

用于同时识别多种基因类型的数字扩增检测方法、检测产品和检测试剂盒

技术领域

本申请涉及基因突变检测的技术领域，更具体地说，它涉及一种用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法、检测产品和检测试剂盒。

背景技术

多重基因检测是行业内的难题，目前大多数技术只能实现有限重基因突变的检测。近些年，部分技术可以做到十多重基因突变的检测，比如多重连接依赖式探针扩增技术（multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA）、多色熔解曲线分析技术（multicolor melting curve analysis, MMCA）和微流控技术（如 Fluidigm 产品）等，但是这些检测手段都存在着不同的技术问题。其中的 MLPA 技术，因探针设计困难费时、试剂昂贵、需要和毛细管电泳等复杂仪器配合使用等，使得其应用受限。其中的微流控技术则需要借助微流控相关的复杂仪器，而且其检测灵敏度不能满足实际应用的要求。

在解决这些行业难题的过程中，一些研究者开始尝试采用数字 PCR 技术来辅助提高基因突变检测的准确度和信号数。数字 PCR 是一种核酸分子绝对定量的技术，可以通过分割反应体系的方式实现阴性信号与阳性信号的有效区分。基于这个技术，科学家们可以通过调节不同基因突变检测探针的浓度，得到不同荧光强度的多个信号，从而实现对多重基因突变的检测。但是，将该技术用于多重基因突变的检测时，其依然受到同一体系内引物探针数量的限制：当检测多重基因突变时，需要设置多组引物探针，而引物数量的增加会增加引物二聚体等非特异性扩增产物产生的可能性，并影响探针与待检测序列的正常结合，降低目标基因扩增检测结果的准确性和可靠性。

因此，亟需开发一种新的超多重基因突变的检测方法，来克服现有技术存在的难题。

发明内容

为了进一步实现超多重基因突变的准确检测，本申请提供一种用于同时识别多种基因突变类型的数字扩增检测方法、检测产品和检测试剂盒。

第一方面，本申请提供了用于同时识别多种基因突变类型的数字扩增检测方法，采用如下的技术方案：

用于同时识别多种基因突变类型的数字扩增检测方法，包括以下步骤：

S1、提取得到样本 DNA，备用；

制备得到引物探针混合液，包括以下步骤：

S11、合成目标基因序列扩增和检测用的引物和探针，所述引物和探针为多个；每个所述目标基因序列至少设计有两个检测用探针，用于覆盖目标基因序列的不同区域；合成所述引物核苷酸序列的碱基包含四种或者四种以下；

S12、使得所述引物的 5' 端添加有能够形成二级结构的核苷酸序列，且使得所述引物上修饰有小分子化合物，即得到 PCR 扩增用引物；

所述小分子化合物选自硫代磷酸寡核苷酸、甲基化寡核苷酸、肽核酸、锁核酸、次黄嘌呤核苷酸或铈金属插入剂中的一种或几种；

S13、将所述 PCR 扩增用引物和所述探针共同溶解于核酸溶解用缓冲液中，得到引物探针混合液；

S2、配制 PCR 反应体系后进行 PCR 反应，所述 PCR 反应体系包括所述样本 DNA 和所述引物探针混合液；进行 PCR 反应；

S3、PCR 反应结束后对检测数据进行分析，得到不同目标基因序列的位点突变类型。

以常规方法设计多种引物和探针用于 PCR 扩增时，常发生非特异性扩增（交互配对和错配）并产生非目标序列产物。而本申请中，在合成引物时，可以选用四种碱基或者仅仅选用三种碱基（缺失碱基 A、碱基 G、碱基 C 或者碱基 T 中的任意一种），以显著降低扩增时的非特异性结合的发生。随后在扩增得到的引物的 5' 端加入能够形成二级结构的核苷酸序列，降低引物之间产生二聚体的

概率，减少非特异性扩增的发生。本申请的方案，通过对引物的特殊设计、结合在引物的 5' 端加入可形成二级结构的核苷酸序列、并加入小分子化合物，不断加强引物和目标基因的结合强度和稳定性，显著降低非特异性扩增的产生，使多重 PCR 得以实现。

其中的小分子化合物的添加作用在于，尤其是当合成所述引物的核苷酸序列仅仅含有三种碱基时，以硫代磷酸寡核苷酸、甲基化寡核苷酸、肽核酸、锁核酸、次黄嘌呤核苷酸或铈金属插入剂中的一种或多种作为所缺失碱基的替代，以提高引物的稳定性以及引物与目标基因的结合稳定性。其中的肽核酸（PNA）可以通过 Watson-Crick 碱基配对的形式识别并结合 DNA 或 RNA 序列，形成稳定的双螺旋结构。锁核酸（LNA）是一种特殊的双环状核苷酸衍生物，LNA 与 DNA/RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架，故其对 DNA、RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力。次黄嘌呤核苷酸或脱氧次黄嘌呤也可以作为通用碱基，用以替代缺失碱基。因此，当小分子化合物为肽核酸、锁核酸、次黄嘌呤核苷酸以及脱氧次黄嘌呤中的一种或多种时，可以用作通用碱基，在引物合成时替代缺失的碱基，以提高引物和目的基因的结合稳定性。

而在进行探针设计时，本申请基于双探针脱落技术（参见文献“Bidshahri, Roza, et al. “Quantitative detection and resolution of BRAF V600 status in colorectal cancer using droplet digital PCR and a novel wild-type negative assay.” *The Journal of Molecular Diagnostics* 18.2 (2016): 190-204.” 所公开的方法）。现有的单探针脱落技术中，需要设计两个探针：脱落探针和参考探针，其中的脱落探针仅仅和野生型序列互补并覆盖可能发生突变的位点序列，参考探针用于和突变位点的邻近位点进行杂交并且与突变和野生型等位基因进行互补，从而实现对不同基因型的识别检测。但是，单探针脱落技术中的两个探针，仅仅有一个探针用于识别野生型基因，使得检测效率低。

因此，本申请中的探针脱落技术中，每个目标基因设置至少两个探针，且设置的探针中没有参照探针；多个不同探针均结合目标基因，且覆盖目标基因可能发生突变的不同区域，以实现对目标基因突变位点的全面检测，从而增强探针使用效率，一次检测就实现对目标基因中多种突变类型的同时检测，使得试剂设计更加高效、工艺更加简便、成本更低。

可选的，合成所述引物的核苷酸序列包含三种碱基且不同时包括碱基 G 和碱基 C。

可选的，所述小分子化合物通过额外添加的方式和所述引物连接；S12 包括以下步骤：所述引物的 5' 端添加可形成三维结构的核苷酸序列，得到初始修饰引物；将所述初始修饰引物加入到缓冲液中，所述缓冲液包括小分子化合物，反应，得到 PCR 扩增用引物。该缓冲液包括反应液和停止液，反应液可以选择如 $[\text{Rh}(\text{NH}_3)_4(\text{phen})][\text{OTf}]_3$ (0.500 g, 0.626 mmol)、chrysene-5,6-dione (0.162 g, 0.626 mmol)、1:9 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (400 mL)、1 M solution of NaOH (1.5 mL)；停止液可以选择 1 M solution of HCl (1.5 mL)；上述“引物的 5' 端添加可形成三维结构的核苷酸序列”为本领域常规方法，如文献“Ronaghi, Mostafa, et al. “PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing.” *Biotechniques* 25.5 (1998): 876-884.” 所公开。

可选的，所述小分子化合物在所述缓冲液中的浓度为 $4 \sim 12 \mu\text{M}$ ，所述小分子化合物和初始修饰引物的摩尔比为 $0.7 \sim 1:1$ 。

