



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105063190 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510460239. 1

(22) 申请日 2015. 07. 30

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号

(72) 发明人 黄庆 府伟灵 黄君富 夏涵

(74) 专利代理机构 重庆强大凯创专利代理事务所 (普通合伙) 50217

代理人 王明书

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

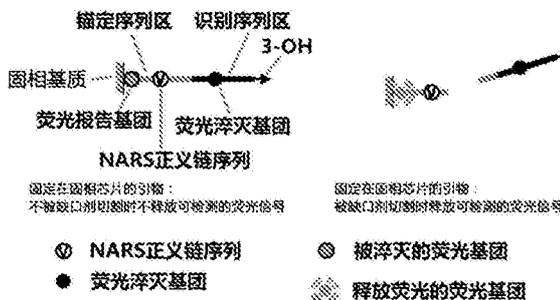
权利要求书2页 说明书17页 附图5页

(54) 发明名称

微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,靶分子特异性的上游引物和下游引物,其锚定序列区含有缺口剂识别序列正义链序列,识别序列区则分别与 miRNA 及其互补链的 3'-端序列互补,可在缺口剂和 DNA 聚合酶协同作用下分别介导一个既独立又相互作用的“切割-延伸-链置换”恒温线性扩增,最终实现恒定温度条件下指数扩增 miRNA,通过将荧光报告分子和淬灭分子标记的上游和 / 或下游引物固定在固相芯片,可通过检测荧光信号实现多种靶分子的高通量检测。本发明克服了 miRNA 固有属性对其扩增检测方法的设计难度,提供一种基于寡核苷酸引物的液态恒温指数扩增与检测系统,能够在恒定温度条件实现多种靶分子恒温指数扩增与检测的方法。



1. 微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:包括反应混合物,反应混合物包括以下反应成分:

- ①具有 3' - 端羟基的 miRNA 靶分子;
- ②上游引物和下游引物;
- ③ DNA 聚合酶;
- ④识别上游引物和下游引物缺口剂识别序列的缺口剂;
- ⑤三磷酸脱氧核苷酸;
- ⑥满足上述 DNA 聚合酶和缺口剂生物学活性的离子与缓冲体系;

所述的上游引物和下游引物是含有缺口剂识别序列的正义链序列,且其 5' → 3' 碱基均依次为锚定序列区、特异性识别 miRNA 靶分子序列的识别序列区;上游引物和下游引物的锚定序列区与 miRNA 靶分子无同源性,上游引物、下游引物的识别序列区分别与 miRNA 靶分子及 miRNA 靶分子互补链的 3' - 端序列互补;

所述的上游引物和下游引物具有靶分子特异性,每种靶分子特异性的上游引物和 / 或下游引物通过其 5' - 末端固定于固相芯片,并且,固定于固相芯片的上游引物和 / 或下游引物在其缺口剂识别序列的两侧分别标记具有荧光共振能量转移作用的荧光报告分子和淬灭分子。

2. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:所述的每种靶分子特异性的上游引物和下游引物同时固定于固态芯片的一个特定位点;

或者,每种靶分子只有其具有特异性的上游引物固定于固态芯片的一个特定位点;

或者,每种靶分子只有其具有特异性的下游引物固定于固态芯片的一个特定位点;

或者,固相芯片的同一个特定位点同时固定一种或以上靶分子特异性的上游引物和另一种或以上其它靶分子特异性的下游引物。

3. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:所述的固相芯片包括微阵列或微珠,以及基于微流体、微流控或微制造工艺产生的具有多个微反应孔的生物芯片。

4. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:所述的固定于固相芯片的上游引物和 / 下游引物的锚定序列区 5' - 端增加多聚碱基,包括多聚胞腺嘧啶碱基 (Poly(T_n)) 或多聚腺嘌呤碱基 (Poly(A_n)),并通过所述多聚碱基的 5' - 末端固定于固相芯片。

5. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:靶分子特异性上游引物和 / 或下游引物通过其 5' - 末端直接或间接固定于固相芯片,固定的方式包括以共价键和非共价键的结合方式固定,或者,通过物理吸附和 / 或化学耦联方式固定,或者,具有胺基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定,或者,具有硫醇基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定引物,或者,通过手臂分子固定。

6. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,其特征在於:固定于不同固相芯片的不同靶分子的特异性上游引物和 / 或下游引物标记具有荧光共振能量转移作用的相同荧光报告分子和淬灭分子;

或者,固定于相同固相芯片的不同靶分子的特异性上游引物和 / 或下游引物标记具有荧光共振能量转移作用的不同荧光报告分子和淬灭分子。

7. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述 miRNA 靶分子的特异性上游引物和 / 或下游引物的锚定序列区和 / 或识别序列区引入衍生核苷酸, 衍生核苷酸包括锁核酸、肽核酸或硫代修饰碱基。

8. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述 miRNA 靶分子的特异性上游引物和 / 或下游引物的识别序列区中含有与 miRNA 靶分子及其互补序列 3' - 末端倒数第二位和 / 或第三位碱基错配的核苷酸;

或者, 在所述反应混合物中加入可抑制非特异性扩增的生物活性分子, 包括 Taq MutS、RecA。

9. 如权利要求 1 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述的 DNA 聚合酶是具有链置换活性的 DNA 聚合酶;

或者所述的 DNA 聚合酶不具有链置换活性, 且在所述反应混合物中加入具有链置换活性的生物活性分子。

10. 如权利要求 1 至 9 中任意一项所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述的恒温的反应温度范围为 37-70℃。

11. 如权利要求 10 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述的恒温的反应温度为 37℃、55℃、60℃或 65℃。

12. 如权利要求 1 至 9 中任意一项所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述的反应时间为 10-80min。

13. 如权利要求 12 所述的微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法, 其特征在于: 所述的反应时间为 10min、20min、30min、40min、50min 或 60min。

14. 如权利要求 1 至 9、11、13 中的任意一项所述的利用微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法的检测试剂和试剂盒。

微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生命科学和生物技术领域,是一种通过固相芯片恒温指数扩增的方式定性和定量检测多种微小 RNA (microRNA, miRNA) 的固相芯片恒温检测方法。

背景技术

[0002] 与基因组 DNA、mRNA 和长片段非编码 RNA (lncRNA) 等核酸分子相比较,微小 RNA (microRNA, miRNA) 分子具有其特殊性,如:核酸分子片段极小 ($\leq 22\text{nt}$), GC 含量分布广泛 (5 ~ 95%), 导致熔解温度 (melting temperature, T_m) 差异大,难于设计匹配的扩增引物和检测探针;所占总 RNA 的比例极低 ($\leq 0.01\%$), 需要高灵敏度的检测方法;家族分子差异小 (可仅有单碱基差异), 对检测特异性的要求高;不同 miRNA 的表达水平差异极大 (可达 4 个数量级;如:几十个拷贝/细胞至 5×10^5 拷贝/细胞), 要求检测线性范围宽,同时能够有效识别低丰度 miRNA;靶序列同时存在于 pri-miRNA 和 pre-miRNA 中;缺乏类似于 mRNA 的 poly(A) 尾,使其难以用常规技术手段进行逆转录检测。miRNA 的上述特征对其核酸分子检测技术和方法提出了近乎于苛刻的特殊需求。例如,极小的分子片段使常规 PCR 引物设计策略无法实施,单碱基差异对引物或探针的碱基分辨能力要求极高,GC 含量的巨大差异导致引物和探针难于取向于均一的退火温度。

[0003] 自 1993 年首次发现 miRNA 以来,miRNA 的检测方法从 Northern Blot 探针杂交法逐渐向高通量测序法 (如: Solexa 法和 SoLiD 法等)、芯片杂交法、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, ISH)、实时荧光逆转录定量 PCR 法 (real-time reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)、恒温扩增检测技术发展。由于 miRNA 靶分子的上述独特属性,现有的每种检测技术和方法特点各异,各有所长,但也都有明显的缺点,从而使每种方法都有其最适合的使用环境。

[0004] 以目前最常用的基于芯片杂交法的微阵列技术、高通量测序法和 RT-qPCR 为例。高通量测序与微阵列的检测通量大,并且,高通量测序还可用于发现新 miRNA,但是,这两种方法的定量精确性较差,价格昂贵,一般应用于 miRNA 的初筛研究。此外,高通量测序技术文库制备复杂,达到兆字节 (terabytes, TB) 的庞大和复杂文库数据分析需要特殊的计算机资源和相关的生物信息学工具和手段,因此,往往由专业的公司提供。由于 miRNA 的片段小,且 T_m 值差异大,微阵列技术不能简单地通过增加和减少探针的长度来均衡不同探针的杂交效率,因此,往往需要借助一些特殊的技术手段,例如使用锁核酸探针 (locked nucleic acid, LNA)。以茎环引物 RT-qPCR、poly(T) 接头 RT-qPCR 为代表的 RT-qPCR 技术是验证基因组水平 miRNA 表达谱研究结果最常用和最经典的方法,但是该技术均需逆转录步骤,受多种因素制约的实验数据归一化对检测结果精确度影响大,“热变性-复性-延伸”热循环条件需要高纯度的 miRNA,此外,扩增效率受到多种因素的影响和制约,易出现非特异性扩增;扩增反应时间长,一般需要几个小时;受限于热动力学特征,无法精确检测 2 倍以下的表达差异。

[0005] 理想的 miRNA 检测方法应当具有以下特征:灵敏度高,能够达到检测少量或微量

起始材料;特异性好,能够识别仅有单碱基差异的 miRNA;操作简便,无需昂贵的试剂和设备;通用性高,能够应用于 miRNA 的组织 and 细胞原位检测、高通量检测、精确定量检测等多个领域。但是,如上所述,受限于 miRNA 靶分子的特有属性及现有技术的固有局限性,miRNA 的现有检测技术往往只能满足上述部分需求。如果能够研发出一种新的能够更好地满足上述需求的技术和方法,一方面,能够得到更广泛的应用,例如,采用一种技术和方法就能实现多个领域的应用,从而有效地拓展非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA) 的研究深度与广度。

[0006] 恒温扩增技术是温度基本不变的核酸扩增技术。相对于以 PCR 为代表的变温扩增技术,恒温扩增技术具有以下主要优势:反应温度单一,对设备的要求程度低;不存在温度变化,扩增效率及核酸扩增片段长度均优于常规 PCR 技术;反应时间短,可在 1 小时,甚至几分钟内实现靶分子的有效扩增,且灵敏度和特异性与 PCR 技术相当,甚至更好。上述技术优势使恒温扩增技术在生命科学的各个领域得到了广泛应用,并且,特别适合于 miRNA 的检测。

