



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107385037 B

(45) 授权公告日 2021.04.13

(21) 申请号 201710605544.4

(22) 申请日 2017.07.24

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107385037 A

(43) 申请公布日 2017.11.24

(73) 专利权人 东莞微量精准检测研究院有限公司

地址 523808 广东省东莞市松山湖高新技术产业开发  
区莞台生物技术合作育成中心5栋3层301室

(72) 发明人 张晓玮 张新 邓可基 彭春梅  
李家导 张嘉 乐小炎 李海茵  
罗园香 杨芬

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 胡辉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6851 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 105132577 A, 2015.12.09

CN 104342486 A, 2015.02.11

CN 102618664 A, 2012.08.01

CN 103882132 A, 2014.06.25

CN 103834719 A, 2014.06.04

谢振华. 相关肿瘤标志性microRNA新型检测体系的构建及其应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2017,摘要,第3-4章.

Yin, Bin-Cheng等. One-Step, Multiplexed Fluorescence Detection of microRNAs Based on Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification.《JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY》.2012,第134卷(第11期),第5064-5067页.

审查员 蔡放

权利要求书1页 说明书6页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法,本发明先使用单链DNA与miRNA进行结合,再使用DSN酶对配对的单链DNA进行消化,最后通过Taqman方法对剩余的单链DNA进行定量,从而间接实现地对目标miRNA含量的检测。本发明避免了传统方法扩增时的非特异扩增问题,仍使用成熟的Taqman技术,应用极为方便、稳定。基于上述优点,本方法在肿瘤检测领域,具有广泛的应用前景。

1. 一种非疾病诊断用途的miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 合成单链DNA,该单链DNA含有能与目标miRNA进行碱基互补的片段1,片段1的5'端和3'端分别连有碱基数不少于20bp的片段2和片段3;

2) 杂交消化:将上述合成的单链DNA与待测样品进行杂交,使用DSN酶对杂交体中的DNA进行消化;

3) 将经过杂交消化的待测样品进行实时荧光定量PCR,检测DSN酶消化后剩下的单链DNA的Ct值;根据目标miRNA的阳性质控品所建立的标准曲线,确定该Ct值所对应的目标miRNA的浓度,从而得出待测样品中目标miRNA的浓度;

所述目标miRNA为miR-21,所述单链DNA如SEQ ID NO:1所示;

实时荧光定量PCR所用引物及荧光探针序列如下:

上游引物F:5'-TGGATTGATGTGATATCTCCACTGA-3'(SEQ ID NO:2),

下游引物R:5'-CCTTATATAGAGGAAGGTCTTGAGTTG-3'(SEQ ID NO:3),

荧光探针P:5'-TAAGGGATATCGAATAGTCTG-3'(SEQ ID NO:4),

所述荧光探针P的5'端标记Fam,3'端标记MGB。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2)中,杂交消化的反应过程为55~65℃30~60min,92~97℃10~20min。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2)中,杂交消化的反应体系中单链DNA加入的量为使其终浓度为 $10^3 \sim 10^8$ copies/mL。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)中,实时荧光定量PCR扩增出来的片段含有片段1,或者含有片段1的6bp以上碱基序列。

5. 一种miR-21间接实时荧光定量PCR检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒含有SEQ ID NO:1所示的单链DNA,SEQ ID NO:2~3所示的引物,SEQ ID NO:4所示的荧光探针,DSN酶。

## 一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物技术领域,一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法。

### 背景技术

[0002] miRNA是一类内源性长约22个nt的非编码微小RNA,有如下结构特点:miRNA普遍存在于真核生物中,它不编码蛋白质,本身不具有开放阅读框;成熟的miRNA并不是简单的RNA降解片段,它的5'端和3'端分别连接了磷酸基团和羟基,且5'端的第一个碱基对尿嘧啶(U)有强烈倾向性,而对鸟嘌呤(G)有一定抗性。miRNA基因序列并不是随机排列的,一些是成簇的(cluster),而且簇生排列的基因常常协同表达;绝大多数的miRNA是由前体miRNA(Precursor miRNA,Pre-miRNA)的一条臂上加工而产生的,鲜有miRNA由Pre-miRNA的两条臂同时产生。miRNA的表达具有明显组织特异性和细胞特异性,还有一定的时序性,其序列还具有高度保守性的特点。

