



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102323400 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110152346. X

(22) 申请日 2011. 06. 08

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一
附属医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30 号

(72) 发明人 邓昆 府伟灵

(74) 专利代理机构 重庆市前沿专利事务所
50211

代理人 郭云

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

C12N 15/10 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法属生物学检验领域, 涉及一种利用适配子技术检测蛇毒的方法。本发明针对蛇毒成分复杂, 目前蛇伤检测方法特异性与敏感性差等问题, 采用消减适配子筛选技术 (depletionSELEX), 筛选获得具有高度蛇毒种属特异性的适配子, 并将适配子转为报告适配子建立蛇毒快速检测新方法。

1. 一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法,其特征在于按如下步骤进行:

(1) 先构建随机单链 DNA 文库和引物,单链 DNA 文库通过 PCR 扩增为双链 DNA、再通过非对称 PCR 扩增并纯化得到单链 DNA 文库;

(2) 筛选出纯化的单链 DNA 文库与靶标粗蛇毒相结合的单链 DNA;再次常规 PCR 和非对称 PCR 扩增 DNA、纯化得到与靶标粗蛇毒相结合的单链 DNA;

(3) 将步骤(2)得到的单链 DNA 再与需要鉴别的 4~8 种蛇毒反筛得到不相结合的单链 DNA;

(4) 按照步骤(2)和步骤(3)交叉循环筛选,得到可与蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒结合的单链 DNA 适配子,PCR 扩增为双链 DNA、非对称 PCR 扩增并纯化得到单链 DNA 适配子库;

(5) 对筛选终池单链 DNA 适配子库进行亲和性检测筛选出靶标适配子;

(6) 获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子;

(7) 采用酶联免疫法从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质,从而判断蛇伤种类,进行相应的抗蛇毒血清救治。

2. 根据权利要求 1 所述一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法,其特征在于:所述步骤(4)中按照步骤(2)和步骤(3)交叉循环筛选 12 轮以上。

3. 根据权利要求 1 所述一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法,其特征在于:步骤(1)、(2)和(4)采用非对称 PCR 法或生物素链亲和素磁珠法制备单链 DNA 文库。

4. 根据权利要求 1 所述一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法,其特征在于:步骤(2)、(3)和(4)筛选过程中以硝酸纤维素膜、亲和树脂或微孔板为分离介质。

一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法

技术领域

[0001] 本发明属生物学检验领域,涉及国内常见毒蛇的蛇伤鉴别检测方法,特别涉及一种利用消减适配子技术进行蛇毒种属特异适配子的筛选技术。

背景技术

[0002] 毒蛇伤害是一个全球性的公共卫生问题,可导致呼吸麻痹、致命性出血性败血症、不可逆性肾功能衰竭和导致永久性残疾的局部组织严重坏死。据统计我国有已知毒蛇 4 科 28 属 63 余种,常见毒蛇包括中华眼镜蛇、眼镜王蛇、金环蛇、银环蛇、尖吻蝮蛇、圆斑蝮蛇、蝮蛇、竹叶青、海蛇等。抗蛇毒血清是目前国内常用的治疗毒蛇咬伤的特效药物,目前我国常见的抗蛇毒血清包括抗蝮蛇毒血清、抗五步蛇毒血清、抗银环蛇毒血清、抗眼镜蛇毒血清等。但是在应用抗蛇毒血清治疗蛇伤之前必须根据肇事毒蛇种类选择正确种类的抗蛇毒血清,才能降低过敏反应的风险,提高毒素拮抗效率获得理想的疗效,否则将导致血清病等严重过敏反应的发生,错失救治的最佳时间。目前我国蛇伤临床诊断主要依靠病史和临床表现,缺乏快速、特异的实验室鉴别蛇毒种类的方法,往往造成治疗的盲目性。究其原因,是因为蛇毒成分复杂,且亲缘关系较近的蛇毒素存在许多同源蛋白,具有大量相同的抗原位点,致使寻找种属特异性单克隆抗体显得十分困难。而近年来发展起来的适配子筛选技术,能从容量高达 10^{14} 的单链寡核酸随机文库中经过数轮的筛选得到与靶标高特异高亲和性结合的适配子。