[0007] 目前,已经发展出了多种核酸恒温扩增技术,其中,具有代表性的技术主要包括:链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)、环介导核酸等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、依赖于核酸序列的扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、依赖于解旋酶的等温扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HAD)、转录介导扩增(transcription-mediated amplification, TMA)、单引物等温扩增(single primer isothermal amplification, SPIA)、信号介导 RNA 扩增技术(signal mediated amplification of RNA technology, SMART)、恒温指数扩增(exponential amplification reaction; EXPAR)。但是,由于 miRNA 靶分子的特殊性,仅有部分恒温技术适合于 miRNA 的检测,例如 SDA、RCA 和 EXPAR。但是,受限于现有恒温技术的技术局限性,现有的 miRNA 恒温检测技术往往只能检测单一 miRNA 靶分子,无法实现多个或高通量 miRNA 的检测。

[0008] 无论是变温还是恒温扩增技术, DNA 聚合酶均是其反应体系的必需酶。一般而言, DNA 聚合酶通常具有以下一种或多种生物学功能:5' → 3' 扩增活性(amplification activities)、5' → 3' 核酸外切酶活性(exonuclease activities)、3' → 5' 核酸外切酶活性、链置换活性(strand displacement activities)。

[0009] 无论是变温还是恒温扩增技术,在引物延伸过程中,当其 3' - 延伸末端抵达下游 DNA 链,即其 3' - 延伸末端存在另一条与模板分子互补配对形成的双链 DNA(double strand DNA, dsDNA) 区域时,如果 DNA 聚合酶既不具备 5' → 3' 外切酶活性,也不具备链置换活性,那么,引物的 3' - 末端延伸则受到下游 DNA 链的阻止而无法继续延伸。但是,当 DNA 聚合酶具有 5' → 3' 外切酶活性时(如:Taq DNA 聚合酶),该活性可将下游 DNA 链按照 5' → 3' 方向水解成单核苷酸,从而使引物的延伸得以继续,如实时荧光 PCR 中的水解探针技术;或者,当 DNA 聚合酶具有链置换活性时(如:Bst DNA 聚合酶),该活性可以使引物的延伸得以继续,同时,将下游 DNA 链从 dsDNA 区域剥离,使下游 DNA 链变成游离的单链核酸分子。DNA 聚合酶的上述链置换活性被广泛应用于多种恒温扩增系统,如 SDA、LAMP、RCA 等。

[0010] 具有链置换活性、缺乏 5' → 3' 外切酶活性的 DNA 聚合酶被广泛应用于依赖双链

核酸分子缺口的链置换反应。所谓双链核酸分子缺口是指双链核酸分子的一条链保持完整性,另一条链的某两个毗邻核苷酸之间的磷酸二酯键断裂,从而形成一个缺口。该缺口两侧的核酸分子末端分别是 3'-端羟基 (3'-hydroxy group, 3'-OH) 和 5'-端磷酸基团 (5'-phosphate group, 5'-P04)。在上述 DNA 聚合酶存在的作用下,具有 3'-OH 的核酸分子从缺口处 3'-OH 开始延伸反应,同时,其延伸合成的新生核酸链将下游的旧链剥离,使下游旧链转变成游离的单链核酸分子。

[0011] 缺口内切酶 (nicking endonuclease),亦叫缺口酶 (nicking enzyme),是 II 型限制性内切酶 (restriction endonuclease) 中的一类特殊类型酶。目前已经发现 280 余种缺口酶,商品化的近 20 余种,并且,其热稳定性可达到 65℃ 或更高。该类酶只切割双链核酸分子中的一条链,造成一个双链核酸分子缺口,该缺口两侧的核酸分子末端分别是 3'-OH 和 5'-P04。完全或部分双链核酸分子中被缺口内切酶识别的核苷酸序列被称为缺口内切酶识别序列 (nicking endonuclease recognition sequences, NERS)。

[0012] 限制性内切酶中还有一种特殊类型的酶 (如 :HincII),该类酶具有常规限制性内切酶的功能,能够识别并在天然双链核酸分子的限制性内切酶识别序列 (restriction endonuclease recognition sequences, RERS) 处同时酶切双链核酸分子的两条链。但是,当双链核酸分子中的一条链在 RERS 序列中至少含有一个衍生核苷酸 (如 : α 巯基 - 脱氧核苷酸 (α -thio deoxynucleotide)) 时,该衍生核苷酸可阻止限制性内切酶切割该核酸分子链,因此,只能切割另一条不含有衍生核苷酸的自然核酸分子链。这种仅有一条链的 RERS 序列含有阻止限制性内切酶切割的双链核酸分子被称为半修饰 RESR。可见,能够识别并切割半修饰 RERS 的限制性内切酶具有与缺口内切酶相似的功能,即可用于制备双链核酸分子缺口。

[0013] 缺口内切酶及可识别半切割半修饰 RESR 的限制性内切酶的上述生物学活性被广泛应用于依赖双链核酸分子缺口的链置换反应,并且,该链置换反应原理被广泛应用于多种恒温扩增技术,如 SDA、EXPAR 等。例如,在缺口内切酶 (或 :可识别半切割半修饰 RESR 的限制性内切酶) 和具有链置换活性 DNA 聚合酶的共同作用下,具有 3'-OH 的核酸分子从缺口处 3'-OH 开始延伸反应,同时,其延伸合成的新生核酸链将下游的旧链剥离。因链延伸而被封闭的缺口可以在缺口内切酶 (或 :可识别半切割半修饰 RESR 的限制性内切酶) 的作用下重复产生,从而使得“切割 - 延伸 - 链置换”的过程能够重复进行,并在此过程中,以线性或指数方式不断剥离或释放出与下游旧链序列相同的单链核酸分子 (Walker GT, et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992 ;20(7):1691-6. Walker GT, et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992 ;20(7):1691-6. Van Ness J, et al. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 ;100(8):4504-9. Shi C, et al. Exponential strand-displacement amplification for detection of microRNAs. *Anal Chem.* 2014 ;86(1):336-9)。

[0014] 锁核酸 (locked nucleid acid, LNA) 一种特殊的双环状寡核苷酸衍生物,其核糖的 β -D- 呋喃核糖的 2'-O 和 4'-C 通过不同的缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥,并连接成环形,这个环形桥锁定了呋喃糖 C3'-内型的 N 构型,降低了核糖结构

的柔韧性,增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性。由于 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。与其他寡核苷酸类似物相比,DNA/LNA 嵌合式寡核苷酸对单碱基变异具有良好的识别能力,以 DNA/LNA 嵌合引物或探针形式广泛应用于多种分子生物学检测技术中。

[0015] 固相芯片 (solid chip) 亦叫生物芯片 (biochips),固相芯片是一种高通量的核酸分子检测手段,在基因表达谱分析、基因多态性研究、基因组拷贝数变异等研究领域具有广泛的用途。但是,在生物芯片应用于包括 miRNA 在内的核酸靶分子检测时,往往单纯依赖于核酸杂交的方式,靶分子需要事先扩增,并在扩增过程中在扩增产物中引入可检测信号(如:荧光标记),扩增产物或靶分子与固相芯片的杂交需要多次洗涤等步骤去除非特异性杂交和背景信号干扰,存在检测步骤烦琐、耗时长等诸多问题,在一定程度上制约了固相芯片在核酸检测领域的应用。

[0016] 由上可见,如果有效整合缺口酶、具有链置换活性 DNA 聚合酶和荧光标记 DNA/LNA 嵌合引物的协同作用优势,就能够在恒定温度条件下通过“切割-延伸-链置换”自主链式循环实现靶分子的指数扩增,同时,将上述恒温指数扩增方法与固相芯片相结合,可极大地简化现有固相芯片检测步骤,能够在极短时间内完成成百上千种 miRNA 靶分子的检测,从而有效解决 miRNA 现有技术瓶颈,实现 miRNA 检测的临床实际应用。

发明内容

[0017] 本发明要解决的技术问题是提供一种固定于固相芯片的引物介导的恒温指数扩增系统,该系统能够在固相芯片通过“切割-延伸-链置换”自主链式循环实现靶分子的恒温指数扩增,并且,该指数扩增可通过固相芯片固定引物释放的可检测信号进行表征,在理论上同时对成百上千种 miRNA 靶分子进行定性和定量检测,具有检测能量高、特异性强、敏感高、重复性好、样本用量少、耗时短、步骤简便等优势。

[0018] 为了解决上述技术问题,本发明提供如下技术方案:微小 RNA 的固相芯片恒温检测方法,反应混合物包括以下反应成分:

[0019] ①具有 3'-端羟基的 miRNA 靶分子;

[0020] ②上游引物和下游引物;

[0021] ③ DNA 聚合酶;

[0022] ④识别上游引物和下游引物缺口剂识别序列的缺口剂;

[0023] ⑤三磷酸脱氧核苷酸;

[0024] ⑥满足上述 DNA 聚合酶和缺口剂生物学活性的离子与缓冲体系;

[0025] 所述的上游引物和下游引物是含有缺口剂识别序列的正义链序列,且其 5' → 3' 碱基均依次为锚定序列区、特异性识别 miRNA 靶分子序列的识别序列区;上游引物和下游引物的锚定序列区与 miRNA 靶分子无同源性,上游引物、下游引物的识别序列区分别与 miRNA 靶分子及 miRNA 靶分子互补链的 3'-端序列互补;

[0026] 所述的上游引物和下游引物具有靶分子特异性,每种靶分子特异性的上游引物和/或下游引物通过其 5'-末端固定于固相芯片,并且,固定于固相芯片的上游引物和/或下游引物在其缺口剂识别序列的两侧分别标记具有荧光共振能量转移作用的荧光报告分子和淬灭分子。

[0027] 采用本发明技术方案的微小 RNA 的固相芯片恒温指数扩增与检测方法, 缺口剂 (nicking agent, NA) 被用于识别和切割上游引物、下游引物缺口剂识别序列 (nicking agent recognition sequences, NARS)。当引物的缺口剂识别序列是缺口内切酶识别序列 (nicking endonuclease recognition sequences, NERS) 时, 所用缺口剂是识别该缺口内切酶识别序列的缺口内切酶 (nicking endonuclease, NE); 当引物的缺口剂识别序列是半修饰限制性内切酶识别序列 (restriction endonuclease recognition sequences, RERS) 时, 所用缺口剂是识别该半修饰 RERS 的限制性内切酶 (restriction endonuclease, RE); 在反应混合物中, 待检测物是含有在本发明中的 miRNA 靶分子的各种生物样本。

