



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110656161 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201810685135.4

(22)申请日 2018.06.28

(71)申请人 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

申请人 上海源奇生物医药科技有限公司

(72)发明人 陶慧卿 熊慧 谢立群 李云航
俞浩 杨建清

(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

代理人 胡剑辉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页
序列表9页

(54)发明名称

用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管
电泳试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本申请涉及基因检测领域,具体讲,涉及一种用于检测人免疫球蛋白基因重排毛细管电泳试剂盒及其使用方法。本申请的试剂盒包括核酸扩增试剂和对照品。本申请试剂盒采用PCR加毛细管电泳技术,具有操作简单、检测速度快、灵敏度高、检测结果直观易懂、诊断准确率高的技术优势。

1. 一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒,其特征在于,所述毛细管电泳试剂盒包括核酸扩增试剂和对照品;

其中,所述核酸扩增试剂包括以下组分:

组份	组份中含有
免疫球蛋白重链 A PCR 反应液	由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示的引物; 由SEQ ID NO:30所示的荧光引物;
免疫球蛋白重链 B PCR 反应液	由 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 所示的引物; 由 SEQ ID NO:30 所示的荧光引物;
免疫球蛋白重链 D PCR 反应液	由 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22 所示的引物; 由 SEQ ID NO:31 所示的荧光引物;
免疫球蛋白 κ 轻链 A PCR 反应液	由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28 所示的引物; 由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 所示的荧光引物;
免疫球蛋白 κ 轻链 B PCR 反应液	由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 所示的引物; 由 SEQ ID NO:34 所示的荧光引物;
质控 PCR 反应液	由 SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42 所示的引物; 由 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41 所示的荧光引物;
DNA 聚合酶液	DNA 聚合酶;

所述荧光引物的5'端标记有荧光基团;

所述对照品包括以下组分:

组分	组分中的主要成分
阳性对照 1	由 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46 所示的质粒；
阳性对照 2	由 SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 所示的质控质粒；
空白对照	工艺用水。

2. 根据权利要求1所述的毛细管电泳试剂盒,其特征在于,SEQ ID NO:30的5'端标记有FAM,SEQ ID NO:31的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:32的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:33的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:34的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41的5'端均标记有Rox。

3. 根据权利要求1所述的毛细管电泳试剂盒,其特征在于,所述核酸扩增试剂中各引物的浓度为:

所述免疫球蛋白重链A PCR反应液中SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:30的浓度为0.25 μ M;

所述免疫球蛋白重链B PCR反应液中SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:30的浓度为0.25 μ M;

所述免疫球蛋白重链D PCR反应液中SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:31的浓度为0.25 μ M;

所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28的浓度为0.125 μ M; SEQ ID NO:25的浓度为0.25 μ M; SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5 μ M; SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33的浓度为0.125 μ M;

所述免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29的浓度为0.25 μ M; SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5 μ M; SEQ ID NO:34的浓度为0.25 μ M;

所述质控PCR反应液中SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36的浓度为0.125 μ M; SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38的浓度为0.25 μ M; SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40的浓度为0.375 μ M; SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42的浓度为0.75 μ M。

4. 根据权利要求3所述的毛细管电泳试剂盒,其特征在于,所述免疫球蛋白重链A PCR反应液、所述免疫球蛋白重链B PCR反应液、所述免疫球蛋白重链D PCR反应液、所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液、所述免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液、所述质控PCR反应液中还含有1.5mM的Mg²⁺和125 μ M的dNTPs。

5. 根据权利要求1所述的毛细管电泳试剂盒,其特征在于,所述免疫球蛋白重链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR1-JH的295bp~378bp重排片段;所述免疫球蛋白重链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR2-JH的236bp~307bp重排片段;所述免疫球蛋白重链D PCR反应液的有效检测范围为目的基因DH-JH的102bp~296bp和384bp~429bp重排片段;所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Jk的120bp~

160bp、190bp~210bp和260bp~300bp重排片段；所述免疫球蛋白κ轻链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Kde和intron-Kde的210bp~250bp、265bp~300bp和350bp~390bp重排片段。

6. 根据权利要求1所述的毛细管电泳试剂盒，其特征在于，所述毛细管电泳试剂盒所适用的样本选自石蜡包埋切片和骨髓样本。

7. 一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的引物，其特征在于，所述引物的序列为：

由SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42所示的引物；由SEQ ID NO:30~SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41所示的荧光引物；

