



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106929563 B

(45)授权公告日 2018.10.12

(21)申请号 201710104367.1

(22)申请日 2017.02.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106929563 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(73)专利权人 山东师范大学
地址 250014 山东省济南市文化东路88号

(72)发明人 张春阳 王黎娟 任明

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 王志坤

(51)Int.Cl.

C12Q 1/34(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 106244703 A,2016.12.21,说明书第7-

16段.

CN 106244703 A,2016.12.21,说明书第7-16段.

EP 0684315 A1,1995.05.13,全文.

CN 105506078 A,2016.04.20,全文.

Yushu Wu等.A unique dual recognition hairpin probe mediated fluorescence amplification method for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase and endonuclease IV activities.《Analyst》.2016,第141卷第1789-1795页.

邹亚娟.基于分子信标的尿嘧啶DNA糖苷酶活性测定.《万方数据》.2008,摘要部分,第37-38页.

审查员 冷千里

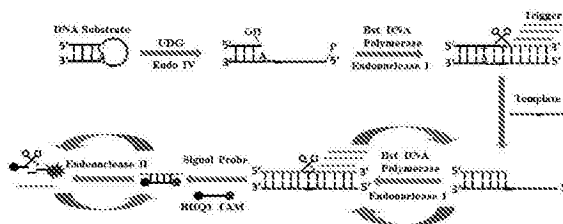
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法,步骤如下:(1)将UDG作用底物加入到切除反应缓冲液中,进行切除修复反应,将UDG作用底物的尿嘧啶碱基切除,留下一个脱碱基位点;(2)将切除修复反应产物加入到扩增反应缓冲液中,进行酶辅助两步串联信号放大反应,即引发链置换反应和指数扩增反应,循环产生增强的荧光信号,通过荧光信号的强弱测定UDG的活性。本发明利用恒温指数扩增反应的高扩增效率和核糖核酸酶H的特异性循环消化,实现了对尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性超高灵敏检测。



1. 一种用于非疾病诊断为目的的基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 将UDG作用底物加入到切除反应缓冲液中,进行切除修复反应,将UDG作用底物上的尿嘧啶碱基切除,留下一个脱碱基位点;

(2) 将切除修复反应产物加入到扩增反应缓冲液中,进行酶辅助两步串联信号放大反应,即引发链置换反应和指数扩增反应,循环产生增强的荧光信号,通过荧光信号的强弱测定UDG的活性;

所述UDG作用底物为发夹探针结构,所述发夹探针的茎部5'端有一个尿嘧啶碱基,其与互补链上的腺嘌呤互补配对;其环部上有一个切刻内切酶的识别位点;

所述扩增反应缓冲液中,包含:BstDNA聚合酶、限制性核酸内切酶、指数扩增模板、信号探针、核糖核酸酶H、NEB缓冲液、ThermoPol缓冲液和核糖核酸酶H缓冲液;

所述切除反应缓冲液包含待检测的尿嘧啶DNA糖基化酶、核酸内切酶IV和NEB缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,切除修复反应的条件为:37℃下孵育30-50分钟。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,孵育时间为40分钟。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,酶辅助两步串联信号放大反应的条件为:37℃下孵育60-80分钟。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,孵育时间为70分钟。

6. 一种检测UDG活性的试剂盒,其特征在于,包括:发夹探针、信号探针、指数扩增模板、BstDNA聚合酶、限制性核酸内切酶、核糖核酸酶H、NEB缓冲液、核酸内切酶IV、ThermoPol缓冲液和核糖核酸酶H缓冲液;所述发夹探针的茎部5'端有一个尿嘧啶碱基,其与互补链上的腺嘌呤互补配对;其环部上有一个切刻内切酶的识别位点;所述信号探针为两端修饰有荧光分子和淬灭分子的RNA。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述发夹探针的序列如SEQ ID NO.1所示;所述信号探针的序列如SEQ ID NO.2所示;所述指数扩增的序列如SEQ ID NO.3所示。

8. 权利要求6-7任一项所述的试剂盒在非疾病诊断为目的的检测UDG活性中的应用。

基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物分析技术领域,特别是涉及一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法。