通过采用上述技术方案，当选择的小分子化合物为铈金属插入剂时，小分子化合物是以加入缓冲液后再添加至引物上。其进一步的添加方法包括：首先，在制备 PCR 扩增用引物时，合成引物；随后在该引物的 5' 端连接一段可以形成三维结构的核苷酸序列后得到初始修饰引物；最后通过将得到的初始修饰引物和含有小分子化合物的缓冲液混合后，实现在初始修饰引物上添加小分子化合物目的，最终得到 PCR 扩增用引物。小分子化合物的添加目的为增强引物和模板结合区的结合强度。在该方案中，通过添加适量的小分子化合物，以达到优异的降低错配概率和增加结合强度的效果。

可选的，所述样本 DNA 包括 cfDNA。

一般来讲，所述 cfDNA 的长度为 150-200bp；本申请的一个实施例方案能够实现对短链核苷酸片段上基因突变的高效准确的检测。

可选的，所述探针的核苷酸序列长度为 10~30bp。

通过采用上述技术方案，且探针的核苷酸序列较短，使得 PCR 扩增的效率更高且使得碱基错配的可能性显著降低；此外，较短的探针，能够促使荧光素和淬灭基团足够接近，以减少背景荧光，进而使得检测结果更加准确；同时较短的探针更适合检测血液中的小片段 cfDNA。

可选的，所述 PCR 反应体系中不包括三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸。

可选的，在所述引物探针混合液中，每条所述 PCR 扩增用引物的浓度为 7~12 μ M，每条所述探针的浓度为 7~12 μ M。

可选的，步骤 S12 反应时，先加热至 50~80℃，随后保温；然后降温至 28~32℃，保温后即可。

可选的，多个所述探针中不包含参考探针。

第二方面，本申请的一个实施例提供了采用上述检测方法进行多种基因类型检测的检测产品。

第三方面，本申请的一个实施例提供了采用上述检测方法进行多种基因类型检测的检测试剂盒。

可选的，所述检测试剂盒包括所述引物探针混合液；所述引物探针混合液内含有所述 PCR 扩增用引物和所述探针；每目标基因对应至少有至少两个所述探针。

综上所述，本申请具有以下有益效果：

1、本申请基于数字 PCR 技术，在常规合成引物基础上，首先仅仅选用三种碱基，以显著降低扩增时的非特异性结合；并在引物的 5' 端加入可形成三维结构的核苷酸序列和引入小分子化合物，能够显著降低引物之间产生二聚体，减少非特异性扩增，并能够提高引物对模板的结合特异性和结合强度、结合稳定性，可以实现单反应体系多重扩增。而在进行探针设计时，基于双探针脱落技术，每个目标基因设置至少两个探针，且设置的探针中不含有参照探针；多个不同探针均结合目标基因，且覆盖目标基因的不同区域，以实现对目标基因突变位点的全面检测，从而通过一次检测实现对目标基因多个基因类型或者基因突变的同时检测，检测过程更加高效

2、本申请中选择探针的核苷酸序列长度为 10~30bp，探针的核苷酸序列较短，使得 PCR 扩增的效率更高且使得碱基错配的可能性显著降低；此外，检测时背景荧光比较弱，进而使得检测结果更加准确；并且短的探针更适合检测血液中的小片段 cfDNA。

附图说明

图 1 是本申请的技术方案进行突变检测的原理示意图；

图 2 是本申请实施例 1 中检测的肺癌基因位点 KRAS 突变位点的聚类分析图；

图 3 是本申请实施例 4 中检测的结直肠癌基因位点 PIK3CA 和 BRAF 突变位点的聚类分析图。

图 4 为本申请实施例 6 中细胞系阳性样品检测结果图。

具体实施方式

以下结合附图和实施例对本申请作进一步详细说明。

如图 1 所示，本申请通过设计至少两个探针，多个不同探针均结合目标基因，且覆盖目标基因的不同区域，以实现对目标基因突变位点的全面检测。针对不同的突变型，其最终在聚类分析图上的不同位置处出现不同荧光显色的聚类：横坐标和纵坐标上对应的是不同通道上出现的不同突变型基因的荧光聚类；对角线上的的是对应基因野生型的荧光聚类。

实施例 1 肺癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法，包括以下步骤：

S1、提取得到样本 DNA 和引物探针混合液的制备

I、样本 DNA 的提取

入组病例：对上海中山医院胸外科 2020 年 1 月至 2020 年 12 月就诊的肺部结节患者进行研究，根据胸部 CT 及血液肺癌肿瘤指标（包括 KRAS）检查结果，均无法确定其为肺癌还是肺良性疾病。所有患者均选择接受手术治疗，术前采外周静脉血 50mL，根据肿瘤术后病理结果，将样本分为肺癌及肺良性疾病组（肺良性疾病包括炎性假瘤、硬化性血管瘤、肺结核球等）。

研究方法：应用 dPCR 技术研究两组样本外周血 cfDNA 突变情况，具体的操作步骤包括：

- ①从外周静脉血中采集分离 20mL 血浆及白细胞；
 ②将采集的样本在 4℃ 条件下，1900g 离心 10min，得到血浆层；
 ③在 4℃ 条件下，16000g 离心 10min，去除细胞残留；
 ④采用 cfDNA 提取试剂盒（QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)）获取 cfDNA。

研究结果：在入组的肺癌病人中，约 48.1% 发现了 KRAS 基因中的一种或几种突变。在所有检测到 KRAS 基因突变的肺癌病人中，通过卡方检验发现其与肺良性疾病患者有显著的统计学差异。

其中，对于肺癌病人，其 KRAS 突变基因及突变位点，如表 1 所示，在反应体系中，通过数字 PCR 技术以及本实施例的特殊引物、探针和缓冲液，可实现对 KRAS 基因 61 个突变位点的检测。

表 1 本申请检测的肺癌相关目标基因的突变位点

基因型	突变位点					
KRAS (A)	c. 437C>T p. A146V	c. 436G>A p. A146T	c. 436G>C p. A146P			
KRAS (B)	c. 183A>C p. Q61H	c. 183A>T p. Q61H	c. 182A>C p. Q61P	c. 182A>G p. Q61R	c. 182A>T p. Q61L	c. 181C>A p. Q61K
	c. 181C>G p. Q61E	c. 180_181TC >CA p. Q61K	c. 180_181TC >AA p. Q61K	c. 176C>G p. A59G	c. 176C>A p. A59E	c. 175G>A p. A59T
	c. 173C>T p. T58I					
KRAS (C-1)	c. 43G>A p. G15S	c. 40G>A p. V14I	c. 39_40insG GC p. G13_V14in sG	c. 39C>G p. G13G	c. 39C>T p. G13G	c. 39C>A p. G13G
	c. 38_39GC>TT p. G13V	c. 38_39GC>T G p. G13V	c. 38_39GC>A T p. G13D	c. 38_39GC> AA p. G13E	c. 37_39GGC> CGT p. G13R	c. 38G>A p. G13D
	c. 38G>C p. G13A	c. 38G>T p. G13V	c. 37G>T p. G13C	c. 37G>A p. G13S	c. 37G>C p. G13R	c. 36_37ins GGT p. G12_G13i nsG
	c. 36_37TG>AT p. G13C	c. 36T>C p. G12G	c. 36T>A p. G12G	c. 35_36GT> AC p. G12D	c. 35_36GT> C p. G12V	c. 35_36GT> AA p. G12E
	c. 34_36GGT>T GG p. G12W	c. 34_36GGT> TGC p. G12C	c. 35G>T p. G12V	c. 35G>A p. G12D	c. 35G>C p. G12A	c. 34_35GG> TA p. G12Y
	c. 34_35GG>AT p. G12I	c. 34_35GG>T T p. G12F	c. 34_35GG>C T p. G12L	c. 34G>T p. G12C	c. 34G>A p. G12S	c. 34G>C p. G12R
	c. 33_34insGG AGCT p. A11_G12ins GA	c. 32C>T p. A11V	c. 31G>C p. A11P	c. 30_31ins GGA p. G10_A11i nsG	c. 24A>G p. V8V	

