



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119220650 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 31

(21) 申请号 202411160371.6

(22) 申请日 2024.08.22

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 蓝琳 王志明 刘勇 龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 江裕强 刘远

(51) Int. Cl.

C12Q 1/686 (2018.01)

C09K 11/06 (2006.01)

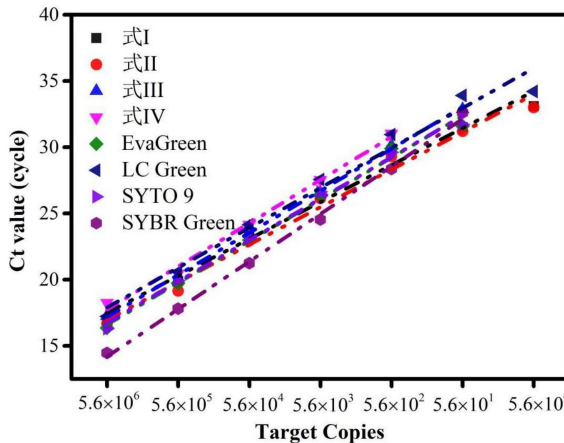
权利要求书4页 说明书18页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

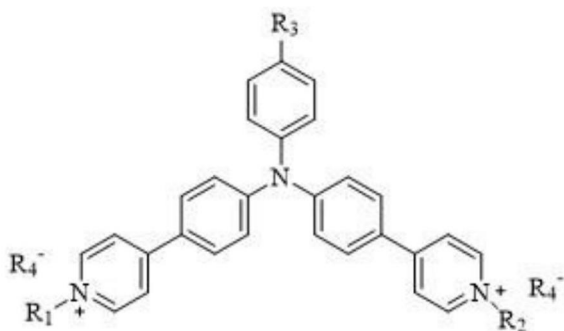
一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用

(57) 摘要

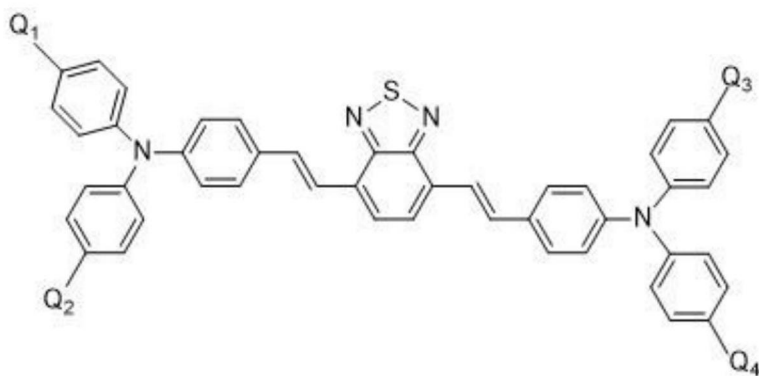
本发明公开了一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用;所述AIE荧光分子选自式(1)、式(2)结构中的任意一种。本发明AIE荧光分子用于实时荧光定量PCR和高分辨率熔解曲线分析,集灵敏度高、抗抑制剂能力强、分辨率高、多重兼容等优势,是通过高分辨率熔解曲线进行基因分型以及病原体多重检测时使用的理想染料。有效解决了现有核酸染料,由于灵敏度差、抗抑制剂能力差,应用在较低浓度模板样本及复杂样本时,效果不佳或无法检测的缺陷,尤其解决了现有染料无法提供每个序列的特异性信息等问题。



1. 一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率溶解曲线分析中的应用,其特征在于,所述AIE荧光分子选自式(1)、式(2)结构中的任意一种;

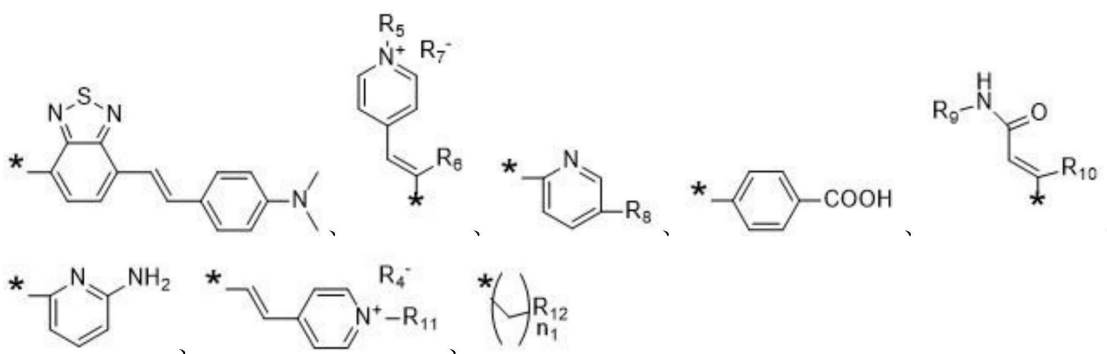


式(1)

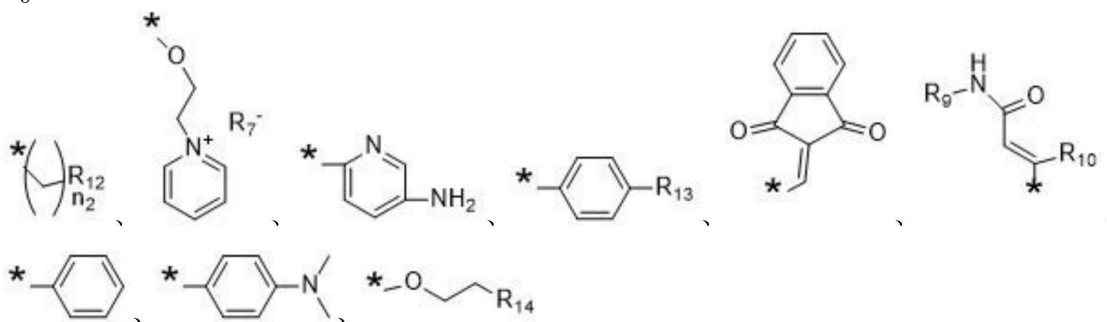


式(2)

式(1)中, R_1 、 R_2 各自独立选自以下结构中的一种:

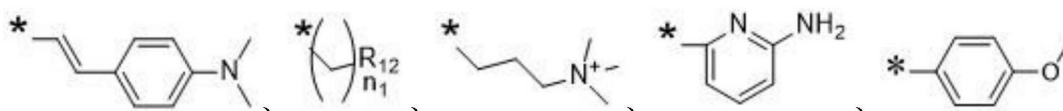


R_3 选自以下结构中的一种:



R_4^- 、 R_7^- 各自独立为阴离子;

R_8 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立选自以下结构中的一种:

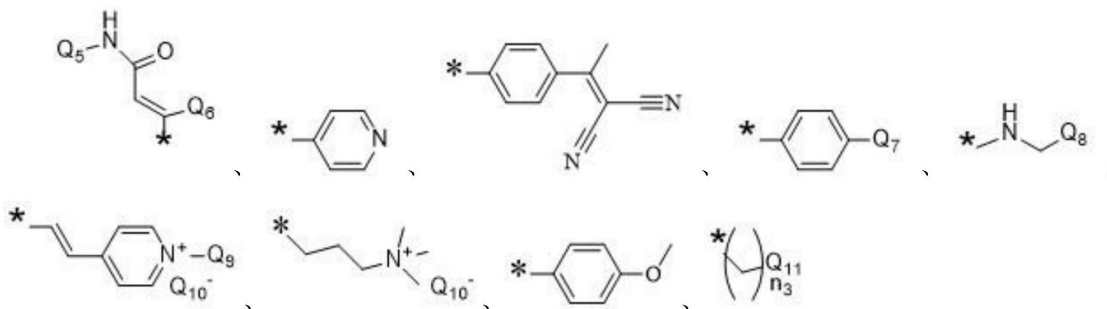


$R_5, R_6, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}$ 各自独立选自 $-H, -NH_2, -COOH, -CN, -CHO, -OH, -CH_3$ 中的一种;

n_1 和 n_2 为大于等于1的整数;

其中,*表示取代位置;

式(2)中, Q_1, Q_2, Q_3, Q_4 各自独立选自以下结构中的一种:



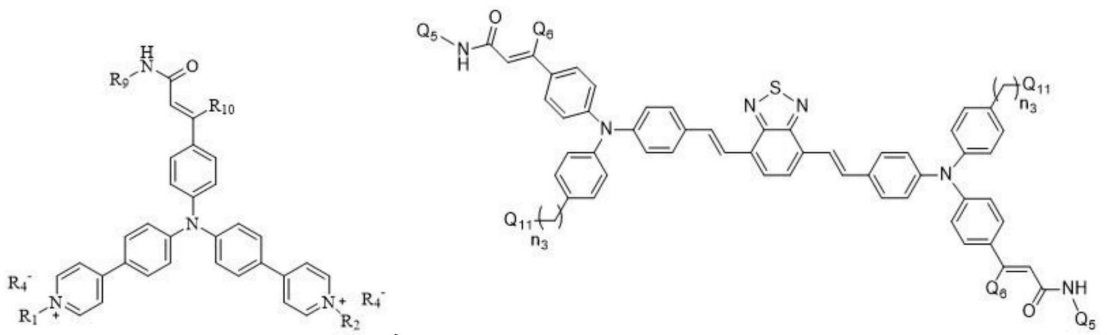
Q_{10}^- 各自独立为阴离子;

$Q_5, Q_6, Q_7, Q_8, Q_9, Q_{11}$ 各自独立选自 $-H, -COOH, -CN, -CHO, -OH, -CH_3$ 中的一种;