[0003] 研究表明,miRNA调控人类约30%以上的基因表达,从而参与到多种生命过程。现有许多证据表明,miRNA表达水平异常与人类肿瘤发生有莫大关联。目前认为,miRNA的下调或上调可能导致原癌基因的激活或抑癌基因的抑制。miR-21在胃癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病中表达水平上调,并且与胃癌等肿瘤的恶性程度呈正相关。miR-21的大多数靶mRNA是抑癌基因的转录产物,如PDCD4和PTEN等。miR-21的成熟序列为hsa-miR-21-5p MIMAT0000076:UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO:5)。

[0004] 主流的检测miRNA的方法是基于Taqman荧光定量PCR的,包括加PolyA尾法和茎环法。

[0005] 加尾法的反转录引物实际上就是处理mRNA所用的通用oligo(dT)引物。在反转录前有一个步骤是为RNA样品加PolyA尾,然后反转录。所以它的反转录引物中包括:一段通用序列、一段多聚T和一个单碱基锚定。单碱基锚定的概念源于mRNA分析技术中的差异显示(Differential display)技术。其原理是借助mRNA的PolyA尾,对大量的mRNA进行分类。这种在多聚T后加上一个A或C或G的简并反转录引物,能将所有mRNA分类为3种,这就是单碱基锚定。

[0006] “茎环”即指反转录引物。茎环结构不但能有效地延长miRNA的长度,同时它自身互补的构象可以避免与其他同源基因结合,减少了非特异性扩增的几率。整个引物由2部分组成,一个通用的茎环结构和5~8个与目的miRNA的3'端反向互补的碱基。这种通用的茎环结构由Chen等设计,其序列为:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC-3'(SEQ ID NO:6)。其中下划线部分为茎环自身互补部分。随后在该序列的3'端加上5~8个碱基,与目的MicroRNA的3'端反向互补。

[0007] 不论是加PolyA尾法还是茎环法,都需要进行逆转录,而其逆转录的过程,均存在引物特异性不够的问题,因而两种方法的特异性均达不到诊断试剂产品的要求。

[0008] 双链特异性核酸酶(Duplex-specific nuclease,DSN)是来自红金蟹的一种特异性核酸酶,具有热稳定性,在60-65℃时具有最大活力,即使在70℃高温孵育20min后仍然具

有25%的活力。DSN酶能切割双链DNA,以及DNA/RNA杂合链中的DNA,常备用于cDNA均一化处理。自2013年以来,一些使用DSN酶结合氧化石墨烯传感器、特异性磁珠、纳米金、分子信标等技术,用于miRNA检测。但是这些方法设计复杂、成本较高,不利于产业化。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测试剂盒。

[0011] 本发明所采取的技术方案是:

[0012] 一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 合成单链DNA,该单链DNA含有能与目标miRNA进行碱基互补的片段1,片段1的5'端和3'端分别连有碱基数不少于20bp的片段2和片段3;

[0014] 2) 杂交消化:将上述合成的单链DNA与待测样品进行杂交,使用DSN酶对杂交体中的DNA进行消化;

[0015] 3) 将经过杂交消化的待测样品进行实时荧光定量PCR,检测DSN酶消化后剩下的单链DNA的Ct值;根据目标miRNA的阳性质控品所建立的标准曲线,确定该Ct值所对应的目标miRNA的浓度,从而得出待测样品中目标miRNA的浓度。

