



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104073432 B

(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201410190295.3

(22)申请日 2014.05.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104073432 A

(43)申请公布日 2014.10.01

(73)专利权人 上海缔达生物科技有限公司

地址 200000 上海市杨浦区邯郸路8号1519号席位

(72)发明人 陈静

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理事务所(普通合伙) 11371

代理人 吴开磊

(51)Int.Cl.

C12M 1/34(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

US 2010216139 A1,2010.08.26,全文.

CN 102827844 A,2012.12.19,全文.

CN 102618640 A,2012.08.01,全文.

WO 2009100430 A2,2009.08.13,第16-20页,第57-59页,表2-1.

无.NR_029957.1.《NCBI》.2014,

张铃.非编码RNA在肝癌发生、发展中的功能及机制研究.《中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2014,

张铃.非编码RNA在肝癌发生、发展中的功能及机制研究.《中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》.2014,

审查员 纪圆圆

权利要求书2页 说明书8页

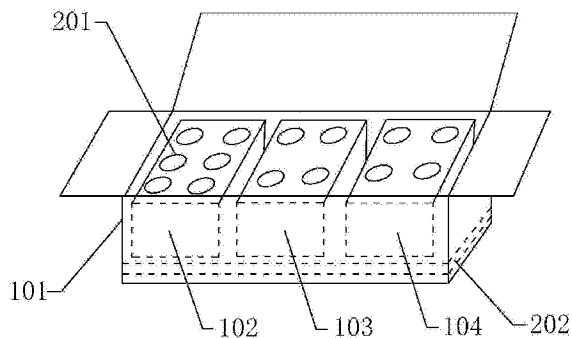
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及生物检测领域,具体而言,涉及检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法。该试剂盒,包括箱体、提取RNA的试剂、逆转录试剂、PCR扩增试剂、无RNA酶的纯水、阴性质控品、含有肝癌标记核酸分子的阳性质控品以及用于分隔收集所有试剂的试剂瓶或试剂管;盒体的内底壁上设置有第一试剂架、第二试剂架和第三试剂架;装有逆转录试剂的试剂瓶或试剂管设置在第一试剂架上;装有PCR扩增试剂的试剂瓶或试剂管设置在第二试剂架上;装有无RNA酶的纯水、阴性质控品、阳性质控品的试剂瓶或试剂管设置在所述第三试剂架上。本发明提供的试剂盒,通过相对定量法快速准确的测得待测血清中肝癌标记核酸分子的相对表达量。



1. 一种检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于:包括盒体、提取RNA的试剂、逆转录试剂、PCR扩增试剂、无RNA酶的纯水、阴性质控品、含有肝癌标记核酸分子的阳性质控品以及用于分隔收集所有试剂的试剂瓶或试剂管;

其中,所述逆转录试剂包括:肝癌标记核酸分子的逆转录引物和逆转录酶;所述肝癌标记核酸分子逆转录引物的序列为:

5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACGGTTTTACCAGACAGTATTA-3';

所述逆转录酶为M-MLV逆转录酶或AMV逆转录酶;

所述PCR扩增试剂包括:肝癌标记核酸分子正向引物、肝癌标记核酸分子反向引物、带有荧光标记的肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针、核酸扩增酶;

所述肝癌标记核酸分子正向引物的序列为:5'-ACACTCCAGCTGGGTAATACTGTCTGGTA-3';

所述肝癌标记核酸分子反向引物的序列为:5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC-3';

所述肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针的序列为:5'X-TTCAGTTGAGACGGTTTTACC-Y3';

其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生基团或荧光淬灭基团;

所述盒体的内底壁上设置有第一试剂架、第二试剂架和第三试剂架;

装有所述逆转录试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第一试剂架上;装有所述PCR扩增试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第二试剂架上;装有无RNA酶的纯水、阴性质控品、阳性质控品的试剂瓶或试剂管设置在所述第三试剂架上。

2. 根据权利要求1所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于:

所述第一试剂架、所述第二试剂架以及所述第三试剂架上均设置有多个用于装载试剂瓶或试剂管的通孔。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于:

所述第一试剂架、所述第二试剂架以及所述第三试剂架与所述底壁之间设置有泡沫层。

4. 根据权利要求3所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于:

所述用于提取RNA的试剂为Trizol试剂或磁珠法抽提RNA所用的试剂。

5. 根据权利要求4所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于,所述逆转录试剂还包括作为内参基因检测的U6 SnRNA逆转录引物;

所述U6 SnRNA逆转录引物的序列为:

5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3'。

6. 根据权利要求5所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于,所述PCR扩增试剂还包括:

作为内参检测的U6 SnRNA的正向引物、U6 SnRNA的反向引物、以及U6 SnRNA的寡核苷酸探针;

所述U6 SnRNA的正向引物的序列为:

5'-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3';

所述U6 SnRNA的反向引物的序列为:

5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3';

所述U6 SnRNA的寡核苷酸探针的序列为:

5'X-CGCAGGGGCCATGCTAAT-Y-3'；

其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生基团或荧光淬灭基团。

7.根据权利要求1所述的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,其特征在于,

所述阴性质控品为牛血清蛋白或生理盐水溶液;

