



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104962560 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201510335088. 7

(22) 申请日 2015. 06. 16

(71) 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区麓山南路
2 号

(72) 发明人 谭蔚泓 秦志强 叶茂 龙禹乾

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
43114

代理人 袁靖

(51) Int. Cl.

C12N 15/115(2010. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测试剂中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测试剂中的应用。与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明通过筛选得到的核酸适配体具有比蛋白抗体更高的亲和力与特异性;无免疫原性;能够体外化学合成,分子量小,可以对不同部位进行修饰和取代,且序列稳定,易于保存;便于标记等优势。采用本发明的核酸适配体进行血吸虫卵检测时,操作更为简单、迅速,并且本发明核酸适配体的合成成本较抗体制备成本低,且周期短,重现性好。

1. 一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体,其特征在于,为以下序列中的任一条:

序列 1:核酸适配体 LC6:

5' -ACGCTCGGATGCCACTACAGTGATAGAAATGGTAGTTGAGTAGTTTGTGTATATGTGGGGCCTCATGGACG
TGCTGGTGAC-3'

序列 2:核酸适配体 LC15:

5' -ACGCTCGGATGCCACTACAGTGAGATATAAAGGGCAGAAATAAGTAGGGGCTCATGGACGTGCTGGTG
AC-3'。

2. 根据权利要求 1 所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体,其特征在于,在保持 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变的情况下将核酸适配体进行修饰和改造。

3. 根据权利要求 2 所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体,其特征在于,核酸适配体包括以下三种中的任一种:

a) 核酸适配体 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端的核苷酸进行删减;

b) 核酸适配体 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端核苷酸的碱基进行人工碱基替换;

c) 核酸适配体 LC6, LC15 连接上荧光物质、放射性物质、治疗性物质、生物素、或者酶标记。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体的应用方法,其特征在于,将所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体用于制备检测日本血吸虫卵的制剂。

一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测制剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核酸适配体及其应用,特别是涉及一种可用于日本血吸虫卵及临床样本组织检测的核酸适配体及其制备检测试剂的应用方法。

背景技术

[0002] 血吸虫病一直是一种严重危害人类身体健康和阻碍社会经济发展的重大传染病。日本血吸虫成虫雌雄合抱寄居在宿主肠系膜静脉,每条雌虫每日产卵约 300 ~ 3000 个,所产的虫卵沉积于肠壁小血管中,部分随血流进入肝。发育成熟(产出后 11 天左右)的血吸虫卵毛蚴分泌物能透过卵壳,破坏血管壁,并造成周围组织炎症坏死,因肠的蠕动、腹内压增加,致使坏死组织向肠腔溃破,少量虫卵随溃破组织落入肠腔,随粪便排出体外。

[0003] 血吸虫卵在血吸虫病发生发展、疾病传播流行等环节意义重大,主要表现在:一是血吸虫卵卵壳和其分泌产物均能激发宿主产生强烈的免疫反应而形成虫卵肉芽肿反应以及随后产生慢性肝(肠)纤维化等临床症状,血吸虫卵被公认为主要致病因子。二是血吸虫卵从粪便中排出到外界后,在有钉螺的孳生环境中,血吸虫卵内的毛蚴孵化出来,钻入媒介生物-钉螺体内,在钉螺体内完成其无性生殖生活史阶段,发育成尾蚴,尾蚴在水中感染人及其它哺乳动物后又能在人体(或其它哺乳动物)内发育成虫并产出虫卵,血吸虫卵在维系血吸虫病传播流行环节中作用关键。目前诊断日本血吸虫感染的主要途径包括基于血吸虫卵抗体(或抗原)的血清学检测和从粪便中检测血吸虫卵的病原学方法。

[0004] 因为从粪便中获得血吸虫卵被公认为血吸虫病诊断的金标准(Gold Standard),目前检测血吸虫卵的病原学方法有 Kato-katz 镜检法(WHO 推荐方法)和集虫卵孵化法。两者缺点有耗时长(前者隔夜,后者需 4 小时以上),漏检率高。现阶段血吸虫病防控需要高敏感、特异、耗时短、简洁的诊断方法。

