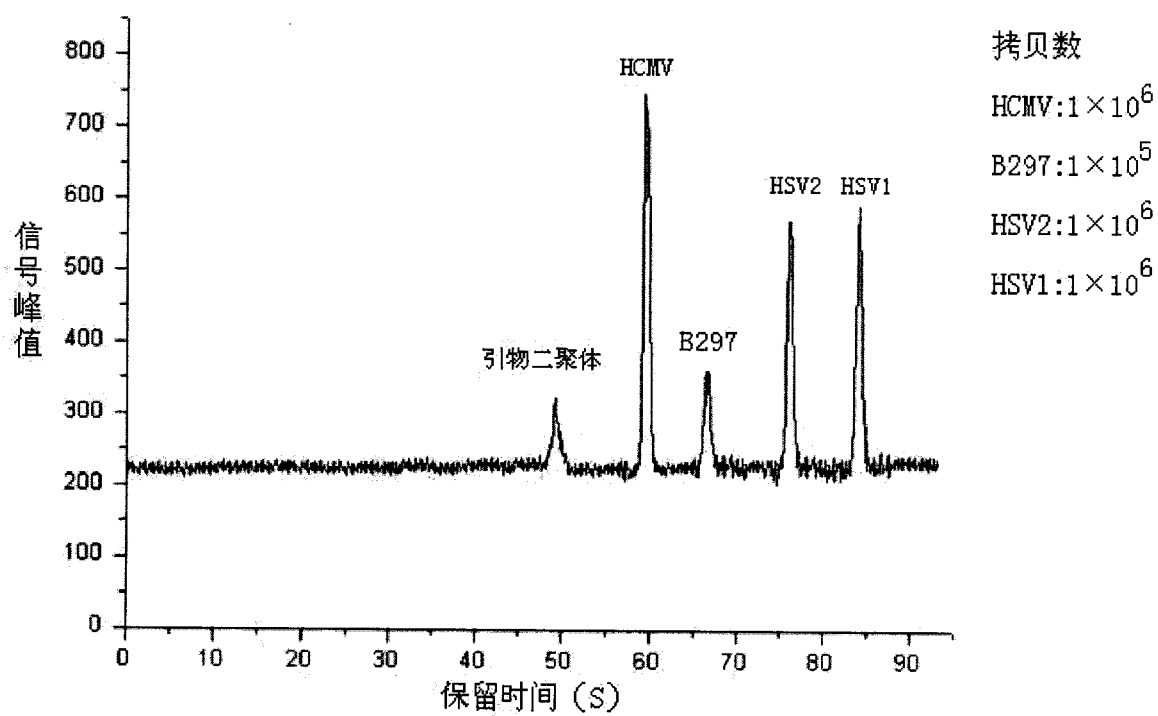


图 7C