



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116790721 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202310794720.9

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2023.06.30

(71) 申请人 苏州德运康瑞生物科技有限公司

地址 215200 江苏省苏州市吴江经济技术开发区联杨路南侧、龙桥路西侧(联杨路139号)

(72) 发明人 刘丹 黄若兰 方星 岳晨思荣

王莹 蔡小鑫 林婕 顾志鹏

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理

有限公司 11250

专利代理师 赵瑞鹏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6816 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

权利要求书2页 说明书21页

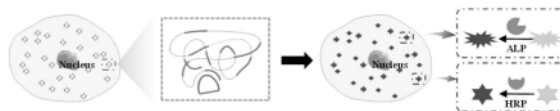
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

一种基于双重显色的核酸检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于双重显色的核酸检测试剂盒及其应用,属于生物检测技术领域。本发明提供了一种核酸检测试剂盒,基于双重RNA原位显色原理,首先设计两条锁式探针分别与固定的细胞或者组织样本中的目标RNA靶序列进行杂交,接着通过连接酶将锁式探针环化,经过滚环扩增后得到扩增产物,将两种不同的检测探针与扩增产物杂交,并且分别加入两种不同的底物,ALP催化萘酚水解产物与固红发生反应,产生红色的沉淀,HRP催化底物二氨基联苯胺产生棕色沉淀,两种颜色的信号点易于区分,在光学显微镜下即可观察到,即所述核酸检测试剂盒能够以单细胞分辨率对两个基因的mRNA进行高选择性和灵敏的单分子检测,并在光学显微镜下可以直接观察。



1. 一种基于双重显色的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述核酸检测试剂盒包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂和第二显色试剂;所述锁式探针杂交试剂包括第一锁式探针组和第二锁式探针组;所述第一锁式探针组和第二锁式探针组能够分别与第一靶标核酸和第二靶标核酸特异性结合,形成第一杂合体和第二杂合体;所述锁式探针环化试剂用于将第一杂合体和第二杂合体环化,形成第一环化产物和第二环化产物;所述滚环扩增引物杂交试剂包括滚环扩增引物组;所述滚环扩增引物组包括第一扩增引物和第二扩增引物;所述第一扩增引物和第二扩增引物能够分别与第一环化产物和第二环化产物特异性结合,进而引发以第一环化产物和第二环化产物为模板的滚环扩增;所述滚环扩增试剂用于将第一环化产物和第二环化产物滚环扩增,形成第一环状扩增产物和第二环状扩增产物;所述第一检测探针和第二检测探针能够分别与第一环状扩增产物和第二环状扩增产物特异性结合,并且,所述第一检测探针和第二检测探针上分别偶联有第一标记物和第二标记物;所述第一显色试剂和第二显色试剂能够分别与第一标记物和第二标记物发生显色反应。

2. 如权利要求1所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述核酸检测试剂盒还包括染色剂以及封片剂;所述封片剂为水溶性封片剂。

3. 如权利要求1或2所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述第一标记物和第二标记物分别为第一显色酶和第二显色酶,所述第一显色试剂包含第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶的显色底物;

或者,所述第一标记物为第一显色酶,所述第二标记物为偶联中间体,所述偶联中间体用于将第二显色酶偶联在第二检测探针上,所述第一显色试剂包含第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶以及第二显色酶的显色底物;

或者,所述第一标记物为偶联中间体,所述第二标记物为第二显色酶,所述偶联中间体用于将第一显色酶偶联在第一检测探针上,所述第一显色试剂包含第一显色酶以及第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶的显色底物。

4. 如权利要求3所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述第一显色酶为碱性磷酸酶;所述第一显色酶的显色底物包括固红和萘酚;所述第二显色酶为辣根过氧化物酶;所述第二显色酶的显色底物包括二氨基联苯胺。

5. 如权利要求1~3任一项所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述染色剂包括苏木素、美蓝和/或结晶紫。

6. 如权利要求1~4任一项所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述锁式探针环化试剂包括DNA连接酶;所述DNA连接酶能够将第一杂合体和第二杂合体环化,形成第一环化产物和第二环化产物。

7. 如权利要求1~5任一项所述的核酸检测试剂盒,其特征在于,所述滚环扩增试剂包括dNTPs和DNA聚合酶;所述dNTPs能够在DNA聚合酶的作用下进行第一环化产物和第二环化产物的滚环扩增,形成第一环状扩增产物和第二环状扩增产物。

8. 一种基于双重显色的核酸检测方法,所述方法非疾病的诊断和治疗目的,其特征在于,所述检测方法使用权利要求1~7任一项所述的核酸检测试剂盒对待测样本进行检测。

9. 如权利要求7所述的核酸检测方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

透化步骤:在待测样本上先滴加酸性溶液进行透化孵育,再分别滴加第一显色酶阻断

剂和第二显色酶阻断剂进行阻断孵育；

锁式探针杂交步骤：

在透化步骤所得待测样本上滴加锁式探针杂交试剂进行孵育；

锁式探针环化步骤：

在锁式探针杂交步骤所得待测样本上滴加锁式探针环化试剂进行孵育；

滚环扩增引物杂交步骤：

在锁式探针环化步骤所得待测样本上滴加滚环扩增引物杂交试剂进行孵育；

滚环扩增步骤：

在滚环扩增引物杂交步骤所得待测样本上滴加滚环扩增试剂进行孵育；

检测探针杂交步骤：

在滚环扩增步骤所得待测样本上滴加检测探针杂交试剂进行孵育；

显色反应步骤：

在检测探针杂交步骤所得待测样本上分别滴加第一显色试剂和第二显色试剂进行孵育；

染色及封片步骤：

在显色反应步骤所得待测样本上依次滴加染色剂和封片剂后，观察待测样本产生的信号点；根据待测样本产生的信号点对待测样本中的第一靶标核酸和第二靶标核酸进行定量。

10. 权利要求1~7任一项所述的核酸检测试剂盒或权利要求8或9所述的核酸检测方法在靶标核酸检测中的应用，其特征在于，所述应用非疾病的诊断和治疗目的。

一种基于双重显色的核酸检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于双重显色的核酸检测试剂盒及其应用,属于生物检测技术领域。

背景技术

[0002] 由于单细胞成像技术的发展,使得单个RNA分子的亚细胞原位可视化成为可能。目前单分子RNA检测方法基于荧光信号的原位成像技术,例如:单分子荧光原位杂交(SmFISH)、基于支链DNA(bDNA)的技术,滚环扩增(RCA)的方法等。但是荧光检测容易受到光漂白的影响,并且组织中的自发荧光会导致信背比较低。因此酶促显色分析可以作为荧光检测的替代方法,在保留检测特异性和单分子灵敏度的同时,避免自发荧光的产生。此外染色样品在经固定后可以长期保存,并且在普通光学显微镜下即可观察到细胞或组织中目标RNA的空间信息。

[0003] 使用bDNA或者RCA的扩增方法也非常适用于mRNA的显色反应。例如,基于RCA扩增的方法,通过辣根过氧化物酶(HRP)催化底物显色,原位可视化单细胞中单个mRNA。但是使用HRP进行显色反应的RCA扩增方法只能检测到单一靶点,且产生棕色沉淀并不适用于黑色素瘤等黑色素沉着组织。而基于bDNA扩增开发的RNAScope技术,可以做到靶向单细胞中两种不同的mRNA,实现对双重靶标同时检测。但是RNAScope需要结合多个探针,通过多轮杂交来产生可见信号,过程复杂,需要投入大量的成本和劳动力。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供了一种基于双重显色的核酸检测试剂盒,所述核酸检测试剂盒包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂和第二显色试剂;所述锁式探针杂交试剂包括第一锁式探针组和第二锁式探针组;所述第一锁式探针组和第二锁式探针组能够分别与第一靶标核酸和第二靶标核酸特异性结合,形成第一杂合体 and 第二杂合体;所述锁式探针环化试剂用于将第一杂合体和第二杂合体环化,形成第一环化产物和第二环化产物;所述滚环扩增引物杂交试剂包括滚环扩增引物组;所述滚环扩增引物组包括第一扩增引物和第二扩增引物;所述第一扩增引物和第二扩增引物能够分别与第一环化产物和第二环化产物特异性结合,进而引发以第一环化产物和第二环化产物为模板的滚环扩增;所述滚环扩增试剂用于将第一环化产物和第二环化产物滚环扩增,形成第一环状扩增产物和第二环状扩增产物;所述第一检测探针和第二检测探针能够分别与第一环状扩增产物和第二环状扩增产物特异性结合,并且,所述第一检测探针和第二检测探针上分别偶联有第一标记物和第二标记物;所述第一显色试剂和第二显色试剂能够分别与第一标记物和第二标记物发生显色反应。

[0005] 在本发明的一种实施方式中,所述核酸检测试剂盒还包括染色剂以及封片剂;所述封片剂为水溶性封片剂。

[0006] 在本发明的一种实施方式中,所述第一标记物和第二标记物分别为第一显色酶和第二显色酶,所述第一显色试剂包含第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶的显色底物;

[0007] 或者,所述第一标记物为第一显色酶,所述第二标记物为偶联中间体,所述偶联中间体用于将第二显色酶偶联在第二检测探针上,所述第一显色试剂包含第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶以及第二显色酶的显色底物;

[0008] 或者,所述第一标记物为偶联中间体,所述第二标记物为第二显色酶,所述偶联中间体用于将第一显色酶偶联在第一检测探针上,所述第一显色试剂包含第一显色酶以及第一显色酶的显色底物,所述第二显色试剂包含第二显色酶的显色底物。

[0009] 在本发明的一种实施方式中,所述第一显色酶为碱性磷酸酶(ALP);所述第一显色酶的显色底物包括固红(FASTRED)和萘酚(Naphthol);所述第二显色酶为辣根过氧化物酶(HRP);所述第二显色酶的显色底物包括二氨基联苯胺(DAB)。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述染色剂包括苏木素、美蓝和/或结晶紫。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述锁式探针环化试剂包括DNA连接酶;所述DNA连接酶能够将第一杂合体 and 第二杂合体环化,形成第一环化产物和第二环化产物。

[0012] 在本发明的一种实施方式中,所述DNA连接酶为SplintR连接酶。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,所述滚环扩增试剂包括dNTPs和DNA聚合酶;所述dNTPs能够在DNA聚合酶的作用下进行第一环化产物和第二环化产物的滚环扩增,形成第一环状扩增产物和第二环状扩增产物。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述DNA聚合酶为Phi29聚合酶。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,所述偶联中间体为生物素和/或链霉亲和素。

[0016] 在本发明的一种实施方式中,所述锁式探针杂交试剂中,第一锁式探针组的浓度为0.1~0.5 μ M,第二锁式探针组的浓度为0.1~0.5 μ M。

[0017] 在本发明的一种实施方式中,所述锁式探针环化试剂中,DNA连接酶的浓度为0.2~1U/ μ L。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,所述滚环扩增引物杂交试剂中,滚环扩增引物组的浓度为0.1~0.5 μ M。

