



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113337583 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 202110641186.9

(22) 申请日 2021.06.09

(71) 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区麓山南路麓山门

(72) 发明人 蒋健晖 楚霞 唐昊 唐丽娟

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 李渤 郭广迅

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6844 (2018.01)

权利要求书2页 说明书8页  
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法,所述方法包括以下步骤:(1)根据多重目标核酸制备环介导等温扩增反应所需的混合物;(2)将步骤(1)获得的反应混合物作为分散相,将油相作为连续相,分别注入微流控芯片生成单分散的液滴;(3)将步骤(2)所述的微流控芯片置于恒定温度下进行扩增反应;(4)对步骤(3)所述反应后的微流控芯片中的液滴进行荧光信号检测及分析。本发明的方法不需要复杂的芯片、可控的温控设备等成本较高的设备即可完成对多重目标核酸的数字分析,简化了实验步骤,利用环介导等温扩增的优势缩短了时间,提高了效率。

1. 一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 根据多重目标核酸制备环介导等温扩增反应所需的混合物;

其中所述混合物包括分别针对多重目标核酸设计的引物和探针组,所述引物和探针组中的每组包括2条外引物F3和B3、2条内引物FIP和BIP、环引物和蝎状引物探针;待检测的核酸;

(2) 将步骤(1)获得的反应混合物作为分散相,将油相作为连续相,分别注入微流控芯片生成单分散的液滴;

(3) 将步骤(2)所述的微流控芯片置于恒定温度下进行扩增反应;

(4) 对步骤(3)所述反应后的微流控芯片中的液滴进行荧光信号检测及分析。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述蝎状引物探针的上游区域包含发夹结构,下游区域包含与环引物特异性互补的片段,所述互补的片段长度优选与环引物长度相同;并且,所述蝎状引物探针的5'端碱基上标记荧光基团,与其互补配对的对应碱基上标记淬灭基团。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述引物和探针组中的每组的蝎状引物探针所标记的荧光基团不同;

优选地,所述蝎状引物探针的径区包含7~8个碱基,环区包含7~8个碱基;

优选地,所述荧光基团选自FAM、TAMRA和/或Cy5,淬灭基团选自BHQ1和/或BHQ2。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述反应混合物还包含dNTP和聚合酶,优选为Bst 2.0 WarmStart™聚合酶;

当所述待检测的核酸包含RNA时,所述混合物还包含逆转录酶;优选为AMV逆转录酶;

优选地,所述反应混合物还包含荧光素钠、异硫氰酸荧光素或四乙基罗丹明中的一种或多种,更优选包含荧光素钠;

优选地,所述反应混合物进一步包含一种或多种选自下组的成分: $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、 $H^{+}$ 、 $Cl^{-}$ 、 $SO_4^{2-}$ 、Tris-HCl和细胞表面活性剂;

更优选地,所述反应混合物包含Tris-HCl、KCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $MgSO_4$ 、Triton® X-100。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在步骤(2)中,所述分散相以微小体积单元的形式分散于连续相中;优选地,所述微小体积单元为 $10^{-12}$ ~ $10^{-15}$ L;

优选地,所述油相为氟化油、矿物油、硅油和/或食用油中的一种或其混合;

优选地,所述油包含表面活性剂;

更优选地,所述油相为含Pico-Surf™1表面活性剂的氟化油;

优选地,所述微流控芯片为流动聚焦结构,包括:

油相入口,用于注入连续相;

水相入口,用于注入分散相;以及

出口,用于液滴收集。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,在步骤(3)中,所述反应的温度为60-65℃,优选地为63-64℃。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中,在步骤(4)中,所述检测使用荧光显微镜进行。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸

为RNA和/或DNA;优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸选自两种或多种病毒、细菌、真菌、病原寄生虫的RNA和/或DNA;

优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸选自梅毒螺旋菌、虾白斑综合征病毒和/或猪流行性乙型脑炎病毒的RNA和/或DNA;

优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、禽流感病毒、SARS病毒和新型冠状病毒的两种、三种、四种、五种或六种的RNA和/或DNA;

更优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒的RNA和/或DNA;

更优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为禽流感病毒、SARS病毒和新型冠状病毒的RNA。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述引物和探针组包含如SEQ ID NO:1-12所示的序列中的一条或多条;

优选地,所述引物和探针组包含SEQ ID NO:1-6所示的引物和探针组和/或SEQ ID NO:6-12所示的引物和探针组;

优选地,所述引物和探针组如SEQ ID NO:1-12所示。

10. 一种用于检测多重目标核酸的微滴式数字检测试剂盒,其包含反应混合物,所述反应混合物包含针对多重目标核酸设计的引物和探针组,所述引物和探针组中的每组包括2条外引物F3和B3、2条内引物FIP和BIP、环引物以及蝎状引物探针;

优选地,所述试剂盒还包含:dNTP和聚合酶,优选为Bst 2.0 WarmStart™聚合酶;

当所述待检测的核酸包含RNA时,所述混合物还包含逆转录酶,优选为AMV逆转录酶;

优选地,所述试剂盒还包含荧光素钠、异硫氰酸荧光素或四乙基罗丹明中的一种或多种,更优选包含荧光素钠;

优选地,所述反应混合物进一步包含一种或多种选自下组的成分:Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、H<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Tris-HCl和细胞表面活性剂;更优选地,所述反应混合物包含Tris-HCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、Triton®X-100;

优选地,所述蝎状引物探针的上游区域包含发夹结构,下游区域包含与环引物特异性互补的片段,所述互补的片段长度优选与环引物长度相同;并且,所述蝎状引物探针的5'端碱基上标记荧光基团,与其互补配对的对应碱基上标记淬灭基团;

优选地,所述引物和探针组中的每组的蝎状引物探针标记的荧光基团不同;

