



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111850103 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 02

(21) 申请号 202010842154.0

C12Q 1/6876 (2018.01)

(22) 申请日 2020.08.20

审查员 温婧

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111850103 A

(43) 申请公布日 2020.10.30

(73) 专利权人 清华大学深圳国际研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区丽水路  
2279号

(72) 发明人 谭英 陈俊粤 谭春燕 金天

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

专利代理师 闫书宁

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于阳离子共轭聚合物和核酸酶辅助  
循环扩增的检测目的核酸的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于阳离子共轭聚合物和核酸酶辅助循环扩增的检测目的核酸的方法。该方法包括如下步骤:取含有核酸、反应缓冲液、DNA探针和核酸酶的反应体系,孵育;加入azo-PPE (+),静置5min以上;检测荧光强度;根据荧光强度判断核酸中是否含有目的核酸或目的核酸的含量;DNA探针与目的核酸的核苷酸序列相同或反向互补;DNA探针的末端进行荧光标记;核酸酶用于消化DNA探针和目的核酸形成的双链核酸分子的一条核酸链,从而释放另一条核酸链。实验证明,本发明提供的方法可以同时检测多种目的核酸,且准确率高、灵敏度高且特异性好。本发明具有重要的应用价值。

1. 一种检测目的核酸的方法,包括如下步骤:

(1) 取含有核酸、反应缓冲液、DNA探针和核酸酶的反应体系,孵育;

(2) 完成步骤(1)后,加入azo-PPE(+),静置5min以上;

(3) 完成步骤(2)后,检测荧光强度;

根据荧光强度判断核酸中是否含有目的核酸或目的核酸的含量;

所述DNA探针与目的核酸的核苷酸序列相同或反向互补;

所述DNA探针的末端进行荧光标记;

所述核酸酶用于消化DNA探针和目的核酸形成的双链核酸分子的一条核酸链,从而释放另一条核酸链。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:当检测N个目的核酸时,需要加入N个DNA探针且各个DNA探针的荧光标记完全不同;N为1以上的自然数。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

当核酸为DNA,核酸酶为DNA外切酶;所述DNA外切酶可以从双链DNA分子的3'末端去除单个核苷酸,释放ssDNA;

反应缓冲液为含8-12mM  $MgCl_2$ 和0.8-1.2mM DTT的pH6.5-7.5、8-12mM Tris-HCl缓冲液。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中,孵育为35-39°C孵育20-40min;

所述步骤(2)中,加入azo-PPE(+)后,azo-PPE(+)在体系中的浓度为3.4-3.8 $\mu$ M。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:当核酸为miRNA时,反应体系还含有RRI。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于:

核酸酶为DSN;DSN可以消化RNA-DNA杂交双链中的DNA链以释放RNA;

反应缓冲液为含4-6mM  $MgCl_2$ 和0.8-1.2mM DTT的pH7.5-8.5、40-60mM Tris-HCl缓冲液。

7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于:

所述步骤(1)中,孵育为43-47°C孵育1-3h;

所述步骤(2)中,加入azo-PPE(+)后,azo-PPE(+)在体系中的浓度为2.8-3.2 $\mu$ M。

8. 权利要求1至7任一所述的方法的应用,为a1)或a2):

a1) 区分核酸碱基差异;

a2) 区分细胞或组织中核酸表达量差异。

9. azo-PPE(+)、与权利要求3或6中所述反应缓冲液和核酸酶组合的应用,为a1)或a2)或a3):

a1) 区分核酸碱基差异;

a2) 区分细胞或组织中核酸表达量差异;

a3) 检测目的核酸。

## 一种基于阳离子共轭聚合物和核酸酶辅助循环扩增的检测目的核酸的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种基于阳离子共轭聚合物和核酸酶辅助循环扩增的检测目的核酸的方法。

### 背景技术

[0002] 癌症的存活率往往很低,很可能是由于诊断滞后以及治疗手段的缺乏。对癌症进行早期精确诊断无疑对于癌症临床确诊、癌症的分期判断以及癌症治疗效用评估至关重要。癌症生物标志物的检测给癌症的早期诊断带来了很大希望,已经成为了研究热点。癌症生物标志物存在于肿瘤组织或血清中,并涵盖多种分子,包括DNA、miRNA、酶、代谢产物、转录因子和细胞表面受体等。

[0003] 肿瘤细胞存在于人类循环系统中,因此细胞内的DNA因为释放也同样会存在于循环系统中。与健康人相比,癌症患者的循环血浆中肿瘤相关DNA含量更高。循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是一种常见的重要肿瘤标志物,依据对其的检测可以实现以无创方式对肿瘤进行诊断与分期监测。

[0004] miRNA是转录后调节基因表达的短的非编码RNA。miRNA参与癌变过程是通过携带抑癌基因和翻译抑癌基因来实现的。研究证明,miRNA表达含量的异常往往与癌症的发病、癌细胞的侵袭、病灶的转移等有关。近些年的研究表明癌症患者的血浆或者其它的体液中miRNA表达水平通常与癌症诊断分期、治疗评估和病患存活率息息相关。不同类型和子集的肿瘤中miRNA的畸变和独特表达谱,以及它们在生物体液中的存在,使得miRNA成为可靠的肿瘤生物标记物。

[0005] 核酸的定量检测,特别是miRNA含量的定量检测对于相关生物基础研究以及癌症的早期诊断和治疗意义重大。然而,miRNA的独特特征,例如序列短、组织和细胞中含量低以及miRNA家族成员的序列相似性给检测造成了许多困难。此外,一种癌症的发生通常与多个miRNA表达水平的变化密切相关,但是在同一体系内实现多个miRNA的检测一直是miRNA检测领域的一大难题。

### 发明内容

[0006] 现有的检测目的核酸(DNA或miRNA)的方法灵敏度低、特异性差、设备依赖性高、耗时长、操作复杂,而且难以在同一体系中实现对多个目的核酸的检测。本发明所要解决的技术问题是提供一种可以在同一体系中同时检测多个目的核酸的方法。

[0007] 本发明首先保护一种检测目的核酸的方法,可包括如下步骤:

[0008] (1) 取含有核酸、反应缓冲液、DNA探针和核酸酶的反应体系,孵育;

[0009] (2) 完成步骤(1)后,加入azo-PPE(+),静置5min以上(如5min);

[0010] (3) 完成步骤(2)后,检测荧光强度;

[0011] 根据荧光强度判断核酸中是否含有目的核酸或目的核酸的含量;

