



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03114490. X

[43] 公开日 2004 年 8 月 18 日

[11] 公开号 CN 1521272A

[22] 申请日 2003. 1. 28 [21] 申请号 03114490. X

[71] 申请人 甘肃省医学科学研究所

地址 730050 甘肃省兰州市七里河区小西湖
东街 2 号

[72] 发明人 廖世奇 邵宁生 韩庆斌 张雪力
王黎 王晓辉 张春梅 吴志豪

[74] 专利代理机构 兰州中科华西专利代理有限公司

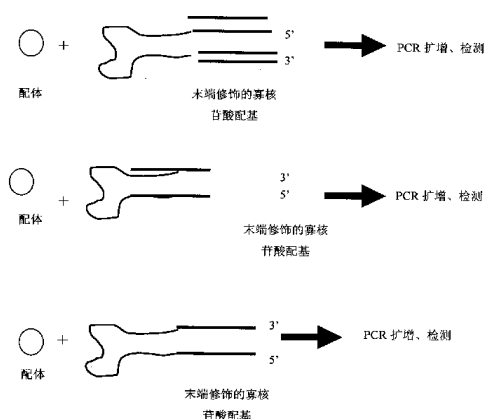
代理人 王玉双

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 新型配体检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种新型核酸配基的配体检测方法，该方法利用经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基(或携带信号分子的特异寡核苷酸配基)与配体直接结合，将配体信号转换成核酸配基信号，然后经 PCR(或滚环复制)扩增放大、检测，来测定配体；该方法检测配体具有快速、灵敏度高、特异性强及多配体微阵检测的特点。



ISSN 1008-4274

- 1、一种新型配体检测方法，包括下述步骤：
 - (1)选择待测配体特异寡核苷酸配基；
 - (2)对步骤(1)中的特异寡核苷酸配基用已知的核酸序列进行修饰；
 - (3)将修饰后的特异寡核苷酸配基与待测配体直接接合形成配体-配基复合物；
 - (4)然后将配体-配基复合物上的修饰核酸进行 PCR 扩增；
 - (5)用与修饰核酸互补的、带有标记物的探针与扩增后的修饰核酸序列杂交得到核酸杂交链；
 - (6)然后检测核酸杂交链上的标记物，即可检测到待测配体。
- 2、如权利要求 1 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的标记物选自化学发光物质、酶、荧光和同位素中的一种。
- 3、如权利要求 1 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的修饰核酸序列步骤是在特异寡核苷酸配基末端人为加上的一些不影响其结合活性的核酸序列，该核酸序列选自 ssDNA、dsDNA 和 RNA 中的一种；所述的修饰核酸序列的长短、碱基序列可根据检测目的设计，其修饰序列特征可通过寡核苷酸配基与配体的特异结合反映配体的信息。
- 4、如权利要求 1 所述的新型配体检测方法，其特征在于还可对步骤(1)中的特异寡核苷酸配基用信号分子进行修饰。
- 5、如权利要求 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于还包括下述步骤：
 - a、将用信号分子修饰的特异寡核苷酸配基与待测配体接合，形成配体-配基复合物；
 - b、检测复合物上的信号分子，即可检测到待测的配体。
- 6、如权利要求 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的信号分子选自化学发光物质、酶、荧光和同位素中的一种。
- 7、如权利要求 1 或 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的配体是指核酸、蛋白质、多肽、有机染料、ATP、金属离子类的任何分子。
- 8、如权利要求 1 或 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的配体特异寡核苷酸配基是指能与配体直接结合的单链 DNA。
- 9、如权利要求 1 或 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于所述的配体特异寡核苷酸配基是指能与配体直接结合的单链 RNA。
- 10、如权利要求 1 或 4 所述的新型配体检测方法，其特征在于应用该检测方法可制成检测试剂和相应的检测试剂盒。

新型配体检测方法

技术领域

本发明涉及一种新型利用核酸配基的配体检测方法，尤其是涉及一种经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基建立的检测配体的方法。

背景技术

抗原检测是通过抗体对抗原分子上特异决定簇的有效识别来实现的。抗原检测，特别是蛋白质的高灵敏度检测对医学研究、后基因组计划的完成及临床检验具有非常重要的作用。目前，特异识别抗原的常用技术是 ELISA（酶联免疫吸附试验），它是通过特异抗体识别抗原决定簇，并通过连接于抗体上的酶、荧光物质、放射性同位素来完成抗原信息的识别、放大，从而实现检测目的。近年来，虽然 ELISA 检测技术有了很大的发展，但是，当检测样品量有限、或抗原浓度极低、或抗体效价不高时，就无法用传统的 ELISA 技术进行检测。