发明内容

[0003] 为解决以上技术问题,本发明的目的在于提供一种利用蛇毒种属特异性的适配子来检测鉴别蛇毒的方法。

[0004] 本发明目的是这样实现的:

一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法,其关键在于按如下步骤进行:

(1) 先构建随机单链 DNA 文库和引物,单链 DNA 文库通过 PCR 扩增为双链 DNA、再通过非对称 PCR 及纯化得到单链 DNA 文库;

(2) 筛选出纯化的单链 DNA 文库与靶标粗蛇毒相结合的单链 DNA;再次 PCR 扩增为双链 DNA、非对称 PCR 及纯化得到与靶标粗蛇毒相结合的单链 DNA;

(3) 将步骤(2)得到的单链 DNA 再与需要鉴别的 4~8 种蛇毒反筛得到不相结合的单链 DNA;

(4) 按照步骤(2)和步骤(3)交叉循环筛选,得到可与蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒结合的单链 DNA 适配子,PCR 扩增为双链 DNA、非对称 PCR 及纯化得到单链 DNA 适配子库;

(5) 对筛选终池单链 DNA 适配子库进行亲和性检测筛选出靶标适配子;

(6) 获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子

(7) 采用酶联免疫法从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质, 从而判断蛇伤种类, 进行相应的抗蛇毒血清救治。

[0005] 上述步骤(4)中按照步骤(2)和步骤(3)交叉循环筛选 12 轮以上。

[0006] 步骤(1)、(2)和(4)采用不对称 PCR 法或生物素链亲和素磁珠法制备单链 DNA 文库。

[0007] 步骤(2)、(3)和(4)筛选过程中以硝酸纤维素膜、亲和树脂或微孔板为分离介质。

[0008] 一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法, 具体按如下步骤进行:

一、适配子的筛选

1)、构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物: 构建序列长度为 78 个碱基的单链 DNA (ssDNA) 文库: 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-N35-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3', 其中 N 代表碱基 A, G, C, T 中的任意一个, 该文库的容量约为 10^{14} - 10^{15} , 构建上游引物: 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-3', 构建下游引物: 5'-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3'。随机单链 DNA 文库和引物由生物公司合成。

[0009] 2)、单链 DNA 文库合成双链 DNA 文库: 将单链 DNA 文库 0.1 μ g, 上游引物 100pmol、下游引物 10pmol、15mmol/l MgCl₂、0.2mmol/l dNTP、1 \times DNA 聚合酶反应缓冲液和 1 个活性单位的 DNA 聚合酶, 加入双蒸水, 使总体积为 20 μ l; 然后放入 PCR 仪中, 先进行 94 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟预变性, 然后按以下条件循环 18 次: 94 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 65 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 最后 72 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 得到双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物, 并用酚氯仿法纯化回收。

[0010] 3)、不对称 PCR 法制备单链 DNA 文库: 步骤 2) 中回收的 DNA 为模版 0.1 μ g, 上游引物 0.1pmol、下游引物 10pmol、7.5mmol/l MgCl₂、0.2mmol/l dNTP、1 \times DNA 聚合酶反应缓冲液和 1 个活性单位的 DNA 聚合酶, 加入双蒸水, 使总体积为 20 μ l; 然后放入 PCR 仪中, 先进行 94 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟预变性, 然后按以下条件循环 18 次: 94 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 65 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 反应 30 秒, 最后 72 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟, 得到单链 DNA 文库的 PCR 扩增产物并用酚氯仿法纯化回收, 得到纯化的单链 DNA 文库。

[0011] 4)、筛选循环:

① 将透析后的 10 μ g 靶标粗蛇毒用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上, 37 $^{\circ}$ C 作用 3 小时, 同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤 5) 中纯化的单链 DNA 文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔 37 $^{\circ}$ C 作用 40 分钟, 反筛去除与 BSA 结合的单链 DNA, 然后转移到蛇毒蛋白包被孔与蛇毒蛋白 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟, 用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次, 再加入 SELEX 洗脱液于 80 $^{\circ}$ C 作用 10 分钟, 洗脱下与蛇毒蛋白结合的 ssDNA, 经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀, 得到纯化的单链 DNA。按照步骤 2) 对纯化后的 ssDNA 进行常规 PCR 反应扩增, 而后按照步骤 3) 进行非对称 PCR 反应, 酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库, 该文库作为一下轮筛选的文库。

[0012] ② 将 PBS 透析后的 15 μ g 鉴别蛇毒混合物(需要与之鉴别的 4-8 种蛇毒混合物)用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上, 37 $^{\circ}$ C 作用 3 小时, 同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤①中纯化的单链 DNA 文库 1ng 转移到蛇毒蛋白包被孔与蛇毒蛋白 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟, 用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次, 收集洗涤下来的 ssDNA, 纯化得到的单链 DNA。在把得到的单链 DNA 按照步骤 2) 常规 PCR 反应扩增, 而后按照步骤 3) 进行非对称 PCR 反应, 酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库, 该文库作为一下轮筛选

的文库。

[0013] 5)、重复步骤4)12轮:单数轮筛选将靶标蛇毒作为筛选靶标,收集结合洗脱 ssDNA 用于下一循环;双数轮筛选使用需要与之鉴别的 4-8 种蛇毒混合体作为消减筛选靶标,收集未结合洗脱 ssDNA 用于下一循环。包被的蛇毒蛋白的浓度和用于结合的单链 DNA 浓度随着筛选轮数的增加而不断的降低,至第 12 轮时,包被蛋白的浓度达到每孔 0.05 μ g,相应的结合单链 DNA 的浓度为每孔 0.02ng,得到可与蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒结合的单链 DNA 适配子库。

[0014] 6)、将步骤5)最终获得的高亲和性单链 DNA 适配子库按照步骤2)扩增,获得双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物。用含浓度 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶,将双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物进行电泳,电泳后将琼脂糖凝胶置放在荧光检测板上,将呈橘红色条带的双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物切下,用 TaKaRa 公司提供的 DNA 纯化回收试剂盒纯化,得到纯化的双链 DNA。

[0015] 7)、将步骤6)获得的双链 DNA,用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试剂盒连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,氨苄抗性筛选,挑取单个生长菌落进行测序。

[0016] 8)将各单个生长菌落所对应的 DNA 适配子用生物素标记,量为 0.1 μ g,与每孔 10 μ g 包被的蛇毒蛋白在 SELEX 结合缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C,作用 30 分钟,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,洗去未与蛇毒蛋白上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素,然后加入四甲基联苯胺室温显色 20 分钟作用,加入 2M 浓硫酸终止显色反应,450nm 酶联仪测定 OD 值,选取 OD 值最高的 DNA 适配子,该适配子即为能与蛇毒蛋白结合的 DNA 适配子,将该适配子测序获得序列。

[0017] 二、检测方法的建立

将由上述过程获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子,就可采用酶联免疫法从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质,从而判断蛇伤种类,进行相应的抗蛇毒血清救治。

[0018] 有益效果:本发明针对成分复杂的蛇毒,采用消减适配子筛选技术(depletion SELEX),筛选获得具有高度蛇毒种属特异性的适配子,并将适配子转为报告适配子建立蛇毒快速检测新方法。蛇伤检测特异性强与敏感性好等,检测迅速,被蛇咬伤后,可以马上进行针对性的治疗。

具体实施方式

[0019] 实施例 1:

一种基于适配子技术的中华眼镜蛇毒鉴别方法,按如下步骤进行:

1)、中华眼镜蛇毒种属特异性适配子的筛选,构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物,将单链 DNA 文库通过 PCR 合成双链 DNA 文库,再利用不对称 PCR 法扩增 DNA 文库,PCR 扩增产物用酚氯仿法纯化回收,得到大量纯化的单链 DNA 文库。

[0020] 2)、中华眼镜蛇毒筛选循环:将中华眼镜蛇毒透析后包被于酶联板上,37 $^{\circ}$ C 作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将纯化的单链 DNA 文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔 37 $^{\circ}$ C 作用 40 分钟,反筛去除与 BSA 结合

的单链 DNA,然后转移到中华眼镜蛇蛇毒蛋白包被孔与中华眼镜蛇蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,再加入 SELEX 洗脱液于 80℃作用 10 分钟,洗脱下与中华眼镜蛇蛇毒蛋白结合的 ssDNA,经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀,得到纯化的单链 DNA。对纯化后的 ssDNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0021] 3)、鉴别蛇毒反筛循环:将鉴别蛇毒混合体(尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上,37℃作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤 2)中纯化的单链 DNA 文库 1ng 转移到蛇毒混合体包被孔与混合蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,收集洗涤下来的 ssDNA,纯化得到的单链 DNA。在把得到的单链 DNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0022] 4)、重复步骤 2)-3) 12 轮:单数轮筛选将中华眼镜蛇毒作为筛选靶标,收集结合洗脱 ssDNA 用于下一循环;双数轮筛选使用需要与之鉴别的蛇毒混合体(尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)作为消减筛选靶标,收集未结合洗脱 ssDNA 用于下一循环。包被的蛇毒蛋白的浓度和用于结合的单链 DNA 浓度随着筛选轮数的增加而不断的降低,至第 12 轮时,包被蛋白的浓度达到每孔 0.05μg,相应的结合单链 DNA 的浓度为每孔 0.02ng,得到可与中华眼镜蛇蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒(尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)结合的单链 DNA 适配子库。

[0023] 5)、将步骤 4) 获得的高亲和性单链 DNA 适配子库进行 PCR 扩增,获得双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物。用含浓度 0.5μg/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶,将双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物进行电泳,电泳后将琼脂糖凝胶置放在荧光检测板上,将呈橘红色条带的双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物切下,用 TaKaRa 公司提供的 DNA 纯化回收试剂盒纯化,得到纯化的双链 DNA。

[0024] 6)、将步骤 5) 获得的双链 DNA,用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试剂盒连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,氨苄抗性筛选,挑取单个生长菌落进行测序。

[0025] 7)、将各单个生长菌落所对应的 DNA 适配子用生物素标记,量为 0.1μg,与每孔 10μg 包被的中华眼镜蛇蛇毒蛋白在 SELEX 结合缓冲液中 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素,37℃,作用 30 分钟,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,洗去未与中华眼镜蛇蛇毒蛋白上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素,然后加入四甲基联苯胺室温显色 20 分钟作用,加入 2M 浓硫酸终止显色反应,450nm 酶联仪测定 OD 值,选取 OD 值最高的 DNA 适配子,该适配子即为能与中华眼镜蛇蛇毒蛋白结合的 DNA 适配子,将该适配子测序获得序列。

[0026] 8)、将由上述过程获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子,

9)、从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质,从而判断蛇伤种类,进行相应的抗蛇毒血清救治。

[0027] 实施例 2:

一种基于适配子技术的尖吻蝮蛇毒鉴别方法,按如下步骤进行:

1)、尖吻蝮蛇毒种属特异性适配子的筛选,构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物,将单链 DNA 文库通过 PCR 合成双链 DNA 文库,再利用不对称 PCR 法扩增 DNA 文库,PCR 扩增产物用酚氯仿法纯化回收,得到大量纯化的单链 DNA 文库。

