



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109852670 A  
(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201910160705.2

(22)申请日 2019.03.04

(71)申请人 中国医科大学

地址 110122 辽宁省沈阳市沈北新区蒲河  
路77号

(72)发明人 张斌 关一夫 袁莹 李硕

(74)专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限  
公司 21107

代理人 史力伏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806(2018.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

C12Q 1/6851(2018.01)

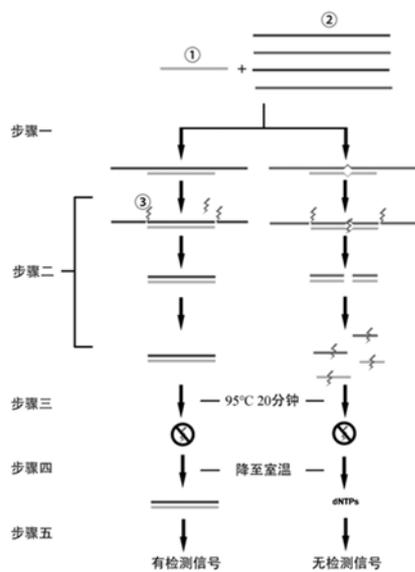
权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及基础研究(基因表达调控、生物进化、种属鉴定、基因分型)和应用研究(药物开发、法医鉴定、食品药品安全监管、海关检验检疫等)领域中的高特异性核酸检测,具体涉及到一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法。该检测试剂的主要成分包括检测目标核酸链的特异性探针和可以降解核酸单链的单链核酸酶。本发明的高特异性核酸检测试剂操作简便、快速便捷、性价比高,可以满足自动化的需要,省时省力,便于实现规模化实验和基础研究。



1. 一种高特异性核酸检测试剂,其特征在于,所述的检测试剂的主要成分包括检测目标核酸链的特异性探针和可以降解核酸单链的单链核酸酶。

2. 一种高特异性核酸检测试剂的使用方法,其特征在于,具体包括下列步骤:

步骤一:将特异性探针①与含有待检测的核酸链②加入到反应缓冲液中,进行变性退火;

步骤二:将单链核酸酶③加入到反应缓冲液中,在优化温度下孵育特定时间,其优化温度取决于特异性探针的探针长度、构成特异性探针的核苷酸组分与类型、以及单链核酸酶的最适工作温度;其反应时间取决于单链核酸酶的酶切效率;

步骤三:反应结束后,将反应体系在95℃孵育20分钟;

步骤四:将反应体系自然降温到室温;

步骤五:将单链核酸酶处理过的反应体系进行核酸检测。

3. 如权利要求1所述的高特异性核酸检测试剂,其特征在于,所述的检测目标核酸链的特异性探针是长度不少于十个、不多于三十个核苷酸的核酸单链;特异性探针可以与待检测的核酸链上的片段形成杂交核酸双链;构成特异性探针的核苷酸可以是核苷酸、脱氧核苷酸以及核苷酸衍生物,包括但不限于锁核酸、肽核酸、硫核酸、双脱氧核苷酸、甲氧基核苷酸。

4. 如权利要求1所述的高特异性核酸检测试剂,其特征在于,可以降解核酸单链的单链核酸酶具有降解杂交核酸双链中的非双链结构的核酸酶。

5. 如权利要求1所述的高特异性核酸检测试剂,其特征在于,所述的非双链结构的核酸酶的非双链结构包括不符合标准碱基配对(A:T、A:U和 G:C)原则的碱基对,或由于核苷酸插入或缺失形成的泡状结构或环状结构,或核酸双链的单链切口、或核酸双链的单链缺口。

6. 如权利要求1所述的高特异性核酸检测试剂,其特征在于,所述的可以降解核酸单链的单链核酸酶包括但不限于S1核酸酶(S1 Nuclease)、绿豆芽核酸酶(Mung Bean Nuclease)、P1核酸酶(P1 Nuclease)、BAL 31核酸酶(BAL 31 Nuclease)、核糖核酸酶A(Ribonuclease A)、芹菜核酸酶(CEL I Nuclease)。

7. 如权利要求1所述的所述的高特异性核酸检测试剂,其特征在于,所述的待检测的核酸链,可以是核酸双链或核酸单链,可以是长核酸链或寡核酸片段,可以是线性核酸链或环形核酸链;所述的待检测的核酸链可以是DNA链、RNA链或含有核苷酸衍生物的核酸链。

8. 如权利要求2所述的高特异性核酸检测试剂的使用方法,其特征在于,将单链核酸酶处理过的反应体系进行核酸检测包括任何一种依赖于核酸扩增方法的检测技术或不依赖于核酸扩增方法的检测技术。

9. 如权利要求2所述的高特异性核酸检测试剂的使用方法,其特征在于,所述的依赖于核酸扩增方法的检测技术是基于热循环核酸扩增技术或基于恒温核酸扩增技术。

## 一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基础研究(基因表达调控、生物进化、种属鉴定、基因分型)和应用研究(药物开发、法医鉴定、食品药品安全监管、海关检验检疫等)领域中的高特异性核酸检测,具体涉及到一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法。

### 背景技术

[0002] 现代生物学(植物学、动物学、微生物学、海洋生物学、古生物学、古人类学等)的重要研究内容之一是核酸鉴定和核酸检测。完整的基因组信息可以使人类在基因水平上对地球上已经灭绝的和现存的各种各样物种的起源、进化、迁徙以及灭亡进行深层次、多视角、全方位的分析 and 解读,因为基因组的核苷酸序列以及核苷酸变异决定了物种特征和物种进化。