- [0012] 所述DNA探针与目的核酸的核苷酸序列相同或反向互补；
- [0013] 所述DNA探针的末端进行荧光标记；
- [0014] 所述核酸酶用于消化DNA探针和目的核酸形成的双链核酸分子的一条核酸链，从而释放另一条核酸链。
- [0015] 所述步骤(1)中，核酸可含有目的核酸。所述核酸具体可为细胞的核酸。
- [0016] 所述步骤(3)中，荧光强度可采用酶标仪测定。
- [0017] 上述任一所述的方法中，所述DNA探针的末端进行荧光标记可为所述DNA探针的5'末端进行荧光标记。
- [0018] 上述任一所述的方法中，当检测N个目的核酸时，需要加入N个DNA探针且各个DNA探针的荧光标记完全不同；N为1以上的自然数。由于各个DNA探针的荧光标记完全不同，所以通过检测不同激发波长和发射波长的荧光强度可以判断各个目的核酸。
- [0019] 上述方法中，当核酸为DNA时，核酸酶可为DNA外切酶。所述DNA外切酶可以从双链DNA分子的3'末端去除单个核苷酸，释放ssDNA。所述DNA外切酶具体可为DNA外切酶III，即Exo III。反应缓冲液可为含8-12mM(如8-10mM、10-12mM、8mM、10mM或12mM) MgCl<sub>2</sub>和0.8-1.2mM(如0.8-1.0mM、1.0-1.2mM、0.8mM、1.0mM或1.2mM) DTT的pH6.5-7.5(如pH6.5-7.0、pH7.0-7.5、pH6.5、pH7.0或pH7.5)、8-12mM(如8-10mM、10-12mM、8mM、10mM或12mM) Tris-HCl缓冲液。所述步骤(1)中，孵育可为35-39℃(如35-37℃、37-39℃、35℃、37℃或39℃)孵育20-40min(如20-30min、30-40min、20min、30min或40min)。所述步骤(2)中，加入azo-PPE(+)后，azo-PPE(+)在体系中的浓度可为3.4-3.8μM(如3.4-3.6μM、3.6-3.8μM、3.4μM、3.6μM或3.8μM)。所述DNA探针与目的DNA的核苷酸序列相同或反向互补。
- [0020] 上述方法中，当核酸为DNA时，步骤(1)中的反应体系中，探针的浓度可为80-120nM(如80-100nM、100-120nM、80nM、100nM或120nM)。Exo III的浓度可为4-6U/100uL(如4-5U/100uL、5-6U/100uL、4U/100uL、5U/100uL或6U/100uL)。
- [0021] 上述方法中，当核酸为miRNA时，反应体系还可含有RRI。核酸酶可为DSN。DSN可以消化RNA-DNA杂交双链中的DNA链以释放RNA。反应缓冲液可为含4-6mM(如4-5mM、5-6mM、4mM、5mM或6mM) MgCl<sub>2</sub>和0.8-1.2mM(如0.8-1.0mM、1.0-1.2mM、0.8mM、1.0mM或1.2mM) DTT的pH7.5-8.5(如pH7.5-8.0、pH8.0-8.5、pH7.5、pH8.0或pH8.5)、40-60mM(如40-50mM、50-60mM、40mM、50mM或60mM) Tris-HCl缓冲液。所述步骤(1)中，孵育可为43-47℃(如43-45℃、45-47℃、43℃、45℃或47℃)孵育1-3h(如1-2h、2-3h、1h、2h或3h)。所述步骤(2)中，加入azo-PPE(+)后，azo-PPE(+)在体系中的浓度可为2.8-3.2μM(如2.8-3.0μM、3.0-3.2μM、2.8μM、3.0μM或3.2μM)。所述DNA探针与目的miRNA的核苷酸序列反向互补。
- [0022] 上述方法中，当核酸为miRNA时，步骤(1)中的反应体系中，探针的浓度可为80-120nM(如80-100nM、100-120nM、80nM、100nM或120nM)。DSN的浓度可为0.4-0.6U/100uL(如0.4-0.5U/100uL、0.5-0.6U/100uL、0.4U/100uL、0.5U/100uL或0.6U/100uL)。RRI的浓度可为7-9U/100uL(如7-8U/100uL、8-9U/100uL、7U/100uL、8U/100uL或9U/100uL)。
- [0023] 上文中，Exo III和RRI均为Takara公司的产品，DSN为Evrogen公司的产品。
- [0024] 上文中，所述步骤(2)加入azo-PPE(+)静置5min以上的目的为使azo-PPE(+)充分与未反应的DNA探针结合并淬灭荧光。
- [0025] 在发明的实施例中，荧光标记包括FAM(羧基荧光素)、TAMRA(羧四甲基罗丹明)和

Cy5(花青5)。FAM通道、TAMRA通道和Cy5通道的激发波长分别为450nm、535nm和643nm,最大发射波长为520nm、580nm和671nm。检测荧光强度时所有发射光谱在500-700nm范围内采集,酶标仪所使用的激发和发射狭缝宽度为10.0nm。

[0026] 本发明还保护上述任一所述的方法的应用,可为a1)或a2):

[0027] a1) 区分核酸碱基差异;

[0028] a2) 区分细胞或组织中核酸表达量差异。

[0029] 本发明还保护azo-PPE(+)的应用,可为a1)或a2)或a3):

[0030] a1) 区分核酸碱基差异;

[0031] a2) 区分细胞或组织中核酸表达量差异;

[0032] a3) 检测目的核酸。

[0033] 上述应用中,所述目的核酸可为目的DNA或目的miRNA。

[0034] 本发明还保护azo-PPE(+)、上述任一所述反应缓冲液和核酸酶的应用,可为a1)或a2)或a3):

[0035] a1) 区分核酸碱基差异;

[0036] a2) 区分细胞或组织中核酸表达量差异;

[0037] a3) 检测目的核酸。

[0038] 具体的,本发明保护azo-PPE(+)、含8-12mM(如8-10mM、10-12mM、8mM、10mM或12mM)  $MgCl_2$ 和0.8-1.2mM(如0.8-1.0mM、1.0-1.2mM、0.8mM、1.0mM或1.2mM) DTT的pH6.5-7.5(如pH6.5-7.0、pH7.0-7.5、pH6.5、pH7.0或pH7.5)、8-12mM(如8-10mM、10-12mM、8mM、10mM或12mM) Tris-HCl缓冲液和DNA外切酶的应用,可为A1)或A2)或A3):

[0039] A1) 区分目的DNA碱基差异;

[0040] A2) 区分细胞或组织中目的DNA表达量差异;

[0041] A3) 检测目的DNA。

[0042] 上述应用中,所述DNA外切酶具体可为DNA外切酶III,即Exo III。

[0043] 具体的,本发明保护azo-PPE(+)、含4-6mM(如4-5mM、5-6mM、4mM、5mM或6mM)  $MgCl_2$ 和0.8-1.2mM(如0.8-1.0mM、1.0-1.2mM、0.8mM、1.0mM或1.2mM) DTT的pH7.5-8.5(如pH7.5-8.0、pH8.0-8.5、pH7.5、pH8.0或pH8.5)、40-60mM(如40-50mM、50-60mM、40mM、50mM或60mM) Tris-HCl缓冲液和DSN的应用,可为B1)或B2)或B3):

[0044] B1) 区分目的miRNA碱基差异;

[0045] B2) 区分细胞或组织中目的miRNA表达量差异;