所述荧光引物的5'端标记有荧光基团。

8. 根据权利要求7所述的引物，其特征在于，SEQ ID NO:30的5'端标记有FAM，SEQ ID NO:31的5'端标记有Tamara，SEQ ID NO:32的5'端标记有Hex，SEQ ID NO:33的5'端标记有Hex，SEQ ID NO:34的5'端标记有Tamara，SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41的5'端均标记有Rox。

9. 一种如权利要求1~6任一项所述的毛细管电泳试剂盒的使用方法，其特征在于，至少包括以下步骤：

(1) 扩增试剂准备：从毛细管电泳试剂盒中取出免疫球蛋白重链A PCR反应液、免疫球蛋白重链B PCR反应液、免疫球蛋白重链D PCR反应液，免疫球蛋白κ轻链A PCR反应液、免疫球蛋白κ轻链B PCR反应液和质控PCR反应液，分别加入DNA聚合酶液，得到相应的PCR预混液；

(2) 加样：从样本DNA液、阳性对照1和空白对照中分别取样，分别加至免疫球蛋白重链A PCR预混液、免疫球蛋白重链B PCR预混液、免疫球蛋白重链D PCR预混液、免疫球蛋白κ轻链A PCR预混液、免疫球蛋白κ轻链B PCR预混液中；从样本DNA液、阳性对照2和空白对照中分别取样，分别加至质控PCR预混液中；

(3) PCR扩增；

(4) 毛细管电泳：将免疫球蛋白重链A PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合，将免疫球蛋白重链B PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合，将免疫球蛋白重链D PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合，将免疫球蛋白κ轻链A PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合，将免疫球蛋白κ轻链B PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合，变性后冷却，进行毛细管电泳；

(5) 处理和分析数据。

用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本申请涉及基因检测领域,具体讲,涉及一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 恶性淋巴瘤(malignant lymphoma)是免疫系统的原发性恶性肿瘤,主要发生于淋巴器官和淋巴组织。恶性淋巴瘤分为霍奇金淋巴瘤(HL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)两类,在我国,NHL的发病率在恶性淋巴瘤中占绝对优势(95%),其中又以B-NHL占绝大多数。

[0003] 淋巴瘤的临床诊断主要依靠淋巴结活检病理的组织形态学检查,由于淋巴结内的细胞增生十分活跃,各种分化阶段的细胞混杂在一起,形态学诊断时更多的依赖常年的工作经验和临床判断。有时,即使在高年病理医师之间,某个病例应当诊断为反应性淋巴结增生还是淋巴瘤,往往容易产生争议。因此,需要寻找一个用于临床评估NHL的快速、特异性强、敏感性高的方法。

[0004] 随着分子生物学理论和技术的发展,从基因水平研究和分析诊断疾病的技术不断出现并且日趋成熟。早至2001年,WHO淋巴瘤新分类以病理组织学为基础,结合免疫组化、基因分析的诊断方案就体现了这一发展趋势。

[0005] 分子诊断技术对判断淋巴瘤具有独特的客观优势。B淋巴细胞个体发生中常常可见抗原受体基因的重排,这些基因重排产物在长度和序列上均是唯一的,因此利用聚合酶链式反应(PCR)鉴定抗原受体基因中的重排情况能够判断检测的淋巴细胞群体是否起源于同一细胞,这为淋巴细胞恶性病变诊断提供了又一分析指标。

[0006] 目前针对免疫球蛋白基因重排检测常用的方法有以下几种:

[0007] Southern印迹杂交和PCR电泳技术(PCR+琼脂糖凝胶电泳、PCR+毛细管电泳)均可检测这一重排基因,以判别克隆性质。

[0008] Southern杂交是分子生物学的经典实验方法。其基本原理是将待检测的DNA样品固定在固相载体上,与标记的核酸探针进行杂交,如果待检物中含有与探针互补的序列,则二者通过碱基互补的原理进行结合,游离探针洗涤后用自显影或其它合适的技术进行检测,从而显示出待检的片段及其相对大小。该项技术广泛被应用在遗传病检测、DNA指纹分析和PCR产物判断等研究中。

[0009] Southern Blot技术的检测结果可靠,但该技术需要制备探针,经Southern印迹,分子杂交,放射自显影等步骤,步骤繁杂、费时,并需要较大的DNA且为新鲜或冰冻组织,同时有放射性同位素污染,敏感性较低(5%~10%)等缺点,制约了它在实际临床病理中的应用。

[0010] PCR+琼脂糖凝胶电泳技术是在模板DNA、引物和四种脱氧核糖核苷酸存在下,依赖于DNA聚合酶的酶促合成反应。DNA聚合酶以单链DNA为模板,借助一小段双链DNA来启动合成,通过一个或两个人工合成的寡核苷酸引物与单链DNA模板中的一段互补序列结合,形成