[0003] 核酸检测的基本原理是利用碱基互补配对原则。基于基因组信息设计的核酸探针与待检测的目标核酸片段形成稳定的杂交双链,然后利用体外扩增技术将与核酸探针结合的微量目标核酸片段扩增到易于检测的水平。核酸检测的成功取决于杂交双链的稳定性,而杂交双链的稳定性受到核酸链的长度、核酸链的核苷酸组分以及序列、溶液中的离子强度、杂交温度以及杂交双链的碱基互补度等因素的影响。在其他条件固定的条件下,杂交双链的碱基互补度越高,其杂交双链的稳定性也越高,即检测特异性越高。但是,当目标核酸片段的核苷酸序列和非目标核酸片段的核苷酸序列之间仅仅相差一个或几个核苷酸时,核酸探针就难于区分目标核酸链和非目标核酸片段,由此产生了假阳性检测信号。这样的假阳性结果给检测具有细微的核苷酸变异提出了巨大的挑战。

[0004] 细微的核苷酸变化包括基因的单点突变、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,简称SNP)、甲基化、微RNA(microRNA)家族成员等。这些细微的核苷酸变异不仅可以影响基因水平的变化,而且还可以在表观遗传水平上影响物种特性。

[0005] 目前常用的检测这些细微的单核苷酸变化的方法有核酸测序(sequencing)、高分辨溶解曲线(high resolution melting,简称HRM)、限制性酶切片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,简称RFLP)、单链构象多态性(single strand conformation polymorphism,简称SSCP)、等位基因特异的寡聚核苷酸杂交(allele specific oligonucleotide hybridization,简称ASO)、等位基因特异性PCR(allele specific PCR)等。虽然这些技术在某种程度上可以对SNP、单点突变等进行检测,但是它们存在一定的技术缺陷。例如,核酸测序被认为是核酸检测的金标准,但是核酸测序的技术含量高,需要专业技术人员操作,测序费用高,不易于普及。SSCP和RFLP必须通过凝胶电泳进行检测,难于满足自动化的需要,耗时费力,不便于实现规模化实验。等位基因特异PCR则面临着引物设计合理性的限制。近年来,人们还利用核酸与蛋白质相互作用发明了SNP和单点突变的检测技术,如基于单链核酸酶的检测方法。但是,这些方法都需要首先对待测核酸进行PCR扩增,然后再利用核酸酶将PCR扩增产物水解成为不同的片段,从而影响了核酸检测的高特异性。因此,无论是基础研究还是实际应用,人们迫切需要高特异性的核

酸检测方法和技术。

## 发明内容

[0006] 鉴于现有技术存在的缺陷,本发明提供了一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法。

[0007] 为了实现本发明的目的,提供以下技术方案。

[0008] 一种高特异性核酸检测试剂,该检测试剂的主要成分包括检测目标核酸链的特异性探针和可以降解核酸单链的单链核酸酶。

[0009] 一种高特异性核酸检测试剂使用方法,具体包括下列步骤。

[0010] 步骤一:将特异性探针①与含有待检测的核酸链②加入到反应缓冲液中,进行变性退火。

[0011] 步骤二:将单链核酸酶⑤加入到反应缓冲液中,在优化温度下孵育特定时间,其优化温度取决于特异性探针的探针长度、构成特异性探针的核苷酸组分与类型、以及单链核酸酶的最适工作温度;其反应时间取决于单链核酸酶的酶切效率。

[0012] 步骤三:反应结束后,将反应体系在95℃孵育20分钟。

[0013] 步骤四:将反应体系自然降温到室温。

[0014] 步骤五:将单链核酸酶处理过的反应体系进行核酸检测。

[0015] 进一步,所述的检测目标核酸链的特异性探针是长度不少于十个、不多于三十个核苷酸的核酸单链;特异性探针可以与待检测的核酸链上的片段形成杂交核酸双链;构成特异性探针的核苷酸可以是核苷酸、脱氧核苷酸以及核苷酸衍生物,包括但不限于锁核酸、肽核酸、硫核酸、双脱氧核苷酸、甲氧基核苷酸等。

[0016] 进一步,所述的可以降解核酸单链的单链核酸酶,具有降解杂交核酸双链中的非双链结构的核酸酶。

[0017] 进一步,所述的非双链结构的核酸酶,非双链结构包括不符合标准碱基配对(A:T、A:U和 G:C)原则的碱基对,或由于核苷酸插入或缺失形成的泡状结构或环状结构,或核酸双链的单链缺口。

[0018] 进一步,所述的可以降解核酸单链的单链核酸酶,包括但不限于S1核酸酶(S1 Nuclease)、绿豆芽核酸酶(Mung Bean Nuclease)、P1核酸酶(P1 Nuclease)、BAL 31核酸酶(BAL 31 Nuclease)、核糖核酸酶A(Ribonuclease A)、芹菜核酸酶(CEL I Nuclease)等。

[0019] 进一步,所述的待检测的核酸链,可以是核酸双链或核酸单链,可以是长核酸链或寡核酸片段,可以是线性核酸链或环形核酸链。所述的待检测的核酸链可以是DNA链、RNA链或含有核苷酸衍生物的核酸链。

[0020] 进一步,所述的将单链核酸酶处理过的反应体系进行核酸检测,检测技术包括任何一种依赖于核酸扩增方法的检测技术或不依赖于核酸扩增方法的检测技术。

[0021] 进一步,所述的依赖于核酸扩增方法的检测技术,检测技术可以是基于热循环核酸扩增技术或基于恒温核酸扩增技术。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果。

[0023] 1) 优良的检测特异性:该核酸检测试剂将首先直接与待测核酸样品进行反应,保持了待测样品核酸序列的原生状态,避免了现有技术的先扩增后辨识的策略,因此可以实