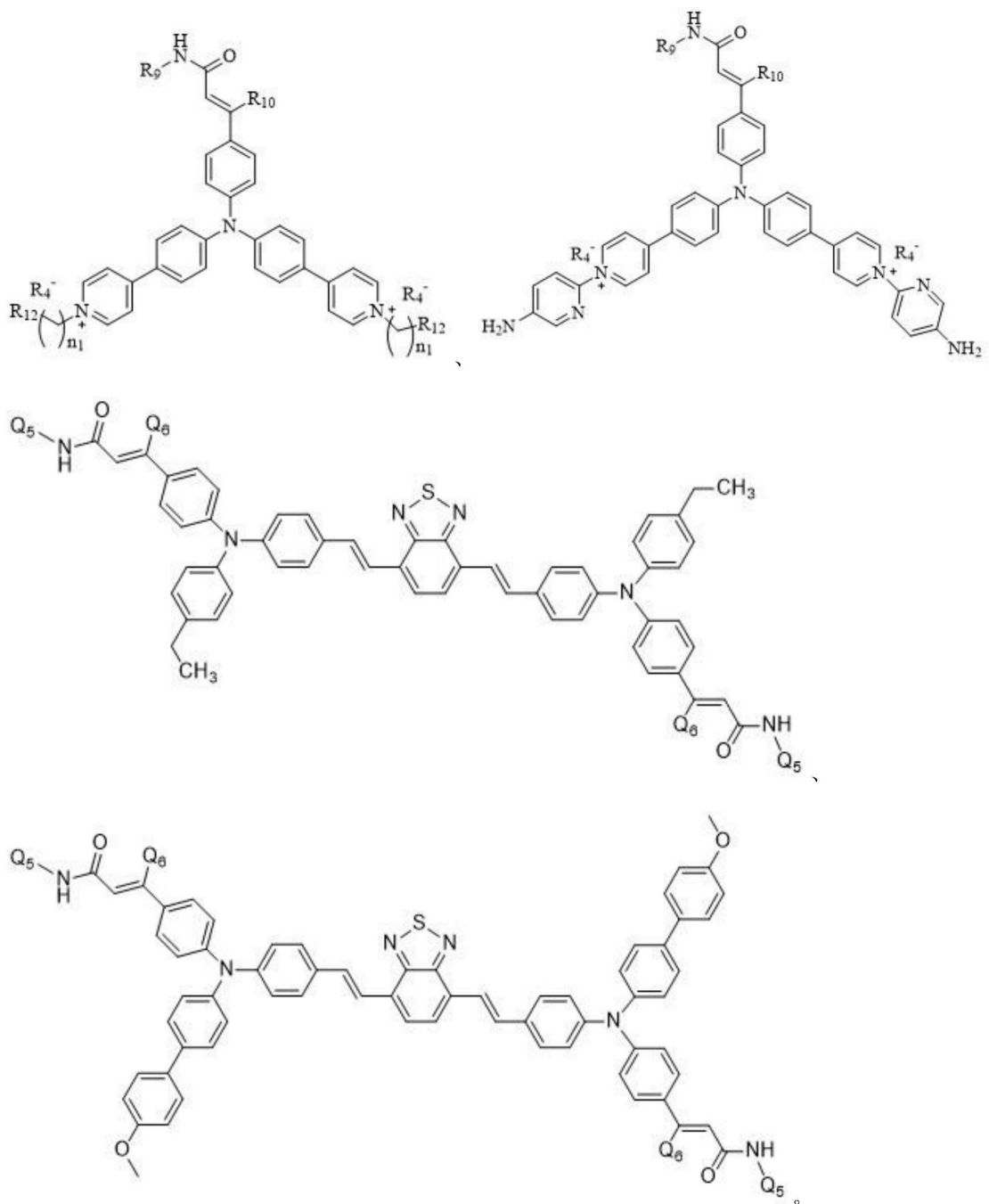
n_3 为大于等于1的整数。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,式(1)中, R_1 与 R_2 结构相同;式(2)中, Q_1 与 Q_4 结构相同,或者, Q_2 与 Q_3 结构相同。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:

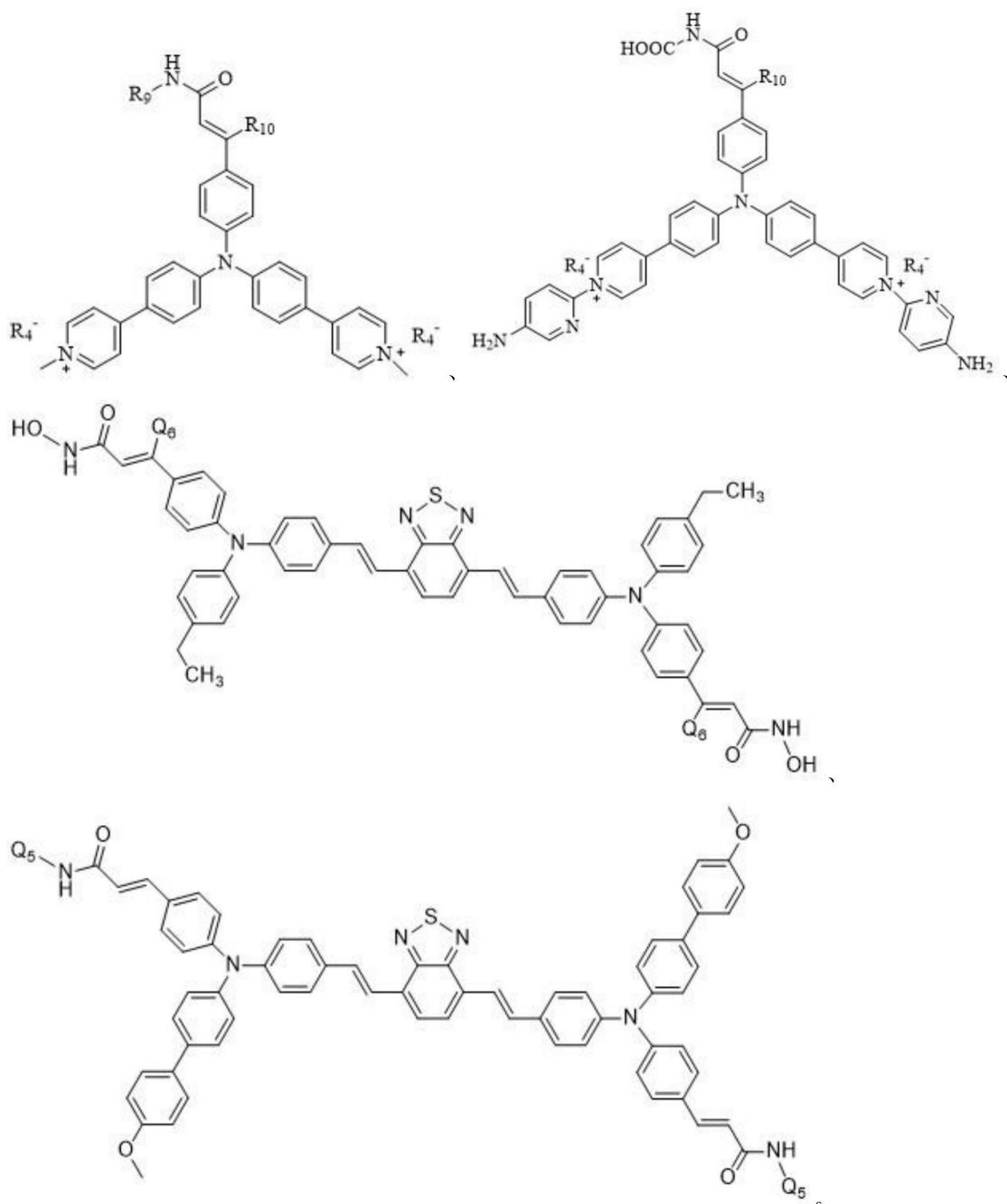


4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:



5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述 R_9 、 R_{10} 、 R_{12} 、 Q_5 、 Q_6 各自独立选自-H、-COOH、-CN、-CHO中的一种。

6. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:



7. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述 n_1 、 n_2 、 n_3 为1-4的整数。
8. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PF_6^- 、 $CF_3SO_3^-$ 、 ClO_4^- 中的一种或多种。
9. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述AIE荧光分子作为核酸染料;
所述实时荧光定量PCR用于核酸定量;所述高分辨率熔解曲线分析用于基因分型、基因突变检测或病原体多重检测。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述核酸定量的目标核酸浓度为 $5.6 \sim 5.6 \times 10^6$ 个拷贝;所述核酸定量的待测样本为纯化样本、粗裂解样本以及未处理样本;所述病原体多重检测的重数为1~7重。

一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体涉及一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用。

背景技术

[0002] 实时荧光定量PCR (qPCR) 和高分辨率熔解曲线分析 (HRM) 是一种可用于核酸定量、突变检测和基因分型分析的先进的技术。实时荧光定量PCR的应用不断扩大,许多不同的系统已经被开发出来,包括基于探针的方法,如Taqman探针、分子信标、蝎子引物等。探针法虽然特异性高,但其费用昂贵,多重检测时受仪器通道限制,且可能由于荧光的泄漏,出现本底较高的现象。另一种方法是使用DNA插入染料,结合双链DNA。与未结合态相比,染料在与双链DNA结合后具有更高的荧光。随后,通过分析qPCR扩增物的熔融曲线,得到特异性扩增的指示。染料法操作简便快捷、通量大、灵敏度高、成本低,结果准确,不受突变碱基位置与类型的限制,无需序列特异性探针,在qPCR结束后直接运行高分辨熔解即可完成对样品的分析,实现了真正的闭管操作。

[0003] 目前,最常用的荧光染料是SYBR Green I,由于成本低、效率高、扩增DNA的通用检测以及通过熔融曲线分析区分qPCR产物的能力,成为实时荧光定量PCR应用最广泛的DNA染料。但其属于非饱和染料,SYBR Green I不能封闭dsDNA的所有小沟位置,远未将DNA双螺旋结构中的小沟饱和。这样,DNA双链高温逐步变性时,部分荧光染料分子会随机结合到尚未解链的双链DNA空置的小沟位置,染料分子发生重排,造成荧光信号混乱,特异性下降,不能准确反映dsDNA解链过程。并且,其以浓度依赖的方式抑制PCR,对DNA熔融温度产生影响,以及在与DNA结合时,会优先结合GC序列。这些缺点限制了使用SYBR Green I基于HRM进行多重PCR的分析。

[0004] EvaGreen是一类同时适用于实时荧光定量PCR和HRM分析的新一代饱和染料。这种染料通过一种被称为“按要求释放”的全新机制,选择性的结合双链DNA,能饱和结合于PCR反应产物的双链小沟内。这一机制保证了较低的PCR抑制作用,也消除了“染料重分布”的缺陷,使EvaGreen既可用于核酸定量,也可用于多重qPCR产物的高分辨率熔解曲线分析 (HRM)。但是,在进行实时荧光定量PCR检测时,较低的模板浓度和复杂的样品材料 (含有很多PCR抑制剂) 都会对PCR的扩增加大难度,这些抑制剂可影响或淬灭所用荧光物质的荧光;并且基因组中广泛存在高GC含量的DNA序列,它们特别容易形成二级结构干扰PCR,增加扩增的难度,并且容易产生非特异性扩增,因此,对于高GC模板的扩增也是一个很重要的影响因素;在用于多重qPCR产物的HRM分析时,对T_m值相差小于2℃的扩增子 (长度和GC含量决定),也要有足够的分辨率;而现有的饱和染料,包括EvaGreen在内,在上述问题的处理上面,仍存在各自的弊端。综上所述,现有技术主要存在三大问题:

[0005] 第一个问题是现有的饱和染料在抗PCR抑制剂方面的能力较差,在应用于复杂样品材料的检测时,效果不佳;

[0006] 第二个问题是进行多重qPCR产物的HRM检测时,现有的饱和染料偏好低GC区域扩增,导致PCR产物比例失衡,以及在进行多重检测时,无法扩增出 T_m 值在90℃左右的扩增子,而最多只能进行五重扩增。

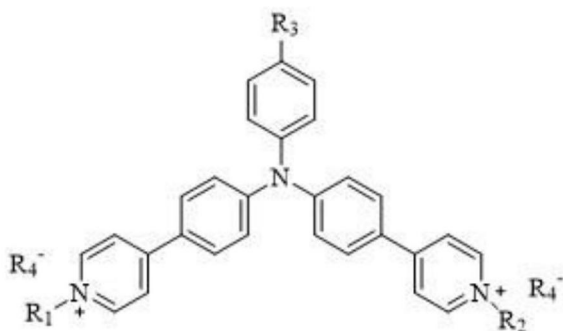
[0007] 第三个问题是HRM检测分析DNA序列的变异,包括各种突变(如替换/插入/删除/重复等),能影响相关基因的表达,进而改变细胞的生理生化活动,最终导致个体层次上的千差万别)。而现有的饱和染料不足以区分 T_m 值相差小于2℃的扩增子,以及针对转换纯合突变子,难以对其进行基因分型;因此,对能兼容灵敏度高、抗抑制剂能力强、兼容多重、以及分辨率高的染料的市场需求仍然很大。

