



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108414735 B

(45)授权公告日 2020.05.12

(21)申请号 201810128971.2

(22)申请日 2018.02.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108414735 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(73)专利权人 斯格特生物
地址 美国加州圣塔克拉拉县1700怀亚特路
10号

(72)发明人 李先强 姜昕

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222
代理人 彭劲松

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2018.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 103525942 A,2014.01.22,全文.
CN 104165999 A,2014.11.26,全文.
CN 101250585 A,2008.08.27,全文.
CN 101382552 A,2009.03.11,全文.
CN 103397090 A,2013.11.20,全文.
CN 1428606 A,2003.07.09,全文.
WO 2004094456 A2,2004.11.04,全文.
Martin Lundberg et al..Homogeneous
antibody-based proximity extension assays
provide sensitive and specific detection
of low-abundant proteins in human blood.
《Nucleic Acids Research》.2011,第39卷(第15
期),

审查员 刘彦宁

权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图1页

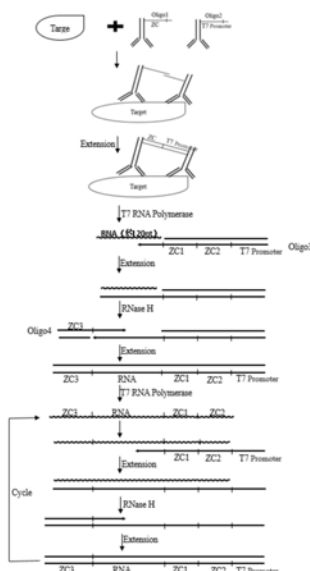
(54)发明名称

一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大
分子免疫分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于三次延伸-RNA扩增
介导的生物大分子免疫分析方法,属于免疫学领
域。该方法将生物大分子与识别生物大分子的物
质偶联的oligo1和oligo2接触,oligo1一端为标
签序列,另一端序列(长约6nt)可以和oligo2末
端互补配对;oligo2,一端为T7启动子序列,另一
端序列(长约6nt)可以和oligo1末端互补配对;
在Klenow酶的作用下进行延伸,形成dsDNA,在T7
聚合酶的作用下转录出小RNA分子;利用小RNA搭
桥对两个互不重叠的扩增引物进行双向延伸检
测小RNA,由此判断待检生物大分子的存在与否。
该法灵敏度高、对仪器的要求低,可用于生物医
学指标的超敏检测。

CN 108414735 B



1. 一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 相关探针及引物的设计:

(1) 第一和第二邻近探针的设计:oligo1,总长为20-30nt的DNA,一端为标签序列ZC,另一端长为5~6nt序列可以和oligo2末端互补配对;oligo2,总长为20-30nt的DNA,一端为T7启动子序列,另一端长为5~6nt序列和oligo1末端互补配对;

oligo1和oligo2分别与识别生物大分子的物质偶联,形成识别生物大分子的物质-oligo1、识别生物大分子的物质-oligo2,标记oligo1和oligo2的物质是结合生物大分子的抗体、或具有亲和能力的生物素;由于设计的这对oligo长度较短,为20-30nt,偶联后可以通过简单的离心柱层析法即实现偶联了识别生物大分子的物质的oligo与游离oligo分开;

(2) 扩增引物R,命名为oligo3:oligo3有两个部分,3'端与转录的小RNA一半的序列互补配对,即通过10或11核苷酸长度与转录的小RNA的3'端的半个分子杂交;另一端是标签序列ZC1和/或ZC2及T7启动子序列;根据标签序列设计捕获探针和检测探针,用于对后续扩增产物的定性分析,标签序列根据需要进行设计,为1-2条,长度为16~20nt;T7启动子序列是T7聚合酶识别位点,用于后续的T7聚合酶转录;

(3) 稳定序列1:为了增加oligo3和转录的小RNA杂交体的稳定性,引入稳定序列1,其与标签序列ZC1和/或ZC2以及T7启动子互补配对结合;

