



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102321765 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201110299143. 3

(22) 申请日 2011. 09. 29

(66) 本国优先权数据

201110265329. 7 2011. 09. 08 CN

(73) 专利权人 厦门基科生物科技有限公司

地址 361000 福建省厦门市思明区厦大海滨路 48 号 102 室

(72) 发明人 王小波

(74) 专利代理机构 泉州市诚得知识产权代理事

务所(普通合伙) 35209

代理人 方惠春

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101845517 A, 2010. 09. 29, 全文.

EP 1805199 B1, 2011. 01. 05, 全文.

CN 101033486 A, 2007. 09. 12, 全文.

李莉等. 茎环引物的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 miR-155 表达及其临床初步应用. 《检验医学》. 2010, 第 25 卷(第 4 期), 296-300.

Caifu Chen et al.. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. 《Nucleic Acids Research》. 2005, 第 33 卷(第 20 期), 1-9.

审查员 刘涛

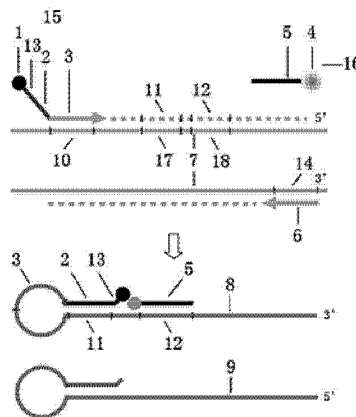
权利要求书 2 页 说明书 6 页  
序列表 3 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种实时荧光 PCR 方法及用途

(57) 摘要

本发明涉及一种实时荧光 PCR 方法及用途, 该方法仅需要一对上下游引物和一条检测探针即可, 其中上游引物和检测探针分别进行单标记。上游引物包含三个区域, 特异引物序列 3、特异检测序列 2 及附加序列 13; 下游引物按照一般的引物设计原则设计即可; 检测探针包括特异检测序列 5。特异检测序列 2 与上游引物的延伸序列形成唯一的颈环结构, 该结构由特异检测序列 2 引导形成, 同时检测探针杂交于相邻位置。本方法的特异性好, 选择性强, 探针和引物设计简单灵活, 易于纯化, 产率高, 可用于实时监测扩增产物量实现目标序列的定性及定量分析, 且可进行熔解曲线分析, 特别适用于检测 SNP 或突变位点, 区分单碱基差异能力强。



1. 一种实时荧光 PCR 检测方法,采用上游引物(15)、下游引物(6)和一条检测探针(16)进行检测,其特征在于,上游引物(15)的序列为:5' 修饰基团(1)–附加序列(13)–特异检测序列(2)–特异引物序列(3),所述特异引物序列(3)为与模板上目标序列(10)反向互补的序列,所述特异检测序列(2)为序列(11)的反向互补序列,其中序列(11)与序列(17)互补杂交,所述附加序列(13)为任意的不与模板杂交的核酸附加序列,所述修饰基团(1)为荧光基团或者淬灭基团;所述检测探针(16)为:3' 修饰基团(4)–特异检测序列(5),所述特异检测序列(5)为序列(12)的反向互补序列,其中序列(12)与序列(18)反向互补,序列(17)为模板上目标序列(10)的延伸序列并远离模板的3'端,序列(18)为模板上序列(17)的延伸序列并远离目标序列(10)的一端,所述修饰基团(4)为淬灭基团或者荧光基团,所述目标序列(10)与序列(17)之间相隔0–150个碱基,序列(17)与序列(18)之间相隔0–10个碱基,特异检测序列(2)与上游引物延伸序列形成唯一的颈环结构且该颈环结构的T<sub>m</sub>值范围为50–72度,所述颈环结构环的碱基数在150碱基内;检测探针(16)杂交于所述颈环结构的相邻位置,所述相邻位置为相邻0–10个碱基,杂交T<sub>m</sub>值50–72度,所述下游引物(6)杂交于目标序列(14)的位置。

2. 权利要求1所述的实时荧光 PCR 检测方法,其特征在于,所述修饰基团(4)的荧光基团为受体荧光基团或者供体荧光基团。

3. 权利要求1所述的实时荧光 PCR 检测方法,其特征在于,所述修饰基团(1)的荧光基团为受体荧光基团或者供体荧光基团。

4. 权利要求1或2或3所述的实时荧光 PCR 检测方法,其特征在于,序列(11)或者(12)包括了SNP或突变位点。

5. 权利要求1所述的实时荧光 PCR 检测方法,其特征在于,目标序列(10)与序列(17)之间相隔间隔为0–50个碱基;序列(17)与序列(18)之间相隔间隔为0–6个碱基。

6. 一个试剂盒,包括权利要求1至3任一所述的实时荧光 PCR 检测方法中所用到的上游引物(15)、下游引物(6)和检测探针(16)。

7. 权利要求1至5任一所述的实时荧光 PCR 检测方法用于实时监测扩增产物量实现目标序列的定性及定量分析的用途。

8. 权利要求1至5任一所述的实时荧光 PCR 检测方法用于熔解分析的用途。

9. 权利要求8所述的用于熔解分析的用途,为用于检测SNP或突变位点的用途。

10. 一种实时荧光 PCR 上游引物和探针制备方法,其步骤为,选定模板的目标序列(10),序列(11),序列(12),一段不与模板杂交的核酸附加序列(13),上游引物的理论序列即为:5' 修饰基团(1)–附加序列(13)–序列(11)的反向互补序列(2)–目标序列(10)的反向互补序列(3),所述修饰基团(1)为荧光基团或者淬灭基团;所述检测探针序列的理论序列为3' 修饰基团(4)–序列(12)的反向互补序列(5),其中序列(12)与序列(18)反向互补,序列(17)为模板上目标序列(10)的延伸序列并远离模板的3'端,序列(18)为模板上序列(17)的延伸序列并远离目标序列(10)的一端,所述修饰基团(4)为淬灭基团或者荧光基团;根据所述的上游引物的理论序列和检测探针引物的理论序列合成即可,所述目标序列(10)与序列(17)之间相隔0–150个碱基,序列(17)与序列(18)之间相隔0–10个碱基,序列(2)与上游引物延伸序列形成唯一的颈环结构且该颈环结构的T<sub>m</sub>值范围为50–72度,所述颈环结构环的碱基数在150碱基内;检测探针(16)杂交于所述颈环结构