[0046] B3) 检测目的miRNA。

[0047] 上述任一所述的应用中,与目的核酸(目的miRNA或目的DNA)的碱基差异越大,则荧光强度越低。

[0048] 上述任一所述的应用中,目的核酸(目的miRNA或目的DNA)的表达量越高,则荧光强度越高。

[0049] 上文中,azo-PPE(+)是一种非荧光的水溶性阳离子共轭聚合物,它在可见光谱范围内具有较宽的吸收范围,最大吸收波长为451nm。与G0相比,azo-PPE(+)具有更宽的可见光吸收范围,并且可以通过一步直接合成方法轻松地在azo-PPE侧链上修饰上正电荷或负电荷基团,使其可以通过静电相互作用与不同的DNA探针结合。与常见的小分子淬灭剂

dabcyl相比, azo-PPE (+) 可以以更高的淬灭效率在可见光谱范围内淬灭各种有机荧光基团。此外, 强的静电引力机制可以提高聚合物的淬灭效率, 这使得azo-PPE (+) 可以与荧光基团标记的ssDNA或RNA缔合, 并通过无标记方法实现高效的荧光淬灭。

[0050] 本发明的实施例设计并合成了三种与靶标DNA或miRNA完全互补配对的荧光基团修饰的DNA探针。azo-PPE (+) 可以通过静电相互作用与荧光基团修饰的DNA探针结合, 并淬灭荧光基团的荧光。当加入靶标DNA或miRNA后, 在存在Exo III或DSN的情况下, 由于形成了双链结构, 荧光基团标记的DNA探针会被核酸酶消化成寡核苷酸或寡核苷酸片段。由此, 静电相互作用变弱, 导致DNA探针的荧光不能被淬灭, 从而形成了荧光信号的“turn on”现象。当靶标DNA或miRNA不存在时, 由于无法形成双链结构, 荧光修饰的DNA探针无法被核酸酶切割成寡核苷酸片段, 探针与azo-PPE (+) 之间的强静电作用导致荧光团的荧光被淬灭, 这样基于azo-PPE (+) 的广谱淬灭能力和核酸酶的辅助循环扩增, 可以同时灵敏的检测多种核酸。

[0051] 本发明设计并合成了广谱淬灭剂azo-PPE (+), 这种水溶性阳离子聚合物可以以很高的淬灭效率同时淬灭多种荧光素, 同时基于核酸酶辅助循环扩增技术提高了检测的灵敏度。本发明的实施例中以DNA和miRNA-21为模型靶标验证了体系的可行性。因为阳离子聚合物具有非常宽的光吸收范围, 可同时淬灭多种荧光, 这为多信号输出提供了可能。本发明基于核酸酶辅助循环扩增和阳离子聚合物构建了一种用于同时检测多种核酸的荧光生物传感器具有以下优势: (1) 可以实现对核酸的多重检测; (2) 可以区分核酸序列的单碱基差异, 具有非常好的特异性; (3) 在实际生物样本中表现优异, 抗干扰能力强; (4) 能够区分不同细胞系中miRNA表达量差异, 具有良好的临床应用前景。本发明具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0052] 图1为采用azo-PPE (+) 检测miRNA或DNA的原理示意图。

[0053] 图2为在不同条件下DNA检测体系的荧光发射光谱和miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0054] 图3为DNA检测的灵敏度分析。

[0055] 图4为miRNA检测的灵敏度分析。

[0056] 图5为DNA检测的特异性分析。

[0057] 图6为miRNA检测的特异性分析。

[0058] 图7为同时检测多种miRNA的结果。

[0059] 图8为实施例1步骤二建立的方法在检测生物样品(如血清)中miRNA含量的应用。

[0060] 图9为采用本发明方法和RT-qPCR方法对MCF-7、HeLa和MCF-10A细胞样品中miRNA-21的相对表达量进行比较。

## 具体实施方式

[0061] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述, 给出的实施例仅为了阐明本发明, 而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南, 并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0062] 下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法, 按照本领域内的文献所

描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0063] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0064] 下述实施例中总miRNA的提取采用MiRcute miRNA分离试剂盒(天根公司)进行。下述实施例中RT-qPCR采用Mir-XmiRNA第一链合成试剂盒(Takara)和2×SYBR Green qPCR Master混合试剂盒(Bimake)进行。下述实施例中紫外可见吸收光谱均采用ckman DU 800S3光谱仪(美国)记录。下述实施例中淬灭滴定实验均在荧光分光光度计(Horiba Jobin Yvon公司的产品,型号为SPEXFluorolog3-TCSPC)上进行滴定测量。下述实施例中所有反应均在恒温金属浴(中国天健生化技术(北京)有限公司)中进行。下述实施例中荧光测量实验均将样本置于96孔微孔板再采用高瑞士Tecan Infinite M1000 PRO多功能酶标仪检测。

[0065] Exo III、RNase抑制剂(RRI)和无RNase水均为Takara公司的产品。DSN为Evrogen公司的产品。Trizol为Invitrogen公司的产品。

[0066] 人血清由北京大学深圳医院(中国深圳)捐赠。人血清的捐赠者均知情同意。

[0067] 下述实施例中的阳离子共轭聚合物为azo-PPE(+)。azo-PPE(+)可以通过静电相互作用与荧光基团修饰的核酸探针结合,并淬灭荧光团的荧光。azo-PPE(+)的制备方法参考如下文献:Wu Y,Tan Y,Wu J,et al.Fluorescence Array-Based Sensing of Metal Ions Using Conjugated Polyelectrolytes[J].Acs Appl Mater Interfaces,2015,7(12):6882。

[0068] 下述实施例中,所有经HPLC纯化的DNA和miRNA均由生工生物工程(中国上海)合成,其核苷酸序列详见表1。

[0069] 表1

[0070]

名称	核苷酸序列(5'—3')
DNA probe 1(P1)	FAM-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA <sup>a)</sup>
DNA target 1(T1)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGATTTTTTT
DNA target 4(T4)	TAGCTTATCAGCCTGATGTTGATTTTTTT <sup>b)</sup>
DNA target 5(T5)	TAACTTATCCGACTGATGTTGATTTTTTT <sup>b)</sup>
DNA target 6(T6)	TAACTTATCCGACTAATGTTGATTTTTTT <sup>b)</sup>
DNA probe 2(P2)	TAMRA-AACTATACAACCTACTACCTCA <sup>a)</sup>
DNA target 2(T2)	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTTTTT
DNA probe 3(P3)	Cy5-CCATCTTTACCAGACAGTGTTA <sup>a)</sup>
DNA target 3(T3)	TAACACTGTCTGGTAAAGATGGTTTTTTT
miRNA-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miRNA-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
Let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
Let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU <sup>c)</sup>
Let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU <sup>c)</sup>

[0071] 注:<sup>a)</sup>FAM是羧基荧光素;TAMRA是羧四甲基罗丹明;Cy5是花青5。<sup>b)</sup>靶标4、靶标5和靶标6中标记为斜体的碱基代表与靶标1中的不同。<sup>c)</sup>Let-7miRNA家族中标记为斜体的碱基代表与Let-7a中的碱基不同。

