



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108333350 A

(43)申请公布日 2018.07.27

(21)申请号 201711372244.2

(22)申请日 2017.12.19

(71)申请人 宝瑞源生物技术(北京)有限公司

地址 102433 北京市房山区窦店镇中心路8号

(72)发明人 李雨峰 陈立柱 杨海侠

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

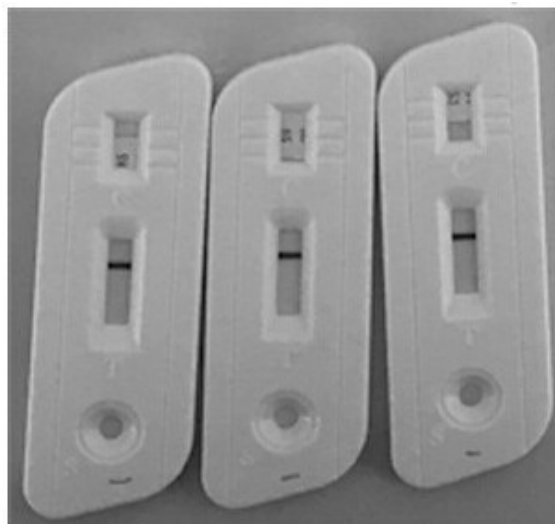
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

免疫探针降解PCR层析核酸检测法

(57)摘要

本发明公开了一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法,包括扩增和免疫层析检测等步骤。扩增的体系中包括可以随基因扩增而降解的特异性免疫标记探针、不随扩增反应降解的内标探针。将扩增的产物进行免疫层析检测。通过结果判读是否有目的基因存在。本发明提供了一种不依赖昂贵仪器,便于操作特点的基础上,兼顾灵敏性高,稳定性强,不受二聚体、气溶胶等PCR技术自身特点的基因检测方法。特别适用于各领域内基因检测的应用和推广。实用价值高。



1. 一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法, 其特征在于: 包括PCR扩增和免疫层析检测等步骤。

2. 根据权利要求1所述的一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法, 其扩增步骤的特征在于: 扩增反应液中添加免疫探针和内标探针。

3. 根据权利要求1所述的一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法, 其免疫探针的特征在于: 成分为可以与待测目的基因特异性结合的寡聚核苷酸序列, 其两端分别标记不同的免疫源性分子, 在扩增的过程中, 该探针可以被水解; 内标探针的特征在于: 成分为不能与待测目的基因特异性结合的寡聚核苷酸, 其两端分别标记不同的免疫源性分子, 在扩增的过程中, 该探针不可被水解。

4. 根据权利要求1所述的一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法, 其免疫层析检测步骤的特征在于: 使用的免疫层析试纸包括加样垫(1)、样品垫(2)、层析膜(3)、吸水纸(4)。

5. 根据权利要求3所述的免疫源性分子, 其特征在于: 可以结合在寡聚核苷酸片段的一端结合, 并可以制备相应的蛋白抗体, 并能和抗体特异性结合。其中样品垫(2)上含有示踪物, 层析膜(3)上分别标记不同的抗体。

6. 根据权利要求4中所述的示踪物, 其特征在于: 富集之后肉眼可见或可被机器读取含量的物质, 并且可以连接蛋白抗体。

7. 一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法, 其特征在于: 根据不同的检测需要, 可以设置多条免疫降解探针, 相对应地, 免疫层析试纸层析膜上可以设置多条检测区域。

免疫探针降解PCR层析核酸检测法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫探针降解PCR层析法,具体而言是一种适用于基因快速、可视化检测的方法,属于分子诊断领域,。

背景技术

[0002] 随着分子生物学的发展,以聚合酶链式反应(PCR)技术为基础的基因诊断得到了广泛的应用,特别在感染性病毒、微生物、肿瘤标志物等检测领域中,起到了越来越重要的作用。