优选地,所述蝎状引物探针的径区包含7~8个碱基,环区包含7~8个碱基;

优选地,所述荧光基团选自FAM、TAMRA和/或Cy5,淬灭基团选自BHQ1和/或BHQ2;

优选地,所述试剂盒还包含油相作为连续相。

11. 一种微生物的检测方法,其包括采用如权利要求1至9中任一项所述的方法或如权利要求10中所述的试剂盒检测来自待测微生物的核酸;

其中,所述微生物为两种或多种真菌、细菌、寄生虫和/或病毒。

## 一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,涉及多重目标核酸的微滴式数字检测方法。

### 背景技术

[0002] 近几年来,一系列基因检测方法层出不穷,同时经典的方法也在不断地被改进,由于环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)技术的发展,大大促进了基因检测研究的发展和应用。环介导等温扩增技术是由Notomi等建立的一种新的核酸特异性扩增技术,具有特异性强、灵敏高、操作简单、产物易检测等优点。该技术已被广泛用于分子诊断领域。LAMP针对靶序列的6个特异部位设计4条核心引物,利用具有链置换活性的Bst DNA聚合酶在恒温条件下催化新链合成,从而使靶序列高效扩增。4条核心引物之中2条为内引物,即FIP(ForWard inner primer,FIP)和BIP(Backward inner primer,BIP)。FIP包含F1c和F2(F2c区域的互补序列),即5'-F1c-F2;BIP包含B1c(B1区域的互补序列)和B2,即5'-B1c-B2。其余两条核心引物为外引物为F3和B3。另外的两条环引物(Loop primes,LF和LB)被增加到反应体系中加速LAMP反应。环介导等温扩增反应只需要把基因模板、引物、链置换型DNA聚合酶、dNTP等共同置于一定温度下(60-65℃)、经一个步骤即可完成。反应扩增效率极高,可在15-60min内实现 $10^9$ - $10^{10}$ 倍的扩增,加之其具有较高的灵敏度与专一性,非常适合应用于各种核酸检测。

[0003] LAMP扩增之后,其产物的检测可以通过琼脂糖电泳后染色观察。较为简便的方法是直接在产物中加入SYBR Green I染色,呈现绿色为阳性反应,橙红色为阴性反应。也可以通过扩增副产物焦磷酸镁沉淀的浊度进行判断,液体浑浊,离心或有白色沉淀的为阳性反应,无此现象的则为阴性反应。现在更为简单的方法是在反应混合物中加入可视染料,阳性反应管的颜色从浅灰色变为绿色,阴性反应管则保持原来的浅灰色。然而,这些方法都只能检测LAMP反应是否进行,不能识别针对特定靶序列的特异性扩增,导致LAMP在检测目的序列时,其结果的判定缺乏特异性。因此,传统LAMP检测很难实现对多重目的片段的检测,这极大限制了LAMP的广泛应用。

[0004] 鉴于上述问题,一些研究致力于发展多重LAMP检测技术。实现多重LAMP检测最常见的方法是在靶序列中寻找限制性内切酶酶切位点,将LAMP产物运用限制性内切酶消化,通过电泳消化后的LAMP产物,根据不同的电泳条带大小与相应的靶序列对应。然而,该方法需要两步完成,限制性内切酶酶切片段大小各异的LAMP产物时,耗时较长且酶切不完全,导致一条靶序列常常对应了几条电泳条带,使得多重LAMP的结果难判断。另一种实现多重LAMP检测的新技术是将LAMP扩增反应和焦磷酸测序结合。然而,该方法与限制性内切酶介导的多重LAMP检测技术一样,都需要两步完成,首先是LAMP扩增,然后通过焦磷酸测序对应到相应的靶序列。该方法操作繁琐,需要特定的试剂盒对LAMP产物进行纯化,测序过程需要特殊人员,以及普通实验室无法负担的测序仪和测序试剂。这些劣势限制了该方法的推广使用。

[0005] 微流控在核酸研究中的一个重要应用是液滴PCR技术,通过微流控芯片产生皮升-

纳升级别的液滴,这些液滴为一个个小而独立的反应室,在这些均匀的液滴中进行PCR,利用荧光探针法对目标DNA进行定量分析。该技术可将样品稀释到单分子水平,并平均分配到几十至几万个单元中进行反应,最后通过直接计数或泊松分布公式计算得到样品的原始浓度或含量。

[0006] 然而,由于PCR反应在乳液中的扩增效率不高,导致目前液滴PCR技术的荧光标记后信号放大效果有限,通常需要对信号进行二次放大等步骤,需要使用更为精密的仪器以及较昂贵的控温设备,这在一定程度上制约了其在核酸数字定量上的发展。此外,现存的多重LAMP检测技术都无法实现快速检测,完成多重LAMP检测耗时大于2.5小时。由于LAMP反应的灵敏度极高,实行LAMP产物的开盖操作对以后的LAMP实验存在极大的污染。

[0007] 综上,现有技术中的LAMP不论在单一扩增还是多重扩增的检测上都存在着难以克服的技术问题。基于此,当前对能同时检测多重目标核酸的环介导等温扩增方法存在需求。

## 发明内容

[0008] 因此,本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法。本发明通过微滴式数字检测方法在单个液滴中进行环介导等温扩增目标核酸。本发明的方法与现有技术的液滴数字PCR相比,有更高的核酸扩增效率和信号放大效果,而且核酸样本无需预先进行PCR扩增,在扩增反应后可以直接用显微镜进行计数分析。本发明的方法对目标核酸没有依赖性,只要进行配套的引物设计即可开展目标核酸的数字分析。另外,相比于传统的单碱基突变检测,本发明的方法不仅费用低,而且操作简单,可以实现多重核酸的定量分析。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的。

[0010] 一方面,本发明提供了一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] (1) 根据多重目标核酸制备环介导等温扩增反应所需的混合物;