[0028] 2)、尖吻蝮蛇毒筛选循环:将尖吻蝮蛇毒透析后包被于酶联板上,37℃作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将纯化的单链 DNA 文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔 37℃作用 40 分钟,反筛去除与 BSA 结合的单链 DNA,然后转移到尖吻蝮蛇毒蛋白包被孔与尖吻蝮蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,再加入 SELEX 洗脱液于 80℃作用 10 分钟,洗脱下与尖吻蝮蛇毒蛋白结合的 ssDNA,经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀,得到纯化的单链 DNA。对纯化后的 ssDNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为一下轮筛选的文库。

[0029] 3)、鉴别蛇毒反筛循环:将鉴别蛇毒混合体(中华眼镜蛇、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上,37℃作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤 2)中纯化的单链 DNA 文库 1ng 转移到蛇毒混合体包被孔与混合蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,收集洗涤下来的 ssDNA,纯化得到的单链 DNA。在把得到的单链 DNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为一下轮筛选的文库。

[0030] 4)、重复步骤 2)-3) 12 轮:单数轮筛选将尖吻蝮蛇毒作为筛选靶标,收集结合洗脱 ssDNA 用于下一循环;双数轮筛选使用需要与之鉴别的蛇毒混合体(中华眼镜蛇毒、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)作为消减筛选靶标,收集未结合洗脱 ssDNA 用于下一循环。包被的蛇毒蛋白的浓度和用于结合的单链 DNA 浓度随着筛选轮数的增加而不断的降低,至第 12 轮时,包被蛋白的浓度达到每孔 0.05μg,相应的结合单链 DNA 的浓度为每孔 0.02ng,得到可与尖吻蝮蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒(中华眼镜蛇毒、江浙蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)结合的单链 DNA 适配子库。

[0031] 5)、将步骤 4) 获得的高亲和性单链 DNA 适配子库进行 PCR 扩增,获得双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物。用含浓度 0.5μg/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶,将双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物进行电泳,电泳后将琼脂糖凝胶置放在荧光检测板上,将呈橘红色条带的双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物切下,用 TaKaRa 公司提供的 DNA 纯化回收试剂盒纯化,得到纯化的双链 DNA。

[0032] 6)、将步骤 5) 获得的双链 DNA,用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试剂盒连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,氨苄抗性筛选,挑取单个生长菌落进行测序。

[0033] 7)、将各单个生长菌落所对应的 DNA 适配子用生物素标记,量为 0.1μg,与每孔 10μg 包被的尖吻蝮蛇毒蛋白在 SELEX 结合缓冲液中 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素,37℃,作用 30 分钟,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,洗去未与尖吻蝮蛇毒蛋白上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素,然后加入四甲基联苯胺室温显色 20 分钟作用,加入 2M 浓硫酸终止显色反应,450nm 酶联仪测定 OD

值,选取 OD 值最高的 DNA 适配子,该适配子即为能与尖吻蝮蛇蛇毒蛋白结合的 DNA 适配子,将该适配子测序获得序列。

[0034] 8)、将由上述过程获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子,

9)、从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质,从而判断蛇伤种类,进行相应的抗蛇毒血清救治。

[0035] 实施例 3:

一种基于适配子技术的江浙蝮蛇毒鉴别方法,按如下步骤进行:

1)、江浙蝮蛇毒种属特异性适配子的筛选,构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物,将单链 DNA 文库通过 PCR 合成双链 DNA 文库,再利用不对称 PCR 法扩增 DNA 文库,PCR 扩增产物用酚氯仿法纯化回收,得到大量纯化的单链 DNA 文库。

