



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102269759 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201010192503. 5

(22) 申请日 2010. 06. 07

(73) 专利权人 常州楚天生物科技有限公司

地址 213022 江苏省常州市新北区高新技术
园创新科技楼北区 417

(72) 发明人 雷向东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

DE 10200703113 A1, 2008. 12. 18, 权利要求
1-32.

US 2002132233 A1, 2002. 09. 19, 权利要求
1-32, 说明书第 8-56 段.

CN 01106288 A, 2002. 10. 09, 全文.

DE 10200703113 A1, 2008. 12. 18, 权利要求
1-32.

WO 2010081493 A1, 2010. 07. 22, 全文.

CN 200910152668 A, 2010. 02. 24, 全文.

黄杰. 免疫 PCR 家属及其应用研究进

展. 《国际检验医学杂志》. 2006, 第 27 卷 (第 8
期), 709-712.

曹琛福 等. 应用 SYBRGreen 荧光 PCR 熔解曲
线同时检测两种致病菌. 《动物医学进展》. 2009,
第 30 卷 (第 2 期), 12-15.

Patricia Elizaquivel and Rosa Aznar. A
multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous
detection of Escherichia coli O157:H7,
Salmonella spp. and Staphylococcus aureus
on fresh, minimally processed vegetables.
《Food Microbiology》. 2008, (第 25 期), 摘要,
正文 2. 1-2. 9, 第 711 页左栏第 16-25 行, 表 2, 图
1.

审查员 周洋

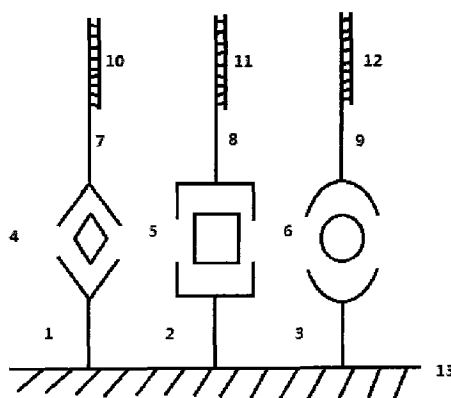
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于免疫 PCR 和 DNA 熔解曲线分析的多
重检测方法

(57) 摘要

本专利公开了一种基于免疫 PCR 和 DNA 熔解
曲线分析的多重检测方法。其原理是用一组可通
过 PCR 高效扩增且扩增产物的熔解温度相差较大
的 DNA 分子分别标记免疫 PCR 检测中使用的检测
物质如抗体或抗原。将 DNA 标记的检测物质混合
成一个检测试剂进行免疫 PCR。PCR 产物再通过
熔解曲线分析来分辨扩增产物中包含哪几种标记
DNA。如果某一个 DNA 标记的特征熔解曲线峰存
在, 表明该 DNA 所标记的检测物质所检测的对象
在样本中存在。各个峰的面积可用来计算所检测
到的物质的相对含量。该方法特别适合 10 种以内
病原体或其它抗原抗体的多重高灵敏度检测。



基于DNA熔解曲线分析的多重免疫PCR原理图

1. 一种多重免疫 PCR 方法,其特征是,将免疫 PCR 与 DNA 熔解曲线分析相结合,先在反应基质中加入被检测物质特异性识别物质的混合物作为捕获试剂,然后加入被检测物质,在样品中的被检测物质被捕获试剂捕获后,加入特异性识别被检测物质、并连接了不同标记 DNA 的物质混合物作为检测试剂,待被检测物质与检测试剂结合后,在单管内通过 PCR 扩增不同的标记 DNA 并对其产物进行熔解曲线分析,实现在单管内对多种被检测物质的高灵敏度检测;所述的被检测物质是可以通过物质与物质的特异性作用而相互识别的物质,所述的不同的标记 DNA 其扩增产物的熔解温度即 T_m 值不同,彼此差别至少 0.5 摄氏度。

一种基于免疫 PCR 和 DNA 熔解曲线分析的多重检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体为一种多重检测方法。其特点为可以在一个反应体系中同时检测多种物质。这里所指的物质是可以通过特异性作用而相互识别的物质,如抗体与抗原,受体与配体,酶与底物,凝集素与多糖。因原理相同,为方便叙述,这里以检测蛋白质为例对本发明的多重检测方法进行说明。