(4) 扩增引物F,命名为oligo4:与oligo3特征相似,有两个部分,一端与转录的小RNA的5'端的半个分子序列相同,长度为10~11核苷酸,可与转录的小RNA全长的cDNA序列互补配对结合;另一端含有一个标签序列ZC3,该标签序列可以用于后续扩增产物定性检测时捕获探针或检测探针的设计;

(5) 稳定序列2:为了增加oligo4和新合成的oligo3-RNA~cDNA结合的稳定性,引入稳定序列2,其特征为可以和标签序列ZC3互补配对结合;

2) 生物大分子检测

(1) 在一个单项反应的试管中识别生物大分子的物质-oligo1和识别生物大分子的物质-oligo2同时结合靶标生物大分子,由于邻位的原因,oligo1和oligo2尾部的6个核苷酸分子会互补配对结合,然后在Klenow酶的作用下进行延伸,形成一个dsDNA,此为第一次序列延伸;

(2) 步骤(1)形成的dsDNA由于含有T7启动子,在T7聚合酶的作用下转录出小RNA分子,大小为20~25nt;

(3) oligo3和步骤(2)转录的小RNA 3'端一半的序列结合,形成小RNA-oligo3复合物,为增加该复合物的稳定性,稳定序列1通过碱基互补配对的原则结合到该复合物上来,最终oligo3、稳定序列1以及小RNA通过融合效应形成一个稳定的oligo3/稳定序列1-RNA复合物,该复合物在逆转录酶的作用下得到小RNA分子全长的cDNA,即为oligo3-RNA~cDNA:RNA复合物,此为第二次序列延伸;

(4) 步骤(3)oligo3-RNA~cDNA:RNA复合物在RNaseH的作用下,复合物中的RNA会被降解,形成oligo3-RNA~cDNA;

(5) oligo4会和oligo3-RNA~cDNA互补配对结合,形成oligo3-RNA~cDNA-oligo4复合物;为增加该复合物的稳定性,稳定序列2通过碱基互补配对的原则结合到该复合物上来,

最终Oligo4、稳定序列2、稳定序列1以及oligo3合成的oligo3-RNA~cDNA通过融合效应形成一个稳定的复合物,即为oligo3-RNA~cDNA-oligo4/稳定序列2复合物;该复合物在逆转录酶的作用下得到含有T7启动子序列、标签序列以及小RNA分子全长的双链DNA,即oligo3-RNA~cDNA-oligo4双链DNA,此为第三次序列延伸;

(6) 在(5)中形成的oligo3-RNA~cDNA-oligo4双链DNA序列结构为T7 启动子-ZC2-ZC1-RNA~cDNA-ZC3,该双链DNA通过TMA 或 NASBA方法进行扩增,得到一段序列为ZC2-ZC1-RNA~cDNA-ZC3的RNA分子;

(7) 检测所述RNA 的扩增产物的存在与否和/或数量,由此判断待检生物大分子的存在与否和/或数量。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2) (7)中的检测结果为定性或定量结果。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2) (7)中检测所述RNA 的扩增产物的方法包括分子信标、平板杂交-信号放大、或者核酸胶体金检测。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤2) (7)中检测所述RNA 的扩增产物的方法为平板杂交-信号放大检测,具体为根据标签序列ZC3设计捕获探针,该捕获探针和ZC3互补配对结合,进而将扩增的RNA分子固定在微孔板中或其他固相载体上;再根据标签序列ZC1和/或ZC2设计检测探针,该检测探针和ZC1和/或ZC2碱基互补配对结合,检测探针标记上生物素,进而将生物素标记到扩增出的RNA分子上,后续依次添加链霉亲和素-HRP酶、化学发光底物,最终通过化学发光的方法检测扩增产物的有无或数量,进而判断待检生物大分子的检出情况。

5. 如权利要求1-4任一项所述的方法,其特征在于,所述的生物大分子是指通过特异性作用而相互识别的物质。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述的通过特异性作用而相互识别的物质为抗体与抗原、受体与配体、酶与底物、凝集素与多糖中的任意一种。

