

一种多重扩增方法

技术领域

本申请属于生物技术领域，涉及一种多重扩增方法。

背景技术

多重 PCR (Multiplex polymerase chain reaction, MPCR) 是指通过一次 PCR 反应同时对多个靶标进行扩增，结合一定的检测手段对扩增产物进行检测从而实现对多个靶标进行检测的技术。MPCR 具有高效率、高通量、低成本的特性而被深入研究，不仅能大幅提升检测效率，还降低了检测成本。MPCR 已经应用于许多领域，包括基因突变与缺失、基因分型与定量、遗传检测、伴随诊断等。目前的 MPCR 主要可以分为液相 MPCR，基于微流控的 MPCR 和固相载体的多重 PCR。

液相 MPCR 采用多个靶标的特异性引物对多个靶标进行扩增，但是这种方式是在同一个反应中引入了多重扩增引物。随着所要检测的靶标分子数量的增加，管内核苷酸链数目也会呈 2 倍的增加，各核苷酸链之间互搭形成二聚体甚至多聚体的可能性大幅上升，轻则导致非特异性扩增的出现，靶标扩增效率下降，检测灵敏度和特异性降低，重则导致非特异性扩增占据主导，靶标扩增失败。同时，这类设计方式还会导致每重靶标分子扩增效率不一致的问题。目前也有多重连接探针扩增技术 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)、基于发夹结构 (PCT/US2002/037238) 和两轮扩增 (PCT 专利 WO 96/41012) 的检测策略的报道。MLPA 先针对不同靶标分子末端信息设计相应的特异性连接引物和通用扩增引物，但是该技术不仅需要连接反应来启动反应，而且还受到连接酶特异性、连接引物制备困难、引物数量和浓度等对扩增的干扰。PCT/US2002/037238 采用一种基于长引物的扩增模式虽然在原理上可以实现对 5' 末端的信息类型进行检测，但是该方案需要在第一步扩增后加入酶或者化学法切割的步骤以及繁杂的预扩增纯化过程，不仅降低了反应的灵敏度，而且增加了操作的复杂性。PCT 专利 WO 96/41012 披露了一种两轮扩增的检测策略，但是该方案不仅无法对多重特定靶标序列上 5' 末端的信息类型进行检测，而且存在引物数量较多、扩增存在竞争的问题。

基于微流控芯片的 MPCR 通过在芯片微孔中预装填不同的引物对的方法将各重扩增限制在各自的独立空间内。这类技术由于其扩增方式的特殊性而使用到专属的检测仪器，其技术的复杂性使其实现较为困难。

基于固相载体的 MPCR 主要有基于液相芯片的多重检测技术。液相芯片以编码后的微球为基质进行多重检测。液相芯片虽然在检测方面有多通量、高效率的特性，但是由于其先要进行液相多重扩增再采用编码微球进行杂交鉴别，实质上并没有解决多重扩增中众多引物和模板间相互错配的问题。

综上，MPCR 虽有着广泛的应用前景，但是目前现有技术面临着扩增效率下降、模板之间扩增效率不一致以及操作步骤比较繁琐等问题。因此，亟需发展简单、方便、高效的单反应、多重核酸等效扩增技术。

发明内容

为了克服传统 MPCR 技术所面临的扩增效率下降、模板之间扩增效率不一致以及操作步骤繁琐等缺陷，本申请提出了一种新的多重扩增方法，该方法包括两个步骤：第一步，采用捕获寡核苷酸结合靶标分子并启动特异性线性扩增，得到含有可被通用引物引发指数扩增的中间序列。第二步，对第一步由靶标分子线性扩增得到的多重中间序列，实施通用引物引发的多重指数扩增。本申请提出的捕获寡核苷酸，由于采用了特殊的分子序列设计，不仅能够保证对靶标分子的特异性线性扩增，而且能够保证线性扩增产物可通过自我折叠和自我延伸，形成含有可被通用引物引发指数扩增的通用序列及与多重靶标分子对应的特异性序列。由于线性扩增过程只须低浓度（普通多重 PCR 引物浓度的 1/20-1/40）的单根特异性捕获寡核苷酸引发，不仅保证了扩增的特异性，而且有效地降低了 MPCR 反应中所需的引物浓度和数量，避免引物彼此之间的相互干扰；通用引物引发的多重指数扩增，不仅显著提高了扩增的效率，保证了反应的灵敏度，而且实现了对多种不同靶标分子的等效扩增。上述两个步骤的结合，使得本申请有效地解决了传统 MPCR 扩增技术所存在的关键问题。