[0012] 其中所述混合物包括分别针对多重目标核酸设计的引物和探针组,所述引物和探针组中的每组包括2条外引物F3和B3、2条内引物FIP和BIP、环引物和蝎状引物探针;待检测的核酸;

[0013] (2) 将步骤(1)获得的反应混合物作为分散相,将油相作为连续相,分别注入微流控芯片生成单分散的液滴;

[0014] (3) 将步骤(2)所述的微流控芯片置于恒定温度下进行扩增反应;

[0015] (4) 对步骤(3)所述反应后的微流控芯片中的液滴进行荧光信号检测及分析。

[0016] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述蝎状引物探针的上游区域包含发夹结构,下游区域包含与环引物特异性互补的片段,所述互补的片段长度优选与环引物长度相同;并且,所述蝎状引物探针的5'端碱基上标记荧光基团,与其互补配对的对应碱基上标记淬灭基团。

[0017] 优选地,所述引物和探针组中的每组的蝎状引物探针所标记的荧光基团不同;

[0018] 优选地,所述蝎状引物探针的径区包含7~8个碱基,环区包含7~8个碱基;

[0019] 优选地,所述荧光基团选自FAM、TAMRA和/或Cy5,淬灭基团选自BHQ1和/或BHQ2。

[0020] 根据不同的目标序列,设计不同的环引物,以及不同的蝎状引物探针,标记不同的

荧光基团,即可实现多重目标的检测。其中,针对不同的目标的蝎状引物探针的荧光基团和淬灭基团必须不同。

[0021] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述反应混合物还包含dNTP和聚合酶,优选为Bst 2.0WarmStart™聚合酶;

[0022] 当所述待检测的核酸包含RNA时,还包含逆转录酶;优选为AMV逆转录酶;

[0023] 优选地,所述反应混合物还包含荧光素钠、异硫氰酸荧光素或四乙基罗丹明中的一种或多种,更优选包含荧光素钠;

[0024] 优选地,所述反应混合物进一步包含一种或多种选自下组的成分: $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $H^+$ 、 $Cl^-$ 、 $SO_4^{2-}$ 、Tris-HCl和细胞表面活性剂;

[0025] 更优选地,所述反应混合物包含Tris-HCl、KCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $MgSO_4$ 和Triton®X-100。

[0026] 在一个优选的实施例中,用于检测两种目标核酸的试剂包括:

[0027] 两种目标核酸分别对应的外引物F3、B3,内引物FIP、BIP,环引物LF,蝎状引物探针SP,10×Thermopol缓冲溶液(200mM Tris-HCl,100mM  $(NH_4)_2SO_4$ ,100mM KCl,20mM  $MgSO_4$ ,1% Triton®X-100,pH 8.8),两种目标核酸, $MgSO_4$ ,dNTP,AMV逆转录酶,Bst 2.0WarmStart™聚合酶;荧光素钠。

[0028] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤(2)中,所述分散相以微小体积单元的形式分散于连续相中;优选地,所述微小体积单元为 $10^{-12} \sim 10^{-15}L$ ;

[0029] 优选地,所述油相为氟化油、矿物油、硅油和/或食用油中的一种或其混合;

[0030] 优选地,所述油包含表面活性剂;

[0031] 更优选地,所述油相为含Pico-Surf™1表面活性剂的氟化油;

[0032] 优选地,所述微流控芯片为流动聚焦结构,包括:

[0033] 油相入口,用于注入连续相;

[0034] 水相入口,用于注入分散相;以及

[0035] 出口,用于液滴收集。

[0036] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤(3)中,所述反应的温度为60-65℃,优选地为63-64℃。

[0037] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤(4)中,所述检测使用荧光显微镜进行。

[0038] 根据本发明所述的方法,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为RNA和/或DNA;优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸选自两种或多种病毒、细菌、真菌、病原寄生虫的RNA和/或DNA;

[0039] 优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸选自梅毒螺旋菌、虾白斑综合征病毒和/或猪流行性乙型脑炎病毒的RNA和/或DNA;

[0040] 优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、禽流感病毒、SARS病毒和新型冠状病毒的两种、三种、四种、五种或六种的RNA和/或DNA;

[0041] 更优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)的RNA和/或DNA;

[0042] 更优选地,所述多重目标核酸和/或待检测的核酸为禽流感病毒、SARS病毒和新型冠状病毒的RNA。

[0043] 在一个具体的实施方案中,所述引物和探针组包含如SEQ ID NO:1-12所示的序列中的一条或多条;

[0044] 优选地,所述引物和探针组包含SEQ ID NO:1-6所示的引物和探针组和/或SEQ ID NO:6-12所示的引物和探针组;

[0045] 更优选地,所述引物和探针组如SEQ ID NO:1-12所示。

[0046] 另一方面,本发明还提供了一种用于检测多重目标核酸的微滴式数字检测试剂盒,其包含反应混合物,所述反应混合物包含针对多重目标核酸设计的引物和探针组,所述引物和探针组中的每组包括2条外引物F3和B3、2条内引物FIP和BIP、环引物以及蝎状引物探针;

[0047] 优选地,所述试剂盒还包含:dNTP和聚合酶,优选为Bst 2.0WarmStart™聚合酶;

[0048] 当所述待检测的核酸包含RNA时,所述混合物还包含逆转录酶,优选为AMV逆转录酶;

[0049] 优选地,所述试剂盒还包含荧光素钠、异硫氰酸荧光素或四乙基罗丹明中的一种或多种,更优选包含荧光素钠;

[0050] 优选地,所述反应混合物进一步包含一种或多种选自下组的成分: $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、 $H^{+}$ 、 $Cl^{-}$ 、 $SO_4^{2-}$ 、Tris-HCl和细胞表面活性剂;更优选地,所述反应混合物包含Tris-HCl、KCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $MgSO_4$ 、Triton®X-100;