所述阳性质控品为含有肝癌标记核酸分子的溶液。

检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体而言,涉及检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 肝细胞性肝癌(HCC)是肝脏最常见的恶性肿瘤,占世界范围内癌症相关死亡的第三位。由于利用现有的肝癌诊断方法大多数肝癌患者被确诊时已为晚期,导致其5年生存率低至10%-15%,所以对癌症发生的早期预测和早期检测对于选择有效的治疗方法来说至关重要。目前使用得最广泛的肝癌测定方法包括血清甲胎蛋白(AFP)检测和B超等影像学检查等。然而,这些传统的方法都不能用作肝癌早期预测的理想指标。相当多的肝细胞性肝癌病人表现出甲胎蛋白水平低或正常,与之相反,约20%-25%的慢性肝炎、肝硬化及其他肝脏疾病患者具有较高AFP水平。

[0003] 另一方面,虽然改进的成像技术使人们有可能发现肝脏局灶性小病变,但是还很难区分良性病变与肿瘤,并且诊断结果与技术操作人员的经验密切相关,受主观因素影响较大。

[0004] 由此可见,由于血清甲胎蛋白和影像学检查都不是理想的肝癌预测及检查方法,也就促使研究者去发现更加敏感和特异的标志物,以期利用这些可能的方法对肿瘤高危人群发生肝细胞性肝癌的可能性进行早期预警。

[0005] 循环核酸是指存在于血液(血浆或血清)中的细胞外游离DNA和RNA。肿瘤患者血循环中核酸含量明显高于正常人,研究证实其来源于肿瘤细胞,并且与原发肿瘤有着结构或功能上的某些一致性,因此循环核酸对肿瘤的诊断、治疗和预后评估都有着重要的价值。

[0006] 早在20世纪70年代末,人们就发现癌症患者血浆DNA含量增加,80年代末相继发现肿瘤患者的血浆或血清DNA具有肿瘤DNA的特征性改变,如链的稳定性降低、*hprt*和*p53*基因突变、微卫星改变、肿瘤抑癌基因启动子的高甲基化、免疫球蛋白重链DNA重排、线粒体DNA突变和肿瘤相关病毒DNA等。

[0007] 最近,人们又发现癌症患者血浆或血清中存在肿瘤相关RNA,如酪氨酸酶RNA、端粒酶成分RNA、不同肿瘤相关基因编码的mRNA和病毒RNA等。目前,基于PCR技术的多种方法可以对极微量的循环核酸进行检测和定量,循环核酸测定已成为肿瘤分子诊断学中一个新的研究靶点。具体的,可以通过检测慢性乙肝患者的血清样本,以及其中发生肝癌的患者确诊半年至一年以前的血清样本,进行小分子核酸差异表达谱分析,通过筛选出与未发生肝癌者相比差异表达的特异性小分子核酸,作为肝癌标记核酸分子,再通过定量检测进而确定其含量,通过其含量分析实现肝癌早期预警分析。

[0008] 然而,在相关技术中,还没有一种用于检测上述肝癌标记核酸分子的试剂盒。因此,为了实现快速准确的检测上述的肝癌标记核酸分子,并准确的进行肝癌早期预警,提供一种用于检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法是本领域亟待解决的一个技术问题。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法,以解决上述的问题。

[0010] 在本发明的实施例中提供了一种检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,包括箱体、用于提取RNA的试剂、逆转录试剂、PCR扩增试剂、无RNA酶的纯水、阴性质控品、阳性质控品以及用于分隔收集所有试剂的试剂瓶或试剂管;

[0011] 所述箱体的内底壁上设置有第一试剂架、第二试剂架和第三试剂架;

[0012] 装有所述逆转录试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第一试剂架上;装有所述PCR扩增试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第二试剂架上;装有无RNA酶的纯水、阴性质控品、阳性质控品的试剂瓶或试剂管设置在所述第三试剂架上。

[0013] 本发明实施例提供的用于检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,先利用提取RNA的试剂对阴性、阳性质控品及待测血清样本进行RNA抽提,得到阴性、阳性质控RNA样本及待测RNA样品,然后再将得到的待测RNA样品作为模板利用逆转录试剂进行逆转录,得到cDNA片段;得到的cDNA片段通过加入PCR扩增试剂(其中所含的引物分别根据肝癌标记核酸分子及内参U6SnRNA特异性合成)之后进行荧光定量PCR扩增,得到扩增片段并确定肝癌标记核酸分子和内参基因的Ct值,进而通过相对定量法快速准确的测得待测血清中肝癌标记核酸分子的相对表达量。

[0014] 可选的,所述第一试剂架、所述第二试剂架以及所述第三试剂架上均设置有多个用于装载试剂瓶或试剂管的通孔。

[0015] 可选的,所述第一试剂架、所述第二试剂架以及所述第三试剂架上与所述底壁之间设置有泡沫层。

[0016] 可选的,所述用于提取RNA的试剂为Trizol试剂、磁珠法抽提RNA所用的试剂。

[0017] 可选的,所述逆转录试剂包括:肝癌标记核酸分子的逆转录引物和逆转录酶;

[0018] 所述肝癌标记核酸分子逆转录引物的序列包括全部或部分下述序列:

[0019] 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGA

[0020] CGGTTTTACCAGACAGTATTA-3';