[0028] 三磷酸脱氧核苷酸, 通常包括 dCTP、dGTP、dTTP 或 dATP, 在生物 DNA 合成, 以及 DNA 介导的链延伸反应中起原料作用。

[0029] 本发明的工作原理及有益效果为: 上游引物和下游引物是含有缺口剂识别序列的正义链序列, 且其 5' → 3' 碱基依次为锚定序列区、特异性识别 miRNA 靶分子序列的识别序列区。上游引物 P1 和下游引物 P2 的识别序列区分别与 miRNA 靶分子和 miRNA 靶分子互补链 (即: miRNA*) 的 3' - 端序列互补, 因此, 上游引物和下游引物可分别识别 miRNA 靶分子或者 miRNA 靶分子互补链, 并具有单碱基变异识别能力; 锚定序列区的序列与 miRNA 靶分子无同源性, 不能与 miRNA 靶分子或 miRNA 靶分子互补链产生非特异性杂交。在扩增过程中, 上游引物 P1 和下游引物 P2 锚定序列区可分别与 miRNA 靶分子和 miRNA 靶分子互补链的 3' - 端延伸产物形成稳定的杂交双链, 从而使上游引物 P1 和下游引物 P2 能够分别“锚定”在 miRNA 靶分子和 miRNA 靶分子互补链的 3' - 端延伸产物端, 并且, 该“锚定”能够在引物的锚定序列区形成缺口剂识别序列双链核酸分子, 从而使缺口剂能够在引物的缺口剂识别序列正义链切割引物, 并在 DNA 聚合酶的协同作用下, 不断生成新生 DNA 链, DNA 聚合酶通常是指 RNA 依赖型 DNA 聚合酶。因此, 当上游引物和下游引物的识别序列区分别识别 miRNA 靶分子和 miRNA 靶分子互补链并形成杂交双链后, 在 DNA 聚合酶的作用下, 上游引物、下游引物、miRNA 靶分子、miRNA 靶分子互补链均产生 5' → 3' 方向链延伸, 并在上游引物与 miRNA 靶分子、下游引物与 miRNA 靶分子互补链之间分别形成两种完整的双链核酸分子, 然后, 缺口剂在缺口剂识别序列正义链序列处切割上游引物和下游引物。此时, 上游引物和下游引物在 DNA 聚合酶的作用下, 分别在缺口处延伸出新生 DNA 链, 该新生 DNA 链与原有的 miRNA 靶分子或 miRNA 靶分子互补链分别互补, 即新的 miRNA 靶分子或 miRNA 靶分子互补链。这些新的 miRNA 靶分子或 miRNA 靶分子互补链在缺口剂和 DNA 聚合酶的协同作用下不断从缺口处切割 - 延伸 - 链置换过程中扩增形成的双链核酸分子中置换出来, 触发新一轮的上游引物和下游引物的上述反应, 如此循环, 实现 miRNA 靶分子在恒温条件下的指数扩增。在上述过程中, 上游引物、下游引物的锚定序列区则因其“锚定”作用而使上述过程能够持续发生。

[0030] 进一步, 所述的每种靶分子特异性的上游引物和下游引物同时固定于固态芯片的一个特定位点; 或者, 每种靶分子只有其具有特异性的上游引物固定于固态芯片的一个特定位点; 或者, 每种靶分子只有其具有特异性的下游引物固定于固态芯片的一个特定位点; 或者, 固相芯片的同一个特定位点同时固定一种或以上靶分子特异性的上游引物和另一种或以上其它靶分子特异性的下游引物。

[0031] 进一步, 所述的固相芯片包括微阵列或微珠, 以及基于微流体、微流控或微制造工

艺产生的具有多个微反应孔的生物芯片。在固相基质表面的特定位置固定本发明所述的靶分子特异性上游引物和 / 或下游引物。所述固相基质包括多种方法处理的玻璃片、硅片、陶瓷片、塑料、硝酸纤维、尼龙膜或橡胶等。

[0032] 固相芯片的每个特定位置或微反应孔只固定一种 miRNA 靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物, 此时, 每个特定位置或微反应孔只检测一种 miRNA 靶分子, 在此条件下, 固定在固相芯片的每种 miRNA 靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物标记具有荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 作用的荧光报告分子和淬灭分子, 未固定在固相芯片的引物则不作上述标记, 在此条件下, 通过每个特定位置或微反应孔固定的靶分子特异性上游引物和 / 或下游引物是否释放荧光信号来判断待检测样本中是否存在靶分子, 通过每个特定位置或微反应孔固定的靶分子特异性上游引物和 / 或下游引物释放的荧光信号强度来判断待检测样本中的靶分子丰度; 或者, 固相芯片的每个特定位置或微反应孔同时固定两种或两种以上 miRNA 靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物, 并且, 每个特定位置或微反应孔同时固定的每种 miRNA 靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物标记具有荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 作用的不同荧光报告分子和淬灭分子, 未固定在固相芯片的引物则不作上述标记, 在此条件下, 可在特定位置或微反应孔同时定性和定量检测两种或两种以上 miRNA 靶分子。

[0033] 固相芯片固定的上游引物和 / 或下游引物包含可产生检测信号的具有荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 作用的荧光报告分子 (供体分子) 和淬灭分子 (受体分子) 组成。在 FRET 技术中, 能量供体 (即: 荧光报告分子或供体分子) 具有荧光性, 能量受体 (即: 淬灭分子或受体分子) 可以是荧光性或非荧光性物质。本发明所述具有 FRET 作用的两种标记 (即: 荧光报告分子和淬灭分子) 被引物内的一个特定位置 (产生缺口酶切割位点的部分, 即缺口识别序列正义链) 分离, 由此, 在靶分子存在的条件下, 缺口酶会在引物的缺口识别序列正义链切割引物, 该切割反应会导致荧光报告分子和淬灭分子相互分离, 失去 FRET 作用, 从而使荧光报告分子释放荧光信号, 产生表征靶分子的可检测荧光信号。由于每种固相芯片固定的引物对应于一种特定的 miRNA 靶分子, 因此, 可通过释放荧光信号的固相芯片种类确定是待检测物中存在的 miRNA 靶分子的种类。荧光报告分子及淬灭分子为荧光物质, 均可利用本发明所属技术领域中公知的任何物质, 包括: PE (Fluorescent algae of eggs; phycoerythrin) (620)、Cy2TM (506)、YO-PROTM-1 (509)、YOYOTM-1 (509)、Calcein (517)、FITC (518)、FluorXTM (519)、AlexaTM (520)、Rhodamine 110 (520)、Oregon GreenTM 500 (522)、Oregon GreenTM 488 (524)、RiboGreenTM (525)、Rhodamine GreenTM (527)、Rhodamine 123 (529)、MagnesiumGreenTM (531)、Calcium GreenTM (533)、TO-PROTM-1 (533)、TOTO1 (533)、JOE (548)、BODIPY530/550 (550)、DiI (565)、BODIPYTMR (568)、BODIPY558/568 (568)、BODIPY564/570 (570)、Cy3TM (570)、AlexaTM 546 (570)、TRITC (572)、Magnesium OrangeTM (575)、Phycoerythrin R&B (575)、Rhodamine Phalloidin (575)、Calcium OrangeTM (576)、Pyronin Y (580)、Rhodamine B (580)、TAMRA (582)、Rhodamine RedTM (590)、Cy3.5TM (596)、ROX (608)、Calcium CrimsonTM (615)、AlexaTM 594 (615)、Texas Red (615)、Nile Red (628)、YO-PROTM-3 (631)、YOYOTM-3 (631)、R-phycoerythrin (642)、C-Phycoerythrin (648)、TO-PROTM-3 (660)、TOTO3 (660)、DiD DiIC (5) (665)、Cy5TM (670)、

Thiadicarbocyanine (671)、Cy5.5 (694)、HEX (556)、TET (536)、Biosearch Blue (447)、CAL Fluor Gold 540 (544)、CAL Fluor Orange 560 (559)、CAL Fluor Red 590 (591)、CAL Fluor Red 610 (610)、CAL Fluor Red 635 (637)、FAM (520)、Fluorescein (520)、Fluorescein-C3 (520)、Pulsar650 (566)、Quasar570 (667)、Quasar 670 (705) 及 Quasar 705 (610)。括号的数字为以纳米单位表示的最大发光波长。

[0034] 淬灭分子是利用本发明所属技术领域中公知的能够对广范围波长或特定波长的荧光进行淬灭的非荧光黑淬灭分子,包括黑洞淬灭剂、(BHQ:black hole quencher;包括 BHQ1、BHQ2、BHQ3)、4-[4-(二甲基氨基)苯偶氮]苯甲酸 (DABCYL:4-[4-(Dimethylamino)phenylazo]benzoic acid)。

[0035] 引物的 FRET 标记中,荧光报告分子包含 FRET 的供体,淬灭分子包含 FRET 的受体,例如,荧光素染料 (fluorescein dye) 为报告分子,罗丹明染料 (rhodamine dye) 为淬灭分子。

[0036] 荧光报告分子和淬灭分子均位于引物的锚定序列区,并且,分别位于缺口剂识别序列的 5'-端和 3'-端的任意位置;或者,荧光报告分子和淬灭分子分别位于锚定序列区和识别序列区,并且,分别位于缺口剂识别序列的 5'-端和 3'-端的任意位置。上述标记的共同特征是,由于引物通过其 5'-端固定于固相芯片,在反应体系中存在靶分子的情况下,固定于固相芯片的引物因缺口剂在其缺口剂识别序列正义链的切割作用而释放荧光,该荧光因引物的 5'-端固定作用而附着在固相芯片,从而可通过固相芯片固定的引物产生的荧光信号判断检测体系中存在靶分子,实现靶分子的定性检测。当反应体系中不存在其固定引物对应的靶分子的情况下,固定于固相芯片的引物不会被缺口剂切割,其荧光报告分子和淬灭分子因 FRET 作用而不产生荧光信号,此时,其固相芯片也不会检测到引物产生的可检测荧光信号,从而判断检测体系中不存在靶分子。同时,由于固相芯片固定的引物产生的可检测荧光信号强度与靶分子的初始丰度正相关,因此,可进一步通过固相芯片固定的引物释放的荧光强度实现靶分子的定量检测。