部分双链。在适宜的温度和环境下，DNA聚合酶将脱氧单核苷酸加到引物3'-OH末端，并以此为起始点，沿模板5'→3'方向延伸，合成一条新的DNA互补链。

[0011] PCR+琼脂糖凝胶电泳技术具有灵敏度高、简便、快速、对标本的要求低、成本低、易推广的优点。但需通过琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色和紫外光进行观察，费时费力，且染色剂溴化乙锭对人体又有害，这些繁杂的实验过程给污染和假阳性提供了机会。并且分辨率低，大约为20bp，容易误判。

[0012] 鉴于此，特提出本申请。

发明内容

[0013] 本申请的发明目的在于提出一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的试剂盒及其使用方法。

[0014] 为了完成本申请的目的，采用的技术方案为：

[0015] 本申请提出一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒，包括核酸扩增试剂和对照品；

[0016] 其中，所述核酸扩增试剂包括以下组分，具体如表1所示：

[0017] 表1

组份	组份中含有
免疫球蛋白重链A PCR 反应液	由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示的引物；由SEQ ID NO:30所示的荧光引物；
免疫球蛋白重链B PCR 反应液	由 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16所示的引物；由 SEQ ID NO:30 所示的荧光引物；
免疫球蛋白重链D PCR 反应液	由 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22 所示的引物；由 SEQ ID NO:31 所示的荧光引物；
免疫球蛋白κ轻链A PCR 反应液	由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28 所示的引物；由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 所示的荧光引物；
免疫球蛋白κ轻链B PCR 反应液	由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 所示的引物；由 SEQ ID NO:34 所示的荧光引物；
质控 PCR 反应液	由 SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42 所示的引物；由 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41 所示的荧光引物；
DNA 聚合酶液	DNA 聚合酶；

[0018] 所述荧光引物的5'端标记有荧光基团；

[0020] 所述对照品包括以下组分,具体如表2所示:

[0021] 表2

[0022]	组分	组分中的主要成分
	阳性对照 1	由 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46 所示的质粒;
[0023]	阳性对照 2	由 SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 所示的质控质粒;
	空白对照	工艺用水。

[0024] 可选的,SEQ ID NO:30的5'端标记有FAM,SEQ ID NO:31的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:32的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:33的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:34的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41的5'端均标记有Rox。

[0025] 可选的,所述核酸扩增试剂中各引物的浓度为:

[0026] 所述免疫球蛋白重链A PCR反应液中SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:30的浓度为0.25 μ M;所述免疫球蛋白重链B PCR反应液中SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:30的浓度为0.25 μ M;所述免疫球蛋白重链D PCR反应液中SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:31的浓度为0.25 μ M;所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28的浓度为0.125 μ M;SEQ ID NO:25的浓度为0.25 μ M;SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5 μ M;SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33的浓度为0.125 μ M;所述免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29的浓度为0.25 μ M;SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5 μ M;SEQ ID NO:34的浓度为0.25 μ M;所述质控PCR反应液中SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36的浓度为0.125 μ M;SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38的浓度为0.25 μ M;SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40的浓度为0.375 μ M;SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42的浓度为0.75 μ M。

[0027] 可选的,所述免疫球蛋白重链A PCR反应液、所述免疫球蛋白重链B PCR反应液、所述免疫球蛋白重链D PCR反应液、所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液、所述免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液、所述质控PCR反应液中还含有1.5mM的Mg²⁺和125 μ M的dNTPs。

[0028] 可选的,所述免疫球蛋白重链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR1-JH的295bp~378bp重排片段;所述免疫球蛋白重链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR2-JH的236bp~307bp重排片段;所述免疫球蛋白重链D PCR反应液的有效检测范围为目的基因DH-JH的102bp~296bp和384bp~429bp重排片段;所述免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Jk的120bp~160bp、190bp~210bp和260bp~300bp重排片段;所述免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Kde和intron-Kde的210bp~250bp、265bp~300bp和350bp~390bp重排片段。

[0029] 可选的,所述毛细管电泳试剂盒所适用的样本选自石蜡包埋切片和骨髓样本。

[0030] 本申请还涉及一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的引物,所述引物的序列为:由SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42所示的引物;由SEQ ID NO:30~SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41所示的荧光引物;所述荧光引物的5'端标记有荧光基团。

[0031] 可选的,SEQ ID NO:30的5'端标记有FAM,SEQ ID NO:31的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:32的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:33的5'端标记有Hex,SEQ ID NO:34的5'端标记有Tamara,SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41的5'端均标记有Rox。