KRAS (C-2)	c. 64C>A p. Q22K	c. 57G>C p. L19F	c. 57G>T p. L19F	c. 53C>A p. A18D		
---------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	--	--

研究结论：在肺癌患者的外周血 cfDNA 中发现 KRAS 基因突变，突变基因包含表 1 所述突变位点。KRAS 基因的特定位点突变，可为肺癌患者的临床诊断和用药指导提供参考，对于影像学 and 肿瘤指标难以确诊的肺结节患者，提供更加合理有效的个体化指导。

II、引物探针混合液的制备

S11、合成目标基因扩增和检测用的引物和探针，所述引物和探针为多个；每个所述目标基因至少设计有两个检测用探针；合成所述引物的核苷酸序列只包括三种碱基且不同时包括碱基 A 和碱基 T。

具体为：按照引物和探针的设计原则（如文献“Bustin, Stephen A., Reinhold Mueller, and Tania Nolan. “Parameters for successful PCR primer design.” Quantitative Real-Time PCR. Humana, New York, NY, 2020. 5-22.”所公开的原则），根据 Cosmic 数据公布的人类 KRAS 野生型基因序列，以 KRAS 的突变位点为基础，来设计特异性引物和探针，如表 2 所示。突变型荧光探针 5’端连接有荧光报告基团 FAM；3’端连接有荧光淬灭基团 BHQ1；野生型荧光探针 5’端连接的荧光报告基团 HEX；3’端连接有荧光淬灭基团 BHQ2。荧光报告基团和淬灭基团还可以根据具体的平台进行合理选择。

表 2 反应管中肺癌基因突变位点检测引物探针序列

引物探针名称	引物探针序列	序列号
KRAS-F1	CCGCCGCGGCCCGCCT	SEQ ID NO. 1
KRAS-R1	CGCCGCCGCGTCCGCGC	SEQ ID NO. 2
KRAS-F2	CCCGCCCCTCCGGGG	SEQ ID NO. 3
KRAS-R2	CCGGGGCGCCGCGGG	SEQ ID NO. 4
KRAS-P1	TGCCGCCGCGCTGCTGCCT	SEQ ID NO. 5
KRAS-P2	CGCCACCTTCGCCG	SEQ ID NO. 6
KRAS-P3	GTACCTCTCTCCC	SEQ ID NO. 7
KRAS-P4	GGAAGCAGCA	SEQ ID NO. 8

将上述针对表 1 所示目标基因位点的引物和探针设计的扩增用的初始修饰引物，送到生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

S12、所述引物经修饰后备用，所述修饰包括以下步骤：

S121、将设计好的引物的 5’端添加上核苷酸序列“CCCTGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGG（如 SEQ ID NO.9 所示）”以形成三维结构，得到扩增用的初始修饰引物。

S122、将合成得到的初始修饰引物，加入到缓冲液中加热至 70℃，保温 5min，然后冷却至 30℃，保温 25min，得到 PCR 扩增用引物。

其中，缓冲液的组分为：290mM NaCl，4.5mM MgCl₂，18mM Tris(pH 7.3)。缓冲液中还包括 10 μM 的小分子化合物，小分子化合物为铈金属插入剂，且铈金属插入剂和初始修饰引物的摩尔比为 0.7:1。通过 X 单晶衍射数据的分析，测定检测的核苷酸序列 5’端序列存在三维结构。本实施例中使用的铈金属结构式为 [RhCl₃(C₁₀H₈N₂){(CH₃)₂SO}](CH₃)₂SO，其合成方法参见文献“Caruso, Francesco, et al. “Synthesis, structure, and antitumor activity of a novel tetranuclear titanium complex.” Journal of medicinal chemistry 43.20 (2000): 3665-3670.”。

S13、将用于检测表 1 所示位点的上游引物、下游引物（即 S122 中的 PCR 扩增用引物）和用于检测表 1 所示位点的荧光探针 1 和荧光探针 2（即 S11 中合成得到的各探针）共同溶解于 TE 溶液中，制成引物探针混合溶液。上游引物、下游引物、荧光探针 1 和荧光探针 2 在引物探针混合液中的浓度均为 10 μM。

引物探针混合液的配制方法为：将上游引物、下游引物、荧光探针 1 和荧光探针 2 四种成分的干粉分别用 TE 缓冲液稀释至各探针、引物的浓度分别为 100 μM，备用。

S2、配制 PCR 反应体系后进行 PCR 反应，所述 PCR 反应体系包括所述样本 DNA 和所述引物探针混合液。

具体的，按照表 3 配制 PCR 反应体系。

表 3 反应体系（总体积 20 μL）

组分	终浓度	添加量
PCR Mix	/	10 μL
上游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
下游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
荧光探针 1（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
荧光探针 2（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
模板 DNA	1ng/μL	2 μL
ddH ₂ O	/	5.6 μL

其中，PCR Mix 购买自 NEB，并加入终浓度 0.1%的 Triton-X-100，1U 热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL 的 BSA，按照 ddH₂O、PCR mix、探针、引物、模板 DNA 的顺序，将上述样品按照表 3 中反应体系中 20 μL 的添加量加入 0.2mLPCR 管中，使用轻柔涡旋将混合体系混匀 15s，并通过短时离心将溶液收集到试管底部。将配制好的不同比例的反应体系上样到 PCR 芯片上，形成微反应单元。将芯片放入数字 PCR 仪中，按照表 4 中 PCR 反应条件进行 PCR 反应。

其中，所述 PCR Mix 中，不包含三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸组分。

表 4 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	300	1
变性	95℃	15	40
退火	60℃	15	
延伸	60℃	30	

S3、PCR 反应结束后对检测数据进行分析，得到不同位点的基因类型。

具体为：扩增结束后，通过电脑分析，对两个通道的有效荧光阳性点进行判读，并对结果进行分析，如图 2 所示，图 2 为临床样本检测结果图（即肺癌基因位点 KRAS 突变位点的聚类分析），纵坐标为 FAM 荧光通道，横坐标为 HEX 荧光通道。由实验结果分析可看出，通过聚类分析可以检测出对应的信号，对应于表 1 所示全部 61 个基因位点。

通过将突变信号（MUT）除以对应的野生型信号（WT）可以计算出目标基因群的突变丰度。进一步地，将本实施例与现有方法学（NGS）结果的一致性比较结果发现，通过本实施例共完成 143 例临床血液样本检测（每例都做 NGS 检测），其中与 NGS 结果一致的有 133 例，不一致的有 10 例，一致率为 93%。

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的检测试剂盒，包括 PCR 扩增用引物和探针、TE 缓冲液和 PCR 混合液。

PCR 混合液购买自 NEB，并加入终浓度 0.1%的 Triton-X-100，1U 热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL 的 BSA，还包括 PCR mix，其中 PCR mix 不包括三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸组分。