的相邻位置,所述相邻位置为相邻 0-10 个碱基,杂交  $T_m$  值 50-72 度,所述序列(11)与序列(17)互补杂交。

11. 权利要求 10 所述的实时荧光 PCR 上游引物和探针制备方法,其特征在于:目标序列(10)与序列(17)之间相隔 0-50 个碱基;序列(11)与序列(12)之间相隔 0-6 个碱基。

12. 权利要求 10 所述的实时荧光 PCR 上游引物和探针制备方法,其特征在于,所述修饰基团(4)的荧光基团为受体荧光基团或者供体荧光基团,所述修饰基团(1)的荧光基团为供体荧光基团或者受体荧光基团。

13. 权利要求 10 所述的实时荧光 PCR 上游引物和探针制备方法,其特征在于,所述修饰基团(1)的荧光基团为受体荧光基团或者供体荧光基团。

## 一种实时荧光 PCR 方法及用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 PCR 方法,尤其涉及一种实时荧光 PCR 方法。

### 背景技术

[0002] 自 1985 年聚合酶链式反应(PCR)提出以来,其以惊人的速度发展,目前,PCR 技术无论在生命科学基础研究还是在临床诊断中都已得到极其广泛的应用。依赖 PCR 的检测技术主要分为两类,一类是异相检测技术,另一类是均相检测技术。异相检测技术包括琼脂糖凝胶电泳、毛细管电泳、芯片杂交等检测方法,均相检测技术主要是指实时荧光检测技术。实时荧光 PCR 检测技术是在 PCR 扩增过程中实时监测产物的形成情况,无需开管操作,快速方便,且可以获取模板的初始拷贝数信息。

[0003] 实时荧光 PCR 按采用的荧光技术分为两类:一类为荧光染料法,另一类为荧光探针法。荧光染料不能分辨特异及非特异产物,故特异性不佳;荧光探针特异识别待检测的目标序列,与之杂交并释放荧光信号,特异性高。目前常见的荧光检测探针有 Taqman 探针、分子信标、双杂交探针、Scorpion 探针等。

[0004] Taqman 探针是最早提出并应用于实时 PCR 体系中的检测探针,也称水解探针,在 PCR 的退火阶段杂交于特异的目标序列并在其后的引物延伸过程中被 Taq 聚合酶水解使其两端的荧光基团和淬灭基团分离从而释放荧光信号。Taqman 探针设计简单,检测体系易于优化,但其荧光背景信号较高,且 Taqman 探针的单碱基区分能力有限,在 SNP 分型中经常会出现非特异检测信号。分子信标是具有颈环(Stem-loop)结构的一种双标记探针,无目标序列存在时,其自身会折叠成颈环结构从而使两端的荧光基团和淬灭基团相互接触淬灭荧光信号,当目标序列存在时,其会优先杂交于特异靶序列,两端基团分开释放荧光信号。分子信标特异性更高、单碱基区分能力强,背景荧光低,但其设计有一定的难度,且纯化较困难。双杂交探针由两条相邻的标记探针所组成,同时杂交于靶序列上相邻的位置,杂交后可通过荧光能量共振转移实现荧光信号的释放且可在 PCR 后进行熔解分析。PCR 过程中两条探针与模板的杂交对聚合酶的延伸起到较大的阻碍作用,扩增效率降低,不利于定量实验,此外,两条探针同时杂交于靶序列需要较长的时间形成三聚体结构,退火时间较长,不利于进行快速 PCR。Scorpion 探针是在分子信标的 3' 端经“连接臂”连接一段引物形成的特异检测探针,因 PCR 延伸反应时不能延伸至分子信标,所以非特异扩增产物便无荧光信号。包含发夹结构的 PCR 产物在退火时形成分子内杂交,发夹结构被破坏,从而释放荧光信号。这种方法反应速度快、信噪比高,但 Scorpion 探针设计及合成复杂,成本较高。

[0005] CN101033486B 公布一种荧光 PCR 检测方法,采用上下游引物和一条探针进行检测,该探针设计上与上游引物互补,无扩增产物出现时,上游引物上的荧光基团与探针上的淬灭基团靠近荧光被淬灭,扩增产物出现时,上游引物上的荧光基团与探针上的淬灭基团分开释放荧光信号,从而实现实时荧光 PCR,该方法的特异性差,出现非特异扩增时,仍然能检测到荧光信号。

[0006] 发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是：提供一种特异性好，选择性强的实时荧光 PCR 检测方法。为解决上述问题，本发明提供一种实时荧光 PCR 检测方法，采用上游引物 15、下游引物 6 和一条检测探针 16 进行检测，其特征在于，上游引物 15 的序列为：修饰基团 1—附加序列 13 和特异检测序列 2—特异引物序列 3，所述特异引物序列 3 为与模板上目标序列 10 反向互补的序列，所述特异检测序列 2 为序列 11 的反向互补序列，其中序列 11 与序列 17 反向互补，所述附加序列 13 为任意的不与模板杂交的核酸附加序列，所述修饰基团 1 为荧光基团或者淬灭基团或者供体荧光基团或者受体荧光基团；所述检测探针 16 为修饰基团 4—特异检测序列 5，所述特异检测序列 5 为序列 12 的反向互补序列，其中序列 12 与序列 18 反向互补，序列 17 为模板上目标序列 10 的延伸序列并远离模板的 3' 端，序列 18 为模板上序列 17 的延伸序列并远离目标序列 10 的一端，所述修饰基团 4 为淬灭基团或者荧光基团或者受体荧光基团或者供体荧光基团。