[0021] 所述逆转录酶为M-MLV逆转录酶或AMV逆转录酶。

[0022] 可选的,所述PCR扩增试剂包括:肝癌标记核酸分子正向引物、肝癌标记核酸分子反向引物、带有荧光标记的肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针、核酸扩增酶;

[0023] 所述肝癌标记核酸分子正向引物的序列包含下述全部或部分序列:

[0024] 5'-ACACTCCAGCTGGGTAATACTGTCTGGTA-3';

[0025] 所述肝癌标记核酸分子反向引物的序列包含下述全部或部分序列:

[0026] 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC-3';

[0027] 所述肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针的序列包含下述全部或部分序列:

[0028] 5'X-TTCAGTTGAGACGGTTTTACC-Y3';

[0029] 其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生集团或荧光淬灭基团。

[0030] 可选的,所述的逆转录引物还包括作为内参基因检测的U6SnRNA逆转录引物;

- [0031] 所述U6SnRNA逆转录引物的序列包括全部或部分下述序列：
- [0032] 5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3'。
- [0033] 可选的,所述PCR扩增试剂还包括：
- [0034] 作为内参检测的U6SnRNA的正向引物、U6SnRNA的反向引物、以及U6SnRNA的寡核苷酸探针；
- [0035] 所述U6SnRNA的正向引物的序列包含下述全部或部分序列：
- [0036] 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3'；
- [0037] 所述U6SnRNA的反向引物的序列包含下述全部或部分序列：
- [0038] 5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3'；
- [0039] 所述U6SnRNA的寡核苷酸探针的序列包含下述全部或部分序列：
- [0040] 5'X-CGCAGGGCCATGCTAAT-Y-3'；
- [0041] 其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生集团或荧光淬灭基团。
- [0042] 可选的,所述阴性质控品为牛血清蛋白或生理盐水溶液;所述阳性质控品为含有肝癌标记核酸分子的溶液。
- [0043] 本发明实施例还提供了一种根据上述试剂盒检测肝癌标记核酸分子的方法,包括以下步骤：
- [0044] 利用提取RNA的试剂待测血清样本进行RNA抽提,得到待测RNA样品；
- [0045] 以所述待测RNA样品为模板,再利用逆转录试剂进行逆转录,得到cDNA片段；
- [0046] 在所述cDNA片段中加入PCR扩增试剂,进行荧光定量PCR,并通过软件分别分析获得的肝癌标记核酸分子扩增曲线的Ct值以及内参基因扩增曲线的Ct值。

附图说明

- [0047] 图1示出了本发明实施例二提供的检测肝癌标记核酸分子的试剂盒的示意图；
- [0048] 图2示出了在本发明实施例三中标准曲线的示意图；
- [0049] 图3示出了在本发明实施例三中不同血清标本的荧光定量PCR的扩增曲线图；
- [0050] 图4示出了在本发明实施例三中肝癌标记核酸分子(标记1")在普通慢性乙肝患者与早期肝癌患者中的表达图；
- [0051] 图5为本发明实施例二提供的试剂盒的ROC曲线评价图。

具体实施方式

- [0052] 下面通过具体的实施例子并结合附图对本发明做进一步的详细描述。
- [0053] 实施例一
- [0054] 请结合图1,在本发明的实施例中提供了一种用于检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,包括盒体101、用于提取RNA的试剂、逆转录试剂、PCR扩增试剂、无RNA酶的纯水、阴性质控品、含有肝癌标记核酸分子的阳性质控品以及用于分隔收集所有试剂的试剂瓶或试剂管;所述盒体101的内底壁上设置有第一试剂架102、第二试剂架103和第三试剂架104;装有上述逆转录试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第一试剂架102上;装有所述PCR扩增试剂的试剂瓶或试剂管设置在所述第二试剂架103上;装有无RNA酶的纯水、阴性质控品、阳性质控

品的试剂瓶或试剂管设置在所述第三试剂架104上。

[0055] 本发明实施例提供的用于检测肝癌标记核酸分子的试剂盒,先利用提取RNA的试剂对阴性、阳性质控品及待测血清样本进行RNA抽提,得到阴性、阳性质控RNA样本及待测RNA样品,然后再将得到的待测RNA样品作为模板利用逆转录试剂进行逆转录,得到cDNA片段;得到的cDNA片段通过加入PCR扩增试剂(其中所含的引物分别根据肝癌标记核酸分子及内参U6SnRNA特异性合成)之后进行荧光定量PCR扩增,得到扩增片段并确定肝癌标记核酸分子和内参基因的Ct值,进而通过相对定量法快速准确的测得待测血清中肝癌标记核酸分子的相对表达量。

[0056] 为了使得本发明实施例一的用于检测肝癌标记核酸分子的试剂盒得到更好的应用,更加有效应用到生物检测领域中,本发明实施例还在上述实施例一的基础之上提供了实施例二,实施例二是在上述实施例一的试剂盒的基础上做出的详细的阐述和解释,请参考图1。

[0057] 实施例二

[0058] 在本实施例中,为了便于在盒体101设置的多个试剂架能够有序稳定的将试剂管或试剂瓶固定,优选的,所述第一试剂架102、所述第二试剂架103以及所述第三试剂架104上均设置有多个用于装载试剂瓶或试剂管的通孔201;这样所有的试剂管或试剂瓶则可以设置在对应的通孔201上,进而实现相对固定。