[0005] 核酸适配体(nucleic acid aptamer)是从人工合成的随机单链核酸库中筛选出来的能高亲和性结合靶分子的 20-50 碱基的寡聚核苷酸,包括 DNA 适体和 RNA 适体。适配体因其结构的多样性而具有靶分子广、亲和力高、特异性强等特点,同时,相比传统抗体,适配体分子量小、易改造修饰、制备方便且无免疫原性。因此,适配体在基础研究、临床诊断、药物研制等方面展现了广阔的应用前景。近年来为研究者们广泛使用的基于完整细胞的 SELEX 核酸适配体筛选技术(CELL-SELEX)可以不需要提前获得细胞表面靶分子的相关信息并在保持细胞膜表面蛋白天然生理状态直接筛选获得和待测细胞结合的核酸适配体,并能利用这些适配体对其所结合的细胞表面的靶分子进行表征和检测,有助于发现新的生物标志物。核酸适配体已经被广泛应用于识别各种靶标分子,发现新的生物标志物。核酸适配体靶标范围广泛,对寄生虫也有良好的亲合力,核酸适配体能特异识别宿主血液中锥虫、利什曼原虫,疟原虫等寄生虫病原体,对于开辟新的寄生虫检测方法和治疗策略提供了新的途径。

[0006] 通过 Cell-SELEX 技术,我们已成功筛选出能高特异性与血吸虫卵特异性结合的

适配体,因核酸适配体具有以下优点:体外筛选且周期短、容易合成和进行化学修饰、不同批次之间差异小、稳定性好、可常温运输、免疫原性小和快速的组织穿透能力。因此,血吸虫卵特异性结合的核酸适配体筛选将为下一步建立新型血吸虫病诊断方法提供依据;并为将来发展血吸虫病靶向治疗及药物疗效评价手段提供新的思路。

发明内容

[0007] 本发明的目的提供一种高度特异性、稳定性、可用于血吸虫卵的检测及其体内样本检测的核酸适配体及其制备检测试剂的应用方法。

[0008] 一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体,为以下序列中的任一条:

[0009] 序列 1:核酸适配体 LC6:

[0010] 5'-ACGCTCGGATGCCACTACAGTGATAGAATGGTAGTTGAGTAGTTTGTGTATATGTGGGCCTCATGGACGTGCTGGTGAC-3'

[0011] 序列 2:核酸适配体 LC15:

[0012] 5'-ACGCTCGGATGCCACTACAGTGAGATATAAAGGGCAGAAATAAGTAGGGCTCATGGACGTGCTGGTGAC-3'。

[0013] 所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体,还可以在保持 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变的情况下将核酸适配体进行修饰和改造。

[0014] 具体包括以下三种中的任一种:

[0015] a) 核酸适配体 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端的核苷酸进行删减;

[0016] b) 核酸适配体 LC6, LC15 下划线部分的保守核苷酸序列不变,不变序列两端核苷酸的碱基进行人工碱基替换;

[0017] c) 核酸适配体 LC6, LC15 连接上荧光物质、放射性物质、治疗性物质、生物素、或者酶标记。

[0018] 所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体的应用方法,将所述的检测日本血吸虫卵的核酸适配体用于制备检测日本血吸虫卵的制剂。

[0019] 另一方面,本发明筛选核酸适配体 LC6, LC15 的方法,包括如下步骤:用血吸虫卵对核酸文库进行筛选,得到与血吸虫卵特异结合的核酸适配体;所述核酸文库为单链的随机核苷酸序列的文库;

[0020] (1) 合成以下序列所示的随机单链 DNA 文库和引物:

[0021] 随机核酸文库:

[0022] 5'-ACGCTCGGATGCCACTACAG(45N)CTCATGGACGTGCTGGTGAC-3'

[0023] 上游引物:5'-异硫氰酸荧光素-ACG CTC GGA TGC CAC TAC AG--3';

[0024] 下游引物:5'-生物素-GTC ACCAGC ACG TCC ATG AG-3';

[0025] (2) 正筛选:将上述随机核酸文库与血吸虫卵孵育;孵育完成后,收集血吸虫卵;95℃加热变性分离与血吸虫卵结合的适配体,即为第一次筛选的核酸文库;

[0026] (3) PCR 扩增第一次筛选的核酸文库:将步骤(2)中筛选得到的文库进行常规 PCR 扩增,得到扩增产物;

[0027] (4) 制备 DNA 单链文库:用链霉亲和素葡聚糖微球分离生物素标记步骤(3)中的

PCR 扩增产物 ;然后利用 2M 氢氧化钠使双链 DNA 变性解链,收集异硫氰酸荧光素标记的 DNA 单链文库 ;

[0028] (5) 反筛 :将步骤 (4) 所得到的 DNA 文库与肝吸虫卵孵育,孵育完成后收集肝吸虫卵孵育后的上清,即排除掉与肝吸虫卵结合的核酸序列 ;