[0008] 目标序列 10 与序列 17 之间相隔 0-150 个碱基，优选间隔为 0-50 个碱基；序列 17 与序列 18 之间相隔 0—10 个碱基，优选间隔为 0-6 个碱基。

[0009] 上游引物的设计原理是依一般的引物设计原则设计模板的上游普通引物序列为上游引物的特异引物序列，选择上游引物的延伸序列，设计适当 T<sub>m</sub> 值的反向互补序列即为特异检测序列，该序列需满足以下条件：1. 与延伸产物形成唯一的颈环结构；2. 该颈环结构的 T<sub>m</sub> 值为 50-72 度，具体 T<sub>m</sub> 值范围为 55-65 度（定量检测实验中）或 50-72 度（SNP 分型或突变检测实验中）；3. 该颈环结构的环不宜过大，最好选择 150 个碱基内，并在上游引物的 5' 端加入一段附加序列。

[0010] 所述上游引物的延伸序列即为在本发明模板下，进行 PCR 扩增时，上游引物扩增过程中的延伸序列。

[0011] 检测探针序列设计原则为：1. 杂交于所述颈环结构的相邻位置，优选相邻 0-10 个碱基，更优选 0—6 个碱基；2. 杂交 T<sub>m</sub> 值适中，主要依检测目的而定。比如定量检测实验中，其 T<sub>m</sub> 值范围为 55-65 度，分型或突变检测实验中，其 T<sub>m</sub> 值范围为 50-72 度，SNP、突变位点最好位于检测探针杂交的中间位置。

[0012] 附加序列为额外的一段序列，其为任意的不与相邻于序列 11 并远离目标序列 10 的碱基互补的序列，即引物延伸且分子内形成颈环结构后，其 5 端游离的未杂交序列。附加序列的加入有利于避免分子内的扩增（下游引物扩增产物的 3 端虽然也形成颈环结构，但 3 端最末端的 2-4 个碱基未杂交，从而避免分子内扩增）。

[0013] 在 SNP 或突变检测实验时，序列 11 或者 12 包括了 SNP 或突变位点。

[0014] 本发明还涉及一种试剂盒，包括采用上述设计原理制备的上游引物 15 和检测探针 16。

[0015] 本发明还涉及所述实时荧光 PCR 检测方法的用途。

[0016] 该用途为用于实时监测扩增产物量实现目标序列的定性及定量分析的用途；用于熔解分析的用途，优选为用于检测 SNP 或突变位点的用途。

[0017] 所述试剂盒的用途。包括用于实时监测扩增产物量实现目标序列的定性及定量分析的用途；用于熔解分析的用途，优选为用于检测 SNP 或突变位点的用途。

[0018] 本发明还涉及一种实时荧光 PCR 上游引物和探针制备方法，其步骤为，选定模板的目标序列 10，序列 11，序列 12，一段不与模板杂交的核酸附加序列 13，上游引物的理论序

列即为：修饰基团 1—附加序列 13 和序列 11 的反向互补序列 2—目标序列 10 的反向互补序列 3，所述修饰基团 1 为荧光基团或者淬灭基团或者供体荧光基团或者受体荧光基团；所述检测探针序列的理论序列为修饰基团 4—序列 12 的反向互补序列 5，其中序列 12 与序列 18 反向互补，序列 17 为模板上目标序列 10 的延伸序列并远离模板的 3' 端，序列 18 为模板上序列 17 的延伸序列并远离目标序列 10 的一端，根据所述的上游引物的理论序列和探针引物的理论序列合成即可；所述修饰基团 4 为淬灭基团或者荧光基团或者受体荧光基团或者供体荧光基团；

[0019] 其中目标序列 10 与序列 17 之间相隔 0-150 个碱基，优选间隔为 0-50 个碱基；延伸序列 11 与延伸序列 12 之间相隔 0—10 个碱基，优选间隔为 0-6 个碱基。

[0020] 所述试剂盒的制备方法主要是制备上游引物 15 和检测探针 16，制备方法同上。

[0021] 本发明是一种基于荧光能量共振转移的检测技术，不仅可以通过荧光扩增曲线进行实时定性及定量检测，而且可通过熔解分析进行分型检测实验。该技术仅需要一对引物（其中上游引物进行单标记）和一条单标记检测探针即可，上游引物包含三个区域，特异引物序列 3、特异检测序列 2 及附加序列 13。特异检测序列 2 由于与序列 11 反向互补，在 PCR 反应时，变性退火后特异检测序列 2 调转过来与序列 11 互补，附加序列 13 由于不与模板互补，所以游离出来。上游引物延伸产物经变性退火后形成自身折叠结构，该结构由特异检测序列引导形成，同时检测探针杂交于相邻位置（图 1），在荧光能量共振转移作用下产生信号从而实现实时监测扩增产物量并可在扩增后进行熔解分析。具体为：PCR 反应的第一个循环：退火阶段，上游特异引物杂交序列 3 杂交于目标序列 10 的位置，下游引物 6 杂交于目标序列 14 的位置，延伸阶段，引物发生延伸反应得到两条延伸产物（序列 8 与序列 9）。PCR 反应的第二个循环：退火阶段，上游引物特异检测序列 2 与延伸序列 11 杂交，形成分子内颈环状结构，特异引物杂交序列 3 位于环状结构内，检测探针序列 5 杂交于延伸序列 12 的位置（两修饰基团相邻，杂交后即发生荧光能量共振转移，产生信号的变化）。