现高保真性的特异性检测。

[0024] 2)巨大的样品处理能力:该核酸检测试剂可以对多种不同种类的核酸样品进行检测,待测的核酸样品可以是核酸双链或是核酸单链,可以是DNA链或是RNA链,可以是较长的核酸链或是很短的寡核酸片段(例如microRNA)。这是目前任何一种核酸检测技术所不可及的。

[0025] 3)检测成本低廉:该核酸检测试剂成本低廉,检测方法易于操作,不需要经过专业技术人员操作。可以与裸眼化检测方法相结合,实现不需要仪器设备的低成本检测,从而实现实时和实地的核酸检测。

### 附图说明

[0026] 图1是高特异性核酸检测试剂的工作原理示意图。其中①:特异性探针;②待检测的核酸链;③完全互补的杂交双链;④:非完全互补的杂交双链;⑤:单链核酸酶。

[0027] 图2是利用滚环扩增技术(RCA)检测高特异性核酸检测试剂处理的microRNA let-7家族成员的流程。其中①:特异性探针probe 7E;②待检测的核酸链let-7a ~ let-7f;③完全互补的杂交双链probe 7E/let-7e;④:非完全互补的杂交双链probe 7E/let-7(不包括let-7e);⑤:单链核酸酶 CEL I;⑥:环形模板;⑦:具有链置换功能的DNA聚合酶 phi29。步骤一:将特异性探针probe 7E①与含有待检测的核酸链的样品混合。变性退火特异性探针①与待检测的let-7家族成员②成为杂交双链。其中特异性探针probe 7E与样品中的let-7e形成了完全互补的杂交双链③,而特异性探针probe 7E与样品中的其它let-7家族成员形成了非完全互补的杂交双链④。步骤二:将单链核酸酶⑤加入到样品混合物中,在优化温度下孵育特定时间。单链核酸酶⑤不能水解完全互补的杂交双链 probe 7E/let-7e③,而可以将非完全互补的杂交双链④:probe 7E/let-7a、probe 7E/let-7b、probe 7E/let-7c、probe 7E/let-7d 和 probe 7E/let-7f的单链部分水解。水解后的小片段不稳定,解离成单链后最终被全部水解。步骤三:将单链核酸酶处理的样品混合物在95℃孵育20分钟,将单链核酸酶失活。步骤四:将样品混合物自然降温到室温中。步骤五:将单链核酸酶处理的样品混合物加入到RCA反应体系(环形模板⑥、聚合酶⑦)中进行检测。未被水解的let-7e可以作为引物启动RCA反应。

[0028] 图3是两个样品(样品1:仅有let-7e;样品2:不含let-7e的其它let-7家族成员的混合物)未经过高特异性核酸检测试剂处理后的let-7家族成员检测结果。

[0029] 图4是两个样品(样品1:仅有let-7e;样品2:不含let-7e的其它let-7家族成员的混合物)经过高特异性核酸检测试剂处理后的let-7家族成员检测结果。

[0030] 图5是样品1和样品2以不同比例形成的混合样品未经过高特异性核酸检测试剂处理后的let-7e检测结果。

[0031] 图6是样品1和样品2以不同比例形成的混合样品经过高特异性核酸检测试剂处理后的let-7e检测结果。

[0032] 图7是样品1和样品2未经过CEL I处理的RT-qPCR结果。

[0033] 图8是样品1和样品2经过CEL I处理后的RT-qPCR结果。

### 具体实施方式

[0034] 下面结合附图和实施例详述本发明,以下实施例的说明只是用于帮助理解本发明的核心思想。应该指出,对于本技术领域的技术人员来说,在不脱离本发明专利原理的前提下,可以对本发明专利进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也在本发明专利权利要求的保护范围之内。

[0035] 实施例高特异性核酸检测试剂结合RCA技术检测microRNA let-7家族成员let-7e。

[0036] 微RNA let-7是一个22-25个核苷酸长的、具有9个成员(let-7a~let-7i)的microRNA家族,它们参与了生命过程中各个阶段,是重要的基因表达调控分子之一。但是,家族成员之间相差甚微(1~3个核苷酸),准确的检测出家族成员具有一定的挑战性。本实例利用高特异性核酸检测试剂检测处理样品后,再利用滚环扩增技术(rolling circle amplification,简称RCA)检测该microRNA家族成员let-7e。

[0037] 一、设计特异性探针和制备样品。

[0038] 以microRNA let-7家族(let-7a ~ let-7f)为检测对象,根据let-7家族成员的核苷酸序列设计DNA探针probe 7E,见表1。

表 1.特异性探针 probe 7E 和 let-7 家族成员核苷酸序列

	核苷酸序列 (5'-3')
特异性探针 probe 7E	3'-A CTCCA TCCTC CAACA TATCA A-5'
Let-7a (SEQ ID No.1)	5'-U GAGGU AGU <u>U</u> AG GUUGU AUAGU U-3'
Let-7b (SEQ ID No.2)	5'-U GAGGU AGU <u>U</u> AG GUUGU <u>GUGGU</u> U-3'
Let-7c (SEQ ID No.3)	5'-U GAGGU AGU <u>U</u> AG GUUGU AUG <u>G</u> U U-3'
Let-7d (SEQ ID No.4)	5'- <u>A</u> GAGGU AGU <u>U</u> AG GUUG <u>C</u> AUAGU U-3'
Let-7e (SEQ ID No.5)	5'-U GAGGU AGGAG GUUGU AUAGU U-3'
Let-7f (SEQ ID No.6)	5'-U GAGGU AGU <u>U</u> AG <u>A</u> UUGU AUAGU U-3'