[0036] 2)、江浙蝮蛇毒筛选循环:将江浙蝮蛇毒透析后包被于酶联板上,37℃作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将纯化的单链 DNA 文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔 37℃作用 40 分钟,反筛去除与 BSA 结合的单链 DNA,然后转移到江浙蝮蛇毒蛋白包被孔与江浙蝮蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,再加入 SELEX 洗脱液于 80℃作用 10 分钟,洗脱下与江浙蝮蛇毒蛋白结合的 ssDNA,经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀,得到纯化的单链 DNA。对纯化后的 ssDNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0037] 3)、鉴别蛇毒反筛循环:将鉴别蛇毒混合体(中华眼镜蛇、尖吻蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上,37℃作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤 2)中纯化的单链 DNA 文库 1ng 转移到蛇毒混合体包被孔与混合蛇毒蛋白 37℃结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,收集洗涤下来的 ssDNA,纯化得到的单链 DNA。在把得到的单链 DNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0038] 4)、重复步骤 2)-3) 12 轮:单数轮筛选将江浙蝮蛇毒作为筛选靶标,收集结合洗脱 ssDNA 用于下一循环;双数轮筛选使用需要与之鉴别的蛇毒混合体(中华眼镜蛇毒、尖吻蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)作为消减筛选靶标,收集未结合洗脱 ssDNA 用于下一循环。包被的蛇毒蛋白的浓度和用于结合的单链 DNA 浓度随着筛选轮数的增加而不断的降低,至第 12 轮时,包被蛋白的浓度达到每孔 0.05μg,相应的结合单链 DNA 的浓度为每孔 0.02ng,得到可与江浙蝮蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒(中华眼镜蛇毒、尖吻蝮蛇毒、烙铁头蛇毒)结合的单链 DNA 适配子库。

[0039] 5)、将步骤 4) 获得的高亲和性单链 DNA 适配子库进行 PCR 扩增,获得双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物。用含浓度 0.5μg/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶,将双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物进行电泳,电泳后将琼脂糖凝胶置放在荧光检测板上,将呈橘红色条带的双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物切下,用 TaKaRa 公司提供的 DNA 纯化回收试剂盒纯化,得到纯化的双链 DNA。

[0040] 6)、将步骤 5) 获得的双链 DNA,用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试

剂盒连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,氨苄抗性筛选,挑取单个生长菌落进行测序。

[0041] 7)、将各单个生长菌落所对应的 DNA 适配子用生物素标记,量为 0.1 μ g,与每孔 10 μ g 包被的江浙蝮蛇蛇毒蛋白在 SELEX 结合缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C,作用 30 分钟,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,洗去未与江浙蝮蛇蛇毒蛋白上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素,然后加入四甲基联苯胺室温显色 20 分钟作用,加入 2M 浓硫酸终止显色反应,450nm 酶联仪测定 OD 值,选取 OD 值最高的 DNA 适配子,该适配子即为能与江浙蝮蛇蛇毒蛋白结合的 DNA 适配子,将该适配子测序获得序列。

[0042] 8)、将由上述过程获得的适配子进行修饰增强其稳定性,然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子,

9)、从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质,从而判断蛇伤种类,进行相应的抗蛇毒血清救治。

[0043] 实施例 4:

一种基于适配子技术的烙铁头蛇毒鉴别方法,按如下步骤进行:

1)、烙铁头蛇毒种属特异性适配子的筛选,构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物,将单链 DNA 文库通过 PCR 合成双链 DNA 文库,再利用不对称 PCR 法扩增 DNA 文库,PCR 扩增产物用酚氯仿法纯化回收,得到大量纯化的单链 DNA 文库。

[0044] 2)、烙铁头蛇毒筛选循环:将烙铁头蛇毒透析后包被于酶联板上,37 $^{\circ}$ C 作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将纯化的单链 DNA 文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔 37 $^{\circ}$ C 作用 40 分钟,反筛去除与 BSA 结合的单链 DNA,然后转移到烙铁头蛇毒蛋白包被孔与江浙蝮蛇蛇毒蛋白 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,再加入 SELEX 洗脱液于 80 $^{\circ}$ C 作用 10 分钟,洗脱下与烙铁头蛇毒蛋白结合的 ssDNA,经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀,得到纯化的单链 DNA。对纯化后的 ssDNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0045] 3)、鉴别蛇毒反筛循环:将鉴别蛇毒混合体(中华眼镜蛇、尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇)用 PH 值 9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上,37 $^{\circ}$ C 作用 3 小时,同时设空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。将步骤 2)中纯化的单链 DNA 文库 1ng 转移到蛇毒混合体包被孔与混合蛇毒蛋白 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟,用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次,收集洗涤下来的 ssDNA,纯化得到的单链 DNA。在把得到的单链 DNA 进行常规 PCR 反应扩增,而后进行非对称 PCR 反应,酚氯仿法纯化回收获得富集单链 DNA 随机库,该文库作为下一轮筛选的文库。