[0016] 进一步的,步骤1)中,所述片段2和片段3的碱基序列与目标miRNA所属物种的基因组不具有同源性。

[0017] 进一步的,步骤2)中,杂交消化的反应过程为55~65℃ 30~60min,92~97℃ 10~20min。

[0018] 进一步的,步骤2)中,杂交消化的反应体系中单链DNA加入的量为使其终浓度为 $10^3\sim 10^8$ copies/mL。

[0019] 进一步的,步骤3)中,实时荧光定量PCR扩增出来的片段含有片段1,或者含有片段1的6bp以上碱基序列。

[0020] 进一步的,所述目标miRNA为miR-21,所述单链DNA如SEQ ID NO:1所示,

[0021] 进一步的,实时荧光定量PCR所用引物及荧光探针序列如下:

[0022] 上游引物F:5'-TGGATTGATGTGATATCTCCACTGA-3'(SEQ ID NO:2),

[0023] 下游引物R:5'-CCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGAGTTG-3'(SEQ ID NO:3),

[0024] 荧光探针P:5'-Fam-TAAGGGATATCGAATAGTCTG-3' MGB(SEQ ID NO:4)。

[0025] 一种miRNA间接实时荧光定量PCR试剂盒,该试剂盒含有单链DNA,实时荧光定量PCR的引物和荧光探针;

[0026] 所述单链DNA含有能与目标miRNA进行碱基互补的片段1,片段1的5'端和3'端分别连有碱基数不少于20bp的片段2和片段3;

[0027] 所述引物能够使实时荧光定量PCR扩增出来的片段含有片段1,或者含有片段1的6bp以上碱基序列;

[0028] 所用荧光探针能够检测实时荧光定量PCR的扩增产物。

[0029] 进一步的,所述片段2和片段3的碱基序列与目标miRNA所属物种的基因组不具有同源性。

[0030] 一种miR-21间接实时荧光定量PCR检测试剂盒,该试剂盒含有SEQ ID NO:1所示的

单链DNA, SEQ ID NO:2~3所示的引物, SEQ ID NO:4所示的荧光探针。

[0031] 本发明的有益效果是:

[0032] 本发明提供了一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法,先使用人工合成的能与目标miRNA具有互补序列的单链DNA,与miRNA进行结合,再使用DSN酶对配对的单链DNA进行消化,同时,释放出来的目标miRNA继续与互补的单链DNA进行结合,实现信号放大。最后通过Taqman方法对剩余的单链DNA进行定量,从而间接实现地对目标miRNA含量的检测。

[0033] 该方法不需要对目标miRNA进行逆转录,避免了传统方法扩增时的非特异扩增问题。

[0034] 该方法仍然使用成熟的Taqman技术,应用极为方便,而无需使用氧化石墨烯传感器、特异性磁珠、纳米金、分子信标等技术。

[0035] 该方法的原理具有通用性,不仅可用于检测本文所提到的miR-21,在序列修改后,可适用于其他miRNA的检测。

[0036] 该方法使用的所有酶均具有一定的热稳定性,因此基于该方法的产品稳定性更强。

[0037] 基于上述优点,本方法在肿瘤检测领域,具有广泛的应用前景。

## 附图说明

[0038] 图1为应用本发明的间接实时荧光定量PCR检测方法检测miR-21的实验,A为梯度稀释的miRNA标准品检测后所得标准曲线,其斜率为3.30165,截距为-6.37831,相关系数为0.99982,扩增效率为-0.50212;B从左到右依次为 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1.236 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 拷贝/mL的miR-21扩增结果,其中浓度为 $1.236 \times 10^5$ 拷贝/mL的样品为待测样品,其他均为miR-21标准品的扩增结果;

[0039] 图2为应用本发明的间接实时荧光定量PCR检测方法检测miR-21的特异性实验,由于正常人血清中也存在miR-21,使用生理盐水进行特异性实验。

## 具体实施方式

[0040] 一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法,包括以下步骤:

[0041] 1) 合成单链DNA,该单链DNA含有能与目标miRNA进行碱基互补的片段1,片段1的5'端和3'端分别连有碱基数不少于20bp的片段2和片段3;

[0042] 2) 杂交消化:将上述合成的单链DNA与待测样品进行杂交,使用DSN酶对杂交体中的DNA进行消化;