发明内容

[0008] 为解决上述的技术问题,本发明提供了一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用。

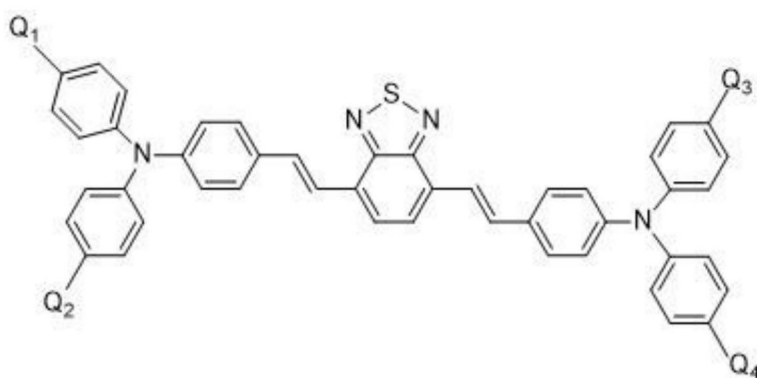
[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 本发明提供一种AIE荧光分子在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用,所述AIE荧光分子选自式(1)、式(2)结构中的任意一种;



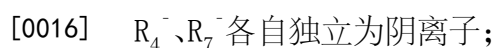
式(1)

[0011]

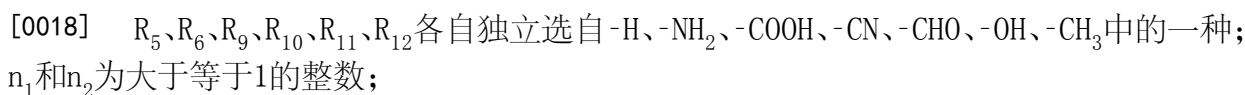


式(2)

[0012] 式(1)中, R_1 、 R_2 各自独立选自以下结构中的一种:

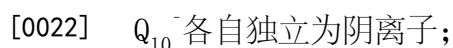


[0017] R_8 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立选自以下结构中的一种：



[0019] 其中,*表示取代位置;

[0020] 式(2)中, Q_1 、 Q_2 、 Q_3 、 Q_4 各自独立选自以下结构中的一种:

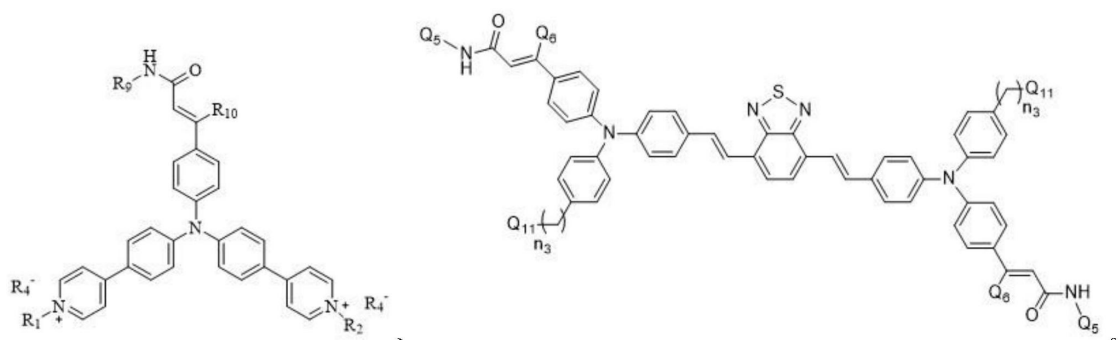


[0023] Q_5 、 Q_6 、 Q_7 、 Q_8 、 Q_9 、 Q_{11} 各自独立选自-H、-COOH、-CN、-CHO、-OH、-CH₃中的一种；

[0024] n_3 为大于等于1的整数。

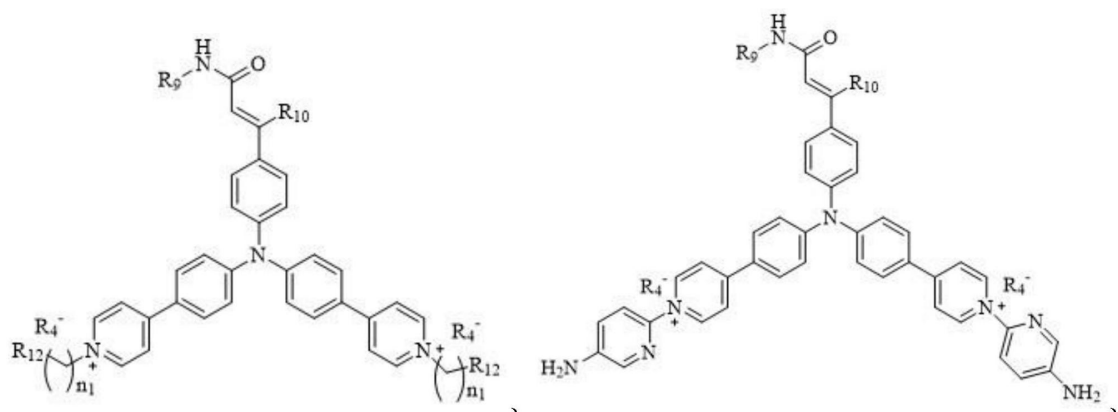
[0025] 优选的,式(1)中, R_1 与 R_2 结构相同;式(2)中, Q_1 与 Q_4 结构相同,或者, Q_2 与 Q_3 结构相同。优选的,所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:

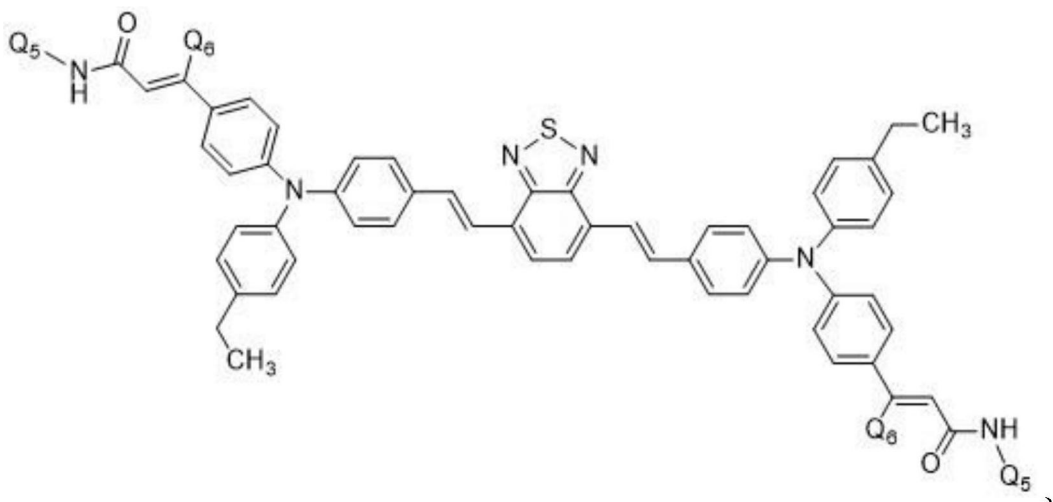
[0026]



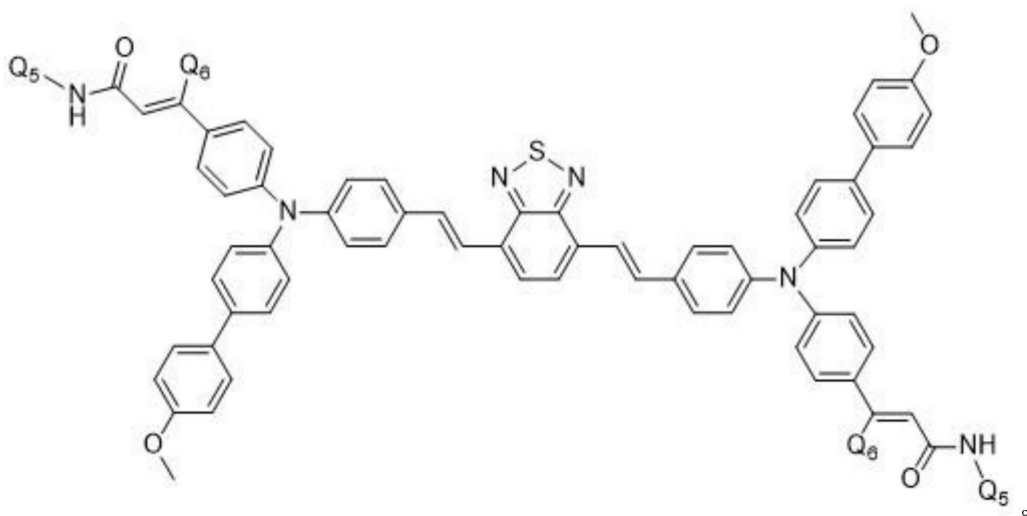
[0027] 优选的,所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:

[0028]



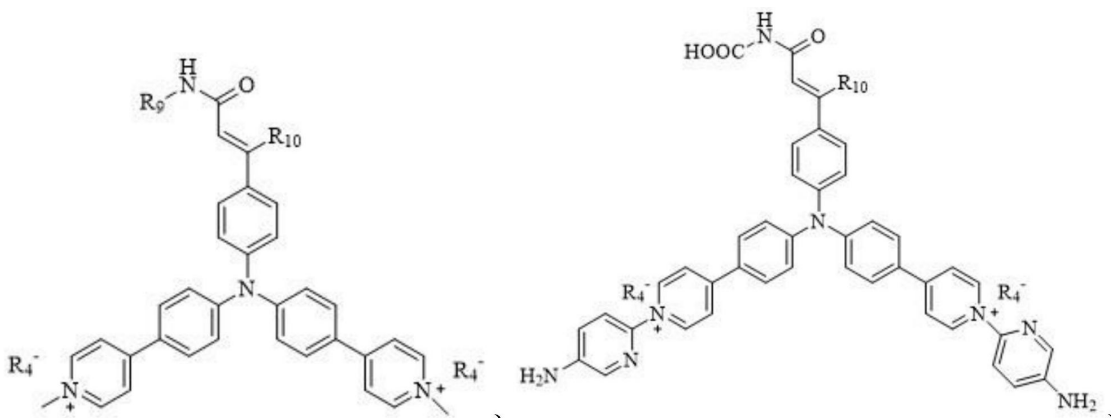


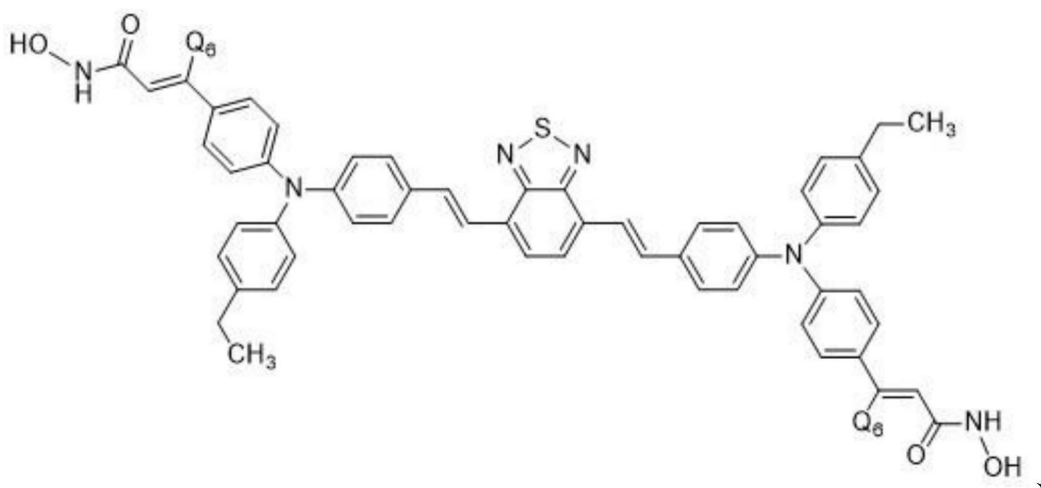
[0029]