为达此目的，本申请采用以下技术方案：

第一方面，本申请提供了一种用于核酸扩增的捕获寡核苷酸，所述捕获寡核苷酸从 5' 端到 3' 端依次包括第一通用序列、折叠序列和结合捕获序列；

所述折叠序列与靶标分子的 5'末端序列至少部分相同；

所述结合捕获序列与靶标分子的非 5'末端序列互补结合。

本申请中，捕获寡核苷酸主要包括三个区域：第一通用序列、折叠序列和结合捕获序列，捕获寡核苷酸首先通过结合捕获序列捕获 5'端序列信息明确的靶标分子，随后以靶标分子为模板进行延伸反应，在捕获寡核苷酸 3'端添加靶标分子的互补链，得到的延长的捕获寡核苷酸由于分子内部存在至少部分碱基互补配对的折叠序列及其延长的 3'端序列，诱发分子内的自我折叠，并在聚合酶的作用下进一步延伸，在 3'端添加第一通用序列的互补链，最终得到具有完整发夹式结构产物，可以采用通用引物和/或靶标分子特异性引物进行 PCR 扩增检测。

在本申请的一些实施方案中，“靶标分子的 5'末端序列”是指靶标分子的 5'末端的 1 位至 4 位核苷酸，1 位至 5 位核苷酸，1 位至 6 位核苷酸，1 位至 7 位核苷酸，1 位至 8 位核苷酸，1 位至 9 位核苷酸，1 位至 10 位核苷酸，1 位至 11 位核苷酸，1 位至 12 位核苷酸，1 位至 13 位核苷酸，1 位至 14 位核苷酸，1 位至 15 位核苷酸，1 位至 16 位核苷酸，1 位至 17 位核苷酸，1 位至 18 位核苷酸，1 位至 19 位核苷酸，1 位至 20 位核苷酸或 1 位至更多位核苷酸的一段连续的序列。

在本申请的一些实施方案中，“折叠序列与靶标分子的 5'末端序列至少部分相同”是指折叠序列与靶标分子的 5'末端序列完全相同，或者部分相同。

例如，在一些实施方案中，指折叠序列与靶标分子的 5'末端序列完全相同。在这样的实施方案中，在以靶标分子为模板进行延伸得到的延长的捕获寡核苷酸中，折叠序列与延长的 3'端序列完全互补，并诱发分子内的自我折叠。

例如，在另一些实施方案中，指折叠序列与靶标分子的 5'末端序列部分相同。在这样的实施方案中，在以靶标分子为模板进行延伸得到的延长的捕获寡核苷酸中，折叠序列与延长的 3'端序列部分互补，并诱发分子内的自我折叠。

在本申请的一些实施方案中，“靶标分子的非 5'末端序列”是指与靶标分子的 5'末端的第一个核苷酸距离 3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、或 19 个、或更多个核苷酸的一段序列。

本申请中，第一通用序列为人工合成序列，与靶标分子序列无关，因此在针对不同靶标分子进行检测时，只需要根据靶标分子设计捕获寡核苷酸的折叠序列和结合捕获序列，而保持第一通用序列不变。

优选地，所述捕获寡核苷酸还包括第二通用序列。

优选地，所述第二通用序列位于结合捕获序列的 5'端。

本申请中，通过在折叠序列和结合捕获序列之间设置第二通用序列，在进行捕获寡核苷酸的延长和自我折叠后，得到的发夹式结构产物可以采用与第一通用序列、第二通用序列相同或部分相同的通用引物作为上下游引物，进行 PCR 扩增检测，可以实现对多重靶标分子等效扩增的效果。

优选地，所述捕获寡核苷酸还包括核酸延伸阻断位点，所述核酸延伸阻断位点位于折叠序列的 3'端，用于隔断结合捕获序列和折叠序列。

优选地，所述核酸延伸阻断位点位于第二通用序列的 5'端，用于隔断第二通用序列和折叠序列。

本申请中，将核酸延伸阻断位点设置在折叠序列的 3'端，或者进一步优选为设置在第二通用序列和折叠序列之间，不仅不影响延长的捕获寡核苷酸的自我折叠，而且还可以在捕获寡核苷酸自我折叠后，以自身为模板进行自我延伸、在 3'端添加不属于靶标分子的第一通用序列的互补链，从而形成具有完整的发夹式结构的产物；所述发夹式结构产物可以作为通用引物和/或靶标分子特异性引物进行 PCR 扩增时的模板，进行 PCR 指数式扩增，有效保证了扩增的特异性和准确性。

优选地，所述核酸延伸阻断位点修饰有能阻断 DNA (deoxyribonucleic acid) 聚合酶延伸的物质，使得发夹式结构产物在使用通用引物和/或靶标分子特异性引物进行 PCR 扩增时，在核酸延伸阻断位点终止延伸，进而产生一个线性化的扩增模板，用于后续的指数式扩增，提高扩增的效率；