[0072] 实施例1、采用azo-PPE(+)检测miRNA或DNA的方法的建立

[0073] 一、采用azo-PPE(+)和DNA外切酶III(Exo III)检测目的DNA的方法的建立

[0074] 本发明的发明人经过大量实验,建立了采用azo-PPE(+)和Exo III检测目的DNA的方法,其基本原理如下:靶标DNA和荧光基团标记的探针形成双链结构,探针会被Exo III消化成寡核苷酸或寡核苷酸片段(Exo III可以从双链DNA的3'平末端或粘性末端分别去除单个核苷酸,随后释放ssDNA,其不需要特定的识别位点),由此,静电相互作用变弱,导致探针的荧光不能被淬灭,从而形成了荧光信号的“turn on”现象;当靶标DNA不存在时,由于无法形成双链结构,探针无法被Exo III切割成寡核苷酸片段,探针与azo-PPE(+)之间的强静电作用导致荧光基团的荧光被淬灭。因此,基于azo-PPE(+)的广谱淬灭能力和Exo III,可以同时灵敏地检测多种目的DNA。

[0075] 具体步骤如下:

[0076] 1、设计并人工合成探针,探针的核苷酸序列与目的DNA的核苷酸序列反向互补。探针的5'末端进行荧光标记。

[0077] 如果检测多个目的DNA,则合成多个探针且各个探针的荧光标记完全不同。

[0078] 2、制备反应体系1。反应体系1为100uL,由探针、细胞的基因组DNA(约500ng)、反应缓冲液1和Exo III(约5U)组成。该反应体系1中,探针的浓度为100nM。

[0079] 反应缓冲液1:含10mM MgCl<sub>2</sub>和1mM DTT的pH7.0、10mM Tris-HCl缓冲液。

[0080] 3、完成步骤2后,取所述反应体系1,37℃孵育30min。

[0081] 4、完成步骤3后,加入azo-PPE(+),混匀,得到体系1;体系1中,azo-PPE(+)的浓度为3.6μM。

[0082] 5、完成步骤4后,取所述体系1,室温静置5min,然后采用酶标仪测量荧光强度。

[0083] 根据荧光强度判断是否含有目的DNA或目的DNA的含量。

[0084] 二、采用azo-PPE(+)和DSN检测miRNA的方法的建立

[0085] 本发明的发明人经过大量实验,建立了采用azo-PPE(+)和DSN检测miRNA的方法,其基本原理如下:miRNA和荧光基团标记的探针形成RNA-DNA杂交双链结构,DSN可以消化RNA-DNA杂交双链中的DNA以释放RNA并与另一个ssDNA重新杂交,从而实现信号扩增,由此,静电相互作用变弱,导致探针的荧光不能被淬灭,从而形成了荧光信号的“turn on”现象;当miRNA不存在时,由于无法形成双链结构,DSN无法消化探针,探针与azo-PPE(+)之间的强静电作用导致荧光基团的荧光被淬灭。因此,基于azo-PPE(+)的广谱淬灭能力和DSN,可以同时灵敏地检测多种miRNA。

[0086] 具体步骤如下:

[0087] 1、设计并人工合成探针,探针的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补。探针的5'末端进行荧光标记。

[0088] 如果检测多个miRNA,则合成多个探针且各个探针的荧光标记完全不同。

[0089] 2、制备反应体系2。反应体系2为100uL,由探针、细胞的总miRNA(约500ng)、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)和RRI(约8U)组成。该反应体系2中,探针的浓度为100nM。

[0090] 反应缓冲液2:含5mM MgCl<sub>2</sub>和1mM DTT的pH8.0、50mM Tris-HCl缓冲液。

[0091] 3、完成步骤2后,取所述反应体系2,45℃孵育2h。

[0092] 4、完成步骤3后,加入azo-PPE(+),混匀,得到体系2;体系2中,azo-PPE(+)的浓度

为3 $\mu$ M。

[0093] 5、完成步骤4后,取所述体系2,室温静置5min,然后采用酶标仪测量荧光强度。

[0094] 根据荧光强度判断是否含有miRNA或miRNA的含量。

[0095] 上述方法的原理图见图1。

[0096] 实施例2、实施例1建立的方法的可行性分析

[0097] 本实施例选择P1作为模型探针,按照实施例1建立的方法探究生物传感器检测靶标DNA T1和靶标miRNA-21的可行性。

[0098] 一、按照实施例1步骤一建立的方法在不同条件下获得DNA检测体系的荧光发射光谱

[0099] 条件1:反应体系1为100uL,由反应缓冲液1组成。

[0100] 条件2:反应体系1为100uL,由探针P1和反应缓冲液1组成;反应体系1中,探针P1的浓度为100nM。体系1中,azo-PPE (+) 的浓度为3.6 $\mu$ M。

[0101] 条件3:反应体系1为100uL,由探针P1、反应缓冲液1和靶标DNA T1组成;反应体系1中,探针P1和靶标DNA T1的浓度均为100nM。体系1中,azo-PPE (+) 的浓度为3.6 $\mu$ M。

[0102] 条件4:反应体系1为100uL,由探针P1、反应缓冲液1和Exo III (约5U) 组成;反应体系1中,探针P1的浓度为100nM。体系1中,azo-PPE (+) 的浓度为3.6 $\mu$ M。

[0103] 条件5:反应体系1为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III (约5U) 和靶标DNA T1组成;反应体系1中,探针P1和靶标DNA T1的浓度均为100nM。体系1中,azo-PPE (+) 的浓度为3.6 $\mu$ M。

[0104] 检测结果见图2中(a) (缓冲液为条件1,不存在T1不存在Exo III为条件2,存在T1不存在Exo III为条件3,不存在T1存在Exo III为条件4,存在T1存在Exo III为条件5)。

[0105] 二、按照实施例1步骤二建立的方法在不同条件下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱

[0106] 条件a:反应体系2为100uL,由反应缓冲液2组成。

[0107] 条件b:反应体系2为100uL,由探针P1和反应缓冲液2组成;反应体系2中,探针P1的浓度为100nM。体系2中,azo-PPE (+) 的浓度为3.0 $\mu$ M。

[0108] 条件c:反应体系2为100uL,由探针P1、反应缓冲液2和miRNA-21组成;反应体系2中,探针P1的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。体系2中,azo-PPE (+) 的浓度为3.0 $\mu$ M。

[0109] 条件d:反应体系2为100uL,由探针P1、反应缓冲液2、DSN (约0.5U) 和RRI (约8U) 组成;反应体系2中,探针P1的浓度为100nM。体系2中,azo-PPE (+) 的浓度为3.0 $\mu$ M。

[0110] 条件e:反应体系2为100uL,由探针P1、反应缓冲液2、DSN (约0.5U) 、RRI (约8U) 和miRNA-21组成;反应体系2中,探针P1的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。体系2中,azo-PPE (+) 的浓度为3.0 $\mu$ M。