[0037] 其工作的原理为:当反应体系中不存在 miRNA 靶分子时,固定于固相芯片的引物的荧光报告分子和淬灭分子因 FRET 作用使引物不产生荧光信号;当反应体系中存在 miRNA 靶分子时,上游引物、下游引物、miRNA 靶分子及其所产生的 miRNA 靶分子互补链均能在 DNA 聚合酶的作用下形成完整的双链核酸分子,从而使切口剂能够切割固定于固相芯片的上游引物和/或下游引物的缺口剂识别序列正义链,此时,固定于固相芯片的荧光报告分子和淬灭分子失去了荧光共振能量转移作用而产生可检测的荧光信号。当反应体系中固相芯片有多个特定位点时,并且,每种特定位点上固定了靶分子特异性的上游引物和/或下游引物,就能够在同一个固相芯片同时定性和定量检测多种靶分子。例如,根据现有的本发明所属技术领域的公知技术,至少可在单个微阵列芯片中同时检测成百上千种 miRNA 靶分子。

[0038] 如图 1 和图 2 所示,通过其 5'-末端固定于固相芯片的上游引物和/或下游引物包含具有 FRET 作用的荧光报告分子和淬灭分子,并且,荧光报告分子和淬灭分子分别位于引物锚定序列区缺口剂识别序列的 5'-端和 3'-端任意位置(图 1),或者,荧光报告分子和淬灭分子分别位于引物锚定序列区和识别序列区,并且,分别位于缺口剂识别序列的 5'-端和 3'-端任意位置(图 2)。未固定于固相芯片的上游引物和/或下游引物标记不包含 FRET 作用的荧光报告分子和淬灭分子(图 1、图 2)。当固定于固相芯片的引物被缺口剂切割时,

可产生可检测的荧光信号,并且,由于其 5'-端固定于固相芯片,因此,使固相芯片产生可产生的荧光信号,并且,该荧光信号具有靶分子特异性(图 1、图 2)。

[0039] 如图 3 所示,上游引物 P1 和下游引物 P2 的 5' → 3' 碱基序列依次是缺口剂识别序列(nicking agent recognition sequences, NARS)正义链序列所在的锚定序列区、特异性识别靶 miRNA 的识别序列区。上述引物具有以下三个显著特点(图 1, 2):引物 P1 和 P2 的识别序列区分别与靶 miRNA 及其互补链(即 :miRNA*)的 3'-端序列互补,可在缺口酶和 DNA 聚合酶的协同作用下分别介导一个既独立又相互作用的“切割-延伸-链置换”线性扩增,最终,二者偶联成一个自主链式循环,最终实现靶 miRNA 的指数扩增;二者的识别序列区特定位置均可引入适当数量的 LNA,从而提高扩增温度(达到 55 ~ 65℃),均一化不同 GC 含量 miRNA 的 T_m 值(介于 50 ~ 55℃),增强引物-模板单碱基错配的识别能力;二者可同时固定在固相芯片条件下(图 2),当引物与模板特异性结合并延伸成双链核酸分子后,缺口剂的切割将导致引物释放荧光。基本技术原理如图 3 所示:靶 miRNA 与引物 P1 互补结合,由于成熟 miRNA 及引物 P1 均具有 3'-OH,可彼此延伸成完整双链核酸分子;缺口剂在 NARS 正义链序列切割引物 P1,释放荧光信号,同时,该缺口的 5'-端核酸分子,即引物 5'-端锚定序列区所在核酸分子的 3'-端序列因具有 3'-OH,可进一步延伸,并在 DNA 聚合酶的链置换活性作用下,置换出与靶 miRNA 完全互补的新生 DNA 链(即 :miRNA*),从而形成第一个“切割-延伸-链置换”线性扩增;引物 P1 释放的 miRNA* 又可按照相似原理,触发引物 P2 介导的第二个“切割-延伸-链置换”线性扩增,并释放与靶 miRNA 序列完全相同的新生 DNA 链(即 :miRNA);第一个和第二个线性扩增通过各自释放的新生 DNA 链彼此偶联成一个自主链式循环,并且,每生成一个新生 DNA 链,均会导致一个引物 P1 或 P2 释放荧光,反应体系释放的荧光强度与靶 miRNA 的起始量呈正比关系;当固相芯片的每个特定位点上只固定一种 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物时,每种 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物可标记相同的荧光报告分子,此时,每个特定位点只检测一种 miRNA 靶分子;或者,当固相芯片的每个特定位点固定两种或两种以上 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物时,在此条件下,每个特定位点固定的每种 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物标记不同的荧光报告分子,但不同特定位点固定的 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物可标记相同的荧光报告分子,在此条件下,固相芯片在每个特定位点可检测两种或两种以上不同的 miRNA 靶分子。由于引物释放的荧光信号均附着于固相芯片,因此,可通过固相芯片每个特定位点释放的荧光信号种类和丰度实现多种靶分子的同时检测。

[0040] 固相芯片的每个特定位点只固定 miRNA 靶分子对应的上游引物(图 4)或下游引物(图 5)。上述两种案例释放荧光信号的原理与固相芯片同时固定上游引物和下游引物(图 3)相似,并不影响检测方法的灵敏度与特异性等方法学参数。

[0041] 进一步,所述的固定于固相芯片的上游引物和/下游引物的锚定序列区 5'-端增加多聚碱基,包括多聚胞腺嘧啶碱基(Poly(T_n))或多聚腺嘌呤碱基(Poly(A_n)),并通过所述多聚碱基的 5'-末端固定于固相芯片。以简化上述引物固定于固相芯片,并且,能够最小化对酶作用(如:缺口剂的切割作用)的空间妨碍(space hindrance),并增加引物与靶分子的杂交效率,提高恒温扩增效率。Poly(T_n)或 Poly(A_n)并不影响本发明所述引物的典型结构及其功能。

[0042] 进一步,靶分子特异性上游引物和/或下游引物通过其 5'-末端直接或间接固定

于固相芯片,固定的方式包括以共价键和非共价键的结合方式固定,或者,通过物理吸附和/或化学耦联方式固定,或者,具有胺基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定,或者,具有硫醇基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定引物,或者,通过手臂分子固定。其固定方法包含本发明所属技术领域中公知的固定技术,包括通过物理吸附和/或化学耦联方式将上游引物和/或下游引物连接于固相芯片,或者,包括具有胺基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定引物,或者,包括具有硫醇基的烷基或者芳基化合物作为连接肽固定引物,或者,包括在固相芯片和/或引物标记、修饰或合成有手臂分子,并通过二者之间的手臂分子、手臂分子与其它分子的相互作用将引物固定于固相芯片。

[0043] 进一步,所述多个种类的 miRNA 靶分子相对应的上游引物和/或下游引物的锚定序列区、识别序列区均引入衍生核苷酸,衍生核苷酸包括锁核酸、肽核酸或硫代修饰碱基。

[0044] 进一步,所述多个种类的 miRNA 靶分子相对应的上游引物和/或下游引物的识别序列区中含有与 miRNA 靶分子互补序列 3'-末端倒数第二位和/或第三位碱基错配的核苷酸;

[0045] 或者,在所述反应混合物中加入可抑制非特异性扩增的生物活性分子,包括 Taq MutS、RecA。

[0046] 进一步,所述的 DNA 聚合酶是具有链置换活性的 DNA 聚合酶;或者所述的 DNA 聚合酶不具有链置换活性,且在所述反应混合物中加入具有链置换活性的生物活性分子。

[0047] 进一步,所述的恒温的反应温度范围为 16-70℃。

[0048] 进一步,所述的恒温的反应温度为 37℃、55℃、60℃或 65℃。

[0049] 进一步,所述的反应时间为 10-80min。

[0050] 进一步,所述的反应时间为 10min、20min、30min、40min、50min 或 60min。

[0051] 进一步,本发明还提供了利用本发明所述固相芯片实时恒温指数扩增方法的检测试剂或试剂盒,其主要特征及包含的反应成分包括:使用了本发明所述的上游引物和下游引物;固定了上游引物和/或下游引物的固相芯片;待检测物是 miRNA 靶分子或具有 3'-OH 其它小片段核酸分子,或者,待检测物是含有 miRNA 靶分子或具有 3'-OH 其它小片段核酸分子的各种生物样本;DNA 聚合酶;识别上游引物和下游引物缺口剂识别序列的缺口剂;三磷酸脱氧核苷酸;满足上述 DNA 聚合酶和缺口剂生物学活性功能的离子与缓冲体系;通过检测固相芯片固定引物释放的可检测信号实现多种靶分子的高通量定性和/或定量检测。

[0052] 名词解释:

[0053] “衍生核苷酸 (derivatized nucleotide)”是指天然核苷酸之外的其它类型核苷酸。

[0054] “非特异性扩增”是指非靶分子导致的扩增。

[0055] “靶分子”是指采用本发明所述方法直接或间接检测的物质。

[0056] “寡核苷酸 (oligonucleotide, ODN)”是指小分子核酸,由核苷酸残基(片段)通过磷酸二酯键 (phosphodiester) 或其它化学键(如:硫代磷酸酯键 (phosphorothioates) 连接或聚合而成,分子量介于核酸与核苷酸之间,并倾向于核苷酸。本发明对核苷酸残基的数目并无严格界限。

[0057] “新生 DNA 链”是指引物在 DNA 聚合酶的作用下延伸合成的 DNA 分子。

[0058] “定性检测”是指检测核酸靶分子是否存在,或者检测靶分子是否存在于待检测

物。

[0059] “定量检测”是指检测靶分子的浓度,或者检测待检测物中靶分子的浓度,例如,检测待检测物中靶分子的拷贝数。

[0060] “缺口”是指双链核酸分子的一条核酸分子链保持完整性,另一条核酸分子链的某两个毗邻核苷酸之间的磷酸二酯键断裂,从而形成一个缺口。该缺口两侧的核酸分子末端分别是 3'-OH 和 5'-P₀₄。

[0061] “缺口的 5'-端核酸分子”是指双链核酸分子缺口处带有 3'-OH 的核酸分子链。

[0062] “切割 (nicking)”是指切割完全互补双链核酸分子的一条链,或者是切割部分双链核酸分子的双链区域中的一条链,并且,切割位置位于 NARS 的特定位置。核酸分子被切割的特定位置在本发明中被称为“缺口位点 (nicking site, NS)”

[0063] “缺口剂识别序列 (nicking agent recognition sequences, NARS)”是指完全或部分双链核酸分子中被缺口剂识别的核苷酸序列。本发明所述 NARS 包括 NERS 和半修饰 RERS。

[0064] “缺口内切酶识别序列 (nicking endonuclease recognition sequences, NERS)”是指完全或部分双链核酸分子中被缺口内切酶识别的核苷酸序列。

[0065] “限制性内切酶识别序列 (restriction endonuclease recognition sequences, RERS)”是指完全或部分双链核酸分子中被限制性切切酶 (RE) 识别的核苷酸序列。