[0039] 红色标记的核苷酸是该microRNA与特异性探针probe 7E杂交后形成的错配位点。

[0040] 样品1:let-7e;浓度100nM。

[0041] 样品2:不含let-7e的其它let-7家族成员的混合物 100nM。

[0042] 样品3:一系列样品1和样品2 按照不同比例的混合物,见表2。

表 2. 样品 1 和样品 2 按照不同比例的系列混合物

名称	样品 1	样品 2
Mix-1	0	10
Mix-2	1	9
Mix-3	2	8
Mix-4	3	7
Mix-5	4	6
Mix-6	5	5
Mix-7	6	4
Mix-8	7	3
Mix-9	8	2
Mix-10	9	1
Mix-11	10	0

[0043] 二、制备RCA的环形模板。

[0044] 用于RCA反应的环形模板DNA (Circular-Template DNA, CT-DNA) 和连接DNA寡核苷酸链 (Ligation DNA, 简称L-DNA) 的核苷酸序列如表3所示。

表 3. 环形模板 DNA 序列及连接 DNA 寡核苷酸链序列

核苷酸序列 (5'-3')	
环形模板 DNA (CT-DNA, SEQ ID No.7)	5'-P- <u>AGCAT</u> <u>ATGAT</u> CCACA ACCGT CGCAT ACCAC ACAA <u>ACTAT</u> <u>ACAAC</u> <u>CTCCT</u> <u>ACCTC</u> A AACC CTCGC AGCTC TCCAC TAATC TCCTA CTCAA-3'
连接 DNA (L-DNA, SEQ ID No.8)	5'-AT ATGCT TTGAG TA-3'

[0045] 下划线是环形模板DNA末端与连接DNA互补的序列。

[0046] 加粗斜体是与miRNA let-7e序列互补的序列。

[0047] 将线性核苷酸模板环化成为环状模板。环化反应体系总体积20 $\mu$ l, 含有1 $\times$ 连接反应缓冲液 (30 mM pH8.0 Tris-HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 mM EDTA, 100 $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, 0.005% BSA), CT-DNA 10 $\mu$ M, L-DNA 10 $\mu$ M, EDIlgase 120U。环化反应温度16 $^{\circ}$ C, 环化时间16小时。反应结束后, 将体系升温至95 $^{\circ}$ C, 孵育20分钟, 灭活EDIlgase。

[0048] 环化反应结束后, 利用核酸外切酶III (exonuclease III, exo-III) 去除没有成环的CT-DNA和L-DNA, 获得纯化的环化产物 (pure CT-DNA, pCT-DNA)。酶切反应体系体积20  $\mu$  l, 含有1 $\times$ exo-III酶切反应缓冲液 (50 mM pH8.0 Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT), 其中exo-III 200U, 环化的CT-DNA (circularized CT-DNA, cCT-DNA) 1  $\mu$ M (酶切温度37 $^{\circ}$ C, 酶切时间4小时)。

[0049] 酶切反应结束后, 利用PAGE银染检测环化反应结果和酶切反应结果。将酶切纯化的环化产物pCT-DNA稀释至100 nM备用。

[0050] 三、利用高特异性核酸检测试剂和RCA方法检测let-7成员。

[0051] 1. 利用高特异性核酸检测试剂处理样品。

[0052] 形成杂交双链:将200 nM 5 $\mu$ l的特异性探针probe 7E分别与100 nM 5  $\mu$ l的样品1和100 nM 5  $\mu$ l样品2混合,升温至95 $^{\circ}$ C,孵育5分钟。自然降温到室温。

[0053] 酶切反应去除非目的核酸:将10  $\mu$ l酶切反应液A分别加入到样品1的混合物和样品2的混合物。酶切反应液A包括2 $\times$ CEL I缓冲液(66 mM Tris-acetate pH 7.9 at 37 $^{\circ}$ C, 20 mM 醋酸镁,132 mM 醋酸钾,0.2% (v/v) Tween 20,2 mM DTT)和CEL I核酸酶 2  $\mu$ l。反应温度55 $^{\circ}$ C,反应时间60分钟。

[0054] 灭活核酸酶:将酶切产物升温至95 $^{\circ}$ C,孵育时间20分钟。

[0055] 2.RCA扩增反应。

[0056] 制备100  $\mu$ l RCA反应体系:1 $\times$ phi29 反应缓冲液(33 mM Tris-acetate pH 7.9 在温度37 $^{\circ}$ C条件下,10 mM 醋酸镁,66 mM 醋酸钾,0.1% (v/v) Tween 20,1 mM DTT)、1:10000 SYBR Green II、1 nM pCT-DNA、dNTPs(每种dNTP浓度为125  $\mu$ M)、phi29 DNA聚合酶 2.5U。

[0057] 加样:在96-孔酶标板中每一孔加入100  $\mu$ l RCA反应体系,保持温度40 $^{\circ}$ C。

[0058] RCA反应:将1  $\mu$ l 样品1的酶切产物和1  $\mu$ l 样品2的酶切产物分别与加入到RCA反应体系中,启动RCA反应。

[0059] 利用酶标仪检测RCA反应的荧光变化。激发波长为480 nm,发射波长为530 nm。

[0060] 3.利用同样的步骤1和步骤2处理样品3(Mix1 - Mix11)。

[0061] 4.检测结果。

[0062] 利用高特异性核酸检测试剂的检测结果如图3 -图6所示。

[0063] 图3是样品未经过高特异性核酸检测试剂处理后的检测结果。图3显示了荧光强度随着RCA反应进行逐步上升,但是样品1的荧光强度与样品2的结果几乎一样,表明启动RCA反应的引物有样品中目标核酸let-7e和非目标核酸(其它let-7成员)。