[0019] 在本发明的一种实施方式中,所述滚环扩增试剂中,dNTPs的浓度为0.5~2mM,DNA聚合酶的浓度为0.5~2U/ μ L。

[0020] 在本发明的一种实施方式中,所述检测探针杂交试剂中,第一检测探针的浓度为0.1~0.5 μ M,第二检测探针的浓度为0.1~0.5 μ M。

[0021] 在本发明的一种实施方式中,所述第一显色试剂中,第一显色酶的浓度为1~5 μ M。

[0022] 在本发明的一种实施方式中,所述第二显色试剂中,第二显色酶通过偶联中间体偶联在第二检测探针上,浓度为0.1~0.5 μ M。

[0023] 在本发明的一种实施方式中,所述偶联中间体包括生物素和/或链霉亲和素。

[0024] 本发明还提供了一种基于双重显色的核酸检测方法,所述方法非疾病的诊断和治疗目的,所述检测方法使用上述核酸检测试剂盒对待测样本进行检测。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0026] 透化步骤:在待测样本上先滴加酸性溶液进行透化孵育,再分别滴加第一显色酶

阻断剂和第二显色酶阻断剂进行阻断孵育；

[0027] 锁式探针杂交步骤：

[0028] 在透化步骤所得待测样本上滴加锁式探针杂交试剂进行孵育；

[0029] 锁式探针环化步骤：

[0030] 在锁式探针杂交步骤所得待测样本上滴加锁式探针环化试剂进行孵育；

[0031] 滚环扩增引物杂交步骤：

[0032] 在锁式探针环化步骤所得待测样本上滴加滚环扩增引物杂交试剂进行孵育；

[0033] 滚环扩增步骤：

[0034] 在滚环扩增引物杂交步骤所得待测样本上滴加滚环扩增试剂进行孵育；

[0035] 检测探针杂交步骤：

[0036] 在滚环扩增步骤所得待测样本上滴加检测探针杂交试剂进行孵育；

[0037] 显色反应步骤：

[0038] 在检测探针杂交步骤所得待测样本上分别滴加第一显色试剂和第二显色试剂进行孵育；

[0039] 染色及封片步骤：

[0040] 在显色反应步骤所得待测样本上依次滴加染色剂和封片剂后，观察待测样本产生的信号点；根据待测样本产生的信号点对待测样本中的第一靶标核酸和第二靶标核酸进行定量。

[0041] 在本发明的一种实施方式中，透化步骤中，滴加酸性溶液后的透化孵育时间为10～15min。

[0042] 在本发明的一种实施方式中，透化步骤中，滴加酸性溶液后的透化孵育时间为10min。

[0043] 在本发明的一种实施方式中，所述酸性溶液包括盐酸。

[0044] 在本发明的一种实施方式中，所述酸性溶液为浓度0.05～2M的盐酸。

[0045] 在本发明的一种实施方式中，所述染色及封片步骤为：在显色反应步骤所得待测样本上先滴加染色剂进行染色，再滴加封片剂进行烤干后，观察待测样本产生的信号点；根据待测样本产生的信号点对待测样本中的第一靶标核酸和第二靶标核酸进行定量。

[0046] 在本发明的一种实施方式中，所述染色及封片步骤为：在显色反应步骤所得待测样本上先滴加染色剂进行染色，再滴加封片剂进行烤干后，通过光学显微镜观察待测样本产生的信号点；通过CellProfiler或Qupath软件根据待测样本产生的信号点对待测样本中的第一靶标核酸和第二靶标核酸进行定量分析。

[0047] 本发明还提供了上述核酸检测试剂盒或上述核酸检测方法在靶标核酸检测中的应用，所述应用非疾病的诊断和治疗目的。

[0048] 本发明技术方案，具有如下优点：

[0049] 本发明提供了一种基于双重显色的核酸检测试剂盒，所述核酸检测试剂盒包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂和第二显色试剂；所述锁式探针杂交试剂包括第一锁式探针组和第二锁式探针组；所述第一锁式探针组和第二锁式探针组能够分别与第一靶标核酸和第二靶标核酸特异性结合，形成第一杂合体和第二杂合体；所述锁式探针环化试剂用于将第一杂

合体和第二杂合体环化,形成第一环化产物和第二环化产物;所述滚环扩增引物杂交试剂包括滚环扩增引物组;所述滚环扩增引物组能够与第一环化产物和第二环化产物特异性结合,进而引发以第一环化产物和第二环化产物为模板的滚环扩增;所述滚环扩增试剂用于将第一环化产物和第二环化产物滚环扩增,形成第一环状扩增产物和第二环状扩增产物;所述第一检测探针和第二检测探针能够分别与第一环状扩增产物和第二环状扩增产物特异性结合,并且,所述第一检测探针和第二检测探针上分别偶联有第一标记物和第二标记物;所述第一显色试剂和第二显色试剂能够分别与第一标记物和第二标记物发生显色反应。所述核酸检测试剂盒基于双重RNA原位显色原理,首先设计两条锁式探针分别与固定的细胞或者组织样本中的目标RNA靶序列进行杂交,接着通过连接酶将锁式探针环化,经过滚环扩增后得到扩增产物,将两种不同的检测探针与扩增产物杂交,并且分别加入两种不同的底物,ALP催化萘酚水解产物与固红发生反应,产生红色的沉淀,HRP催化底物二氨基联苯胺产生棕色沉淀,两种颜色的信号点易于区分,在光学显微镜下即可观察到,即所述核酸检测试剂盒能够以单细胞分辨率对两个基因的mRNA进行高选择性和灵敏的单分子检测,并且在光学显微镜下可以直接观察。研究表明,使用所述核酸检测试剂盒可以在小鼠嗅球组织中检测到颜色分层的Doc2g(肾小球层)、Penk(颗粒细胞层)基因,区域性效果很好,并且,可以在宫颈腺癌组织中实现HPV18E6/E7、MKI67基因共定位,相比于检测P16^{INK4A}、KI67蛋白的常规免疫组化,使用所述核酸检测试剂盒的HPV18E6/E7、MKI67基因双重检测显示出更好的特异性和更高的灵敏度。因此,所述核酸检测试剂盒可以应用于量化单细胞和多种细胞类型中原位检测两个基因的mRNA表达。

[0050] 进一步地,所述核酸检测试剂盒基于碱性磷酸酶(ALP)和辣根过氧化物酶(HRP)的双重RNA原位显色原理,碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶经显色反应后的两种颜色的信号点易于区分,在光学显微镜下能够很容易的观察和分辨。

[0051] 进一步地,使用所述核酸检测试剂盒进行靶标核酸检测时,选择在盐酸透化后进行内源性阻断,并将透化时间控制为10min,此透化时间下信号点达到饱和且不至于胞内杂质颗粒流出。

[0052] 进一步地,使用所述核酸检测试剂盒进行靶标核酸检测时,在滴加水溶性封片剂后烤干,这种封片方式检测效果最佳。

[0053] 进一步地,以HPV18E6/E7基因的mRNA为第一靶标核酸,以MKI67基因的mRNA为第二靶标核酸时,所述第一锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.12、13、16所示的PLP-MKI67-1、PLP-MKI67-2和/或PLP-MKI67-5组成,所述第二锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.21~23所示的PLP-HPV18E7-1、PLP-HPV18E7-2和/或PLP-HPV18E7-3组成,此锁式探针下对MKI67和HPV基因的检测性能最佳。

[0054] 进一步地,所述核酸检测试剂盒进行核酸检测时,将碱性磷酸酶浓度控制在2 μ M,此酶浓度下催化底物显色效果达到最佳。

附图说明

[0055] 图1:核酸检测试剂盒的检测原理图。

[0056] 图2:定量分析不同盐酸透化时长下的结果图。

[0057] 图3:定量分析不同内源性酶阻断条件下的结果图。

- [0058] 图4:定量分析不同锁式探针浓度下的结果图。
- [0059] 图5:定量分析不同碱性磷酸酶浓度下的结果图。
- [0060] 图6:基于碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶方法的检测效率对比结果。图6中,(a)为ALP组在A549细胞系中检测PPIB的结果;(b)为HRP组在A549细胞系中检测PPIB的结果。
- [0061] 图7:定量分析ALP和HRP检测PPIB的检测效率对比图。
- [0062] 图8:定量分析HPV18E6/E7锁式探针筛选结果图。
- [0063] 图9:定量分析MKI67锁式探针筛选结果图。
- [0064] 图10:核酸检测试剂盒准确性验证的结果。图10中,(a)为ALP+HRP组在HeLa细胞系中检测HPV18E6/E7和MKI67的结果;(b)为HRP组在HeLa细胞系中检测HPV18E6/E7的结果;(c)为ALP组在HeLa细胞系中检测MKI67结果。
- [0065] 图11:定量分析ALP检测HPV18E6/E7、HRP检测MKI67以及ALP和HRP双重检测HPV18E6/E7和MKI67的结果图。
- [0066] 图12:核酸检测试剂盒实现对HPV18E6/E7和MKI67mRNA在宫颈腺癌上皮中的共定位的结果。图12中,(a)为HRP组在宫颈腺癌组织中检测HPV18E6/E7的结果;(b)为ALP组在宫颈腺癌组织中检测MKI67的结果;(c)为ALP+HRP组在宫颈腺癌组织中检测HPV18E6/E7和MKI67的结果。
- [0067] 图13:核酸检测试剂盒实现对已知位置标记基因Doc2g(肾小球层)和penk(颗粒细胞层)在小鼠嗅球组织中的区域性展示的结果。图13中,(a)的比例尺为200 μ m;(b)的比例尺为120 μ m;(c)的比例尺为20 μ m。
- [0068] 图14:封片后烤干和未烤干的结果图。

具体实施方式

[0069] 提供下述实施例是为了更好地理解本发明,并不局限于所述最佳实施方式,不对本发明的内容和保护范围构成限制,任何人在本发明的启示下或是将本发明与其他现有技术的特征进行组合而得出的任何与本发明相同或相近似的产品,均落在本发明的保护范围之内。

[0070] 下述实施例中未注明具体实验步骤或条件者,按照本领域内的文献所描述的常规实验步骤的操作或条件即可进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规试剂产品。

[0071] 实验例1:盐酸透化时长对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0072] 本实施例提供了盐酸透化时长对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0073] 1、核酸检测试剂盒的配置

[0074] 以HER2基因的mRNA为靶标核酸,配置基于碱性磷酸酶的单显色核酸检测试剂盒(检测原理图见图1)进行实验,所述核酸检测试剂盒包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物(RCA引物)杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂、苏木素和水溶性封片剂(通灵生物);

[0075] 所述锁式探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20%(v/v)甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一锁式探针组和20 μ LDEPC水组成;所述第一锁式探针组由核苷

酸序列如SEQ ID NO.1所示的PLP-HER2组成；

[0076] 所述锁式探针环化试剂(50 μ L)由含5 μ L10 $\times$ SplintR连接酶反应缓冲液(NEB)、31.25 μ L浓度为80% (v/v)的甘油、1 μ L浓度为25U/ μ L的SplintR连接酶(NEB)、1.25 μ L浓度为40U/ μ L的RiboLockRNaseInhibitor(Promega)、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(NEB)和6.5 μ LDEPC水组成；