[0003] PCR技术的原理是,使用特异性引物,在体外重建的PCR扩增体系中,通过聚合酶使目的基因得到扩增,并通过琼脂糖电泳、荧光实时收集、胶体金免疫层析等方法,对扩增产物进行跟踪,从而达到检测的目的。

[0004] 目前常用到的PCR核酸检测法有实时荧光定量PCR法、PCR免疫层析法、数字PCR法等。

[0005] 如公开号为CN105018468A的专利,提出了一种荧光定量PCR试剂盒和方法,使用两端带有免疫发光基团标记的探针,随着扩增的进行,探针上的淬灭基团被降解,另一端标记的荧光基团发光,通过收集和分析荧光信号,从而表征基因的扩增情况。该方法具有精确、高效等优点。但存在着自身的不足,如必须依赖于昂贵的荧光定量PCR检测系统,该系统属于精密仪器,其自带的软件需要专业人员进行操作和判读。另外,鉴于PCR检测法自身的特点,需要比较严格的实验室环境,扩增样本提取、扩增检测等步骤,需要在特定条件的实验室下进行,不利于广泛推广。

[0006] 再例如,公开号为CN102520172A的专利,提出了一种结合PCR技术和免疫胶体金层析技术的核酸检测方法,使用了地高辛和生物素标记特异性探针,经过PCR反应过程,获得的核酸产物两端带有生物素和地高辛的标记。将扩增产物进行免疫层析试纸检测,试纸上固定地高辛抗体,金颗粒标记生物素抗体。在层析过程中,金颗粒、待测核酸片段和地高辛抗体之间形成三层夹心状结构,并截留于检测线。从而根据检测线的显色,表征是否有目的基因的扩增。该方可以不借助高精密度的仪器,操作简单,检测结果可以肉眼判读。但根据PCR反应自身的特点,该反应体系中的引物二聚体会严重的影响免疫层析结果。并且随着模板和反应循环数的变化,以及非特异性扩增产生的产物,这些都能使检测结果容易出现假阳性。另外,大量的标记扩增产物会随着反应管的打开,散发与空气之中,形成气溶胶,从而导致了胶体金检测结果的不准确。

[0007] 为了使基因检测在不依赖昂贵仪器,便于操作特点的基础上,兼顾灵敏性高,稳定性强,不受二聚体、气溶胶等PCR技术自身特点的限制。本发明提供了一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法。为基因检测领域提供一种高效且可靠的方法,成为检测手段有力的支撑,具有很高的实际应用价值。

发明内容

[0008] 本发明的目的是：提供一种快速的基因检测方法。以克服传统检测方法耗时长、依赖精密仪器、依赖专业人员、精度低、易受污染等缺点。另外，本发明以内标探针为参照验证检测结果是否正确，在一定程度上能有效避免探针无法完全降解等问题造成的检测问题。从而有效的对检测结果作出科学和准确的判断。

[0009] 本发明目的的实现：

一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法，包括核酸扩增过程和胶体金免疫层析过程。其特征在于。

[0010] 针对待测基因，设计特异性结合的免疫探针序列，两端分别标记不同的可被抗体特异性识别的分子物质，作为一个实施例，所标记的分子为地高辛和生物素。

[0011] 同时设计内标探针，该探针是其他源性的寡聚核酸片段，该片段不与待测基因结合，不参与扩增反应。两侧标记可被抗体特异性识别的分子物质。作为一个实施例，所标记的分子为生物素和多巴胺。

[0012] 将上述的探针等量加入到PCR反应体系中，进行扩增反应，根据PCR扩增的原理，免疫探针将会和目的基因特异性结合，随着特异性引物和扩增酶的作用下，半保留复制将从3'端开始，向5'端延伸，DNA扩增酶不但具有3'端的聚合酶活性，也具有5'端的降解酶的活性，随着延伸，结合在前方的探针将被降解，使免疫探针上结合的两个免疫源性分子分离。游离于体系中；内标探针不结合于目的基因，所以内标探针并不降解。保持了结构的完整。