[0029] (6) 正筛 :将步骤 (5) 中所制上清液与血吸虫卵孵育,洗脱结合在血吸虫卵表面的高亲和力适配体库,即为第二次筛选的核酸文库 ;

[0030] (7) 核酸适配体循环筛选 :以步骤 (6) 所得的核酸文库取代步骤 (3) 所得到的扩增产物,并重复步骤 (4) ~ (6) 的筛选过程,直到筛选得到与血吸虫卵结合能力强的核酸文库 ;

[0031] (8) 将筛选获得的最终核酸文库进行高通量测序,确定核酸适配体。

[0032] 与现有技术相比,本发明的优点在于 :本发明通过筛选得到的核酸适配体具有比蛋白抗体更高的亲和力与特异性 ;无免疫原性 ;能够体外化学合成,分子量小,可以对不同部位进行修饰和取代,且序列稳定,易于保存 ;便于标记等优势。采用本发明的核酸适配体进行血吸虫卵检测时,操作更为简单、迅速,并且本发明核酸适配体的合成成本较抗体制备成本低,且周期短,重现性好。

附图说明

[0033] 图 1 为 Real-time PCR 熔解曲线的变化过程 :峰形代表原始文库、第 1 轮筛选产物、第 7 轮筛选产物、第 9 轮筛选产物通过扩增后的熔解曲线 ;

[0034] 图 2 为标记异硫氰酸荧光素的核酸适配体 (LC15, LC6) 与血吸虫卵及反筛肝吸虫卵结合能力激光共聚焦显微镜分析 ;

[0035] 在图 2 中,前三幅图分别为阴性对照核酸适配体 (起始文库)、LC6、LC15 与血吸虫卵结合情况的展示,后两幅图分别是 LC6、LC15 与肝吸虫卵的结合情况的展示 ;在激光共聚焦图片中能够明显看出 LC6 和 LC15 这两条 Aptamer 能够很好的富集在血吸虫卵表面,可见绿色荧光,图片结果表明,LC6 与 LC15 的荧光强度明显高于文库组的荧光强度,而且都不与肝吸虫卵结合,没有荧光 (后两幅图),说明具有很好的特异性 ;

[0036] 图 3 为吖啶菁类染料 (Cy5) 标记的 Aptamer 对日本血吸虫感染兔子肝组织切片中血吸虫卵结合的激光共聚焦显微镜分析 ;a, c: 阴性对照核酸适配体 (起始文库) b:LC6, d:LC15 ;

[0037] 图 4 为 LC6,LC15 对蛔虫虫卵结合的激光共聚焦显微镜分析,该图没有任何荧光显现。

具体实施方式

[0038] 以下的实施例便于更好的理解本发明,但并不限于本发明。以下实施例中的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下属实施例中所用的实验材料如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买所得到的。

[0039] 虫卵来源 :

[0040] 本实验筛选所用两种虫卵 (血吸虫卵和肝吸虫卵) 均由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所国家寄生虫病参比实验室提供。

[0041] 本发明利用核酸适配体的体外筛选技术 SELEX 技术,以血吸虫卵为正筛靶标,以肝吸虫卵为反筛靶标,从体外合成的随机寡聚 ssDNA 文库中筛选出与所述血吸虫卵特异结合的核酸适配体。

[0042] 实施例 1:血吸虫卵特异性核酸适配体的筛选

[0043] (1) 所用核酸文库和引物的设计

[0044] 随机核酸文库:

[0045] 5'-ACGCTCGGATGCCACTACAG (45N) CTCATGGACGTGCTGGTGAC-3'

[0046] 上游引物:5'-异硫氰酸荧光素-ACG CTC GGA TGC CAC TAC AG-3';

[0047] 下游引物:5'-生物素-GTC ACCAGC ACG TCC ATG AG-3';

[0048] (2) 正筛选

[0049] 2.1 孵育:用结合缓冲液(D-PBS,5mM 氯化镁)溶解上述的随机核酸文库,95℃恒温变性 5min,迅速放入冰中 10min;然后与已经预处理好的血吸虫卵在 4℃摇床孵育 1.5h。

[0050] 2.2 解离:孵育完成后离心,并移除离心管中溶液,用洗涤缓冲液(PBS,含 0.45% 的葡萄糖,5mM 氯化镁)离心洗涤孵育后离心管中的血吸虫卵;95℃加热变性 10min,5500rpm/s 离心后取上清,分离结合血吸虫卵的核酸序列,即为血吸虫卵的第一轮筛选的核酸文库。