[0043] 3) 将经过杂交消化的待测样品进行实时荧光定量PCR,检测DSN酶消化后剩下的单链DNA的Ct值;根据目标miRNA的阳性质控品所建立的标准曲线,确定该Ct值所对应的目标miRNA的浓度,从而得出待测样品中目标miRNA的浓度。

[0044] 优选的,步骤1)中,所述片段2和片段3的碱基序列与目标miRNA所属物种的基因组不具有同源性。

[0045] 优选的,步骤2)中,杂交消化的反应过程为55~65℃ 30~60min,92~97℃ 10~20min。

[0046] 优选的,步骤2)中,杂交消化的反应体系中含有DSN酶、Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、KCl和

DTT。

[0047] 优选的,杂交消化的反应体系中含有5~10U DSN酶、45~55mM Tris-HCl pH 7.2~7.8、4~6mM MgCl<sub>2</sub>、18~22mM KCl、0.8~1.2mM DTT。

[0048] 优选的,步骤2)中,杂交消化的反应体系中单链DNA加入的量为使其终浓度为10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>copies/mL。

[0049] 优选的,步骤3)中,实时荧光定量PCR扩增出来的片段含有片段1,或者含有片段1的6bp以上碱基序列。

[0050] 优选的,步骤3)中,实时荧光定量PCR中所用荧光探针能够检测实时荧光定量PCR的扩增产物。

[0051] 优选的,检测结果无Ct时,样本为阳性,且超出定量上限,需要稀释后进行检测;

[0052] 检测结果6≤Ct≤40时,判为阳性;

[0053] 检测结果Ct<6时,建议复检,若复检结果Ct≥4则可判样本为目标miRNA阳性;若复检结果Ct<4,则判为目标miRNA阴性;

[0054] 检测结果Ct<4时,判为miRNA阴性。

[0055] 优选的,所述待测样品为miRNA提取样品。

[0056] 优选的,所述目标miRNA为miR-21,所述单链DNA如SEQ ID NO:1所示,

[0057] 优选的,实时荧光定量PCR所用引物及荧光探针序列如下:

[0058] 上游引物F:5'-TGGATTGATGTGATATCTCCACTGA-3'(SEQ ID NO:2),

[0059] 下游引物R:5'-CCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGAGTTG-3'(SEQ ID NO:3),

[0060] 荧光探针P:5'-Fam-TAAGGGATATCGAATAGTCTG-3' MGB(SEQ ID NO:4)。

[0061] 一种miRNA间接实时荧光定量PCR试剂盒,该试剂盒含有单链DNA,实时荧光定量PCR的引物和荧光探针;

[0062] 所述单链DNA含有能与目标miRNA进行碱基互补的片段1,片段1的5'端和3'端分别连有碱基数不少于20bp的片段2和片段3;

[0063] 所述引物能够使实时荧光定量PCR扩增出来的片段含有片段1,或者含有片段1的6bp以上碱基序列;

[0064] 所用荧光探针能够检测实时荧光定量PCR的扩增产物。

[0065] 优选的,所述片段2和片段3的碱基序列与目标miRNA所属物种的基因组不具有同源性。

[0066] 优选的,该试剂盒还含有DSN酶、Tris-HCl、MgCl<sub>2</sub>、KCl、DTT。

[0067] 一种miR-21间接实时荧光定量PCR检测试剂盒,该试剂盒含有SEQ ID NO:1所示的单链DNA,SEQ ID NO:2~3所示的引物序列,SEQ ID NO:4所示的荧光探针。

[0068] 优选的,该试剂盒还含有DSN酶。

[0069] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

[0070] 实施例1一种miR-21间接实时荧光定量PCR检测方法

[0071] 一、单链DNA、引物探针序列设计:

[0072] 人工设计,合成一段如SEQ ID NO:1所示的单链DNA,其中下划线部分,与miR-21的序列反向互补,其余部分为与人类基因组不具备同源性的Camv35S序列,合成公司为上海捷瑞生物科技有限公司。