[0022] 本发明一种情况为：当上游引物的修饰基团为淬灭基团或荧光基团，探针为荧光基团或淬灭基团时，随着反应的进行，PCR 产物的增多，荧光信号越来越弱。

[0023] 上游引物的修饰基团为荧光基团，探针为淬灭基团时，本底较高，增加了背景，结果信噪比差，不利于获取精确的实验结果；但是相反，上游引物的修饰基团为淬灭基团，探针为荧光基团时，结果信噪比高，检测结果更精确。故这种情况下的优选方案是上游引物的修饰基团为淬灭基团，探针为荧光基团。

[0024] 另一种情况为：当上游引物的修饰基团为供体荧光基团或受体荧光基团，检测探针为受体荧光基团或供体荧光基团，随着反应的进行，PCR 产物的增多，荧光信号越来越强。

[0025] 以上两种情况就是荧光能量共振转移（FRET）现象：1. 当荧光基团与淬灭基团靠近时，其直观表现为荧光基团的荧光信号被淬灭，较其单独存在时信号大大降低；2. 当两种不同的荧光基团离的较近，且其中一种基团（供体）的发射谱与另一种基团（受体）的激发谱有相当程度的重叠时，当供体被激发时，受体会因供体激发能的转移而被激发，其直观表现就是供体产生的荧光强度较其单独存在时要低的多，而受体发射的荧光却大大增强。

[0026] 本发明的下游引物遵循一般 PCR 引物设计原则，比如设计方法参照《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社。

[0027] 本发明的有益效果和优点在于：

- [0028] 1. 探针和引物只需要单标记,且不需要额外封闭基团的修饰,易于纯化,产率高;
- [0029] 2. 只有当 PCR 产物形成正确的二级结构且检测探针特异杂交时才能出现信号,故其特异性高,选择性好;
- [0030] 3. 能量限制型的 PCR 产物与检测探针相互作用释放或催灭荧光信号,区分单碱基差异的能力强;
- [0031] 4. 可用于熔解分析,据熔解曲线检测突变、SNP 位点等;
- [0032] 5. 引物及检测探针设计简单灵活,可按照实验要求设计不同方案的引物及检测探针;
- [0033] 6. 本技术可灵活使用各种催灭及荧光基团,从而形成“倒置”及“正常”的扩增曲线。

### 附图说明

[0034] 图 1 为实时荧光 PCR 扩增原理:其中 1 为修饰基团,2 为特异检测序列,13 为附加序列,3 为特异引物序列,4 为修饰基团,5 为检测探针序列,10 为模板上的目标序列,11 为上游引物的延伸序列,12 为 11 之后的延伸序列,6 为下游引物序列,7 为模板,14 为下游引物对应模板上的目标序列,15 为上游引物,16 为检测探针,8 为单标记引物延伸产物经变性退火后形成自身颈环结构,9 为下游引物延伸产物经变性退火后形成自身颈环结构。

[0035] 图 2A 为三份样本的原始扩增曲线图。

[0036] 图 2B 为三份样本的数据处理后的扩增曲线图。

[0037] 图 3A 为三份基因组 DNA 样本 SNP 基因分型检测熔解曲线原始图。

[0038] 图 3B 为数据处理后的熔解曲线图。

[0039] 图 4A 为梯度稀释 DNA 样本的扩增曲线。

[0040] 图 4B 为标准曲线。

### 具体实施方式

[0041] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译的《分子克隆实验指南》,第三版,科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0042] 实施例中使用的仪器:实时荧光 PCR 仪(Rotor-gene 6000,德国 QIAGEN 公司),紫外可见分光光度计(ND-1000,美国 NanoDrop 公司),台式微量离心机(德国 Eppendorf 公司),本专利实施例中所有序列合成均来自生工生物工程(上海)有限公司。所使用的基因组 DNA 样本来源于正常人的外周血提取,均采用 Qiagen 公司的 DNeasy™ Blood Kit 并遵照其说明书的提取方式提取获得。外周血样品由厦门市妇幼保健院提供。标本的使用均获得当事人或其监护人的许可。

[0043] 实施例 1:选择人 SOD1 基因(Gene ID: 6647),依据说明书中所述原则,设计相应的引物及探针,序列如下:

[0044] 上游引物:TMR-TTTGCTGCTGTGCCTGAAGACAGCCGTGTTATGAA(SEQ ID NO:1)

[0045] 下游引物 :TCTATCTGTGCCCTTTACTTGGT (SEQ ID NO:2)

[0046] 检测探针 :CATTCCAACGTATCCCTGTGTAGAAG (SEQ ID NO:3)-FAM

[0047] 其中上游引物中 :双下划线为附加序列 13,单下划线为特异检测序列 2,单下划波浪线为特异引物序列 3。

[0048] 体系中的上游引物 5 端标记淬灭基团 TMR,检测探针 3 端标记 FAM 基团,在退火阶段,标记 TMR 引物的延伸产物与检测探针形成杂交复合体,复合体形成后即发生接触淬灭(属于 FRET 的范畴),荧光信号减弱。随着 PCR 循环数的增加,体系中的荧光信号逐渐降低形成一条“倒置”的实时扩增曲线。

[0049] 25  $\mu$  L PCR 反应体系内含 5  $\mu$  L 人基因组模板,75 mmol/L Tris-HCl pH 9.0, 20 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.01% Tween 20,50 mmol/L KCl,1 U *Taq* 酶,3.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ,0.2  $\mu$  mol/L 标记探针,0.4  $\mu$  mol/L 上游标记引物,0.08  $\mu$  mol/ 下游引物。PCR 反应程序为 :95 $^{\circ}\text{C}$  3 分钟 ;95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒,58 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,72 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,50 个循环 ;58 $^{\circ}\text{C}$ 退火阶段采集荧光信号。