[0051] (3) 进行 PCR 扩增文库:取步骤 2 中筛选所得的核酸文库进行常规 PCR 扩增,上游引物:5'-异硫氰酸荧光素-ACG CTC GGA TGC CAC TAC AG-3';下游引物:5'-生物素-GTC ACCAGC ACG TCC ATG AG-3';扩增条件为:95℃,3min;95℃,30s;59.4℃,30s;72℃,30s,经合适循环轮数,72℃,5min。第一轮筛选后将全部所得的血吸虫卵的第一轮筛选的核酸文库进行预扩增 10 个循环,然后以扩增产物为模板再进行大量扩增。

[0052] (4) 制备 DNA 单链文库:用链霉亲和素葡聚糖微球分离生物素标记步骤(3)中的 PCR 扩增产物;然后利用 0.2M 氢氧化钠使双链 DNA 变性解链,收集异硫氰酸荧光素标记的 DNA 单链文库;

[0053] (5) 反筛:将步骤(4)所得到的 DNA 单链文库与反筛虫卵肝吸虫卵孵育,然后收集虫卵孵育后的上清,即排除掉与血吸虫卵非特异性结合的核酸序列;

[0054] (6) 正筛:将步骤(5)中所制上清液与血吸虫卵孵育,洗脱保留结合血吸虫卵的核酸序列,即为第二次筛选的核酸文库;

[0055] (7) 核酸适配体循环筛选:以步骤(6)所得的核酸文库取代步骤(2)所得到的扩增产物,并重复步骤(4)~(6)的筛选过程,直到筛选得到与靶虫卵血吸虫卵结合能力强的核酸文库;

[0056] (8) 将筛选获得的最终核酸文库进行高通量测序。

[0057] 实施例 2:血吸虫卵特异性核酸适配体的筛选

[0058] 利用 Real-time PCR 检测筛选进程,分别取原始文库、第 1 轮筛选产物、第 3 轮筛选产物、第 7 轮筛选产物、第 9 轮筛选产物、第 13 轮筛选产物进行 PCR,通过熔解曲线的变化来判断筛选产物的特异性。

[0059] 该实施例的目的是为下一步的高通量测序(即实施例 1 的步骤(8))作为选择依据。通过实施例 2 的实验找出了能够进行高通量测序的文库是第 9 轮的文库。

[0060] 实施例 3:利用激光共聚焦显微镜观察 Aptamer 与正筛虫卵和反筛虫卵的结合情

况

[0061] 分别取大约 8000 个左右的血吸虫卵和肝吸虫卵,将带有异硫氰酸荧光素标记的核酸适配体 (LC15,LC6) 与血吸虫卵及反筛肝吸虫卵孵育 45min。孵育完毕之后,离心洗涤两次,每次 2000r/s 3min,去除上清液,并加入 500 μ L 洗涤液方便取样观察。取少量的样品置于激光共聚焦显微镜下进行拍照观察,结果见图 2。

[0062] 实施例 4 :5' - 吡啶菁类染料 (Cy5) 标记的核酸适配体在血吸虫感染后的兔子肝组织切片中的应用测试

[0063] (1) 将血吸虫感染兔肝脏样本组织切片于 60 $^{\circ}$ C 烤箱中烘烤 1h 后,立刻置于第一缸二甲苯中 15min,而后置入第二缸二甲苯中 15min 进行脱蜡;再将已脱蜡的组织切片依次放置于无水乙醇中 10min,95%乙醇 5min,70%乙醇 5min,50%乙醇 5min;蒸馏水润组织切片后对将其置于 TE buffer (pH 8.0),将切片放入盛有修复液的容器中。蒸馏水冲洗后,再用 PBS (0.01M, pH7.4) 浸泡 3 次,每次 5min (保证第一次浸泡的是新配的 PBS)。

[0064] 将已抗原修复的组织切片与含 20% FBS 和 1mg/ml 鲑鱼精 DNA 的结合缓冲溶液室温孵育 60min;洗涤后与 300pmol/L 的 Cy5 标记的核酸适配体 LC15,LC6 或起始文库于室温孵育 60min。用洗涤缓冲液洗涤两次后,将组织切片晾干,并用 20% 甘油封片,观察。结果见图 3。该图是 LC15、LC6 或起始文库与血吸虫感染的兔子肝脏组织切片的一个结合实验;图中发出红色荧光,且呈椭圆形的中空圈就是寄生在兔子肝脏中的血吸虫卵;在激光共聚焦图片中能够清晰的看到荧光集中在虫卵寄生的位置,结果说明 LC15、LC6 具有较好识别组织中虫卵的能力。