一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,具体涉及一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法。

背景技术

[0002] 数十年来,免疫学方法如酶联免疫法(ELISA)已被广泛应用于生命科学研究和临床诊断中。ELISA为基础的产品具有使用简单、通用性高以及成本相对较低的特点。但是,像任何其他技术一样这些普通的免疫学方法都有局限性,最主要的问题就是其检测的敏感度不高,难于检测超低量的蛋白质,而这些超低量蛋白质对于像冠状动脉疾病、卵巢肿瘤、以及老年痴呆症这样的疾病的早期诊断至关重要。因此,建立一种超高敏感的生物大分子检测技术显得尤为必要。

[0003] 免疫-聚合酶链反应(Immuno-PCR, iPCR)已成为一个强有力的技术,在检测靶标蛋白时灵敏度比常规ELISA方法高100~10000倍。这种方法学灵敏度的提高是通过对抗体偶联核苷酸进行PCR扩增而实现的。但是这种设计存在许多缺陷,即设计的与抗体偶联的核苷酸都较长,如在邻位连接技术(Proximity ligation assay, PLA)和邻位延伸技术(Proximity extension assay, PEA)中使用的一对核苷酸片段都较长,约40-60核苷酸,这两种技术中较长核苷酸的设计是便于下一步的PCR分子扩增。这种较长探针设计的缺陷在于核苷酸偶联抗体后的复合物与游离的核苷酸很难分离,常规的分离方法比如HPLC分离纯化,需要一定的抗体量才能进行有效分离,当标记的抗体量很少时仍然很难实现有效分离。

发明内容

[0004] 针对以上问题,本发明提供一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子高敏免疫分析方法,即免疫-TEBRA(triple extension-based RNA amplification)。该方法具有高灵敏度、抗体用量小、对仪器的要求较低的特点,可用于生物医学指标的超敏检测,还可用于以监测生物标志物浓度为基础的新药筛选平台的建立。

[0005] 为解决现有技术中存在的问题,本发明通过以下技术方案实现:

[0006] 本发明第一方面,提供一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 相关探针及引物的设计:

[0008] (1) 第一和第二邻近探针的设计:oligo1,总长为20-30nt的DNA,一端为标签序列ZC,另一端序列(长为5~6nt)可以和oligo2末端互补配对;oligo2,总长约20-30nt的DNA,一端为T7启动子序列,另一端序列(长为5~6nt)和oligo1末端互补配对;

[0009] oligo1和oligo2分别与识别生物大分子的物质偶联,形成识别生物大分子的物质-oligo1、识别生物大分子的物质-oligo2,标记oligo1和oligo2的物质是结合生物大分子的抗体、或具有亲和能力的生物素;由于设计的这对oligo长度较短(约20-30nt),偶联后可以通过简单的离心柱层析法即实现偶联了识别生物大分子的物质的oligo与游离oligo

分开;

[0010] (2) 扩增引物R(命名为oligo3):oligo3有两个部分,3'端与转录的小RNA一半的序列互补配对,即通过10或11核苷酸长度与转录的小RNA的3'端的半个分子杂交;另一端是标签序列(命名为ZC1、ZC2)及T7启动子序列;根据标签序列设计捕获探针和检测探针,用于对后续扩增产物的定性分析,标签序列根据需要进行设计,为1-2条,长度为16~20nt;T7启动子序列是T7聚合酶识别位点,用于后续的T7聚合酶转录;

[0011] (3) 稳定序列1:为了增加oligo3和转录的小RNA杂交体的稳定性,引入稳定序列1,其与oligo3的标签序列、T7启动子互补配对结合;

[0012] (4) 扩增引物F(命名为oligo4):与oligo3特征相似,有两个部分,一端与转录的小RNA的5'端的半个分子序列相同(为10~11核苷酸),可与转录的小RNA全长的cDNA序列互补配对结合;另一端含有一个标签序列(命名为ZC3),该标签序列可以用于后续扩增产物定性检测时包被探针或检测探针的设计;