[0111] 检测结果见图2中(b) (缓冲液为条件a,不存在miRNA-21不存在DSN为条件b,存在miRNA-21不存在DSN为条件c,不存在miRNA-21存在DSN为条件d,存在miRNA-21存在DSN为条件e)。

[0112] 结果表明,与不添加核酸酶(DSN或Exo III) 的体系相比,加入100nM的T1或10nM的miRNA-21后,核酸酶辅助的靶标循环扩增分别使体系的荧光强度增加了5.7倍和4.8倍。由此可见,本发明制备的生物传感器可以灵敏的检测DNA和miRNA。

[0113] 实施例3、灵敏度分析

[0114] 一、DNA检测的灵敏度分析

[0115] 按照实施例1步骤一建立的方法在不同反应体系下获得DNA检测体系的荧光发射光谱。

[0116] 反应体系1-1:反应体系1-1为100uL,由探针P1、反应缓冲液1和Exo III(约5U)组成;反应体系1-1中,探针P1的浓度为100nM。

[0117] 反应体系1-2:反应体系1-2为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-2中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为40nM。

[0118] 反应体系1-3:反应体系1-3为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-3中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为50nM。

[0119] 反应体系1-4:反应体系1-4为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-4中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为100nM。

[0120] 反应体系1-5:反应体系1-5为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-5中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为200nM。

[0121] 反应体系1-6:反应体系1-6为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-6中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为500nM。

[0122] 反应体系1-7:反应体系1-7为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-7中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为1000nM。

[0123] 反应体系1-8:反应体系1-8为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系1-8中,探针P1的浓度为100nM,靶标DNA T1的浓度为2000nM。

[0124] 检测结果见图3((a)为随着靶标DNA T1浓度的增加,体系的荧光强度变化;(b)为靶标DNA T1浓度与520nm处的荧光强度的关系,插图为荧光强度与靶标DNA T1浓度之间的线性关系)。结果表明,随着靶标DNA T1的浓度从0nM增加到2000nM,荧光强度也逐渐增加,荧光强度与靶标DNA T1的浓度在0-250pM之间具有良好的线性相关性( $R^2=0.996$ )。根据3 $\sigma$ 规则计算的检出限为8.3pM。

[0125] 二、miRNA检测的灵敏度分析

[0126] 按照实施例1步骤二建立的方法在不同反应体系下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0127] 反应体系2-1:反应体系2-1为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)和RRI(约8U)组成。反应体系2-1中,探针P2的浓度为100nM。

[0128] 反应体系2-2:反应体系2-2为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-2中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为40pM。

[0129] 反应体系2-3:反应体系2-3为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-3中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为50pM。

[0130] 反应体系2-4:反应体系2-4为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-4中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为100pM。

[0131] 反应体系2-5:反应体系2-5为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-5中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为200pM。

[0132] 反应体系2-6:反应体系2-6为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI

(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-6中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为1nM。

[0133] 反应体系2-7:反应体系2-7为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-7中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为5nM。

[0134] 反应体系2-8:反应体系2-2为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系2-8中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为10nM。

[0135] 检测结果见图4(a)为随着Let-7a浓度的增加,体系的荧光强度变化;(b)为Let-7a浓度与580nm处的荧光强度的关系,插图为荧光强度与Let-7a浓度之间的线性关系)。结果表明,随着Let-7a的浓度从0nM增加到10nM,荧光强度也逐渐增加,荧光强度与Let-7a的浓度在0-150pM之间具有良好的线性相关性( $R^2=0.955$ )。根据 $3\sigma$ 规则计算的检出限为2.4pM。

[0136] 实施例4、特异性分析

[0137] 一、DNA检测的特异性分析

[0138] 按照实施例1步骤一建立的方法在不同反应体系下获得DNA检测体系的荧光发射光谱。

[0139] 反应体系3-1:反应体系3-1为100uL,由探针P1、反应缓冲液1和Exo III(约5U)组成;反应体系1中,探针P1的浓度为100nM。

[0140] 反应体系3-2:反应体系3-2为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T1组成;反应体系3-2中,探针P1和靶标DNA T1的浓度均为100nM。

[0141] 反应体系3-3:反应体系3-3为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T4组成;反应体系3-3中,探针P1和靶标DNA T4的浓度均为100nM。

[0142] 反应体系3-4:反应体系3-4为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T5组成;反应体系3-4中,探针P1和靶标DNA T5的浓度均为100nM。

[0143] 反应体系3-5:反应体系3-5为100uL,由探针P1、反应缓冲液1、Exo III(约5U)和靶标DNA T6组成;反应体系3-5中,探针P1和靶标DNA T6的浓度均为100nM。

[0144] 检测结果见图5(blank为反应体系3-1,T1为反应体系3-2,T4为反应体系3-3,T5为反应体系3-4,T6为反应体系3-5,靶标DNA T1为正常靶标,靶标DNA T4为单碱基错配,靶标DNA T5为双碱基错配,靶标DNA T6为三碱基错配)。结果表明,只有靶标DNA T1产生了显著的荧光信号。由此可见,该生物传感器具有较高的选择性,其可以区分DNA的单碱基错配。

[0145] 二、miRNA检测的特异性分析

[0146] 按照实施例1步骤二建立的方法在不同反应体系下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0147] 反应体系4-1:反应体系4-1为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)和RRI(约8U)组成。反应体系4-1中,探针P2的浓度为100nM。

[0148] 反应体系4-2:反应体系4-2为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系4-2中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为10nM。

[0149] 反应体系4-3:反应体系4-3为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7d组成;反应体系4-3中,探针P2的浓度为100nM,Let-7d的浓度为10nM。

[0150] 反应体系4-4:反应体系4-4为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7e组成;反应体系4-4中,探针P2的浓度为100nM,Let-7e的浓度为10nM。

[0151] 反应体系4-5:反应体系4-5为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和miRNA-21组成;反应体系4-5中,探针P2的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0152] 反应体系4-6:反应体系4-6为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和miRNA-141组成;反应体系4-6中,探针P2的浓度为100nM,miRNA-141的浓度为10nM。

[0153] 检测结果见图6(blank为反应体系4-1,Let-7a为反应体系4-2,Let-7d为反应体系4-3,Let-7e为反应体系4-4,miRNA-21为反应体系4-5,miRNA-141为反应体系4-6,Let-7e为单碱基错配,Let-7d为双碱基错配)。结果表明,只有let-7a产生了显著的荧光信号,let-7a的荧光强度高于let-7e和let-7d。由此可见,该生物传感器具有较高的选择性,其可以区分miRNA的单碱基错配。