[0001]

<110> 湖南大学

<120> 一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测制剂中的应用

<130> 无

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> 核酸适配体 LC6

<400> 1

acgctcggat gccactacag tgatagaatg gtagttgagt agtttgtgta tatgtggggc 60

ctcatggacg tgctggtgac 80

<210> 2

<211> 70

<212> DNA

<213> 核酸适配体 LC15

<400> 2

acgctcggat gccactacag tgagatataa agggcagaaa taagtagggg ctcatggacg 60

tgctggtgac 70

<210> 3

<211> 86

<212> DNA

<213> 随机核酸文库

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(66)

<223> n is a, c, g, or t

[0002]

<400> 3	
acgctcggat gccactacag (45n)ctcatggac gtgctggtga c	41
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 上游引物	
<400> 4	
acgctcggat gccactacag	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 下游引物	
<400> 5	
gtcaccagca cgtccatgag	20

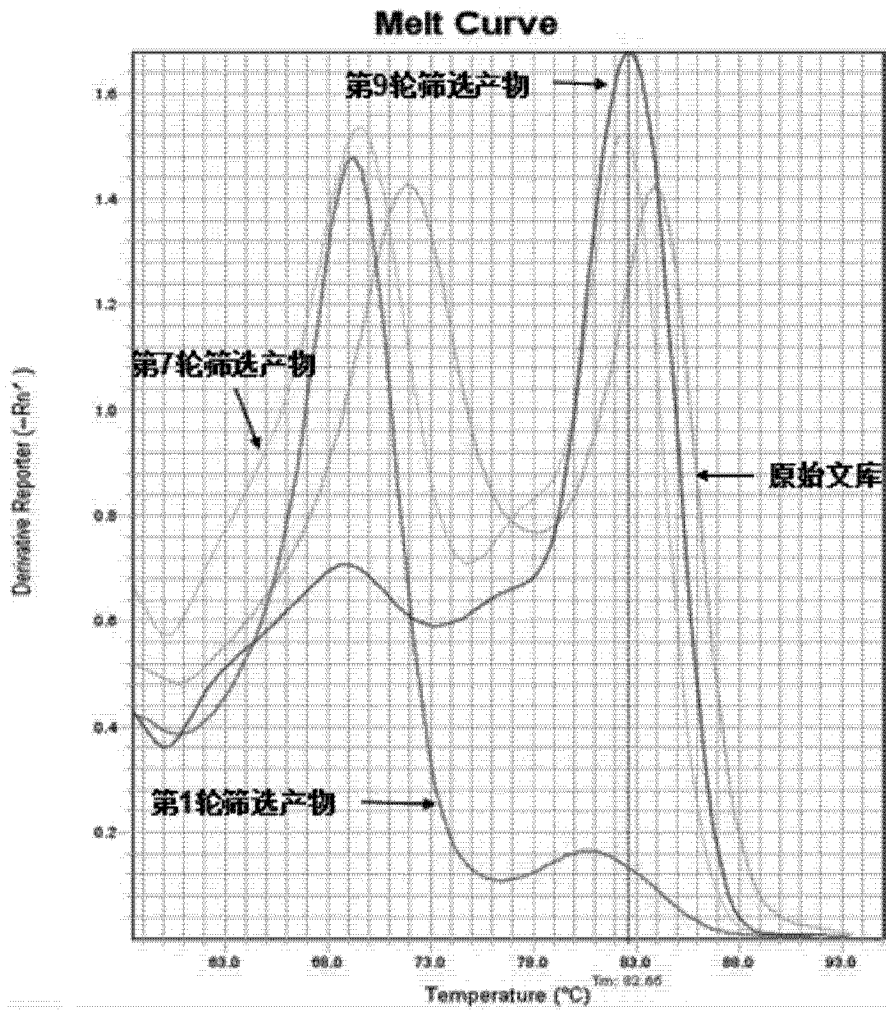
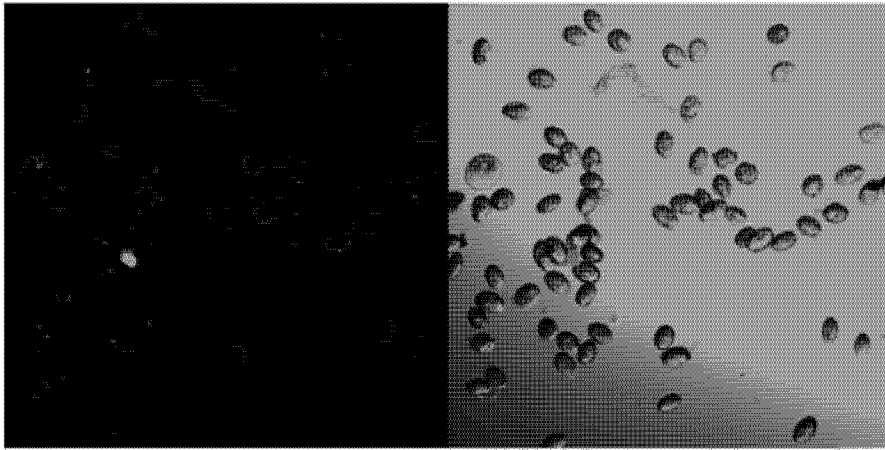
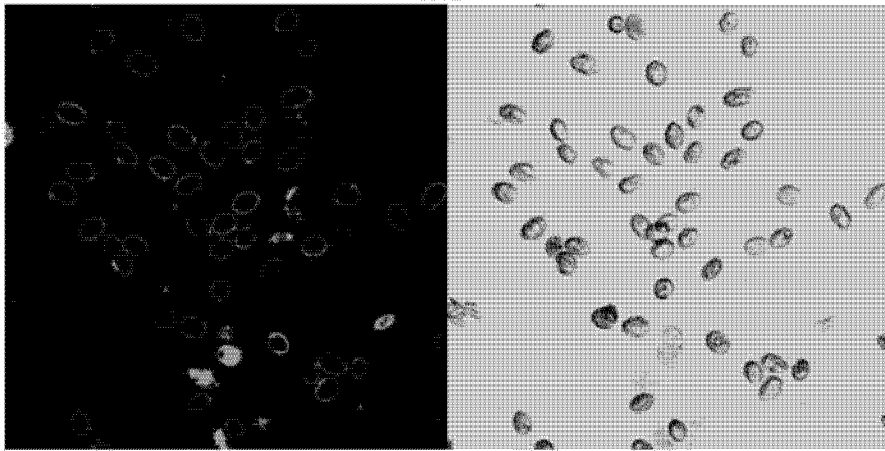