[0050] 该方法的原始扩增曲线不同于传统的实时扩增曲线,呈现“倒置”的曲线图,即随着 PCR 循环数的增加,本底期(在 PCR 反应早期,此时扩增产生的荧光信号不能与背景信号明显地区别,故称为本底期)之后的荧光值逐渐减弱,通过数据处理获取正常的扩增曲线图,从而实现检测,结果见附图 2A 和 2B。19A、20A 为两份 DNA 样本的扩增曲线,模板用量分别为 :500ng 和 50ng。原始扩增曲线(图 2A)及经过实时 PCR 仪自动数据处理后的扩增曲线(图 2B)中,19A 的荧光信号在循环数约为 19 时开始变化,20A 的荧光信号在循环数约为 22 时开始变化。可以看出,同一反应条件下,模板用量越大,荧光值越早发生变化,反之亦然 ;21A 为阴性对照 ddH<sub>2</sub>O,没有模板的存在,无特异产物的扩增,故检测不到信号的变化。该技术采用分析荧光信号有无变化(亦即特异性荧光信号是否出现)实现目标序列“有无”的定性分析。

[0051] 实施例 2 :选择人基因组中一 SNP 位点(rs13182883),依据说明书中所述原则,设计分型引物及探针,序列如下 :

[0052] 上游引物 : TMR-GGATGCTCACTGCCTAGTAGAGGGCCTGGCCT (SEQ ID NO:4)

[0053] 下游引物 : CAGGCTCTCCGTTACTTTCTTC (SEQ ID NO:5)

[0054] 检测探针 : ACCCTGTTCCCTCGAGGATTTGA (SEQ ID NO:6)-FAM

[0055] 其中上游引物中 :双下划线为附加序列 13,单下划线为特异检测序列 2,单下划波浪线为特异引物序列 3。

[0056] 体系中的上游引物 5 端标记淬灭基团 TMR,检测探针 3 端标记荧光基团 FAM,设计的检测探针“覆盖”待检测的 SNP 位点,扩增出的标记产物链形成的内部二级结构 T<sub>m</sub> 值(理论值为 66 度)> 单标记检测探针 T<sub>m</sub> 值(理论值为 62 度),PCR 扩增后经熔解分析实现 SNP 分型。

[0057] 25  $\mu$  L PCR 反应体系内含 5  $\mu$  L 人基因组模板,75 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,20 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.01% Tween 20,50 mmol/L KCl,1 U *Taq* 酶,3 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ,0.2  $\mu$  mol/L 标记探针,0.4  $\mu$  mol/L 上游引物,0.04  $\mu$  mol/ 下游引物。PCR 反应程序为 :95 $^{\circ}\text{C}$  3 分钟 ;95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒,55 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,72 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,50 个循环 ;55 $^{\circ}\text{C}$ 退火阶段采集荧光信号。熔解分析程序为 :95 $^{\circ}\text{C}$  1 分钟 ;40 $^{\circ}\text{C}$  2 分钟 ;40 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 90 $^{\circ}\text{C}$ 并在升温过程中采集 FAM 荧光信号。

[0058] 用量为 20ng 的三份样本(22A、23A 和 24A)及阴性对照(25A)的原始熔解曲线(图



3A)和其对应的处理后的熔解曲线(图 3B):样本 22A 的熔解曲线熔解  $T_m$  值较低,是一份 AA 纯合的标本;样本 24A 的熔解曲线熔解  $T_m$  值较高,是一份 GG 纯合的标本;样本 23A 的熔解曲线是一条双  $T_m$  值曲线,每个  $T_m$  值对应一种基因型,故是一份 AG 杂合的标本,阴性对照 25A 的熔解曲线无特异  $T_m$  值出现。

[0059] 实施例 3:选择人 SOD1 基因,依据说明书中所述原则,设计相应的引物及探针,序列如下:

[0060] 上游引物:FAM-TTCCTCGACAGCACTGAAGACAGCCGTGTTATGAA (SEQ ID NO:7)

[0061] 下游引物:TCTATCTGTGCCCTTTACTTGGT (SEQ ID NO:2)

[0062] 检测探针:ACCAGGGGATGACATTCACAGA (SEQ ID NO:8)-ROX 其中上游中:双下划线为附加序列 13,单下划线为特异检测序列 2,单下划波浪线为特异引物序列 3。

[0063] 体系中的上游引物 5 端标记 FAM (供体)荧光基团,检测探针 3 端标记 ROX (受体)荧光基团,它们与扩增产物杂交形成复合体,复合体形成后发生荧光能量共振转移从而达到实时监测产物形成的目的,随着 PCR 循环数的增加,体系中的荧光信号逐渐增强形成扩增曲线。

[0064] 选择用量为 200ng、50ng、12.5ng、3.125ng、0.78ng(四倍梯度稀释)的人基因组 DNA 作为反应模板。25  $\mu$  L PCR 反应体系内含 5  $\mu$  L 人基因组模板,75 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,20 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,0.01% Tween 20,50 mmol/L KCl,1 U *Taq* 酶,3.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ ,0.2  $\mu$  mol/L 标记探针,0.4  $\mu$  mol/L 上游标记引物,0.08  $\mu$  mol/L 下游引物。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  3 分钟;95 $^{\circ}\text{C}$  15 秒,58 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,72 $^{\circ}\text{C}$  20 秒,50 个循环;58 $^{\circ}\text{C}$  退火阶段采集荧光信号。