[0154] 传感器优异的特异性归因于DSN或Exo III的识别能力和azo-PPE(+)的猝灭机理。

[0155] 实施例5、采用实施例1步骤二建立的方法同时检测多种miRNA

[0156] 为了测定生物传感器同时检测多种miRNA能力,进行如下实验。

[0157] 样品1:含有10nM的miRNA-21、10nM的miRNA-141和10nM的let-7a的样品

[0158] 样品2:含有10nM的miRNA-141和10nM的let-7a的样品

[0159] 样品3:含有10nM的miRNA-21和10nM的miRNA-141的样品

[0160] 样品4:含有10nM的miRNA-21和10nM的let-7a的样品

[0161] 样品5含有10nM的miRNA-141的样品

[0162] 样品6含有10nM的let-7a的样品

[0163] 样品7含有10nM的miRNA-21的样品

[0164] 按照实施例1步骤二建立的方法检测每个样品,获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0165] 其中,反应体系为100uL,由探针P1、探针P2、探针P3、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和样品组成。反应体系中,探针P1、探针P2和探针P3的浓度均为100nM。体系2中,azo-PPE(+)的浓度为9 $\mu$ M。

[0166] 检测结果见图7( $F_0$ 为不存在miRNA复合样品的情况下体系的荧光强度; $F$ 为存在miRNA复合样品的情况下体系的荧光强度)。结果表明,当体系存在一种或随机两种类型的miRNA时,才能检测到溶液中相应探针的荧光强度。当所有miRNA靶标都存在时,可以检测到所有三种荧光探针的荧光。因此,传感器对特定miRNA的信号响应不受其它miRNA存在的影响。由此可见,该生物传感器具有优异的、同时检测多重核酸的能力。

[0167] 实施例6、实施例1步骤二建立的方法在检测生物样品(如血清)中miRNA含量的应用

[0168] 1、按照实施例1步骤二建立的方法检测不同反应体系下10%人血清,获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0169] 反应体系5-1:反应体系5-1为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)和RRI(约8U)组成。反应体系5-1中,探针P2的浓度为100nM。

[0170] 反应体系5-2:反应体系5-2为100uL,由探针P2、反应缓冲液2、DSN(约0.5U)、RRI(约8U)和Let-7a组成;反应体系5-2中,探针P2的浓度为100nM,Let-7a的浓度为40pM、50pM、100pM、200pM或300pM。

[0171] 检测结果见图8。结果表明,在10%人血清中荧光强度同样随着let-7a浓度的增加而增加。经计算得出let-7a在10%人血清中的LOD为4.1pM,与缓冲液(即反应体系5-1)中的结果相近。

[0172] 2、在40、100和150pM的浓度下测试了let-7a与人血清等体积注射的回收率实验;即在浓度为40、100和150pM浓度下,在10%血清环境中用本发明方法进行检测,检测结果与理论值进行比较分析)

[0173] 结果表明,该生物传感器的标准添加回收率为97.93%-107.61%。

[0174] 由此可见,该生物传感器具有出色的抗干扰能力,可以检测复杂生物样品中miRNA。

[0175] 实施例7、不同细胞系miRNA检测分析

[0176] 待测细胞为HeLa细胞、MCF-7细胞或MCF-10A细胞。

[0177] 1、将待测细胞接种至Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)(该培养基含10%的胎牛血清),37℃、5%CO<sub>2</sub>培养至贴壁。

[0178] 2、完成步骤1后,用PBS缓冲液将细胞( $1 \times 10^6$ 个)洗涤2次,加入1mL Trizol试剂,孵育5min(目的为完全消化细胞);之后加入氯仿,异丙醇和乙醇提取miRNA;离心后,将干燥后的miRNA溶于DEPC水中,用Nanodrop测定浓度,-80℃保存。

[0179] 3、按照实施例1步骤二建立的方法检测待测细胞的miRNA中miRNA-21的荧光强度。

[0180] 4、采用RT-qPCR方法检测待测细胞中miRNA-21的荧光强度。

[0181] 检测结果见图9。结果表明,按照实施例1步骤二建立的方法,在相同miRNA总量下,MCF-7细胞的荧光强度分别是MCF-10A和HeLa细胞的3倍和2倍;这与RT-qPCR结果完全一致。

[0182] 上述结果表明,miRNA-21在MCF-7细胞中相对于MCF-10A和HeLa细胞高表达,这与文献(Zhang J,Wu D,Chen Q,et al.Label-free microRNA detection based on terbium and duplex-specific nuclease assisted target recycling[J].Analyst.2015,140(15):5082-5089.)结果一致,由此可见本发明提供的方法具有良好的实际应用潜力。

