



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113249449 B

(45) 授权公告日 2021.10.12

(21) 申请号 202110718435.X

审查员 吕健

(22) 申请日 2021.06.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113249449 A

(43) 申请公布日 2021.08.13

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 许文涛 朱龙佼 肖星凝 黄昆仑

杜再慧 贺晓云 李相阳 宋锐豪

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 11690

代理人 张丹

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6851 (2018.01)

权利要求书2页 说明书7页

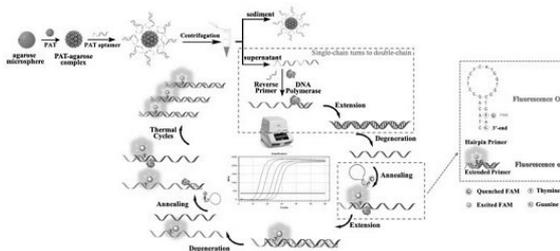
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法。以展青霉素PAT为例,采用单一荧光基团标记,基于配体-受体相互作用来测定PAT与截短核酸适配体之间的亲和常数Kd。本发明首次构建了基于延伸发光引物的实时定量PCR方法并应用于Kd值的检测,利用引物核酸构型的变化实现荧光信号的放大。本发明与已公布的Kd值测量方法比较结果证实本方法测得Kd值的有效性。依托本方法测定,本发明简单归纳出PAT适配体冗余序列截短导致的解离常数Kd值的变化规律。本发明极大地降低了普通Kd值测定方法的成本费用,并且易操作,可行性强,为适配体Kd值的测量提供了一个新的方法。



1. 一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 运用PAT-琼脂糖微球复合物对不同浓度的PAT核酸适配体结合孵育,进行配体-受体相互反应的检测实验;

(2) 运用延伸发光引物,以孵育上清液中未结合适配体作为实时定量PCR的模板,并根据Ct值及标曲测定未结合适配体的浓度;

(3) 运用Scatchard方程式,利用上述测定的未结合适配体浓度计算得到适配体的解离常数Kd值;

所述PAT核酸适配体包括:

78-mer: 5'-CCTTCTCATGGTGGCTGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAATGTGGTTGGTGTGGACACGGTGGCTTAGT-3',如SEQ ID NO.5所示;

PCR-54-mer: 5'-CGGGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAATGTGGTTGGTGTGGACACGGTTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3',如SEQ ID NO.6所示;

PCR-34-mer: 5'-CGGGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAATTGCATATGGGCAAAGTTTCGTG-3',如SEQ ID NO.7所示;

PCR-22-mer: 5'-CGGGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3',如SEQ ID NO.8所示;

PCR-22-mer-M1: 5'-CGGGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTACTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3',如SEQ ID NO.9所示;

PCR-22-mer-M2: 5'-CGGGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGGATTAAACGGCGCTCATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3',如SEQ ID NO.10所示;

所述延伸发光引物包括:

Forward Primer-1: 5'-CTACAGTCCTTCTCATGGTGGCTGTAG-3',如SEQ ID NO.1所示;

Reverse Primer-1: 5'-ACTAAGCCACCGTGTCCA-3',如SEQ ID NO.2所示;

Forward Primer-2: 5'-CACTGGTCGGGTGTGTAAGTTCAGTG-3',如SEQ ID NO.3所示;

Reverse Primer-2: 5'-CACGAACTTGGCCATAGCA-3',如SEQ ID NO.4所示;

所述Scatchard方程式的计算方法为:

模型	因变量 (Y)	自变量 (X)	回归方程
B vs L	B	L	$B = (L + A + K_d - \sqrt{(L + A + K_d)^2 - 4AL}) / 2$
双倒数作图法	1/B	1/F	$\frac{1}{B} = \frac{1}{A} + \frac{K_d}{A} \times \frac{1}{F}$

其中,B和F分别代表结合配体和游离配体的浓度,Kd为解离常数,A代表结合位点的浓度,L代表配体总数。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中延伸发光引物进行实时定量PCR的20 $\mu$ L反应体系包括:0.8 $\mu$ L 10  $\mu$ M Forward Primer、0.8 $\mu$ L 10  $\mu$ M Forward Primer、2  $\mu$ L 10 mM dNTPs、0.4  $\mu$ L 5 U/ $\mu$ L rTaq、2  $\mu$ L buffer-Mg<sup>2+</sup> plus、1  $\mu$ L 模板DNA、13  $\mu$ L 水。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,其中延伸发光引物进行实时定量PCR的扩增程序为:25 $^{\circ}$ C保温120 s;95 $^{\circ}$ C预变性120 s;49个循环包括:95 $^{\circ}$ C变性15 s,40.6 $^{\circ}$ C或

30.6°C退火30 s和 72°C延伸30 s。

4.根据权利要求1-3任一所述的基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法在PAT检测中的应用。

5.根据权利要求1-3任一所述的基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法在适配体Kd值测量或计算中的应用。

## 一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学领域,具体涉及一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法。

### 背景技术

[0002] 在适配体筛选和优化过程中,解离常数(Kd)是评估适配体与靶标结合能力的关键参数,Kd值越小意味着两者间结合成为耦合物的能力越强。近年来,Kd测定方法可分为直接法和间接法两大类。使用仪器直接测量获得的Kd值称为直接法,如高效液相色谱法(HPLC)、等温滴定量热法(ITC)、微型热传递法(MST)。而间接法通常是通过做实验,然后用一些方程式计算得到Kd值,比如酶联适配体分析、流式细胞术、毛细管电泳、荧光各向异性、表面等离子共振、荧光强度等。它们的缺点较明显,仪器直接法通常需要很高的设备使用和维护成本,其他间接方法需要在核酸上进行剪辑修饰。此外,当采用长链适配体作为探针构建适配体与纳米材料传感平台时,可能存在响应性能差等问题,严重制约其实际应用及Kd值的测定。因此探索测定适配体解离常数的新方法具有应用价值。