优选地，所述能阻断 DNA 聚合酶延伸的物质有 Spacer、硫代基团或尿嘧啶碱基中的任意一种或至少两种的组合。

优选地，所述折叠序列修饰有核酸类似物。

在本申请的一些实施方案中，Spacer 是指聚乙二醇，优选聚乙二醇 18。

值得提出的是，由于现有的寡核苷酸合成技术的局限，使得捕获寡核苷酸在合成过程中可能会产生序列片段不完整的副产物，然而根据本申请，由于捕获寡核苷酸折叠区域的序列来源于靶标分子，上述副产物的存在可能引发非特异性扩增；因此，本申请为进一步提高检测体系的特异性，将捕获寡核苷酸的折叠序列采用核酸类似物进行修饰，在保证折叠序列正常的碱基互补配对功能的情况下，抑制所合成的捕获寡核苷酸副产物延伸，阻断原始基因片段或基因组的非特异性扩增，从而提高检测体系的特异性。

优选地，所述核酸类似物包括肽核酸、锁核酸、转置碱基、2'-O,4'-C-亚甲基桥 RNA (2'-O,4'-C-methylene bridge ribonucleic acid)、2'-O-甲基 RNA (2'-O-Methyl RNA) 或 2'-氟 RNA (2'-Fluoro RNA) 中的任意一种或至少两种的组合。

本申请中，转置碱基是一类与正常碱基方向相反的碱基，其碱基的 3'端与上游碱基的 3'端形成 3-3-磷酸二酯键，与下游碱基的 5'端形成 5-5-磷酸二酯键，从而可以抑制 DNA 聚合酶的延伸，以及在延伸过程中的外切核酸酶的降解作用。

第二方面，本申请提供了一种核酸扩增试剂盒，所述试剂盒包括第一方面所述的捕获寡核苷酸。

优选地，所述试剂盒还包括靶核酸预处理试剂，用以产生 5'末端序列信息类型明确的靶标分子。

优选地，所述预处理试剂包括能进行位点特异性切割的核酸酶、核酸延伸阻断剂或特异性引物中的任意一种或至少两种的组合。

优选地，所述特异性引物的 5'端含有修饰基团。

优选地，所述修饰基团包括磷酸基团和/或硫代基团。

优选地，所述试剂盒还包括通用引物。

优选地，所述通用引物的核酸序列与第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同。

本申请中，基于通用引物的扩增反应以 5'末端序列信息确定的靶标分子为模板，靶标分子可以是自身 5'末端序列信息类型明确的靶标分子，或经化学因子或生物学方法处理后产生的 5'末端序列信息类型明确的靶标分子。

本申请中，5'末端序列信息明确的核酸序列类型包括正常核酸序列、带有修饰的核酸序列、单核苷酸突变、序列转置、序列缺失、序列重组等不同类型。

优选地，自身 5'末端序列信息明确的靶标分子，如 microRNA 成熟体、microRNA 前体、cfDNA (cell free DNA) 等。

优选地，可通过化学因子实施切割或阻断的方法得到 5'末端序列信息明确的靶标分子，包括多肽核酸 (PNA) 修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、锁核酸 (LNA) 修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、甲氧基修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、RNA 修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、2-氟修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、反转碱基修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、磷酸基团修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链、硫代基团修饰的与靶标序列互补的短寡核苷酸链等中的任意一种或至少两种的组合等。

优选地，可通过生物学方法实施切割或阻断的方法得到 5'末端序列信息明确的靶标分子中间产物，包括采用 AP 核酸外切酶、AP 裂解酶、尿嘧啶-DNA 糖基化酶 (UDG)、核酸限制性内切酶、甲基化依赖性核酸限制性内切酶、甲基化敏感性核酸限制性内切酶、切口酶、巨型核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶 (TALEN)、CRISPR-Cas 等中的任意一种或至少两种的组合。

本申请中，只有在捕获寡核苷酸、通用引物和/或特异性引物的共同参与下才能发生扩增反应，简述如下：在双通用引物扩增体系中，采用的通用引物的核酸序列与捕获寡核苷酸的第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同，在没有 5'末端序列确定的靶标分子存在的情况下无法启动 PCR 扩增反应。当体系中有 5'末端序列确定的靶标分子的存在时，将触发由捕获寡核苷酸引发的延伸反应，形成具有发夹式结构的中间产物，并以其作为通用引物扩增反应的模板；同时，由于只有当延伸反应的延伸序列与折叠序列能够形成互补配对时，才能使得延长的捕获寡核苷酸发生自我折叠并形成发夹式结构，有效地保证了反应的特异性。延伸序列与折叠序列可以是完全互补配对，也可以是不完全互补配对。