检测试剂盒还包括阳性质控品和阴性质控品。

阳性质控品的制备方法为：表 1 所示每一基因突变位点野生型和突变型的序列各 200bp，合成后，分别装入质粒载体 pET-23d(+) (Promega)。使用 Qubit 3.0 进行定量，计算两种类型质粒的拷贝数浓度，根据拷贝数比例 1:3000，1:2000，1:1000，1:500，1:200，1:100，1:50，1:10 混合两种质粒，之后通过超声将质粒混合物打断为约 180bp 的片段，定量到 20ng/μL，作为梯度阳性质控品。

阴性质控品由上述含有野生型的质粒单独构成，然后采用同样方法打断为约 180bp 的片段，定量到 20ng/μL，作为阴性质控品。

实施例 2 肺癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法:本实施例和实施例 1 的区别在于,所选用的的小分子化合物是直接加在引物上的,即所选用的引物是经锁核酸修饰后获得的。此外在步骤 S122 中,其缓冲液内不再添加小分子化合物。

锁核酸通过市售获得,可以是购自北京赛百盛基因技术有限公司合成的锁核酸寡聚链。

其他同实施例 1。

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的检测试剂盒。

本实施例和实施例 1 的区别在于,其中 PCR 扩增用引物是本实施例制备得到的,其他同实施例 1。

实施例 3 肺癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法

本实施例和实施例 1 的区别在于,小分子化合物选用的是肽核酸(购自北京赛百盛基因技术有限公司),肽核酸是在步骤 S2 添加,具体为:在 PCR Mix 中,添加有终浓度为 0.35 μM 的肽核酸。并且在步骤 S122 中,其缓冲液内不再添加小分子化合物。

其他同实施例 1。

针对肺癌的用于同时识别多种基因突变的检测试剂盒

本实施例和实施例 1 的区别在于,其中 PCR 扩增用引物是本实施例制备得到的,其他同实施例 1。

最终采用该方法也能够获得对肺癌相关突变基因(如表 1 所示的 KRAS 基因 61 个突变位点)的准确检测。

实施例 4 结直肠癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

针对结直肠癌的用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法,包括以下步骤:

S1、提取得到样本 DNA 和引物探针混合液的制备

I、样本 DNA 的提取

入组病例:对上海中山医院肛肠外科 2019 年 1 月至 2019 年 12 月就诊的结直肠癌患者进行研究,根据 CT 及血液结直肠癌肿瘤指标(包括 PIK3Ca 和 BRAF)检查结果,均无法确定其为结直肠癌还是结直肠良性疾病。所有患者均选择接受手术治疗,术前采外周静脉血 50mL,根据肿瘤术后病理结果,将样本分为结直肠癌还是结直肠良性疾病。

研究方法:应用 dPCR 技术研究两组样本外周血 cfDNA 突变情况,具体的操作步骤包括:

- ①从外周静脉血中采集分离 20mL 血浆及白细胞;
- ②将采集的样本在 4℃ 条件下,1900g 离心 10min,得到血浆层;
- ③在 4℃ 条件下,16000g 离心 10min,去除细胞残留;
- ④采用 cfDNA 提取试剂盒(QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA))获取 cfDNA。

研究结果:在入组的结直肠癌病人中,部分病人中检测出 PIK3CA 和 BRAF 基因中的一种或几种突变,而在肺良性疾病患者中,未发现 PIK3CA 和 BRAF 基因突变。在所有检测到 PIK3CA 和 BRAF 基因突变的结直肠癌病人中,通过卡方检验发现其与结直肠良性疾病患者有显著的统计学差异。

其中,对于结直肠癌病人,其 PIK3CA 和 BRAF 突变基因及突变位点,如表 5 所示,在反应体系中,通过数字 PCR,和本实施例采用的特殊引物和缓冲液,可实现 PIK3CA 和 BRAF 等 2 个基因总共 41 个突变位点的检测。

表 5 实施例检测的目标基因的突变位点

基因型	突变位点					
	c. 1616C>G	c. 1624G>C	c. 1624G>A	c. 1625A>T		
PIK3CA (A-1)	p. P539R	p. E542Q	p. E542K	p. E542V		

PIK3CA (A-2)	c. 1631C>A p. T544N	c. 1633G>C p. E545Q	c. 1633G>A p. E545K	c. 1634A>C p. E545A	c. 1634A>G p. E545G	c. 1635G>C p. E545D
	c. 1635G>T p. E545D	c. 1634A>T p. E545V	c. 1636C>A p. Q546K	c. 1637A>G p. Q546R	c. 1637A>T p. Q546L	c. 1636C>G p. Q546E
	c. 1637A>C p. Q546P	c. 1638G>T p. Q546H	c. 1645C>T p. D549N			
PIK3CA (B-1)	c. 3104C>T p. A1035V	c. 3115T>C p. F1039L	c. 3120G>A p. M1040I			
PIK3CA (B-2)	c. 3127A>G p. M1043V	c. 3128T>C p. M1043T	c. 3129G>A p. M1043I	c. 3129G>T p. M1043I	c. 3129G>C p. M1043I	c. 3130A>G p. N1044D
	c. 3132T>A p. N1044K	c. 3133G>A p. D1045N	c. 3136G>A p. A1046T	c. 3137C>A p. A1046E	c. 3139C>T p. H1047Y	c. 3140A>G p. H1047R
	c. 3140A>T p. H1047L	c. 3141T>G p. H1047Q	c. 3143A>G p. H1048R	c. 3145G>C p. G1049R	c. 3145G>A p. G1049S	c. 3146G>C p. G1049A
BRAF	c. 1799T>A p. V600E					

研究结论：在结直肠癌患者的外周血 ctDNA 中发现 PIK3CA 和 BRAF 基因突变，突变基因包含表 5 所述突变位点，而在良性肿瘤中未发现其突变。PIK3CA 和 BRAF 基因的特定位点突变，可为结直肠癌的诊断及鉴别诊断提供参考，对于影像学 and 肿瘤指标难以确诊的结直肠患者，提供更加合理有效的个体化指导。

II、引物探针混合液的制备

S11、合成目标基因扩增和检测用的引物和探针，所述引物和探针为多个；每个所述目标基因至少设计有两个检测用探针；合成所述引物的核苷酸序列只包括三种碱基且不同时包括碱基 G 和碱基 C。

具体为：

引物及探针设计步骤：

- 1、首先在 Ensemble 数据库中确定包含 PIK3CA 和 BRAF 基因突变位点的 cDNA 序列；
- 2、通过 BLAST 确定该 cDNA 序列在 DNA 上所对应的外显子序列；
- 3、根据所得外显子序列，通过 GenomeBrowser 确定所对应的完整 DNA 序列(包括外显子和内含子)；其中，PIK3CA 和 BRAF 的突变位点、突变基因如表 6 所示。

4、按照上述引物和探针的设计原则，以上述 PIK3CA 和 BRAF 突变基因对应的 DNA 序列为模板，利用 ION AMPLISEQ DESIGNER 在线设计网站设计出覆盖表 5 所示目标基因位点的引物和探针，如表 6 所示。突变型荧光探针 5' 端连接有荧光报告基团 FAM；3' 端连接有荧光淬灭基团 BHQ1；野生型荧光探针 5' 端连接的荧光报告基团 CY3；3' 端连接有荧光淬灭基团 BHQ2。荧光报告基团和淬灭基团还可以根据具体的平台进行合理选择。