[0064] 图4是样品经过高特异性核酸检测试剂处理后的检测结果。荧光曲线表明仅有样品1得到了RCA扩增,而样品2的荧光曲线与阴性对照基本相同,没有RCA反应。实验结果表明经过高特异性核酸检测试剂处理,其余let-7家族成员(let-7a、let-7b、let-7c、let-7d和let-7f)被水解掉,不能启动RCA反应,实现了高特异性检测试剂的作用。

[0065] 图5是样品3未经过高特异性核酸检测试剂处理后的检测结果。样品3是样品1和样品2按照不同比例的一系列混合物。RCA反应不能区分出混合物中的let-7家族成员。

[0066] 图6是样品3经过高特异性核酸检测试剂处理后的检测结果。随着let-7e在混合样品中比例的逐步增加(每一步为10%),RCA反应的荧光曲线而不断升高,与预期的结果具有一一对应的浓度依赖关系。

[0067] 实施例2 利用高特异性核酸检测试剂结合PCR技术检测microRNA let-7家族成员let-7e。

[0068] 本实例先利用高特异性核酸检测试剂处理实施例1中的样品1和样品2,再利用逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-quantitative polymerase chain reaction,简称RT-qPCR)检测let-7e。未经过CEL I处理的样品作为对照组。

[0069] 实验中使用Thermo-Fisher Scientific公司的Taqman探针RT-qPCR试剂盒对上述

样品进行检测。

[0070] 1. 利用高特异性核酸检测试剂处理样品。

[0071] 形成杂交双链:将200 nM 5  $\mu$ l的特异性探针probe 7E分别与100 nM 5  $\mu$ l的样品1和100 nM 5  $\mu$ l样品2混合,升温至95 $^{\circ}$ C,孵育5分钟。自然降温到室温。

[0072] 酶切反应去除非目的核酸:将10 $\mu$ l酶切反应液A分别加入到样品1的混合物和样品2的混合物。酶切反应液A包括2 $\times$ CEL I缓冲液(66 mM Tris-acetate pH 7.9 at 37 $^{\circ}$ C,20 mM 醋酸镁,132 mM 醋酸钾,0.2% (v/v) Tween 20,2 mM DTT)和CEL I核酸酶 2  $\mu$ l。反应温度55 $^{\circ}$ C,反应时间60分钟。

[0073] 灭活核酸酶:将酶切产物升温至95 $^{\circ}$ C,孵育时间20分钟。

[0074] 2. 逆转录反应(以下过程依据Thermo-Fisher Scientific公司的Taqman探针RT-qPCR试剂盒使用说明书)将3  $\mu$ l 5 $\times$ RT primer和5  $\mu$ l酶切产物混合,升温至85 $^{\circ}$ C,孵育5分钟。变温至60 $^{\circ}$ C,孵育5分钟。将混合样品置于冰上备用。在冰上配置逆转录反应液见表4。

表 4. 逆转录反应液配方

成分	每 15 $\mu$ l 的主混液
100 mM dNTPs (含有 dTTP)	0.15 $\mu$ l
MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase, 50U/ $\mu$ l	1.00 $\mu$ l
10 $\times$ Reverse Transcription Buffer	1.50 $\mu$ l
RNase Inhibitor, 20U/ $\mu$ l	0.19 $\mu$ l
Nuclease-free water	4.16 $\mu$ l
总体积	7.00 $\mu$ l

[0075] 将逆转录反应液与预制的样品混合,轻柔震荡混匀,离心后在冰上静置5分钟。

[0076] 将15  $\mu$ l混匀后的反应液放入PCR仪,设定温度循环条件见表5。

表 5. 逆转录反应参数

循环步骤	时间	温度
1	30 分钟	16 $^{\circ}$ C
2	30 分钟	42 $^{\circ}$ C
3	5 分钟	85 $^{\circ}$ C
4	$\infty$	4 $^{\circ}$ C

[0077] 3. PCR扩增反应(以下过程依据Thermo-Fisher Scientific公司的Taqman探针RT-qPCR试剂盒使用说明书)将逆转录反应产物稀释10倍,置于冰上备用。制备qPCR反应液见表6。

表 6. PCR 反应液配方

成分	反应液体积
TaqMan Universal PCR Master Mix II	10 $\mu$ l
Nuclease-free water	7.67 $\mu$ l
TaqMan Small RNA Assay(20 $\times$ )	1.00 $\mu$ l
逆转录产物(稀释后)	1.33 $\mu$ l
总体积	20.00 $\mu$ l

[0078] 将PCR反应液轻柔震荡混匀,放入Roche LightCycler480实时荧光定量PCR检测仪,设定热循环参数见表7,启动PCR反应。

表 7. PCR 反应参数

步骤	预变性	PCR (40 个循环)	
		变性	退火/延伸
温度	95 $^{\circ}$ C	95 $^{\circ}$ C	60 $^{\circ}$ C
时间	10 分钟	15 秒	60 秒

[0079] 4. 检测结果。

[0080] 图7是样品未经高特异性核酸检测试剂处理的RT-qPCR结果。样品1和样品2的CT值几乎没有差别,均为24左右,而阴性对照组的CT值大于40。实验结果表明RT-qPCR方法不能够区分出未经高特异性检测试剂处理的样品1(1et-7e)和样品2(其他1et-7成员)。

[0081] 图8是样品经过高特异性核酸检测试剂处理的RT-qPCR检测结果。样品1的CT值没有差别,仍为24,而样品2的CT值已经明显后移。实验结果表明,经过高特异性核酸检测试剂处理后的样品,RT-qPCR方法可以提高检测microRNA的特异性。

## SEQUENCE LISTING

<110> 中国医科大学

<120> 一种高特异性核酸检测试剂及其使用方法

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

actccatcct ccaacatatc aa 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ugagguagua gguuguaugg uu 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

agagguagua gguugcauag uu 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

ugagguagga gguuguauag uu 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ugagguagua gauuguauag uu 22