[0003] 延伸发光引物是指利用荧光基团与核苷酸的碱基(特别是G电子供体)相互作用,以及寡核苷酸的二级结构的空构型变化导致荧光基团周围电子云变化,进而延伸发光引物自身荧光淬灭。延伸发光(FLUE)引物有几个优点:使用单个荧光标记物降低成本,并且PCR反应动力学简单,这有利于设计多个PCR反应系统;并且,引物上标记的荧光基团可以直接与扩增产物混合,与探针法相比,降低了探针模板结合效率的影响。因此,基于FLUE引物的原理和技术,建立了一种新颖、灵敏、可靠的实时定量PCR方法,来测量适配体的结合亲和力。

[0004] 本发明公开了一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法。以展青霉素PAT为例,采用单一荧光基团标记,基于配体-受体相互作用来测定PAT适配体与截短核酸适配体之间的亲和常数Kd。本发明首次将延伸发光引物实时定量PCR与Kd值的检测联系在一起,利用引物核酸构型的变化实现荧光信号的放大。随后用此方法测定适配体Kd值与已公布的Kd值测量方法进行比较,证实其测得Kd值的有效性。并简单归纳出冗余序列与kd值亲和力的规律关系。本发明极大地降低了普通Kd值测定方法的成本费用,并且易操作,可行性强,对于适配体Kd值的测量提供了一个新的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供用于测定适配体与小分子靶标Kd值的思路与方法。

[0006] 本发明申请一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法,主要包括以下步骤:

[0007] (1) 运用靶标-琼脂糖微球复合物对不同浓度的靶标核酸适配体结合孵育,进行配体-受体相互反应的检测实验;

[0008] (2) 运用延伸发光引物进行实时定量PCR(FLUE primer-RT-qPCR),并根据Ct值及

标曲测定靶标适配体的浓度；

[0009] (3) 运用公式测定适配体浓度, 计算得到适配体的解离常数Kd值；

[0010] 一方面, 本发明申请一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定PAT适配体Kd值的新方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

[0011] (1) 运用PAT-琼脂糖微球复合物对不同浓度的PAT核酸适配体结合孵育, 进行配体-受体相互反应的检测实验；

[0012] (2) 运用延伸发光引物, 以孵育上清液中未结合适配体作为实时定量PCR的模板, 并根据Ct值及标曲测定未结合适配体的浓度；

[0013] (3) 运用Scatchard方程式, 利用上述测定的未结合适配体浓度计算得到适配体的解离常数Kd值。

[0014] 其中琼脂糖微球的主要作用是为了结合靶标, 且可以通过离心区分靶标的结合状态。

[0015] 其中PAT核酸适配体包括:

[0016] 78-mer: 5'-CCTTCTCATGGTGGCTGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAATGTGGTTGGTGTGGACACGGTGGCTTAGT-3', 如SEQ ID NO.5所示；

[0017] PCR-54-mer: 5'-CGGGTGTGTAAAGTTCCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAAATGTGGTTGGTGTGGACACGGTTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3', 如SEQ ID NO.6所示；

[0018] PCR-34-mer: 5'-CGGGTGTGTAAAGTTCCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCAACTGATAAGAAATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3', 如SEQ ID NO.7所示；

[0019] PCR-22-mer: 5'-CGGGTGTGTAAAGTTCCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTCATGCTATGGGCAAGTTTCGTG-3', 如SEQ ID NO.8所示；

[0020] PCR-22-mer-M1: 5'-CGGGTGTGTAAAGTTCCAGTGGTAGTGGCGTAAACGGCGCTACTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3', 如SEQ ID NO.9所示；

[0021] PCR-22-mer-M2: 5'-CGGGTGTGTAAAGTTCCAGTGGTAGTGGATTAAACGGCGCTCATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG-3', 如SEQ ID NO.10所示；

[0022] 其中延伸发光引物包括:

[0023] Forward Primer-1: 5'-CTACAGTCCTTCTCATGGTGGCTGTAG-3', 如SEQ ID NO.1所示；

[0024] Reverse Primer-1: 5'-ACTAAGCCACCGTGTCCA-3', 如SEQ ID NO.2所示；

[0025] Forward Primer-2: 5'-CACTGGTCGGGTGTGTAAAGTTCCAGTG-3', 如SEQ ID NO.3所示；

[0026] Reverse Primer-2: 5'-CACGAACTTTGCCATAGCA-3', 如SEQ ID NO.4所示；

[0027] 其中延伸发光引物进行实时定量PCR (FLUE primer-RT-qPCR) 的20 $\mu$ L反应体系包括: 0.8 $\mu$ L Forward Primer (10  $\mu$ M)、0.8 $\mu$ L Forward Primer (10  $\mu$ M)、2 $\mu$ L dNTPs (10 mM)、0.4 $\mu$ L rTaq (5 U/ $\mu$ L)、2 $\mu$ L buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、1 $\mu$ L 模板 DNA、13 $\mu$ L 水；