表 6 反应管中结直肠癌基因突变位点检测引物探针序列

引物探针名称	引物探针序列	序列号
--------	--------	-----

PIK3CA-F1	ACATAAAAAATA	SEQ ID NO. 10
PIK3CA-R1	AAAAATTCAATTTCTAA	SEQ ID NO. 11
PIK3CA-F2	AAATATTTTATAAT	SEQ ID NO. 12
PIK3CA-R2	AACTTCAAAACAAACAAACAAACACA	SEQ ID NO. 13
PIK3CA-P1	TGAGATAACCTG	SEQ ID NO. 14
PIK3CA-P2	GCAGTAGAAATAATC	SEQ ID NO. 15
PIK3CA-P3	GATAGTAATACCACTCTGTC	SEQ ID NO. 16
PIK3CA-P4	TTCAGATTAGAATACCATTTCTTA	SEQ ID NO. 17
BRAF-F1	CACATAACAAATTTT	SEQ ID NO. 18
BRAF-R1	ATAATTAATAATTTCCA	SEQ ID NO. 19
BRAF-P1	ACACGGTATT	SEQ ID NO. 20

将上述表 6 所示目标基因位点的引物和探针，送到生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

S12、所述引物经修饰后备用，所述修饰包括以下步骤：

S121、将设计好的引物的 5' 端添加上核苷酸序列

“TCCTCATCTGTCGAGACTCACTATAGGAAGAGATGTCAACTCGTGCACGAGTTGACATCTCTTCTCCGAGCCGGTCGAAATAT TGGAGGAAGCTCGAGCTGGAGGAAAAGTGAGTCTCGACAGATGAGGA（如 SEQ ID NO. 21 所示）”，以在引物前端形成三维结构，得到扩增用的初始修饰引物。

S122、将合成得到的初始修饰引物，加入到缓冲液中加热至 70℃，保温 5min，然后冷却至 30℃，保温 25min，得到 PCR 扩增用引物。

其中，缓冲液的组分为：300mM NaCl，5mM MgCl₂，20mM Tris(pH 7.6)。缓冲液的组分还包括 5 μM 的小分子化合物，小分子化合物为甲基化寡核苷酸（购自金斯瑞生物科技股份有限公司），且甲基化寡核苷酸和初始修饰引物的摩尔比为 0.8:1。通过 X 单晶衍射数据的分析，测定检测的核苷酸序列 5' 端序列存在三维结构。

S13、将用于检测表 5 所示位点的上游引物、下游引物（即 S122 中的 PCR 扩增用引物）和用于检测表 5 所示位点的突变型荧光探针、野生型荧光探针（即 S11 中合成得到的各探针）共同溶解于 TE 溶液中，制成引物探针混合溶液。各上游引物、下游引物、荧光探针在引物探针混合液中的浓度均为 10 μM。

引物探针混合液的配制方法为：将上游引物、下游引物、荧光探针 1 和荧光探针 2 四种成分的干粉分别用 TE 缓冲液稀释至各探针、引物的浓度分别为 100 μM，备用。

S2、配制 PCR 反应体系后进行 PCR 反应，PCR 反应体系包括样本 DNA 和引物探针混合液。

具体的，按照表 7 配制 PCR 反应体系。

表 7 反应体系（总体积 20 μL）

组分	终浓度	添加量
PCR Mix	/	10 μL
上游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
下游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
荧光探针 1（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
荧光探针 2（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
模板 DNA	1ng/μL	2 μL
ddH ₂ O	/	5.6 μL

其中，PCR Mix 购买自 NEB，并加入终浓度 0.1%的 Triton-X-100，1U 热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL 的 BSA，按照 ddH₂O、PCR mix、探针、引物、模板 DNA 的顺序，将上述样品按照表 7 反应体系中 20 μL 的添加量加入 0.2mLPCR 管中，使用轻柔涡旋将混合体系混匀 15s，并通过短时离心将溶液收集到试管底部。将配制好的不同比例的反应体系上样到 PCR 芯片上，形成微反应单元。将芯片放

入数字 PCR 仪中，按照表 8 中 PCR 反应条件进行 PCR 反应。

其中，所述 PCR Mix 中，不包含三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸（dCTP）组分。

表 8 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	300	1
变性	95℃	15	40
退火	60	15	
延伸	60	30	

S3、PCR 反应结束后对检测数据进行分析，得到不同位点的基因类型。

具体为：

扩增结束后，通过电脑分析，对两个通道的有效荧光阳性点进行判读，并对结果进行分析，如图 3 所示，图 3 为临床样本检测结果图（即结直肠癌基因位点 PIK3CA 和 BRAF 突变位点的聚类分析），纵坐标为 FAM 荧光通道，横坐标为 HEX 荧光通道。由实验结果分析可看出，通过聚类分析可以检测出对应的信号，对应于表 5 所示全部 41 个基因位点。

通过将突变信号（MUT）除以对应的野生型信号（WT）可以计算出目标基因群的突变丰度。采用上述方法，完成了 108 例临床血液样本检测（每例都做 NGS 检测），其中与 NGS 结果一致的有 107 例，不一致的有 2 例（因为 panel 设计不一样），一致率为 98%。

申请人还对血清、血浆、外周血、胸腔积液、体液或者组织来源的 DNA 进行表 5 所示基因位点突变的检测，且重复性良好。通过本实施例所述检测方法，可实现对结直肠癌基因突变位点的灵敏检测，且无非特异性扩增，特异性好。可以添加多种引物进行检测，可以有效地节省反应过程中的底物。

针对直肠癌的用于同时识别多种基因突变的检测试剂盒，包括引物探针混合液和 PCR 混合液。

引物探针混合液包括缓冲液、在缓冲液中的探针和在缓冲液中的初始修饰引物。缓冲液的组分为：300mM NaCl，5mM MgCl₂，20mM Tris(pH 7.6)，缓冲液的组分还包括 5 μM 的小分子化合物。小分子化合物为锁核酸，且锁核酸和初始修饰引物的摩尔比为 0.8:1，各初始修饰引物和各探针在缓冲液中的含量为 10 μM。

PCR 混合液购买自 NEB，并加入终浓度 0.1% 的 Triton-X-100，1U 热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL 的 BSA，还包括 PCR mix，其中 PCR mix 不包括三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸组分。

试剂盒还包括阳性质控品和阴性质控品。

阳性质控品的制备方法为：表 5 所示每一基因突变位点野生型和突变型的序列各 200bp，合成后，分别装入质粒载体 pET-23d(+) (Promega)。使用 Qubit 3.0 进行定量，计算两种类型质粒的拷贝数浓度，根据拷贝数比例 1:3000，1:2000，1:1000，1:500，1:200，1:100，1:50，1:10 混合两种质粒，之后通过超声将质粒混合物打断为约 180bp 的片段，定量到 20ng/μL，作为梯度阳性质控品。

阴性质控品由上述含有野生型的质粒单独构成，然后采用同样方法打断为约 180bp 的片段，定量到 20ng/μL，作为阴性质控品。

实施例 5 结直肠癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

本实施例和实施例 4 的区别在于，步骤 S121 中，于设计好的引物 5' 端添加可形成三维结构的核苷酸序列和实施例 4 不同，本实施例中添加的核苷酸序列为“ACTCATCTGTGAGACTCACTATAGGAAGAGATGTCACTCGTGACAGTTGACATCTCTCTCCGAGCCGGTCGAAATATTGAGGAAGCTCGAGCTGGAGGAAAAGTGAGTCTCACAGATGAGT（如 SEQ ID NO. 22 所示）”，得到扩增用的初始修饰引物。