优选地，所述试剂盒还包括特异性引物。

本申请中，当所述捕获寡核苷酸仅包括第一通用序列、折叠序列和结合捕获序列，而不包括第二通用序列时，即在单通用引物扩增体系中，采用通用引物和靶标分子特异性引物作为 PCR 的上下游引物，进一步提高了反应的特异性和灵敏度；采用本申请的方法对相同浓度、不同序列的靶标分子进行检测，得到的 Ct 值基本一致，由此证明本方法对不同的靶标分子亦可保证等效扩增的性能。

优选地，所述试剂盒还包括检测探针。

优选地，所述检测探针标记有荧光基团和/或淬灭基团。

本申请中，采用标记有荧光基团和/或淬灭基团的检测探针与扩增产物进行杂交互补，有利于实现扩增产物的实时定量检测。

优选地，所述荧光基团标记在检测探针的 5' 端。

优选地，所述淬灭基团标记在检测探针的 3' 端。

优选地，所述荧光基团包括 FAMTM（羧基荧光素）、VICTM（绿色荧光蛋白）、JOETM（2, 7-二甲基-4, 5-二氯-6-羧基荧光）、TETTM（四氯-6-羧基荧光素）、CYTM3（马来酰亚胺 3）、CYTM5（马来酰亚胺 5）、ROXTM（罗丹明 X 马来酰亚胺）、Texas RedTM（磺化罗丹明 101 氯酸）或 LC RED460TM 中的任意一种。

优选地，所述淬灭基团包括 BHQ1TM（Black Hole Quencher）、BHQ2TM、BHQ3TM、Dabcyl 或 Tamra（羧基四甲基罗丹明）中的任意一种。

第三方面，本申请提供了一种核酸检测方法，所述核酸检测方法包括采用捕获寡核苷酸结合靶标分子并启动特异性线性扩增和基于通用引物的核酸扩增检测。

优选地，所述捕获寡核苷酸结合靶标分子并启动特异性线性扩增包括以下步骤：

- （1）5' 端序列确定的靶标分子与捕获寡核苷酸的结合捕获序列进行结合；
- （2）捕获寡核苷酸以靶标分子为模板进行延伸反应，在捕获寡核苷酸 3' 末端添加与靶标分子互补的核苷酸，形成延伸的捕获寡核苷酸；
- （3）延伸的捕获寡核苷酸通过延伸序列与分子内部的折叠序列进行结合，形成半发夹结构产物；
- （4）半发夹结构产物再进行延伸反应，在 3' 末端添加与分子内部的第一通用序列互补的核苷酸，形成完整的发夹结构产物。

优选地，所述基于通用引物的核酸扩增检测包括以下步骤：

以完整的发夹结构产物作为模板，采用通用引物和/或特异性引物进行指数式扩增，得到扩增产物。

优选地，所述通用引物的核酸序列与捕获寡核苷酸的第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同。

优选地，所述指数式扩增包括聚合酶链式反应，例如可以是普通 PCR、qPCR 或数字 PCR 中的任意一种。

优选地，所述方法还包括扩增产物与检测探针结合，进行检测的步骤。

本申请还提供了一种核酸扩增方法，其包括：

（1）使 5' 端序列确定的靶标分子与本申请提供的捕获寡核苷酸接触，由此，所述捕获寡核苷酸的结合捕获序列与所述靶标分子结合；

（2）使捕获寡核苷酸以靶标分子为模板进行延伸反应，由此，在捕获寡核苷酸的 3' 末端添加与靶标分子互补的核苷酸，从而形成延伸的捕获寡核苷酸；

（3）将延伸的捕获寡核苷酸在允许分子内自我折叠的条件下孵育，由此，延伸的捕获寡核苷酸通过延伸序列与折叠序列进行碱基互补配对，形成半发夹结构产物；及

（4）使半发夹结构产物再进行延伸反应，由此，在 3' 末端添加与第一通用序列互补的核苷酸，进而形成完整的发夹结构产物。

在一些具体的实施方案中，该方法还包括以完整的发夹结构产物作为模板，采用通用引物和/或特异性

引物进行指数式扩增,得到扩增产物。在一些更具体的实施方案中,通用引物的核酸序列与捕获寡核苷酸的第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同。

与现有技术相比,本申请具有如下有益效果:

(1) 本申请的核酸检测试剂盒不需要对扩增产物进行连接反应、化学处理等额外步骤,只要靶标分子 5'端序列信息明确,即可实现核酸的高特异、高灵敏的多重检测;

(2) 本申请的核酸检测试剂盒中,捕获寡核苷酸与通用引物经过特殊设计,相互配合,在靶标分子存在的情况下,靶标分子触发由捕获寡核苷酸引发的延伸反应,形成发夹式结构产物,并以此作为通用引物和/或特异性引物扩增反应的模板,由于扩增反应基于 5'序列确定的产物,有效避免了假阳性问题;