[0028] 其中延伸发光引物进行实时定量PCR的扩增程序: 25 $^{\circ}$ C 保温120 s; 95 $^{\circ}$ C 预变性120 s; 49 个循环包括: 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 40.6 $^{\circ}$ C或30.6 $^{\circ}$ C退火30 s和 72 $^{\circ}$ C延伸30 s。

[0029] 其中Scatchard方程式的计算方法为:

	模型	因变量 (Y)	自变量 (X)	回归方程
[0030]	B vs L	B	L	$B = (L + A + K_d - \sqrt{(L + A + K_d)^2 - 4AL}) / 2$
	双倒数 作图法	1/B	1/L	$\frac{1}{B} = \frac{1}{A} + \frac{K_d}{A} \times \frac{1}{L}$

[0031] 公式中, B (Bound) 和 F (Free) 分别代表结合配体和游离配体的浓度,  $K_d$  为解离常数, A 代表结合位点的浓度, L (Ligand) 代表配体总数。

[0032] 本发明的适用范围: 各类适配体与小分子靶标亲和力  $K_d$  值的检测。

[0033] 本发明具有的技术效果为:

[0034] (1) 本申请与其他测定  $K_d$  值的传统方法相比, 首次利用延伸发光引物实时定量 PCR 实现  $K_d$  值的测量。

[0035] (2) 本申请只利用一对延伸发光引物实现了五条适配体解离常数 ( $K_d$  值) 的测定, 简化了 FLUE primer-RT-qPCR 的引物设计, 且证明延伸发光引物具有通用性。

[0036] (3) 本申请中的延伸发光引物采用单一荧光标记, 降低了检测成本。

[0037] (4) 本申请中样品需求量少, 即可实现适配体  $K_d$  值的检测。

[0038] (5) 本申请通过  $K_d$  值的测量, 证明了 78-mer PAT 适配体中存在冗余碱基, 且 22-mer 和 M1 的亲和力较强, 极有可能是 PAT 的核心结合区域。

## 附图说明

[0039] 图1为琼脂糖微球表面修饰PAT的偶联化学反应式。

[0040] 图2为基于延伸发光引物的实时定量PCR测定适配体亲和常数  $K_d$  值的原理图, 插图表示 FLUE 引物的构型变化。

[0041] 图3为扫描电镜图: (A) 琼脂糖微球+水, (B) 琼脂糖微球+22-mer PAT 适配体, (C) 琼脂糖微球+78-merPAT适配体。

[0042] 图4 两对引物在PCR程序中的退火温度优化: (A) 原始序列内部引物序列, (B) 其余五条裁剪适配体外加引物序列。

[0043] 图5为解离饱和曲线图: (A) 间接法 (B) 直接法。

[0044] 图6为六条适配体的PCR 扩增图 (A)、标准曲线 (B), 其中曲线a: 1 nM, 曲线b: 0.1 nM, 曲线 c:  $10^{-2}$  nM, 曲线d:  $10^{-3}$  nM, 曲线e:  $10^{-4}$  nM。

[0045] 图7为截短适配体与PAT的解离饱和曲线图 (A) 和Scatchard图 (B)。

## 具体实施方式

[0046] 下面将结合本发明实施例中的附图, 对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述, 显然, 所描述的实施例仅是本发明一部分实施例, 而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例, 本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例, 都属于本发明保护的范围。

[0047] 实施例1. 琼脂糖微球表面修饰 PAT。

[0048] (1) 将琼脂糖微球与展青霉素 (PAT) 在 pH 13 的碱性环境下孵育 16 h。

[0049] (2) 用 1 M 乙醇胺封闭 4 h, 从而将靶物质 PAT 偶联到琼脂糖微球上, 构建 PAT-琼脂糖微球复合物。

[0050] 展青霉素 (PAT) 偶联到琼脂糖微球上的反应原理是PAT上的活性羟基与琼脂糖微球上的环氧基进行了开环反应,其化学反应式如图1所示。

[0051] 实施例2. 引物设计。

[0052] 延发光引物序列以及实验中用到的核酸序列如表1所示,全部由北京瑞博兴科生物技术有限公司合成。

表 1 实验中用到的引物序列

Primers	Sequence (5'-3')	Length	序列号
Forward Primer-1	<b>CTACAGTCCTTCTCATGGTGGCTG7AG</b>	27	SEQ ID NO.1
Reverse Primer-1	ACTAAGCCACCGTGTCCA	18	SEQ ID NO.2
Forward Primer-2	<b>CACTGGTCGGGTGTGTGTAAGTTCAG7G</b>	28	SEQ ID NO.3
Reverse Primer-2	CACGAAACTTTGCCATAGCA	21	SEQ ID NO.4
78-mer	<u>CCTTCTCATGGTGGCTGTAGTGGCGTAAACGGCGCTC</u> <u>AACTGATAAGAATGTGGTTGGTGGACACGGTGGCT</u> <u>TAGT</u>	78	SEQ ID NO.5
PCR-54-mer	<u>CGGGTGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGCCGTAAACGG</u> <u>CGCTCAACTGATAAGAATGTGGTTGGTGTGGACACGG</u> <u>TTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG</u>	96	SEQ ID NO.6
PCR-34-mer	<u>CGGGTGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGCCGTAAACGG</u> <u>CGCTCAACTGATAAGAATTGCTATGGGCAAAGTTTCG</u> <u>TG</u>	76	SEQ ID NO.7
PCR-22-mer	<u>CGGGTGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGCCGTAAACGG</u> <u>CGCTCATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG</u>	64	SEQ ID NO.8
PCR-22-mer-M1	<u>CGGGTGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGCCGTAAACGG</u> <u>CGCTACTGCTATGGGCAAAGTTTCGTG</u>	64	SEQ ID NO.9
PCR-22-mer-M2	<u>CGGGTGTGTGTAAGTTCAGTGGTAGTGATTAACGG</u> <u>CGCTCATGCTATGGGCAAAGTTTCGTG</u>	64	SEQ ID NO.10