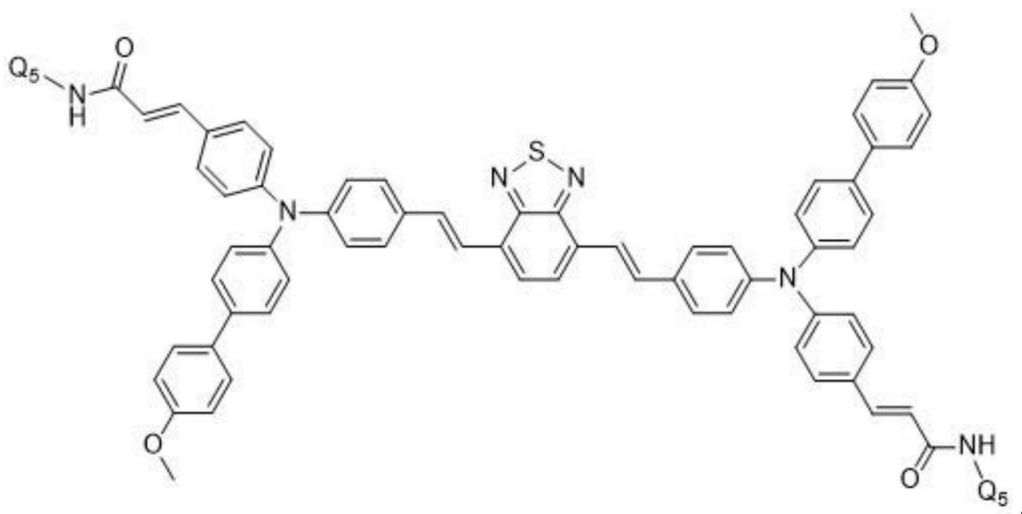
[0030] 进一步优选的,所述 R_9 、 R_{10} 、 R_{12} 、 Q_5 、 Q_6 各自独立选自-H、-COOH、-CN、-CHO中的一种。进一步优选的,所述AIE荧光分子选自以下结构中的任意一种:

[0031]





[0032]



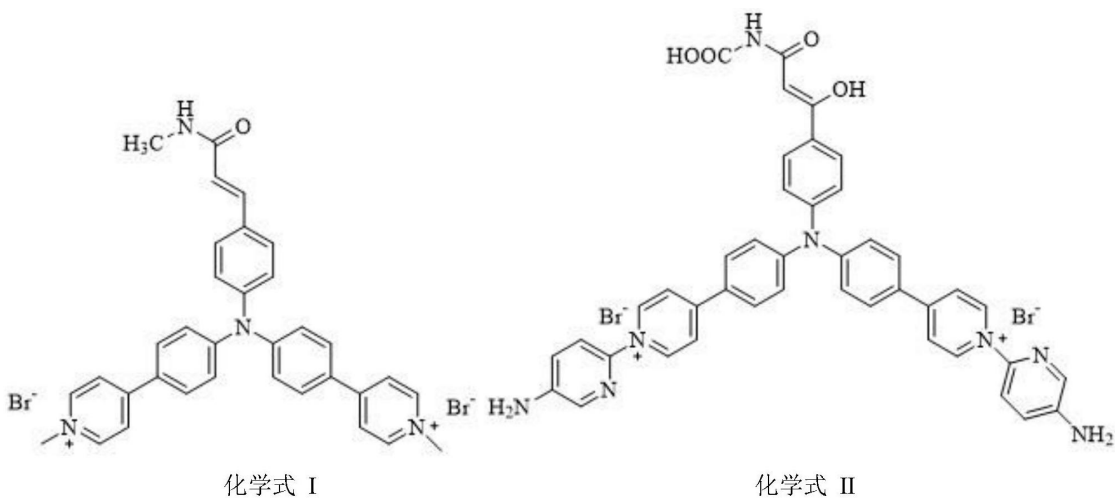
[0033] 优选的, 所述 n_1 为1-4的整数(1、2、3、4); 所述 n_2 为1-4的整数(1、2、3、4); 所述 n_3 为1-4的整数(1、2、3、4)。

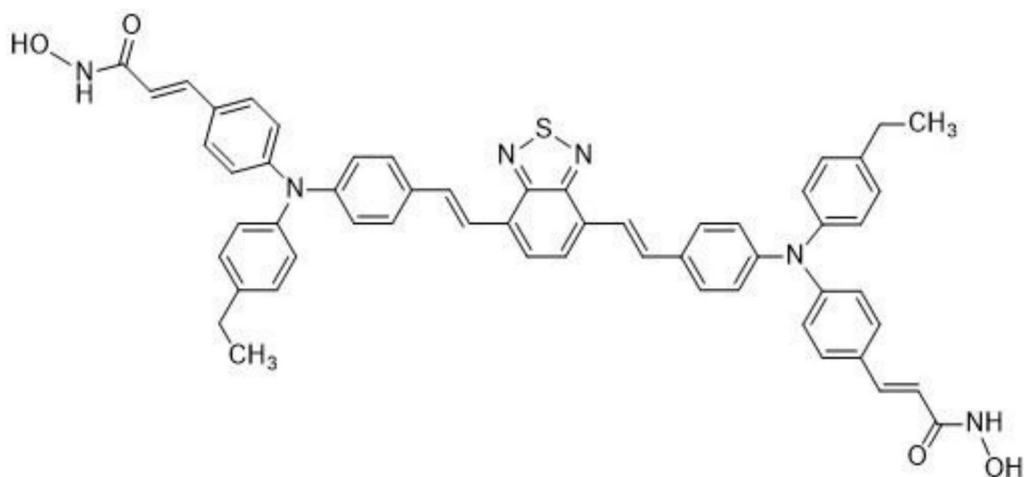
[0034] 进一步优选的, 所述 n_1 为2或3; 所述 n_2 为2或3; 所述 n_3 为1或2;

[0035] 优选的, 所述阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PF_6^- 、 $CF_3SO_3^-$ 、 ClO_4^- 中的一种或多种。

[0036] 优选的, 所述AIE荧光分子选自化学式I-化学式IV结构中的任意一种;

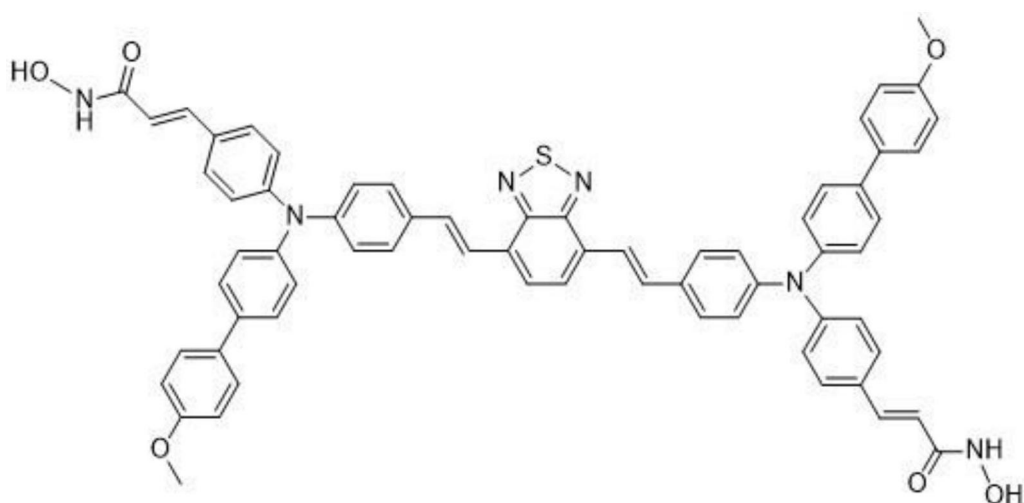
[0037]





化学式 III

[0038]



化学式 IV。

[0039] 优选的,本发明所述AIE荧光分子作为核酸染料在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析中的应用。

[0040] 优选的,所述AIE荧光分子的工作浓度为1-5(1、2、3、4、5) μM 。

[0041] 优选的,所述实时荧光定量PCR用于核酸定量;所述高分辨率熔解曲线用于基因分型、基因突变检测或病原体多重检测。

[0042] 进一步优选的,所述核酸定量的目标核酸浓度为 $5.6 \sim 5.6 \times 10^6$ 个拷贝;所述核酸定量的待测样本为纯化样本、粗裂解样本以及未处理样本;所述病原体多重检测的重数为1~7(1、2、3、4、5、6、7)重。相比于现有的染料,本发明AIE荧光分子检测样本的适用性较广,可包括纯化样本、粗裂解样本以及未纯化的血液样本;在多重检测方面,其检测比现有染料多1-2重;并且其检测限可至单个拷贝;同时,在基因分型方面可对单碱基突变进行明显区分。

[0043] 本发明还提供一种用于实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析的AIE饱和荧光染料,包括上述AIE荧光分子和溶剂。所述溶剂包括二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、水、甲醇中的至少一种。

[0044] 本发明提供一种基于上述AIE荧光分子的实时荧光定量PCR扩增的方法,包括以下

步骤:

[0045] (1) 构建qPCR反应体系,包括:待测样品、与所述待测样品中待测模板互补的正向引物和反向引物、AIE荧光染料(含有AIE荧光分子)及相对应的PCR缓冲液;

[0046] (2) 在所述反应体系中,对所述模板进行qPCR扩增,以形成双链DNA-AIE饱和荧光染料复合物;

[0047] (3) 每次qPCR扩增后,通过仪器检测荧光值,分析得到所述qPCR反应体系的Ct值及扩增产物的数量,从而确定所述待测样品中所述待测模板的数量。

[0048] 优选地,设计用于检测rtxA基因的基于上述AIE荧光分子的实时荧光定量PCR扩增引物,包括如下:

[0049] rtxA质粒:

[0050] GGTGCCGGAACAGCATCAGTTCACGCGTTGAGACAGGTAACATCACCTTCCGTGGCGCAGGTGCG

[0051] GATAACCATTAGTCCGTAAAGGCAAAGTGGGCGATATTACTCTGCAAGGTGCTGGGGCTTCAAACC

[0052] GCATTGAGCGGACACATCAGGCCGAAGATGTCTACACGCAAACCCGCGGCAATAT

[0053] 正向引物VCF:CACGCGTTGAGACAGGTAACATCAC

[0054] 反向引物VCR:CAGCACCTTGCAGAGTAATATCGCC

[0055] 目的基因片段大小为99bp。

[0056] 优选地,所述实时荧光定量PCR扩增体系为:PCR master mix缓冲液1×、AIE荧光分子为1-5 μ M、上下游引物各为200nM-400nM、模板适量。

[0057] 优选的,步骤(1)所述qPCR反应体系的反应程序包括如下步骤:

[0058] 第一阶段:95℃预变性5min;

[0059] 第二阶段:95℃变性15s;

[0060] 第三阶段:58℃退火,及72℃延伸45s,然后采集荧光数据;

[0061] 重复第二阶段、第三阶段,共40cycles。

[0062] 本发明提供一种基于上述AIE荧光分子的高分辨率熔解曲线分析的方法,包括以下步骤:

[0063] (1) 构建qPCR反应体系,包括:待测样品、与所述待测样品中待测模板互补的正向引物和反向引物、AIE荧光染料(含有AIE荧光分子)及相对应的PCR缓冲液;

[0064] (2) 在所述反应体系中,对所述模板进行qPCR扩增,以形成双链DNA-AIE饱和荧光染料复合物;

[0065] (3) qPCR扩增完成后,采集扩增产物的熔解曲线信息,检测所述qPCR反应体系各基因的T_m值,从而确定所述待测样品是否能对所述待测模板进行区分。

[0066] 优选地,设计用于检测各个基因的基于上述AIE荧光分子的实时荧光PCR扩增引物及其质粒参考实施例。

[0067] 优选的,所述实时荧光定量PCR扩增体系为:PCR master mix缓冲液1×、AIE荧光分子为1-5 μ M、上下游引物各为200nM-400nM、模板适量。

[0068] 优选地,步骤(1)所述qPCR反应体系的程序包括如下步骤:

[0069] 第一阶段:95℃预变性5min;

[0070] 第二阶段:95℃变性15s;

[0071] 第三阶段:58℃退火,及72℃延伸45s;

[0072] 重复第二阶段、第三阶段,共40cycles。

[0073] 第四阶段:扩增产物熔解曲线信息采集,为95℃下反应15s,在60℃反应1min,以0.025℃/s的速率升至95℃反应1s,并采集荧光信号。

[0074] 优选地,所述待测模板包括各个基因组DNA、各个不同基因的质粒、野生型及突变型模板。

[0075] 优选地,检测样本包括人的血液样本和咽拭子样本。

[0076] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0077] 本发明的AIE荧光分子作为核酸染料在实时荧光定量PCR或高分辨率熔解曲线分析的应用中,同现有的产品相比较,不仅可以对纯化的样本保持高灵敏度,同时由于其抗抑制剂能力强,同样能针对血液样本进行直扩,并保持较高的灵敏度;并且由于其染料之间无迁移(可通过 T_m 值进行判断),即能在进行DNA序列变异的检测时,包括各种突变(如替换/插入/删除/重复等),保证其准确性,也能兼容多重PCR扩增产物的HRM分析,并且由于能针对高GC的模板进行扩增,因此,在实际应用中,不会偏好低GC区域扩增,而导致PCR产物比例失衡,目前,可进行多至7重靶标扩增产物的HRM分析。

附图说明

[0078] 图1为AIE荧光分子式I、式II、式III、式IV和SYBR Green、EvaGreen、SYTO 9和LC Green的灵敏度标准曲线图。

[0079] 图2为AIE荧光分子式VI、式VII的灵敏度标准曲线图。

[0080] 图3为AIE荧光分子式I、式II、式III、式IV和SYBR Green、EvaGreen、SYTO 9和LC Green的多重熔解曲线图。

[0081] 图4为AIE荧光分子式VI、式VIII的多重熔解曲线图。

[0082] 图5为AIE荧光分子式I、式II、式III和EvaGreen、SYTO 9和LC Green的基因分型图。

[0083] 图6为AIE荧光分子式I、式II、式III和SYBR Green、EvaGreen、SYTO 9和LC Green的抗抑制剂图。

具体实施方式

[0084] 下面结合本发明的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。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,例如制造厂商建议的条件。

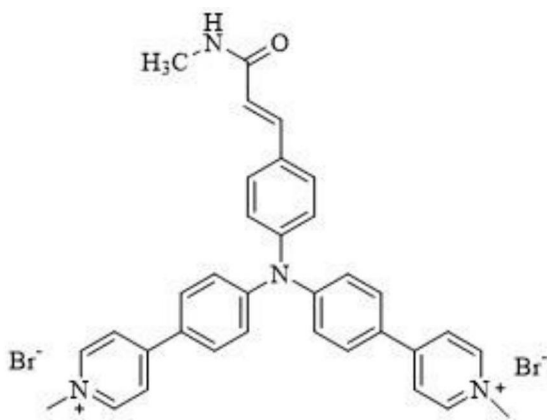
[0085] qPCR反应程序有两步法、三步法等多种方法,常规的两步法如95℃变性,60℃退火及延伸;三步法如95℃变性,58℃退火及72℃延伸。具体用哪一种方法,需结合引物退火温度、酶的特性、具体实施方案进行选择。用本发明方法检测样品,其长度一般不超过500bp,一般选择100-300bp,最佳为100-200bp。

[0086] 本发明实施中所用SYBR Green荧光染料(型号S917731)购自Macklin;EvaGreen荧光染料(型号31000-T)购自Biotium公司;LC Green荧光染料(型号BCHM-ASY-0005)购自Idaho;SYTO 9荧光染料(型号BS34854)购自Thermo Fisher Scientific;Taq DNA聚合酶(型号A131)购自北京康润诚业生物科技有限公司;PCR mix(型号Q513)购自诺唯赞;镁离子、dNTP溶液分别购自生工生物有限公司;正向引物、反向引物、基因合成均由上海迪赢生

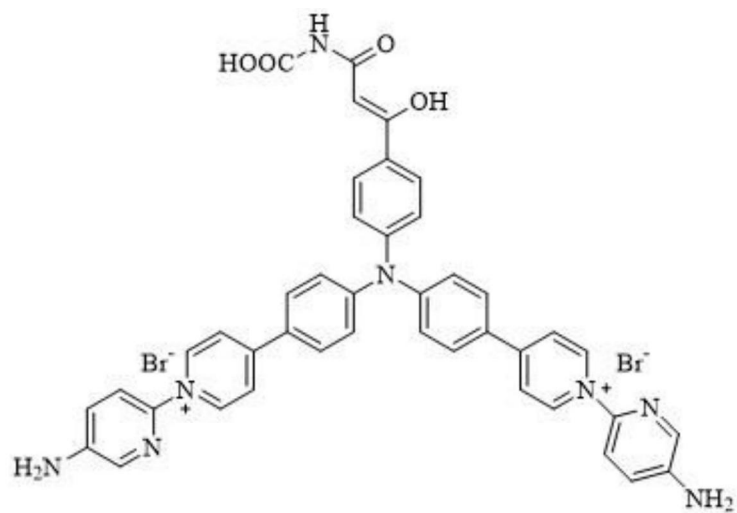
物科技有限公司合成。本发明体系中含有的本发明核酸饱和荧光染料,能解决复杂体系扩增、非特异性扩增、灵敏度低等难题,提供了一种新型的荧光定量PCR和高分辨溶解曲线分析的方法。

[0087] 实施例所用的AIE荧光分子化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV结构如下:

[0088]

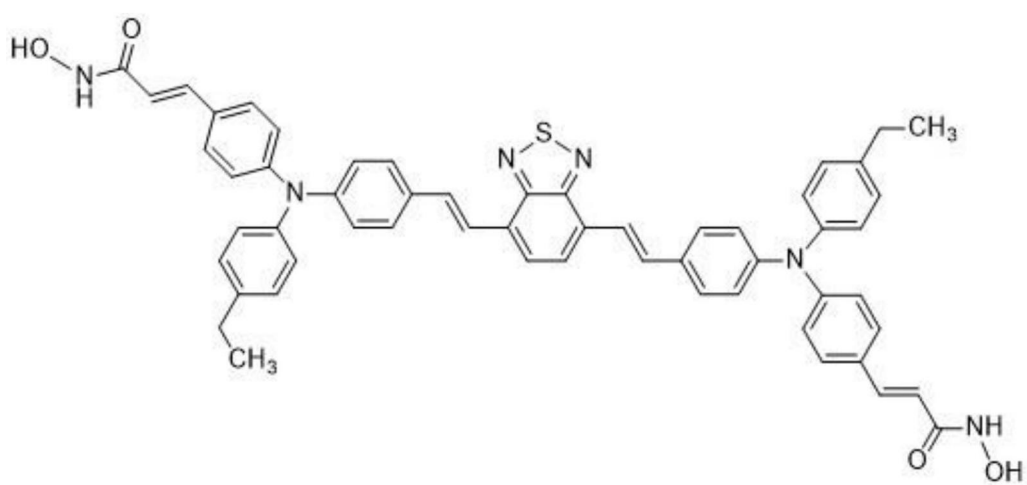


化学式 I

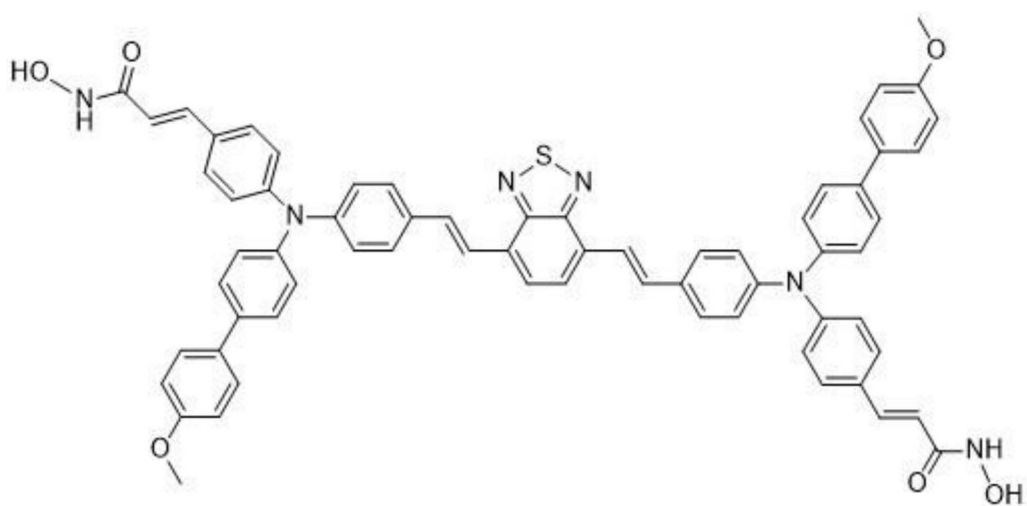


化学式 II

[0089]

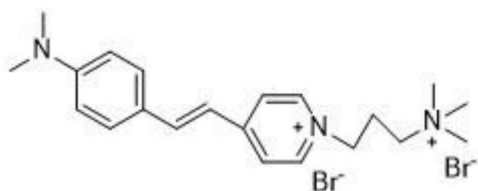


化学式 III

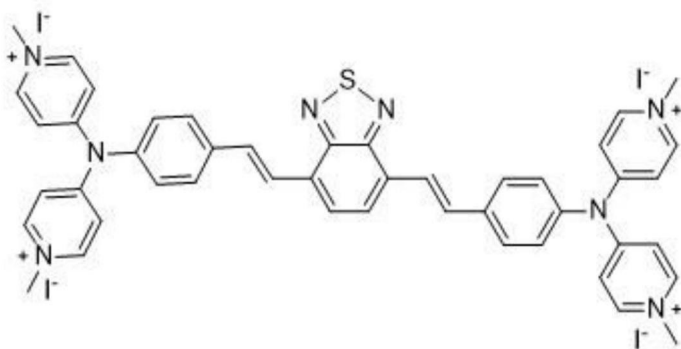


化学式 IV

[0090] 实施例所用的对比AIE荧光分子化学式V、化学式VI、式VII、式VIII结构如下：

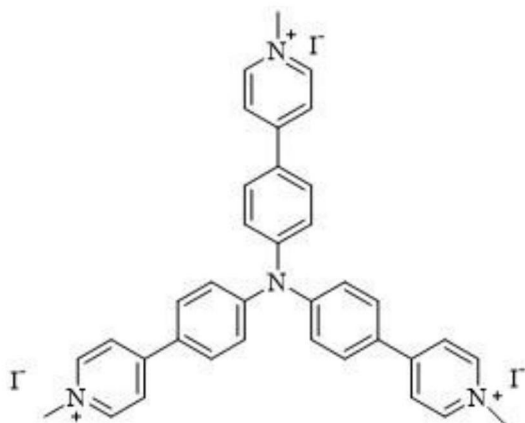


化学式 V

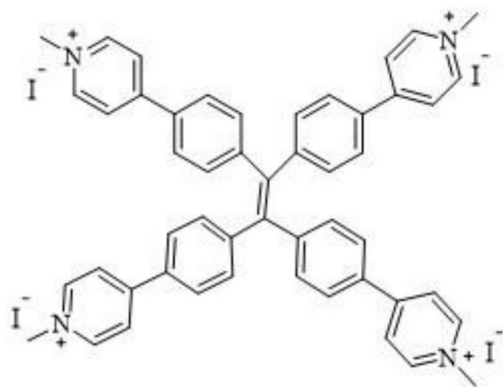


化学式 VI

[0091]