(3) 本申请中,当捕获寡核苷酸的 3'延伸序列与折叠序列能够形成互补配对,才能引发捕获寡核苷酸的自我折叠形成发夹式结构,有效保证了反应的特异性;

(4) 本申请的核酸检测试剂盒在针对不同靶标分子进行检测时,只需要根据靶标分子设计捕获寡核苷酸的折叠序列和结合捕获序列,而保持第一通用序列不变,极大程度降低多重靶标扩增的多种引物间干扰,提高扩增的灵敏度;

(5) 本申请的核酸检测试剂盒通过指数扩增过程达到信号放大的目的,不仅能很好地满足 DNA/RNA 检测时对灵敏度的需求,而且所述指数扩增过程仅利用延长的捕获寡核苷酸和通用引物来完成,可在保持通用引物的数量和浓度不变的前提下达到对多重靶标分子的等效扩增目的,避免了序列差异导致的扩增效率的偏差;

(6) 本申请的核酸检测试剂盒操作简便。

附图说明

图 1 (A) 为双通用引物扩增原理图,图 1 (B) 为单通用引物扩增原理图;

图 2 为构建 5'端序列明确的靶标分子示意图;

图 3 为 qPCR 检测 miRNA27a 和 let-7a 的结果图;

图 4 为琼脂糖凝胶检测多重人源基因的结果图;

图 5 为结核分枝杆菌的利福平 526 耐药突变检测结果图;

图 6 为 qPCR 检测 Septin 9 基因的结果图;

图 7 为 ddPCR 检测 Septin 9 基因的结果图;

图 8 (A) 为不同浓度的甲基化样本中 Septin 9 基因的灵敏度检测结果,图 8 (B) 为不同浓度的甲基化样本中 RASS-F1 基因的灵敏度检测结果;

图 9 (A) 为普通捕获寡核苷酸的检测特异性结果,图 9 (B) 为 LNA 修饰捕获寡核苷酸的检测特异性结果;

图 10 为 qPCR 检测 RASS-F1 基因的结果图。

具体实施方式

为进一步阐述本申请所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本申请作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本申请,而非对本申请的限定。

实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的共识性文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

实施例 1 本申请扩增的基本原理

本申请包括两种模式:双通用引物模式和单通用引物模式,原理如图 1 (A) 和图 1 (B) 所示。

在双通用引物扩增中,捕获寡核苷酸包括四个区域:第一通用序列 U1s、折叠序列 T1s、第二通用序列 U2s 和结合捕获序列 T2a,捕获寡核苷酸首先通过结合捕获序列 T2a 捕获 5'端序列确定的靶标分子,随后以靶标分子为模板进行延伸反应,在 3'端添加折叠序列 T1s 的互补链 T1a,得到的延长的捕获寡核苷酸。T1a 与 T1s 可以为完全互补,也可以为不完全互补,只要 T1a 与 T1s 能够诱发分子内的自我折叠并形成半发夹结构产物。所述半发夹结构产物继续在聚合酶的作用下进一步延伸,在 3'端添加第一通用序列 U1s 的互补链 U1a,得到的发夹式结构产物,该产物可以采用与第一通用序列 U1s 和第二通用序列 U2s 相同或部分相同的通用引物进行 PCR 扩增检测。具体方式为,通用引物 U1s (此处为说明方便使用 U1s 指代,实际

序列可以不完全与 U1s 相同) 在退火阶段与发夹式结构产物的 U1a 区域结合并进行延伸, 当发夹式结构产物的第二通用序列与折叠序列之间存在核酸延伸阻断位点时, 延伸在核酸延伸阻断位点处停止, 形成局部双链结构, 通用引物 U1s 延伸形成的产物, 刚好是通用引物 U1s 和 U2s 的 PCR 模板, 可以使用通用引物 U1s 和 U2s 进行后续 PCR 扩增检测。当发夹式结构产物的第二通用序列与折叠序列之间不存在核酸延伸阻断位点时, 通用引物 U1s 延伸形成完整的双链结构, 新生成的双链结构的局部区域是通用引物 U1s 和 U2s 的 PCR 模板, 可以使用通用引物 U1s 和 U2s 进行后续 PCR 扩增检测。