[0053] [0054] 注:Forward Primer中斜体加粗的T碱基上标记荧光基团FAM,加粗的碱基对则为发卡的互补茎;下划线部分为各自的上下游引物序列。78-mer的引物是自身的内部序列,其余5条裁剪序列的上下游引物则是添加的外部序列。

[0055] 实施例3.FLUE primer-RT-qPCR的原理。

[0056] 原理如图2所示,修饰PAT的琼脂糖微球通过与PAT的核酸适配体混合孵育,可以达到结合的目的,然后通过旋转离心,琼脂糖微球沉淀会沉在离心管底部,与液体出现明显的分层界面,最后可取上清液或者琼脂糖微球沉淀作为模板,进行FLUE primer-RT-qPCR扩增。其中本实验中用到的两对引物的上游引物都进行了特殊修饰,在离5'端最近的T碱基上修饰FAM荧光基团,即延发光引物。延发光引物的实时定量PCR的具体反应过程,第一个步骤:下游引物扩增出与模板适配体互补的目标序列,第二个步骤:双链解旋,上下游引物分别扩增得到新的双链链,第三个步骤:因碱基堆积而荧光淬灭的发卡会随着扩增,发卡结构展开,释放出荧光,最后读取荧光信号实现定量检测。

[0057] 其中PAT的琼脂糖微球与PAT的核酸适配体混合孵育的具体步骤为:取10 $\mu$ L PAT-琼脂糖微球复合物,用结合缓冲液(20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6)冲洗3遍,每遍10 $\mu$ L。最后一遍使PAT-琼脂糖微球复合物悬浮10 $\mu$ L结合缓冲液中,然后将10 $\mu$ L不同浓度的PAT核酸适配体(终浓度为19.5、39、78.125、156.25、312.5和625 nmol/L)加入到PAT-琼脂糖微球复合物,37 $^{\circ}$ C摇床轻微振荡反应30

min,经旋转分离。

[0058] PAT适配体FLUE primer-RT-qPCR扩增分为两种方法:间接法和直接法。其中间接法是取1 $\mu$ L上清液,稀释10000倍的核酸链作为基于依赖延伸发光引物的实时定量PCR的模板,根据Ct值及标曲得到结合浓度,根据公式再计算得到亲和力Kd值(图2)。其中直接法是将琼脂糖微球用PBS洗3次,每次10 $\mu$ L,以除去未结合的PAT核酸适配体,然后用洗脱缓冲液将结合在琼脂糖微球上的ssDNA洗脱下来,收集洗脱液获得与PAT特异性结合的sDNA。然后使用伯乐 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量PCR仪对游离的适配体进行扩增。

[0059] 定量PCR体系的配置:总体积为20 $\mu$ L,包括dNTPs、rTaq酶、Mg<sup>2+</sup>缓冲液、上下游引物及对应的探针、模板DNA等20 $\mu$ L反应体系如表2所示。

表 2 实时荧光定量 PCR 平台的反应体系

组分	体积/ $\mu$ L	终浓度
SPS-QF (10 $\mu$ M)	0.8	0.4 $\mu$ M
SPS-QR (10 $\mu$ M)	0.8	0.4 $\mu$ M
[0060] dNTPs (10 mM)	2	0.25 mM
rTaq (5 U/ $\mu$ L)	0.4	0.1 U/ $\mu$ L
buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	2	1 $\times$
模板 DNA	1	
水	13	
总体积	20	

[0061] 具体的步骤是先将上下游引物、dNTPs、rTaq 酶和缓冲液按照比例混合配置完成后,然后在96孔板中加入19 $\mu$ L上述的混合液,随后加入模板核酸链1  $\mu$ L,通过热封口仪器Eppendorf 96-well heat sealer上封膜,最后再涡旋震荡、在小型高速离心机上去除混合液中的气泡;

[0062] PCR扩增程序:25 $^{\circ}$ C保温120 s;95 $^{\circ}$ C预变性 120 s;49 个循环包括:95 $^{\circ}$ C变性 15 s,40.6 $^{\circ}$ C(引物 1)或 30.6 $^{\circ}$ C(引物 2)退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C延伸 30 s。在退火这一步读取荧光信号,扩增结束后,根据样品和标准品的Ct曲线图进行核酸浓度计算。

[0063] 实施例4.SEM电镜验证琼脂糖微球与适配体之间的结合变化。

[0064] 首先将样品溶液放置-80 $^{\circ}$ C中冷冻 30 min,然后在真空冷冻干燥器中完全干燥过夜。在电压为 2 kv 时,用扫描电子显微镜对它们进行了 Pt 涂层。通过琼脂糖微球的扫描电镜图3,可以看出琼脂糖微球多数呈颗粒球状且直径约为140 nm。向琼脂糖微球中加入短链适配体以后发现,此时的琼脂糖微球直径约为320 nm,表明PAT与核酸适配体有结合且包覆在琼脂糖微球上,使琼脂糖微球更大了。图3(C)加入等浓度等体积的长链适配体后,琼脂糖微球颗粒直径进一步增加,约为420 nm,再次说明靶标修饰的琼脂糖微球明显与核酸适配体有反应,同时随着核苷酸链的长度增加,琼脂糖微球颗粒直径可能越大。也有可能是因为核酸链间的反应,使微球颗粒间的距离靠近,发生聚集,增大了直径。