[0032] 本申请还涉及上述毛细管电泳试剂盒的使用方法,至少包括以下步骤:

[0033] (1) 扩增试剂准备:从毛细管电泳试剂盒中取出免疫球蛋白重链A PCR反应液、免疫球蛋白重链B PCR反应液、免疫球蛋白重链D PCR反应液,免疫球蛋白κ轻链A PCR反应液、免疫球蛋白κ轻链B PCR反应液和质控PCR反应液,分别加入DNA聚合酶液,得到相应的PCR预混液;

[0034] (2) 加样:从样本DNA液、阳性对照1和空白对照中分别取样,分别加至免疫球蛋白重链A PCR预混液、免疫球蛋白重链B PCR预混液、免疫球蛋白重链D PCR预混液,免疫球蛋白κ轻链A PCR预混液、免疫球蛋白κ轻链B PCR预混液中;从样本DNA液、阳性对照2和空白对照中分别取样,分别加至质控PCR预混液中;

[0035] (3) PCR扩增;

[0036] (4) 毛细管电泳:将免疫球蛋白重链A PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合,将免疫球蛋白重链B PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合,将免疫球蛋白重链D PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合,将免疫球蛋白κ轻链A PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合,将免疫球蛋白κ轻链B PCR扩增产物、质控PCR扩增产物与毛细管电泳试剂混合,变性后冷却,进行毛细管电泳;

[0037] (5) 处理和分析数据。

[0038] 本申请的技术方案至少具有以下有益的效果:

[0039] 本申请的毛细管电泳试剂盒采用PCR+毛细管电泳技术,即基因扫描技术(GeneScan),具有以下技术优势。

[0040] 本申请的毛细管电泳试剂盒的操作简单,检测速度快,只须在PCR结束后直接上机进行毛细管电泳,四个小时即可获得结果,因此操作简便、省时、减少污染,远胜于SouthernBlot技术和琼脂糖凝胶电泳。

[0041] 本申请的毛细管电泳试剂盒的灵敏度高,只需少量骨髓和石蜡包埋组织标本,利用特异性荧光引物,通过激光激发荧光,荧光信号被CCD收集进行分析。与SouthernBlot技术相比,灵敏度大为提高。

[0042] 本申请的毛细管电泳试剂盒的检测结果直观易懂,诊断准确率高,基因扫描技术的分辨率高达1bp,远高于琼脂糖凝胶电泳法。

[0043] 本申请的毛细管电泳试剂盒专门针对中国人群进行设计,从而显著提高了中国人群检出率。

[0044] 下面结合具体实施例,进一步阐述本申请。应理解,这些实施例仅用于说明本申请而并不用于限制本申请的范围。

具体实施方式

[0045] 本申请实施例涉及一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒,由免疫球蛋白重链基因及免疫球蛋白 κ 轻链多组特异性荧光引物、特异性引物以及DNA聚合酶液等成分组成,采用PCR体外扩增的方法,在一条PCR引物的5'端标记荧光染料,在PCR扩增时,PCR产物带上荧光标记,然后采用高分辨率胶电泳(毛细管电泳)对扩增产物片断进行分离,通过荧光检测系统(如ABI测序仪)确定扩增片断的长度和荧光信号高度,判断检测的标本是否存在发生克隆重排的细胞群体。

[0046] 基于PCR的检测常被用于鉴定克隆性B细胞群。由于抗原受体基因的多态性(组成了异质性群体),因此很难仅用一套引物扩增发生V-J重排的所有保守区域,而N-端的多样性以及体细胞突变则使该区域的DNA序列分析更为复杂。因此,需要靶向各个区域的多重引物方能鉴定发生克隆重排的细胞群。本申请实施例的毛细管电泳试剂盒的核酸扩增试剂免疫球蛋白重链A用于扩增IGH可变区中FR1区和保守的J区,免疫球蛋白重链B用于扩增IGH可变区中FR2区和保守的J区,免疫球蛋白重链D用于扩增D区和J区。免疫球蛋白 κ 轻链A扩增IGK可变区(V)和连接区(J),免疫球蛋白 κ 轻链轻链B检测V区、Jk-Ck内含子区及Kde区。这些保守区域主要位于B细胞成熟过程中发生基因重排的互补决定区(CDR3)V-J区域两侧。发生重排的抗原受体基因主要为B细胞免疫球蛋白重链和轻链,每个B细胞的V-J重排在长度和序列上均是唯一的。因此,从正常或者多克隆细胞群扩增V-J区域得到的预期扩增片段在毛细管电泳图上表现为钟形曲线(高斯分布)。高斯分布说明检测的标本中存在发生V-J重排的异质性细胞群体(在某些情况下,若无淋巴细胞DNA则无相应的产物生成)。含有克隆性群体的样品DNA扩增在降低的多克隆背景下往往可见1个或者2个明显的扩增峰。本申请的毛细管电泳试剂盒专门针对中国人群进行设计,从而显著提高了中国人群检出率。