[0051] 优选地,所述蝎状引物探针的上游区域包含发夹结构,下游区域包含与环引物特异性互补的片段,所述互补的片段长度优选与环引物长度相同;并且,所述蝎状引物探针的5'端碱基上标记荧光基团,与其互补配对的对应碱基上标记淬灭基团;

[0052] 优选地,所述引物和探针组中的每组的蝎状引物探针标记的荧光基团不同;

[0053] 优选地,所述蝎状引物探针的径区包含7~8个碱基,环区包含7~8个碱基;

[0054] 优选地,所述荧光基团选自FAM、TAMRA和/或Cy5,淬灭基团选自BHQ1和/或BHQ2。

[0055] 优选地,所述试剂盒还包含油相作为连续相。

[0056] 本发明还提供了一种微生物的检测方法,其包括采用所述的方法或所述的试剂盒检测来自待测微生物的核酸;

[0057] 其中,所述微生物为两种或多种真菌、细菌、寄生虫和/或病毒。

[0058] 结合说明书附图1,根据本发明所述的多重目标核酸的微滴式数字检测方法的反应机制简述如下:

[0059] 在环介导等温扩增反应中,除了反应所需的2条外引物、2条内引物、1条环引物,再添加一条蝎状引物探针。所述蝎状引物探针的上游区域是一个普通的发夹结构,径区7个碱基,环区8个碱基,在其5'端碱基处标上荧光基团,其互补配对的对应碱基标上淬灭基团,下游区域是与目标的环引物特异性互补,序列长度与环引物相同。

[0060] 反应第一阶段是哑铃状链的形成。双链DNA模板在等温64℃的条件下,首先由内引物FIP的F2区域,特异性识别模板F2c区域,在DNA聚合酶作用下形成一条新的双链DNA,此时外引物F3通过与新合成双链DNA的F3c区域互补配对,置换FIP合成的新链的同时形成自身DNA双链。被置换出的FIP新链5'端具有F1c和F1的互补区域,可自身形成环状结构。同理,另一条内引物BIP此时能与上述环状单链杂交,环状结构被打开合成互补链。在外引物B3的作用下,形成新的双链DNA。反应的第二个阶段为循环扩增阶段。哑铃状结构以自身为模板,在

内引物的作用下自我引导合成DNA链。FIP引物F2与F2c杂交,形成新的DNA链,而B1与B1c能互补结合再次形成环状结构,置换出之前的互补链。同理,BIP引物的B2与B2c互补结合,形成新的DNA链,置换出先前合成的DNA链,新链中的F1与F1c互补结合形成环状结构,如此不断的重复扩增,最终的产物是一些具有不同茎长度茎环结构的DNA和带有许多环的类似花椰菜结构的DNA的混合物。

[0061] 反应中的环引物也是通过茎环结构杂交,启动链置换DNA的合成,其结合区域分别位于F1和F2间以及B1和B2间。环引物的加入,不但对原来内引物的结合没有影响,而且可以结合内引物无法结合的其他环结构并引发链置换DNA合成,因此保证了扩增反应中所有形成的环状单链结构都有相应的引物与之结合,引发DNA合成,从而大大提高LAMP反应速度。

[0062] 在上述反应机制的基础上,本发明的技术方案以微流控芯片为平台,生成油包水的单个液滴,将生成的液滴收集在玻璃芯片储液槽,以每个液滴为反应室。当每个液滴存在目标链时,发生环介导等温扩增反应,反应过程中生成大量的哑铃式单链结构,蝎状引物探针与其杂交进行聚合延伸,打开发夹结构,发生荧光能量共振转移,使其荧光恢复,在显微镜下观察每个液滴的荧光强度和计数亮的液滴个数,对目标DNA实现数字核酸分析的目的。在本发明中,LAMP反应液中含有荧光素钠,用488nm激光激发,产生强烈的绿色荧光信号,因此,用该反应液去制备液滴,每个液滴在显微镜下观察都会有绿色荧光信号。本发明同时检测HCV和HIV两种目标核酸分子,反应液中同时含有HCV和HIV的扩增引物,检测HCV的蝎状引物探针标记TAMRA,检测HIV的蝎状引物探针标记Cy5,当液滴中存在HCV分子时,会有黄色荧光信号,当液滴中存在HIV分子时,会有红色荧光信号。由于产生的液滴个数远远大于目标分子个数,因此,根据泊松分布,每个液滴至多含有一个目标分子,实现了单分子的扩增和检测。在显微镜平台下,通过计数绿色液滴的个数,可以知道反应液滴的总个数,计数黄色液滴个数,统计出HCV分子个数,计数红色液滴个数,统计出HIV分子个数。通过该方法和平台,达到了LAMP反应同时检测多重目标核酸分子的目的。该方法的建立为多种疾病诊断提供了一种简单、快速以及高灵敏度的核酸数字分析手段。。

[0063] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0064] 1. 本发明提供的方法不需要复杂可控的温控设备即可完成对核酸的定量分析,实验步骤简单,利用环介导等温扩增的优势缩短反应时间、提高反应效率、重复性高、通用性好、有利于高通量应用,为基因诊断和治疗等研究提供了一种高灵敏性、检测简便性、省时性的核酸分析方法。

[0065] 2. 本发明提供的方法对目标核酸序列没有依赖性,针对每种目标核酸,选择合适的扩增区域,进行配套的引物设计即可开展目标核酸的检测分析。

[0066] 3. 该方法不需要复杂的芯片、可控的温控设备等成本较高的设备即可完成对多重目标核酸的数字分析,简化了实验步骤,利用环介导等温扩增的优势缩短了时间、提高了效率,为传染性疾病预防研究提供了一种操作简单、适用性广、灵敏度高的多重目标核酸数字分析手段。