在单通用引物扩增中, 捕获寡核苷酸主要包括三个区域: 第一通用序列 U1s、折叠序列 T1s 和结合捕获序列 T3a, 捕获寡核苷酸首先通过结合捕获序列 T3a 捕获 5'端序列确定的靶标分子。随后以靶标分子为模板进行延伸反应, 在 3'端添加折叠序列 T1s 的互补链 T1a, 得到的延长的捕获寡核苷酸。T1a 与 T1s 可以为完全互补, 也可以为不完全互补, 只要 T1a 与 T1s 能够诱发分子内的自我折叠并形成半发夹结构产物。所述半发夹结构产物继续在聚合酶的作用下进一步延伸, 在 3'端添加第一通用序列 U1s 的互补链 U1a, 得到的发夹式结构的中间产物, 该中间产物可以采用与第一通用序列 U1s 相同或部分相同的通用引物、和靶标分子的特异性引物进行 PCR 扩增检测。具体方式为, 通用引物 U1s (此处为说明方便使用 U1s 指代, 实际序列可以不完全与 U1s 相同) 在退火阶段与发夹式结构产物的 U1a 区域结合并进行延伸, 当发夹式结构产物的结合捕获序列与折叠序列之间存在核酸延伸阻断位点时, 延伸在核酸延伸阻断位点处停止, 形成局部双链结构, 通用引物 U1s 延伸形成的产物, 刚好是通用引物 U1s 和特异性引物 T2a 的 PCR 模板, 可以使用通用引物 U1s 和特异性引物 T2a 进行后续 PCR 扩增检测。当发夹式结构产物的结合捕获序列与折叠序列之间不存在核酸延伸阻断位点时, 通用引物 U1s 延伸形成完整的双链结构, 新生成的双链结构的局部区域是通用引物 U1s 和特异性引物 T2a 的 PCR 模板, 可以使用通用引物 U1s 和特异性引物 T2a 进行后续 PCR 扩增检测。

实施例 2 5'端序列明确的产物的构建

本申请的方法需要采用 5'端序列明确的样本来启动由捕获寡核苷酸介导的延伸反应, 构建 5'端序列明确的产物的策略如图 2 所示: ①例如针对靶标分子设计核酸延伸阻断剂来阻断 DNA 聚合酶的延伸, 来得到 5'端序列确定的产物, ②针对靶标分子中的特异性酶切位点采用不同的切割酶进行切割反应, 来得到 5'端序列确定的产物, ③或针对靶标分子设计低浓度的特异性引物进行特异性扩增, 从而得到 5'端序列确定的产物。

实施例 3 miRNA27a 和 let-7a 的 qPCR 检测

microRNA (miRNA) 是一类长度为 19-25 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA, 在真核细胞中普遍存在, 控制着超过 50% 的编码基因的活性。

本实施例对 miRNA27a 和 let-7a 进行检测, 步骤如下:

(1) 人工合成 miRNA27a 和 let-7a 序列;

(2) 向含有 miRNA27a 和 let-7a 序列的反应体系中同时加入 miRNA27a 和 let-7a 基因的捕获寡核苷酸、通用引物和检测探针, PCR 检测 miRNA27a 和 let-7a, 采取的 PCR 扩增体系为模板 RNA、5 nM 捕获寡核苷酸、150 nM 第一通用引物、150 nM 第二通用引物、150 nM 检测探针、1 U 反转录酶、1U Taq 聚合酶、200 μ M dNTP、4.5 mM $MgCl_2$ 和 2 $\times$ PCR 缓冲液, 终体积为 20 μ L; PCR 反应程序为 42 度 1h, 94 $^{\circ}$ C 灭活、预变性 15min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 66 $^{\circ}$ C 90 s, 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环; 在 ROCHE 仪器 (480) 上进行实时 PCR, 对相应的荧光数值进行采集。

采用的通用引物、捕获寡核苷酸、检测探针的组合包括:

第一通用引物 (SEQ ID NO: 1)

5-GCGATCCGCACCGTCAATTCG;

第二通用引物 (SEQ ID NO: 2)

5-GAGGTCCGATCCATCCAGACC;

let-7a 采用的捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 3)

5-CCGCACCGTCAATTCGTGAGGTAGTAGG-spacer-CCGATCCATCCAGACCTTTAACTATACAAC;

let-7a 检测探针 (SEQ ID NO: 4)

5-FAM-TGAGGTAGTAGGT-MGB;

miRNA27a 采用的捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 5)

5-CCGCACCGTCAATTCGTTACAGTGGC-spacer-CCGATCCATCCAGACCTTTGCGGAACTTAG;

miRNA27a 检测探针 (SEQ ID NO: 6)

5-ROX-GTTCACAGTGGC-MGB。

检测结果如图 3 所示, 曲线 miRNA27a 为 miRNA27a 的扩增曲线, 曲线 let 7a 为 let 7a 扩增曲线。由此说明, 本申请可以利用通用引物可以同时检测 miRNA 27a 及 let-7a, 且 Ct 值相同, 即实现了两个 miRNA 的等效扩增。

实施例 4 人源基因多重检测

本实施例对人源基因 DNA 进行检测, 步骤如下:

(1) 提取 HeLa 细胞系的基因组 DNA, 梯度稀释后并作为模板;