[0065] 四倍梯度稀释样本的扩增曲线 26A 体现较好的梯度,27A(阴性对照,没有模板的存在,即为 ddH<sub>2</sub>O)无特异产物的扩增,故检测不到特异信号(图 4A)。200ng 模板用量的反应管的 Ct 值为 24.30(Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。)、50ng 模板用量的反应管的 Ct 值为 26.00、12.5ng 模板用量的反应管的 Ct 值为 28.07、3.125ng 模板用量的反应管的 Ct 值为 30.18、0.78ng 模板用量的反应管的 Ct 值为 32.21,可见,相邻梯度模板用量的 Ct 值差约为 2(理论上,扩增效率为 100%时,模板用量差异四倍时 Ct 值差为 2),结果表明该体系具有较高的反应效率。梯度样本扩增曲线的 Ct 值与其 DNA 起始拷贝数的对数有很好的线性关系( $R^2=0.9986$ ),体现该技术较强的定量检测能力(图 4B)。

## SEQUENCE LISTING

<110> 厦门基科生物科技有限公司

<120> 一种实时荧光 PCR 方法及用途

<130> P2011 - 0011

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

tttgctgctg tgcctgaaga cagccgtggt atgaa

35

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

tctatctgtg cccttactt ggt

23

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

cattccaact gtatcctgtg tagaag

26

|   |    |
|---|----|
| <210> 4                                 |    |
| <211> 32                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> 人工合成                              |    |
| <400> 4                                 |    |
| ggatgctcac tgcctagtag agggcctggc ct     | 32 |
| <210> 5                                 |    |
| <211> 22                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> 人工合成                              |    |
| <400> 5                                 |    |
| caggctctcc gttactttct tc                | 22 |
| <210> 6                                 |    |
| <211> 22                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> 人工合成                              |    |
| <400> 6                                 |    |
| accctgttcc tcgaggattt ga                | 22 |
| <210> 7                                 |    |
| <211> 35                                |    |
| <212> DNA                               |    |
| <213> 人工合成                              |    |
| <400> 7                                 |    |
| ttcctcgaca gcaactgaaga cagccgtggt atgaa | 35 |
| <210> 8                                 |    |
| <211> 22                                |    |