背景技术

[0002] 基因组是由特异性配对的A:T/G:C碱基组成,其精确性和稳定性对生命体的维持具有十分重要的意义。但在现实生活中,基因组DNA碱基的结构经常遭受到来自于外部因素(如紫外线、电离辐射、有毒化学物质)和内源活性因素(如超氧阴离子、羟基自由基、过氧化氢等)的损害,造成DNA单、双链断裂,错配,碱基缺失等,破坏基因组的完整性,导致基因组的不稳定、诱发癌变,从而影响物种的生存。为了降低体内基因组DNA的损伤,生物体内进化出多种损伤修复机制,仅针对单碱基突变就有错配修复(MMR),碱基切除修复(BER),核苷酸切除修复(NER)等,其中碱基切除修复(BER)是修复碱基氧化损伤最重要方式。而启动碱基切除修复(BER)最关键的一步是由DNA糖基化酶催化完成的。DNA糖基化酶是一类在碱基切除修复(BER)过程中负责损伤碱基识别和切除的起始酶,它的功能的异常会导致碱基切除修复机制无法运行,从而引发多种疾病,如人类免疫缺陷、神经退行性变、淋巴瘤、绽放综合征以及乳腺癌等。

[0003] 因此,尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的超灵敏检测对于基础生物医学的研究和人类各种疾病的早期临床诊断有着十分重要的作用。到目前为止,已发展出多种方法用于尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的检测,其中凝胶电泳结合放射性标记被认为是检测方法中的“黄金标准”。但是该方法具有一些无法克服的缺点,如放射性污染,检测灵敏度低,以及消耗时间长等。近年来已研发出一些新的用于检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的方法,如比色分析法,电化学分析法和以及荧光分析法。其中,比色分析法通过过氧化氢氧化2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐($ABTS^{2-}$)产生有色的 $ABTS^{\cdot-}$,使尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的活性可视化,但是其检测灵敏度无法与电化学方法和荧光方法相比。电化学分析方法在一定程度上提高了检测灵敏度,但是需要将捕获探针固定在固化载体上以及需要提前制备石墨烯电极,既耗时又费力。荧光方法设计简单,操作方便,但无法避免检测灵敏度低以及信号不稳定等缺点。综上,尽管这些检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的方法有效,但是仍然存在灵敏度偏低,损耗时间长,操作繁琐等缺点。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法。本发明利用恒温指数扩增反应的高扩增效率和核糖核酸酶H(RNase H)的特异性循环消化,实现了对尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性超高灵敏检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明的第一方面,提供一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法,步骤如下:

[0007] (1) 将UDG作用底物加入到切除反应缓冲液中,进行切除修复反应,将UDG作用底物的尿嘧啶碱基切除,留下一个脱碱基位点;

[0008] (2) 将切除修复反应产物加入到扩增反应缓冲液中,进行酶辅助两步串联信号放大反应,即引发链置换反应和指数扩增反应,循环产生增强的荧光信号,通过荧光信号的强弱测定UDG的活性。

[0009] 步骤(1)中,所述UDG作用底物为发夹探针结构,所述发夹探针的茎部5'端有一个尿嘧啶(U)碱基,其与互补链上的腺嘌呤(A)互补配对;其环部上有一个切刻内切酶的识别位点。

[0010] 作为优选的,所述发夹探针结构的序列如SEQ ID NO.1所示,具体如下:

[0011] 发夹探针序列:

5'-*TAAC ACT GTC TGG TUA ATG AAT AAC TCT ACT ATC TCT TGA CTC*
TTA TCT TAA CCA GAC AGT GTT A-3' (SEQ ID NO.1)

[0012] 其中,斜体部分为探针茎部互补区域;下划线部分为限制性核酸内切酶(Nt.BstNBI)区域。

[0013] 步骤(1)中,所述切除反应缓冲液中,包含:待检测的尿嘧啶DNA糖基化酶、核酸内切酶IV和NEB缓冲液。

[0014] 步骤(1)中,切除修复反应的条件为:37°C下孵育30-50分钟;优选的,孵育时间为40分钟。

[0015] 步骤(2)中,所述扩增反应缓冲液中,包含:BstDNA聚合酶、限制性核酸内切酶(Nt.BstNBI)、指数扩增模板、信号探针、核糖核酸酶H(RNase H)、NEB缓冲液、ThermoPol缓冲液和核糖核酸酶H缓冲液。

[0016] 所述信号探针的序列如SEQ ID NO.2所示,具体如下:

[0017] 信号探针序列:5'-FAM-AUA ACUCUA CUAUC-BHQ1-3';(SEQ ID NO.2)

[0018] 信号探针序列为核糖核苷酸(RNA)序列;"FAM"和"BHQ1"代表修饰的荧光分子和淬灭分子。

[0019] 所述指数扩增模板的序列如SEQ ID NO.3所示,具体如下:

[0020] 指数扩增模板序列:5'-TGA ATA ACT CTA CTA TCT CTT GAC TCT GAA TAA CTC TAC TAT C-3';(SEQ ID NO.3)

[0021] 下划线部分为限制性核酸内切酶(Nt.BstNBI)区域。

[0022] 步骤(2)中,酶辅助两步串联信号放大反应的条件为:37°C下孵育60-80分钟;优选的,孵育时间为70分钟。

[0023] 本发明的第二方面,提供一种检测UDG活性的试剂和/或试剂盒,包括:发夹探针和信号探针。

[0024] 所述发夹探针的茎部5'端有一个尿嘧啶(U)碱基,其与互补链上的腺嘌呤(A)互补配对;其环部上有一个切刻内切酶的识别位点。

[0025] 所述信号探针为两端修饰有荧光分子和淬灭分子的RNA。

[0026] 优选的,所述发夹探针的序列如SEQ ID NO.1所示;所述信号探针的序列如SEQ ID

NO.2所示。

[0027] 优选的,所述试剂和/或试剂盒中还包括:BstDNA聚合酶、限制性核酸内切酶(Nt.BstNBI)、指数扩增模板、信号探针、核糖核酸酶H(RNase H)、NEB缓冲液、ThermoPol缓冲液和核糖核酸酶H缓冲液。

[0028] 所述指数扩增模板、信号探针的结构同上,即指数扩增模板的的序列如SEQ ID NO.3所示,信号探针的序列如SEQ ID NO.2所示。

[0029] 本发明的第三方面,提供上述试剂和/或试剂盒在检测UDG活性中的用途。

[0030] 本发明的有益效果:

[0031] 本发明首先设计了一个发夹探针,其茎部5'端有一个尿嘧啶(U)碱基,其与互补链上的腺嘌呤(A)互补配对;其环部上有一个切刻内切酶的识别位点。在尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)存在下,发夹探针茎部的尿嘧啶(U)将被特异性识别并切除,产生一个脱碱基(AP)位点。核酸内切酶IV(Endo IV)随后切割该脱碱基(AP)位点,导致发夹结构的展开。在DNA聚合酶和切刻内切酶的作用下,展开的发夹探针将同时化作引物和模板启动等温指数扩增反应,产生大量的触发物,所得到的触发物可以特异性地与信号探针杂交,形成RNA-DNA异质双链体。加入的核糖核酸酶H(RNase H)将水解RNA-DNA双链中的RNA链,导致荧光信号的产生。且不需要繁琐的洗涤、转移、分离步骤。因此本方法可适用于高效、灵敏地检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的活性。

[0032] (2) 由于本发明利用了高效率的恒温指数扩增方法和核糖核酸酶H(RNase H)的特异性循环消化,将检测信号进行了两步放大,具有超高的灵敏度和较高的分辨率,该方法可达到低至 10^{-7} U/ μ L的检测限。

[0033] (3) 由于本发明是基于尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的自身损伤修复特性,整个修复反应是严格按照体内的自然修复机制进行的,因此反应的特异性很高。另外,我们对该方案中的各反应条件也都进行了详细的优化。因此在修复反应过程中,极少发生非特异性反应,而且核糖核酸酶H(RNase H)只能水解RNA-DNA双链中的RNA,这也大大减少了该方法的非特异性。

[0034] (4) 由于本发明中的反应都是恒温扩增,因而不涉及控温;而且该反应不涉及分离、洗涤步骤,操作简便。

附图说明

[0035] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本申请的进一步理解,本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请,并不构成对本申请的不当限定。

[0036] 图1为本发明的基于切除修复由酶介导的二次串联信号放大检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的荧光法原理图;

[0037] 图2为体外尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)引发的碱基切除修复过程的验证;图中A为实时荧光监测基于切除修复由内切酶介导的等温指数扩增反应;图中,“S”曲线为加尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG),与时间轴几乎重合的曲线为不加尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG),即Control。图中B:基于切除修复内切酶介导的等温指数扩增反应产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析。泳道M为DNA marker,泳道1为尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的酶切反应产物;泳道2为基于切除修复内切酶介导的等温指数扩增反应产物;泳道3为DNA发夹探针;泳