[0059] 这样,试剂瓶或试剂管则可以对应的设置在通孔201上。考虑到试剂盒在运输的过程中会出现磕碰的现象,严重时可能会导致试剂管或者试剂瓶出现碎裂的情况,为了防止上述情况的发生,在本实施例中,优选的,所述盒体101为一个具有开口的矩形盒体101,且所述矩形盒体101的开口与底壁相对;所述第一试剂架102、所述第二试剂架103以及所述第三试剂架104上与所述底壁之间设置有泡沫层202。泡沫层202可以起到减震和缓冲的效果,可以有效的放置试剂瓶或试剂管在运输过程或者意外情况下被碰碎。

[0060] 此外,在本实施例中,为了实现快速有效的提取样本RNA的效果,优选的,所述用于提取RNA的试剂为Trizol试剂或磁珠法抽提RNA所用的试剂。RNA提取试剂除本发明提及的方法外,还可以使用其他成熟的RNA提取方法或试剂盒。

[0061] 同时,逆转录试剂具体包括:肝癌标记核酸分子的逆转录引物和逆转录酶;所述肝癌标记核酸分子逆转录引物的序列包括全部或部分下述序列(SEQ ID NO:1):

[0062] 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGA

[0063] CGGTTTTACCAGACAGTATTA-3'

[0064] 所述逆转录酶为M-MLV逆转录酶或AMV逆转录酶;在本实施例中,优选M-MLV逆转录酶。同时,还包括逆转录的体系,其含有:5X逆转录缓冲液、DTT、dNTPs、无RNA酶的纯水、RNA酶抑制剂,及提取出的RNA。通过上述试剂以及提取得到的RNA模板,通过逆转录的操作即可得到cDNA片段。

[0065] 需要指出的是,在上述的操作中,逆转录引物是根据肝癌标记核酸分子的序列特定设定的。

[0066] 得到cDNA片段之后,需要对其进行荧光定量PCR的操作,优选的,在PCR扩增的过程中,所述PCR扩增试剂包括:肝癌标记核酸分子正向引物、肝癌标记核酸分子反向引物、带有荧光标记的肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针、核酸扩增酶;所述肝癌标记核酸分子正向引

物的序列(SEQ ID NO:2):

[0067] 5'-ACACTCCAGCTGGGTAATACTGTCTGGTA-3';

[0068] 所述肝癌标记核酸分子反向引物的序列(SEQ ID NO:3):

[0069] 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC-3';

[0070] 所述肝癌标记核酸分子寡核苷酸探针的序列(SEQ ID NO:4):

[0071] 5'X-TTCAGTTGAGACGGTTTTACC-Y3';

[0072] 其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生集团或荧光淬灭基团。

[0073] 上述引物都是通过肝癌标记核酸分子特异性设定的(其包括全部或者部分上述所示序列)。

[0074] 此外,为了避免扩增产生的误差,本发明还以U6SnRNA作为内参基因,所述内参基因的逆转录引物的序列包括全部或部分下述序列(SEQ ID NO:5):5'-CACGAATTTGCGTGTCTATCC-3'。

[0075] 另外,所述PCR扩增试剂还包括:作为内参检测的U6SnRNA的正向引物、U6SnRNA的反向引物、以及U6SnRNA的寡核苷酸探针;所述U6SnRNA的正向引物的序列(SEQ ID NO:6)为:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3';所述U6SnRNA的反向引物的序列包含下述全部或部分序列(SEQ ID NO:7):5'-CACGAATTTGCGTGTCTATCC-3';所述U6SnRNA的寡核苷酸探针的序列包含下述全部或部分序列(SEQ ID NO:8)5'X-CGCAGGGCCATGCTAAT-Y-3';其中,X或Y修饰在能够与靶多核苷酸结合的寡核苷酸片段两末端,且分别为荧光发生集团或荧光淬灭基团。

[0076] 上述引物都是通过U6SnRNA特异性设定的(其包括全部或者部分上述所示序列)。

[0077] 通过荧光定量PCR之后,其可以确定样本中的肝癌标记核酸分子的相对于U6SnRNA的相对表达量。

[0078] 在本实施例中,为了实现标准曲线的制作以及进行对比分析,优选的,所述阴性质控品为牛血清蛋白或生理盐水溶液或正常人的血清;所述阳性质控品为含有肝癌标记核酸分子的溶液。更具体的,在本发明所有的实施例中,阳性质控品为早期肝癌患者血清或者已知浓度的含有人工合成的肝癌标记核酸分子的溶液,其序列(SEQ ID NO:9)为:5'-ACGGTTTTACCAGACAGTATTA-3'或包含其互补序列的脱氧核糖核酸或核糖核酸分子。

[0079] 接下来,本发明实施例还提供了一种利用上述实施例的试剂盒测定肝癌标记核酸分子的方法;请参考实施例三以及图2-5:

[0080] 实施例三

[0081] 本实施例具体包括以下步骤:

[0082] S1:以梯度稀释的阳性质控品为模板,依次通过逆转录以及荧光定量PCR检测,得到标准曲线;

[0083] 此步骤为标准曲线的制备过程,更具体的,该步骤可以按照以下操作进行:

[0084] 将阳性质控品依据储存液标记拷贝数,用无RNA酶的纯水稀释为不同拷贝数梯度:500、5K、50K、500K、5M。

[0085] 各取50 μ l上述不同拷贝数的RNA标准品,加入10X转录反应的缓冲液10 μ l,震荡混匀后,放入70 $^{\circ}$ C水浴或空气浴中孵育10分钟,结束后迅速放入冰浴中处理2分钟;随后加入其中40 μ l逆转录酶混合液进行逆转录;其中,逆转录酶混合液包括:逆转录引物(50ng/ μ l)2

μl 、dNTPs(10mmol/L)2 μl 、RNasin(40U/ μl)2.5 μl 、MMLV(200U/ μl)2 μl 、ddH₂O 31.5 μl ,总体积为40 μl 。

[0086] 其中,逆转录过程中的条件按照如下设置:

[0087] 25°C5min

[0088] ↓

[0089] 42°C60min

[0090] ↓

[0091] 70°C15min

[0092] ↓

[0093] 4°C15min

[0094] ↓

[0095] 逆转录后得到的cDNA片段;

[0096] 逆转录得到的cDNA片段,用Applied Biosystems 7300Fast Real-Time PCR System软件分析结果。

[0097] 其中,荧光定量PCR检测体系和实验条件如下:

	cDNA 片段	7 μl;
	上游引物 (10 μM)	1 μl;
	下游引物 (10 μM)	1 μl;
[0098]	Taqman 荧光探针(10 μM)	1 μl;
	2×Taqman Universal PCR Master Mix	10μl;
	Total Volume:	20 μl;

[0099] 荧光定量PCR的循环次数为40,具体的,在95°C预变性4分钟、94°C变性15秒、58°C复性30秒、72°C延伸35秒。

[0100] 荧光定量PCR的结果,如图2所示,其拟合曲线为直线,方程为 $Y = -3.581X + 44.47$, $R^2 = 0.999$,表明本试剂盒对于检测肝癌标记核酸分子的线性相关性良好,具有很好的精确性。

[0101] S2:利用提取RNA的试剂提取血清中的RNA,得到RNA样品;

[0102] 具体的,为了提高RNA提取的可控性和效率,优选的,整个提取过程可以按照以下操作进行:

[0103] 运用本试剂盒中的Trizol试剂,对待检测样本(为了实现对比效果,同时可对阴性及阳性对照品进行总RNA抽提),步骤如下:

[0104] a)、将50 μl 样本血清与1mlTrizol混合后,室温放置5min,使其充分裂解;

[0105] b)、加入200 μl 氯仿(sigma),振荡混匀后室温放置15min;

[0106] c)、4°C12,000g离心15min;

[0107] d)、吸取上层水相,至另一离心管中,加入0.5ml异丙醇(sigma)混匀,室温放置5-10min;

- [0108] e)、4℃12,000g离心10min,弃上清,RNA沉于管底;
- [0109] f)、加入1ml 75%乙醇,漂洗沉淀后弃上清;
- [0110] g)、室温晾干或真空干燥5-10min,后用50μl无RNA酶H₂O溶解,得到RNA样品。
- [0111] S3:以所述RNA样品为模板,再利用逆转录试剂进行逆转录,得到cDNA片段;
- [0112] 需要指出的是,在本实施例中,为了避免扩增产生的误差,本实施例还以U6SnRNA作为内参基因,其相关引物如下:
- [0113] U6SnRNA逆转录引物序列:
- [0114] 5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3'
- [0115] U6SnRNA上游引物序列:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3'
- [0116] U6SnRNA下游引物序列:5'-CACGAATTTGCGTGTCATCC-3'
- [0117] U6SnRNA探针序列:5'X-CGCAGGGGCCATGCTAAT-Y-3'
- [0118] 具体操作的过程按照以下步骤进行:各取50μl抽提好的样本RNA,阳性对照RNA(通过阳性质控品获得),阴性对照(通过阴性质控品获得),加入10X转录反应的缓冲液10μl,震荡混匀后,放入70℃水浴或空气浴中孵育10分钟,结束后迅速放入冰浴中处理2分钟;随后加入其中40μl逆转录酶混合液;其中,逆转录酶混合液包括:肝癌标记核酸分子的逆转录引物(50ng/μl)2μl、U6SnRNA逆转录引物(50ng/μl)2μl、dNTPs(10mmol/L)2μl、RNasin(40U/μl)2.5μl、MMLV(200U/μl)2μl、ddH₂O29.5μl;反应总体积为:40μl。
- [0119] 逆转录的过程和上述步骤101中制作标准曲线时的过程一致,在此不作赘述,需要指出的是,在逆转录的过程中,对待测样本RNA以及内参基因均进行逆转录操作,获得不同的cDNA片段,然后再将不同的cDNA片段进行荧光定量PCR扩增。
- [0120] S4:在所述cDNA片段中加入PCR扩增试剂,进行荧光定量PCR,并通过软件分别分析获得的肝癌标记核酸分子扩增曲线的Ct值以及内参基因扩增曲线的Ct值;
- [0121] 在得到相应的cDNA片段(待测RNA样品以及内参基因)之后,需要对其进行荧光定量PCR扩增;扩增过程中的反应体系和条件按照如下设置:

cDNA 片段	9μl;
肝癌标记核酸分子上游引物 (10μM)	1μl;
肝癌标记核酸分子下游引物 (10μM)	1μl;
U6 SnRNA 上游引物 (10μM)	1μl;
[0122] U6 SnRNA 下游引物 (10μM)	1μl;
肝癌标记核酸分子 Taqman 荧光探针(10μM)	1μl;
U6 SnRNA Taqman 荧光探针(10μM)	1μl;
2×Taqman Universal PCR Master Mix	15μl
Total Volume:	30μl;