随着基因技术应用的快速发展，在抗原抗体检测方面已有较多的基因检测技术。

Gold 等在 1995 年（Gold L, et al. *Annu Rev Biochem*, 64:763--797）应用 SELEX 筛选出的系统性红斑狼疮特异抗体的 RNA 和 ssDNA 配基，不仅对系统性红斑狼疮进行诊断，而且进行病情监测和疗效检验。Gold 等又在 1999 年（Gold L, et al. *Diagn Dec*; 4(4):381-8）在配基微阵分子诊断应用研究中，对配基微阵分辨率进行研究。均显出核酸配基检测有巨大的应用前景。但是目前的配基检测都是采用直接对配基 PCR 扩增放大检测的方法。这种方法操作复杂，需要将配体和配基分离，且灵敏度低（由于配体和配基分离后，配基纯度及残留配体和配基的再结合阻断 DNA 复制）和准确性差。

发明内容

本发明的目的是为了提供一种利用经修饰的配体特异寡核苷酸配基建立的新型配体检测方法，该方法操作简单，灵敏度高，特异性强，核酸修饰序

列信息量大,可进行微量多样检测等。

本发明的目的可通过如下措施来实现:

本发明的检测方法是利用特异寡核苷酸配基与配体特异表位的有效识别、结合;特异寡核苷酸配基是通过 SELEX 技术,即:从含有一定长度(40-60个 NcDNA)的随机序列,5'和3'两端为固定序列,这些固定序列长度一般为15-30个核苷酸不等的(10^{15} 个)寡核苷酸组成的文库,其中 SELEX 所用的引物与文库模板两端固定序列相互补,对配体经过十几轮 SELEX 过程筛选得到的一段20-40个特定碱基的寡核苷酸家族。特异寡核苷酸配基再通过标记核酸序列的修饰、PCR 信号放大、识别和分析,来实现对配体检测。

本发明提供一种新型配体检测方法,包括下述步骤:

- (1)选择待测配体特异寡核苷酸配基;
- (2)对步骤(1)中的特异寡核苷酸配基用已知的核酸序列进行修饰;
- (3)将修饰后的特异寡核苷酸配基与待测配体直接接合形成配体-配基复合物;
- (4)然后将配体-配基复合物上的修饰核酸进行 PCR 扩增;
- (5)用与修饰核酸互补的、带有标记物的探针与扩增后的修饰核酸序列杂交得到核酸杂交链;
- (6)然后检测核酸杂交链上的标记物,即可检测到待测配体。

所述的标记物选自化学发光物质、酶、荧光和同位素中的一种。

所述的修饰核酸序列步骤是在特异寡核苷酸配基末端人为加上的一些不影响其结合活性的核酸序列,该核酸序列选自 ssDNA、dsDNA 和 RNA 中的一种;所述的修饰核酸序列的长短、碱基序列可根据检测目的设计,其修饰序列特征可通过寡核苷酸配基与配体的特异结合反映配体的信息。

根据上述方法,还可对步骤(1)中的特异寡核苷酸配基用信号分子进行修饰。

根据上述方法,还包括下述步骤:

a、将用信号分子修饰的特异寡核苷酸配基与待测配体接合,形成配体-配基复合物;

b、检测复合物上的信号分子,即可检测到待测的配体。

所述的信号分子选自化学发光物质、酶、荧光和同位素中的一种。

所述的配体是指核酸、蛋白质、多肽、有机染料、ATP、金属离子类的

任何分子。

所述的配体特异寡核苷酸配基是指能与配体直接结合的单链 DNA。

所述的配体特异寡核苷酸配基是指能与配体直接结合的单链 RNA。

根据上述方法，可制成检测试剂和相应的检测试剂盒。。

本发明相比现有技术具有如下优点：

1、本发明的配体特异寡核苷酸配基经过序列修饰后，可建立一种新型配体检测技术及多配体检测技术体系。通过对筛选出的配体特异寡核苷酸配基经过人为序列（标记序列）修饰后；再通过配体和配基的特异结合，制成对应与不同配体的标记序列；经过标记序列的 PCR 信号放大、寡核苷酸微阵芯片的检测，可完成对单一和多种配体的检测。

2、本发明的修饰核酸序列为特异寡核苷酸配基末端人为加上的一些不影响其结合活性的核酸序列（可以是 ssDNA、dsDNA 和 RNA），修饰序列的长短，碱基序列可根据检测目的设计，不同的修饰序列可通过寡核苷酸配基与配体的特异结合反映不同的配体。

3、本发明的灵敏度高：当配基和配体直接结合形成稳定的复合物，和配体特异结合的寡核苷酸配基，其修饰序列可直接通过 PCR 得到指数级富集，使得检测灵敏度更高、特异性更强；

4、本发明的操作简单，易于普及应用：由于在反应时只需将配体和配基室温孵育 2 小时就能完成配体和配基的结合反应，因此操作简便，便于一般实验室或临床检验科室的普及应用。