(2) 采用核酸限制性内切酶 AluI 对基因组进行酶切反应, 反应体系为 10×酶切缓冲液 2 μL, 不同浓度的基因组 DNA, 体系共 20 μL; 反应条件为 37°C 孵育 1 小时; 酶切反应结束后, 将体系加热至 85°C, 孵育 10 分钟, 对 AluI 进行热灭活;

(3) 分别向上述酶切反应体系中加入各基因捕获寡核苷酸、通用引物, 进行 PCR 扩增, 采取的 PCR 扩增体系包括酶切 DNA 模板、5 nM 捕获寡核苷酸、150 nM 第一通用引物、150 nM 第二通用引物、1U Taq 聚合酶、200 μM dNTP、4.5 mM MgCl₂ 和 2×PCR 缓冲液, 终体积为 20 μL; PCR 反应程序为 94°C 预变性 5 min; 94°C 10 s, 66°C 90 s, 10 个循环; 94°C 10 s, 65°C 20 s, 40 个循环; 在 ROCHE 仪器 (480) 上进行实时 PCR, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

采用的捕获寡核苷酸、通用引物组合包括:

第一通用引物 (SEQ ID NO: 7)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACG;

第二通用引物 (SEQ ID NO: 8)

5-CGCAATCAGGCAATACCATAGC;

IL4 采用的捕获寡核苷酸 1 (SEQ ID NO: 9) (模板长度: 86 bp)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACGCTGCTAGAGAAGTTGA-spacer-CGCAATCAGGCAATACCATAGCG
GCTGCCACTGACCACCA;

GAPDH 采用的捕获寡核苷酸 2 (SEQ ID NO: 10) (模板长度: 104 bp)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACGCTGCTTAGACGCTGGA-spacer-CGCAATCAGGCAATACCATAGCG
TCGCGGGAGGCTGCT;

Homo sapiens actin alpha 1 采用的捕获寡核苷酸 3 (SEQ ID NO: 11) (模板长度: 137 bp)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACGCTTCCCCTTCTCAGCCTTGACGCAATCAGGCAATACCATAGCCA
TTGACCTCAACTACATGG;

18S ribosomal 1 采用的捕获寡核苷酸 4 (SEQ ID NO: 12) (模板长度: 200 bp)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACGCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-spacer-ATCAGGCAATACCATAGCGT
CCCTCTAAGAAGTTGG;

18S ribosomal 2 采用的捕获寡核苷酸 5 (SEQ ID NO: 13) (模板长度: 300 bp)

5-ACTGGACGAGCTGATTTACGCTACCCGCCAGAACTAGA-spacer-CGCAATCAGGCAATACCAT
AGCCACCAGGCCGGAGCCATTG;

结果如图 4 所示, 泳道 1 为 20 bp ladder, 泳道 2 为 Saimiri sciureus interleukin 4 (IL4) 基因扩增产物, 泳道 3 为 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 基因扩增产物, 泳道 4 为 Homo sapiens actin alpha 1 基因扩增产物, 泳道 5 为 18S ribosomal 1 扩增产物, 泳道 6 为 18S ribosomal 2 扩增产物, 泳道 7 为多重扩增结果, 均为阳性。

由此说明, 本申请利用通用引物对不同的人源性基因进行灵敏、特异地多重检测。

实施例 5 结核分枝杆菌的利福平耐药突变检测

针对结核分枝杆菌的利福平耐药突变 (*rpoB* 基因的 526 位点突变), 结合错配修复酶和通用引物进行多位点的耐药突变多重检测。

步骤如下:

(1) 往合成好的结核分枝杆菌突变质粒中加入与野生基因组完全互补的人工序列浓度为 100nM, 将体系加热至 95℃, 孵育 10 分钟, 将温度降低到 60℃ 杂交孵育 30 分钟, 人工序列和突变质粒杂交产生错配, 缓慢降低温度至室温, 得到人工序列与基因组杂交的产物;

(2) 采用错配酶 T7E1 分别对步骤 (1) 得到的杂交产物进行酶切反应, 反应体系为 10×酶切缓冲液 2 μL, 不同浓度的杂交产物, 体系共 20 μL; 反应条件为 37℃ 孵育 1 小时; 酶切反应结束后, 将体系加热至 85℃, 孵育 10 分钟, 对错配酶进行热灭活;

(3) 分别向上述酶切反应体系及未酶切处理的野生质粒体系中加入相应的捕获寡核苷酸、通用引物和检测探针, PCR 检测 526 位点突变状态, 采取的 PCR 扩增体系包括酶切 DNA 模板、5 nM 捕获寡核苷酸、150 nM 第一通用引物、150 nM 第二通用引物、150 nM 检测探针、1U Taq 聚合酶、200 μM dNTP、4.5 mM MgCl₂ 和 2×PCR 缓冲液, 终体积为 20 μL; PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 10 s, 66℃ 90 s, 10 个循环; 94℃ 10 s, 65℃ 20 s, 40 个循环; 在 ROCHE 仪器 (480) 上进行实时 PCR, 对相应的荧光数值进行采集。