[0013] 若模板中不存在目的基因，则免疫探针和内标探针都不降解。保持其结构的完整。

[0014] 一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法，其层析检测的特征在于：使用抗原抗体三层夹心法原理检测，使用的示踪物可以是肉眼可见的金颗粒，也可以是机器可以判读的荧光微球。

[0015] 作为一个实施例，在免疫层析试纸应该包括样品垫、层析膜、加样垫、吸水垫等，在样品垫上铺设标记生物素抗体的金颗粒，在检测线(T线)上标记地高辛抗体，在控制线(C线)上标记多巴胺抗体。

[0016] 若扩增体系中不存在目的基因，那么免疫探针不被降解。体系中存留结构完整的免疫探针和内标探针。将上述扩增产物滴入样品垫中，液体会由于虹吸效应向吸水垫方向层析，金标颗粒标记的生物素抗体会和探针上的生物素分子结合，使金标颗粒结合在探针的一端。

[0017] 层析至检测线(T)时，此处固定的地高辛抗体和免疫探针的地高辛一端的地高辛分子结合，形成了地高辛抗体-地高辛-探针-生物素-生物素抗体-金颗粒的三层夹心结构，将金颗粒截留于T线，肉眼可观测。若探针被降解，则不能生成三层夹心结构，无法截留金颗粒，则不发生显色。

[0018] 同理，内标探针的多巴胺一端，被控制线(C线)上的多巴胺抗体识别并结合，生物素一端被金颗粒上标记的生物素抗体结合，形成三层夹心结构，在控制线(C线)聚集显色。

[0019] 一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法，通过免疫层析试纸的显色程度或荧光程度显示是否有目的基因的存在。

[0020] 本发明的优势在于。

[0021] 本发明提供了一种不依赖昂贵仪器，便于操作特点的基础上，兼顾灵敏性高，稳定性强，不受二聚体、气溶胶等PCR技术自身特点的基因检测方法。通过特异性引物和特异性

免疫探针双重保证反应的特异性,不受非特异性扩增和引物二聚体的影响,随着扩增的进行,免疫探针被降解,而不是大量生成,避免了气溶胶对后续免疫层析测量结果的影响。针对免疫层析检测结果,可以表征待测样本中是否含有目的基因。同时引入等量内标探针作为参比,确保了反应的灵敏度。

附图说明

[0022] 图1:层析试纸结构示意图。

[0023] 图2:HCV检测阳性结果。

[0024] 图3:HCV检测弱阳性结果。

[0025] 图4:HCV检测阴性对照结果。

具体实施方式

[0026] 实施例1。

[0027] 作为一种本发明的实施例,样本为HCV 2a分型感染血浆样本和阴性对照样本,使用试剂盒法提取,试剂盒为宝瑞源生物技术(北京)有限公司生产的核酸纯化试剂(磁珠法)。提取结束获得检测模板。

[0028] 配制反应体系如下:

组分	加入量
5X One-step RT-PCR Buffer	10 μ l
Solution I(10X)	5 μ l
酶系	2 μ l
上游引物	1.5 μ l
下游引物	1.5 μ l
免疫探针	1 μ l
内标探针	1 μ l
水	8 μ l
模板	20 μ l

其中设计的序列为:

上游引物:ATC CCT CGC TTC TAT CCT GAC;

下游引物:TTC ATG GCT TGG AAT ATA CTC A。

[0029] 作为本发明的一个实施例,设计的免疫探针和内标探针的序列为:

免疫探针:地高辛-ATC CCT GTT TTA AAG GCT TGC TTA GGG-生物素;

内标探针:多巴胺-CCC CTA AAT TGC CCT TCA AAA CTA GAG-生物素。

[0030] 将上述混合液置于PCR仪上进行反应,循环参数设计如下。

序号	步骤	温度 ($^{\circ}$ C)	时间	循环
1	RNA 反转录	50	30 分钟	1
2	预变性	95	3 分钟	1
3	变性	95	15 秒	45
4	延伸, 荧光采集	62	45 秒	
5	仪器冷却	25	10 秒	1