其他步骤同实施例 4，进行 PCR 扩增后发现，将该可形成三维结构的核苷酸序列添加至设计好的引物的 5' 端时，在循环次数为 25 次时，已经出现了明显的非特异性扩增；而在以实施例 4 的方案进行 PCR 扩增时，循环至少 120 次时，仍未出现非特异性扩增。

实施例 6 食管鳞癌相关的多种基因突变的数字扩增检测方法和检测试剂盒

针对食管癌的用于同时识别多种基因突变的数字扩增检测方法，包括以下步骤：

S1、提取得到样本 DNA 和引物探针混合液的制备

I、样本 DNA 的提取：使用外购食管鳞癌细胞系 KYSE270 作为阴性样品，使用外购 TP53 突变细胞系作为阳性样品，采用基因组 DNA 提取试剂盒（QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen, Valencia, CA, USA））获取基因组 DNA。

II、引物探针混合液的制备

S11、合成目标基因扩增和检测用的引物和探针，所述引物和探针为多个；每个所述目标基因至少设计有两个检测用探针；合成所述引物的核苷酸序列只包括三种碱基且不同时包括碱基 G 和碱基 C。

具体为：

引物及探针设计步骤：

- 1、首先在 Ensemble 数据库中确定包含 TP53 基因突变位点的 DNA 序列；
- 2、通过 BLAST 确定该 DNA 序列在 DNA 上所对应的外显子序列；
- 3、根据所得外显子序列，通过 GenomeBrowser 确定所对应的完整 DNA 序列（包括外显子和内含子）；

其中，TP53 的突变位点、突变基因如表 9 所示。

表 9 实施例检测的目标基因的突变位点

基因型	突变位点					
TP53 (A-1)	p. C277G c. 829T>G	p. C277Y c. 830G>A	p. C277F c. 830G>T	p. C277* c. 831T>A	p. C277C c. 831T>C	p. C277W c. 831T>G
	p. P278F c. 832_833CC >TT	p. P278T c. 832C>A	p. P278A c. 832C>G	p. P278S c. 832C>T	p. P278fs*67 c. 832de1C	p. P278H c. 833C>A
	p. P278R c. 833C>G	p. P278L c. 833C>T	p. P278fs *67 c. 833de1 C	p. G279fs*65 c. 835_838de1 GGGA	p. R280fs*65 c. 835de1G	p. G279R c. 835G>A
	p. G279W c. 835G>T	p. G279E c. 836G>A	p. G279V c. 836G>T	p. G279G c. 837G>A	p. R280_D281de1 RD c. 838_843de1AG AGAC	p. R280G c. 838A>G
	p. R280* c. 838A>T	p. R280K c. 839G>A	p. R280T c. 839G>C	p. R280I c. 839G>T	p. R280S c. 840A>C	p. R280R c. 840A>G
	p. R280S c. 840A>T	p. D281N c. 841G>A	p. D281H c. 841G>C	p. D281Y c. 841G>T	p. D281A c. 842A>C	p. D281G c. 842A>G
	p. D281V c. 842A>T	p. R282W c. 843_84 4CC>TT	p. D281E c. 843C>A	p. D281E c. 843C>G	p. D281D c. 843C>T	p. R282R c. 844C>A
	p. R282G c. 844C>G	p. R282W c. 844C>T	p. R282Q c. 845G>A	p. R282P c. 845G>C	p. R282L c. 845G>T	p. R282R c. 846G>A
				p. S269_F270> I		
	p. N268N	p. S269G	p. S269C		p. S269N	p. S269T
TP53 (A-2)						

	c. 804C>T	c. 805A>G	c. 805A>T	c. 806_808del GCT	c. 806G>A	c. 806G>C
	p. S269S c. 807C>T	p. F270I c. 808T>A	p. F270L c. 808T>C	p. F270V c. 808T>G	p. F270Y c. 809T>A	p. F270S c. 809T>C
	p. F270C c. 809T>G	p. F270L c. 810T>A	p. F270L c. 810T>G	p. E271K c. 811G>A	p. E271Q c. 811G>C	p. E271* c. 811G>T
	p. E271G c. 812A>G	p. E271V c. 812A>T	p. E271E c. 813G>A	p. E271D c. 813G>C	p. V272fs*73 c. 814delG	p. V272M c. 814G>A
	p. V272L c. 814G>C	p. V272L c. 814G>T	p. V272E c. 815T>A	p. V272A c. 815T>C	p. V272G c. 815T>G	p. R273S c. 817C>A
	p. R273G c. 817C>G	p. R273C c. 817C>T	p. R273fs *72 c. 817del C	p. R273H c. 818G>A	p. R273P c. 818G>C	p. R273L c. 818G>T
	p. V274I c. 820G>A	p. V274L c. 820G>C	p. V274F c. 820G>T			
	p. G244G c. 732C>A	p. G244G c. 732C>G	p. G244G c. 732C>T	p. G245N c. 733_734GG> AA	p. G245fs*2 c. 733delG	p. G245S c. 733G>A
	p. G245R c. 733G>C	p. G245C c. 733G>T	p. G245D c. 734G>A	p. G245A c. 734G>C	p. G245V c. 734G>T	p. G245G c. 735C>T
	p. M246V c. 736A>G	p. M246L c. 736A>T	p. M246fs *1 c. 736del A	p. M246K c. 737T>A	p. M246T c. 737T>C	p. M246R c. 737T>G
TP53 (B-1)	p. M246I c. 738G>A	p. M246I c. 738G>C	p. M246I c. 738G>T	p. N247D c. 739A>G	p. N247Y c. 739A>T	p. N247T c. 740A>C
	p. N247S c. 740A>G	p. N247I c. 740A>T	p. N247_R 248>KW c. 741_74 2CC>AT	p. R248W c. 741_742CC> TT	p. N247K c. 741C>A	p. N247N c. 741C>T
	p. R248R c. 742C>A	p. R248G c. 742C>G	p. R248W c. 742C>T	p. R248fs*97 c. 742delC	p. R248Q c. 743_744GG>AA	p. R248L c. 743_744G G>TT
	p. R248Q c. 743G>A	p. R248P c. 743G>C	p. R248L c. 743G>T	p. R248R c. 744G>A	p. R248R c. 744G>C	p. R249G c. 745A>G
	p. R249W c. 745A>T	p. R249fs *96 c. 746del G	p. R249K c. 746G>A	p. R249T c. 746G>C	p. R249M c. 746G>T	p. R249R c. 747G>A
	p. R249S c. 747G>T	p. P250A c. 748C>G				