[0065] 实施例5.PCR反应体系Tm值的优化。

[0066] 不同的退火温度(Tm值)会产生不同的扩增效果,因此为了确保后续实验中各个引物的扩增效率,需要对退火温度进行优化。在具体操作中,利用梯度PCR仪,设置了一系列温度梯度,在30 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C的温度区间。由于第50个循环的时候荧光值越大,说明延伸引物设计

的效果越好,因此选择第50个循环处的荧光为标准,进行试验优化。退火温度至少测定3次,使用IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, USA)进行单因素方差分析(ANOVA),通过邓肯多重检验法确定样品间的差异显著性, $p < 0.05$  视为显著,结果如图4所示。本实验有2对引物序列和6条与之相应的PAT适配体序列,其中第一对引物与原始长度78-mer的适配体联合使用,第二对引物可作为裁剪改造后的另外5条适配体的通用引物。由图4可知两对引物的最优退火温度为40.6°C和30.6°C,因此我们选择40.6°C作为78-mer适配体的 $T_m$ 值进行后续实验研究;30.6°C用作为后续裁剪改造的适配体序列的 $T_m$ 实验研究,且此最佳温度与其余温度差异显著。根据延伸发光引物原理,温度越低,发卡越稳定,荧光被淬灭的越好,所以基于延伸发光引物的实时定量PCR的温度比普通的PCR退火温度低是合理的。

[0067] 实施例6. 直接法和间接法检测适配体与靶标的结合率。

[0068] 图5(A)是间接法测得适配体-PAT的结合饱和曲线,间接法是以离心悬浮液为样本,测定其中未与PAT结合的适配体含量;直接法是通过洗脱缓冲液将结合在琼脂糖微球上的适配体洗脱下来,收集洗脱液获得与PAT特异性结合的适配体,其饱和曲线图见图5(B)图。横坐标表是PAT适配体浓度,纵坐标代表着随着适配体浓度的增大,靶标位点逐渐饱和,由(A)、(B)图对比可以发现,间接法曲线更美观且间接法测得的适配体量比直接法测得的量相对会更准确一些,因为直接法测得是琼脂糖微球洗脱下来的核酸,其中可能掺杂一些琼脂糖微球,而琼脂糖微球可能会影响PCR的扩增。

[0069] 实施例7. 标准曲线的建立

[0070] 我们分别将六条适配体的浓度梯度设为1 nM、0.1 nM、 $10^{-2}$  nM、 $10^{-3}$  nM、 $10^{-4}$  nM,与修饰了PAT的琼脂糖凝胶,进行FLUE primer-RT-qPCR反应,并绘制了六条适配体的标准曲线,结果如图6。公式结果见表3。后续可结合样品的Ct值与标准曲线计算得到样品中的对应适配体的浓度。

表 3 标准曲线公式表

适配体名称	公式	R <sup>2</sup>
78-mer	$Y = -3.676x + 10.804$	0.992
54-mer	$Y = -3.510x + 12.681$	0.986
34-mer	$Y = -3.736x + 12.271$	0.988
22-mer	$Y = -3.954x + 12.301$	0.982
M1	$Y = -4.055x + 10.959$	0.984
M2	$Y = -3.784x + 12.525$	0.965

[0072] 实施例8. PAT适配体的Kd值计算

[0073] 通过小分子靶标核酸适配体的浓度来判定特异性结合量,得到解离饱和曲线,然后根据数据绘制 Scatchard方程,计算得到解离常数 Kd 值。解离常数 Kd 值通过以下表4的模型计算得到。

表 4 Scatchard 方程

模型	因变量 (Y)	自变量 (X)	回归方程
B vs L	B	L	$B = (L + A + K_d - \sqrt{(L + A + K_d)^2 - 4AL}) / 2$
双倒数 作图法	1/B	1/F	$\frac{1}{B} = \frac{1}{A} + \frac{K_d}{A} \times \frac{1}{F}$

[0075] 在以上公式中,B (Bound)和 F (Free)分别代表结合配体和游离配体的浓度,Kd为解离常数,A代表结合位点的浓度,L (Ligand)代表配体总数。

[0076] 当靶标PAT浓度一定时,由适配体-琼脂糖微球结合的解离饱和曲线图结果如图7所示,随着适配体浓度的增加,琼脂糖微球上的PAT靶标逐渐与适配体结合逐渐趋于饱和。对数据进行非线性拟合,可得到PAT裁剪适配体的解离常数Kd值,如表5所示。所有的PAT裁剪适配体解离常数都处于纳摩尔量级,R<sup>2</sup>数据说明拟合度较高,PAT裁剪适配体序列具有良好的亲和性。最后,结合Scatchard分析法可以得到适配体与PAT的解离常数Kd。采取此方法测得的PAT裁剪适配体的Kd值与其他文献中报导几乎一致,该文献报道的PAT适配体长度约为40-mer,并且它们的Kd值约为50 nM,这和本文34-mer的PAT适配体的Kd测定值很接近,说明了我们设计的新方法具有可行性。此外,随着碱基的剔除,这几种裁剪后的适配体均与靶标保持了较强的结合能力,其中22-mer及M1结合效果最佳。以上结果表明,基于依赖延伸发光引物的实时定量聚合酶链反应(FLUE primer-RT-qPCR)进一步证实了78-mer PAT的原始适配体链存在冗余碱基。