图 1

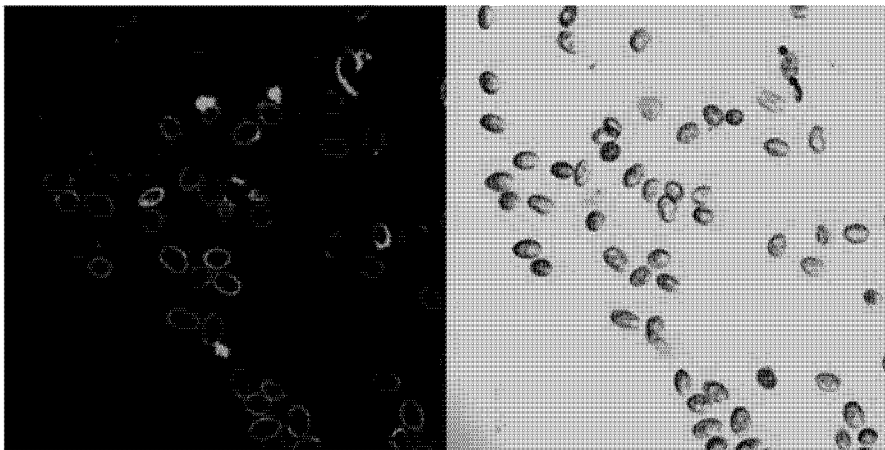
文库



LC6



LC15



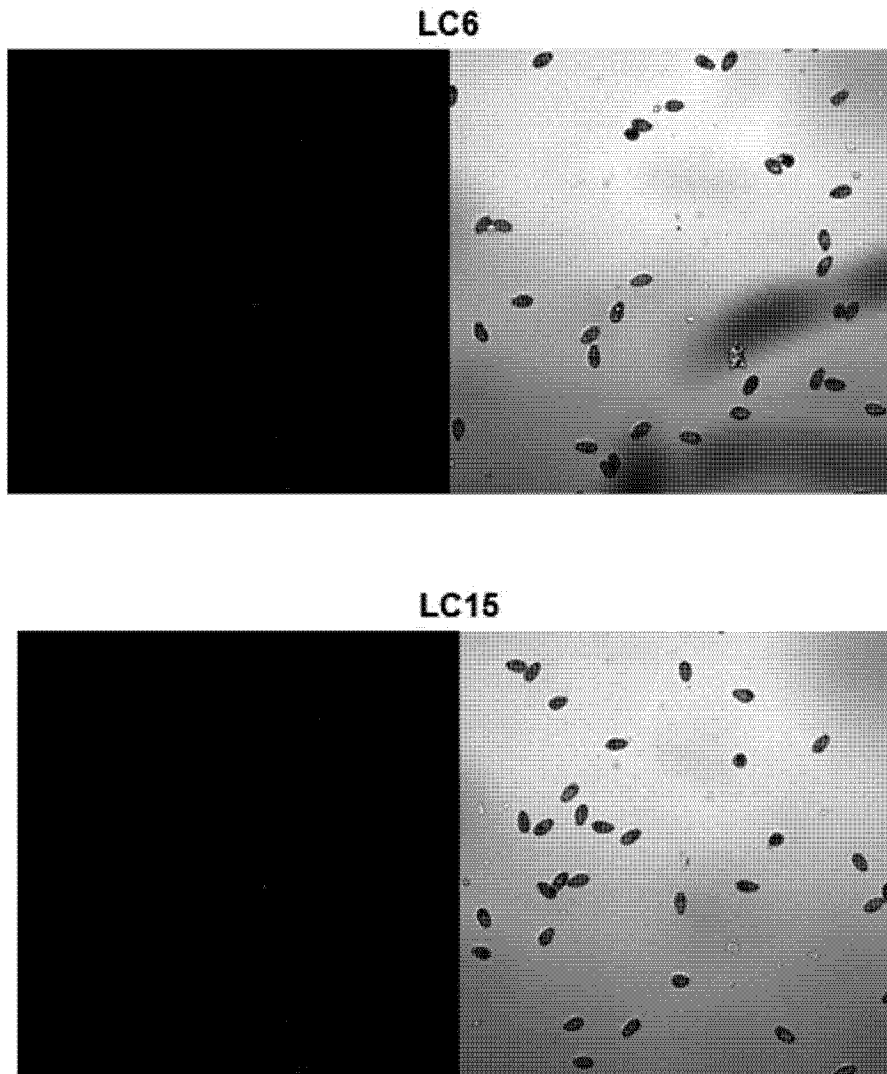