[0073] 单链DNA:

[0074] 5'-AGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATATCGAATAGTCTGACTACAACTCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAG-3' (SEQ ID NO:1)

[0075] 设计匹配的实时荧光定量PCR引物及荧光探针序列如下:

[0076] 上游引物F:5'-TGGATTGATGTGATATCTCCACTGA-3' (SEQ ID NO:2),

[0077] 下游引物R:5'-CCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGAGTTG-3' (SEQ ID NO:3),

[0078] 荧光探针P:5'-Fam-TAAGGGATATCGAATAGTCTG-3' MGB (SEQ ID NO:4)。

[0079] 合成公司为上海英潍捷基(上海)贸易有限公司。

[0080] 二、样品采集和预处理

[0081] 用广州海力特生物科技有限公司生产的外泌体分离试剂盒,按说明书要求从血清样品中分离外泌体,血清样品采集自广州市中山三院。

[0082] 用广州海力特生物科技有限公司生产的外泌体miRNA提取试剂盒,按说明书要求进行miRNA提取,得待测样品。

[0083] 三、阳性质控品的制备

[0084] 人工合成miR-21序列:5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3' (SEQ ID NO:5),并对浓度进行测定。合成公司为上海吉玛制药技术有限公司。

[0085] 四、杂交消化

[0086] 将前述经过外泌体分离和miRNA提取的待测样品和阳性质控品分别进行杂交与DSN酶消化。

[0087] 杂交消化体系中含50mM Tris-HCl pH 7.5,5mM MgCl<sub>2</sub>,20mM KCl,1mM DTT,10<sup>8</sup>copies的单链DNA,5~10U DSN酶,待测样品5~20μL,余量为RNAase-Free水。

[0088] 杂交消化反应过程为:60℃45min,95℃15min。

[0089] 五、实时荧光定量PCR扩增

[0090] 实时荧光定量PCR的反应体系:使用55μL体系进行扩增,其中含有400nM上游引物F、400nM下游引物R、200nM荧光探针P、25μl PCR Mix、25μL待测样品,余量为水。按照上述同样体系分别设置阳性对照组(人工合成的miR-21)、阴性对照组(水)。

[0091] 所述PCR Mix成分为65mM Tris pH 8.8,MgCl<sub>2</sub> 10mM,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30mM,KCl 20mM,Taq 5U/25μL,dNTP 700mM。

[0092] 将各反应管放入定量PCR仪器的反应槽内,设置各检测的名称和荧光基团种类(设置报告基团为FAM,淬灭基团选择MGB),设定循环条件:

[0093] 使用宏时SLAN 96P荧光PCR仪进行扩增,循环条件为95℃2分钟;95℃15秒,60℃30秒,40个循环;60℃时收集荧光。

[0094] 六、结果分析和判定

[0095] 1、结果分析条件设定

[0096] 设置基线(baseline):使用宏时SLAN 96P荧光PCR仪软件默认设置,可根据具体情况对基线适当调整。

[0097] 设置阈值(threshold):使用宏时SLAN 96P荧光PCR仪软件默认设置。

[0098] 2、结果判断

[0099] 检测结果无Ct时,样本为阳性,且超出定量上限,需要稀释后进行检测。

[0100] 检测结果 $6 \leq Ct \leq 40$ 时,判为阳性,以定量值作为检测结果;

[0101] 检测结果 $Ct < 6$ 时,建议复检,若复检结果 $Ct \geq 4$ 则可判样本为miRNA-21阳性,但样品浓度低于试剂定量限,定量值仅供参考;若复检结果 $Ct < 4$ ,则判为miRNA-21阴性;

[0102] 检测结果 $Ct < 4$ 时,判为miRNA-21阴性。

[0103] 3、miRNA浓度

[0104] 对梯度稀释的miRNA标准品进行上述检测,宏时SLAN 96P荧光PCR仪软件计算得到标准曲线(如图1-A所示),图1-B为应用本发明的间接实时荧光定量PCR检测方法检测不同浓度阳性miR-21的实验,从左到右依次为 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1.236 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 拷贝/mL的miR-21扩增结果,其中浓度为 $1.236 \times 10^5$ 拷贝/mL的样品为待测样品,其他均为miR-21标准品的扩增结果。