- [0123] 荧光定量PCR的循环次数为40,具体的,在95℃预变性4分钟,94℃变性15秒,58℃复性30秒,72℃延伸35秒。

[0124] 完成上述步骤之后,通过ROC曲线评价内参和肝癌标记核酸分子的Ct值的差值($\Delta Ct = Ct_{U6} - Ct_{\text{肝癌标记}}$),以曲线下面积(AUC值)最大时的 ΔCt 值作为临界值(cutoff值),当大于其值定义为阳性,而小于其值则判为阴性,进而实现早期肝癌预警。

[0125] 另外,请参考图3,图3示出了不同样品的荧光定量PCR结果;阳性对照、早期肝癌患者血清的肝癌标记核酸分子(标记1)的扩增曲线呈典型的S型曲线,且Ct值均小于40,可认为是阳性扩增曲线。而阴性对照的扩增曲线不呈S型,Ct值大于40,可认为是阴性扩增曲线。样本(患者)的内参U6SnRNA的扩增曲线均呈现典型的S型曲线,且Ct值均小于40,均判定为是阳性扩增曲线。

[0126] 更具体的,在图3中,4份普通慢性肝炎样本血清“肝癌标记核酸分子(标记1)检测Ct值分别为:30.2、30.9、31.0、32.5;3份早期肝癌患者血清肝癌标记核酸分子(标记1)检测Ct值分别为:24.9、25.2、25.6;3个复孔阳性对照的Ct值分别为19.3、19.9、20.0;阴性对照的Ct值均 >42 。表明背景信号对标本检测信号干扰很小,反映检测特异性高。

[0127] 另外,将肝癌标记核酸分子(标记1)的Ct值和内参U6SnRNA的Ct值相减,得到的差值(ΔCt)作为后续ROC曲线分析的协变量。

[0128] 在进一步的技术方案中,为了验证本试剂盒定量肝癌标记核酸分子(即应用于早期肝癌检测)的特异性、敏感性,利用本发明实施例提供二提供的试剂盒检测了81个未诊断出肝癌的普通乙肝慢性患者血清和40个早期肝癌患者血清;对大样本量进行鉴定,以2组样本各自的 ΔCt 分别为普通慢性乙肝患者 -4.67 ± 3.09 和早期肝癌患者 -1.42 ± 3.90 (见图4);经统计学分析,2组样本 ΔCt 之间差异有统计学意义($P < 0.0001$)。

[0129] 以2组样本各自的 ΔCt 作为协变量,绘制ROC曲线(请参考图5),并以目前临床上广泛使用的肝癌检测指标-甲胎蛋白(AFP)检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)作为对照。结果可知,肝癌标记核酸分子(标记1)的ROC曲线下面积(AUC)为0.754,敏感性70.0%,特异性80.2%,明显优于常规临床肝癌检测指标-甲胎蛋白(AFP)的曲线下面积0.535,敏感性43.3%,特异性64.2%。

[0130] 综上,通过本发明的这种试剂盒,其首次提出利用循环系统中小分子核酸(肝癌标记核酸分子)对高危人群进行检测、早期预警,填补了国内外肝癌极早期诊断试剂盒的空白。

[0131] 本发明实施例提供的试剂盒可将高危人群的肝癌早期发现以及早期诊断的时间提早半年甚至1年;本发明实施例提供的试剂盒具备良好的敏感性及特异性,敏感性为70.0%,特异性为80.2%,与甲胎蛋白的商业化检测试剂盒相比较,具有显著的优势。本发明的试剂盒为血清检测,标本来源方便且性能较稳定,较适合用于临床。检测灵敏,成本低,可在一天内测定出结果,操作简便且同时能对几十例标本检测。对肝细胞癌病人的监控、治疗及预后具有重要的指导意义。

[0132] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

<110> 上海缔达生物科技有限公司

<120> 检测肝癌标记核酸分子的试剂盒及其检测方法

<160> 9

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACGGTTTTACCAGACAGTATTA

[0001]

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ACACTCCAGCTGGGTAATACTGTCTGGTA