表5 截短展青霉素PAT适配体的解离常数

适配体名称	$K_d$ (nmol/L)	$R^2$
78-mer	82.01	0.9913
54-mer	83.45	0.9773
34-mer	52.73	0.9881
22-mer	48.27	0.9622
M1	33.14	0.9845
M2	65.79	0.9553

[0077] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0078] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国农业大学
- [0003] <120> 一种基于延伸发光引物的实时定量PCR测定Kd值的方法
- [0004] <130> S010210616026Y
- [0005] <160> 10
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 27
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] ctacagtcct tctcatggtg gctgtag 27
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 18
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] actaagccac cgtgtcca 18
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 28
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] cactggtcgg gtggtgtaag ttccagtg 28
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0029] <400> 4
- [0030] cacgaaactt tgcccatagc a 21
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 78
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <400> 5
- [0036] ccttctcatg gtggctgtag tggcgtaaac ggcgctcaac tgataagaat gtggttggtg 60
- [0037] tggacacggt ggcttagt 78
- [0038] <210> 6

- [0039] <211> 96  
[0040] <212> DNA  
[0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0042] <400> 6  
[0043] cgggtgttgt aagttccagt ggtagtggcg taaacggcgc tcaactgata agaatgtggt 60  
[0044] tgggtggac acggttgcta tgggcaaagt ttcgtg 96  
[0045] <210> 7  
[0046] <211> 76  
[0047] <212> DNA  
[0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0049] <400> 7  
[0050] cgggtgttgt aagttccagt ggtagtggcg taaacggcgc tcaactgata agaattgcta 60  
[0051] tgggcaaagt ttcgtg 76  
[0052] <210> 8  
[0053] <211> 64  
[0054] <212> DNA  
[0055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0056] <400> 8  
[0057] cgggtgttgt aagttccagt ggtagtggcg taaacggcgc tcatgctatg ggcaaagttt 60  
[0058] cgtg 64  
[0059] <210> 9  
[0060] <211> 64  
[0061] <212> DNA  
[0062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0063] <400> 9  
[0064] cgggtgttgt aagttccagt ggtagtggcg taaacggcgc tactgctatg ggcaaagttt 60  
[0065] cgtg 64  
[0066] <210> 10  
[0067] <211> 64  
[0068] <212> DNA  
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0070] <400> 10  
[0071] cgggtgttgt aagttccagt ggtagtggat taaacggcgc tcatgctatg ggcaaagttt 60  
[0072] cgtg 64