[0183] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

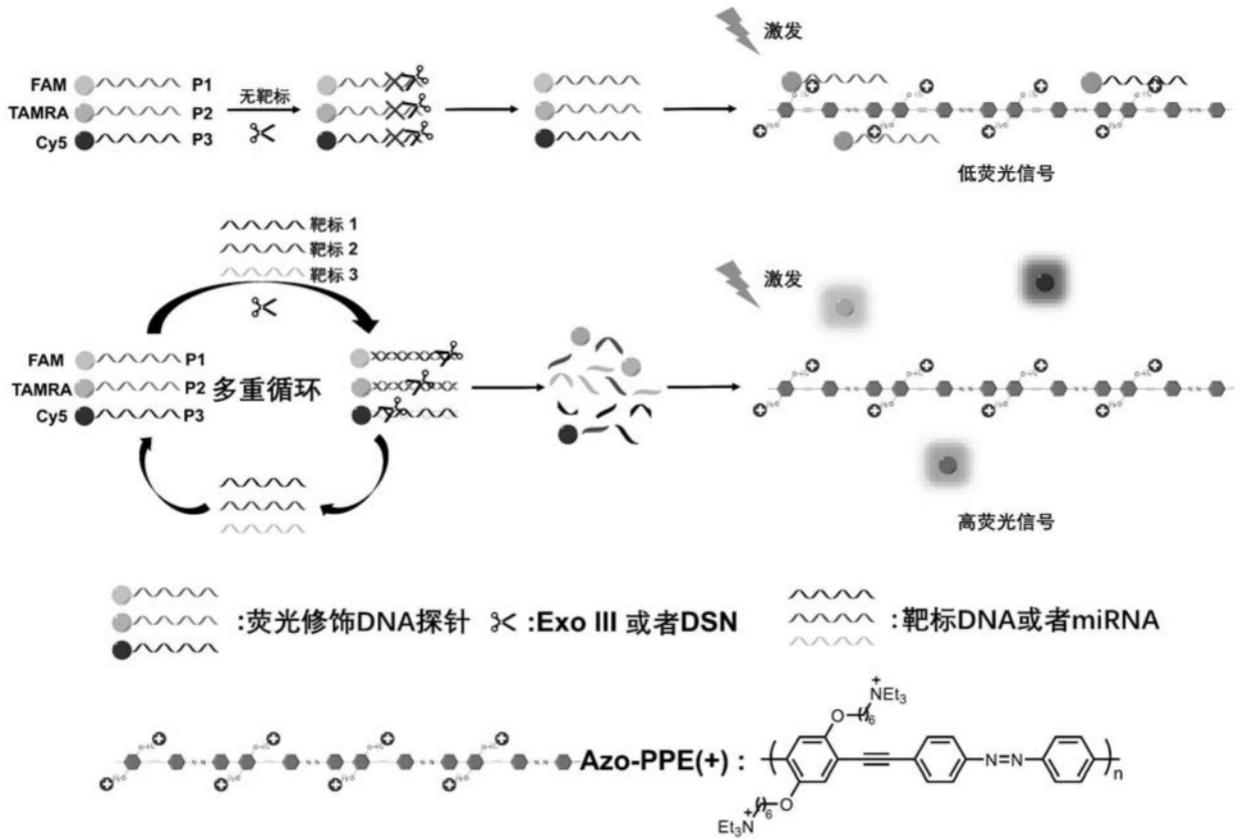


图1

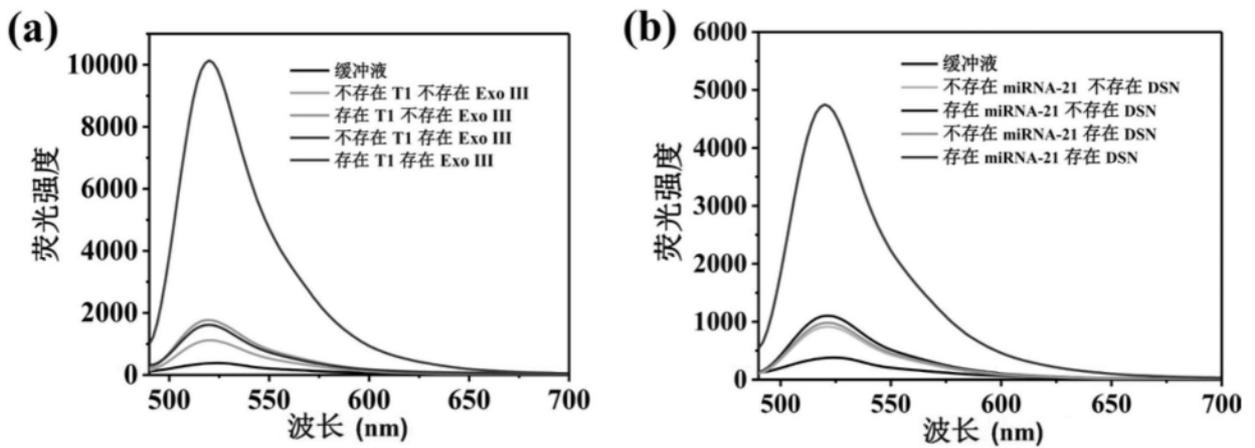


图2

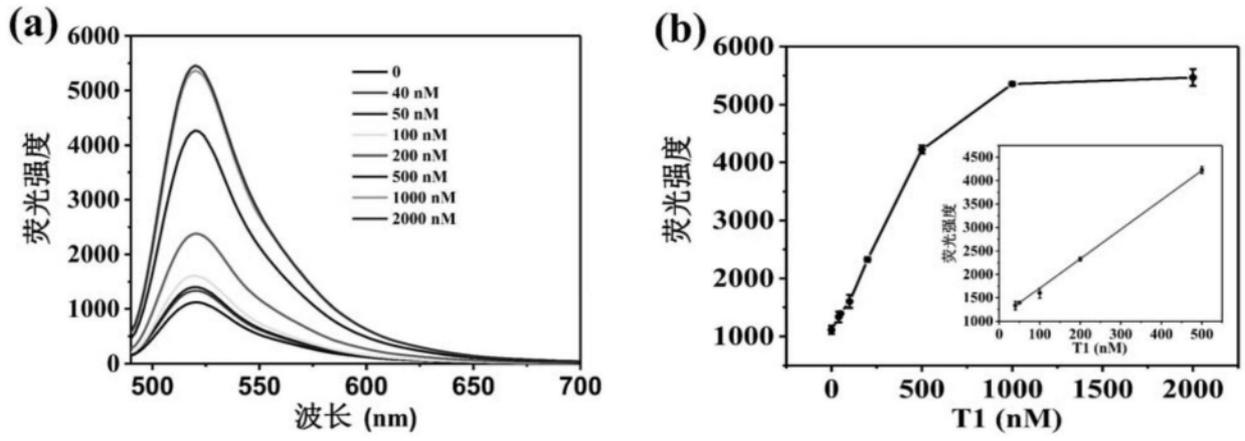


图3

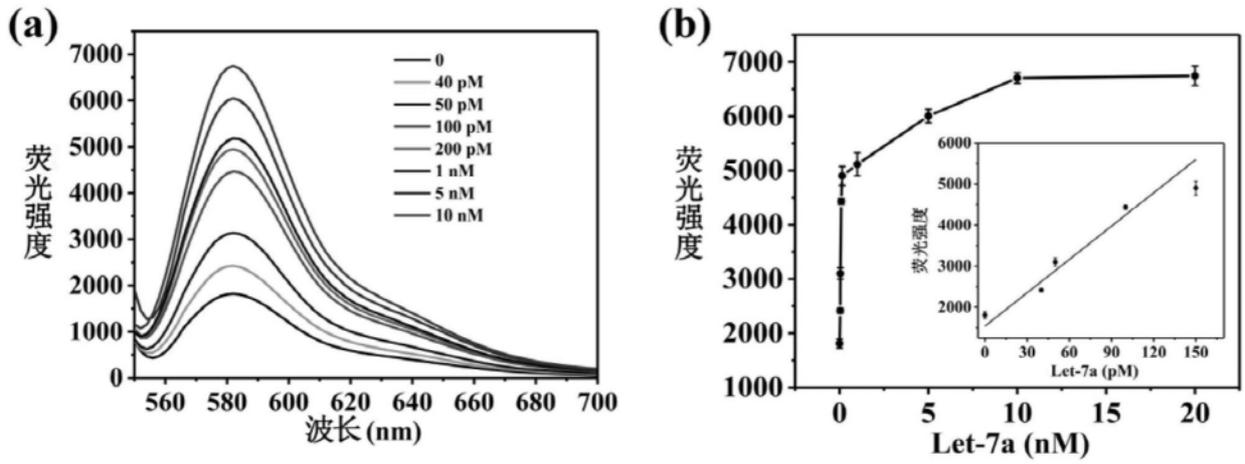