化学式 VII



化学式 VIII

[0092] 实施例1:

[0093] 本发明AIE荧光分子的应用

[0094] (一) 本发明AIE荧光染料的配制

[0095] 称取5.5mg式IAIE荧光分子固体,加入1mL生物级无水DMSO,充分溶解得到浓度为10mM的初始溶液染料,后再用生物级无水DMSO将其稀释为100 μ M作为母液浓度。使用时稀释

为1~3 μ M作为工作浓度,例如25 μ L扩增体系中加入0.25 μ L染料母液即为1 μ M工作浓度;以此为准,将式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII分别配成浓度为100 μ M的染料母液。

[0096] (二) 本发明AIE荧光分子在qPCR扩增中应用于灵敏度测试的具体实验方法如下:

[0097] 1. 构建rtxA质粒作为待测模板;

[0098] rtxA质粒:

[0099] GGTGCCGCGAACAGCATCAGTTCACGCGTTGAGACAGGTAACATCACCTTCCGTGGCGCAGGTGCG

[0100] GATAACCATTAGTCCGTAAAGGCAAAGTGGGCGATATTACTCTGCAAGGTGCTGGGGCTTCAAACC

[0101] GCATTGAGCGGACACATCAGGCCGAAGATGTCTACACGCAAACCCGCGGCAATAT

[0102] 2. 设计与待测样品中待测模板互补的正向引物和反向引物;

[0103] 正向引物VCF: CACGCGTTGAGACAGGTAACATCAC

[0104] 反向引物VCR: CAGCACCTTGCAGAGTAATATCGCC

[0105] 3. 构建qPCR反应体系:向体系中加入反应所需物质,包括不同浓度的待测模板、正向引物和反向引物、AIE荧光染料、热启动DNA聚合酶及对应的buffer (2 \times PCR master mix),最终体系为20 μ L;同时,在进行上述样品操作时,选取商用染料 (EvaGreen、LC Green、SYTO 9、SYBR Green) 取代AIE荧光分子染料做相同的实验进行分析;

[0106] qPCR反应体系的建立,反应体系共20 μ L,参考下表添加各试剂。

[0107] 表1PCR反应体系

	试剂	浓度
	2 \times PCR master mix	1 \times
	正向引物	200 nM
[0108]	反向引物	200 nM
	待测模板	不同浓度
	商用染料/实验染料及对照染料	1 \times /1 μ M
	水	加水补齐至 20 μ L

[0109] 4. 待qPCR反应体系准备完后,置于PCR仪中,设置相应的程序进行反应;qPCR反应程序为:

[0110] 采用三步法qPCR反应程序,

[0111] 第一阶段:95 $^{\circ}$ C预变性5min;

[0112] 第二阶段:95 $^{\circ}$ C变性15s;

[0113] 第三阶段:58 $^{\circ}$ C退火15s,及72 $^{\circ}$ C延伸45s,然后采集荧光数据;

[0114] 重复第二阶段、第三阶段,共40cycles;

[0115] 5. qPCR扩增完成后,通过仪器分析模块对数据进行自动分析处理;结果如图1和图2所示,图中的待测模板的浓度为 5.6×10^6 、 5.6×10^5 、 5.6×10^4 、 5.6×10^3 、 5.6×10^2 、 5.6×10^1 、 5.6×10^0 ;商用染料的浓度均为最佳工作浓度。

[0116] 结果:从图1和图2可以看出:

[0117] 从图1可知:本发明AIE荧光分子与商用染料 (EvaGreen、LC Green、SYTO 9、SYBR Green) 相比,其灵敏度最低可低至5.6个拷贝,同LC Green一致,其余商用染料均只能到56个拷贝;式I的灵敏度为5.6个拷贝,式II也为5.6个拷贝,式III为56个拷贝,式IV为560个拷贝;其相对应的r值分别为:式I为0.992;式II为0.993;式III为0.996;式IV为0.992;

EvaGreen为0.991;LC Green为0.972;SYTO 9为0.992;SYBR Green为0.995;

[0118] 从图2可知:对照组的AIE荧光分子中,式V无扩增,式VI的灵敏度只能到560个拷贝,式VII的灵敏度也能到5.6个拷贝、式VIII显示无扩增;其相对应的r值分别为:式VI为0.983;式VII为0.988;

[0119] (三) 本发明AIE荧光分子在高分辨率溶解曲线分析中应用于多重测试的具体实验方法如下:

[0120] 1. 构建六组质粒,其分别为XZ质粒、LZ质粒、AF2质粒、rtxA质粒、3a质粒、ProGRP质粒,同时在体系中加入λDNA基因组进行七重扩增检测;

[0121] 2. 针对以上七个靶标分别设计引物,在引物设计时的重点在于,其溶解曲线的T_m值能相互区分开;靶标与其引物分别为:

[0122] 腺状病毒质粒(XZ质粒):

[0123] gcaataacaatggcaatattagcaccaattcttggcataatcttcttgtgcttcatggaagactctaatatgtgagccagatacgtggtcttattgctacagcagtattaatt

[0124] gctggtgggcacgcctgtttgacactcacaggcacaaccacgtcattatgttgtcactactaacttgtaggttcatacgtatggcaacagt

[0125] XZ正向引物:GGCAATATTAGCACCAATTC

[0126] XZ反向引物:AGTCTTCCATGAAGCACAA

[0127] 轮状病毒质粒(LZ质粒):

[0128] aaatgaatcgtcttctacaacgtcaactctttctggaaaatctattggtaggagtgaacagtacatttcaccggatgcagaggcattcaataagtagcatgttgtcgaagtct

[0129] ccagaggatattggaccatctgattctgcttcaaacgatccactcaccagcttttcgattagatcgaa tgcagttaagacaaatgcagacgctggc

[0130] LZ正向引物:GCAGAGGCATTCAATAAGTA

[0131] LZ反向引物:GAATCAGATGGTCCAATATCC

[0132] AF2质粒:

[0133] AAGGTCAGAGAACTAGATATTGGGGAAGAGTTCTGGGATACATGTGCAGAAGCTGCAAGTTTGT TAC ACAGGTATACATGTGCTGTGGTGGTTTGCTGCA

[0134] AF2正向引物:AAGGTCAGAGAACTAGATATT

[0135] AF2反向引物:TGCAGCAAACCACCACAGCA

[0136] rtxA质粒:

[0137] GGTGCCGCGAACAGCATCAGTTCACGCGTTGAGACAGGTAACATCACCTTCCGTGGCGCAGGTGCG

[0138] GATAACCATTTAGTCCGTAAAGGCAAAGTGGGCGATATTACTCTGCAAGGTGCTGGGGCTTCAAACC

[0139] GCATTGAGCGGACACATCAGGCCGAAGATGTCTACACGCAAACCCGCGGCAATAT

[0140] rtxA正向引物VCF:CACGCGTTGAGACAGGTAACATCAC

[0141] rtxA反向引物VCR:CAGCACCTTGCAGAGTAATATCGCC

[0142] 3a质粒:

[0143] ATTCTTGGGAAAATTCAGATGATAGCCGTAATAAATTGTGCGAAAATACCTTCAACACCCAAATTAATAC

[0144] CAAAAGTTACCAAAACTGCAGACAAGCATAAAGATGTCATCATCAACCAAGTGTAACCGCGGAAGCA

[0145] CCAGGAGCTGCAAGCCATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCTGAGTACAAGCTGAGCAAGCTCCGCAC

[0146] CTCGACCATCATGACCGACTACAAC

[0147] 3a正向引物:GCAGACAAGCATAAAGATGT

[0148] 3a反向引物:TGTAGTCGGTCATGATGGT

[0149] ProGRP质粒:

[0150] TATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCCGCCACCATGCTGCTGGTCAACCAGTCCCACCAGGGCTTCAACAAGGAGCACACCAGCAAGATGGTCAGCGCTATTGTGCTGTACGTGCTGCTGGCCGCCGCGCTCACTCCGCTTCGCTCATCACCACCACCACCATAGCACTGGTGAGAGCAGCAGCGTGAGCGAGCGTGGCTCCCTGAAGCAGCAGCTGCGCGAGTACATCCGTTGGGAGGAGGCCGCTCGTAACCTGCTGGGTCTGATCGAGGCCAAGGAGAACCGCAACCACCAGCCCCCTCAGCCTAAGGCTCTGGGTAACCAGCAGCCTAGCTGGGACAGCGAGGACTCCTCCAACCTCAAGGACTGGTCCCACCCCCAGTTCGAAAAGTAAAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGProGRP正向引物:TATTCCGGATTATTCATACC

[0151] ProGRP反向引物:CCTCTACAAATGTGGTATGG

[0152] λDNA基因组(购买自Takara)

[0153] λDNA正向引物:AACGTCTCTTCAGGCCACTG

[0154] λDNA反向引物:TGCTTATAACGCCGATTGC

[0155] 3. 构建qPCR反应体系:将几组质粒模板制备成相同的模板量(5.6×10^5),并将上述引物,在探索引物浓度后,找到各自对应的最佳引物浓度,分别为80nM-150nM(在多重检测时不同靶标对应不同浓度,XZ质粒的引物浓度为80nM、LZ质粒的引物浓度为80nM、AF2质粒的引物浓度为150nM、rtxA质粒的引物浓度为80nM、3a质粒的引物浓度为150nM、ProGRP质粒的引物浓度为80nM、λDNA的引物浓度为150nM),连同PCR master mix和相对应的商用染料,或实验组或对照组的AIE荧光染料加入到同一个体系中,并进行实时荧光定量PCR反应和高分辨率熔解曲线分析。

[0156] qPCR反应体系的建立,反应体系共20μL,参考下表添加各试剂。

[0157] 表2qPCR反应体系

	试剂	浓度
	2×PCR master mix	1×
	正向引物	80-150 nM
[0158]	反向引物	80-150 nM
	模板	5.6×10^5
	商用染料/实验染料及对照染料	1×/3μM
	水	加水补齐至 20 μL

[0159] 4. qPCR反应及高分辨率熔解曲线分析

[0160] 采用三步法qPCR反应程序,

[0161] 第一阶段:95℃预变性5min;

[0162] 第二阶段:95℃变性15s;

[0163] 第三阶段:58℃退火15s,及72℃延伸45s;

[0164] 重复第二阶段、第三阶段,共40cycles;

[0165] 第四阶段:扩增产物熔解曲线信息自动采集,程序设计为95℃下反应15s,在60℃反应1min,以0.025℃/s的速率升至95℃反应1s,并采集荧光信号。