[0046] 4)、重复步骤 2)-3) 12 轮:单数轮筛选将江浙蝮蛇毒作为筛选靶标,收集结合洗脱 ssDNA 用于下一循环;双数轮筛选使用需要与之鉴别的蛇毒混合体(中华眼镜蛇毒、尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇毒)作为消减筛选靶标,收集未结合洗脱 ssDNA 用于下一循环。包被的蛇毒蛋白的浓度和用于结合的单链 DNA 浓度随着筛选轮数的增加而不断的降低,至第 12 轮时,包被蛋白的浓度达到每孔 0.05 μ g,相应的结合单链 DNA 的浓度为每孔 0.02ng,得到可与烙铁头蛇毒蛋白高亲和性结合同时不与鉴别蛇毒(中华眼镜蛇毒、尖吻蝮蛇毒、江浙蝮蛇毒)结合的单链 DNA 适配子库。

[0047] 5)、将步骤 4) 获得的高亲和性单链 DNA 适配子库进行 PCR 扩增, 获得双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物。用含浓度 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶, 将双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物进行电泳, 电泳后将琼脂糖凝胶置放在荧光检测板上, 将呈橘红色条带的双链 DNA 文库的 PCR 扩增产物切下, 用 TaKaRa 公司提供的 DNA 纯化回收试剂盒纯化, 得到纯化的双链 DNA。

[0048] 6)、将步骤 5) 获得的双链 DNA, 用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试剂盒连接到 pMD18-T 载体上, 转化到大肠杆菌 DH5a, 氨苄抗性筛选, 挑取单个生长菌落进行测序。

[0049] 7)、将各单个生长菌落所对应的 DNA 适配子用生物素标记, 量为 0.1 μ g, 与每孔 10 μ g 包被的烙铁头蛇毒蛋白在 SELEX 结合缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 结合 40 分钟, 用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次, 加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素, 37 $^{\circ}$ C, 作用 30 分钟, 用 PBST 缓冲液洗涤 4 次, 洗去未与烙铁头蛇毒蛋白上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素, 然后加入四甲基联苯胺室温显色 20 分钟作用, 加入 2M 浓硫酸终止显色反应, 450nm 酶联仪测定 OD 值, 选取 OD 值最高的 DNA 适配子, 该适配子即为能与烙铁头蛇毒蛋白结合的 DNA 适配子, 将该适配子测序获得序列。

[0050] 8)、将由上述过程获得的适配子进行修饰增强其稳定性, 然后用荧光素、生物素、放射性同位素或胶体金进行标记转为报告适配子,

9)、从蛇伤受害者血、尿、伤口组织及分泌物中检测相应的蛇毒物质, 从而判断蛇伤种类, 进行相应的抗蛇毒血清救治。

专利名称(译)	一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法		
公开(公告)号	CN102323400A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201110152346.X	申请日	2011-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
[标]发明人	邓昆 府伟灵		
发明人	邓昆 府伟灵		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/10		
代理人(译)	郭云		
其他公开文献	CN102323400B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用适配子技术检测鉴别蛇毒种类的方法属生物医学检验领域，涉及一种利用适配子技术检测蛇毒的方法。本发明针对蛇毒成分复杂，目前蛇伤检测方法特异性与敏感性差等问题，采用消减适配子筛选技术 (depletionSELEX)，筛选获得具有高度蛇毒种属特异性的适配子，并将适配子转为报告适配子建立蛇毒快速检测新方法。