背景技术

[0002] 免疫检测通常是指通过抗体与抗原的特异性识别而用抗体(或抗原)来检测抗原(或抗体)的检测方法。这种通过特异性相互识别的检测方法也可以推广到其它物质的检测,如受体与配体,酶与底物,凝集素与多糖。免疫检测的最经典方法是酶联免疫吸附法(ELISA)。该方法简单,经济,而且已广泛采用自动化操作。ELISA 的局限一是灵敏度低,二是无法进行多重检测。为了增强 ELISA 的灵敏度,免疫 PCR 运用而生。免疫 PCR 是 ELISA 和 PCR 的结合。整个流程的前面步骤是 ELISA,完成抗体抗原的专一性结合。与经典的 ELISA 不同的是,免疫 PCR 的检测抗体不是用酶标记的,而是用 DNA 标记的。标记的 DNA 随后通过 PCR 进行扩增,并用生物素标记,扩增产物通过标记的生物素检测。标记的 DNA 也可通过实时荧光 PCR 直接定量。免疫 PCR 比 ELISA 灵敏度高 10-10000 倍,解决了 ELISA 灵敏度低的问题。本发明通过巧妙设计标记在检测抗体或抗原的 DNA 序列,并将免疫 PCR 与 DNA 熔解曲线分析结合,组成一种新颖的多重免疫 PCR 检测技术。这种新颖的多重免疫 PCR 技术具备以下几个优点。(1)DNA 熔解曲线分析可以在 PCR 后极为方便的完成。如果使用实时荧光 PCR 仪,熔解曲线分析可以整合到 PCR 程序中,PCR 和 DNA 熔解曲线分析一气呵成,操作人员无需做任何事,达到 PCR 和熔解曲线分析的无痕结合。如果使用常规 PCR 仪,PCR 扩增后,也无需打开 PCR 反应管盖做任何事,仅仅需要把 PCR 管转移至熔解曲线分析仪进行熔解曲线分析即可。这不仅方便了操作,而且大大减少了 PCR 污染。(2)DNA 熔解曲线分析是非破坏性,非消耗性检测。分析结束,样本恢复原样。(3)DNA 熔解曲线分析不需要在 PCR 时对 PCR 产品进行标记,化学反应简单,也减少了成本。由此可见,这种基于 DNA 熔解曲线分析的多重免疫 PCR 比基于 DNA 固体芯片技术,液体芯片技术,或凝胶电泳分析的多重免疫 PCR 简便,快速,经济,抗 PCR 污染能力强。本专利描述的多重免疫 PCR 特别适用于十种以内物质的高灵敏度多重检测。

发明内容

[0003] 本发明通过巧妙设计标记 DNA 序列,并将免疫 PCR 与 DNA 熔解曲线分析结合,实现对多种物质的高灵敏度多重检测。这里所指的物质是可以通过特异性作用而相互识别的物质,如抗体与抗原,受体与配体,酶与底物,凝集素与多糖。因原理相同,为方便叙述,下文以被检测物均为抗原为例。图一显示同时检测三种抗原的原理。

[0004] 1. 设计一组互不相同的用于标记检测抗体的 DNA 序列,数目与需检测的抗原数相同。如需要同时检测三种抗原,设计三个 DNA 序列。如图一中 10,11,12。设计的 DNA 标记

具备如下特点：

[0005] (1) DNA 长度在 40 个碱基以上；

[0006] (2) 设计的一组标记 DNA，每个标记 DNA 都可以用 PCR 高效率扩增。扩增每个标记 DNA 的引物可以相同，也可以不同。如果不同，这些引物对必须能在同一个 PCR 反应体系中在相同的循环条件下高效率的扩增各自的模板。

[0007] (3) 设计的一组标记 DNA，各个标记的 PCR 产物熔解温度（即 T_m 值）不同，彼此差别至少 0.5 摄氏度。具体差值可视反应体系的多重度和熔解曲线的分析仪器的精度确定。如只需对六种或少于六种蛋白质同时检测，可设计成 DNA 标记的 PCR 扩增产物彼此之间的熔解温度差在 2 摄氏度以上。这样，市场上的几种主流实时荧光 PCR 仪能可靠的分辨每个 DNA 标记的熔解曲线，反应体系的微小波动对熔解温度的影响将不会对结果的判断造成困难，体系抗干扰的能力强。这也为使用分辨率低但价格低廉的熔解曲线分析仪提供可能，为降低检测成本创造空间。