[0013] (5) 稳定序列2:为了增加oligo4和新合成的oligo3-RNA~cDNA结合的稳定性,引入稳定序列2,其特征为可以和标签序列ZC3互补配对结合;

[0014] 2) 生物大分子检测

[0015] (1) 在一个单项反应的试管中识别生物大分子的物质-oligo1(标记oligo1的物质可以是结合生物大分子的抗体、或具有亲和能力的生物素等)和识别生物大分子的物质-oligo2(标记oligo2的物质可以是结合生物大分子的抗体、或具有亲和能力的生物素等)同时结合靶标生物大分子,由于邻位(proximity)的原因,oligo1和oligo2尾部的6个核苷酸分子会互补配对结合,然后在Klenow酶的作用下进行延伸,形成一个dsDNA,此为第一次序列延伸;

[0016] (2) 步骤(1)形成的dsDNA由于含有T7启动子,在T7聚合酶的作用下转录出小RNA分子,大小为20~25nt;

[0017] (3) oligo3和步骤(2)转录的小RNA3'端一半的序列结合,形成小RNA-oligo3复合物,为增加该复合物的稳定性,稳定序列1通过碱基互补配对的原则结合到该复合物上来,最终oligo3、稳定序列1以及小RNA通过融合效应(stacking effect)形成一个稳定的oligo3/稳定序列1-RNA复合物,该复合物在逆转录酶的作用下得到小RNA分子全长的cDNA,即为oligo3-RNA~cDNA:RNA复合物,此为第二次序列延伸;

[0018] (4) 步骤(3)oligo3-RNA~cDNA:RNA复合物在RNaseH的作用下,复合物中的RNA会被降解,形成oligo3-RNA~cDNA;

[0019] (5) oligo4和oligo3-RNA~cDNA互补配对结合,形成oligo3-RNA~cDNA-oligo4复合物;为增加该复合物的稳定性,稳定序列2通过碱基互补配对的原则结合到该复合物上来,最终oligo4、稳定序列2、稳定序列1以及oligo3合成的oligo3-RNA~cDNA通过融合效应(stacking effect)形成一个稳定的复合物,即为oligo3-RNA~cDNA-oligo4/稳定序列2复合物。该复合物在逆转录酶的作用下得到含有T7启动子序列、标签序列以及小RNA分子全长的双链DNA,即oligo3-RNA~cDNA-oligo4双链DNA,此为第三次序列延伸;

[0020] (6) 在(5)中形成的oligo3-RNA~cDNA-oligo4双链DNA序列结构为T7启动子-ZC2-ZC1-RNA~cDNA-ZC3,该双链DNA可以通过TMA或NASBA方法进行扩增,得到序列为ZC2-ZC1-RNA~cDNA-ZC3的RNA分子;

[0021] (7) 检测所述RNA的扩增产物的存在与否和/或数量,由此判断待检生物大分子的存在与否和/或数量。

[0022] 在另一优选例中,上述步骤2) (7) 中所述的检测结果为定性或定量结果。

[0023] 在另一优选例中,步骤2) (7) 中检测所述RNA的扩增产物的方法包括分子信标、平板杂交-信号放大、或者核酸胶体金检测。

[0024] 在另一优选例中,步骤2) (7) 中检测所述RNA的扩增产物的方法为平板杂交-信号放大检测,具体为根据标签序列(如ZC3)设计捕获探针,该捕获探针可以和ZC3互补配对结合,进而可以将扩增的RNA分子固定在微孔板中或其他固相载体上;再根据标签序列(如ZC1、ZC2)设计检测探针,该检测探针可以和ZC1和ZC2碱基互补配对结合,检测探针可以标记上生物素,进而将生物素标记到扩增出的RNA分子上,后续可依次添加链霉亲和素-HRP酶(Strep-HRP)、化学发光底物,最终通过化学发光的方法检测扩增产物的有无或数量,进而判断待检生物大分子的检出情况。