[0066] “半修饰限制性内切酶识别序列 (hemimodified RERS)”是指完全或部分双链核酸分子中一条链的 RERS 序列中至少含有一个衍生核苷酸 (如:巯基-脱氧核苷酸 (-thio deoxynucleotide), 并且,该衍生核苷酸可阻止能够识别该 RERS 的限制性内切酶切割含有此衍生核苷酸的链 (即:在限制性内切酶无法切割其识别序列中含有上述衍生核苷酸的核酸分子链), 而另一条链则在其识别序列的特定位置被切割,从而使限制性内切酶具有与缺口内切酶一样的生物学功能,即:只切割完全或部分双链核酸分子中的一条链。

[0067] “缺口剂 (nicking agent, NA)”是指可识别完全或部分双链核酸分子的 NARS 序列,并且,只在 NARS 序列双链区域的缺口位点切割一条核酸分子链的内切酶。缺口剂包括 (但并不限于) 缺口内切酶 (nicking endonuclease, NE; 如:N. BstNBI)、限制性内切酶 (restriction endonuclease, RE; 如:HincII)。对于限制性内切酶,只有当完全或部分双链核酸分子含有半修饰 RERS 时,限制性内切酶才被作为缺口剂使用。

[0068] “缺口内切酶 (nicking endonuclease ;NE)”是指一种能够识别完全或部分双链核酸分子的核苷酸序列,并且,只在相对于其识别序列,即 NERS 的特定位置切割一条核酸分子链的内切酶。该功能与限制性内切酶不同,限制性内切酶通常需要在完全或部分双链核酸分子的识别序列中至少有一个衍生核苷酸,该衍生核苷酸能阻止限制性内切酶切割含有该衍生核苷酸的核酸分子链,而缺口酶通常识别天然核苷酸,并且,只切割完全或部分双链核酸分子中的一条链。

[0069] “NARS 正义链序列 (sequence of the sense strand of the NARS)”是指完全或部分双链核酸分子中能够被缺口剂切割的 NARS 序列,该序列含有识别该 NARS 的缺口剂的缺口位点。

[0070] “NARS 反义链序列 (sequence of the antisense strand of the NARS)”是指完

全或部分双链核酸分子中不能够被缺口剂切割的 NARS 序列,该序列没有识别该 NARS 的缺口剂的缺口位点。

[0071] “NERS 正义链序列 (sequence of the sense strand of the NERS)”是指完全或部分双链核酸分子中能够被缺口内切酶切割的 NERS 序列,该序列含有识别该 NERS 的缺口剂的缺口位点。

[0072] “NERS 反义链序列 (sequence of the antisense strand of the NERS)”是指完全或部分双链核酸分子中不能够被缺口内切酶切割的 NARS 序列,该序列没有识别该 NERS 的缺口剂的缺口位点。

[0073] “半修饰 RERS 正义链序列 (sequence of the sense strand of the hemimodified RERS)”是指完全或部分双链核酸分子中能够被限制性内切酶切割的 RERS 序列,该序列含有识别该 RERS 的缺口剂的缺口位点,其特征是 RERS 序列均是天然核苷酸。

[0074] “半修饰 RERS 反义链序列 (sequence of the antisense strand of the hemimodified RERS)”是指完全或部分双链核酸分子中不能够被限制性内切酶切割的 RARS 序列,该序列没有识别该 RERS 的缺口剂的缺口位点,其特征是 RERS 序列中至少含有一个衍生核苷酸(如:巯基-脱氧核苷酸,并且,该衍生核苷酸可阻止能够识别该 RERS 的限制性内切酶切割此序列)。

[0075] “恒温条件 (isothermal conditions)”是指在扩增过程中,反应温度保持基本恒定的反应条件(即:温度相同,或者,最高温度和最低温度差异不超过 20° C 的窄温度变化范围)。

[0076] 本发明所述“固定”是指通过物理吸附和/或化学耦联方式将寡核苷酸引物连接于固相芯片。

[0077] 本发明所述“物理吸附”是指寡核苷酸引物通过次级键(例如:离子键)与固相芯片相连并固定,或者是以非共价键作用将寡核苷酸引物直接或恒电位吸附到固相芯片,或者由本发明引物中的磷酸根负离子与固相芯片带正电荷的修饰层通过静电作用而固定。

[0078] 本发明所述“化学耦联”是通过形成共价键(例如:酰胺键、酯键、醚键等)使寡核苷酸引物与固相芯片的活性基团相互作用,从而将寡核苷酸引物固定到固相芯片,例如:首先活化预处理固相芯片,引入各种所需活性基团,如氨基、羧基、巯基、羟基、卤素基(包括氟、氯、溴、碘等)等,或者衍生核苷酸,使其带上合适的功能基因,随后用双官能试剂或偶联活化剂联络将寡核苷酸引物固定到固相芯片,常用的双官能基团有戊二醛(GA)、对硝基苯氯甲酸酯(NPC)、马来酰亚胺(MA)、二异硫氰酸酯等。

附图说明

[0079] 下面结合附图和实施例对本发明技术方案进一步说明:

[0080] 图 1 是本发明所述引物的典型结果示例图一;

[0081] 图 2 是本发明所述引物的典型结果示例图二;

[0082] 图 3 是本发明使用了固相芯片同时固定了荧光标记上游引物和下游引物的恒温指数扩增原理示意图;

[0083] 图 4 是本发明使用了固相芯片只固定了荧光标记上游引物的恒温指数扩增原理示意图;

[0084] 图 5 是本发明使用了固相芯片只固定了荧光标记下游引物的恒温指数扩增原理示意图；

[0085] 图 6 是本发明的检测结果示例。

具体实施方式

[0086] 在具体实施过程中,对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明结构的前提下,还可以作出若干变形和改进,这些也应该视为本发明的保护范围,这些都不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。

[0087] 实施例一:固相芯片的每个特定位点固定一种 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物,在单张固相芯片中同时检测 6 种 miRNA 靶分子

[0088] 本发明仅以 6 种 miRNA 靶分子的检测作为实施例,以说明本发明的检测效果。在引物的固相芯片固定方面,为了增加其简易性,在固定引物的本发明所述锚定序列区的 5'-端引入 10 个连续的多聚 T 碱基 (Poly(T₁₀)),并通过 Poly(T₁₀)5'-末端的氨基与固相芯片表面修饰的羧基的化学耦联实现引物在固相芯片的固定。本实施例所采用的化学耦联、固相芯片、固相芯片的荧光检测均是本发明所在技术领域的公知技术与方法。

[0089] 1. 靶分子特异性引物的设计与合成

[0090] SEQ No. 1 和 SEQ No. 2 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-105 (SEQ No. 3) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 4 和 SEQ No. 5 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-26a (SEQ No. 6) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 7 和 SEQ No. 8 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-16 (SEQ No. 9) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 10 和 SEQ No. 11 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-189 (SEQ No. 12) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 13 和 SEQ No. 14 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-451 (SEQ No. 15) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 16 和 SEQ No. 17 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-7e (SEQ No. 18) 的上游引物和下游引物。

[0091] 各引物 5' → 3' 方向共同序列特征依次是含有 Nt. BstNBI 切口内切酶 NERS 正义链序列(即:5'-GAGTC-3')的锚定序列区、特异性识别 miRNA 靶分子 (SEQ No. 3、SEQ No. 6、SEQ No. 9、SEQ No. 12、SEQ No. 15、SEQ No. 18) 及其互补链的识别序列区。其中,上游引物和下游引物的序列识别区分别与 miRNA 靶分子及其互补链的 3'-末端序列互补,并在识别序列区的部分位置设计有锁核酸 (LNA;序列中带有 + 号的碱基)。对于固定在固相芯片的引物,包括 SEQ NO. 1、SEQ NO. 4、SEQ NO. 8、SEQ NO. 11、SEQ NO. 13、SEQ NO. 14、SEQ NO. 16、SEQ NO. 17,均在上述引物的锚定序列区的 5'-末端引入 Poly(T₁₀),并在 Poly(T₁₀)的 5'-末端修饰氨基基团。

[0092] 上述所有寡核苷酸分子均由专业公司合成。

[0093] 上游引物 SEQ No. 1 (5' → 3' 方向)

[0094] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtgtttctt (BHQ1) ACC+AC+A+GG+AG

[0095] 下游引物 SEQ No. 2 (5' → 3' 方向)

[0096] CCGATCTAGTGAGTCtgtttcttTC+AA+ATGC+TCA

[0097] miRNA-105 SEQ No. 3 (5' → 3' 方向)

[0098] UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU

[0099] 上游引物 SEQ No. 4 (5' → 3' 方向)

- [0100] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) AGCC+TA+TCC+TG
- [0101] 下游引物 SEQ No. 5 (5' → 3' 方向)
- [0102] CCGATCTAGTGAGTCtggttcttT+TCA+AGT+AAT
- [0103] miR-26a SEQ No. 6 (5' → 3' 方向)
- [0104] UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
- [0105] 上游引物 SEQ No. 7 (5' → 3' 方向)
- [0106] CCGATCTAGTGAGTCtggttcttCGCC+AA+TA+TT
- [0107] 下游引物 SEQ No. 8 (5' → 3' 方向)
- [0108] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) T+AGC+AGC+ACGT
- [0109] miR-16 SEQ No. 9 (5' → 3' 方向)
- [0110] UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
- [0111] 上游引物 SEQ No. 10 (5' → 3' 方向)
- [0112] CCGATCTAGTGAGTCtggttcttAC+TGA+TA+TCAG
- [0113] 下游引物 SEQ No. 11 (5' → 3' 方向)
- [0114] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) TGCC+TAC+TG+AG
- [0115] miR-189 SEQ No. 12 (5' → 3' 方向)
- [0116] UGCCUACUGAGCUGAUUUCAGU
- [0117] 上游引物 SEQ No. 13 (5' → 3' 方向)
- [0118] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) A+ACTC+AGT+AATG
- [0119] 下游引物 SEQ No. 14 (5' → 3' 方向)
- [0120] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) A+A+ACCGT+TACC
- [0121] miR-451 SEQ No. 15 (5' → 3' 方向)
- [0122] AAACCGUUACCAUUCUGAGUU
- [0123] 上游引物 SEQ No. 16 (5' → 3' 方向)
- [0124] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) A+ACTA+TACA+ACC
- [0125] 下游引物 SEQ No. 17 (5' → 3' 方向)
- [0126] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGAGTCtggttctt (BHQ1) TG+AGGT+AGG+AG
- [0127] let-7e SEQ No. 18 (5' → 3' 方向)
- [0128] UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU.