[0047] 具体的,本申请实施例的毛细管电泳试剂盒具体如表3所示:

[0048] 表3

编号	组分	组分中的主要成分
1	核酸 扩增 试剂	免疫球蛋白重链 A PCR 反应液 由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7所示的引物；由SEQ ID NO:30所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
2		免疫球蛋白重链 B PCR 反应液 由 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16 所示的引物；由 SEQ ID NO:30 所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
3		免疫球蛋白重链 D PCR 反应液 由 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22 所示的引物；由 SEQ ID NO:31 所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
4		免疫球蛋白κ轻链 A PCR 反应液 由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28 所示的引物；由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
5		免疫球蛋白κ轻链 B PCR 反应液 由 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 所示的引物；由 SEQ ID NO:34 所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
6		质控 PCR 反应液 由 SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42 所示的引物；由 SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41 所示的荧光引物；Mg ²⁺ ；dNTPs；
7		DNA 聚合酶液 DNA 聚合酶；
8	对照 品	阳性对照 1 由 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46 所示的质粒；
9		阳性对照 2 由 SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50 所示的质控质粒；
10		空白对照 工艺用水。

[0050] 具体的，引物的核苷酸序列具体如表4所示：

[0051] 表4：

引物名称	编号	核苷酸序列	修饰
VH1-FR1-1	SEQ ID NO:1	ggcctcagtgaagggtctctgcaag	—
VH1-FR1-2	SEQ ID NO:2	gggtacagtgaaaatctctgcaagg	
VH2-FR1	SEQ ID NO:3	gtctggctctacgctggtgaaaccc	—

[0052]

[0053]

VH3-FR1	SEQ ID NO:4	ctggggggtccctgagactctcctg	—
VH4-FR1	SEQ ID NO:5	cttcggagaccctgtccctcacctg	—
VH5-FR1	SEQ ID NO:6	cgggggagtctctgaagatctcctgt	—
VH6-FR1	SEQ ID NO:7	tcgcagaccctctcactcacctgtg	—
VH1-FR2-1	SEQ ID NO:8	ctgggtgcgacaggcccctggacaa	—
VH1-FR2-2	SEQ ID NO:9	gggtgcgacaggctcctggaaaa	
VH2-FR2-1	SEQ ID NO:10	tggatccgtcagccccaggggaagg	—
VH2-FR2-2	SEQ ID NO:11	tggatccgtcagccccagg	
VH3-FR2	SEQ ID NO:12	ggtccgccaggctccagggaa	—
VH4-FR2	SEQ ID NO:13	tggatccgccagccccaggggaagg	—
VH5-FR2	SEQ ID NO:14	gggtgcgccagatgcccgggaaagg	—
VH6-FR2	SEQ ID NO:15	tggatcaggcagtccccatcgagag	—
VH7-FR2	SEQ ID NO:16	ttgggtgcgacaggcccctggacaa	—
DH1	SEQ ID NO:17	ggcggaatgtgtgcaggc	—
DH2	SEQ ID NO:18	gcactgggctcagagtctct	—
DH3	SEQ ID NO:19	gtggccctgggaatataaaaa	—
DH4	SEQ ID NO:20	agatccccaggacgcagca	—
DH5	SEQ ID NO:21	cagggggacactgtgcatgt	—
DH6	SEQ ID NO:22	tgacccagcaaggggaagg	—
VK1-F	SEQ ID NO:23	tcaagggtcagcggcagtgatctg	—
VK2-F	SEQ ID NO:24	ggcctccatctcctgcaggctagtc	—
VK3-F	SEQ ID NO:25	cccaggctcctcatctatgatgcc	—
VK4-F	SEQ ID NO:26	caactgcaagtccagccagagtgttt	—
VK5-F	SEQ ID NO:27	cctgcaaagccagccaagacattgat	—
VK6-F	SEQ ID NO:28	gaccgatccaccctcacaattaatcc	—
INTR	SEQ ID NO:29	cgtggcaccgagctglagac	—
JH-Fam	SEQ ID NO:30	cttacctgaggagacggtgacc	5'-FAM
JH-Tamara	SEQ ID NO:31	cttacctgaggagacggtgacc	5'-Tamara