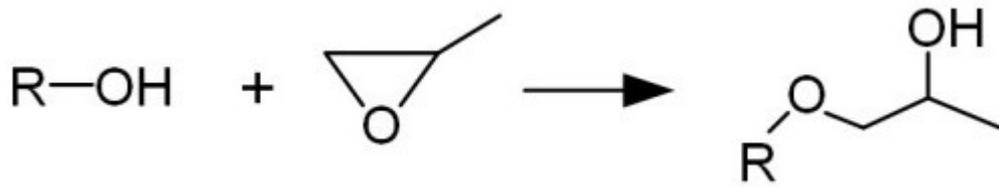


图1

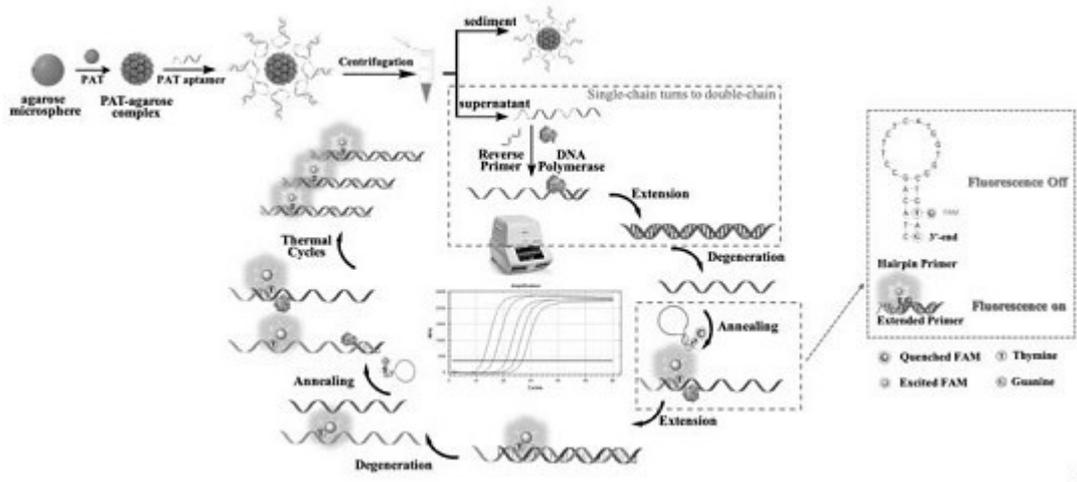


图2

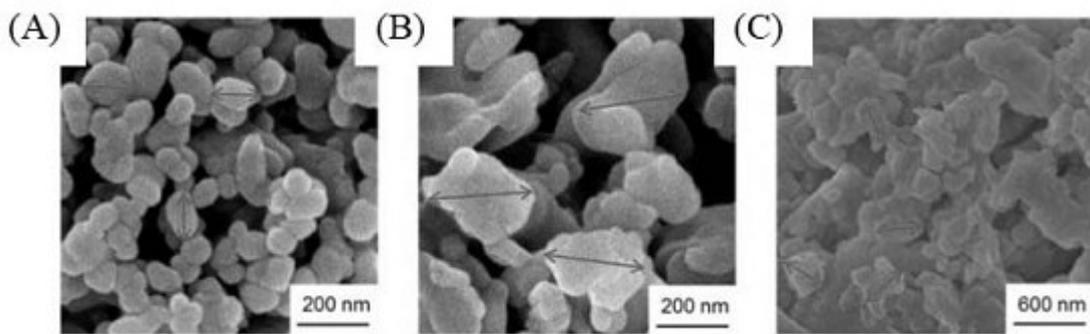


图3

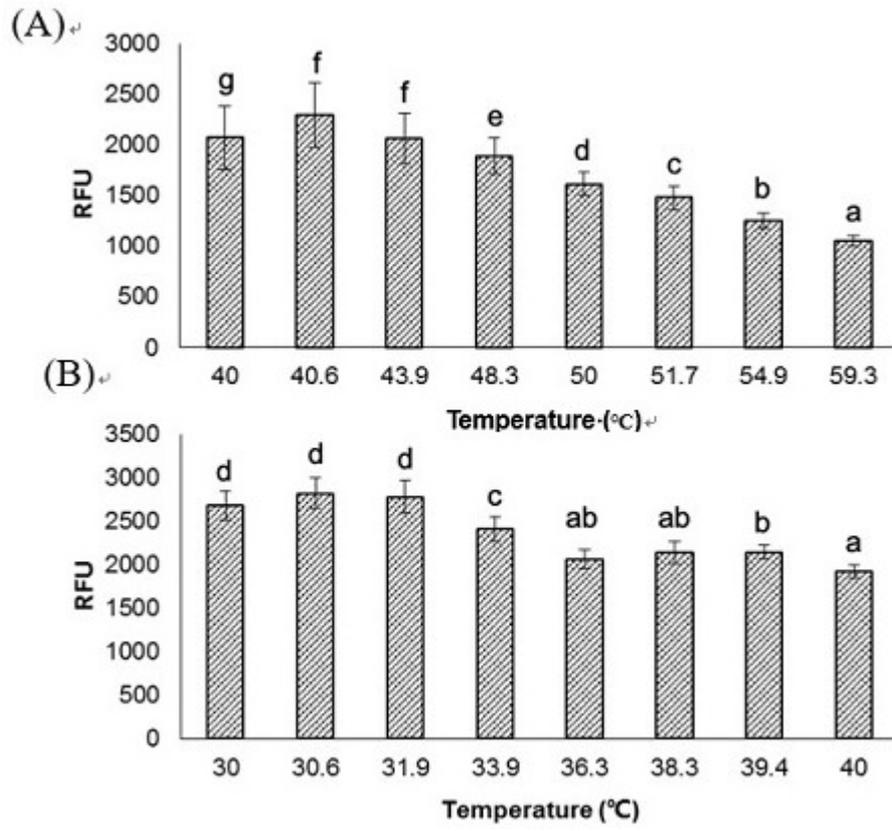