TP53 (B-2)	p. M237V	p. M237L	p. M237fs*10	p. M237fs*10	p. M237K	p. M237T
	c. 709A>G	c. 709A>T	c. 709delA	c. 710delT	c. 710T>A	c. 710T>C
	p. M237R	p. M237I	p. M237I	p. M237I	p. C238S	p. C238R
	c. 710T>G	c. 711G>A	c. 711G>C	c. 711G>T	c. 712T>A	c. 712T>C
	p. C238G	p. C238Y	p. C238S	p. C238F	p. N239fs*1	p. C238*
	c. 712T>G	c. 713G>A	c. 713G>C	c. 713G>T	c. 714_715insT	c. 714T>A
	p. C238W	p. N239_S240delNS	p. N239_C242delNS SC	p. N239D	p. N239Y	p. N239fs*8
	c. 714T>G	c. 715_720delAACA GT	c. 715_726del112	c. 715A>G	c. 715A>T	c. 715delA
	p. N239T	p. N239S	p. N239K	p. N239K	p. S240G	p. S240C
	c. 716A>C	c. 716A>G	c. 717C>A	c. 717C>G	c. 718A>G	c. 718A>T
	p. S240fs*7	p. S240T	p. S240I	p. S240R	p. S240S	p. S240R
	c. 718delA	c. 719G>C	c. 719G>T	c. 720T>A	c. 720T>C	c. 720T>G
	p. S241del	p. S241fs*6	p. S241T	p. S241P	p. S241A	p. S241F
	c. 721_723delITCC	c. 721delT	c. 721T>A	c. 721T>C	c. 721T>G	c. 722_723C>TT
	p. S241del	p. S241Y	p. S241C	p. S241F	p. C242fs*5	p. C242fs*5
	c. 722_724delICCT	c. 722C>A	c. 722C>G	c. 722C>T	c. 722delC	c. 723delC
	p. C242S	p. C242R	p. C242G	p. C242Y	p. C242S	p. C242F
	c. 724T>A	c. 724T>C	c. 724T>G	c. 725G>A	c. 725G>C	c. 725G>T
	p. C242*	p. C242W	p. C242C	p. M243L	p. M243V	p. M243L
	c. 726C>A	c. 726C>G	c. 726C>T	c. 727A>C	c. 727A>G	c. 727A>T
	p. M243K	p. M243T	p. M243R	p. M243I	p. M243I	p. G244fs*3
	c. 728T>A	c. 728T>C	c. 728T>G	c. 729G>A	c. 729G>C	c. 730delG
	p. G244S	p. G244R	p. G244C	p. G244D	p. G244A	p. G244V
	c. 730G>A	c. 730G>C	c. 730G>T	c. 731G>A	c. 731G>C	c. 731G>T
TP53 (C-1)	p. R174fs*1	p. R175_E180delIRC PHHE	p. C176_R181delICP HHER	p. P177fs*3	p. P177_C182del PHHERC	p. P177P
	c. 520_536del117	c. 523_540del118	c. 526_543del118	c. 529_545del17	c. 529_546del118	c. 531C>G
	p. P177P	p. H178N	p. H178D	p. H178Y	p. H178fs*69	p. H178P
	c. 531C>T	c. 532C>A	c. 532C>G	c. 532C>T	c. 532delC	c. 533A>C
	p. H179Y	p. H178Q	p. H178Q	p. H178H	p. H179N	p. H179D
	c. 534_535CC>TT	c. 534C>A	c. 534C>G	c. 534C>T	c. 535C>A	c. 535C>G
	p. H179Y	p. H179P	p. H179R	p. H179L	p. H179Q	p. H179H

	c. 535C>T	c. 536A>C	c. 536A>G	c. 536A>T	c. 537T>A	c. 537T>C
	p. H179Q	p. E180K	p. E180*	p. E180D	p. R181C	p. R181H
	c. 537T>G	c. 538G>A	c. 538G>T	c. 540G>T	c. 541C>T	c. 542G>A
	p. R181P	p. R181L	p. R181R	p. C182S	p. C182R	p. C182Y
	c. 542G>C	c. 542G>T	c. 543C>T	c. 544T>A	c. 544T>C	c. 545G>A
	p. C182*	p. C182C	p. S183P	p. S183*	p. S183*	p. S183L
TP53 (C-2)	c. 546C>A	c. 546C>T	c. 547T>C	c. 548C>A	c. 548C>G	c. 548C>T
	p. V172fs*2	p. V172I	p. V172F	p. V172D	p. V172A	p. V172G
	c. 514de1G	c. 514G>A	c. 514G>T	c. 515T>A	c. 515T>C	c. 515T>G
	p. V172V	p. V173fs*1	p. V173M	p. V173L	p. V173L	p. V173A
	c. 516T>C	c. 517delG	c. 517G>A	c. 517G>C	c. 517G>T	c. 518T>C
	p. V173G	p. V173V	p. R174W	p. R174K	p. R174M	p. R174fs*73
	c. 518T>G	c. 519G>A	c. 520A>T	c. 521G>A	c. 521G>T	c. 522delG
	p. R174R	p. R175S	p. R175G	p. R175C	p. R175H	p. R175P
	c. 522G>A	c. 523C>A	c. 523C>G	c. 523C>T	c. 524G>A	c. 524G>C
	p. R175L	p. R175R	p. R175R	p. C176fs*71	p. C176S	p. C176R
	c. 524G>T	c. 525C>G	c. 525C>T	c. 526delT	c. 526T>A	c. 526T>C
	p. C176G	p. C176Y	p. C176S	p. C176F	p. C176*	p. C176W
	c. 526T>G	c. 527G>A	c. 527G>C	c. 527G>T	c. 528C>A	c. 528C>G
	p. H178fs*69	p. P177S	p. H178fs*69	p. P177H	p. P177R	p. P177L
	c. 528delC	c. 529C>T	c. 529delC	c. 530C>A	c. 530C>G	c. 530C>T

4、按照上述引物和探针的设计原则，以上述 TP53 突变基因对应的 DNA 序列为模板，利用 Primer3web (version 4.1.0) 在线设计网站设计出覆盖表 9 所示目标基因位点的引物和探针，如表 10 所示。突变型荧光探针 5' 端连接有荧光报告基团 FAM；3' 端连接有荧光淬灭基团 BHQ1；野生型荧光探针 5' 端连接的荧光报告基团 CY3；3' 端连接有荧光淬灭基团 BHQ2。荧光报告基团和淬灭基团还可以根据具体的平台进行合理选择。

表 10 反应管中结直肠癌基因突变位点检测引物探针序列

引物探针名称	引物探针序列	序列号
TP53-F1	TGGGTGACAGAGTGAGACTTC	SEQ ID NO. 23
TP53-R1	ACCCGGCCCTCATTATTCT	SEQ ID NO. 24
TP53-F2	CCAACATGGTGAAACCCCAA	SEQ ID NO. 25
TP53-R2	CCGAAGTGCTGGGATTACA	SEQ ID NO. 26
TP53-F3	GGCACCTCTAATCCCAGCTA	SEQ ID NO. 27
TP53-R3	CCTCAGCCTCCCGAAGTG	SEQ ID NO. 28
TP53-P1	ACGTTGATACCATACTGGAGGT	SEQ ID NO. 29
TP53-P2	AGGATTTGACTCTCA	SEQ ID NO. 30
TP53-P3	TACTCAGGAGGCTGAGGCAGAGAA	SEQ ID NO. 31
TP53-P4	TTGCTTGACCTGGGAGGCAGAGGT	SEQ ID NO. 32

TP53-P5	GGAGGCAGAGGTTGCAGTGAG	SEQ ID NO. 33
TP53-P6	GAGATCGCGCTATTGCACTC	SEQ ID NO. 34

将上述表 10 所示目标基因位点的引物和探针，送到生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

S12、所述引物经修饰后备用，所述修饰包括以下步骤：

S121、将设计好的引物的 5' 端添加上核苷酸序列

“AATGCCAACAATGACCGCAGGTACCCAGATTCAAGGAGAACAGAAGCAGTCAGTCATGGCCCCCTGGTGTGTTTTGAATAATTTGGGTAAAAAGAAGGGACGGACTGAAGATGGAGGTACGAGATTGTTGGCAC（如 SEQ ID NO. 35 所示）”，以在引物前端形成三维结构，得到扩增用的初始修饰引物。

S122、将合成得到的初始修饰引物，加入到缓冲液中加热至 70℃，保温 5min，然后冷却至 30℃，保温 25min，得到 PCR 扩增用引物。

其中，缓冲液的组分为：300mM NaCl，5mM MgCl₂，20mM Tris(pH 7.6)，缓冲液的组分中还包括 5 μM 的小分子化合物；该小分子化合物为硫代磷酸寡核苷酸（购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司），且硫代磷酸寡核苷酸和初始修饰引物的摩尔比为 0.6:1。通过 X 单晶衍射数据的分析，测定检测的核苷酸序列 5' 端序列存在三维结构。