[0025] 以上所述的生物大分子是指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。

[0026] 本发明检测生物大分子的原理如图1所示。

[0027] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和有益效果:

[0028] 1、oligo1和oligo2设计的长度较短,标记识别生物大分子的物质后很容易与游离的oligo进行分离。

[0029] 2、由于进过三序列延伸,检测灵敏度较高,经过试验检测生物大分子的灵敏度可以达到0.75pg/ml的级别。

[0030] 3、全程的扩增都为恒温扩增,对仪器的要求较低,一个恒温装置就可以实现检测,便于技术的推广。

附图说明

[0031] 图1显示了本发明方法的流程示意图。

具体实施方式

[0032] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0033] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0034] **【实施例1】**抗体及邻近探针(oligo1和oligo2)的活化

[0035] 抗体在标记邻近探针之前,抗体和邻近探针都要进行相应的活化处理,具体如下:

[0036] 1) 抗体的活化处理

[0037] (1) 将抗体溶解在PBS缓冲液(pH8)中,将抗体浓度稀释到1mg/ml。

[0038] (2) 取100 μ l的抗体(1mg/ml)+5 μ l TCO-PEG4-NHS(10mM),混匀,室温反应30min。

[0039] (3) 向体系中加入Tris-HCl缓冲液(1M, Ph8.0),终止反应,加入的量至Tris-HCl终

浓度为50~100mM。

[0040] (4) 室温孵育5min。

[0041] (5) 将产物过柱(7K孔径的脱盐柱),除去游离的TCO-PEG4-NHS及未活化的抗体,大于7K的会被洗脱收集,小于7K的会残留于层析柱中。所得产物即为活化的抗体。

[0042] 2) 邻近探针的活化处理

[0043] (1) 将邻近探针用PBS缓冲液(pH8)溶解成100 μ M。

[0044] (2) 取50 μ l的oligo(100 μ M)+5 μ l PEG4-NHS(10mM),混匀,室温反应30min。

[0045] (3) 向体系中加入Tris-HCl缓冲液(1M,pH8.0),终止反应,加入的量至Tris-HCl终浓度为50~100mM。

[0046] (4) 室温孵育5min。

[0047] (5) 将产物过柱(BioRad P-30Columns,40,000MW limit,洗脱液为PBS),除去未活化的oligo及游离PEG4-NHS。大于40K的会被洗脱收集,小于40K的会残留于层析柱中。所得产物即为活化的oligo。

[0048] **【实施例2】**活化后的邻近探针与抗体的链接

[0049] 1) 取15 μ l活化后的oligo1、50 μ l活化后的抗体,溶解在PBS缓冲液(pH8)至200 μ l,室温反应1小时。

[0050] 2) 纯化标记后的抗体:用Bio-Spin 30Tris Columns(缓冲液换成PBS)进行纯化,过柱纯化后小于30bp的oligo都会被滞留在柱子中,从而将未标记上的oligo去除。

[0051] 3) 用50K的Milipore filter再次纯化标记物。

[0052] 4) 最后所得产物即为标记上邻近探针(oligo1、oligo2)的抗体。

[0053] **【实施例3】**血管内皮生长因子(VEGF)的检测

[0054] 1) 将oligo1(序列ACCCGATGGATAGGTCGGTGAA-ACGCAT)和oligo2(序列TAATACGACTCACTATAGGGAGA-ATGCGT)标记VEGF多克隆抗体(购至Thermo Fisher, Lot Number:P802),其中oligo2带有T7启动子序列,oligo1和oligo2可以通过各自3'端的6个碱基互补配对链接。

[0055] 2) VEGF的检测

[0056] (1) 抗体oligo1和抗体oligo2双链的形成

[0057] 将VEGF(购至Thermo Fisher, Lot Number:PHC9391)进行2倍浓度梯度稀释,按照下列体系进行第一次序列延伸,得到oligo1和oligo2的双链体:

	2 \times Klenow 酶 buffer (含 Klenow 酶, dNTPs 等)	10 μ l
	VEGF 稀释液	2 μ l
[0058]	抗体 oligo1	2 μ l
	抗体 oligo2	2 μ l
	ddH ₂ O	4 μ l