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 8

accaggggat gacattcaca ga

22

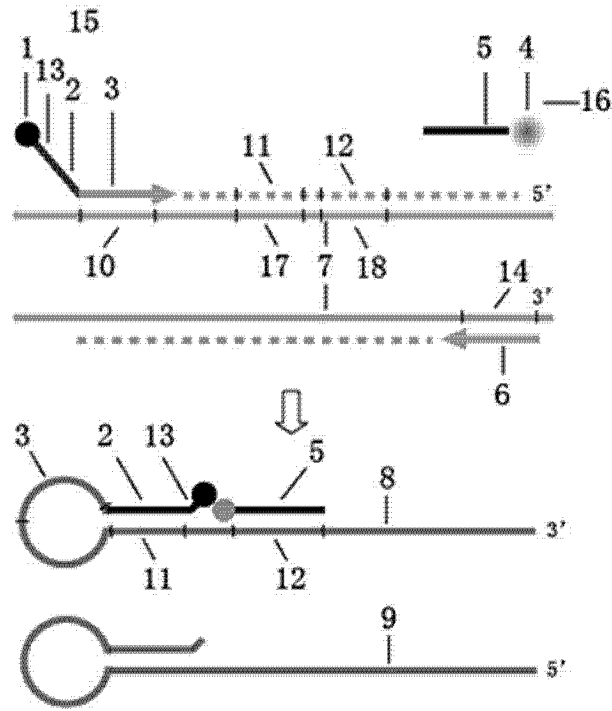


图 1

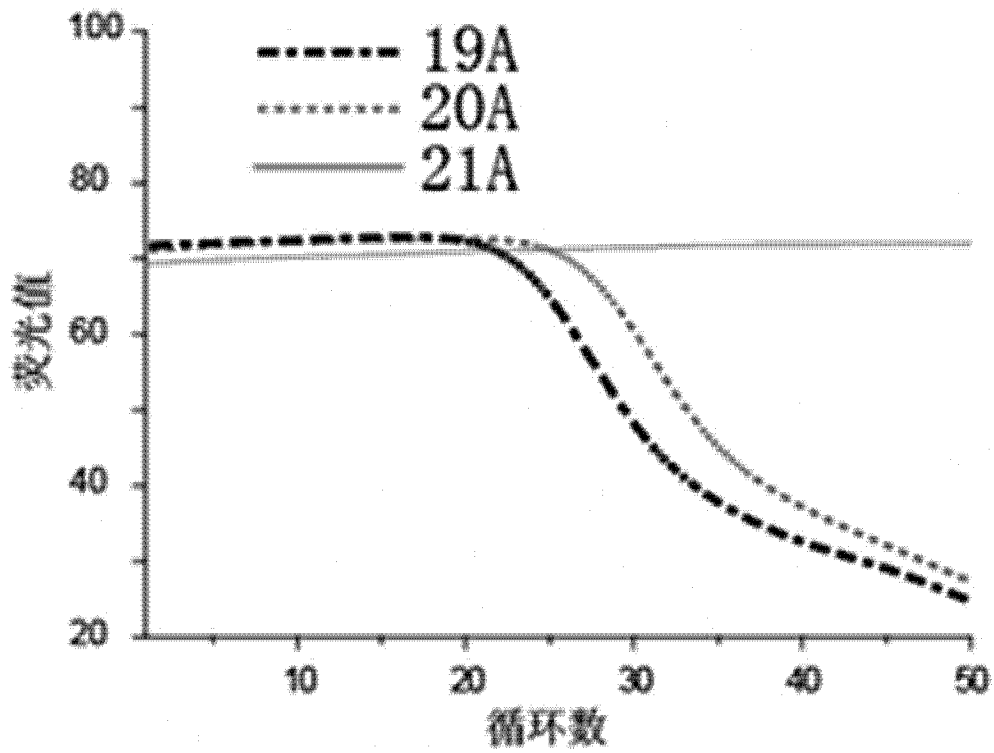


图 2a

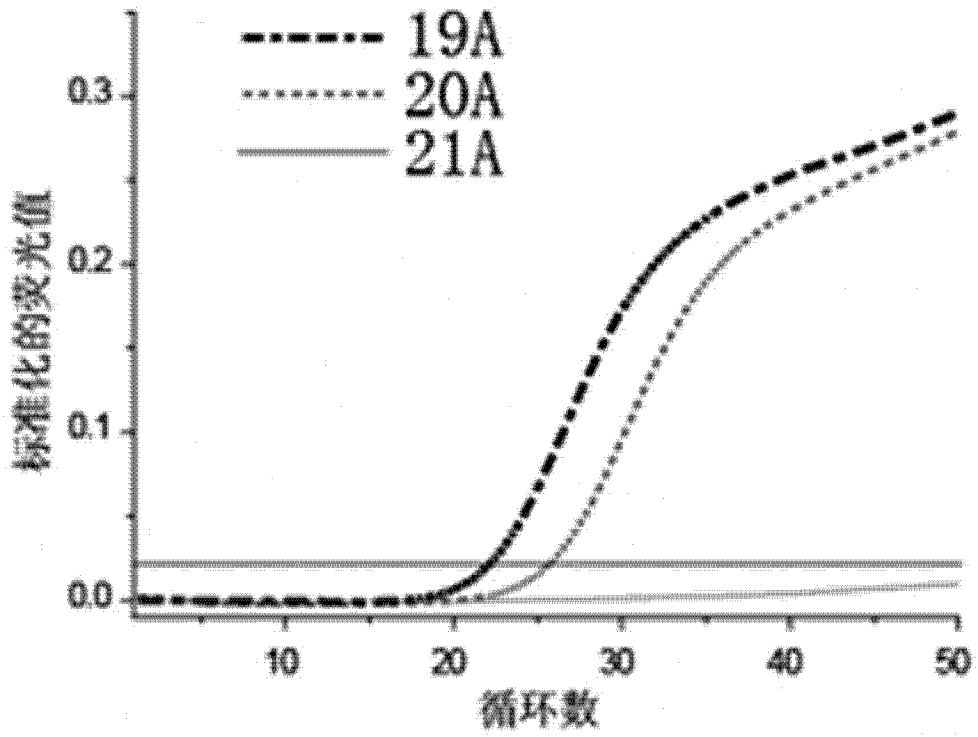