图 2

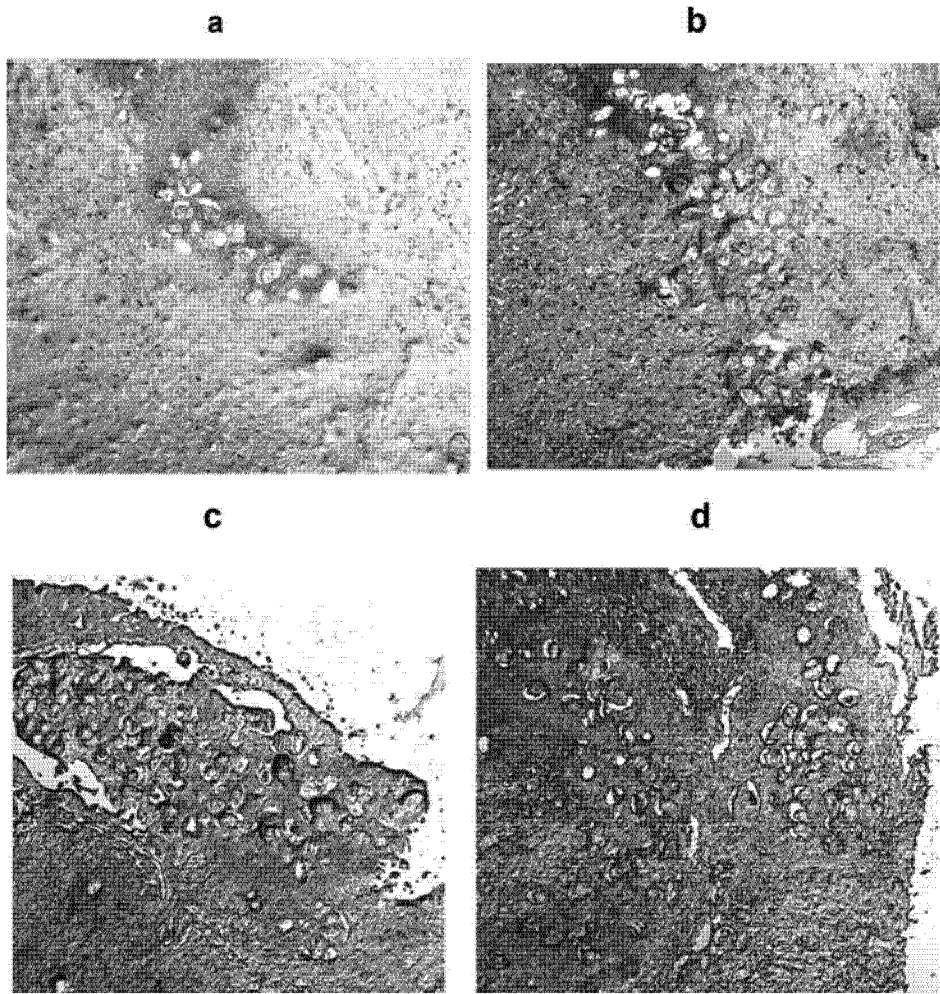
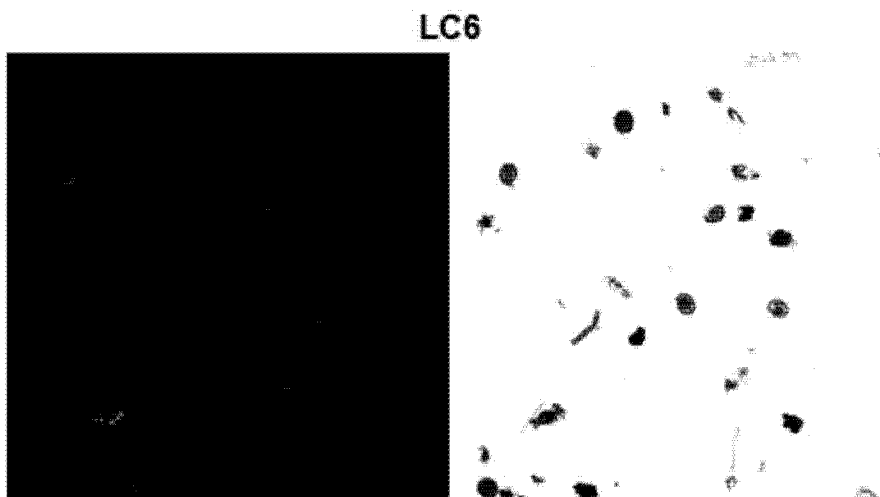