## 附图说明

[0067] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0068] 图1为根据本发明的一个实施方案所述的微滴式数字检测方法的反应原理图;其

中,在微流控液滴中发生多重LAMP单分子扩增,芯片储液槽的绿色液滴为微流控芯片生成的液滴,黄色液滴为含有HCV目标分子发生LAMP扩增产生的荧光信号,红色液滴为含有HIV目标分子发生LAMP扩增产生的荧光信号;

[0069] 图2为根据本发明的一个实施方案所述的微滴式数字检测方法的芯片生成液滴的显微镜成像图,由图2可见,该方法生成的液滴直径在约为50 $\mu\text{m}$ 左右;

[0070] 图3为根据本发明的一个实施方案所述的微滴式数字检测方法中,LAMP反应后液滴的显微镜成像图,由图3可见,图中绿色液滴为阴性液滴,说明该液滴未发生环介导等温扩增反应,不含有目标核酸链,没有蝎状引物探针与单链哑铃结构杂交进行聚合延伸的阴性液滴,黄色液滴为含有HCV目标分子的阳性液滴,红色液滴为含有HIV目标分子的阳性液滴,说明该液滴发生了环介导等温扩增反应,存在目标核酸链,有蝎状引物探针与单链哑铃结构杂交进行聚合延伸的阳性液滴;

[0071] 图4为本发明实施例所述的LAMP反应实时荧光曲线;

[0072] 图5为本发明实施例所述的凝胶电泳图。

### 具体实施方式

[0073] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0074] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0075] 实施例1根据本发明的方法检测HCV和HIV

[0076] (1) 引物设计:针对HCV和HIV基因设计环介导等温扩增(LAMP)引物。引物序列见表1:

[0077] 表1:引物序列表

名称	SEQ ID NO	序列 (5'-3')
HCV-F3	1	TGGTCTGCGGAACCGG
HCV-B3	2	GGGGCACTCGCAAGCA
HCV-FIP	3	ACGCCCAAATCTCCAGGCATTGCATTGCCAGGACGACCGG
HCV-BIP	4	CCGCGAGACTGCTAGCCGACCCTATCAGGCAGTA
HCV-LF	5	AGCGGGTTGATCCAAGAAAGGAC
HCV-SP	6	TAMRA-AGCGCGGATATCTCACCGCGCT(BHQ2)TGTTGGGTTCGC GAAAGGCC
HIV-F3	7	CCTATTTGTTTCCTGAAGGGT
HIV-B3	8	ATTATCAGAAGGAGCCACC
HIV-FIP	9	GAGTGCATCCAGTGCATGCACTGCTATGTCACCTCCCCT
HIV-BIP	10	CCATTCTGCAGCTTCCTCATTGAACACCATGCTAAACACAGT
HIV-LF	11	CAGGCCAGATGAGAGAACCA
HIV-SP	12	Cy5-AGCGCGGATATCTCACCGCGCT(BHQ2)ATGGCTGCTTGATGT

[0079]		CCCC
--------	--	------

[0080] CV、HIV的cDNA序列如下：

[0081] HCV目标基因碱基序列SEQ ID NO:13

[0082] GTTTAGGATTTCGTGCTCATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCCCGGGGCACTCGCAAGCACCTATCAGG  
CAGTACCACAAGGCCTTTCGCGACCCAACACTACTCGGCTAGCAGTCTCGCGGGGACGCCAAATCTCCAGGCAT  
TGAGCGGGTTGATCCAAGAAAGACCCGGTCTGCTGGCAATCCGGTGTACTACCGGTTCCGCAGACCACTATGG  
CTCTCCCGGGAGGGGGGCTCTGGAGGCTGCACGACTCATACTAACGCCATGGCTAGACGCTTTCTGCGTGAAGA  
CAGTAGTTCCTCACAGGGGAGTGATTCATGGTGGAGTGTGCCCCCATCAGGGGGCTGGC

[0083] HIV目标基因碱基序列SEQ ID NO 14

[0084] ATTTTATTTAATCCCAGGATTATCCATCTTTTATAAATTTCTCCTACTGGGATAGGTGGATTATTTGTC  
ATCCATCCTATTTGTTTCTGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTCCCCTTGGTTCTCTCATCTGGCCTGG  
TGCAATAGGCCCTGCATGCACTGGATGCACTCTATCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTTTTAACATTT  
GCATGGCTGCTTGATGTCCCCCACTGTGTTTAGCATGGTGTAAATCTTGTGGGGTGGCTCCTTCTGATAATGCT  
GAAAACATGGGTATCACTTCTGGGCTGAAAGCCTTCTCTTCTACTACTTTTACCCATGCATTTAAAGTTCTAGGTGA  
TATGGCCTGATGTACCA

[0085] (2) LAMP反应液制备：外引物HCV-F3 (5 $\mu$ M)、HIV-F3 (5 $\mu$ M)、HCV-B3 (5 $\mu$ M)、HIV-B3 (5 $\mu$ M) 各8 $\mu$ L,内引物HCV-FIP (40 $\mu$ M)、HCV-BIP (40 $\mu$ M)、HIV-FIP (40 $\mu$ M)、HIV-BIP (40 $\mu$ M) 各8 $\mu$ L,环引物HCV-LF (10 $\mu$ M)、HIV-LF (10 $\mu$ M) 各8 $\mu$ L,蝎状引物HCV-SP (10 $\mu$ M)、HIV-SP (10 $\mu$ M) 各8 $\mu$ L,10X Thermopol缓冲溶液 (200mM Tris-HCl,100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,100mM KCl,20mM MgSO<sub>4</sub>,1% Triton® X-100,pH 8.8) 20 $\mu$ L,MgSO<sub>4</sub> (10mM) 8 $\mu$ L,dNTP (10mM) 32 $\mu$ L,Bst 2.0WarmStart™聚合酶8 $\mu$ L,荧光素钠20 $\mu$ M 5 $\mu$ L混合均匀,加灭菌超纯水至100 $\mu$ L;