[0077] 所述滚环扩增引物杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20% (v/v) 甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的滚环扩增引物组和20 μ LDEPC水组成；所述滚环扩增引物组由核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示的第一扩增引物组成；

[0078] 所述滚环扩增试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为50% (v/v)的甘油、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)、5 μ L浓度为10mM的dNTPs(天根)、5 μ L10 $\times$ Phi29DNA聚合酶缓冲液(NEB)、5 μ L浓度为10U/ μ L的Phi29聚合酶(NEB)和25 μ LDEPC水组成；

[0079] 所述检测探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针和20 μ LDEPC水组成；所述第一检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示,并且,所述第一检测探针的5'端修饰有生物素(Biotin)；

[0080] 所述第一显色试剂有第一试剂和第二试剂组成；所述第一试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为20 μ M的链霉亲和素化碱性磷酸酶(ALP,ThermoScientific)、10 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)和35 μ L的DEPC水组成；所述第二试剂为由5 μ L的FASTRedA组分和45 μ L的FASTRedB组成的FASTRED(固红)反应液(通灵生物)。

[0081] 2、靶标核酸的检测

[0082] 细胞爬片步骤：

[0083] 在细胞瓶中将A549细胞(购自广州吉妮欧生物科技有限公司)和SKBR3细胞(国家实验室细胞资源共享平台)以 2×10^6 个/mL的接种量分别接种至均含10% (v/v) 胎牛血清(FBS,UE)和1% (m/v,g/100mL) 双抗SP(碧云天)的DMEM培养基(GIBCO)和RPMI1640培养基(GIBCO)中,于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞培养液；将2mL胰蛋白酶(购自碧云天)添加至细胞培养液中,于37 $^{\circ}$ C孵育1min进行消化,得到细胞悬液；取1mL细胞悬液种板于无菌多聚赖氨酸载玻片(世泰)上后,将无菌多聚赖氨酸的载玻片分别置于添加有15mL均含10% (v/v) 胎牛血清和1% (m/v,g/100mL) 双抗SP的DMEM培养基和RPMI1640培养基的培养皿中,于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞爬片后的载玻片；

[0084] 细胞固定步骤：

[0085] 弃去制作细胞爬片的培养皿中的培养基,加入DEPC-PBS(Biosharp)浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,清洗3次,每次3min后弃去废液；清洗结束后,向培养皿中加入4% (m/v,g/100mL) 多聚甲醛固定液(Paraformaldehyde,PFA)浸没过载玻片,在室温(25 $^{\circ}$ C)下孵育30min进行固定后弃去废液；固定结束后,向培养皿中加入DEPC-PBS浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,洗涤3次,每次3min后弃去废液以终止PFA的固定作用；洗涤结束后,在培养皿中相继加换70% (v/v)、85% (v/v)和100% (v/v)的乙醇水溶液浸没过载玻片,每种乙醇水溶液在室温(25 $^{\circ}$ C)下放置5min后弃去废液以进行脱水；脱水结束后,将载玻片平铺放置在超净工作台上至完全干燥,记录信息和编号,-80 $^{\circ}$ C保存以备用；

[0086] 细胞透化步骤：

[0087] 将A549细胞和SKBR2细胞载玻片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,在A549细胞和SKBR2细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,分别在室温(25℃)下第一次孵育5min、10min、15min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗A549细胞和SKBR2细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,在A549细胞和SKBR2细胞载玻片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温(25℃)下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0088] 锁式探针杂交步骤:

[0089] 在样品载玻片上滴加50μL锁式探针杂交试剂,37℃孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0090] 锁式探针环化步骤:

[0091] 在样品载玻片上滴加50μL锁式探针环化试剂,37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0092] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0093] 在样品载玻片上滴加50μL滚环扩增引物杂交试剂,37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0094] 滚环扩增步骤:

[0095] 在样品载玻片上滴加50μL滚环扩增试剂,37℃反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;

[0096] 检测探针杂交步骤:

[0097] 在样品载玻片上滴加50μL检测探针杂交试剂,37℃第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在载玻片上滴加50μL第一试剂,室温(25℃)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗载玻片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0098] 显色反应步骤:

[0099] 在样品载玻片上滴加50μL第二试剂,室温(25℃)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0100] 染色及封片步骤:

[0101] 在样品载玻片上滴加20μL苏木素(生工),室温(25℃)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在载玻片上滴加20μL水溶性封片剂,在60℃烘箱中烤干,以进行封片。

[0102] 检测步骤:

[0103] 通过CellProfiler软件对不同HCl透化时长下所得样品载玻片上检测到的信号点进行定量分析,结果见图2。

[0104] 3、结果分析

[0105] 通过图2可知,HCl透化时长为10min时的检测效果优于5min,HCl透化时长为15min时的检测效果与10min差别不大,为了提高实验效率并防止透化时间过长导致胞外杂质流出,故选择盐酸透化10min为最佳HCl透化时长。

[0106] 实验例2:内源性酶阻断条件对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0107] 本实施例提供了内源性酶阻断条件对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0108] 1、核酸检测试剂盒的配置

[0109] 参见实验例1的以HER2基因的mRNA为靶标核酸,配置而得的基于碱性磷酸酶的单显色核酸检测试剂盒。

[0110] 2、靶标核酸的检测

[0111] 细胞爬片步骤:

[0112] 在细胞瓶中将SKBR3细胞(国家实验室细胞资源共享平台)以 2×10^6 个/mL的接种量接种至含10% (v/v) 胎牛血清(FBS, UE) 和1% (m/v, g/100mL) 双抗SP(碧云天)的RPMI1640培养基(GIBCO)中,于37℃、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞培养液;将2mL胰蛋白酶(购自碧云天)添加至细胞培养液中,于37℃孵育1min进行消化,得到细胞悬液;取1mL细胞悬液种板于无菌多聚赖氨酸载玻片(世泰)上后,将无菌多聚赖氨酸的载玻片分别置于添加有15mL含10% (v/v) 胎牛血清和1% (m/v, g/100mL) 双抗SP的RPMI1640培养基的培养皿中,于37℃、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞爬片后的载玻片;

[0113] 细胞固定步骤:

[0114] 弃去制作细胞爬片的培养皿中的培养基,加入DEPC-PBS (Biosharp) 浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,清洗3次,每次3min后弃去废液;清洗结束后,向培养皿中加入4% (m/v, g/100mL) 多聚甲醛固定液(Paraformaldehyde, PFA) 浸没过载玻片,在室温(25℃)下孵育30min进行固定后弃去废液;固定结束后,向培养皿中加入DEPC-PBS浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,洗涤3次,每次3min后弃去废液以终止PFA的固定作用;洗涤结束后,在培养皿中相继加换70% (v/v)、85% (v/v) 和100% (v/v) 的乙醇水溶液浸没过载玻片,每种乙醇水溶液在室温(25℃)下放置5min后弃去废液以进行脱水;脱水结束后,将载玻片平铺放置在超净工作台上至完全干燥,记录信息和编号,-80℃保存以备用;

[0115] 细胞透化步骤:

[0116] 将SKBR2细胞载玻片分为在HCl透化后进行内源性酶阻断样品组和在水性内源性酶阻断样品组,将两组的SKBR2细胞载玻片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,在SKBR2细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,在室温(25℃)下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗SKBR2细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,在水性内源性酶阻断的SKBR2细胞载玻片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温(25℃)下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;而HCl透化后进行内源性酶阻断样品组在盐酸透化后不进行任何操作;

[0117] 锁式探针杂交步骤:

[0118] 在两组样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针杂交试剂,37℃孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0119] 锁式探针环化步骤:

[0120] 在两组样品的载玻片上分别滴加50μL锁式探针环化试剂,37℃孵育30min;孵育结

束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0121] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0122] 在两组样品的载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增引物杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0123] 滚环扩增步骤:

[0124] 在两组样品的载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增试剂,37 $^{\circ}$ C反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;清洗结束后,在RCA后进行内源性阻断样品组的载玻片上滴加50 μ L内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;孵育结束后,用TBST清洗非透化组的载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;HCl透化后进行内源性酶阻断样品组在清洗结束后不进行任何操作;

[0125] 检测探针杂交步骤:

[0126] 在两组样品的载玻片上分别滴加50 μ L检测探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在载玻片上滴加50 μ L第一试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗载玻片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0127] 显色反应步骤:

[0128] 在两组样品的载玻片上分别滴加50 μ L第二试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0129] 染色及封片步骤:

[0130] 在两组样品的载玻片上分别滴加20 μ L苏木素(生工),室温(25 $^{\circ}$ C)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在载玻片上滴加20 μ L水溶性封片剂,在60 $^{\circ}$ C烘箱中烤干,以进行封片。

[0131] 检测步骤:

[0132] 通过CellProfiler软件对不同内源性酶阻断条件下所得样品载玻片上检测到的信号点进行定量分析,结果见图3。

[0133] 3、结果分析

[0134] 通过图3可知,HCl透化后阻断的检测效果优于RCA后阻断,为了提高实验效率,故选择HCl透化后阻断。

[0135] 实验例3:锁式探针对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0136] 本实施例提供了锁式探针对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0137] 在实验例2的HCl透化后进行内源性酶阻断样品组的基础上,将锁式探针杂交试剂中第一锁式探针组的浓度由0.2 μ M调整为0 μ M以进行对照实验。通过CellProfiler软件对不同锁式探针浓度下所得样品载玻片上检测到的信号点进行定量分析,结果见图4。

[0138] 通过图4可知,加入0.2 μ M的锁式探针后有明显的信号点出现,而对照组0 μ M的锁式

探针几乎没有信号点,因此证明了锁式探针的杂交性能。

[0139] 实验例4:碱性磷酸酶浓度对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0140] 本实施例提供了碱性磷酸酶浓度对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0141] 在实验例2的HCl透化后进行内源性酶阻断样品组的基础上,将第一试剂(50 μ L)中链霉亲和素化碱性磷酸酶的浓度分别由2 μ M调整为1 μ M、4 μ M以进行对照实验。通过CellProfiler软件对不同碱性磷酸酶浓度下所得样品载玻片上检测到的信号点进行定量分析,结果见图5。

[0142] 通过图5可知,加入2 μ M的碱性磷酸酶催化底物显色效果优于加入1 μ M的碱性磷酸酶,又与4 μ M结果相差不大,为节省试剂选择2 μ M碱性磷酸酶为后续实验条件。

[0143] 实验例5:双重显色的可行性验证

[0144] 本实施例提供了双重显色的可行性验证实验,实验过程如下:

[0145] 1、核酸检测试剂盒的配置

[0146] 以PPIB基因的mRNA为靶标核酸,配置基于碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶的双重显色核酸检测试剂盒(检测原理图见图1)进行实验,所述核酸检测试剂盒包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物(RCA引物)杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂、第二显色试剂、苏木素和水溶性封片剂(通灵生物);