[0059] 37 $^{\circ}$ C 孵育40min。

[0060] (2) RNA转录

[0061] 按照下列体系转录(转录体系购至Thermo Fisher):

	(1) 中所得的产物	10 μ l
	5X 转录 buffer (及各盐离子)	10 μ l
[0062]	NTPs (每种含量为 20mM)	5 μ l
	T7 聚合酶	1 μ l
	ddH ₂ O	24 μ l

[0063] 37 $^{\circ}$ C 1 小时。

[0064] (3) RNA 扩增

[0065] 将 (2) 中转录的小 RNA 进行扩增, 实现第二、第三次的序列延伸, 相关引物及探针设计如表 1。

[0066] 表 1 第二、第三次的序列延伸, 相关引物及探针设计

序列名称	序列 (5'-3')
[0067] Oligo3	TAATACGACTCACTATAGGGAGA-CCTCTAGCAGTTGGGCAACGTA -ACCCGATGGATAGG
稳定序列 1	TACGTTGCCCAACTGCTAGAGG-TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
[0068] Oligo4	TTCACCGACCTATCCATCGGGT-ATGCGTTTCACCGA
稳定序列 2	ACCCGATGGATAGGTCGGTGAA
检测探针 1	CCTCTAGCAGTTGGGCAttttGCTCGACTTGCCACCGAATA
检测探针 2	ACGTAACCCGATGGATAGGttttGCTCGACTTGCCACCGAATA
捕获探针	ATGGATAGGTCGGTGAAttttATGGATAGGTCGGTGAA
Biotin 标记探针	Biotin-TATTCGGTGGCAAGTTCGAGC

[0069] 按照下列体系扩增小 RNA:

[0070] (2) 中转录的小 RNA 产物: 2 μ l

[0071] 扩增 buffer (含 oligo3 及其稳定序列,

[0072] oligo4 及其稳定序列): 17 μ l

[0073] 扩增酶混合液 (AMV&T7 聚合酶&RNaseH) 1 μ l

[0074] 在 42 $^{\circ}$ C 反应 90min 后, 待检。

[0075] (4) 采用板杂交的方法对 (3) 中的产物进行检测分析

[0076] 用微孔板杂交法检测转录的小 RNA 产物, 根据 RNA 的 ZC 序列信息, 在检测体系中设计捕获探针、检测探针 (检测探针 1 和检测探针 2), 形成检测探针-RNA 产物-捕获探针复合物, 该复合物会被微孔中被的一段探针捕获并固定在微孔中。向微孔中再依次加入一段可以和检测探针结合的并标有 biotin 的探针、链霉亲和素-HRP 酶, 化学发光底物, 最终发光检测。具体的,

[0077] a、扩增产物固定杂交

	RNA 扩增产物	10 μ l
	捕获探针 (5 μ M):	1 μ l
[0078]	检测探针 1 (5 μ M):	1 μ l
	检测探针 2 (5 μ M):	1 μ l
	Biotin 标记探针 (5 μ M):	1 μ l
	杂交液 (柠檬酸盐)	100 μ l

[0079] 42 $^{\circ}$ C 孵育60min。

[0080] b、弃去孔内液体并在干净的吸水纸上拍干。每孔加入200 μ L预热的杂交洗涤液,共洗涤3次。

[0081] c、每孔加入200 μ L封闭液,室温振荡1分钟。

[0082] d、弃去孔内液体,每孔加入100 μ L链霉亲和素-HRP酶联物,室温震荡30分钟。

[0083] e、弃去孔内液体并在干净的吸水纸上拍干。每孔加入200 μ L预热的杂交洗涤液,共洗涤3次。

[0084] f、配制底物溶液,底物A、底物B、底物稀释液(Tris缓冲液,pH8.5)按比例1:1:8混匀。

[0085] g、每孔加入95 μ L底物溶液,孵育5分钟后,置于化学发光检测仪上进行相对光单位(RLU)测定。

[0086] h、实验结果如下:

VEGF的含量	稀释比例	RLU值
125pg/ml	1:1600	3506542
62.5pg/ml	1:3200	1813211
31pg/ml	1:6400	1023212
15.5pg/ml	1:12800	609832
7.5pg/ml	1:25600	423216
3.5pg/ml	1:51200	205432
1.5pg/ml	1:102400	108844
0.75pg/ml	1:204800	66543
0.36pg/ml	1:409600	44332
Blank	/	10355

[0088] 检出值与Blank比值大于5即为检测阳性,从检测结果看,该检测方法在检测VEGF时,检测灵敏度能够达到0.75pg/ml的级别。

[0001]		序列表	
[0002]	<110>	斯格特生物(Signosis Inc)	
[0003]	<120>	一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法	
[0004]	<160>	10	
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0006]	<210>	1	
[0007]	<211>	28	
[0008]	<212>	DNA	
[0009]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<400>	1	
[0011]		accgatgga taggtcggg aaacgcat	28
[0012]	<210>	2	
[0013]	<211>	29	
[0014]	<212>	DNA	
[0015]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0016]	<400>	2	
[0017]		taatacgact cactataggg agaatgcgt	29
[0018]	<210>	3	
[0019]	<211>	59	
[0020]	<212>	DNA	
[0021]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0022]	<400>	3	
[0023]		taatacgact cactataggg agacctctag cagttgggca acgtaaccgg atggatagg	59
[0024]	<210>	4	
[0025]	<211>	45	
[0026]	<212>	DNA	
[0027]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0028]	<400>	4	
[0029]		tacgttgccc aactgctaga ggtctcccta tagtgagtcg tatta	45
[0030]	<210>	5	
[0031]	<211>	36	
[0032]	<212>	DNA	
[0033]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0034]	<400>	5	
[0035]		ttcaccgacc tatccatcgg gtatgcggtt caccga	36
[0036]	<210>	6	
[0037]	<211>	22	
[0038]	<212>	DNA	

[0039]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0040]	<400>	6	
[0041]		acccgatgga taggtcggg aa	22
[0042]	<210>	7	
[0043]	<211>	41	
[0044]	<212>	DNA	
[0045]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0046]	<400>	7	
[0047]		cctctagcag ttgggcattt tgctcgactt gccaccgaat a	41
[0048]	<210>	8	
[0049]	<211>	43	
[0050]	<212>	DNA	
[0051]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0052]	<400>	8	
[0053]		acgtaaccgg atggataggt tttgctcgac ttgccaccga ata	43
[0054]	<210>	9	
[0055]	<211>	38	
[0056]	<212>	DNA	
[0057]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0058]	<400>	9	
[0059]		atggataggt cgggtaattt tatggatagg tcggtgaa	38
[0060]	<210>	10	
[0061]	<211>	20	
[0062]	<212>	DNA	
[0063]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0064]	<400>	10	
[0065]		tattcggg caagtcgagc	20