<210> 8

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

agcatatgat ccacaaccgt cgcataccac acaaaactat acaacctcct acctcaaacc 60

ctcgcagctc tccactaatc tctactcaa 90

<210> 9

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

atatgctttg agta 14

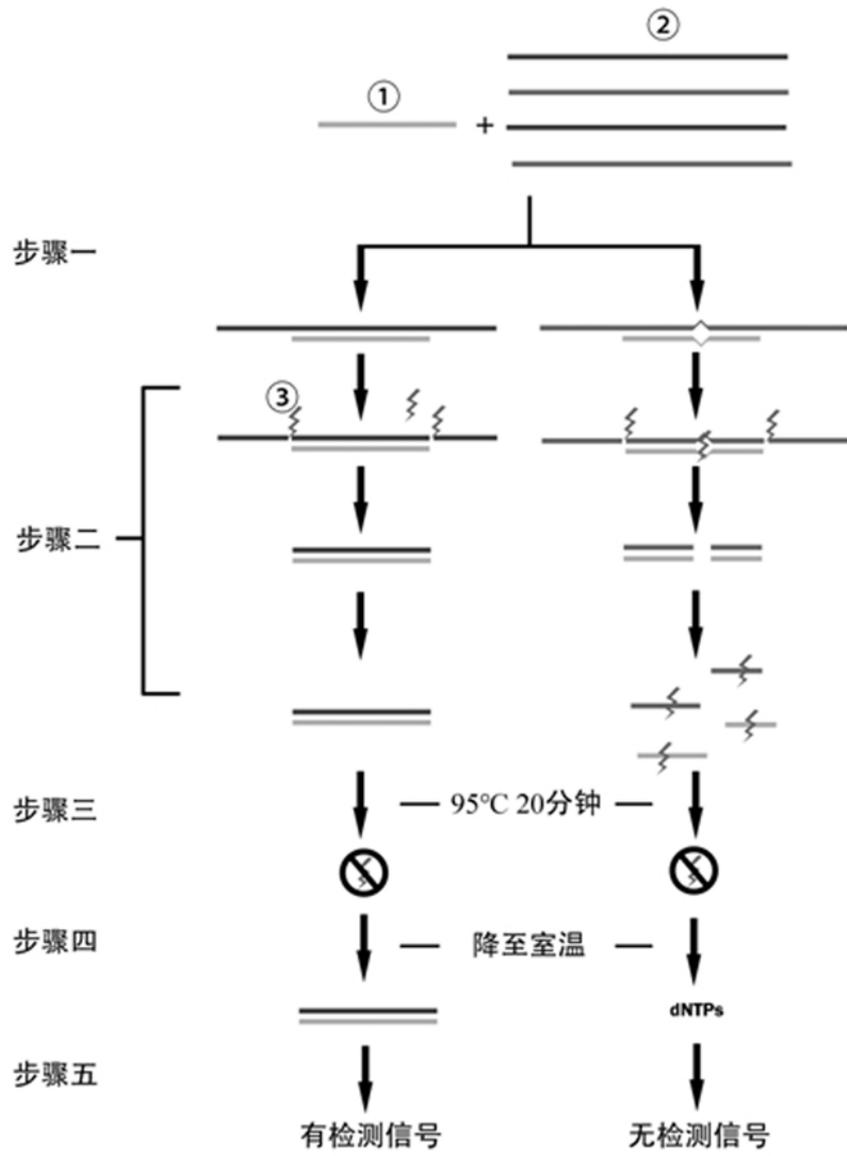


图1

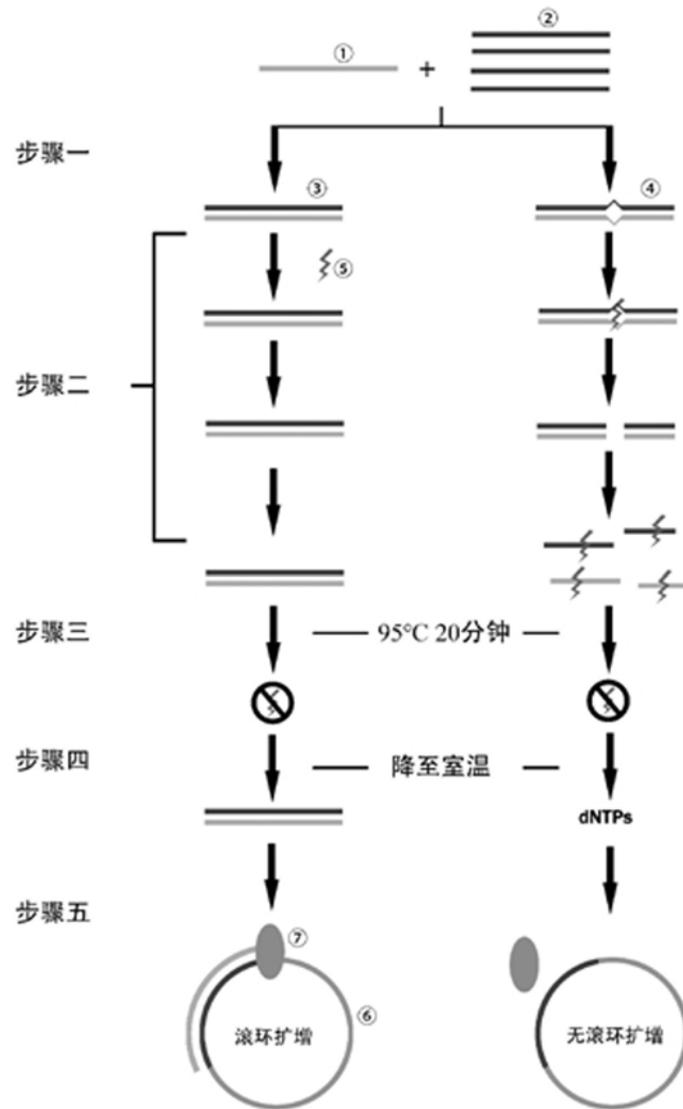


图2

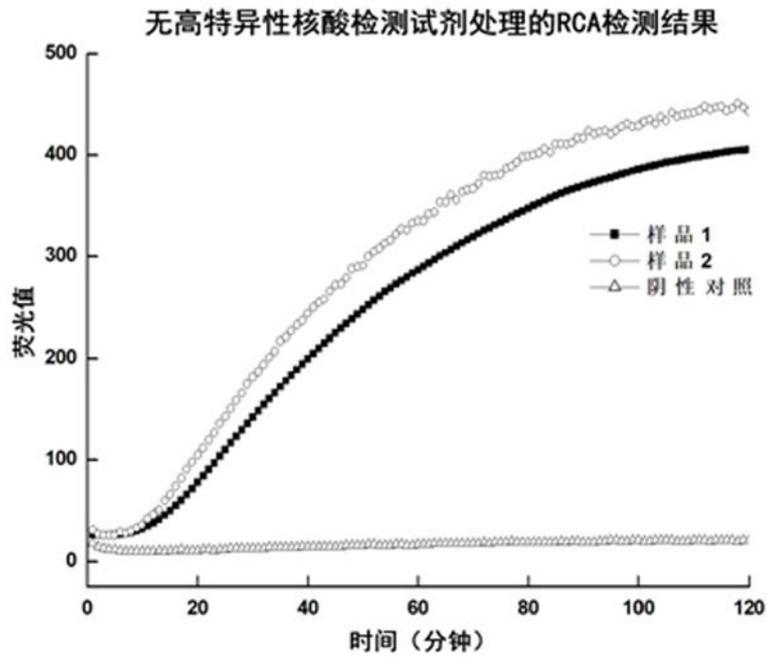


图3

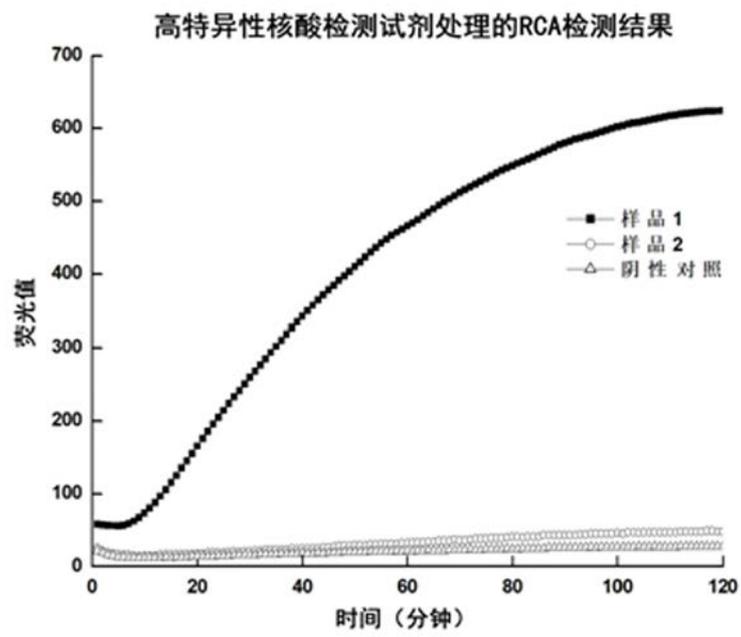