[0129] 2. 不同靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物固定于固相芯片的特定位点

[0130] 采用本发明所属技术领域公知的技术方法, 如图 6 所示, 通过上游引物和 / 或下游引物的 Poly (T₁₀) 的 5' - 末端氨基基团和固相芯片的羧基基团的化学偶联, 将引物固定于固相芯片表面的特定位点, 其中:

[0131] miR-105 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 1 固定于固相芯片的第一列三个重复的特定位点, 三个重复的特定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性;

[0132] miR-26a 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 4 固定于的第二列三个重复的特定位点, 三个重复的特定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性;

[0133] miR-16 靶分子对应的下游引物 SEQ No. 8 固定于的第三列三个重复的特定位点, 三个重复的特定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性;

[0134] miR-189 靶分子对应的下游引物 SEQ No. 11 固定于的第四列三个重复的特定定位点,三个重复的特定定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性;

[0135] miR-451 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 13 和下游引物 SEQ No. 14 同时固定于的第五列三个重复的特定定位点,三个重复的特定定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性;

[0136] miR-7e 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 16 和下游引物 SEQ No. 17 同时固定于的第六列三个重复的特定定位点,三个重复的特定定位点的目的是提高检测结果的准确性与重复性。

[0137] 并且,固定在固相芯片的上述所述上游和 / 或下游引物均在锚定序列区所在的 NERS 正义链序列两侧的碱基分别标记有 PE 荧光报告分子和 BHQ3 淬灭分子。

[0138] 3. 血清总 RNA 的提取

[0139] 采用商品化总 RNA 提取试剂盒提取 10 例人体外周血白细胞总 RNA。

[0140] 4. 固相芯片恒温指数扩增体系的构建

[0141] 反应体系共计 50 μ L, 该体系包括以下组分: 20mM Tris-HCl、10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50mM KCl、8mM MgSO_4 、0.1% Tween-20、100 μ g/ml BSA、5% DMSO、0.2 单位 Vent_r(exo-)DNA 聚合酶 (NEB)、1.6 单位 Nt. BstNBI 缺口酶 (NEB)、1.5 μ g 耐热错配识别蛋白 Taq MutS (Nippon Gene)、600 μ M dNTPs (Promega)、步骤 1 和 2 中未固定于固相芯片的上游和 / 或下游引物为每种引物 50nM, 步骤 2 中表面固定了上游和 / 或下游引物的固相芯片, 靶分子是合成的 0.1zmol 的 miRNA 靶分子 (包括: SEQ No. 3、SEQ No. 6、SEQ No. 9、SEQ No. 12、SEQ No. 15、SEQ No. 18), 或者是步骤 3 制备的 10 例人体外周血白细胞总 RNA。

[0142] 4. 靶分子的扩增与荧光检测

[0143] 将上述制备的反应体系置于 ViiA7 实时荧光定量 PCR, 反应条件为: 60°C 40 分钟。反应完毕后, 采用北京博奥公司的微阵列芯片扫描仪检测固相芯片每个特定定位点的荧光。

[0144] 5. 检测结果与分析

[0145] 5.1 当反应体系中只有 miR-105 靶分子时, 只有第一列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0146] 5.2 当反应体系中只有 miR-26a 靶分子时, 只有第二列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0147] 5.3 当反应体系中只有 miR-16 靶分子时, 只有第三列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0148] 5.4 当反应体系中只有 miR-189 靶分子时, 只有第四列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0149] 5.5 当反应体系中只有 miR-451 靶分子时, 只有第五列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0150] 5.6 当反应体系中只有 miR-7e 靶分子时, 只有第六列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0151] 5.7 当反应体系中同时存在本实施例所述的 6 种靶分子时, 第一列至第六列的三个重复的特定定位点能够检测到 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与各靶分子的初始浓度成正比 (图 6)。

[0152] 5.8 临床样本的检测结果表明,10 例样本的 miR-105、miR-26a、miR-16、miR-189、miR-451、miR-7e 检测结果分别是 $5.23 \sim 7.28 \times 10^3$ 、 $1.27 \sim 4.38 \times 10^4$ 、 $2.13 \sim 3.24 \times 10^4$ 、 $6.23 \sim 8.23 \times 10^3$ 、 $4.23 \sim 6.89 \times 10^4$ 。

[0153] 5.9 相对于现有的基于杂交的固相芯片检测方法,本实施例是核酸扩增与检测为一体的检测方法,可在 40 分钟内完成核酸扩增,扩增产物可直接用于相关设备检测,无需后续的杂交步骤,总体耗时仅 50 分钟左右,远远低于现有的基于杂交的类似检测方法,并且,其灵敏度和特异性等方法学参数与现有类似检测方法具有良好的相关性。

[0154] 实施例二:固相芯片的每个特定位点固定两种 miRNA 靶分子对应的上游引物和/或下游引物,在一张固相芯片中同时检测 6 种 miRNA 靶分子

[0155] 在引物的固相芯片固定方面,为了增加其简易性,在固定引物的本发明所述锚定序列区的 5'-端引入 10 个连续的多聚 T 碱基 (Poly(T₁₀)),并通过 Poly(T₁₀) 5'-末端的氨基与固相芯片的羧基的化学耦联实现引物在固相芯片的固定。本实施例所采用的化学耦联、固相芯片、固相芯片的荧光检测均是本发明所在技术领域的公知技术与方法。

[0156] 1. 靶分子特异性引物的设计与合成

[0157] SEQ No. 1 和 SEQ No. 2 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-105 (SEQ No. 3) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 4 和 SEQ No. 5 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-26a (SEQ No. 6) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 7 和 SEQ No. 8 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-16 (SEQ No. 9) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 10 和 SEQ No. 11 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-189 (SEQ No. 12) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 13 和 SEQ No. 14 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-451 (SEQ No. 15) 的上游引物和下游引物,SEQ No. 16 和 SEQ No. 17 分别是扩增 miRNA 靶分子 miR-7e (SEQ No. 18) 的上游引物和下游引物。

[0158] 各引物 5' → 3' 方向共同序列特征依次是含有 Nt. AlwI 切口内切酶 NERS 正义链序列 (即:5'-GGATC-3') 的锚定序列区、特异性识别 miRNA 靶分子 (SEQ No. 3、SEQ No. 6、SEQ No. 9、SEQ No. 12、SEQ No. 15、SEQ No. 18) 及其互补链的识别序列区。其中,上游引物和下游引物的序列识别区分别与 miRNA 靶分子及其互补链的 3'-末端序列互补,并在部分引物的识别序列区的部分位置设计有锁核酸 (LNA; 序列中带有 + 号的碱基)。对于固相芯片的固定引物,包括 SEQ NO. 1、SEQ NO. 4、SEQ NO. 8、SEQ NO. 11、SEQ NO. 13、SEQ NO. 14、SEQ NO. 16、SEQ NO. 17,均在上述引物的锚定序列区的 5'-末端引入 Poly(T₁₀),并在 Poly(T₁₀) 的 5'-末端修饰氨基基团。

[0159] 上述所有寡核苷酸分子均由专业公司合成。

[0160] 上游引物 SEQ No. 1 (5' → 3' 方向)

[0161] NH₂-tttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGGATCtgttcttACC (BHQ1) ACAGGAG

[0162] 下游引物 SEQ No. 2 (5' → 3' 方向)

[0163] CCGATCTAGTGGATCtgttcttTCAAATGC+TCA

[0164] miRNA-105 SEQ No. 3 (5' → 3' 方向)

[0165] UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU

[0166] 上游引物 SEQ No. 4 (5' → 3' 方向)

[0167] NH₂-tttttttttt (VIC) CCGATCTAGTGGATCtgttcttAGCCT (BHQ1) A+TCCTG

[0168] 下游引物 SEQ No. 5 (5' → 3' 方向)

- [0169] CCGATCTAGTGGATCtgttcttTTCAAGTAAT
- [0170] miR-26a SEQ No. 6 (5' → 3' 方向)
- [0171] UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
- [0172] 上游引物 SEQ No. 7 (5' → 3' 方向)
- [0173] CCGATCTAGTGGATCtgttcttCGCCAATATT
- [0174] 下游引物 SEQ No. 8 (5' → 3' 方向)
- [0175] NH₂-ttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGGATCtgttctt (BHQ1) TAGCAGCACGT
- [0176] miR-16 SEQ No. 9 (5' → 3' 方向)
- [0177] UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
- [0178] 上游引物 SEQ No. 10 (5' → 3' 方向)
- [0179] CCGATCTAGTGGATCtgttcttACTGA+TATCAG
- [0180] 下游引物 SEQ No. 11 (5' → 3' 方向)
- [0181] NH₂-ttttttttt (VIC) CCGATCTAGTGGATCtgttcttTGCCCT (BHQ1) ACTGAG
- [0182] miR-189 SEQ No. 12 (5' → 3' 方向)
- [0183] UGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGU
- [0184] 上游引物 SEQ No. 13 (5' → 3' 方向)
- [0185] NH₂-ttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGGATCtgttctt (BHQ1) AACTCAGTAATG
- [0186] 下游引物 SEQ No. 14 (5' → 3' 方向)
- [0187] NH₂-ttttttttt (FAM) CCGATCTAGTGGATCtgttctt (BHQ1) A+AACCGTTACC
- [0188] miR-451 SEQ No. 15 (5' → 3' 方向)
- [0189] AAACCGUUACCAUUAUCUGAGUU
- [0190] 上游引物 SEQ No. 16 (5' → 3' 方向)
- [0191] NH₂-ttttttttt (VIC) CCGATCTAGTGGATCtgttctt (BHQ1) AACTATAACAACC
- [0192] 下游引物 SEQ No. 17 (5' → 3' 方向)
- [0193] NH₂-ttttttttt (VIC) CCGATCTAGTGGATCtgttcttTGAGGT (BHQ1) +AGGAG
- [0194] let-7e SEQ No. 18 (5' → 3' 方向)
- [0195] UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU。

[0196] 2. 不同靶分子对应的上游引物和 / 或下游引物固定于固相芯片

[0197] 采用本发明所属技术领域公知的技术方法, 利用微细加工技术, 制备含有 3 个微反应孔的固相芯片, 通过上游引物和 / 或下游引物的 Poly (T₁₀) 的 5' - 末端氨基基团和固相芯片微反应孔的羧基基团的化学耦联, 将引物固定于固相芯片的微反应孔, 其中:

[0198] miR-105 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 1 和 miR-26a 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 4 同时固定于固相芯片的第一个微反应孔, 二者的引物分别标记 FAM 和 VIC 荧光报告分子;