[0054]	JK4-HEX	SEQ ID NO:32	cttacgtttgatctccaccttgggcc	5'-Hex
	JK5-HEX	SEQ ID NO:33	cttacgttaatctccagtcgtgtccc	5'-Hex
	KdE-Tamara	SEQ ID NO:34	cctcagaggcagagcaggtgtccta	5'-Tamara
	内参-F1	SEQ ID NO:35	ccgcagcaagcaacgaacc	5'-Rox
	内参-R1	SEQ ID NO:36	gcttctcttggcggctcc	—
	内参-F2	SEQ ID NO:37	tgcgatgtggcatcatggtg	5'-Rox
	内参-R2	SEQ ID NO:38	cgtgtcattgtcgtctgaggc	—
	内参-F3	SEQ ID NO:39	tgttgactcgatccaccca	5'-Rox
	内参-R3	SEQ ID NO:40	tgagctgcaagttggctgaa	—
	内参-F4	SEQ ID NO:41	gccccacattctgcaagtcc	5'-Rox
	内参-R4	SEQ ID NO:42	ggtgtgccgggaagggtt	—

[0055] 具体的,质粒DNA的核苷酸序列具体如表5所示:

[0056] 表5

质粒 DNA 名称	编号	核苷酸序列
[0057] IgH1质粒 DNA	SEQ ID NO:43	ggcctcagtgaaaggctcctgcaaggcttcgggatacatattcatcggctattttc tgcactgggtgcgacaggcccctggacaagggttgaatggatgggacggat caacccaacactgggtggcacaagatgcacaaaagtttcagggaagggtca ccatgaccaggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcagctt gagatctgacgacagcccatgtattactgtgcgaaagagaccgggaatttcc gacacattgactactggggccaggggaccccggtcaccgtctcctcaggtaa g
IgHD1质粒 DNA	SEQ ID NO:44	ggcggaatgtgtgcaggcctcaggctctgtgggtgccgctagctggggctgc cagtcctcaccacacctaagggtgagccacagccgccagagcctccacagg agacccaccagcagcccagcccctaccaggaggccccagagctcagg gcgctgggtgattctgaacagccccgagtcacgggtggtatagtgggagct actgcctcttactactactacggatggacgtctggggccaagggaccac ggtcaccgtctcctcaggtaa
IgK1质粒 DNA	SEQ ID NO:45	tcaaggtcagcggcagtgatctgggacagaattcactctcaccatcagcag cctgcagcctgatgatttgcaacttattactccaacagtataatacttatccgct cactttcggcggagggaagggtggagatcaaacgtaag

IgK7质粒 DNA	SEQ ID NO:46	cgtggcaccgcgagctgtagacagagccgcggttcttctcgattgagtgctt tggtggccatgccaccgcgctcttggggcagccgccttgccactatgccgtg ccacctgtgtctgcccgattgatgctgccgtagccagcttctgagtggcag cccagggcgactcctcatgagctgagctgcagctgcattttgccataccactattg agtctgacctccctaggaagccctcctgctccctaggacaacctgctctgacct ctgagg	
内参100质粒 DNA	SEQ ID NO:47	gcccacattctgcaagtccatggcgctgcaagacttgacatcgtcagaga cgtttctcctctactgggtgcaagccgaaccctcccggcaacacc	
内参200质粒 DNA	SEQ ID NO:48	tgttgactcgtaccacccactgagttctgccataactgctggagcatcatgcac aggaagttagcagtgccccatgtgaggttacttcccagggaacgtgacctg gagtgaccacccacacaccatcctgtgacatctgcaacactgcccgtcggg gactcaagaggaagagtcttcagccaaactgcagctca	
[0058]	内参300质粒 DNA	SEQ ID NO:49	tgcgatgtggtcatcatggtggacagccaggagtccacgccaccggagcgt gctggcctgcaccagcaagatgttgagatcctctccaccgcaatagcaaca ctatacttggacttctctcgccaaagacctccagcagattctggagatgcat atacagccacgctgcaagccaaggcggaggacctggatgacctgctgtatgc ggccgagatcctggagatcgagtacctggaggaacagtgcctgaagatgctg gagaccatccaggcctcagacgacaatgacacg
内参400质粒 DNA	SEQ ID NO:50	ccgcagcaagcaacgaaccaagccagcagtgccccctccagtgagaaga agaagcacaagagctccctccctgcccccttaaggctctcagggccagaa cccgcgaaggacaatgtggaggacaggacctgagcactttgctctgttcc cctgactgagagccagggcccacccacagtggcagcggcagcaggacta gtggctgccccaagccgtggtggtccaggaggacagccgaaagacagac tcccattgcccttgagagacaccaagctgctctcaccgctcagggacactcctc ccccaaaagcttgatggtgaagatcacctagacctgctctcggatacccc agcctcccgggaaggggagccgagaggaaagc	