[0166] 5.完成后,通过分析模块对数据进行分析处理;

[0167] 结果如图3和图4所示。图3显示实验组AIE荧光分子式I有7个很明显的峰(可通过峰的数量进行判断),并且和单重熔解峰的位置可以对应上(对应T_m值数据如表3所示),说明式I可进行七重扩增;式II和式III有六个峰,说明有一个质粒没有被扩增出来(单重可检,多重不可检出),能做到六重检测;相对应的式IV的结果显示只能进行五重扩增;而商用染料EvaGreen、LC Green、SYTO 9均只能进行五重扩增;SYBR Green无法进行多重扩增(结果未展示)。图4显示对照组染料分子中,式VI只能进行双重扩增,式VII只能进行四重扩增;式V和VIII由于在实施例1中显示无扩增曲线,因此,未进行多重测试。表明式I和式II均扩增重数比商用染料多1-2重。

[0168] 表3

[0169]

		XZ 质粒	LZ 质粒	AF2 质粒	RtxA	3a	λ DNA	ProGRP
EvaGreen	单重	73.42	75.81	81.20	82.94	84.90	87.10	90.13
	多重	/	76.10	81.47	83.02	84.95	87.03	/
LC Green	单重	72.95	75.53	80.69	82.10	84.31	86.38	89.52
	多重	/	75.65	80.69	82.39	84.32	86.40	/
SYTO 9	单重	73.10	75.60	80.71	82.38	83.95	86.13	89.54
	多重	/	75.65	80.66	82.44	84.34	86.30	/
式IV	单重	74.10	76.90	81.65	82.60	85.13	85.90	89.10
	多重	/	76.93	81.56	82.68	85.13	/	88.64
式III	单重	73.80	76.98	81.33	82.68	85.10	85.88	90.13
	多重	73.80	/	81.10	82.65	84.95	85.96	89.86
式II	单重	73.54	76.33	81.20	82.54	84.78	85.93	90.12
	多重	/	76.03	80.76	82.26	84.78	85.82	89.45

[0170]

式I	单重	73.36	75.68	80.88	81.98	85.10	85.80	89.98
	多重	73.35	75.52	80.57	82.19	84.90	85.89	89.46

[0171] (四) 本发明AIE荧光分子在高分辨率溶解曲线分析中应用于基因分型测试的具体实验方法如下:

[0172] 1.为了确定在最优条件下进行比对各个染料对基因分型检测的能力,购买了ThermoFisher的MeltDoctor HRM阳性对照试剂盒(内含等位基因A DNA(20×)、等位基因G DNA(20×)、等位基因A/G DNA(20×)、引物混合物(20×))进行测试。

[0173] 2.qPCR反应体系及引物和模板浓度均参照制造厂商建议的条件,各个商用染料所用浓度也参照制造厂商建议的条件,实验组AIE荧光分子均使用3μM浓度。

[0174] 对AIE荧光分子(式I、式II、式III)进行基因分型测试,同时采用商用染料(EvaGreen、LC Green、SYTO 9)进行对照,结果如图5所示。图5显示实验组AIE荧光分子式I和式II均可以对等位基因A DNA、等位基因G DNA进行明显区分,式I的区分效果更好一些;式III无法区分;商用染料LC Green、SYTO 9区分效果同式I和式II一致;商用染料EvaGreen的效果相对来说差一些;表明式I和式II荧光分子完全可以用于基因分型的研究,并且具有较好的效果。

[0175] (五) 本发明AIE荧光分子在qPCR扩增中应用于抗抑制剂能力测试的具体实验方法如下:

[0176] 1.以未经提取纯化核酸的粗样本作为模板,粗样本中含有对qPCR具有抑制作用的血红蛋白、抗凝剂、免疫球蛋白、腐殖酸等物质,并且该qPCR反应体系中由于含有促进样本

裂解的表面活性剂,表面活性剂也会对qPCR产生一定程度的抑制作用,为了验证各个染料分子对抗这些物质的能力,选取了纯化处理的咽拭子样本、只进行粗提取的咽拭子样本,以及未经任何提取的样本进行血液直扩。

[0177] 2.设计与人基因组中待测片段(CFTR基因)互补的正向引物和反向引物;

[0178] CFTR正向引物:ACTTGAGTGCTGTAGGGGAG

[0179] CFTR反向引物:GACTTCATGGGGTCGAGTTG

[0180] 3.同时准备用不同方式处理的样本:1)用核酸提取试剂盒(产品型号:MNFSH-030)对人咽拭子进行提取纯化处理的样本;2)同步对人咽拭子进行初步裂解处理的样本(粗提取的咽拭子样本);3)以及未进行任何处理的血液样本;

[0181] 4.构建qPCR反应体系:向体系中加入反应所需物质,分别包括不同方式处理的样本、正向引物和反向引物、本发明AIE荧光染料、Taq酶-GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)及对应的PCR buffer、MgCl₂、dNTPs,最终体系为25μL;参考下表添加各试剂。

[0182] 表4qPCR反应体系

[0183]	试剂	浓度
	正向引物	400nM
	反向引物	400 nM
	Taq 酶	5U/ μ L
	PCR buffer	1×
	25mM MgCl ₂	2.5mM
	10mM dNTPs	0.25mM
	待测样本	/
	商用染料/实验染料及对照染料	1× /1μM
	水	加水补齐至 25 μ L

[0184] 5.待qPCR反应体系准备完后,置于PCR仪中,设置相应的程序进行反应;

[0185] 采用三步法qPCR反应程序,

[0186] 第一阶段:95℃预变性5min;

[0187] 第二阶段:95℃变性15s;

[0188] 第三阶段:60℃退火15s,及72℃延伸45s,然后采集荧光数据;

[0189] 重复第二阶段、第三阶段,共40cycles;

[0190] 6.qPCR扩增完成后,通过分析模块对数据进行分析处理;

[0191] 对AIE荧光分子(式I、式II、式III)进行抗抑制剂能力测试,同时采用商用染料(EvaGreen、LC Green、SYTO 9、SYBR Green)取代AIE荧光染料分子做相同的实验分析进行对照,结果如图6所示;

[0192] 从图6可知,实验组AIE荧光分子式I和式II在检测粗提取样本中,与纯化样本相比较,其ΔCt很小,而商用染料的ΔCt值均较大,粗提取样本和纯化样本差异(ΔCt)越小,抗抑制剂的能力越强;说明式I和式II的抗抑制剂能力较强,而商用染料LC Green、EvaGreen、SYBR Green、SYTO 9相对较差;进一步对血液直扩的样本进行分析,式I和式II,以及SYBR Green分子的Ct值相当,SYTO 9分子的Ct值明显增加,而EvaGreen和LC Green完全无扩增;说明式I和式II,以及SYBR Green分子可以实现血液样本直扩,具有很强的抗抑制剂的能力;而SYTO 9抗抑制剂的能力较差;EvaGreen和LC Green完全无法用于血液样本的直扩;式