[0086] (3) 油相制备：配置10mL含1% Pico-Surf™1表面活性剂的氟化油Novec-7500,备用;

[0087] (4) 液滴制备：用Dolomite购买的2Reagent Droplet Chip去制备液滴,水相1为100 $\mu$ L LAMP反应液,水相2为100 $\mu$ L目标核酸,2个油相为200 $\mu$ L,水相和油相的流速分别为3 $\mu$ L/min、10 $\mu$ L/min,出口接玻璃芯片储液槽,收集生成的液滴,收集3min;

[0088] (5) LAMP反应：将玻璃芯片储液槽放入恒温水浴锅中,在64 $^{\circ}$ C下反应1小时;

[0089] (6) 显微镜检测：调整荧光显微镜参数,同时打开488、560、640激光通道,在显微镜下看到的绿色液滴为总液滴个数,黄色液滴个数为HCV阳性液滴,红色液滴个数为HIV阳性液滴,且得到阳性液滴的数量与目标核酸的加入量成正比;

[0090] (7) 实时荧光定量分析

[0091] 反应液配置：外引物HCV-F3 (5 $\mu$ M)、HIV-F3 (5 $\mu$ M)、HCV-B3 (5 $\mu$ M)、HIV-B3 (5 $\mu$ M) 各1 $\mu$ L,内引物HCV-FIP (40 $\mu$ M)、HCV-BIP (40 $\mu$ M)、HIV-FIP (40 $\mu$ M)、HIV-BIP (40 $\mu$ M) 各1 $\mu$ L,环引物HCV-LF (10 $\mu$ M)、HIV-LF (10 $\mu$ M) 各1 $\mu$ L,蝎状引物HCV-SP (10 $\mu$ M)、HIV-SP (10 $\mu$ M) 各1 $\mu$ L,10X Thermopol缓冲溶液 (200mM Tris-HCl,100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,100mM KCl,20mM MgSO<sub>4</sub>,1% Triton® X-100,pH 8.8) 2.5 $\mu$ L,目标核酸,MgSO<sub>4</sub> (10mM) 1 $\mu$ L,dNTP (10mM) 4 $\mu$ L,Bst 2.0WarmStart™聚合酶1 $\mu$ L,加灭菌超纯水至25 $\mu$ L。反应温度为64 $^{\circ}$ C,所用仪器为C1000Thermal Cycler (Bio-Rad,Hercules,CA,MSA) 包括一个CFX96原位检测系统。实时监

测荧光选择FAM、ROX、Cy5通道,每间隔30s读取一次荧光值,具体结果见附图4:曲线a表示未加入目标,曲线b表示加入HCV目标,曲线c表示加入HIV目标。

#### [0092] (8) 凝胶电泳分析

[0093] 对LAMP反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。制胶和电泳过程均在室温下进行,电泳分析使用1.5%的琼脂糖和0.5×TBE缓冲液(45mM Tris,45mM Boric Acid,10mM EDTA,pH 8.0),用0.5μg/mL GoldView和0.5μg/mL溴化乙锭进行染色,向上述样品中加入10μL样品混合液,样品混合液在100V电压下电泳90分钟,电泳结束后,用Tanon 4200SF凝胶成像系统(上海天能科技有限公司,中国)观察条带并拍照,具体结果见附图5:从左到右依次为:DNA marker条带;有HCV引物和HIV模板的LAMP扩增产物条带;有HCV引物和HCV模板的LAMP扩增产物条带;有HIV引物和HCV模板的LAMP扩增产物条带;有HIV引物和HIV模板的LAMP扩增产物条带;有HCV引物和HIV引物的LAMP扩增产物条带;有HCV引物、HIV引物和HCV模板的LAMP扩增产物条带;有HCV引物、HIV引物和HIV模板的LAMP扩增产物条带;有HCV引物、HIV引物、HCV模板和HIV模板的LAMP扩增产物条带。由电泳结果图表明,只有存在对应的目标引物和目标模板,才会发生LAMP反应,且另外一种目标的存在不会对多重LAMP产生干扰,证明了该反应的特异性。

[0094] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

## 序列表

- <110> 湖南大学  
<120> 一种多重目标核酸的微滴式数字检测方法  
<130> DIC20110097  
<160> 14  
<170> SIPOSequenceListing 1.0  
<210> 1  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 1  
tggctctgcgg aaccgg 16  
<210> 2  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 2  
ggggcactcg caagca 16  
<210> 3  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 3  
acgccc aaat ctccaggcat tgcat tggca ggacgaccgg 40  
<210> 4  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 4  
ccgcgagact gctagccgac cctatcaggc agta 34  
<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 5  
agcgggttga tccaagaaag gac 23  
<210> 6  
<211> 41