[0059] 可选的,核酸扩增试剂中各引物的浓度为:

[0060] 免疫球蛋白重链A PCR反应液中SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:30的浓度为0.25μM;免疫球蛋白重链B PCR反应液中SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:30的浓度为0.25μM;免疫球蛋白重链D PCR反应液中SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:31的浓度为0.25μM;免疫球蛋白κ轻链A PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28的浓度为0.125μM;SEQ ID NO:25的浓度为0.25μM;SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5μM;SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33的浓度为0.125μM;免疫球蛋白κ轻链B PCR反应液中SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29的浓度为0.25μM;SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27的浓度为0.5μM;SEQ ID NO:34的浓度为0.25μM;质控PCR反应液中SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36的浓

度为0.125 μ M;SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38的浓度为0.25 μ M;SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40的浓度为0.375 μ M;SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42的浓度为0.75 μ M。

[0061] 由于本申请毛细管电泳试剂盒为多重PCR,1个反应管中存在不同大小的扩增产物,如果引物浓度不进行优化,较大的片段不容易被扩增,易造成漏检。对此,本申请对引物的浓度进行了优化,从而显著提高了试剂的灵敏度。

[0062] 可选的,免疫球蛋白重链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR1-JH的295bp~378bp重排片段;免疫球蛋白重链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因FR2-JH的236bp~307bp重排片段;免疫球蛋白重链D PCR反应液的有效检测范围为目的基因DH-JH的102bp~296bp和384bp~429bp重排片段;免疫球蛋白 κ 轻链A PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Jk的120bp~160bp、190bp~210bp和260bp~300bp重排片段;免疫球蛋白 κ 轻链B PCR反应液的有效检测范围为目的基因Vk-Kde和intron-Kde的210bp~250bp、265bp~300bp和350bp~390bp重排片段。本申请实施例毛细管电泳试剂盒专门针对中国人群基因重排进行检测,确定了重排片段的大小范围,从而可提高中国人群基因重排的检出率。

[0063] 可选的,本申请实施例的毛细管电泳试剂盒还可以包括毛细管电泳试剂,毛细管电泳试剂包括标准分子量内标和DNA产物变性剂。优选的,标准分子量内标选自LIZ-500分子量内标和所述DNA产物变性剂选自高度去离子甲酰胺。

[0064] 可选的,本申请实施例的毛细管电泳试剂盒还包括DNA抽提试剂盒。

[0065] 可选的,DNA抽提试剂盒制备得到的样本DNA的浓度为50ng/ μ l~100ng/ μ l。

[0066] 本申请实施例毛细管电泳试剂盒的使用方法为:

[0067] 1.在每次检测中,必须对毛细管电泳试剂盒中的阳性对照和空白对照同时进行PCR扩增。

[0068] 2.扩增试剂准备:

[0069] 从毛细管电泳试剂盒中取出各PCR反应液(免疫球蛋白重链A反应液、免疫球蛋白重链B反应液、免疫球蛋白重链D反应液,免疫球蛋白 κ 轻链A反应液、免疫球蛋白 κ 轻链B反应液和质控PCR反应液)以及DNA聚合酶液,室温融化并振荡混匀后,2000rpm离心10s。

[0070] 各反应体系配制如下:16 μ l的PCR反应液和1 μ l DNA聚合酶液混合(注意PCR管数应为样本数及2个对照之和,其中质控PCR反应液检测空白对照和阳性对照2,其余PCR反应液均检测空白对照和阳性对照1)。

[0071] 用微量加样器在每一PCR反应管内分别各自加入17 μ l上述混匀后的反应液,存于4 $^{\circ}$ C。

[0072] 3.加样:从样本DNA液、阳性对照和空白对照中分别取3 μ l,加至装有上述PCR预混液的离心管中,盖紧管盖,快速离心10秒,将其移至检测区。

[0073] 4.PCR扩增:反应体系为20 μ l。在PCR扩增仪上设定PCR扩增条件如表6所示:

[0074] 表6:

保 温	40次循环	保 温
[0075] 95 $^{\circ}$ C, 7分钟	95 $^{\circ}$ C, 45秒	72 $^{\circ}$ C, 10分钟
	60 $^{\circ}$ C, 45秒	4 $^{\circ}$ C, 恒温
	72 $^{\circ}$ C, 90秒	

