



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103725769 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201210390906. X

(22) 申请日 2012. 10. 16

(71) 申请人 哈尔滨德歌生物科技有限公司

地址 150028 黑龙江省哈尔滨市科技创新城
智谷大街 4333 号 1-2 号楼

(72) 发明人 王德国 曲海涛 张文超

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一管式共用引物法检测同一突变位点不同突变类型

(57) 摘要

本发明基于 LAMP(环介导恒温扩增检测)技术的一管式检测同一突变位点不同突变类型的方法或理论,该方法可以在同一个核酸检测反应管中同时检测同一个突变位点的不同突变碱基。LAMP 设计需要 4-6 个引物,通过在环介导等温扩增检测试剂盒探针设计,对于同一突变点的不同突变类型,只改变覆盖突变点处的引物,覆盖其它位点的引物不变为共用引物(加入量也不变),这样保证了,覆盖突变点的引物与共用引物之间不发生交叉反应,只需要验证覆盖同一突变点不同突变类型处的引物之间是否发生交叉反应即可,那么覆盖此处引物只有一到两个碱基不同,也不会发生反应,这就是本检测方式的理论基础。此方法不仅可以降低成本、提高效率,更重要的是可以极大的提高对多突变类型同时存在的检测灵敏度。

1. 本发明基于 LAMP (环介导恒温扩增检测)技术的一管式检测同一突变位点不同突变类型的方法或理论,其特征在于:通过在环介导等温扩增检测试剂盒探针设计,对于同一突变点的不同突变类型,只改变覆盖突变点处的引物,覆盖其它位点的引物不变(加入数量也不变),这样保证了,突变点的引物与其它点位的引物之间不发生交叉反应,只需要验证覆盖同一突变点不同突变类型处的引物之间是否发生交叉反应即可,那么覆盖此处这引物只有一到两个碱基不同,也不会发生反应,这就是本检测方式的理论基础。

2. 根据权利 1 要求我们保护的是 LAMP 技术一管式检测同一突变位点不同突变类型,是我们首次提出基于 LAMP 技术对不同基因类型的检测,只要是一管式检测不同基因突变类型都在我们的保护范围。

3. 我们同时保护也是 LAMP 技术一管式检测同一突变位点不同突变类型的理论和方法。

4. 根据权利要求 1 所述本技术也可以向检测不同突变位点延伸,本技术是同时检测多个突变位点的基础,多个位点引物设计除覆盖突变位点的其它引物尽量设计共用引物,避免交叉反应。

5. 此方法主要应用于各种突变耐药基因(如肺结核、乙肝、艾滋病等)的检测,同时也可用于同一位点是否存在不同有效基因形式的检测。

一管式共用引物法检测同一突变位点不同突变类型

[0001]

技术领域

[0002] 一管式共用引物法检测同一突变位点不同突变类型,此发明可以应用于环介导等温扩增检测技术领域,结核杆菌、乙型肝炎病毒、HIV 病毒、肿瘤耐药等检测。

背景技术

[0003] 环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是2000年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的6个区域设计4种特异引物,利用一种链置换DNA聚合酶在等温条件(63℃左右)保温30—60分钟,即可完成核酸扩增反应。与常规PCR相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。LAMP是一种全新的核酸扩增方法,具有简单、快速、特异性强的特点。该技术在灵敏度、特异性和检测范围等指标上能优于PCR技术,不依赖任何专门的仪器设备实现现场高通量快速检测,检测成本远低于荧光定量PCR。

[0004] 目前在行业应用最广范的耐药检测是药敏实验和基因芯片技术,药敏实验耗时太长,基因芯片虽然能实现高通量检测但是制备成本及检测费用均较昂贵,灵敏度低,不宜大面积推广。因此急需一种检测成本低、灵敏度高切实可行的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是:提供一种同时一管式检测同一突变位点不同突变类型的环介导等温扩增检测方法。

[0006] 本发明的技术方案是:该方法可以在同一个核酸检测反应管中同时检测同一个突变位点的不同突变碱基。LAMP设计需要4-6个引物,通过在环介导等温扩增检测试剂盒探针设计,对于同一突变点的不同突变类型,只改变覆盖突变点处的引物,覆盖其它位点的引物不变(加入数量也不变),这样保证了,突变点的引物与其它点位的引物之间不发生交叉反应,只需要验证覆盖同一突变点不同突变类型处的引物之间是否发生交叉反应即可,那么覆盖此处这引物只有一到两个碱基不同,也不会发生反应,这就是本检测方式的理论基础。

[0007] 实施例1:

结核分支杆菌耐利福平(RFP)药物核苷酸526点突变有如下几种情况:

密码子	核苷酸突变	氨基酸置换
526 位	CAC→TAC	His→Tyr
	CAC→GAC	His→Asp
	CAC→CTC	His→Leu
	CAC→CCC	His→Pro
	CAC→GTC	His→Val
	CAC→AAC	His→Asn

如果采用现有环介导等温扩增检测技术,需要六个试管检测出这六种突变方式之一,可以确定 526 耐药,采用基因芯片检测也需要有六个对应的检测点才能检测到不同的突变形式,但假定他们在耐药性级别是一样的,哪么就不需要检测出他们具体是哪种突变类型,只需要检测有以上基因存在即可,此点即耐药,正是基于此,本专利技术采用环介导等温扩增技术,本专利技术针对 526 点位 6 种突变类型设计了覆盖对应突变点的 6 种不同引物(如下所示),这 6 条引物之间,只有 1 到 2 个碱基不同,因此之间不会发生交叉反应,覆盖其它点位的引物(共用引物)和覆盖突变点的每条引物都是搭配的,他们可以单独在一个管中反应检测确定不同的突变点,也就是说每条突变点引物和共用引物不可能发生交叉反应,共用引物之间当然也不存在交叉反应,这都是在设计时就已确定了,这样所有的反应环节不可能存在交叉反应,因此将他们加入一个管反应是没有问题的,只要存在一个突变以上位点,对应的引物和共用引物一起就会和结核 DNA 相结合,发生反应,其它突变引物不参与其中的反应,这样就可以确定 526 存在突变,是耐药的,这样即可达到由一个反应管同时检测多种突变的目的。我们将以上的方法定义为:LAMP 一管式共用引物法检测同一突变点的不同突变类型。

[0008] 那么如果和一根只检测一个突变类型对比最佳的引物加入量是什么样的呢?当然不是简单的只将 6 个管液体混合,每条共用引物的加入量是不变的(和一根只检一个突变类型是一样的),DNA 模板的量也不变,突变引物每一条和单管检一个突变类型也是相同的,也就是说无论 DNA 存在以上哪一个突变类型或哪几个突变类型,他们都会去与对应的突变引物及共用引物相结合。但是反应效率和灵敏是不同的,我们假定 526DNA 中分别存在以上 6 种突变,且含量相同,但是每种突变的浓度都低于 LAMP 最低检测线,这样如果分别检测就不会检测到突变基因,但是将他们一管式检测,相当于总反应体积基本未变的情况下,有效的突变基因浓度提高了近 6 倍,这样就完全有可能检测到突变,因此本技术不仅是降低成本,更重要的是可以极大的提高对多突变类型同时存在的检测灵敏度。

[0009] 针对 6 种突变方式设计引物如下:

六个突变位点对应引物:

引物 1、TGACCTACAAGCGCCGACT

引物 2、TGACCGACAAGCGCCGACT

引物 3、TGACCCTCAAGCGCCGACT

引物 4、TGACCCCAAGCGCCGACT

引物 5、TGACCGTCAAGCGCCGACT

引物 6、TGACCAACAAGCGCCGACT

共用引物：

526B3 CGACCACCTTGCGGTACG

526FIP GTAGTGCACGGGTGTTTTGGTCTGTCACGTGAGCGT

526BIP ACCCCTGAGGGGCCCAACATTTTTTCGATGAACCCGAACGG

526LB TGTACGCGGGTCAA

反应体系(反应总体积仍为 25 μ l)

成分	母液浓度	用量(μ l)	终浓度
核酸模板		2.0	
引物 1	5 μ M	1.0	
引物 2	5 μ M	1.0	
引物 3	5 μ M	1.0	
引物 4	5 μ M	1.0	
引物 5	5 μ M	1.0	
引物 6	5 μ M	1.0	
B3	5 μ M	1.0	0.8 μ M
FIP	40 μ M	1.0	1.6 μ M
BIP	40 μ M	1.0	1.6 μ M
LB	20 μ M	1.0	0.2 μ M
dNTP	150mM	2-4	
指示剂	10mM	1-2.5	0.4-1mM
BstDNAPolymeraseBuffer	10 \times	2.5	
Mg ²⁺	50mM	1.5-2.5	
BstDNAPolymerase	8U/ μ l	1	0.32U/ μ l
ddH ₂ O		补至 25 μ l	

扩增反应

59-65 $^{\circ}$ C 水浴 20-60 分钟。

[0010] 结果判断

反应结束后,颜色改变为阳性,说明 526 位点存在基因突变,颜色保持不变为阴性。如图 1 所示 526 位点阴阳性对照。

[0011] 实施例 2:

密码子	核苷酸突变	氨基酸置换
531 位	TCG \rightarrow TTG	Ser \rightarrow Leu
	TCG \rightarrow TGG	Ser \rightarrow Trp

二个突变位点对应引物：

引物 1、AAGCGCCGACTGTT

引物 2、AAGCGCCGACTGTG

531B3 CGTCGACCACCTTGCG

531FIP GCCGTAGTGCACGGGTGTTTTGCGGTCTGTACGTGAGC

531BIP GATCGAAACCCCTGAGGGGCTTTTGAACCCGAACGGGTTGAC

531LB GATCGAAACCCCTGAGGGGC

反应体系(反应总体积为 25 μ l)

成分	母液浓度	用量(μ l)	终浓度
核酸模板		2.0	
引物 1	5 μ M	1.0	
引物 2	5 μ M	1.0	
B3	5 μ M	1.0	0.8 μ M
FIP	40 μ M	1.0	1.6 μ M
BIP	40 μ M	1.0	1.6 μ M
LB	20 μ M	1.0	0.2 μ M
dNTP	150mM	2-4	
指示剂	10mM	1-2.5	0.4-1mM
BstDNAPolymeraseBuffer	10 \times	2.5	
Mg ²⁺	50mM	1.5-2.5	
BstDNAPolymerase	8U/ μ l	1	0.32U/ μ l
ddH ₂ O		补至 25 μ l	

扩增反应

59-65 $^{\circ}$ C 水浴 20-60 分钟。

[0012] 结果判断

反应结束后,颜色改变为阳性,说明 531 位点存在基因突变,颜色保持不变为阴性。如图 2 所示 531 位点阴阳性对照。

[0013]

本发明的有益的积极效果:

WHO 2009 年报告全球新发结核病 440 万,其中多耐药结核为 42 万,广泛耐药结核占多耐药结核的 10%;我国调查显示初治结核耐药率为 10% 左右,复治结核患者耐药率高达 35% 以上。耐药结核已经成为严重的公共卫生威胁。南非一组 53 名艾滋病合并耐药结核患者,死亡 52 名,其中 70% 在 30 天内死亡;耐药结核治疗与患者管理十分困难,治疗费用远远高于普通结核,同时由于人口流动,耐药结核患者难于发现,管理存在盲区,对社会人群造成严重威胁。

[0014] 不仅在肺结核领域,在乙肝治疗中,也出现耐药,乙肝(乙型病毒性肝炎)耐药性主要是指体内乙肝(乙型病毒性肝炎)病毒发生变异,导致起初选择的乙肝(乙型病毒性肝炎)治疗药物不再发挥任何的治疗功效。还有艾滋病领域都出现了类似问题。

[0015] 那么开发一种简单快速、灵敏度高的检测方法迫在眉睫,本技术为 LAMP 检测耐药找到了一种切实可行的方法。

本发明专利内容采用环介导等温扩增技术对同一突变点不同突变类型进行检测,检测灵敏度更高,检测时间短、操作简便、同时又可以实现高通量检测,不但适合大医院使用也可以在中小医院使用,对肺结核感染提供了快速的分子诊断。同时,它也可以对多种在耐多种药物型结核病、乙肝病、艾滋病等患者中最为常见的基因突变进行检测,疾病耐药的早期诊断有助于即时对患者实施高强度的治疗方案,从而有助于控制疾病的传播。

[0016]

最后应说明的是:以上实施例仅用于说明而非限制本发明的应用,本领域的技术人员

应当理解：本发明也可用于其他的核酸等温扩增及产物检测，包括但不限于滚环扩增、依赖解旋酶的等温扩增、链替代扩增、切刻内切酶核酸等温扩增；同时，本领域的技术人员也应当理解：可以对本发明进行修改或者等同替换，在不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换，其均应涵盖在本发明的权利要求保护范围内。

阴性对照

阳性扩增

阴性对照

阳性扩增

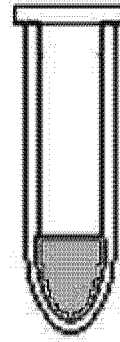
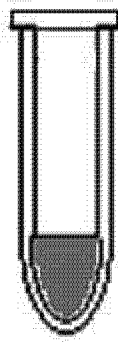
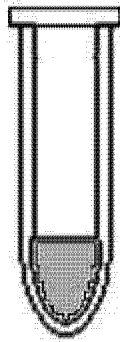
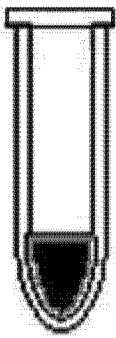


图 1

图 2