[0031] 一种免疫探针降解PCR层析法的免疫层析试纸,作为一个实施例,在免疫层析试纸应该包括样品垫、层析膜、加样垫、吸水垫等,在样品垫上铺设标记生物素抗体的金颗粒,在检测线(T线)上标记地高辛抗体,在控制线(C线)上标记多巴胺抗体。

[0032] 将反应结束后的扩增产物进行免疫层析检测。检测结果如附图1,C线显色深,T线无显色,说明探针被降解,不能生成三层夹心结构,无法截留金颗粒,则不发生显色。结论是待测样本为含有HCV 2a的目的基因,该血浆样本为HCV 2a阳性。

[0033] 检测结果显示如附图3,C线显色深,T线显色远远低于C线,说明探针被降解,但不完全,该血浆样本为HCV 2a弱阳性。

[0034] 阴性对照样本T线显色,且与C线深浅一致,说明免疫探针未被降解,说明该样本为HCV 2a阴性,见附图4。

[0035] 以上实施例仅为本发明在HCV定性检测中的应用案例之一,而不是对本发明进行的具体限定,本发明可以运用于微生物检测、转基因检测、体外诊断检测等所有与基因检测有关的领域中,本领域技术人员,利用本发明的思想,设计的探针、标记分子、示踪物都应落在本发明的保护范围内,例如应用本发明的设计思路,对甲肝病毒、乙肝病毒、转基因外源启动子等检测,都属于对本发明的应用。同时,本领域内技术人员易知的、显而易见的对本发明的改进,如各组分的用量的优化,也落入本发明的范围。

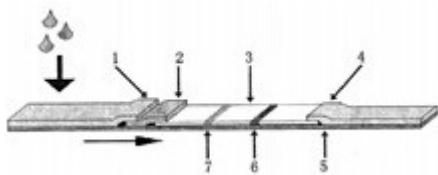


图1

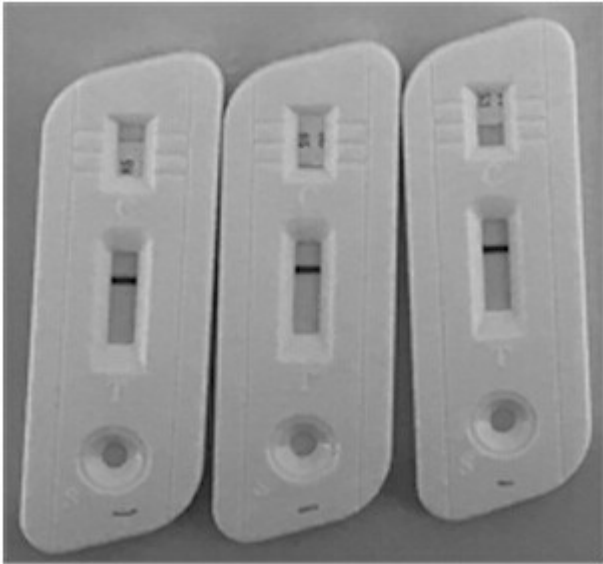


图2



图3



图4

专利名称(译)	免疫探针降解PCR层析核酸检测法		
公开(公告)号	CN108333350A	公开(公告)日	2018-07-27
申请号	CN2017111372244.2	申请日	2017-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宝瑞源生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	李雨峰 陈立柱 杨海侠		
发明人	李雨峰 陈立柱 杨海侠		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫探针降解PCR层析核酸检测法，包括扩增和免疫层析检测等步骤。扩增的体系中可以随基因扩增而降解的特异性免疫标记探针、不随扩增反应降解的内标探针。将扩增的产物进行免疫层析检测。通过结果判读是否有目的基因存在。本发明提供了一种不依赖昂贵仪器，便于操作特点的基础上，兼顾灵敏性高，稳定性强，不受二聚体、气溶胶等PCR技术自身特点的基因检测方法。特别适用于各领域内基因检测的应用和推广。实用价值高。