[0076] 5.毛细管电泳:

[0077] 对同一样本、阳性对照或空白对照品,如下配置试剂:

[0078] 1 μ l免疫球蛋白重链A PCR扩增产物+0.5 μ l质控PCR扩增产物+0.3 μ l LIZ500+10 μ l
HIDI;

[0079] 1 μ l免疫球蛋白重链B PCR扩增产物+0.5 μ l质控PCR扩增产物+0.3 μ l LIZ500+10 μ l
HIDI;

[0080] 依此类推,配置免疫球蛋白重链D、免疫球蛋白 κ 轻链A和免疫球蛋白 κ 轻链B PCR扩
增产物。

[0081] 95 $^{\circ}$ C变性,3分钟后,立即置于冰上冷却3分钟,之后立即在3130XL或3500DX基因分
析仪上进行毛细管电泳。

[0082] 计算机自动处理和分析数据。

[0083] 注意:若PCR产物的荧光信号强度超过测序仪的能采集到的最高检测限,可将PCR
产物适量稀释后上机,并且质控PCR反应液的扩增产物与其他反应液的扩增产物应稀释相
同的倍数。

[0084] 【阳性判断值】

[0085] a.除质控PCR反应液外的任意1管反应液在有效范围内收集到单一大小的1个或2
个明显扩增峰,且扩增峰荧光信号高度符合表7条件之一的,则判定该样本:“免疫球蛋白基
因克隆性重排检测结果为阳性,表明存在克隆细胞群”。

[0086] 表7

[0087]

Master Mix	最高峰/第三高峰荧光信号	次高峰/第三高峰荧光信号
免疫球蛋白重链A	>3	/
免疫球蛋白重链B	>3	/
免疫球蛋白重链D	>3	/
免疫球蛋白 κ 轻链A	>7	>4
免疫球蛋白 κ 轻链B	>5	>3

[0088] b.若无法满足a

[0089] (1)若样本的质控PCR反应液在100、200、299、394bp位置未收集到ROX荧光信号,必
须重新抽提样本;若仍无荧光信号,则判定该样本:“用于检测的DNA的数量或者质量不合
格,无法进行判定”。

[0090] (2)若样本的质控PCR反应液在100,200,299,394bp位置收集到ROX荧光信号:

[0091] ①其他反应液在有效范围内均未收集到荧光信号或收集到连续荧光信号,且荧光
信号表现为钟形曲线,则判定该样本:“免疫球蛋白基因克隆性重排检测结果为阴性或低于
检测极限”。

[0092] ②反之,建议重新检测该管反应液。重新检测后,若实验结果满足a,即可判定“免
疫球蛋白基因克隆性重排检测结果为阳性,表明存在克隆细胞群体”;若实验结果无法满足
a,则判定“免疫球蛋白基因克隆性重排检测结果为阴性或低于检测极限”。

[0093] 【检验结果的解释】

[0094] 1.实验结果应符合下列有效性判定:

[0095] a. 空白对照:未收集到除引物峰外的荧光信号。

[0096] b. 阳性对照1:除质控PCR反应液外的其它PCR反应液在有效检测范围内,收集到不连续的荧光信号,且表现明显的扩增峰,扩增峰在表8所示位置上出现即为有效。

[0097] 表8

Master Mix	Target	有效检测范围 (bp)	荧光标记	阳性对照品位置 (bp)
免疫球蛋白重链A	FR1-JH	295-378	FAM蓝色	319
免疫球蛋白重链B	FR2-JH	236-307	FAM蓝色	261
免疫球蛋白重链D	DH-JH (不包括DH7-JH)	102-296, 384-429	TAMRA黑色	285
免疫球蛋白κ轻链A	Vk-Jk	120-160, 190-210, 260-300	HEX绿色	150
免疫球蛋白κ轻链B	Vk-Kde+intron-Kde	210-250, 265-300, 350-390	TAMRA黑色	275

[0099] c. 阳性对照2:质控PCR反应液在100, 200, 299, 394bp位置收集到ROX (红色) 荧光信号。

[0100] 备注:荧光信号位置误差<3bp。

[0101] 2. 免疫球蛋白重链D中有效检测范围之外可能存在345bp的扩增条带,该扩增条带为基因组DNA扩增产物,无需关注。

[0102] 3. 扩增峰:明显高于多克隆背景的荧光信号峰。

[0103] 实施例1

[0104] 一种用于检测人免疫球蛋白基因重排的毛细管电泳试剂盒,其组成如表9所示:

[0105] 表9:

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/257151050031006054>