图4

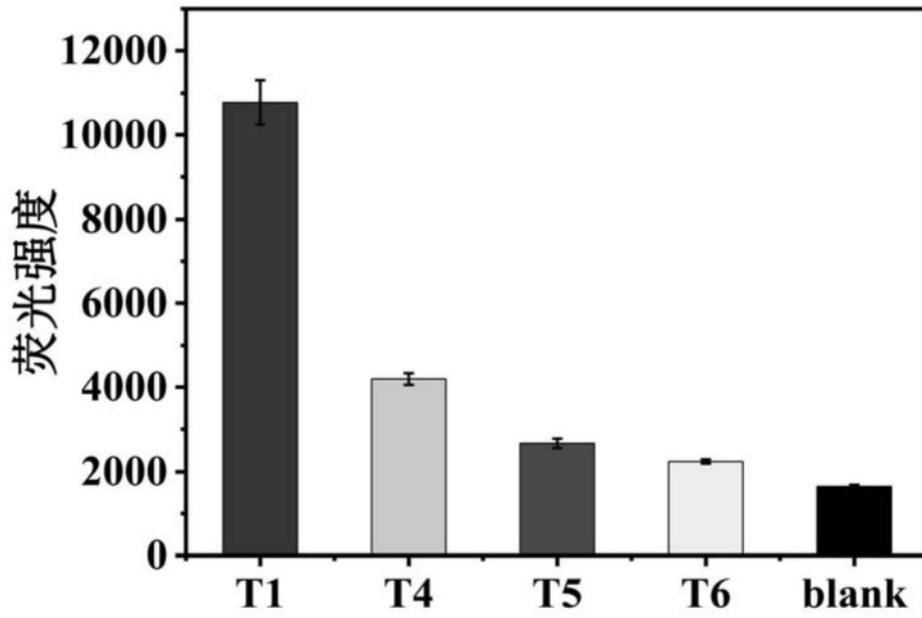


图5

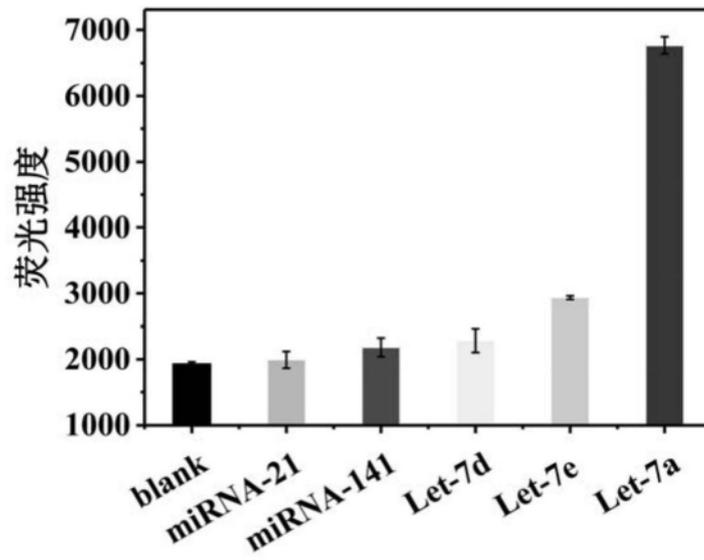


图6

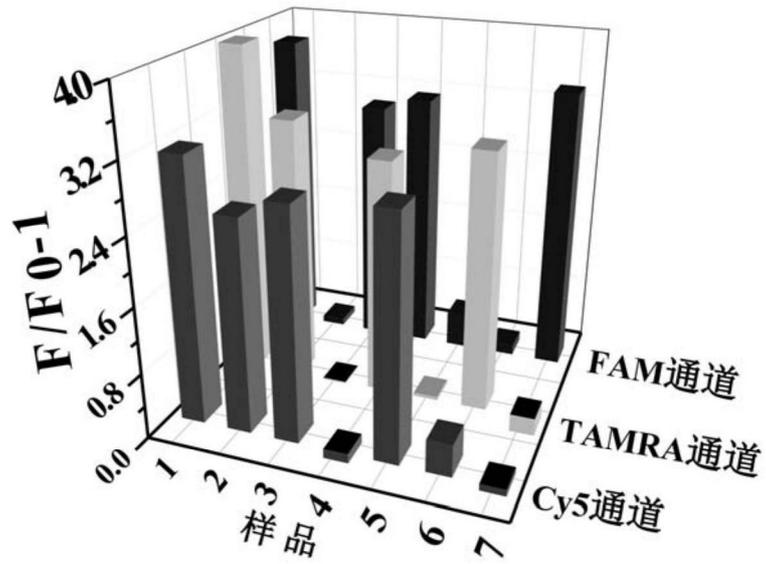


图7

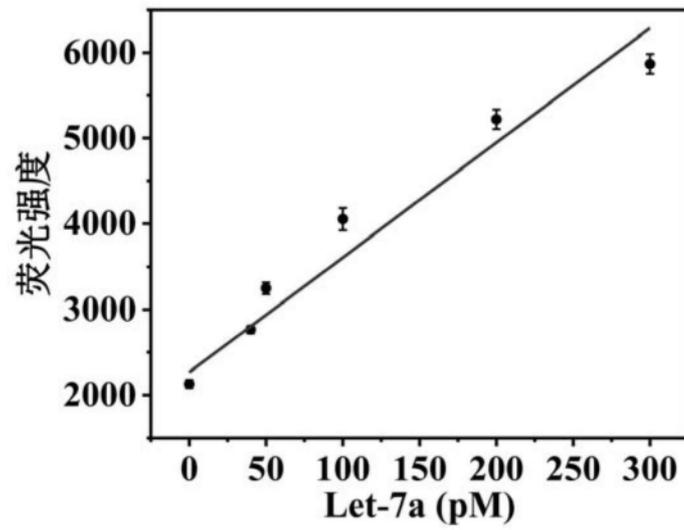


图8

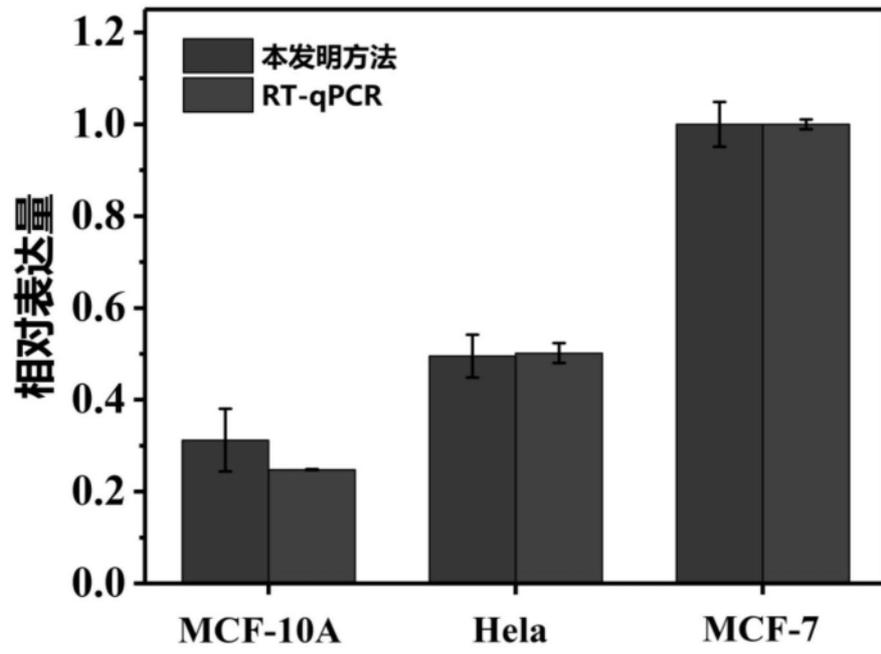


图9