[0008] 2. 用合成的 DNA（单链或双链均可）分别标记检测抗体，一种检测抗体标记一种 DNA 序列。

[0009] 3. 将 DNA 标记的检测抗体混合在一起。混合的浓度由抗体的滴度确定，要求是当加入一定体积的混合检测抗体时，每个抗体的浓度在其最佳工作浓度范围。

[0010] 4. 将每个被检抗原的捕获抗体混合，固定在反应基质表明，如酶联免疫吸附板反应孔或微球表面，如图一中 13。

[0011] 5. 加入样本（如样本需预处理，先作预处理），恒温培育一定时间，让抗原抗体充分结合。培育结束充分洗涤后，加入 DNA 标记的检测抗体混合物，恒温培育。

[0012] 6. 恒温培育结束后，洗涤。如果采用了可同时做 ELISA 和 PCR 的管子，可直接加入 PCR 混合液进行扩增。否则需通过物理如加热或化学的处理破坏抗原—抗体—DNA 标记复合物，然后将 DNA 或含有 DNA 的部分转移至 PCR 管进行 PCR 扩增。PCR 扩增混合液含有引物，DNA 聚合酶，荧光染料 SYBRI 或其它用于高分辨率熔解曲线分析的荧光染料，和其它辅助成分。

[0013] 7. PCR 扩增后对 PCR 产物进行熔解曲线分析。如果 PCR 时使用实时荧光 PCR 仪，PCR 扩增和扩增后的熔解曲线分析在同一仪器上完成，完全达到 PCR 扩增与 PCR 产物的融解曲线分析无痕连接。如果使用专门的熔解曲线分析仪，PCR 可以在常规 PCR 仪上进行。PCR 结束后，不需要打开 PCR 反应管，仅仅需要将 PCR 管从 PCR 仪转移至 DNA 熔解曲线分析仪。如果某一个 DNA 标记的特征熔解曲线峰存在，表明该 DNA 所标记的抗体或抗原所检测的蛋白质在样本中存在。如图 2 所示，融解曲线分析显示三个峰，对应的熔解温度分别为 T_{m1} ， T_{m2} ， T_{m3} ，表明熔解温度为 T_{m1} ， T_{m2} ， T_{m3} 的 DNA 所标记的抗体所检测的抗原在样品中存在。各个峰的面积可用来计算所检测到的蛋白质的相对含量。

附图说明

[0014] 图一：基于 DNA 熔解曲线分析的多重免疫 PCR 原理图。该图以检测三种抗原为例。图中，4,5,6 分别代表三种需要检测的抗原。1,2,3 分别为抗原 4,5,6 的捕获抗体。7,8,9 分别为 4,5,6 的检测抗体。10,11,12 为分别标记在检测抗体 8,9,10 上的标记 DNA。13 为捕获抗体吸附的基质。

[0015] 图二：基于 DNA 熔解曲线分析的多重免疫 PCR 熔解曲线分析示意图。该图以样品中存在三种检测抗原为例。图中 Tm1, Tm2, Tm3 分别为 DNA 标记 10, 11, 12 的熔解温度。

具体实施方式

[0016] 下面以常检致病性食品微生物沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌的同时检测为例说明具体实施方式。需要特别强调的是本专利不是描述和寻求保护沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌的同时检测体系，而是以此例说明基于免疫 PCR 和 DNA 熔解曲线的多重分析方法。因而本专利不详细描述沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌应用本技术检测的细节。

[0017] 设计 4 个 DNA 序列 A, B, C, D, 4 对 PCR 引物 a, b, c, d。引物 a, b, c, d 分别专一性扩增 A, B, C 和 D。A, B, C 和 D 的 PCR 扩增产物的熔解温度互不相同，相邻的两个熔解温度相差约 3 摄氏度。用 A, B, C, D 分别通过化学共价连接标记抗沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌特异抗原的检测抗体。将标记的四个抗体混合组成混合检测抗体。将沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌各自特异性抗原的捕获抗体混合成一个混合捕获抗体，通过表面吸附固定在酶联免疫和 PCR 两用反应管中。用屏蔽缓冲液屏蔽非专一性结合位点后，加入处理过的样本，培育。培育结束，充分洗涤，加入混合检测抗体，培育。培育结束，充分洗涤。加入含有 SYBR I 的 PCR 扩增混合液，将 PCR 管转移至一实时荧光 PCR 仪（如 LightCycler 480）进行 PCR 扩增和扩增后 DNA 熔解曲线分析。根据熔解曲线分析出现的峰和每个峰的面积判定四种致病微生物是否存在和相对定量。