[0199] miR-16 靶分子对应的下游引物 SEQ No. 8 和 miR-189 靶分子对应的下游引物 SEQ No. 11 同时固定于固相芯片的第二个微反应孔, 二者的引物分别标记 FAM 和 VIC 荧光报告分子;

[0200] miR-451 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 13 和下游引物 SEQ No. 14、miR-7e 靶分子对应的上游引物 SEQ No. 16 和下游引物 SEQ No. 17 均同时固定于固相芯片的第三个微反

应孔,二者的引物分别标记 FAM 和 VIC 荧光报告分子。

[0201] 3. 血清总 RNA 的提取

[0202] 采用商品化总 RNA 提取试剂盒提取 10 例人体外周血白细胞总 RNA。

[0203] 4. 固相芯片恒温指数扩增体系的构建

[0204] 反应体系共计 50 μ L, 该体系包括以下组分:50mM NaCl、10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100 μ g/ml BSA、0.5 单位 Klenow(exo-)DNA 聚合酶 (NEB)、2 单位 Nt. AlwI 缺口酶 (NEB)、600 μ M dNTPs(Promega)、步骤 1 和 2 中未固定于固相芯片的上游和 / 或下游引物为每种引物 50nM, 步骤 2 中固定了上游和 / 或下游引物的固相芯片, 靶分子是合成的 0.1 μ mol 的 miRNA 靶分子 (包括:SEQ No. 3、SEQ No. 6、SEQ No. 9、SEQ No. 12、SEQ No. 15、SEQ No. 18), 或者是步骤 3 制备的 10 例人体外周血白细胞总 RNA。

[0205] 4. 靶分子的扩增与荧光检测

[0206] 将上述制备的反应体系置于 ViiA7 实时荧光定量 PCR, 反应条件为:37 $^{\circ}$ C 30 分钟。反应完毕后, 采用北京博奥公司的微阵列芯片扫描仪检测固相芯片每个微反应孔的荧光种类与强度。

[0207] 5. 检测结果与分析

[0208] 5.1 当反应体系中只有 miR-105 靶分子时, 只有固相芯片的第一个微反应孔固定引物释放的可检测 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0209] 5.2 当反应体系中只有 miR-26a 靶分子时, 只有固相芯片的第一个微反应孔固定引物释放的可检测 VIC 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0210] 5.3 当反应体系中只有 miR-16 靶分子时, 只有固相芯片的第二个微反应孔固定引物释放的可检测 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0211] 5.4 当反应体系中只有 miR-189 靶分子时, 只有固相芯片的第二个微反应孔固定引物释放的可检测 VIC 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0212] 5.5 当反应体系中只有 miR-451 靶分子时, 只有固相芯片的第三个微反应孔固定引物释放的可检测 FAM 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0213] 5.6 当反应体系中只有 miR-7e 靶分子时, 只有固相芯片的第三个微反应孔固定引物释放的可检测 VIC 荧光信号, 且荧光信号的强度与该靶分子的初始浓度成正比。

[0214] 5.7 当反应体系中同时存在本实施例所述的 6 种靶分子时, 固相芯片的每一个至第三个微反应孔均可检测到固定引物释放的 FAM 和 VIC 荧光信号, 且荧光信号的强度与各靶分子的初始浓度成正比。

[0215] 5.8 临床样本的检测结果表明, 10 例样本的 miR-105、miR-26a、miR-16、miR-189、miR-451、miR-7e 检测结果分别是 $5.23 \sim 7.28 \times 10^3$ 、 $1.27 \sim 4.38 \times 10^4$ 、 $2.13 \sim 3.24 \times 10^4$ 、 $6.23 \sim 8.23 \times 10^3$ 、 $4.23 \sim 6.89 \times 10^4$ 。

[0216] 5.9 相对于现有的基于杂交的固相芯片检测方法, 本实施例是核酸扩增与检测为一体的检测方法, 可在 30 分钟内完成核酸扩增, 扩增产物可直接用于相关设备检测, 无需后续的杂交步骤, 总体耗时仅 40 分钟左右, 远远低于现有的基于杂交的类似检测方法, 并且, 其灵敏度和特异性等方法学参数与现有类似检测方法具有良好的相关性。