III的 ΔCt 较SYBR Green相当,比SYTO 9小,可对血液样本进行直扩检测。

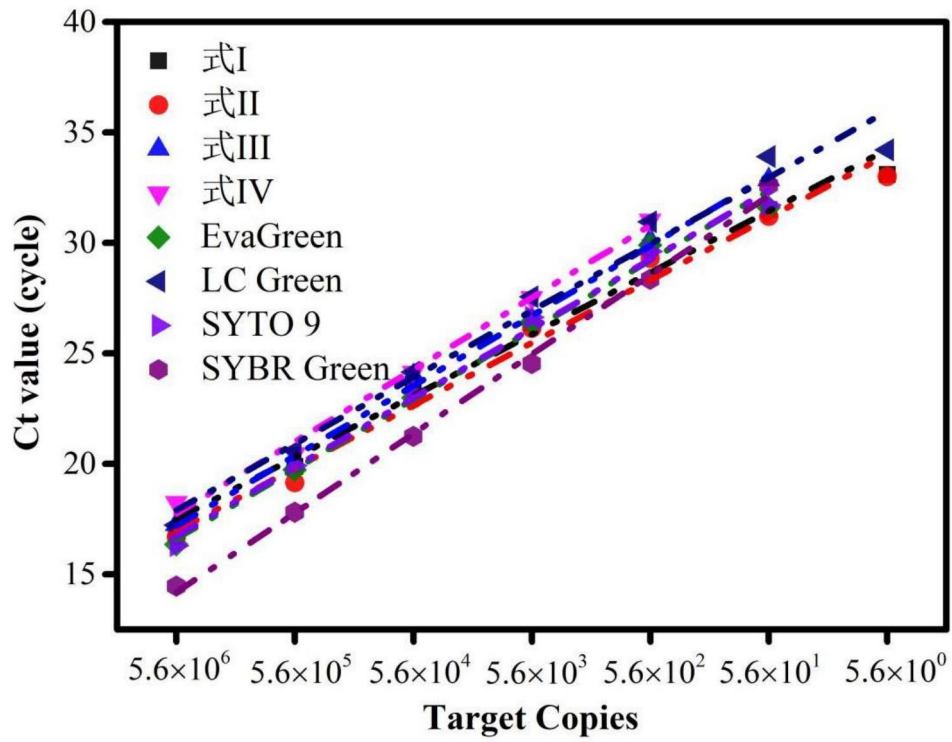


图1

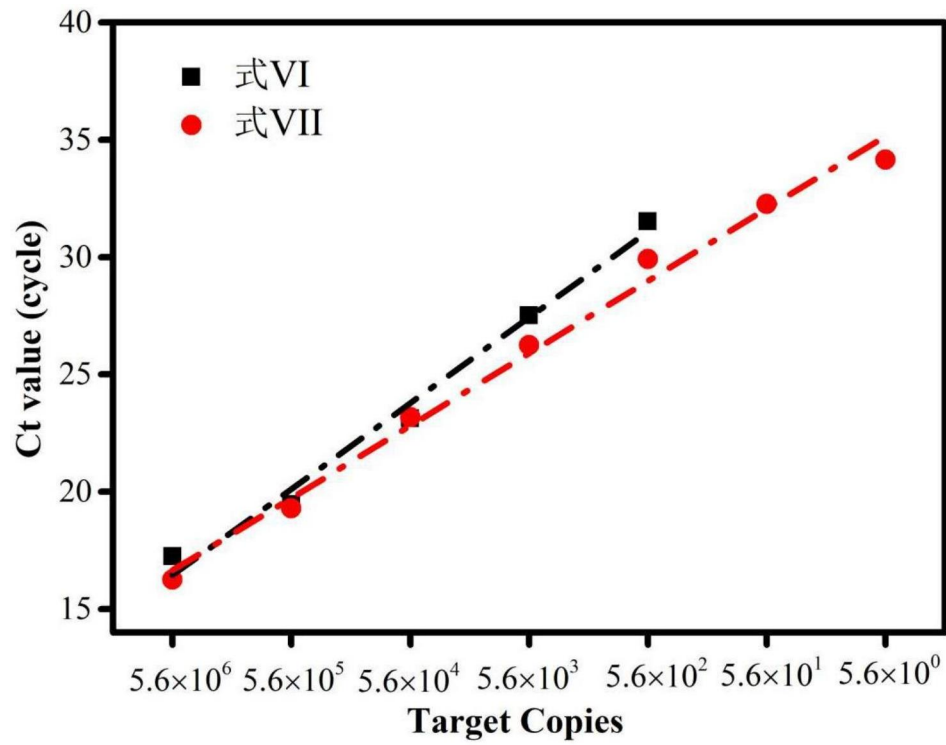


图2

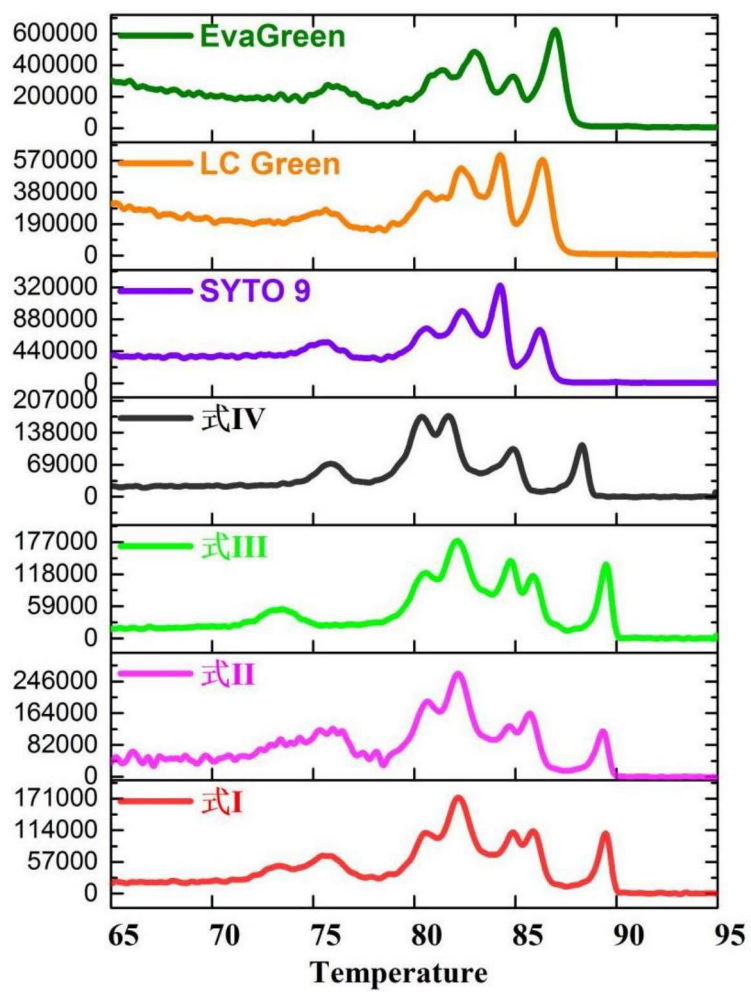


图3

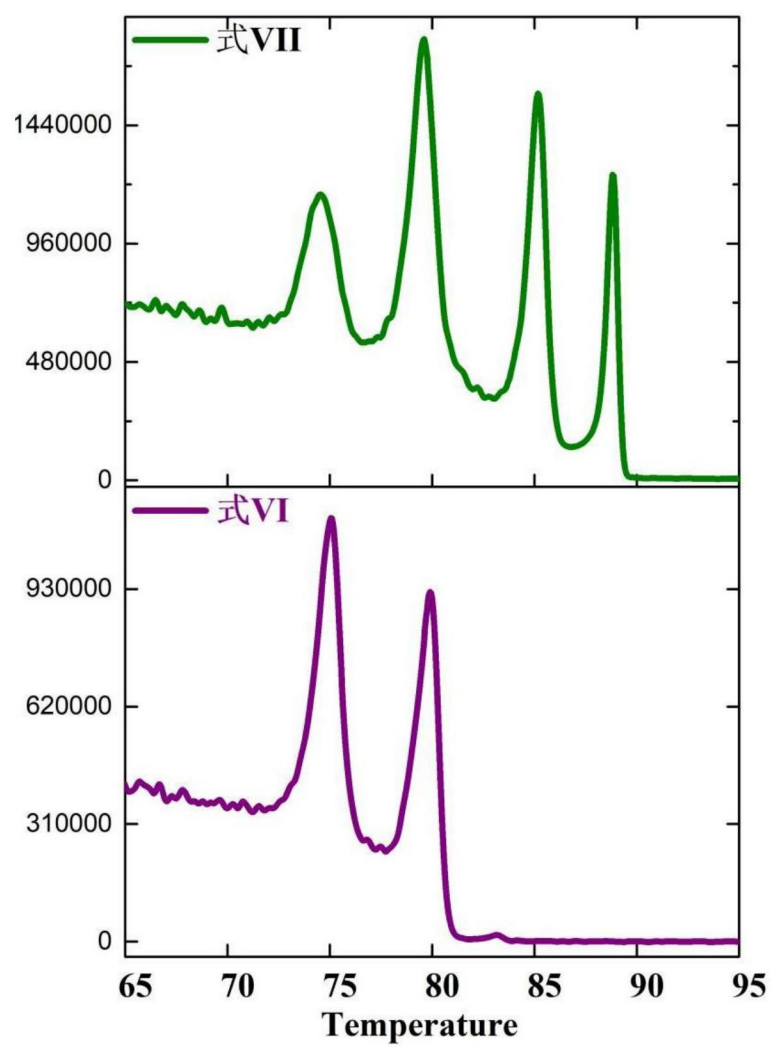


图4

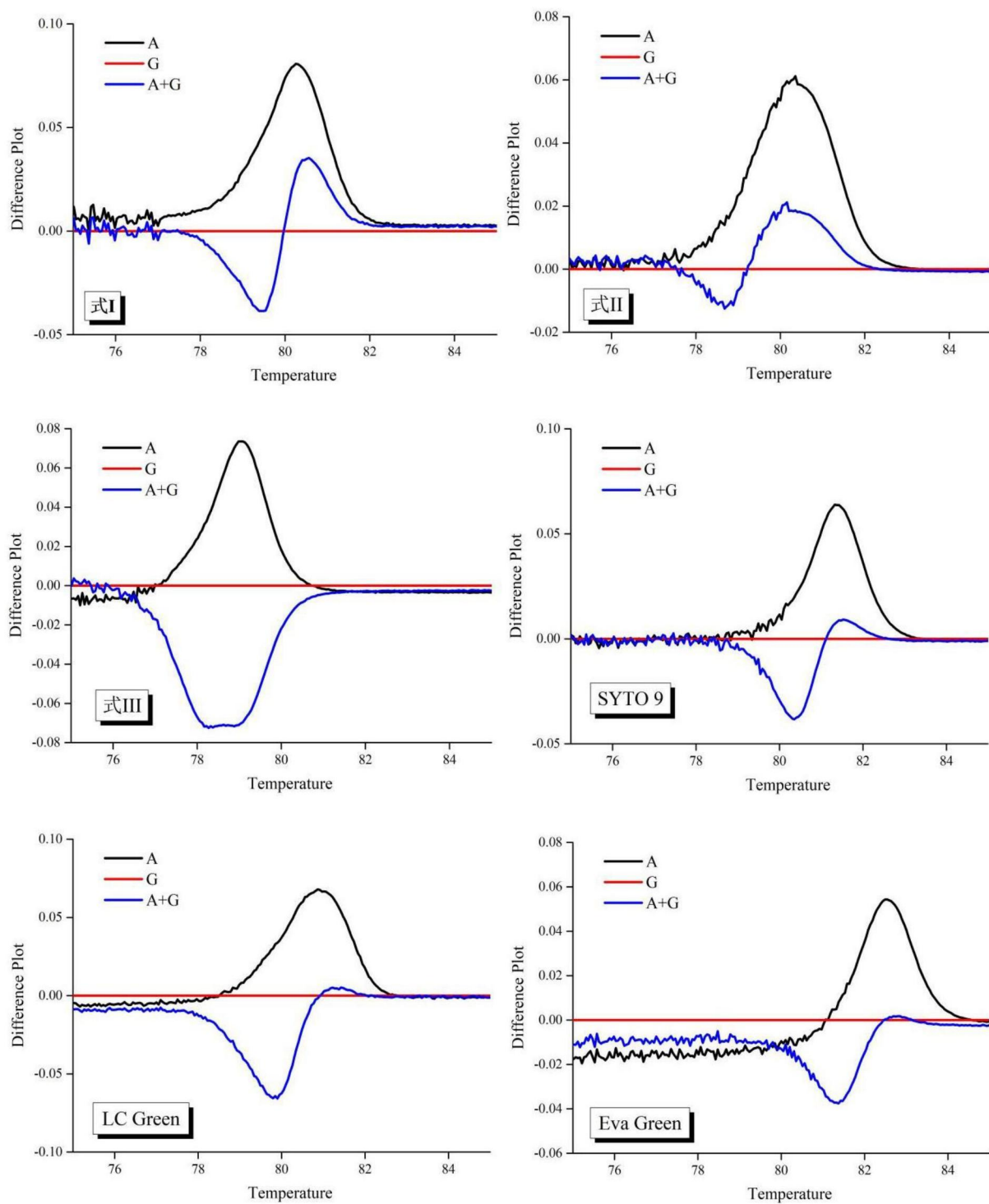


图5

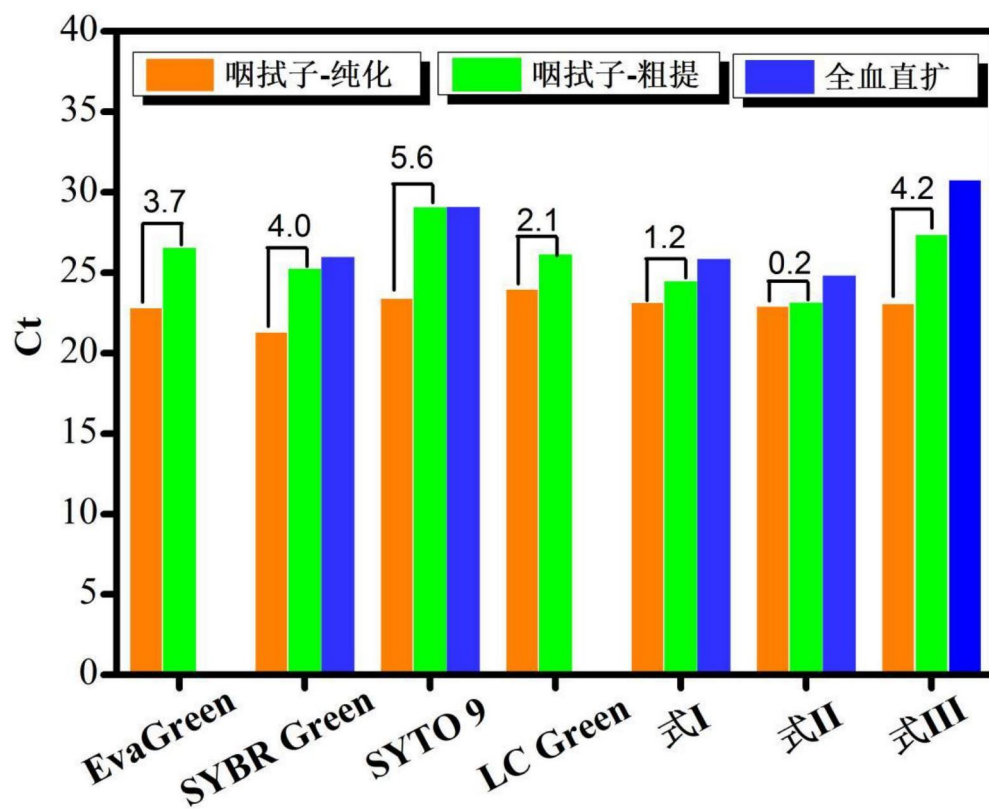


图6