道4为指数扩增模板。

[0038] 图3为检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的灵敏度结果,A图:不同浓度的尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的荧光光谱变化。B图:荧光强度在不同浓度尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)下的变化情况及其线性分析。误差线代表三次独立实验的标准偏差。;

[0039] 图4为针对不同的蛋白样品,荧光强度的变化分析。误差线代表三次独立实验的标准偏差。

具体实施方式

[0040] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0041] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0042] 正如背景技术所介绍的,现有技术中有关尿嘧啶DNA糖基化酶活性的检测方法仍然存在灵敏度偏低,损耗时间长,操作繁琐等缺点。基于此,本发明提出了一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法。

[0043] 本发明的设计构思在于:首先设计了一个发夹探针作为尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)作用底物,并分别在DNA发夹探针茎部的5'端上设计一个尿嘧啶(U),在环上设计一个切割内切酶的识别位点。当尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)存在时,尿嘧啶碱基会被切除,并留下一个脱碱基(AP)位点。核酸内切酶IV(Endo IV)将会进一步切割该脱碱基(AP)位点,从而使发夹探针的环部展开。展开的发夹探针将同时作为引物和模板,在DNA聚合酶作用下进行聚合延伸,形成DNA双链。加入的切割内切酶将在形成的双链酶切位点处进行剪切,引发链置换反应,产生触发物。该触发物可与指数扩增模板结合,展开指数扩增反应,产生更多的触发物。加入信号探针(带有荧光分子和淬灭分子的RNA序列),触发物将与其互补结合,形成双链RNA-DNA异质体。在核糖核酸酶H(RNase H)的作用下,信号探针将被消化,同时释放荧光分子和触发物,释放的触发物又会与新的信号探针结合,从而循环释放出大量的荧光信号。荧光信号的强弱可反应出尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的活性大小。本发明的设计原理图如图1所示。

[0044] 在本申请的一种实施方案中,提供了一种基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法,步骤如下:

[0045] (1) 将UDG作用底物加入到切除反应缓冲液中,进行切除修复反应,将UDG作用底物的尿嘧啶碱基切除,留下一个脱碱基位点;

[0046] (2) 将切除修复反应产物加入到扩增反应缓冲液中,进行酶辅助两步串联信号放大反应,即引发链置换反应和指数扩增反应,循环产生增强的荧光信号,通过荧光信号的强弱测定UDG的活性。

[0047] 为了验证本发明的尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)可在细胞外碱基切除修复的可行性,我们对修复反应产物进行了分析验证,结果如图2所示。首先我们用非变性聚丙烯酰胺凝胶

(PAGE)电泳进行验证。从图2A中可以看出,在没有尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)时(即图中的Control),荧光信号几乎检测不到。而在加入尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)之后(即图中的UDG),荧光信号随着反应时间的延长而逐步增加。从图2B中可看出,在尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)存在时,第一条泳道可看到一条27nt的条带,表明尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)可引发细胞外尿嘧啶的切除修复反应;在第二条泳道里可观察到一条17nt的条带,表明发生了由切除修复引发的切刻内切酶介导的等温指数扩增反应。以上结果证明尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)可以在细胞外特异性识别并切除尿嘧啶,并能引发随后的切刻内切酶介导的等温指数扩增反应。

[0048] 为了评估本方案检测尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的灵敏度,本发明对其进行不同浓度的分析测定,结果如图3所示。为了评估其定量分析能力,我们对尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)的浓度取对数,观察到荧光强度与其浓度对数值在一定浓度范围内呈现出良好的线性关系,且检测限可达 1.0×10^{-7} 摩尔每升。因此本技术方案具有超高的检测灵敏度。

[0049] 为了评估本方案的特异性,本发明选用了另外两种蛋白牛血清白蛋白(BSA)和DNA糖基化酶(hOGG1)作为实验样品,结果如图4所示。从该图可以看出,尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)有显著的荧光信号,而牛血清白蛋白(BSA)、8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶(hOGG1)则和对照组的信号值保持一致。以上结果表明该方法可以很好的区分尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和其它蛋白,证明本发明的技术方案具有很好的特异性。