图4

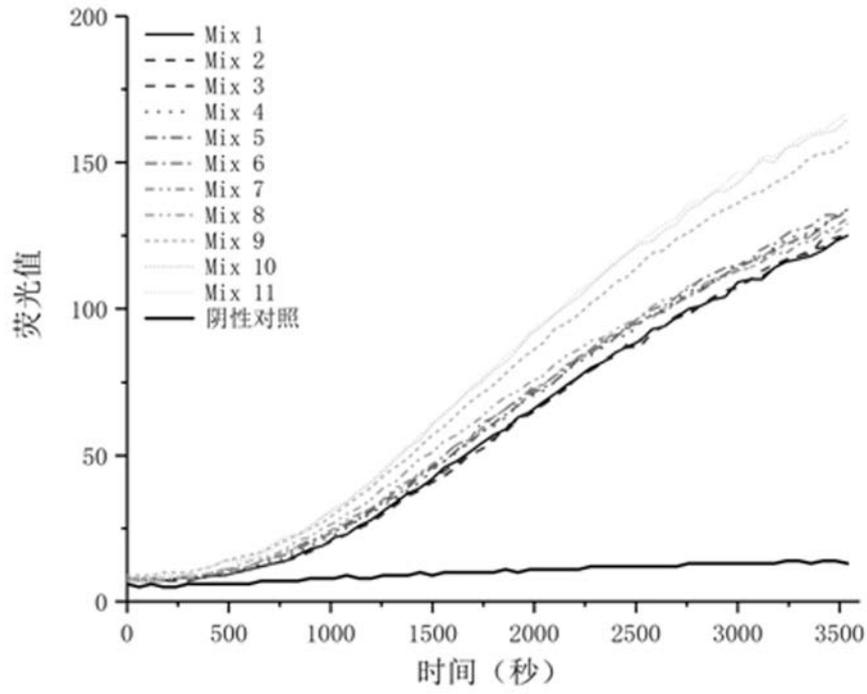


图5

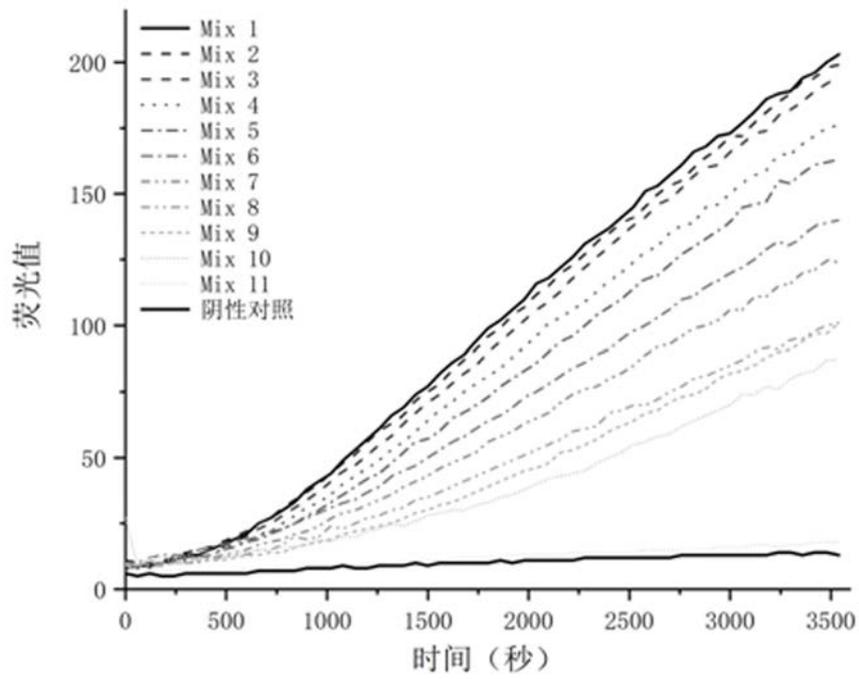


图6

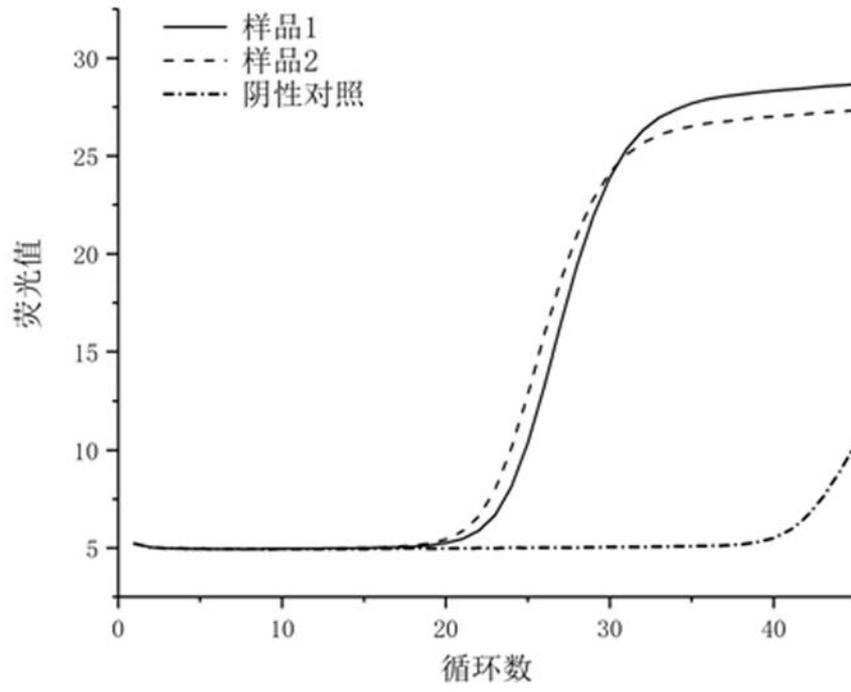


图7

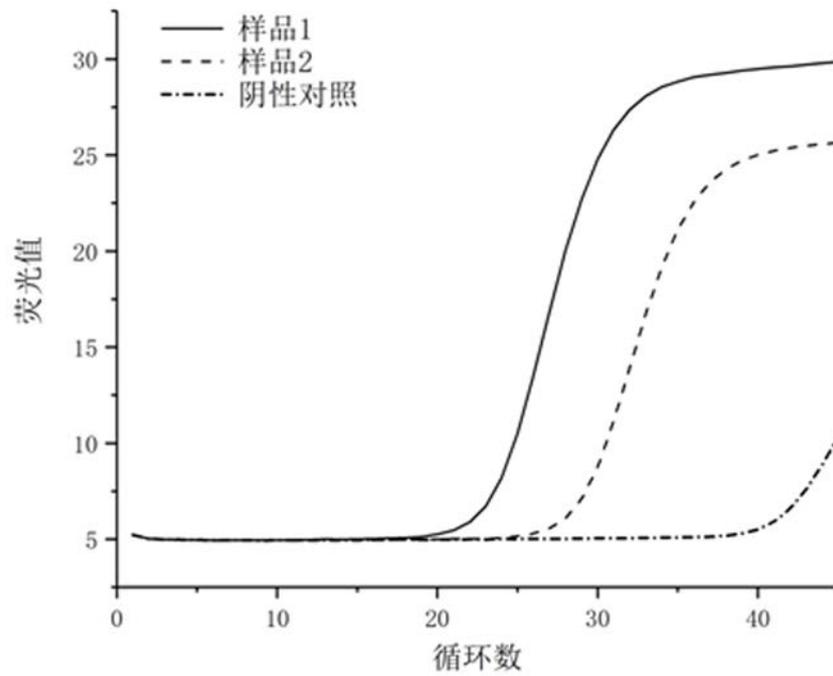


图8