图 3



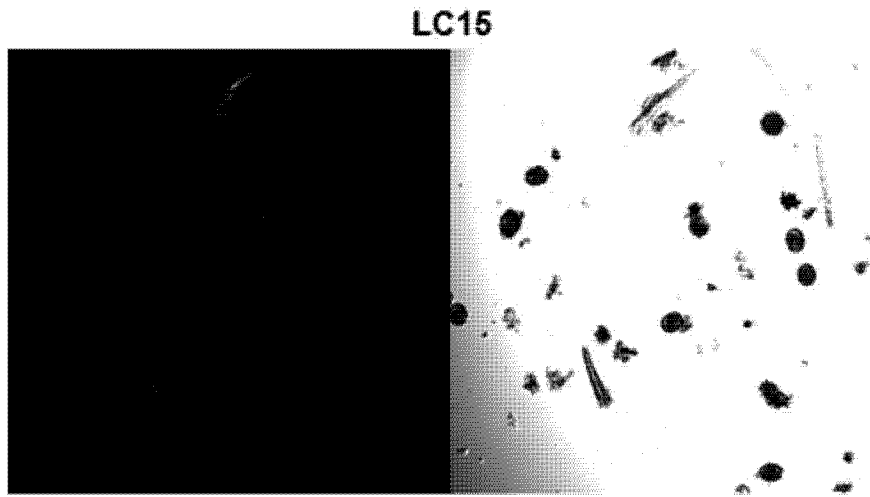


图 4

专利名称(译)	一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测制剂中的应用		
公开(公告)号	CN104962560A	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201510335088.7	申请日	2015-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	谭蔚泓 秦志强 叶茂 龙禹乾		
发明人	谭蔚泓 秦志强 叶茂 龙禹乾		
IPC分类号	C12N15/115 G01N33/53		
代理人(译)	袁靖		
其他公开文献	CN104962560B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测日本血吸虫卵的核酸适配体及其在制备检测制剂中的应用。与现有技术相比，本发明的优点在于：本发明通过筛选得到的核酸适配体具有比蛋白抗体更高的亲和力与特异性；无免疫原性；能够体外化学合成，分子量小，可以对不同部位进行修饰和取代，且序列稳定，易于保存；便于标记等优势。采用本发明的核酸适配体进行血吸虫卵检测时，操作更为简单、迅速，并且本发明核酸适配体的合成成本较抗体制备成本低，且周期短，重现性好。