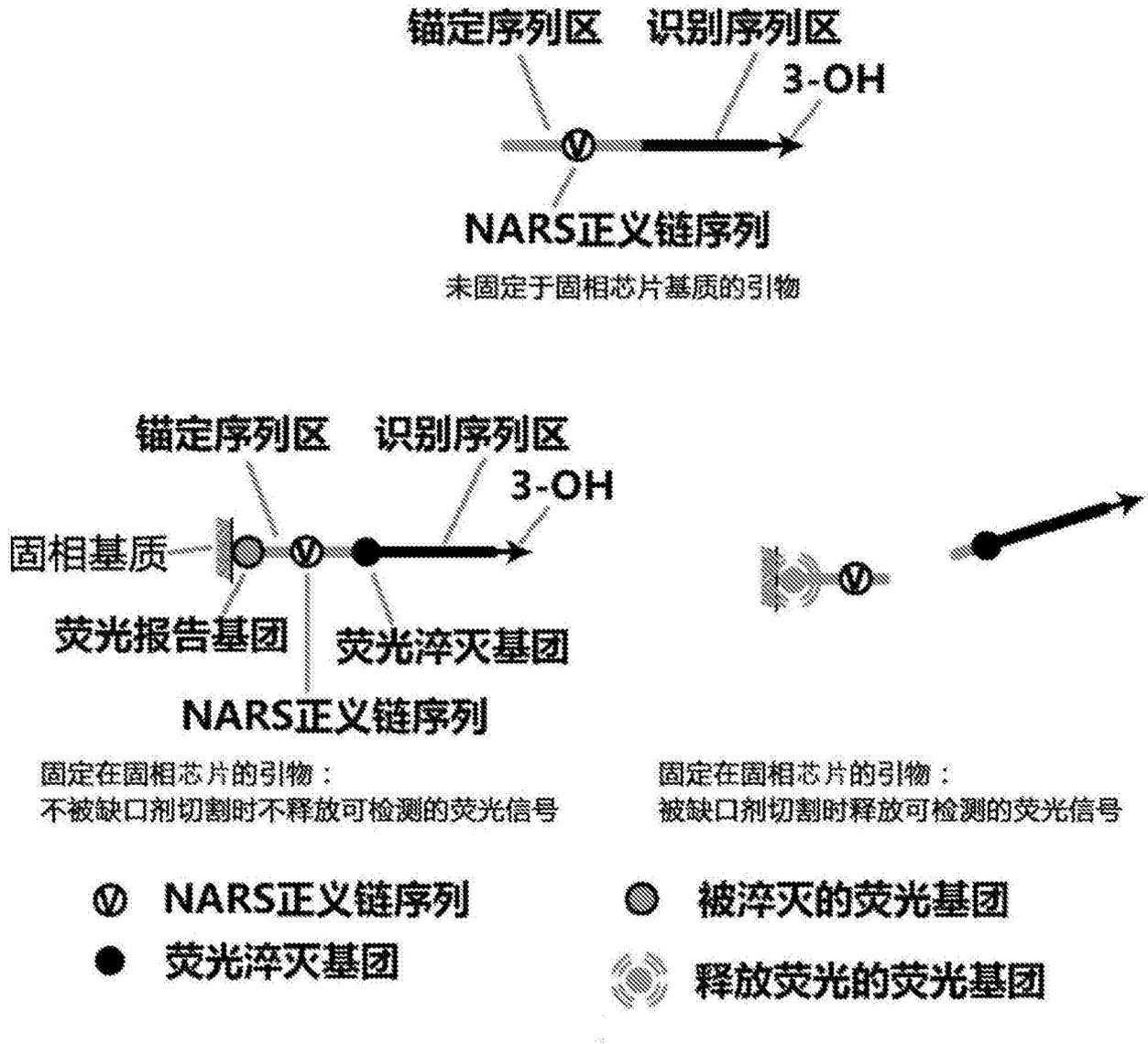


图 1

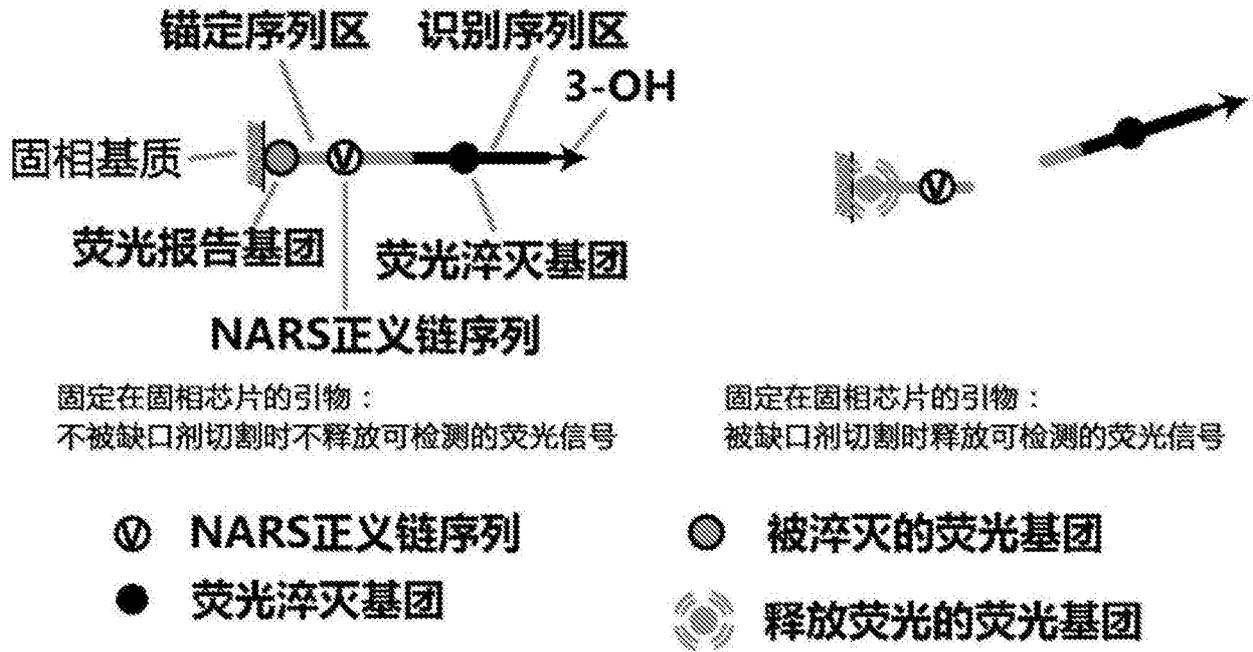


图 2

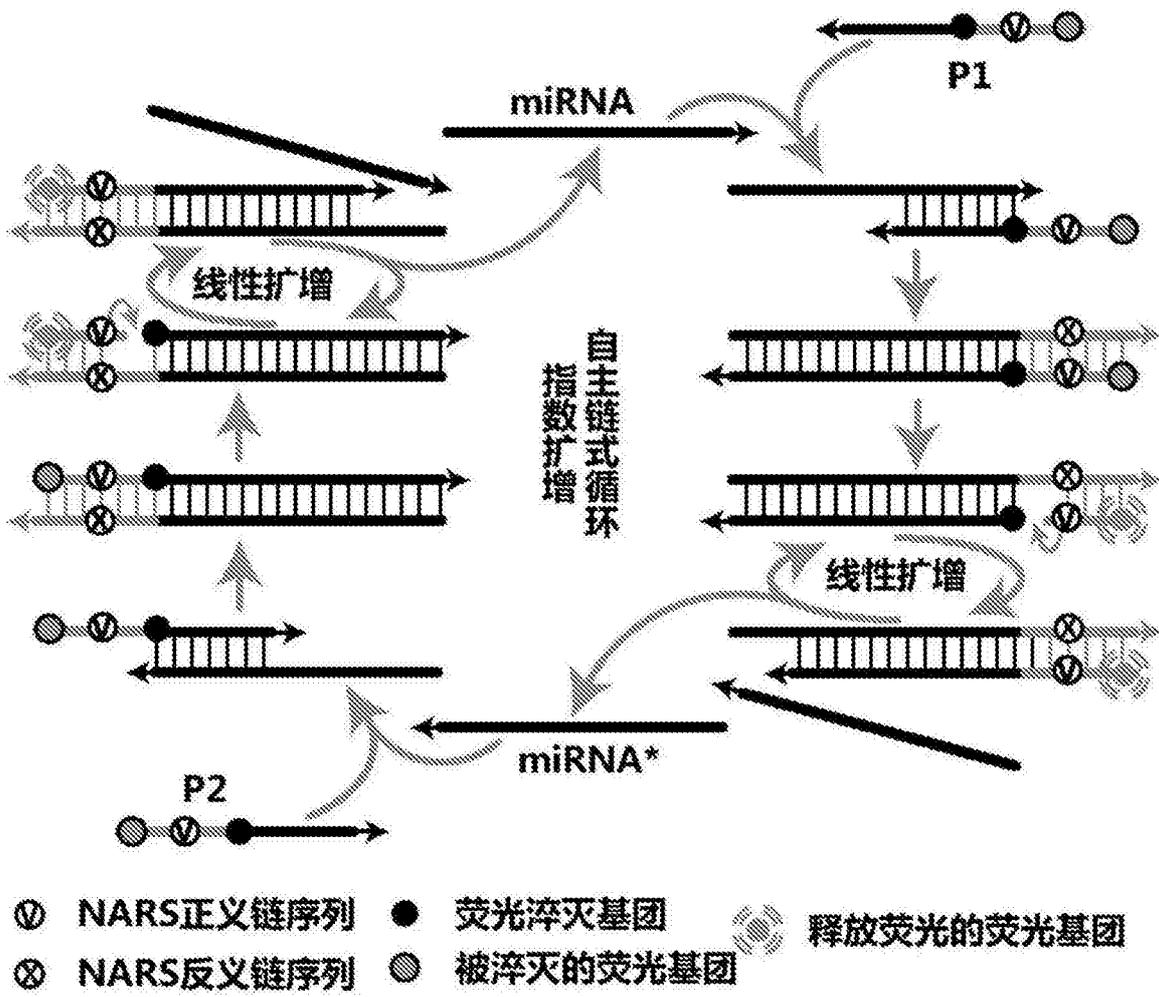


图 3

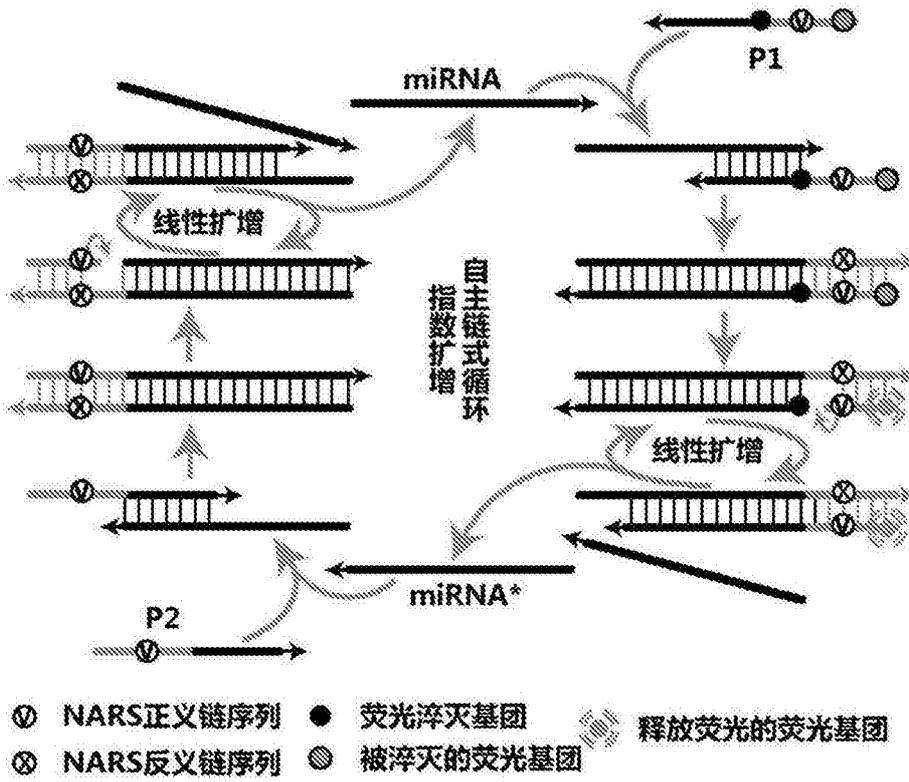


图 4

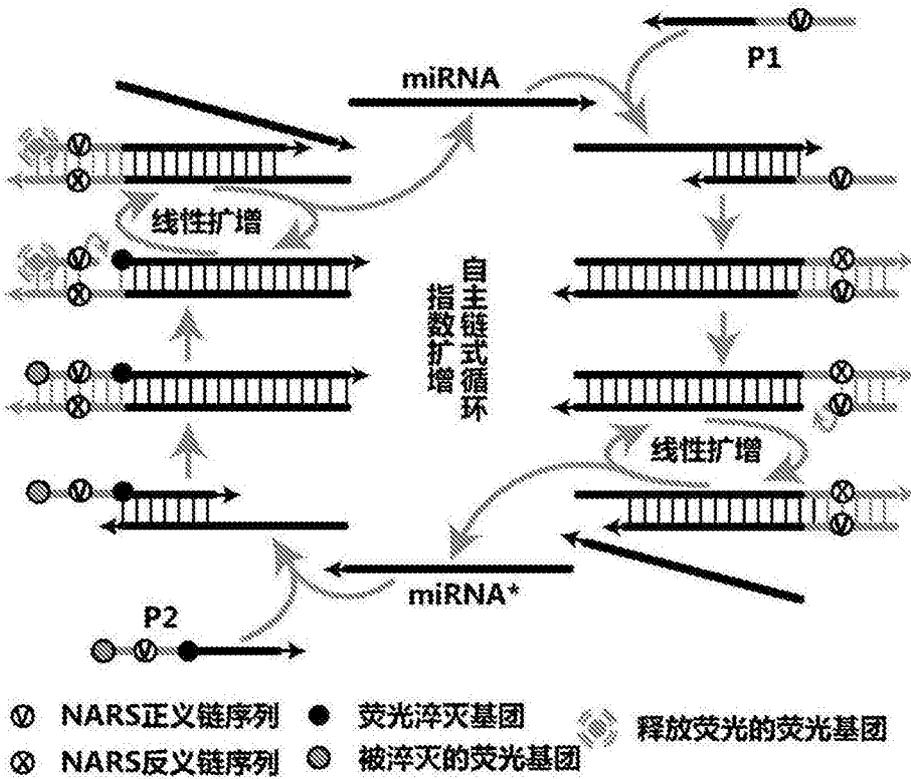


图 5

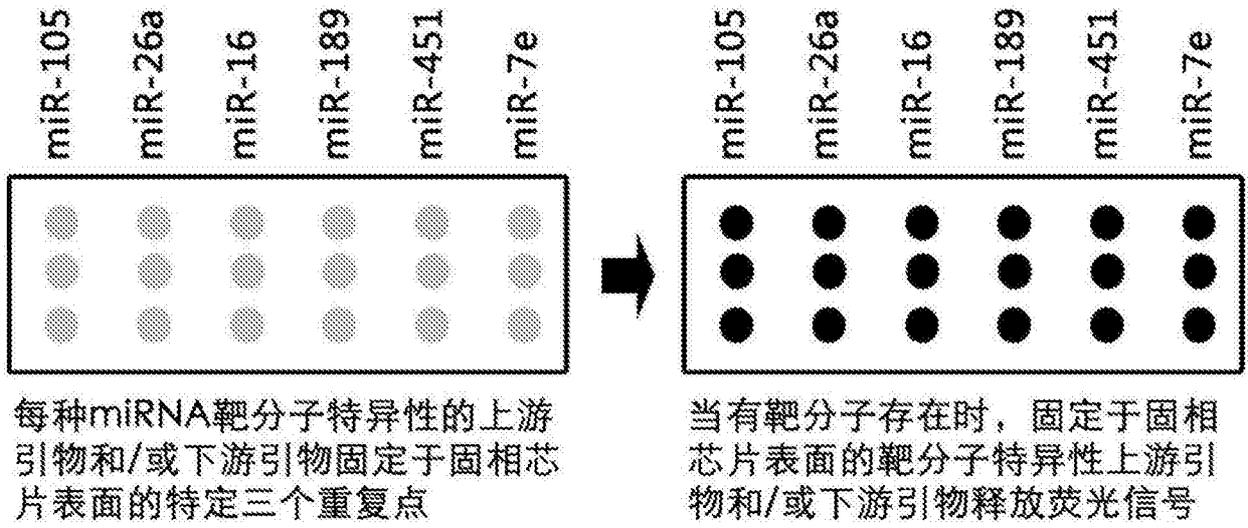


图 6