<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<220>  
<221> misc\_binding  
<222> (1) .. (1)  
<223> 标记荧光基团TAMRA  
<220>  
<221> misc\_binding  
<222> (22) .. (22)  
<223> 标记淬灭基团BHQ2  
<400> 6  
agcgcggata tctcaccgcg cttggtgggt cgcgaaaggc c 41  
<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 7  
cctatttggt cctgaagggt 20  
<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 8  
attatcagaa ggagccacc 19  
<210> 9  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 9  
gagtgcattcc agtgcattgca ctgctatgtc acttcccct 39  
<210> 10  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 10  
ccattctgca gcttcctcat tgaacacat gctaaacaca gt 42  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 11  
 caggccagat gagagaacca 20  
 <210> 12  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> 标记荧光基团Cy5  
 <220>  
 <221> misc\_binding  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> 标记淬灭基团BHQ2  
 <400> 12  
 agcgcggata tctcaccgcg ctatggctgc ttgatgtccc c 41  
 <210> 13  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis C virus  
 <400> 13  
 gtttaggatt cgtgctcatg gtgcacggtc tacgagacct cccggggcac tcgcaagcac 60  
 cctatcaggc agtaccacaa ggcctttcgc gaccaacac tactcggcta gcagtctcgc 120  
 gggggcacgc ccaaactctc aggcattgag cgggttgatc caagaaagga cccggtcgtc 180  
 ctggcaattc cgggtgtactc accggttccg cagaccacta tggctctccc gggagggggg 240  
 gtccctggagg ctgcacgaca ctcatactaa cgccatggct agacgctttc tgcgtgaaga 300  
 cagtagttcc tcacagggga gtgattcatg gtggagtgtc gccccatca gggggctggc 360  
 <210> 14  
 <211> 394  
 <212> DNA  
 <213> Human immunodeficiency virus  
 <400> 14  
 attttattta atcccaggat tatccatett ttataaattt ctctactgg gataggtgga 60  
 ttatttgtea tccatcctat ttgttctga agggactag tagttctgc tatgtcactt 120  
 ccccttggtt ctctcatctg gcctgggtgca ataggecctg catgcactgg atgcacteta 180  
 tcccattctg cagcttcctc attgatggtc tcttttaaca tttgcatggc tgcttgatgt 240  
 cccccactg tgtttagcat ggtgtttaa tcttgtgggg tggctccttc tgataatgct 300  
 gaaaacatgg gtatcacttc tgggctgaaa gccttctctt ctactacttt tacccatgca 360