图4

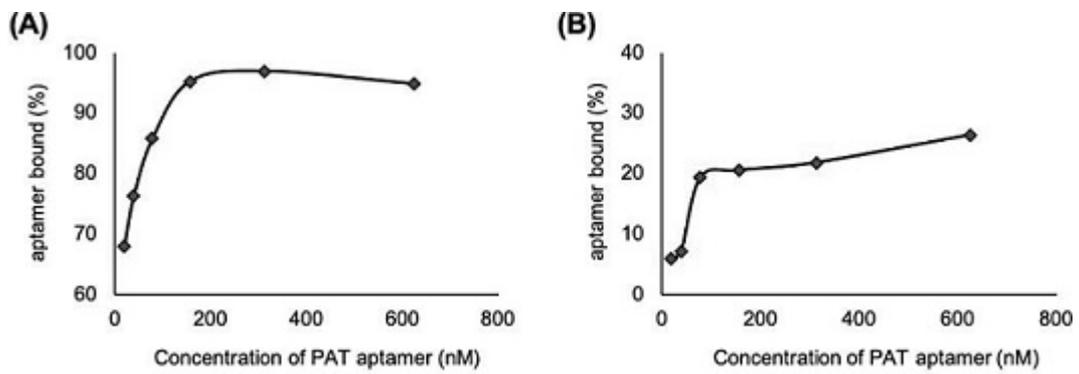


图5

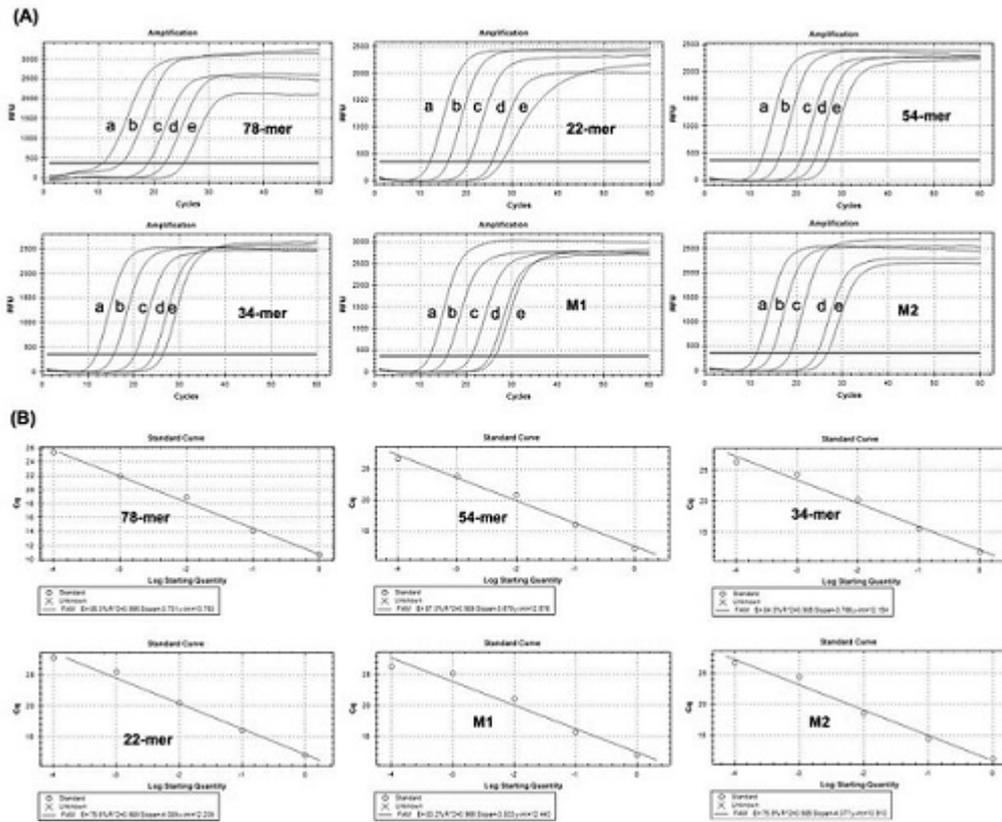


图6

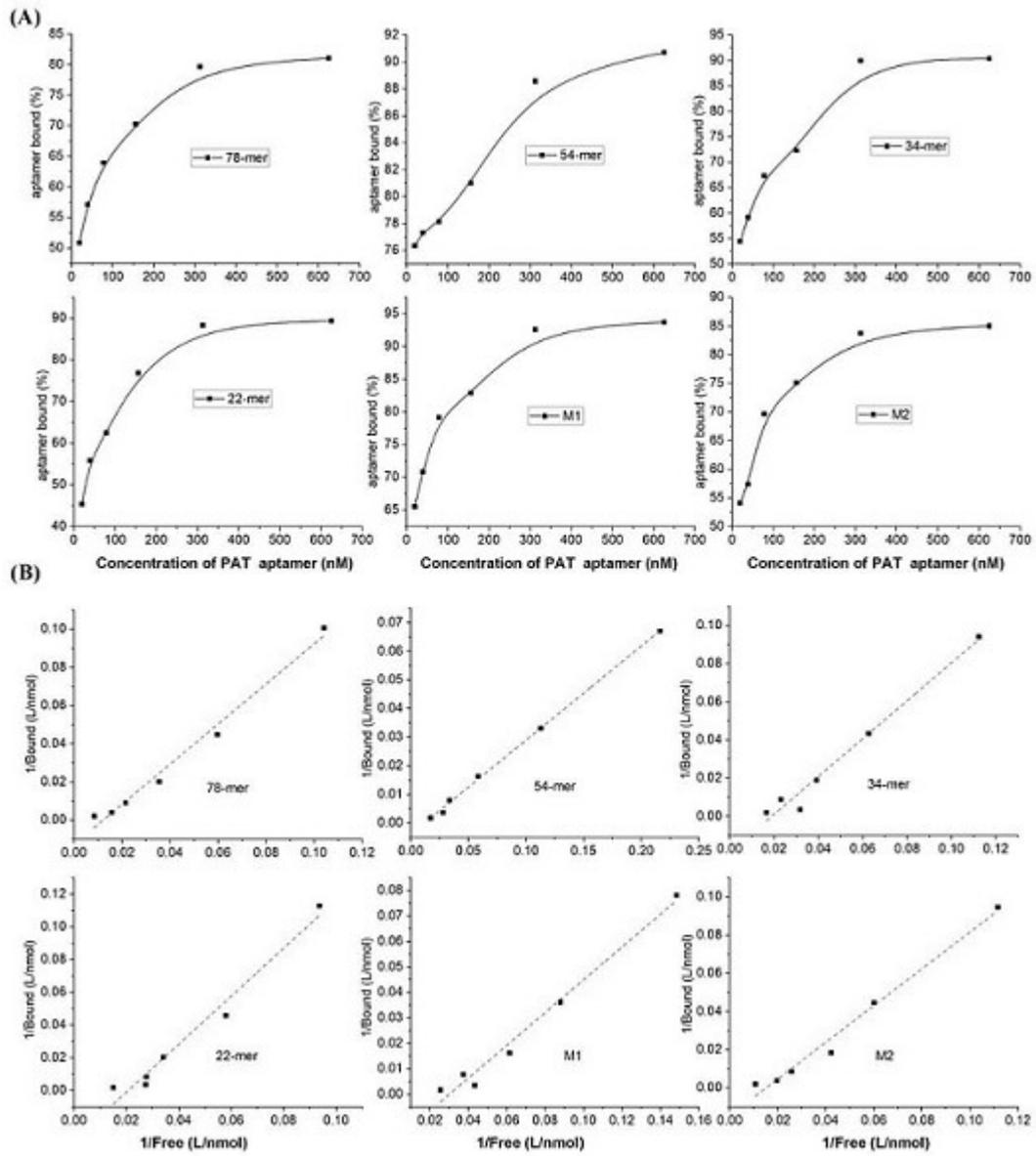


图7