[0105] 根据标准曲线由荧光定量PCR仪自带软件计算本实施例中待测样品miRNA-21的浓度为 $1.236 \times 10^5$ 拷贝/mL。

[0106] 图2为应用本发明的间接实时荧光定量PCR检测方法检测阴性对照(生理盐水)的扩增结果, $Ct$ 为2.89。

[0107] 七、特异性检测

[0108] 对上述miR-21间接实时荧光定量PCR检测方法进行特异性检测,由于正常人血清中也存在miR-21,使用生理盐水进行特异性实验。检测结果如图2所示。

[0109] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 广州海力特生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种miRNA间接实时荧光定量PCR检测方法
- [0004] <130>
- [0005] <160> 6
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 85
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] agtggattga tgtgatatct ccaactgacgt aaggatatac gaatagtctg actacaactc 60
- [0013] aagacccttc ctctatataa ggaag 85
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 25
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <400> 2
- [0019] tggattgatg tgatatctcc actga 25
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 28
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <400> 3
- [0025] ccttatatag aggaagggtc ttgagttg 28
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 21
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <400> 4
- [0031] taaggatat cgaatagtct g 21
- [0032] <210> 5
- [0033] <211> 22
- [0034] <212> RNA
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <400> 5
- [0037] uagcuuauca gacugauguu ga 22
- [0038] <210> 6

- 
- [0039] <211> 44  
[0040] <212> DNA  
[0041] <213> 人工序列  
[0042] <400> 6  
[0043] gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggtattc gcactggata cgac 44