[0050] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0051] 本发明实施例中所用的试验材料均为本领域常规的试验材料,均可通过商业渠道购买得到。

[0052] 实施例1:

[0053] 细胞裂解缓冲液准备:10毫摩尔每升的三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0),150毫摩尔每升的氯化钠,1%(质量/体积)乙基苯基聚乙二醇(NP-40),0.25毫摩尔每升的脱氧胆酸钠,1%(质量/体积)甘油,0.1毫摩尔每升的4-(2-氨乙基)苯磺酰氟盐酸盐

[0054] 细胞提取物准备:人类子宫颈癌细胞(HeLa)培养基为含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM),放在含有5%二氧化碳,37摄氏度的培养箱中进行培养。待细胞长到对数生长期时,用胰酶将其消化下来,并用pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两遍,然后在4度,1000转每分钟离心5分钟。将细胞悬浮在100微升的裂解缓冲液中,于4摄氏度冰上裂解30分钟,然后在4度,12000转每分钟离心20分钟。最后,将上清液转移至干净的离心管中,并立即进行尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)活性的测定。

[0055] DNA糖基化酶UDG介导的碱基切除修复反应:将2微升(1微摩尔每升)发夹探针底物加入到切除反应缓冲液中,包括不同浓度的尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG),10个单位的核酸外切酶IV和2微升 $10 \times$ NEB缓冲液3,并在37摄氏度下孵育40分钟,以确保切除修复反应完全。

[0056] 切除修复引发的酶辅助两步串联信号放大反应:将2微升切除修复反应产物加入到扩增反应缓冲液中,包括5纳摩尔每升的单链DNA模板,500纳摩尔每升的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs),1个单位的BstDNA聚合酶,5个单位的限制性核酸内切酶(Nt.BstNBI),800纳摩尔信号探针,1.5个单位的核糖核酸酶H(RNase H),2微升 $10 \times$ NEB缓冲液3.1,2微升 $10 \times$ ThermoPol缓冲液和2微升 $10 \times$ 核糖核酸酶H缓冲液。将混合溶液在37摄氏度下孵育70分钟。

(对于以上反应所用到的缓冲液和酶,均购自New England Biolabs(北京,中国))

[0057] 荧光光谱测量:将20微升的反应产物用超纯水稀释至60微升,用荧光分光光度计在室温下进行荧光光谱的测定。

[0058] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 山东师范大学
- [0003] <120> 基于切除修复由酶介导的两步串联信号放大检测UDG活性的方法
- [0004] <130> 2017
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 65
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 发夹探针
- [0011] <400> 1
- [0012] taacactgtc tggtuaatga ataactctac tatctcttga ctcttatctt aaccagacag 60
- [0013] tgtta 65
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 14
- [0016] <212> RNA
- [0017] <213> 信号探针
- [0018] <400> 2
- [0019] auaacucuac uauc 14
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 43
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 指数扩增模板
- [0024] <400> 3
- [0025] tgaataacte tactatctct tgactctgaa taactctact atc 43