5、利用本发明的原理组装成检测试剂盒或试纸条，能够快速高效的提高现有各类配体检测的灵敏度、特异性；

6、利用本发明的原理可以发展成一种新型使用的生物芯片技术；

7、利用本发明组装的检测试剂盒或构建的生物芯片可以广泛应用于基础研究与临床检测，并带来可观的经济效益与社会效益。

8、利用该项技术可进行药物和靶向药物的应用研究。

附图说明

图 1 是利用某一类配体特异寡核苷酸配基序列，该序列是通过 SELEX 技术针对配体筛选出的一段 20-40 个碱基的寡核苷酸片段，再经人为合成增加

一些碱基修饰后，使其变成可携带大量信息的配基序列用于多种配体同时检测示意图。人为序列可以加在 5'端、3'端、或 5'端和 3'端同时加上，长度可以多样，其中 PCR 所用引物为寡核苷酸配基两端人为添加序列的互补序列。

具体实施方式

实施例一：

参照图 1，利用经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基与配体直接结合，将配体信号转换成核酸信号，然后经 PCR 扩增放大，检测出配体。

本实施例的原理和技术路线是：将待测配体固定在硝酸纤维素膜等介质上，用封闭液封闭硝酸纤维素膜后，再将膜与经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基孵育一定时间，用洗涤液充分洗涤纤维素膜，将未结合的特异寡核苷酸配基除去，利用 PCR 技术扩增与配体结合的经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基。PCR 扩增所用引物标记有荧光试剂或同位素等，通过检测荧光或同位素的强度实现配体信号的检测。

本发明是利用 SELEX 技术筛选配体的高亲合性寡核苷酸配基（包括单链 DNA 和 RNA），通过寡核苷酸配基对配体的特异性识别、直接结合（中间不需要任何连接分子）及 PCR（或滚环复制）扩增，实现抗原信息的有效传递和放大。

实施例二：

不需要任何连接分子，而是经化学发光物质，酶，荧光和同位素等修饰的配体特异寡核苷酸配基与配体直接结合，将配体信号转换成分子信号，然后经分子信号的识别，检测出配体。

本实施例的原理和技术路线是：将待测配体固定在硝酸纤维素膜等介质上，用封闭液封闭硝酸纤维素膜后，再将膜与经信号分子修饰的配体特异寡核苷酸配基孵育一定时间，用洗涤液充分洗涤纤维素膜，将未结合的特异寡核苷酸配基除去，通过检测荧光或同位素的强度实现配体信号的检测。

本发明强调的是该配体检测方法中配体和配基之间无任何连接分子，是特异性直接连接。

实施例三：

将某一类配体的寡核苷酸配基经核酸序列人为修饰后（如末端人为加上

一些不影响其结合活性的核酸序列), 根据修饰序列长短不同, 碱基序列不同, 通过寡核苷酸配基与配体的特异结合使修饰序列代表不同配体, 然后经 PCR (或滚环复制) 扩增放大, 修饰序列的检测, 从而鉴定配体。可利用这项技术构建微阵列或生物芯片。

本实施例的原理和技术路线是: 将含多种待测配体的检测样品固定在硝酸纤维素膜等介质上, 用封闭液封闭硝酸纤维素膜后, 再将膜与经不同核酸序列修饰的多种待测配体特异寡核苷酸配基孵育一定时间后, 用洗涤液充分洗涤纤维素膜, 将未结合的特异寡核苷酸配基除去, 利用 PCR 技术扩增与配体结合的经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基的修饰序列, 通过对不同配体的核酸修饰序列用寡核苷酸芯片检测, 对配体进行定量定性分析检测。

本发明所指的寡核苷酸可以是 ssDNA, 也可以是 RNA。通过 SELEX 筛选出序列后, 可以直接化学合成或通过其他分子生物学的方法获得。

下面结合实施例对本发明的具体应用作进一步详细说明。

实施例 1. 单一配体的检测

具体方法如下:

将配体固定在硝酸纤维素膜上, 封闭液封闭后, 将膜与经核酸序列修饰的配体特异寡核苷酸配基在 37°C 下共同孵育 30 分钟, 用洗涤液洗涤滤膜数次后, 将滤膜重新置于含有 PCR 反应液 (包括引物及标准 PCR 反应体系) 的薄壁 PCR 管中, 进行 PCR 扩增。利用引物上标记的荧光试剂检测荧光信号, 同时设立相应未进行 PCR 扩增 (相应试剂都存在) 的对照。扣除对照荧光信号差即为待测配体的信号。

实施例 2. 用于原发性肝癌早期诊断新型配体微阵列的制备及其应用

具体步骤如下:

1. 分别制备 AFP (甲胎蛋白)、Ft(铁蛋白)、GGT (γ —谷氨酰转氨酶) 及 GGT 同工酶的特异核酸标记配基: 方法是用 SELEX 技术分别筛选 AFP (甲胎蛋白)、Ft(铁蛋白)、GGT (γ —谷氨酰转氨酶) 及 GGT 同工酶四种配体的寡核苷酸配基, 然后在 5' 末端分别人为加上 4 种不影响其结合活性的核酸序列 A、B、C、D, 长度 40—80bp, 既成为 4 种特定的核酸标记配基的修饰序列。

2. 按目前常规方法制备针对上述 A、B、C、D 序列的微阵列。

3. 将含上述 4 种配体的检测样品（如：患者血清）固定在硝酸纤维素膜上，用封闭液封闭后与上述 4 种特定的核酸标记配基试剂在 37℃ 下共同孵育 30 分钟，再用洗涤液冲洗滤膜数次后，将滤膜置于含有 PCR 反应液（包括引物及标准 PCR 反应体系）的薄壁 PCR 管中，进行 PCR 扩增。所用引物分别为针对上述 A、B、C、D 4 种人为序列（既可同时存在 8 种引物或 2 种相同的引物），引物上同时标记有荧光试剂。用微阵列技术对 PCR 产物进行定性定量分析，即可检测上述 4 种配体，从而对原发性肝癌进行早期诊断。

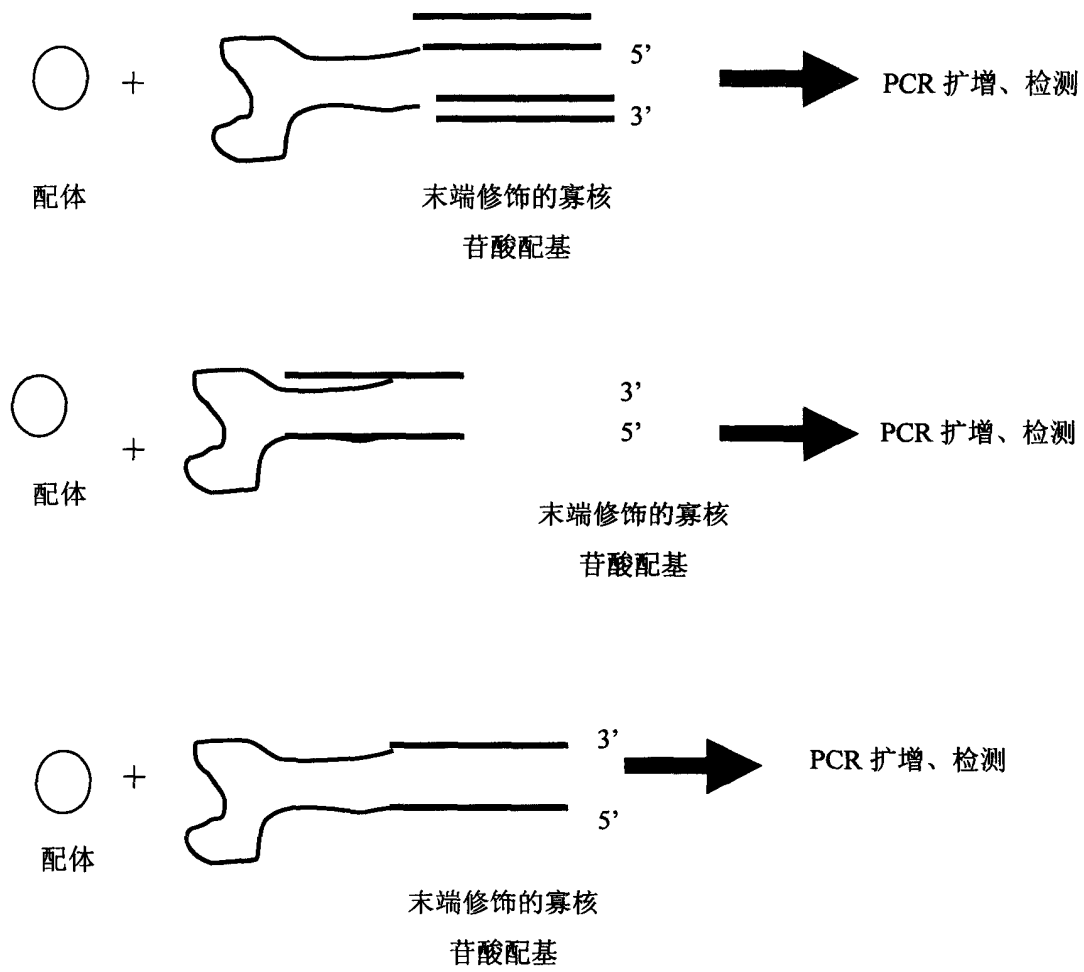


图 1