[0147] 所述锁式探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20%(v/v)甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一锁式探针组和20 μ LDEPC水组成;所述第一锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.2~SEQ ID NO.6所示的PLP-PPIB-1、PLP-PPIB-2、PLP-PPIB-3、PLP-PPIB-4、PLP-PPIB-5组成,并且,所述锁式探针杂交试剂中,所有探针浓度比例均相等;

[0148] 所述锁式探针环化试剂(50 μ L)由含5 μ L10 $\times$ SplintR连接酶反应缓冲液(NEB)、31.25 μ L浓度为80%(v/v)的甘油、1 μ L浓度为25U/ μ L的SplintR连接酶(NEB)、1.25 μ L浓度为40U/ μ L的RiboLockRNaseInhibitor(Promega)、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(NEB)和6.5 μ LDEPC水组成;

[0149] 所述滚环扩增引物杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20%(v/v)甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的滚环扩增引物组和20 μ LDEPC水组成;所述滚环扩增引物组由核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示的第一扩增引物组成;

[0150] 所述滚环扩增试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为50%(v/v)的甘油、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)、5 μ L浓度为10mM的dNTPs(天根)、5 μ L10 $\times$ Phi29DNA聚合酶缓冲液(NEB)、5 μ L浓度为10U/ μ L的Phi29聚合酶(NEB)和25 μ LDEPC水组成;

[0151] 所述检测探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含40%(v/v)甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和15 μ LDEPC水组成;所述第一检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示,并且,所述第一检测探针的5'端修饰有生物素(Biotin);所述第二检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,并且,所述第二检测探针的5'端修饰有辣根过氧化物酶(HRP);

[0152] 所述第一显色试剂有第一试剂和第二试剂组成;所述第一试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为20 μ M的链霉亲和素化碱性磷酸酶(ALP,ThermoScientific)、10 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)和35 μ L的DEPC水组成;所述第二试剂为由5 μ L的FASTRedA组分和45 μ L的FASTRedB组

成的FASTRED(固红)反应液(通灵生物)；

[0153] 所述第二显色试剂为由25 μ L A液和25 μ L B液组成的DAB(二氨基联苯胺)反应液(Sangon)。

[0154] 2、靶标核酸的检测

[0155] 细胞爬片步骤：

[0156] 在细胞瓶中将A549细胞(购自广州吉妮欧生物科技有限公司)以 2×10^6 个/mL的接种量接种至含10% (v/v)胎牛血清(FBS, UE)和1% (m/v, g/100mL)双抗SP(碧云天)的DMEM培养基(GIBCO)中,于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞培养液;将2mL胰蛋白酶(购自碧云天)添加至细胞培养液中,于37 $^{\circ}$ C孵育1min进行消化,得到细胞悬液;取1mL细胞悬液种植于无菌多聚赖氨酸载玻片(世泰)上后,将无菌多聚赖氨酸的载玻片分别置于添加有15mL含10% (v/v)胎牛血清和1% (m/v, g/100mL)双抗SP的DMEM培养基的培养皿中,于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养24h,得到细胞爬片后的载玻片;

[0157] 细胞固定步骤：

[0158] 弃去制作细胞爬片的培养皿中的培养基,加入DEPC-PBS (Biosharp)浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,清洗3次,每次3min后弃去废液;清洗结束后,向培养皿中加入4% (m/v, g/100mL)多聚甲醛固定液(Paraformaldehyde, PFA)浸没过载玻片,在室温(25 $^{\circ}$ C)下孵育30min进行固定后弃去废液;固定结束后,向培养皿中加入DEPC-PBS浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,洗涤3次,每次3min后弃去废液以终止PFA的固定作用;洗涤结束后,在培养皿中相继加换70% (v/v)、85% (v/v)和100% (v/v)的乙醇水溶液浸没过载玻片,每种乙醇水溶液在室温(25 $^{\circ}$ C)下放置5min后弃去废液以进行脱水;脱水结束后,将载玻片平铺放置在超净工作台上至完全干燥,记录信息和编号,-80 $^{\circ}$ C保存以备用;

[0159] 细胞透化步骤：

[0160] 将A549细胞载玻片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,在A549细胞载玻片上滴加50 μ L浓度为0.1M的HCl,在室温(25 $^{\circ}$ C)下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗A549细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,将A549细胞载玻片分为ALP组和HRP组,在ALP组的A549细胞载玻片上滴加50 μ L内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),在HRP组的A549细胞载玻片上滴加50 μ L内源性过氧化物酶阻断剂(博奥龙),室温(25 $^{\circ}$ C)下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0161] 锁式探针杂交步骤：

[0162] 在ALP组和HRP组样品载玻片上分别滴加50 μ L锁式探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0163] 锁式探针环化步骤：

[0164] 在ALP组和HRP组样品载玻片上分别滴加50 μ L锁式探针环化试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0165] 滚环扩增引物杂交步骤：

[0166] 在ALP组和HRP组样品载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增引物杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0167] 滚环扩增步骤:

[0168] 在ALP组和HRP组样品载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增试剂,37 $^{\circ}$ C反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;

[0169] 检测探针杂交步骤:

[0170] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗ALP组和HRP组的载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在ALP组的载玻片上滴加50 μ L第一试剂,在HRP组的载玻片上滴加50 μ L TBST缓冲液,室温(25 $^{\circ}$ C)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗ALP组和HRP组的载玻片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0171] 显色反应步骤:

[0172] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二试剂,在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二显色试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水清洗ALP组和HRP组的载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0173] 染色及封片步骤:

[0174] 在ALP组和HRP组的样品载玻片上分别滴加20 μ L苏木素(生工),室温(25 $^{\circ}$ C)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在ALP组和HRP组的载玻片上分别滴加20 μ L水溶性封片剂,在60 $^{\circ}$ C烘箱中烤干,以进行封片。

[0175] 检测步骤:

[0176] 通过显微镜对ALP组和HRP组的载玻片进行观察,观察结果见图6;通过CellProfiler软件对ALP组和HRP组的载玻片检测到的信号点进行定量分析,结果见图7。

[0177] 3、结果分析

[0178] 由图6~7可知,分别基于ALP和HRP对A549细胞内PPIB基因表达水平的检测效率进行对比,检测效率一致。此结果表明核酸检测试剂盒可以基于两种显色方法进行同时检测。

[0179] 实施例1:一种基于双重显色的核酸检测试剂盒

[0180] 本实施例提供了一种基于双重显色的核酸检测试剂盒(检测原理图见图1),所述核酸检测试剂盒以HPV18E6/E7基因的mRNA为第一靶标核酸,以MKI67基因的mRNA为第二靶标核酸,包括包括锁式探针杂交试剂、锁式探针环化试剂、滚环扩增引物(RCA引物)杂交试剂、滚环扩增试剂、检测探针杂交试剂、第一显色试剂、第二显色试剂、苏木素和水溶性封片剂(通灵生物);

[0181] 所述锁式探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20% (v/v) 甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一锁式探针组、5 μ L浓度为2 μ M的第二锁式探针组和15 μ LDEPC水组成;所述第一锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.12、13、16所示的PLP-MKI67-1、

PLP-MKI67-2和PLP-MKI67-5组成;所述第二锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.21~23所示的PLP-HPV18E7-1、PLP-HPV18E7-2和PLP-HPV18E7-3组成;所述锁式探针杂交试剂中,所有探针浓度比例均相等;

[0182] 所述锁式探针环化试剂(50 μ L)由含5 μ L10 $\times$ SplintR连接酶反应缓冲液(NEB)、31.25 μ L浓度为80%(v/v)的甘油、1 μ L浓度为25U/ μ L的SplintR连接酶(NEB)、1.25 μ L浓度为40U/ μ L的RiboLockRNaseInhibitor(Promega)、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(NEB)和6.5 μ LDEPC水组成;

[0183] 所述滚环扩增引物杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20%(v/v)甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的滚环扩增引物组和20 μ LDEPC水组成;所述滚环扩增引物组由核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示的第一扩增引物和核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示的第二扩增引物组成;所述滚环扩增引物杂交试剂中,第一扩增引物和第二扩增引物的浓度比为1:1;

[0184] 所述滚环扩增试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为50%(v/v)的甘油、5 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)、5 μ L浓度为10mM的dNTPs(天根)、5 μ L10 $\times$ Phi29DNA聚合酶缓冲液(NEB)、5 μ L浓度为10U/ μ L的Phi29聚合酶(NEB)和25 μ LDEPC水组成;

[0185] 所述检测探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含40%(v/v)甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和15 μ LDEPC水组成;所述第一检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,并且,所述第一检测探针的5'端修饰有生物素(Biotin);所述第二检测探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,并且,所述第二检测探针的5'端修饰有辣根过氧化物酶(HRP);

[0186] 所述第一显色试剂有第一试剂和第二试剂组成;所述第一试剂(50 μ L)由5 μ L浓度为20 μ M的链霉亲和素碱性磷酸酶(ALP,ThermoScientific)、10 μ L浓度为2mg/mL的BSA(Sigma)和35 μ L的DEPC水组成;所述第二试剂为由5 μ L的FASTRedA组分和45 μ L的FASTRedB组成的FASTRED(固红)反应液(通灵生物);

[0187] 所述第二显色试剂为由25 μ LA液和25 μ LB液组成的DAB(二氨基联苯胺)反应液(Sangon)。

[0188] 实验例6:锁式探针的设计对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0189] 本实施例提供了锁式探针的设计对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0190] 细胞爬片步骤:

[0191] 在细胞瓶中将HeLa细胞(取自中国科学院)以 2×10^6 个/mL的接种量接种至含10%(v/v)胎牛血清(FBS,UE)和1%(m/v,g/100mL)双抗SP(碧云天)的DMEM培养基(GIBCO)中,于37 $^{\circ}$ C、5%(v/v)CO₂下培养24h,得到细胞培养液;将2mL胰蛋白酶(购自碧云天)添加至细胞培养液中,于37 $^{\circ}$ C孵育1min进行消化,得到细胞悬液;取1mL细胞悬液种板于无菌多聚赖氨酸载玻片(世泰)上后,将无菌多聚赖氨酸的载玻片分别置于添加有15mL含10%(v/v)胎牛血清和1%(m/v,g/100mL)双抗SP的DMEM培养基的培养皿中,于37 $^{\circ}$ C、5%(v/v)CO₂下培养24h,得到细胞爬片后的载玻片;

[0192] 细胞固定步骤:

[0193] 弃去制作细胞爬片的培养皿中的培养基,加入DEPC-PBS(Biosharp)浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,清洗3次,每次3min后弃去废液;清

洗结束后,向培养皿中加入4% (m/v,g/100mL) 多聚甲醛固定液(Paraformaldehyde,PFA)浸没过载玻片,在室温(25℃)下孵育30min进行固定后弃去废液;固定结束后,向培养皿中加入DEPC-PBS浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,洗涤3次,每次3min后弃去废液以终止PFA的固定作用;洗涤结束后,在培养皿中相继加换70% (v/v)、85% (v/v) 和100% (v/v) 的乙醇水溶液浸没过载玻片,每种乙醇水溶液在室温(25℃)下放置5min后弃去废液以进行脱水;脱水结束后,将载玻片平铺放置在超净工作台上至完全干燥,记录信息和编号,-80℃保存以备用;