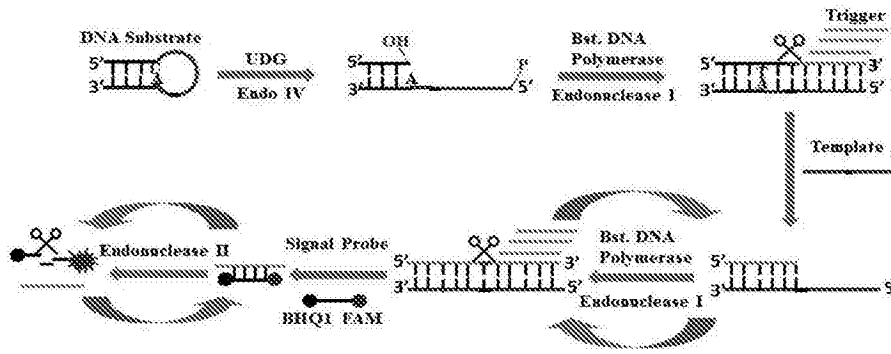


图1

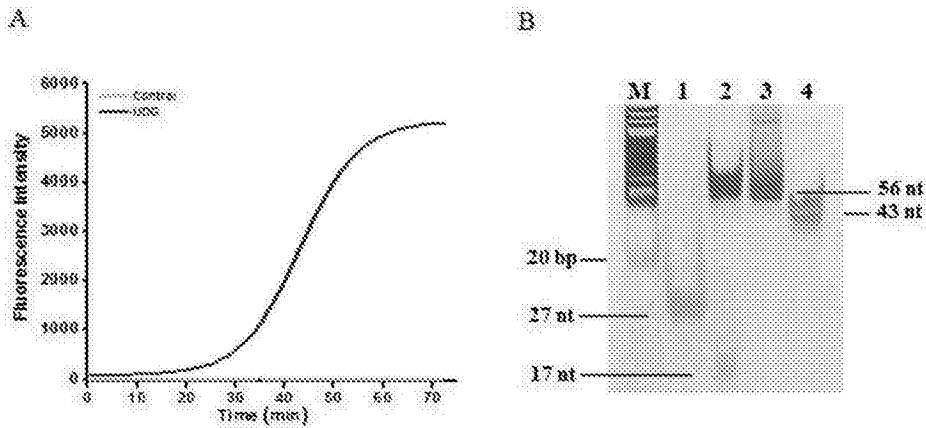


图2

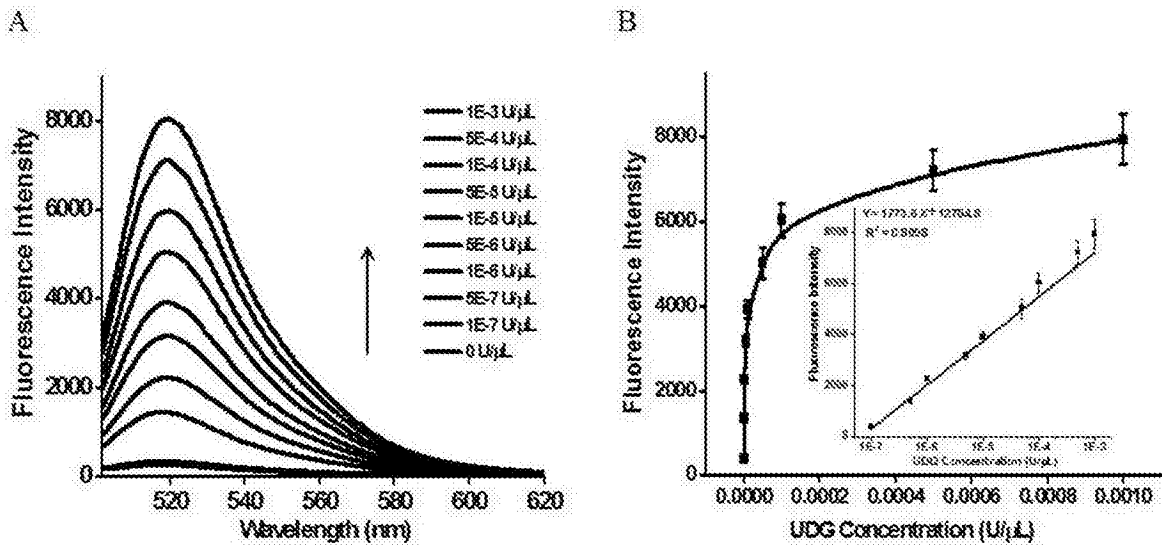


图3

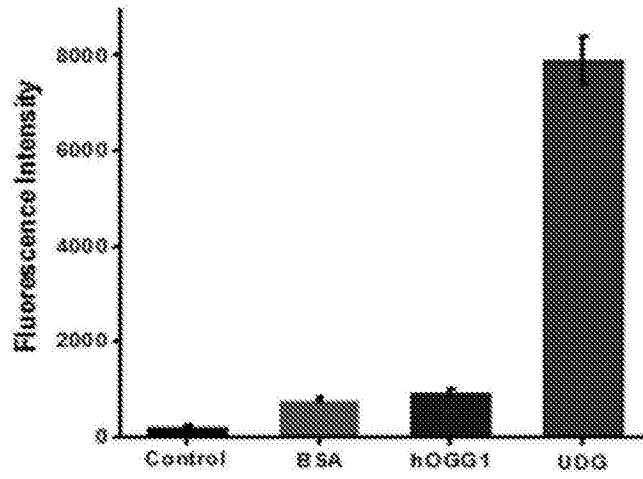


图4