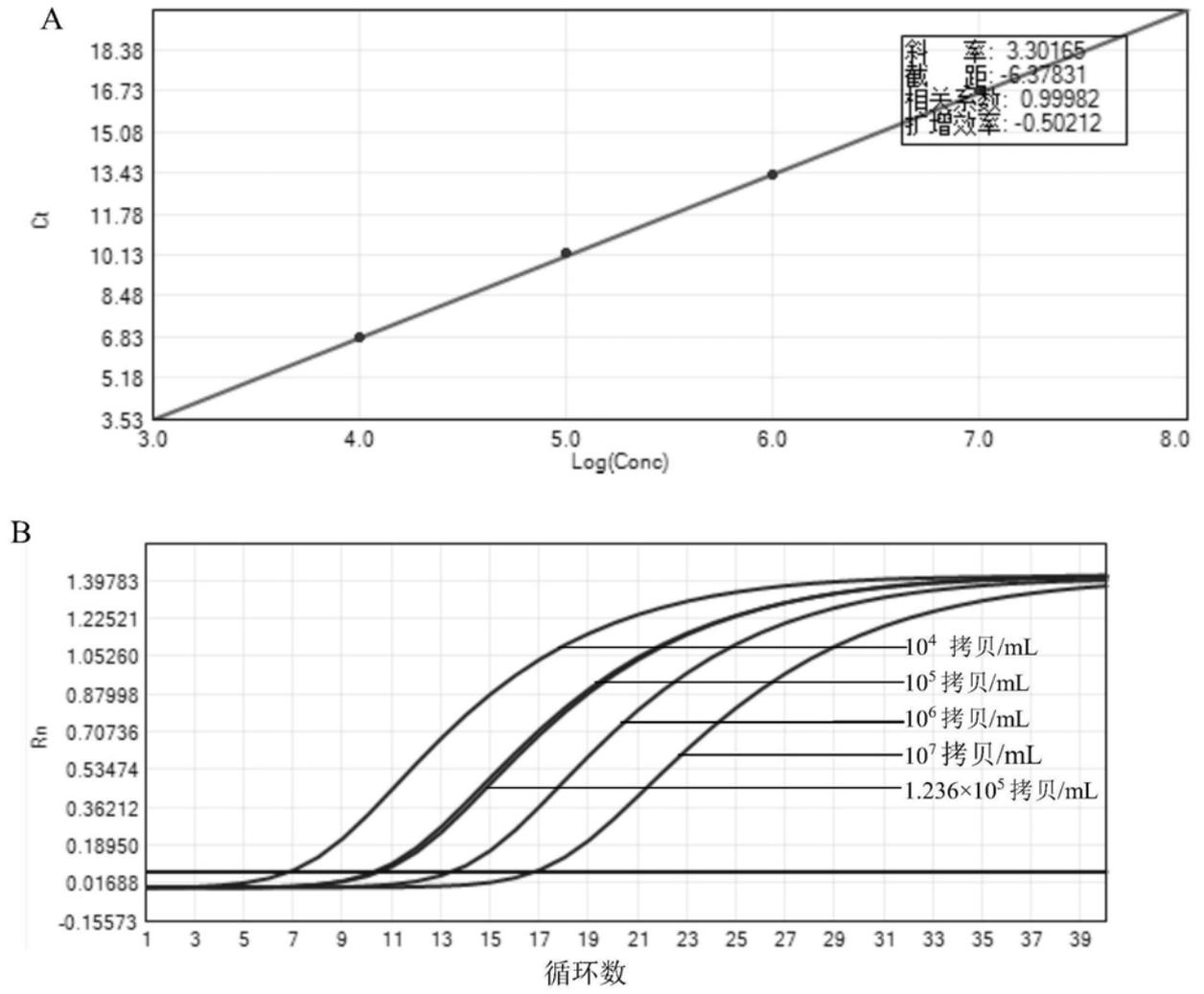


图1

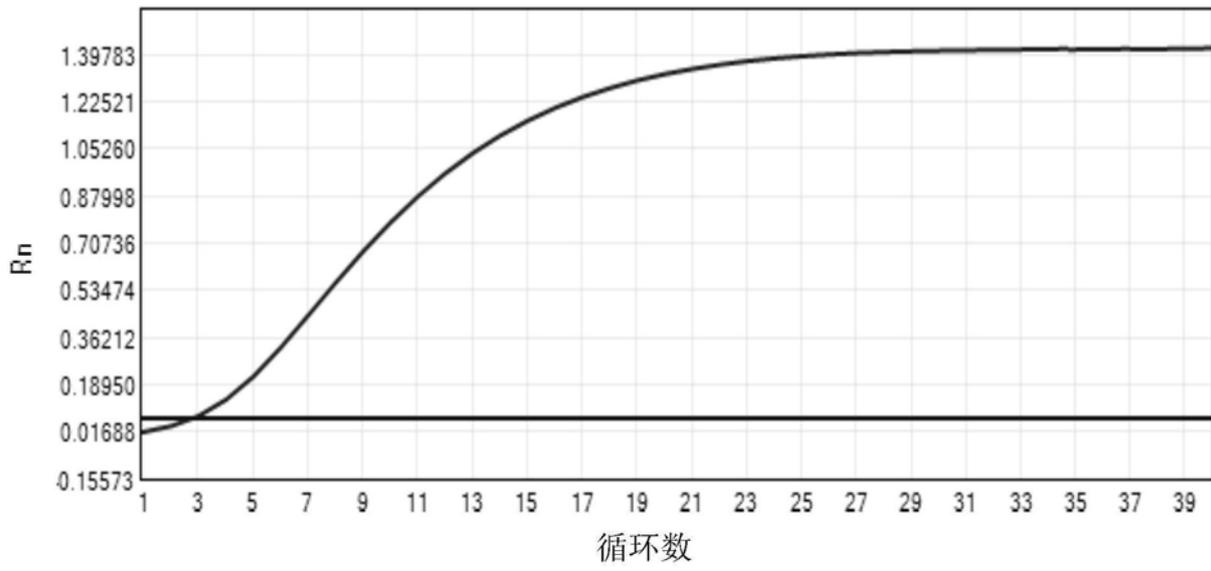


图2