[0194] 细胞透化步骤:

[0195] 将HeLa细胞载玻片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,在A549细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,在室温(25℃)下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗HeLa细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,将A549细胞载玻片分为ALP组和HRP组,在ALP组的A549细胞载玻片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),在HRP组的A549细胞载玻片上滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂(博奥龙),室温(25℃)下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0196] 锁式探针杂交步骤:

[0197] 将ALP组的样品载玻片分为5组,在5组样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针杂交试剂1~5,将HRP组样品载玻片分为7组,在5组样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针杂交试剂6~12,37℃孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0198] 其中,所述锁式探针杂交试剂1(50μL)由25μL含20% (v/v) 甲酰胺的12×SSC缓冲液(Sigma)、5μL浓度为2μM的第一锁式探针组和20μLDEPC水组成;所述第一锁式探针组由核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示的PLP-MKI67-1组成;

[0199] 所述锁式探针杂交试剂2~5分别为在锁式探针杂交试剂1的基础上,将核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示的PLP-MKI67-1分别替换为核苷酸序列如SEQ ID NO.13~16所示PLP-MKI67-2、PLP-MKI67-3、PLP-MKI67-4、PLP-MKI67-5;

[0200] 所述锁式探针杂交试剂6(50μL)由25μL含20% (v/v) 甲酰胺的12×SSC缓冲液(Sigma)、5μL浓度为2μM的第二锁式探针组和20μLDEPC水组成;所述第二锁式探针组由核苷酸序列如SEQ ID NO.17所示的PLP-HPV18E6-1组成;

[0201] 所述锁式探针杂交试剂7~12分别为在锁式探针杂交试剂6的基础上,将核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示的PLP-MKI67-1分别替换为核苷酸序列如SEQ ID NO.18~20所示PLP-HPV18E6-2、PLP-HPV18E6-3、PLP-HPV18E6-4,或,核苷酸序列如SEQ ID NO.21~23所示的PLP-HPV18E7-1、PLP-HPV18E7-2、PLP-HPV18E7-3;

[0202] 锁式探针环化步骤:

[0203] 在ALP组和HRP组的样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针环化试剂,37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0204] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0205] 在ALP组和HRP组的样品载玻片上分别滴加50μL滚环扩增引物杂交试剂,37℃孵育

30min; 孵育结束后, 用TBST缓冲液清洗载玻片3次, 每次洗涤2min, 以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0206] 滚环扩增步骤:

[0207] 在ALP组和HRP组的样品载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增试剂, 37 $^{\circ}$ C反应3h, 进行滚环扩增(RCA); 反应结束后, 用TBST缓冲液清洗载玻片3次, 每次洗涤2min, 以去除未连接的dNTPs和酶;

[0208] 检测探针杂交步骤:

[0209] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂, 在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂, 37 $^{\circ}$ C第一次孵育30min; 第一次孵育结束后, 用TBST缓冲液清洗ALP组和HRP组的载玻片3次, 每次洗涤2min, 以去除未杂交的检测探针; 洗涤结束后, 在ALP组的载玻片上滴加50 μ L第一试剂, 在HRP组的载玻片上滴加50 μ L TBST缓冲液, 室温(25 $^{\circ}$ C)第二次孵育1h; 第二次孵育结束后, 用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗ALP组和HRP组的载玻片6次, 每次洗涤2min, 以去除未连接的酶;

[0210] 显色反应步骤:

[0211] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二试剂, 在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二显色试剂, 室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min; 孵育结束后, 用蒸馏水清洗ALP组和HRP组的载玻片3次, 每次洗涤2min, 以去除未反应的显色试剂;

[0212] 染色及封片步骤:

[0213] 在ALP组和HRP组的样品载玻片上分别滴加20 μ L苏木素(生工), 室温(25 $^{\circ}$ C)孵育5s后, 先用蒸馏水清洗3次, 每次洗涤2min, 然后流水反蓝30s; 流水反蓝结束后, 在ALP组和HRP组的载玻片上分别滴加20 μ L水溶性封片剂, 在60 $^{\circ}$ C烘箱中烤干, 以进行封片。

[0214] 检测步骤:

[0215] 通过CellProfiler软件对ALP组和HRP组的载玻片检测到的信号点进行定量分析, MKI67锁式探针筛选结果见图8, 锁式探针HPVE6/E7筛选结果见图9。

[0216] 由图8~9可知, 经过筛选, MKI67锁式探针为PLP-MKI67-1、PLP-MKI67-2、PLP-MKI67-5三条时检测效果最佳; HPVE6/E7锁式探针为PLP-HPV18E7-1、PLP-HPV18E7-2、PLP-HPV18E7-3三条时检测效果最佳。

[0217] 实验例7: 核酸检测试剂盒的性能验证

[0218] 本实验例使用实施例1的核酸检测试剂盒检测HeLa细胞中MKI67基因和HPV18E6/E7基因的mRNA表达水平以验证核酸检测试剂盒的性能, 具体包括如下步骤:

[0219] 细胞爬片步骤:

[0220] 在细胞瓶中将HeLa细胞(取自中国科学院)以 2×10^6 个/mL的接种量接种至含10% (v/v) 胎牛血清(FBS, UE) 和1% (m/v, g/100mL) 双抗SP(碧云天)的DMEM培养基(GIBCO)中, 于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养24h, 得到细胞培养液; 将2mL胰蛋白酶(购自碧云天)添加至细胞培养液中, 于37 $^{\circ}$ C孵育1min进行消化, 得到细胞悬液; 取1mL细胞悬液种板于无菌多聚赖氨酸载玻片(世泰)上后, 将无菌多聚赖氨酸的载玻片分别置于添加有15mL含10% (v/v) 胎牛血清和1% (m/v, g/100mL) 双抗SP的DMEM培养基的培养皿中, 于37 $^{\circ}$ C、5% (v/v) CO₂下培养

24h,得到细胞爬片后的载玻片;

[0221] 细胞固定步骤:

[0222] 弃去制作细胞爬片的培养皿中的培养基,加入DEPC-PBS (Biosharp) 浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,清洗3次,每次3min后弃去废液;清洗结束后,向培养皿中加入4% (m/v,g/100mL) 多聚甲醛固定液 (Paraformaldehyde,PFA) 浸没过载玻片,在室温 (25℃) 下孵育30min进行固定后弃去废液;固定结束后,向培养皿中加入DEPC-PBS浸没过载玻片,将培养皿平铺放置在超净工作台上,轻微晃动皿身,洗涤3次,每次3min后弃去废液以终止PFA的固定作用;洗涤结束后,在培养皿中相继加换70% (v/v)、85% (v/v) 和100% (v/v) 的乙醇水溶液浸没过载玻片,每种乙醇水溶液在室温 (25℃) 下放置5min后弃去废液以进行脱水;脱水结束后,将载玻片平铺放置在超净工作台上至完全干燥,记录信息和编号,-80℃保存以备;

[0223] 细胞透化步骤:

[0224] 将Hela细胞载玻片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,将Hela细胞载玻片分为ALP组、HRP组和ALP+HRP组三组,其中,ALP组为:在Hela细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,在室温 (25℃) 下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液 (阿拉丁) 清洗Hela细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,在Hela细胞载玻片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂 (博奥龙),室温 (25℃) 下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0225] HRP组为:在Hela细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,在室温 (25℃) 下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液 (阿拉丁) 清洗Hela细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,在Hela细胞载玻片上滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂 (博奥龙),室温 (25℃) 下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0226] ALP+HRP组为:在Hela细胞载玻片上滴加50μL浓度为0.1M的HCl,在室温 (25℃) 下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液 (阿拉丁) 清洗Hela细胞载玻片3次,每次2min,以去除残留的HCl;清洗结束后,在Hela细胞载玻片上滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂 (博奥龙),室温 (25℃) 下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;清洗结束后,在Hela细胞载玻片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂 (博奥龙),室温 (25℃) 下第三次孵育10min;第三次孵育结束后,用TBST清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0227] 锁式探针杂交步骤:

[0228] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针杂交试剂,37℃孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0229] 锁式探针环化步骤:

[0230] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的样品载玻片上分别滴加50μL锁式探针环化试剂,37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液 (阿拉丁) 清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0231] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0232] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的样品载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增引物杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0233] 滚环扩增步骤:

[0234] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的样品载玻片上分别滴加50 μ L滚环扩增试剂,37 $^{\circ}$ C反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;

[0235] 检测探针杂交步骤:

[0236] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和20 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,在ALP+HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和15 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在ALP组和ALP+HRP组的载玻片上分别滴加50 μ L第一试剂,在HRP组的载玻片上滴加50 μ L TBST缓冲液,室温(25 $^{\circ}$ C)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0237] 显色反应步骤:

[0238] 在ALP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;在HRP组的样品载玻片上滴加50 μ L第二显色试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;在ALP+HRP组的载玻片上先滴加50 μ L第二试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min,用蒸馏水清洗3次后,再滴加50 μ L第二显色试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水分别清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0239] 染色及封片步骤:

[0240] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的样品载玻片上分别滴加20 μ L苏木素(生工),室温(25 $^{\circ}$ C)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片上分别滴加20 μ L水溶性封片剂,在60 $^{\circ}$ C烘箱中烤干,以进行封片。

[0241] 检测步骤:

[0242] 检测结束后,通过显微镜对ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片进行观察,观察结果见图10;通过CellProfiler软件对ALP组、HRP组和ALP+HRP组的载玻片检测到的信号点进行定量分析,分析结果见图11。

[0243] 由图10~11可知,实施例1的核酸检测试剂盒可以准确检测mRNA,并可用于在单细胞内原位量化两个基因的mRNA表达。

[0244] 实验例8:核酸检测试剂盒的性能验证

[0245] 本实验例使用实施例1的核酸检测试剂盒检测宫颈腺癌临床组织标本(石蜡组织切片,取自厦门复旦中山医院)中MKI67基因和HPV18E6/E7基因的mRNA表达水平以验证核酸

检测试剂盒的性能,具体包括如下步骤:

[0246] 石蜡组织切片预处理步骤:

[0247] 将石蜡组织切片在烘箱中于65℃下烤片30min,烤片后立即放入盛有二甲苯的染色缸中浸泡15min,更换二甲苯再浸泡10min;从盛有二甲苯的染色缸中取出石蜡组织切片,然后立即放入盛有无水乙醇的染色缸中浸泡2min,更换无水乙醇再浸泡2min;从盛有无水乙醇的染色缸中取出石蜡组织切片,然后立即放入盛有95% (v/v) 乙醇的染色缸中浸泡2min,更换95%乙醇再浸泡2min;从盛有95% (v/v) 乙醇的染色缸中取出石蜡组织切片,然后立即放入盛有85% (v/v) 乙醇的染色缸中浸泡2min,更换85%乙醇再浸泡2min;从盛有85% (v/v) 乙醇的染色缸中取出石蜡组织切片,然后立即放入盛有70% (v/v) 乙醇的染色缸中浸泡2min,更换70%乙醇再浸泡2min;从盛有70%乙醇的染色缸中取出石蜡组织切片,先浸泡于DEPC-H₂O中5min,再浸泡于DEPC-PBS中2min,洗去残余的乙醇;从DEPC-PBS中取出石蜡组织切片,将含4% (m/v, g/100mL) 聚四氟乙烯 (PFA) 的DEPC-PBS滴在石蜡组织切片上,完全覆盖组织样本,在室温 (25℃) 下孵育10min后用DEPC-PBS洗去;将配好的抗原修复液 (ORIGENE) 在100℃的水浴锅中预热15min,得到预热好的抗原修复液;将3mL浓度为0.1M的HCl水溶液置于染色缸中预热至37℃后,加入3μL浓度为0.1mg/mL的胃蛋白酶(购Sigma),得到盐酸透化混合液;将石蜡组织切片先放置在预热好的抗原修复液中孵育10min,然后浸入冷的纯水中30S,再放置在水乙醇中浸泡2min,最后将盐酸透化混合液滴加在石蜡组织切片中,于37℃孵育30min;孵育后,先于DEPC水中浸泡5min,再于DEPC-PBS中浸泡2min洗净;将石蜡组织切片依次浸泡在70% (v/v)、85% (v/v)、100% (v/v) 的梯度乙醇中各2min以进行脱水处理后,于空气中晾干备用;

[0248] 组织透化步骤:

[0249] 将石蜡组织切片使用含0.1% (v/v) Tween20的DEPC-PBS冲洗后,将石蜡组织切片分为三组,分别为ALP组、HRP组和ALP+HRP组,其中,ALP组为:在石蜡组织切片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温 (25℃) 下孵育10min;孵育结束后,用TBST清洗石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0250] HRP组为:在石蜡组织切片上滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂(博奥龙),室温 (25℃) 下孵育10min;孵育结束后,用TBST清洗石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0251] ALP+HRP组为:在石蜡组织切片上滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂(博奥龙),室温 (25℃) 下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST清洗石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;清洗结束后,在石蜡组织切片上滴加50μL内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温 (25℃) 下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0252] 锁式探针杂交步骤:

[0253] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加50μL锁式探针杂交试剂,37℃孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0254] 锁式探针环化步骤:

[0255] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加50μL锁式探针环化试剂,

37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0256] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0257] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加50μL滚环扩增引物杂交试剂,37℃孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0258] 滚环扩增步骤:

[0259] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加50μL滚环扩增试剂,37℃反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;

[0260] 检测探针杂交步骤:

[0261] 在ALP组的石蜡组织切片上滴加50μL由25μL含40%(v/v)甲酰胺的4×SSC缓冲液(Sigma)、5μL浓度为2μM的第一检测探针和20μLDEPC水组成的检测探针杂交试剂,在HRP组的石蜡组织切片上滴加50μL由25μL含40%(v/v)甲酰胺的4×SSC缓冲液(Sigma)、5μL浓度为2μM的第二检测探针和20μLDEPC水组成的检测探针杂交试剂,在ALP+HRP组的石蜡组织切片上滴加50μL由25μL含40%(v/v)甲酰胺的4×SSC缓冲液(Sigma)、5μL浓度为2μM的第一检测探针、5μL浓度为2μM的第二检测探针和15μLDEPC水组成的检测探针杂交试剂,37℃第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在ALP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加50μL第一试剂,在HRP组的石蜡组织切片上滴加50μLTBST缓冲液,室温(25℃)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5%(v/v)Tween20的TBST缓冲液清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0262] 显色反应步骤:

[0263] 在ALP组的石蜡组织切片上滴加50μL第二试剂,室温(25℃)孵育10min;在HRP组的石蜡组织切片上滴加50μL第二显色试剂,室温(25℃)孵育10min;在ALP+HRP组的石蜡组织切片上先滴加50μL第二试剂,室温(25℃)孵育10min,用蒸馏水清洗3次后,再滴加50μL第二显色试剂,室温(25℃)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水分别清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0264] 染色及封片步骤:

[0265] 在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加20μL苏木素(生工),室温(25℃)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片上分别滴加20μL水溶性封片剂,在60℃烘箱中烤干,以进行封片。

[0266] 检测步骤:

[0267] 检测结束后,通过显微镜对ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片进行观察,观察结果见图12。

[0268] 由图12可知,实施例1的核酸检测试剂盒可以实现在宫颈腺癌上皮中MKI67基因和HPV18E6/E7基因的共定位检测,与常规免疫组化检测P16^{INK4A}、KI67蛋白的结果一致。且相较于常规免疫组化检测P16^{INK4A}、KI67蛋白,实施例1的核酸检测试剂盒在诊断宫颈癌前病变

有更高的特异性和灵敏度。

[0269] 实施例2:一种基于双重显色的核酸检测试剂盒

[0270] 本实施例提供了一种基于双重显色的核酸检测试剂盒(检测原理图见图1),所述核酸检测试剂盒以Doc2g基因(肾小球层)的mRNA为第一靶标核酸,以Penk基因(颗粒细胞层)的mRNA为第二靶标核酸,所述核酸检测试剂盒在实施例1的基础上,将锁式探针杂交试剂替换为:

[0271] 所述锁式探针杂交试剂(50 μ L)由25 μ L含20%(v/v)甲酰胺的12 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一锁式探针组、5 μ L浓度为2 μ M的第二锁式探针组和15 μ LDEPC水组成;所述第一锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.24~SEQ ID NO.26所示的PLP-Doc2g-1、PLP-Doc2g-2和PLP-Doc2g-3组成;所述第二锁式探针组由核苷酸序列分别如SEQ ID NO.27~SEQ ID NO.29所示的PLP-Penk-1、PLP-Penk-2和PLP-Penk-3组成;所述锁式探针杂交试剂中,所有探针浓度比例均相等。

[0272] 实验例9:核酸检测试剂盒的性能验证

[0273] 本实验例使用实施例2的核酸检测试剂盒检测小鼠嗅球组织标本(冰冻组织切片,取自厦门复旦中山医院)中Doc2g基因和Penk基因的mRNA表达水平以验证核酸检测试剂盒的性能,具体包括如下步骤:

[0274] 冰冻组织切片预处理步骤:

[0275] 将冰冻组织切片于室温(25 $^{\circ}$ C)晾干后,将含4%(m/v,g/100mL)聚四氟乙烯(PFA)的DEPC-PBS滴在冰冻组织切片上,完全覆盖组织样本,在室温(25 $^{\circ}$ C)下孵育10min后用DEPC-PBS洗去;将冰冻组织切片依次浸泡在70%(v/v)、85%(v/v)、100%(v/v)的梯度乙醇中各2min以进行脱水处理后,于空气中晾干备用;

[0276] 组织透化步骤:

[0277] 将组织切片使用含0.1%(v/v)Tween20的DEPC-PBS冲洗后,在组织切片上滴加50 μ L内源性碱性磷酸酶阻断剂(博奥龙),室温(25 $^{\circ}$ C)下第一次孵育10min;第一次孵育结束后,用TBST清洗组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;清洗结束后,在组织切片上滴加50 μ L内源性过氧化物酶阻断剂(博奥龙),室温(25 $^{\circ}$ C)下第二次孵育10min;第二次孵育结束后,用TBST清洗组织切片3次,每次洗涤2min,以去除多余的内源性酶阻断剂;

[0278] 锁式探针杂交步骤:

[0279] 在组织切片上滴加50 μ L锁式探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2h,将锁式探针与靶标核酸充分杂交;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗3次,每次洗涤2min,以去除多余的未杂交锁式探针;

[0280] 锁式探针环化步骤:

[0281] 在组织切片上滴加50 μ L锁式探针环化试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液(阿拉丁)清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的锁式探针和酶;

[0282] 滚环扩增引物杂交步骤:

[0283] 在组织切片上滴加50 μ L滚环扩增引物杂交试剂,37 $^{\circ}$ C孵育30min;孵育结束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的滚环扩增引物(RCA引物);

[0284] 滚环扩增步骤:

[0285] 在组织切片上滴加50 μ L滚环扩增试剂,37 $^{\circ}$ C反应3h,进行滚环扩增(RCA);反应结

束后,用TBST缓冲液清洗载玻片3次,每次洗涤2min,以去除未连接的dNTPs和酶;

[0286] 检测探针杂交步骤:

[0287] 在组织切片上滴加50 μ L由25 μ L含40% (v/v) 甲酰胺的4 $\times$ SSC缓冲液(Sigma)、5 μ L浓度为2 μ M的第一检测探针、5 μ L浓度为2 μ M的第二检测探针和15 μ LDEPC水组成的检测探针杂交试剂,37 $^{\circ}$ C第一次孵育30min;第一次孵育结束后,用TBST缓冲液清洗组织切片3次,每次洗涤2min,以去除未杂交的检测探针;洗涤结束后,在组织切片上滴加50 μ L第一试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)第二次孵育1h;第二次孵育结束后,用含0.5% (v/v) Tween20的TBST缓冲液清洗组织切片6次,每次洗涤2min,以去除未连接的酶;

[0288] 显色反应步骤:

[0289] 在组织切片上先滴加50 μ L第二试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min,用蒸馏水清洗3次后,再滴加50 μ L第二显色试剂,室温(25 $^{\circ}$ C)孵育10min;孵育结束后,用蒸馏水分别清洗ALP组、HRP组和ALP+HRP组的石蜡组织切片3次,每次洗涤2min,以去除未反应的显色试剂;

[0290] 染色及封片步骤:

[0291] 在组织切片上分别滴加20 μ L苏木素(生工),室温(25 $^{\circ}$ C)孵育5s后,先用蒸馏水清洗3次,每次洗涤2min,然后流水反蓝30s;流水反蓝结束后,在组织切片上分别滴加20 μ L水溶性封片剂,在60 $^{\circ}$ C烘箱中烤干,以进行封片。

[0292] 检测步骤:

[0293] 检测结束后,通过显微镜对组织切片进行观察,观察结果见图13。

[0294] 由图13可知,实施例2的核酸检测试剂盒可以在小鼠嗅球组织标本的肾小球层检测到Doc2g基因、颗粒细胞层检测到Penk基因,染色后的区域性很好。此结果表明实施例2的核酸检测试剂盒能够实现样本组织中不同基因的区域性展示。

[0295] 实验例10:烤干对核酸检测试剂盒检测效果的影响

[0296] 本实施例提供了烤干对核酸检测试剂盒检测效果的影响实验,实验过程如下:

[0297] 在实验例9的基础上,在组织切片上分别滴加20 μ L水溶性封片剂后不进行烤干处理,显微镜观察结果见图14。

[0298] 由图14可知,烤干的组织信号点更清晰、明亮,而不烤干的组织信号点与背景融合在一起,不能很好区分。

[0299] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

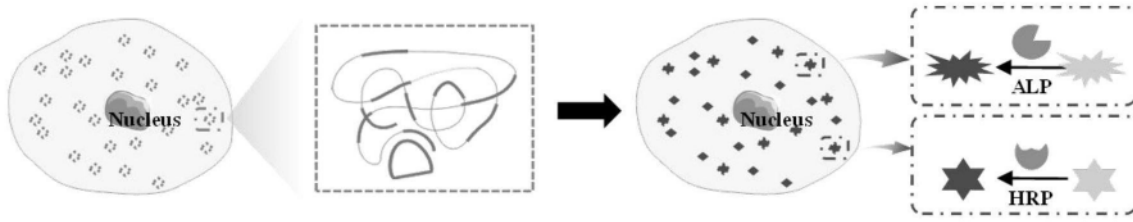


图1

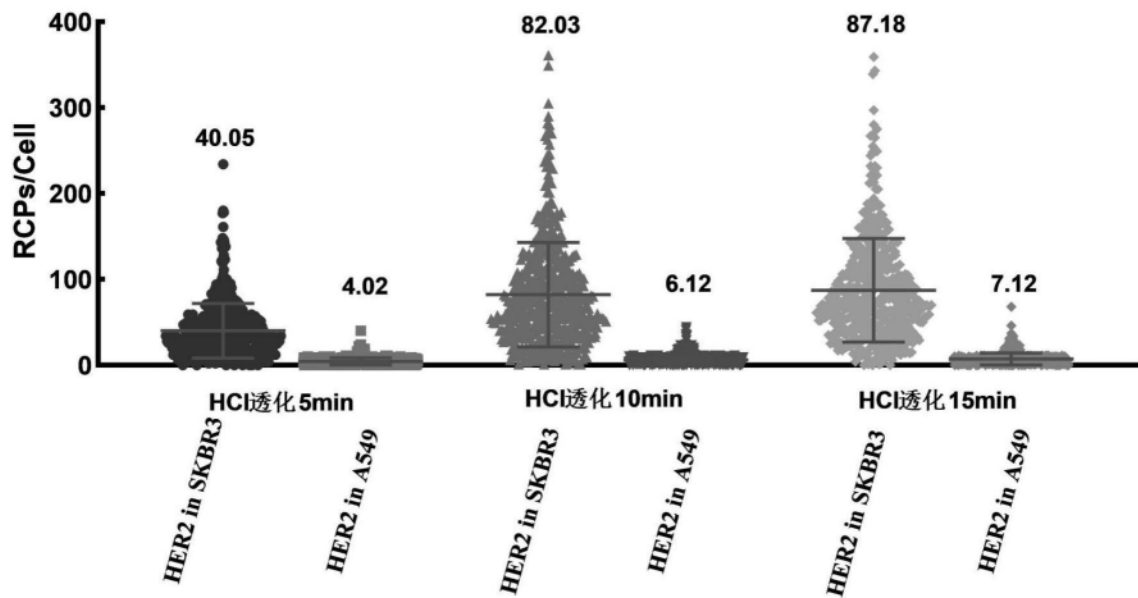


图2

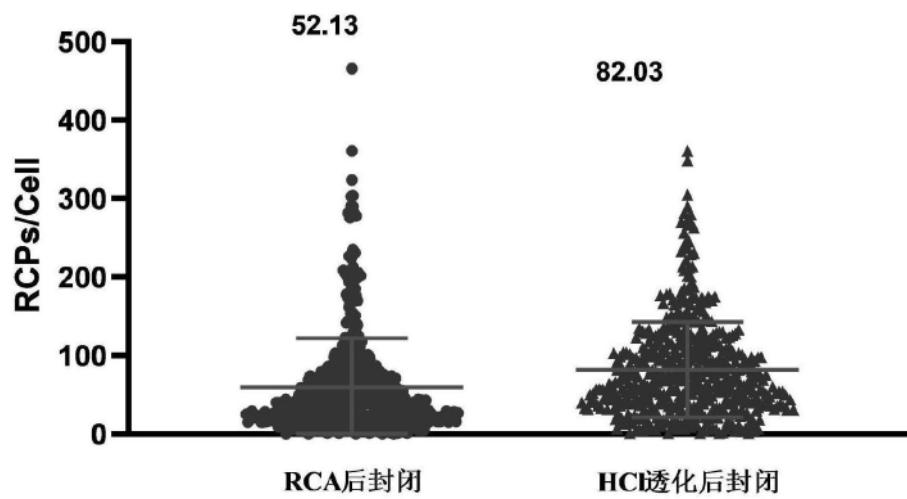


图3

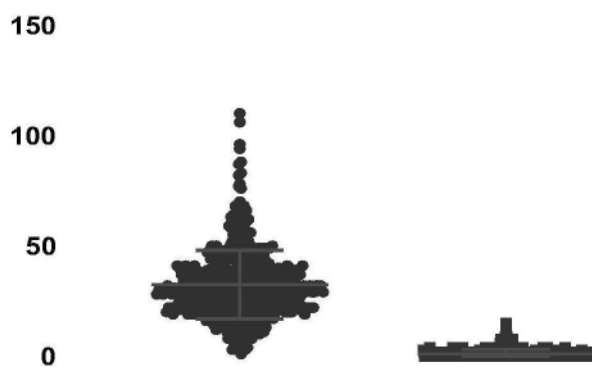


图4

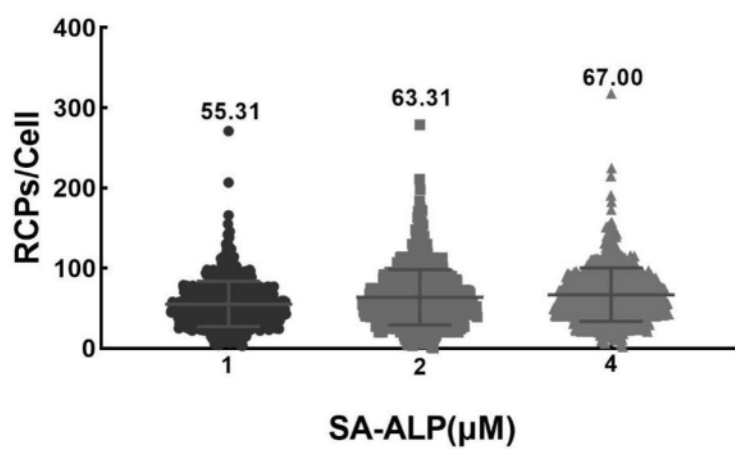


图5