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGC

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

TTCAGTTGAGACGGTTTTACC

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<400> 5

CACGAATTTGCGTGTCATCC

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

GTGCTCGCTTCGGCAGC

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

CACGAATTTGCGTGTCATCC

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<400> 8

CGCAGGGGCCATGCTAAT

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ACGGTTTTACCAGACAGTATTA

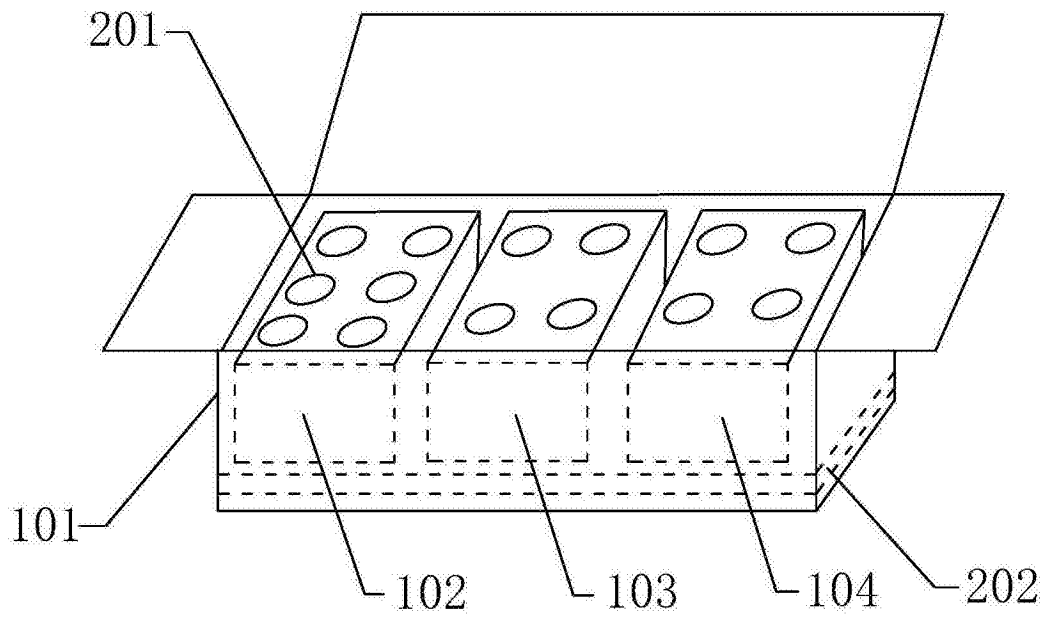


图1

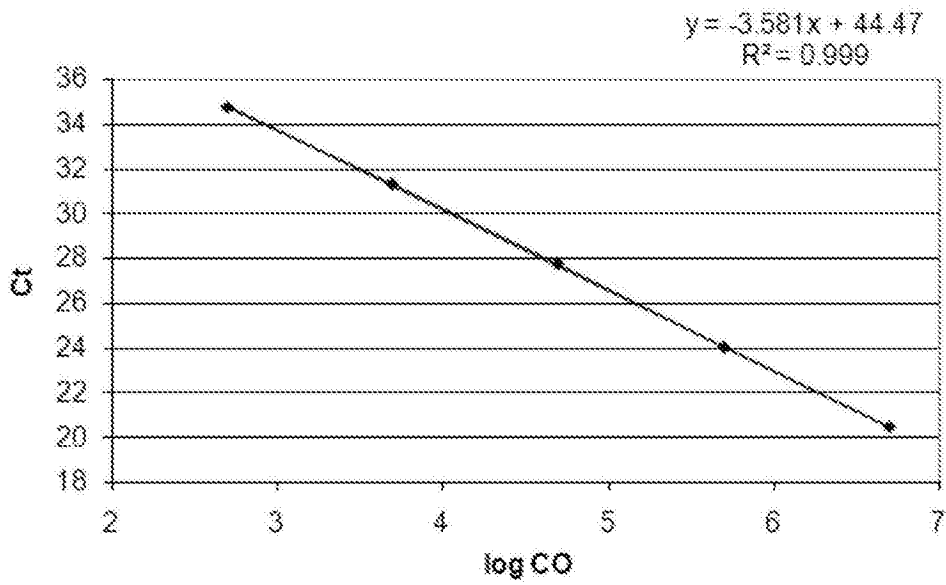


图2

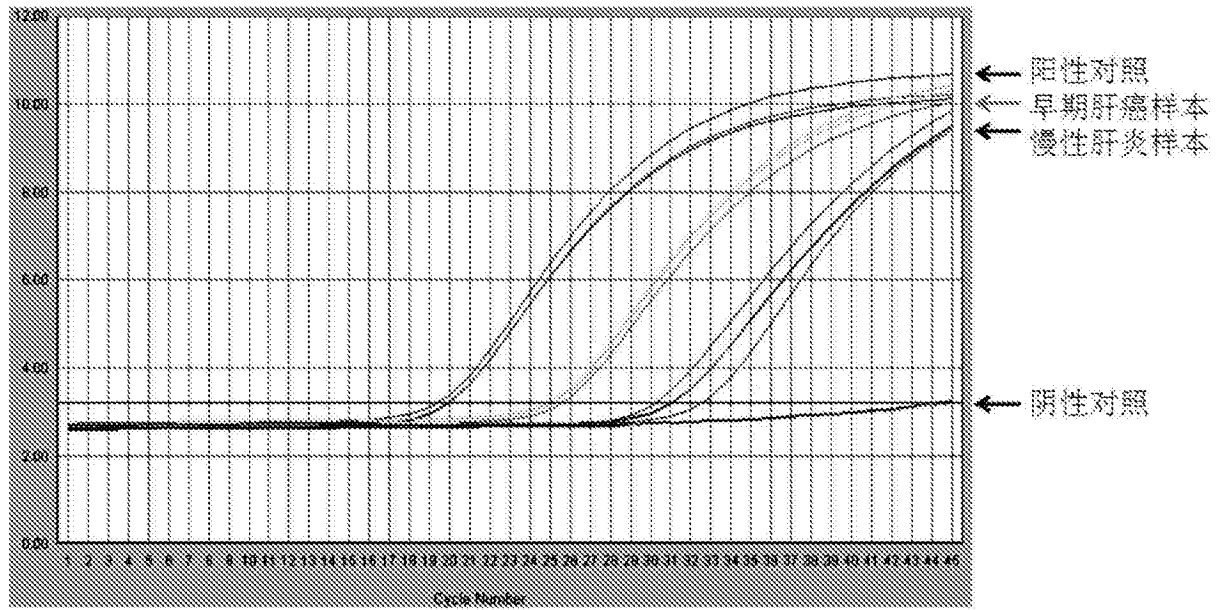


图3

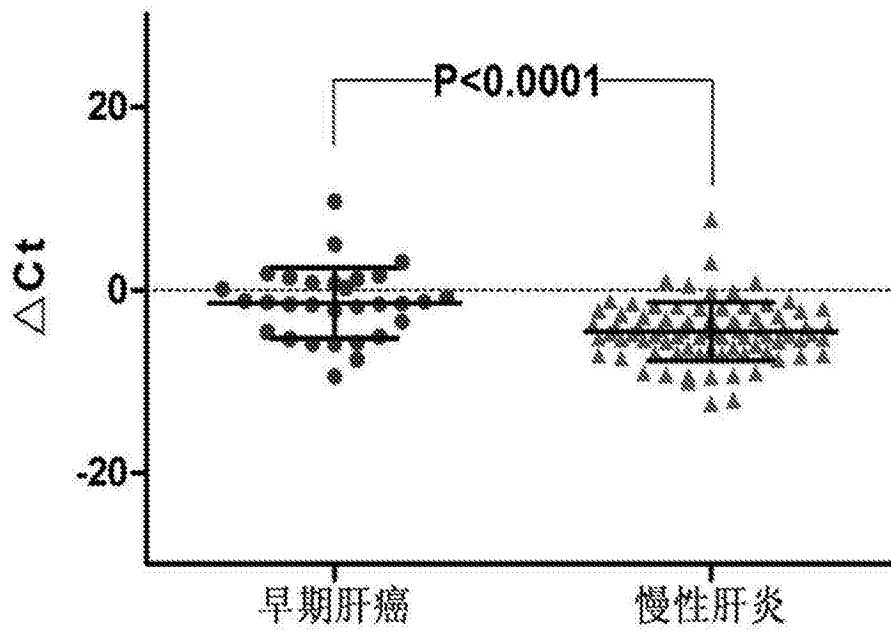


图4

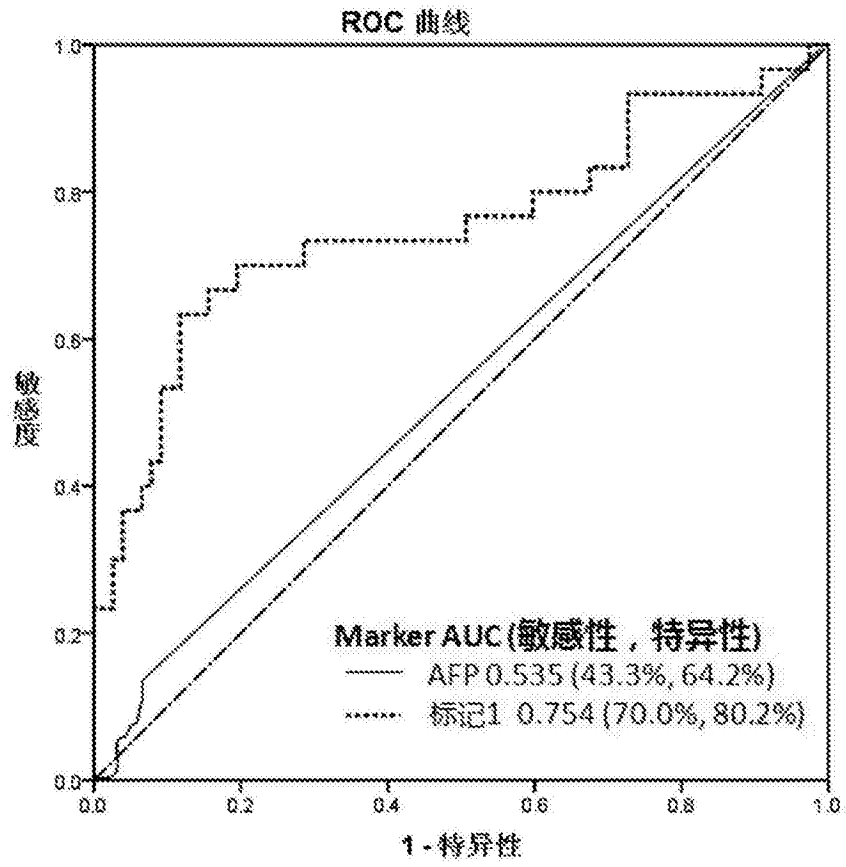


图5