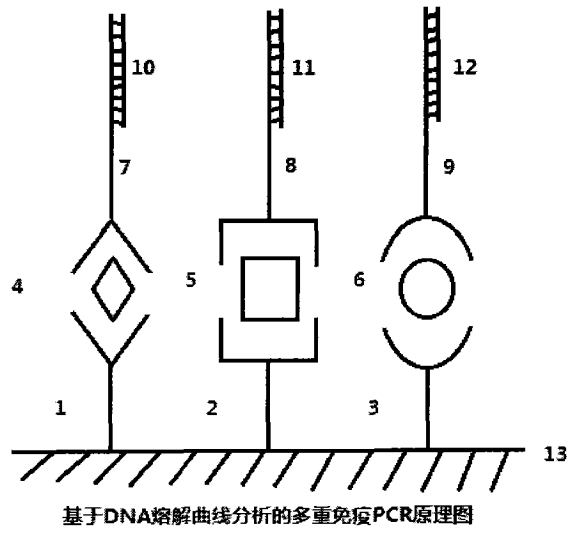
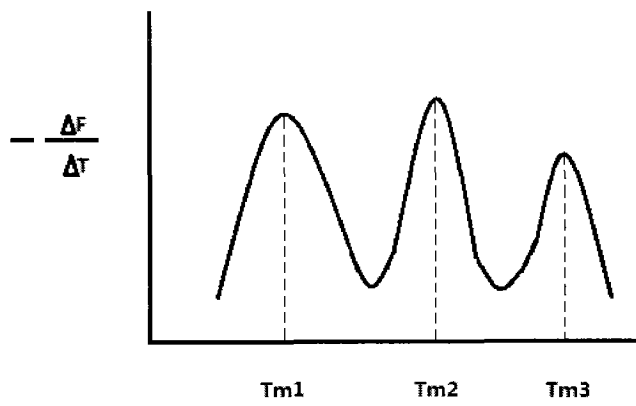


图 1



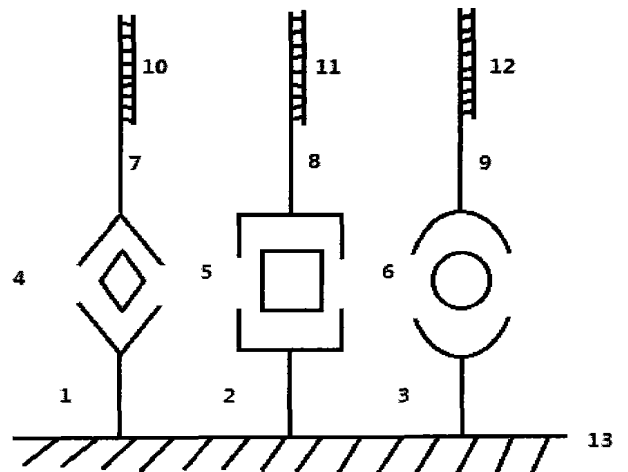
基于DNA溶解曲线分析的多重免疫PCR溶解曲线分析示意图

图 2

专利名称(译)	一种基于免疫PCR和DNA熔解曲线分析的多重检测方法		
公开(公告)号	CN102269759B	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201010192503.5	申请日	2010-06-07
[标]发明人	雷向东		
发明人	雷向东		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/68		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102269759A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本专利公开了一种基于免疫PCR和DNA熔解曲线分析的多重检测方法。其原理是用一组可通过PCR高效扩增且扩增产物的熔解温度相差较大的DNA分子分别标记免疫PCR检测中使用的检测物质如抗体或抗原。将DNA标记的检测物质混合成一个检测试剂进行免疫PCR。PCR产物再通过熔解曲线分析来分辨扩增产物中包含哪几种标记DNA。如果某一个DNA标记的特征熔解曲线峰存在，表明该DNA所标记的检测物质所检测的对象在样本中存在。各个峰的面积可用来计算所检测到的物质的相对含量。该方法特别适合10种以内病原体或其它抗原抗体的多重高灵敏度检测。



基于DNA熔解曲线分析的多重免疫PCR原理图