S13、将用于检测表 9 所示位点的上游引物、下游引物（即 S122 中的 PCR 扩增用引物）和用于检测表 9 所示位点的突变型荧光探针、野生型荧光探针（即 S11 中合成得到的各探针）共同溶解于 TE 溶液中，制成引物探针混合溶液。各上游引物、下游引物、荧光探针在引物探针混合液中的浓度均为 10 μM。

引物探针混合液的配制方法为：将上游引物、下游引物、荧光探针 1 和荧光探针 2 四种成分的干粉分别用 TE 缓冲液稀释至各探针、引物的浓度分别为 100 μM，备用。

S2、配制 PCR 反应体系后进行 PCR 反应，PCR 反应体系包括样本 DNA 和引物探针混合液。

具体的，按照表 11 配制 PCR 反应体系。

表 11 反应体系（总体积 20 μL）

组分	终浓度	添加量
PCR Mix	/	10 μL
上游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
下游引物（10 μM）	0.4 μM	0.8 μL
荧光探针 1（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
荧光探针 2（10 μM）	0.2 μM	0.4 μL
模板 DNA	1ng/ μL	2 μL
ddH ₂ O	/	5.6 μL

其中，PCR Mix 购买自 NEB，并加入终浓度 0.1%的 Triton-X-100，1U 热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL 的 BSA，按照 ddH₂O、PCR mix、探针、引物、模板 DNA 的顺序，将上述样品按照表 11 反应体系中 20 μL 的添加量加入 0.2mLPCR 管中，使用轻柔涡旋将混合体系混匀 15s，并通过短时离心将溶液收集到试管底部。将配制好的不同比例的反应体系上样到 PCR 芯片上，形成微反应单元。将芯片放入数字 PCR 仪中，按照表 12 中 PCR 反应条件进行 PCR 反应。

其中，所述 PCR Mix 中，不包含三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸（dCTP）组分。

表 12 PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	300	1
变性	95℃	15	40
退火	60	15	
延伸	60	30	

S3、PCR 反应结束后对检测数据进行分析，得到不同位点的基因类型。

具体为：扩增结束后，通过电脑分析，对两个通道的有效荧光阳性点进行判读，并对结果进行分析，如图4所示，图4为细胞系阳性样品检测结果图（即食管鳞癌基因位点TP53突变位点的聚类分析），纵坐标为FAM荧光通道，横坐标为HEX荧光通道。由实验结果分析可看出，通过聚类分析可以检测出对应的信号，对应于表9所示全部293个基因位点。通过将突变信号（MUT）除以对应的野生型信号（WT）可以计算出目标基因群的突变丰度。

申请人还对血清、血浆、外周血、胸腔积液、体液或者组织来源的DNA进行表9所示基因位点突变的检测，且重复性良好。通过本实施例所述检测方法，可实现对食管鳞癌基因突变位点的灵敏检测，且无非特异性扩增，特异性好。可以添加多种引物进行检测，可以有效地节省反应过程中的底物。

针对食管鳞癌的用于同时识别多种基因突变的检测试剂盒，包括引物探针混合液和PCR混合液。

引物探针混合液包括缓冲液、在缓冲液中的探针和在缓冲液中的初始修饰引物。缓冲液的组分为：300mM NaCl，5mM MgCl₂，20mM Tris(pH 7.6)。缓冲液的组分还包括5 μM的小分子化合物，小分子化合物为硫代磷酸寡核苷酸，且硫代磷酸寡核苷酸和初始修饰引物的摩尔比为0.6:1，各初始修饰引物和各探针在缓冲液中的含量为10 μM。

PCR混合液购买自NEB，并加入终浓度0.1%的Triton-X-100，1U热稳定焦磷酸酶，5 μg/μL的BSA，还包括PCR mix，其中PCR mix不包括三磷酸胞嘧啶脱氧核苷酸组分。

试剂盒还包括阳性质控品和阴性质控品。

阳性质控品的制备方法为：表9所示每一基因突变位点野生型和突变型的序列各200bp，合成后，分别装入质粒载体pET-23d(+) (Promega)。使用Qubit 3.0进行定量，计算两种类型质粒的拷贝数浓度，根据拷贝数比例1:3000，1:2000，1:1000，1:500，1:200，1:100，1:50，1:10混合两种质粒，之后通过超声将质粒混合物打断为约180bp的片段，定量到20ng/μL，作为梯度阳性质控品。

阴性质控品由上述含有野生型的质粒单独构成，然后采用同样方法打断为约180bp的片段，定量到20ng/μL，作为阴性质控品。

本具体实施例仅仅是对本申请的解释，其并不是对本申请的限制，本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改，但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

1. 用于同时识别多种基因类型的数字扩增检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

S1、提取得到样本 DNA；

制备得到引物探针混合液，包括以下步骤：

S11、合成目标基因扩增和检测用的引物和探针，所述引物和探针为多个；每个所述目标基因至少设计有两个检测用探针，用于覆盖目标基因的不同区域；合成所述引物核苷酸序列的碱基包含四种或者四种以下；

S12、使得所述引物的 5' 端添加有能够形成二级结构的核苷酸序列，且使得所述引物上修饰有小分子化合物，得到 PCR 扩增用引物；

所述小分子化合物选自硫代磷酸寡核苷酸、甲基化寡核苷酸、肽核酸、锁核酸、次黄嘌呤核苷酸或铈金属插入剂中的一种或几种；

S13、将所述 PCR 扩增用引物和所述探针共同溶解于核酸溶解用缓冲液中，得到引物探针混合液；

S2、配制 PCR 反应体系后进行 PCR 反应，所述 PCR 反应体系包括所述样本 DNA 和所述引物探针混合液；进行 PCR 反应；

S3、PCR 反应结束后对检测数据进行分析，得到不同位点的基因类型。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，合成所述引物的核苷酸序列包含三种碱基且不同时包含碱基 C 或者碱基 G。

3. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，所述小分子化合物通过额外添加的方式和所述引物连接；S12 包括以下步骤：所述引物的 5' 端添加可形成三维结构的核苷酸序列，得到初始修饰引物；将所述初始修饰引物加入到缓冲液中，所述缓冲液包括小分子化合物，反应得到 PCR 扩增用引物。

4. 根据权利要求 3 所述的检测方法，其特征在于，所述小分子化合物在所述缓冲液中的浓度为 $4 \sim 12 \mu\text{M}$ ，所述小分子化合物和初始修饰引物的摩尔比为 $0.7 \sim 1:1$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，所述探针的核苷酸序列长度为 $10 \sim 30\text{bp}$ 。

6. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，所述样本 DNA 包括 cfDNA。

7. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，在所述引物探针混合液中，每条所述 PCR 扩增用引物的浓度为 $7 \sim 12 \mu\text{M}$ ，每条所述探针的浓度为 $7 \sim 12 \mu\text{M}$ 。

8. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于，步骤 S12 反应时，先加热至 $50 \sim 80^\circ\text{C}$ ，随后保温；然后降温至 $28 \sim 32^\circ\text{C}$ ，保温后即可。

9. 采用权利要求 1-8 任一所述检测方法进行多种基因类型检测的检测产品。

10. 采用权利要求 1-8 任一所述检测方法进行多种基因类型检测的检测试剂盒。