图 2b

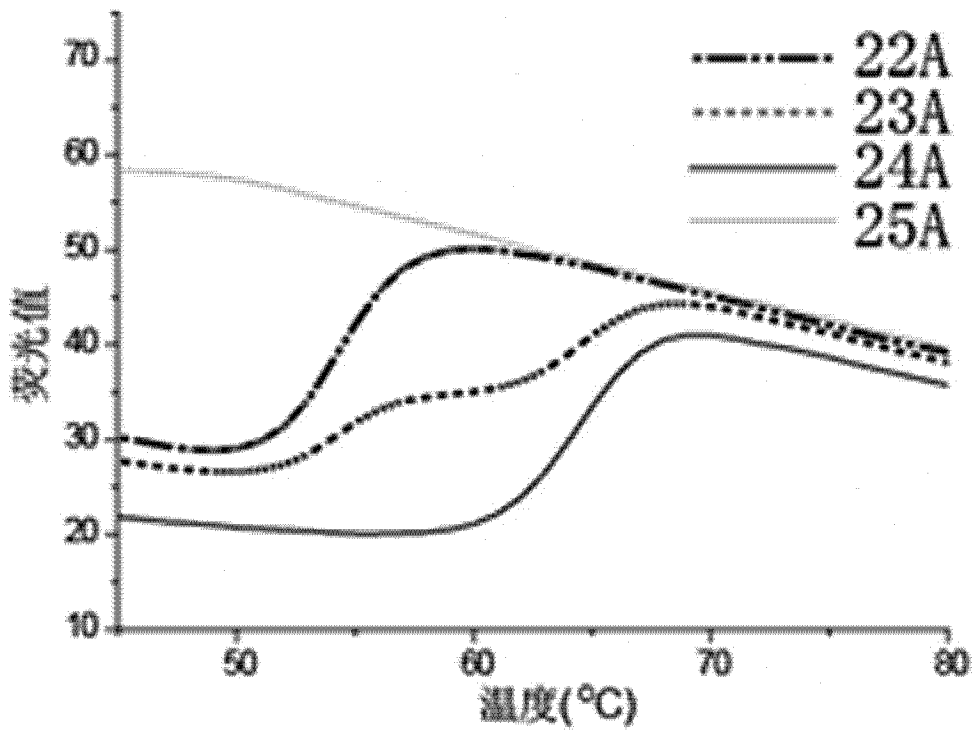


图 3a

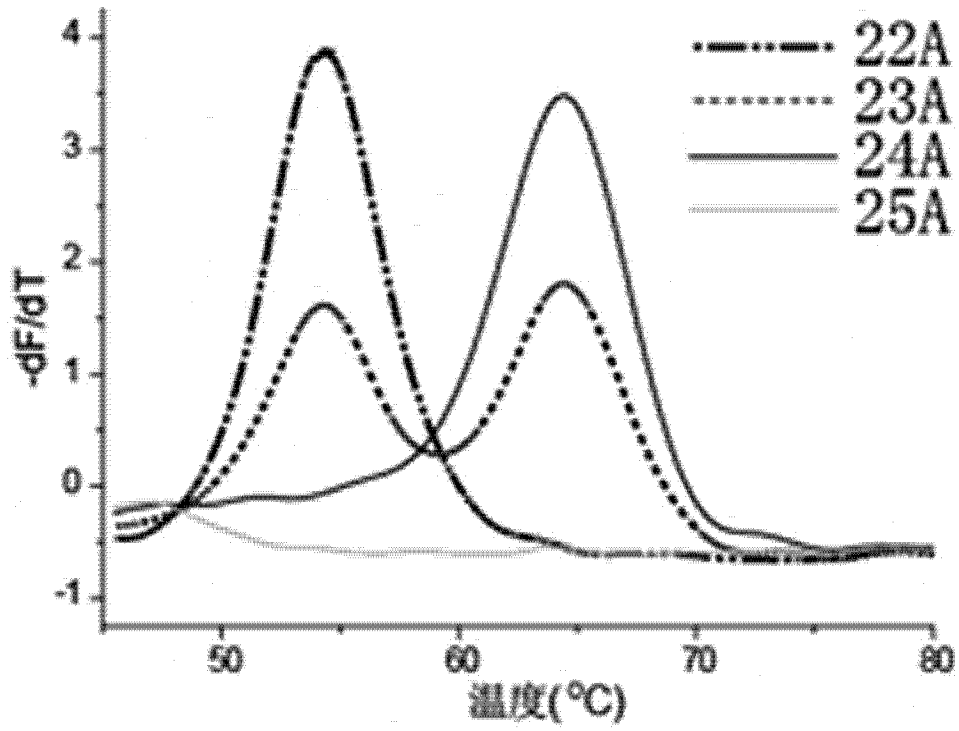


图 3b

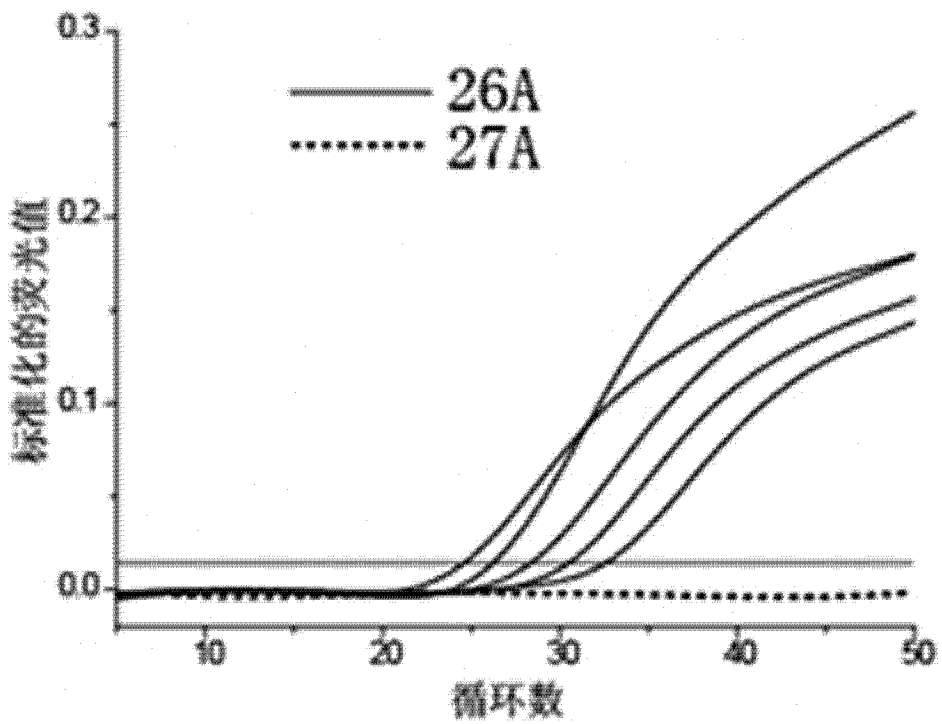


图 4a

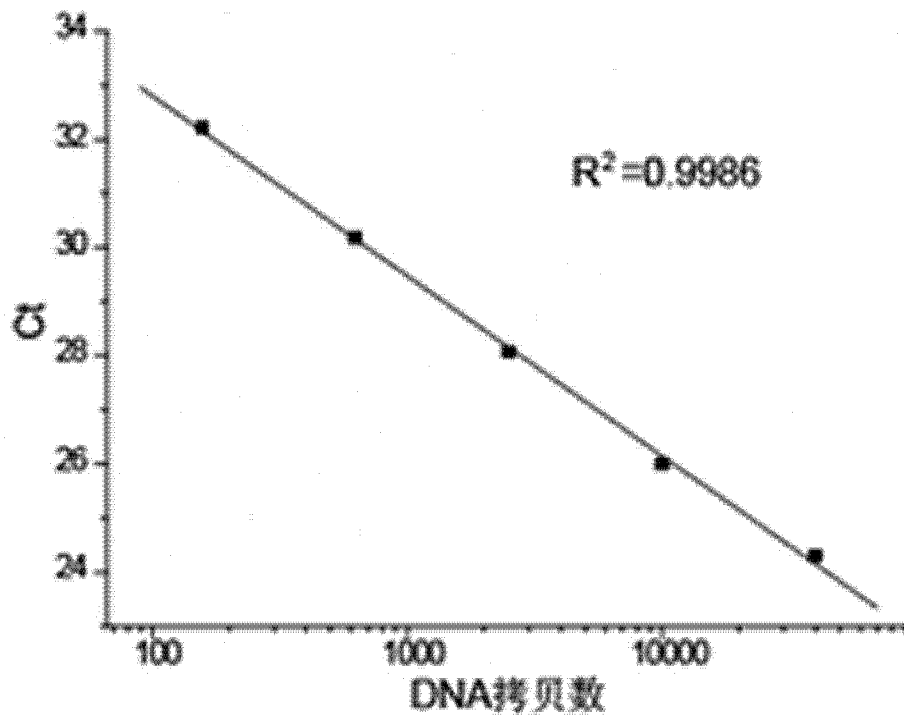


图 4b