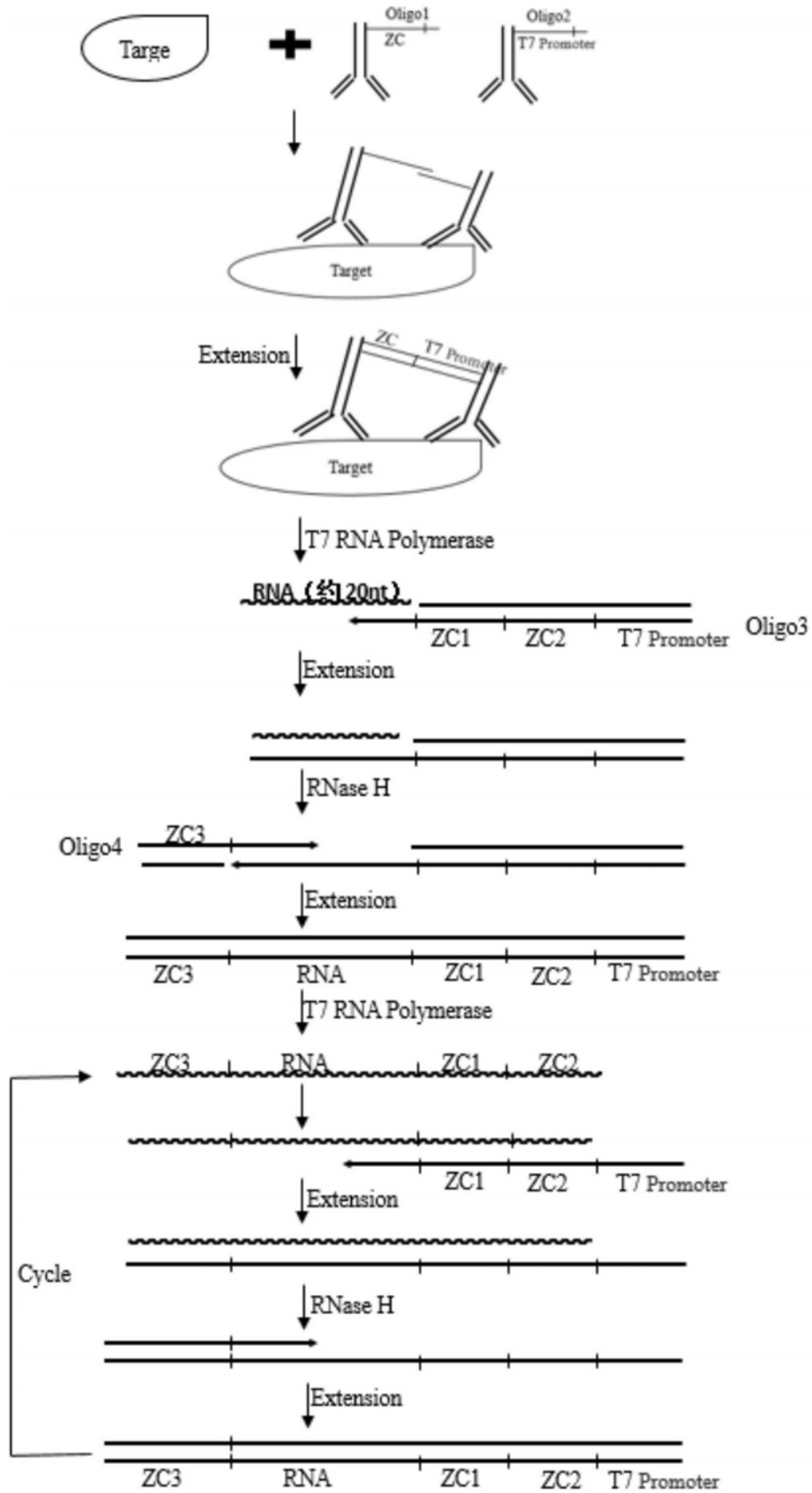


图1

专利名称(译)	一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法		
公开(公告)号	CN108414735B	公开(公告)日	2020-05-12
申请号	CN201810128971.2	申请日	2018-02-08
[标]发明人	李先强 姜昕		
发明人	李先强 姜昕		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	彭劲松		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN108414735A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于三次延伸-RNA扩增介导的生物大分子免疫分析方法，属于免疫学领域。该方法将生物大分子与识别生物大分子的物质偶联的oligo1和oligo2接触，oligo1一端为标签序列，另一端序列（长约6nt）可以和oligo2末端互补配对；oligo2，一端为T7启动子序列，另一端序列（长约6nt）可以和oligo1末端互补配对；在Klenow酶的作用下进行延伸，形成dsDNA，在T7聚合酶的作用下转录出小RNA分子；利用小RNA搭桥对两个互不重叠的扩增引物进行双向延伸检测小RNA，由此判断待检生物大分子的存在与否。该法灵敏度高、对仪器的要求低，可用于生物医学指标的超敏检测。