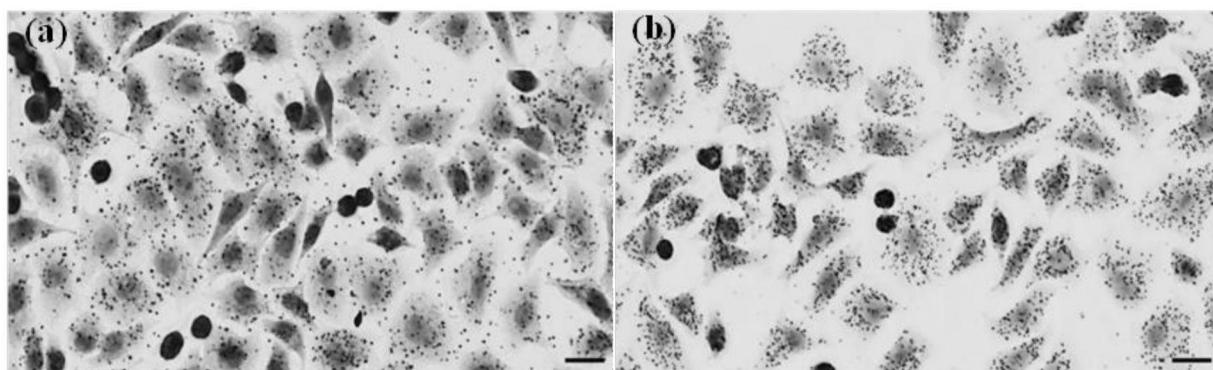


图6

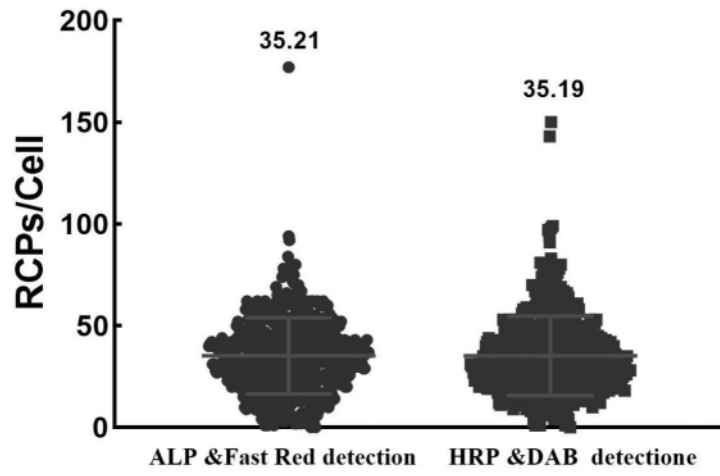


图7

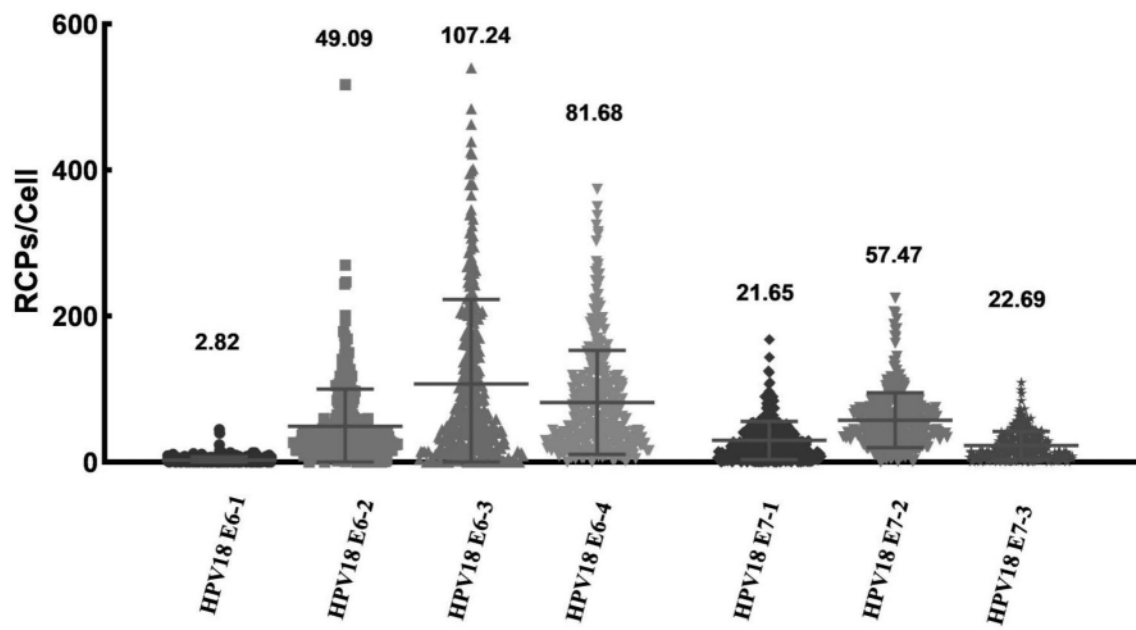


图8

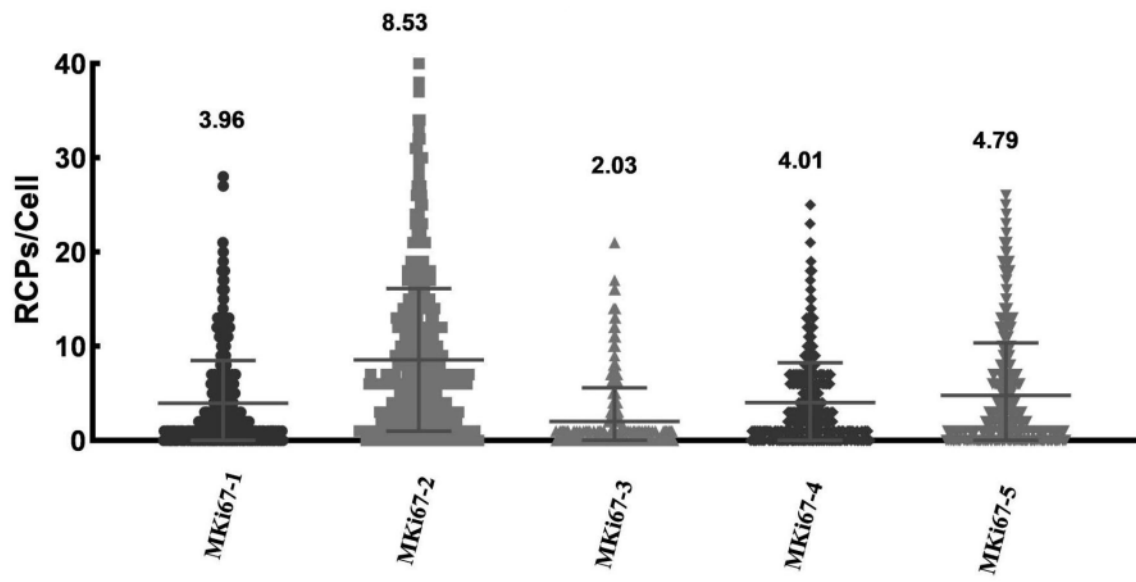


图9

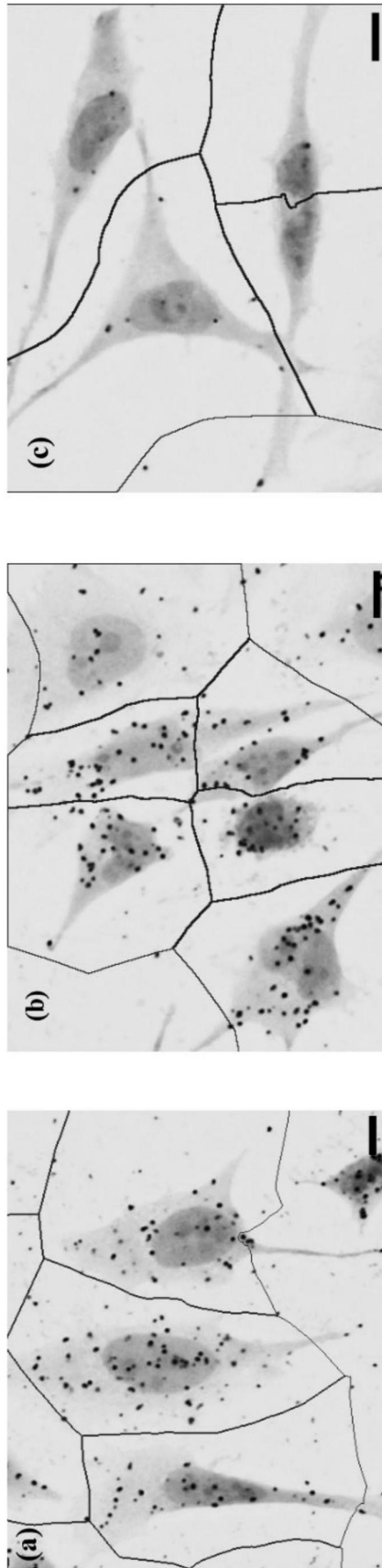


图10

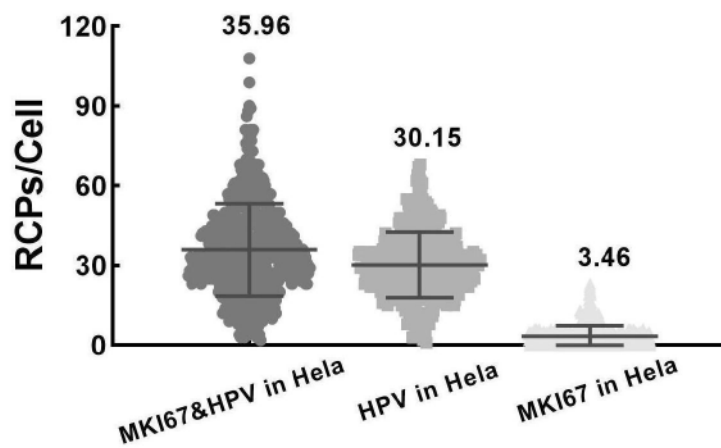


图11

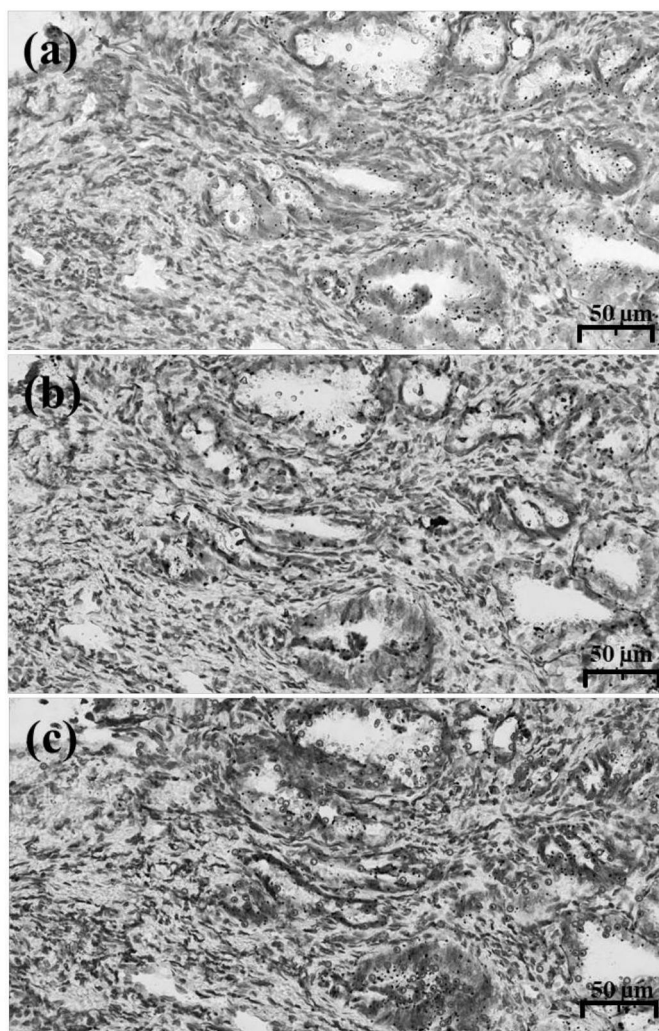


图12

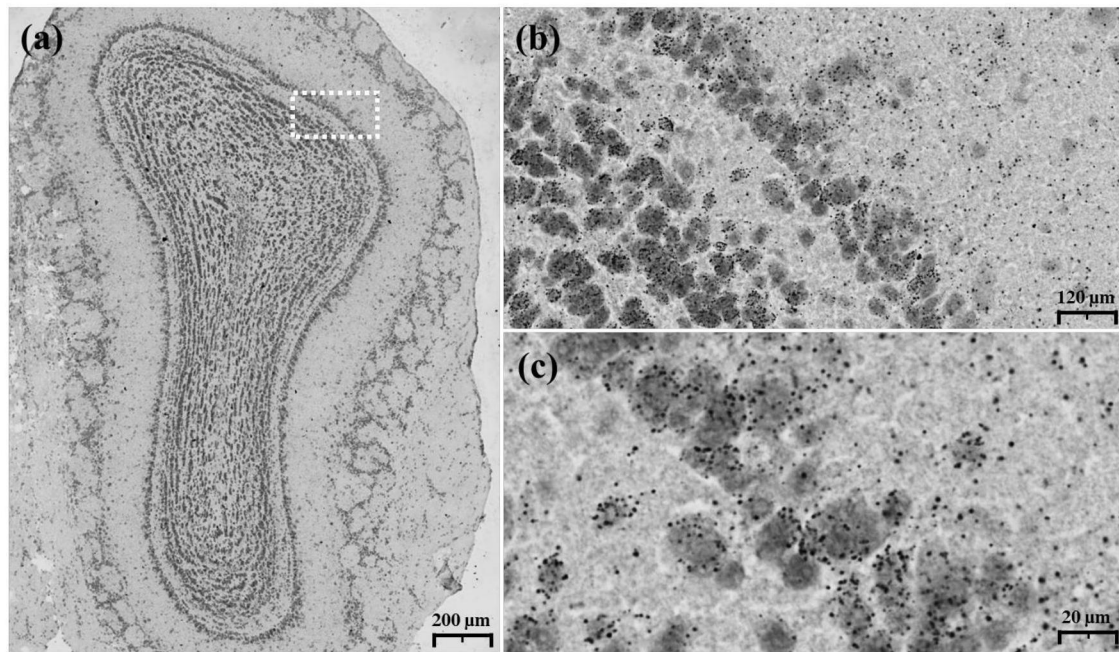


图13

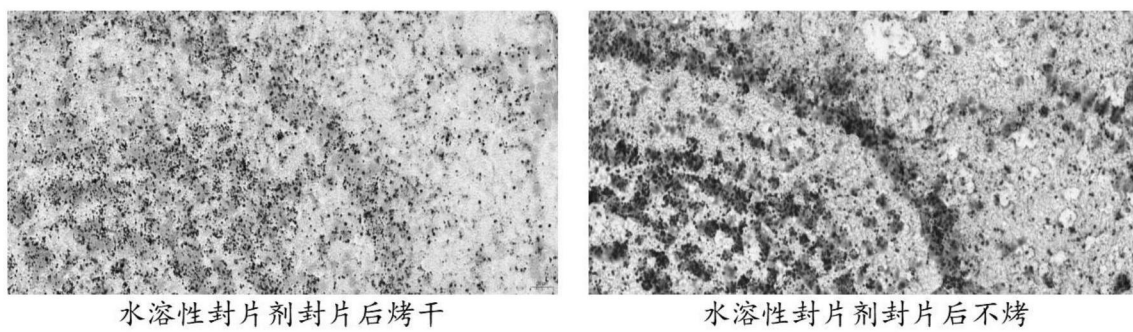


图14