tttaaagttc taggtgatat ggcctgatgt acca 394

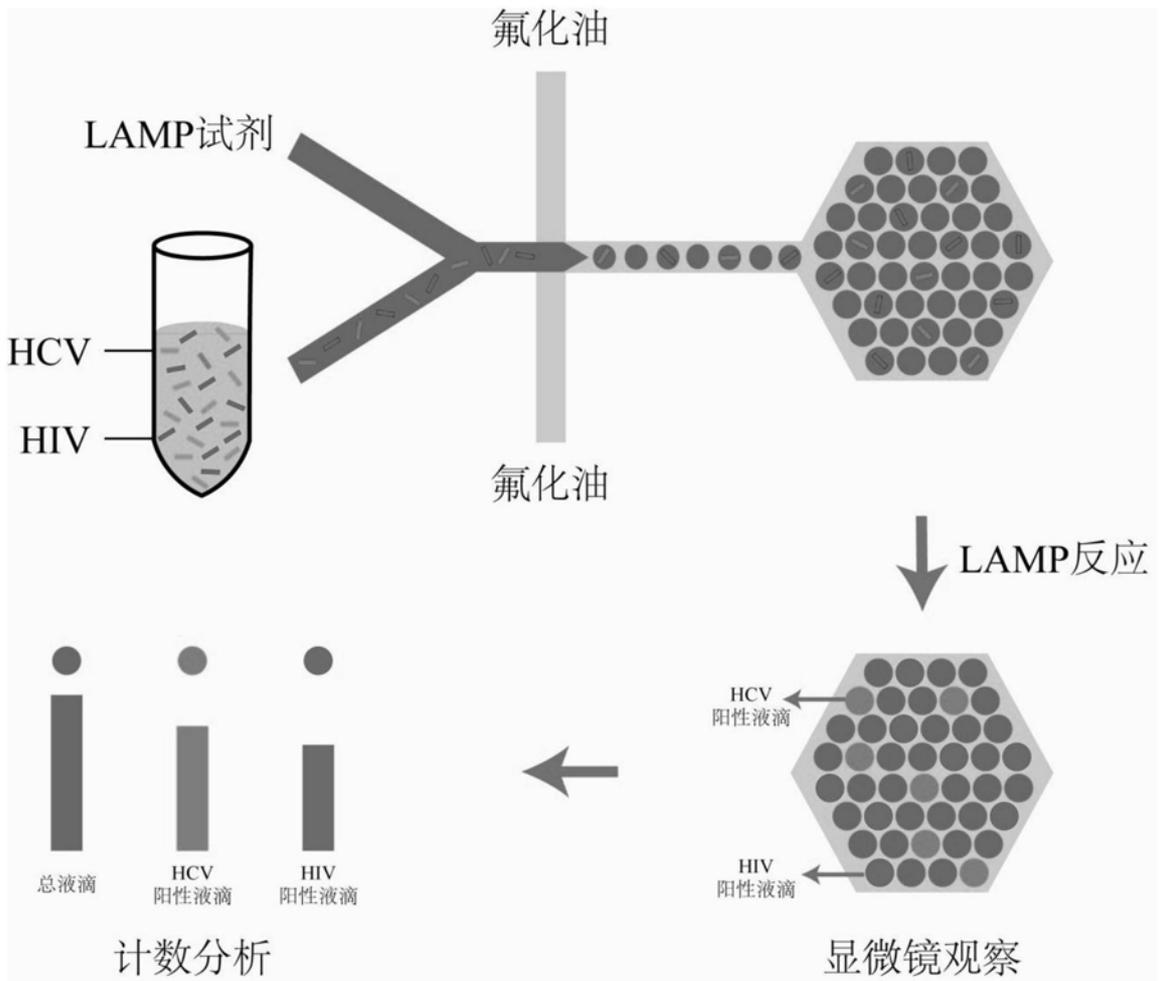


图1

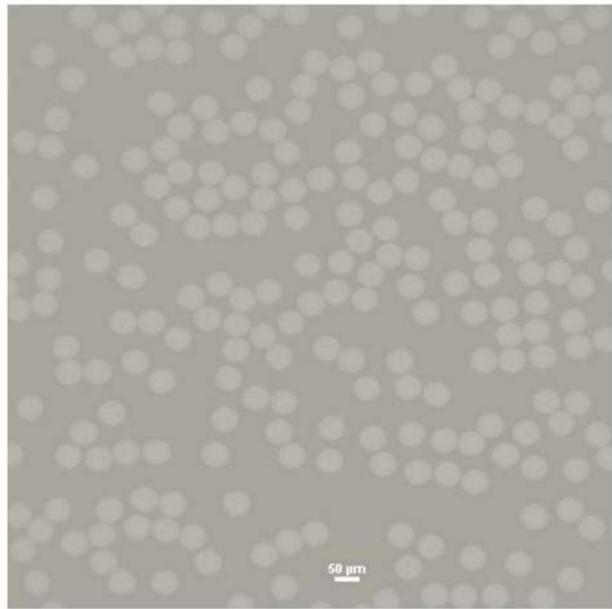


图2

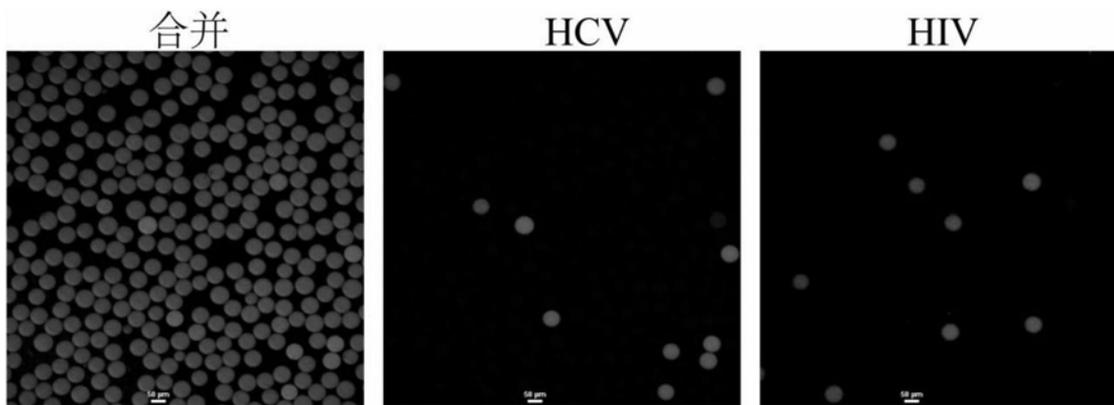


图3

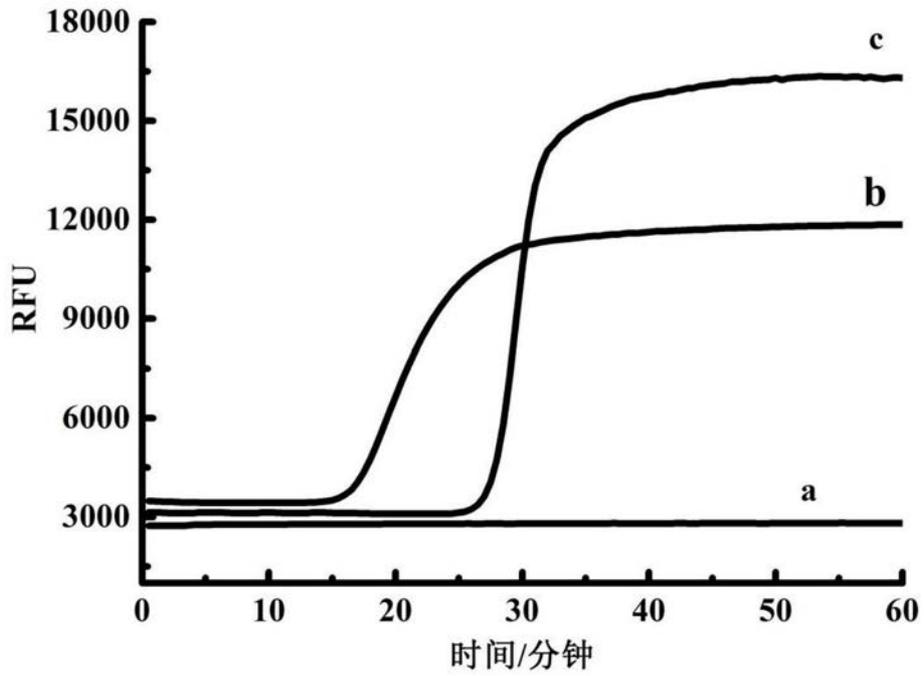


图4

<b>HCV引物</b>	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>HIV引物</b>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>HCV模板</b>	-	+	+	-	-	+	-	+
<b>HIV模板</b>	+	-	-	+	-	-	+	+

**5000 bp**  
**500 bp**  
**250 bp**  
**100 bp**

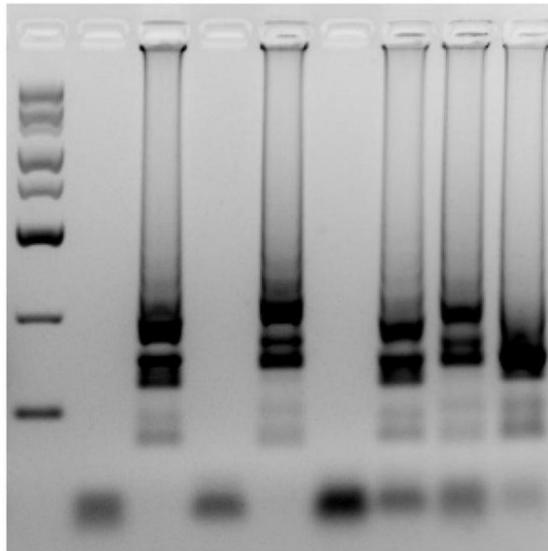


图5