第一通用引物 (SEQ ID NO: 8)

5-CGCAATCAGGCAATACCATAGC;

第二通用引物 (SEQ ID NO: 14)

5-GAGCGCAGGTCGTACTCG;

526 突变捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 15)

5-CAGGCAATACCATAGCTTGTGGGTCAACCCCGACAGAGCGCAGGTCGTACTCGTGCACCAGC
CAGCTGAG;

526 突变检测探针 (SEQ ID NO: 16)

5-FAM-CCAATTCATGGACCAGAACAAAC-MGB;

人工序列 (SEQ ID NO: 17)

5-GGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTGCG。

结果如图 5 所示, 曲线 A 为突变质粒扩增曲线, 曲线 a 为野生质粒扩增曲线。

由此说明, 本申请能够在合适的人工序列帮助下, 利用通用引物对结核分枝杆菌的利福平耐药突变进行灵敏、特异地检测。

实施例 6 人源 Septin 9 基因甲基化的 qPCR 检测

Septin 9 基因位于人类染色体 17q25.3, 是 Septin 基因家族成员, 参与调控胞质分裂和细胞周期等细胞生物学过程。

由于组成细胞的多样性, 采用现有技术获得的生物样本 DNA 往往是非甲基化 DNA 和甲基化 DNA 的混合物, 如: 癌症组织 DNA 的来源包括发生 DNA 甲基化的癌细胞和未发生 DNA 甲基化的正常细胞; 外周血游离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 的主要来源是未发生 DNA 甲基化的正常白细胞, 而随着癌细胞凋亡和衰亡, 进入外周血中的癌细胞 DNA 的含量一般少于 0.1%。因此, 用于检测 Septin 9 基因甲基化 DNA 的方法需要能够有效区分甲基化 DNA 和非甲基化 DNA, 特异性地对样本中发生甲基化的 DNA 进行检测。

本实施例对人源 Septin 9 基因的甲基化 DNA 进行检测, 步骤如下:

(1) 分别提取 Jurkat 细胞系和 HeLa 细胞系的基因组 DNA, 测序鉴定 Septin 9 基因的甲基化状态;

(2) 采用甲基化依赖型限制性内切酶 *GlaI* 分别对 Jurkat 细胞系、HeLa 细胞系的基因组 DNA、阴性对照 NC 进行酶切反应, 反应体系为 10×酶切缓冲液 2 μL, 不同浓度的基因组 DNA, 体系共 20 μL; 反应条件为 37℃ 孵育 1 小时; 酶切反应结束后, 将体系加热至 85℃, 孵育 10 分钟, 对 *GlaI* 进行热灭活;

(3) 分别向上述酶切反应体系中加入 Septin 9 基因捕获寡核苷酸、通用引物和检测探针, PCR 检测 Septin 9 基因的甲基化状态, 采取的 PCR 扩增体系包括酶切 DNA 模板、5 nM 捕获寡核苷酸、150 nM 通

用引物、150 nM 特异性引物、150 nM 检测探针、1U Taq 聚合酶、200 μM dNTP、4.5 mM MgCl₂ 和 2×PCR 缓冲液，终体积为 20 μL；PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min；94℃ 10 s，66℃ 90 s，10 个循环；94℃ 10 s，65℃ 20 s，40 个循环；在 ROCHE 仪器（480）上进行实时 PCR，对相应的荧光数值进行采集。

采用的捕获寡核苷酸、通用引物、检测探针的组合包括：

捕获寡核苷酸（SEQ ID NO: 18）

5-TGTCAGCCAACGGTATTCGTTGACCGCGGGCTCGCCGCTGCCCTCCGC；

通用引物（SEQ ID NO: 19）

5-GCCTGTCAGCCAACGGTATTC；

特异性引物（SEQ ID NO: 20）

5-CGACCCGCTGCCCACCAG；

检测探针（SEQ ID NO: 21）

5-FAM-CCATCATGTCGGACCC-MGB；

人源 Septin 9 基因如 SEQ ID NO: 22 所示：

5-GCGC//GTTGACCGCGGGGTCCGACATGATGGCTGGTGGGCAGCGGGTCGCGCGGAGGGCAGC
GGCGAGGAA；

下划线为甲基化位置，//为酶切位置。

测序鉴定发现，Jurkat 细胞系基因组的 Septin 9 基因是非甲基化的，而 Hela 细胞系基因组的 Septin 9 基因是甲基化的。采用 qPCR 检测不同浓度的甲基化样本和非甲基化样本中 Septin 9 基因的甲基化状态，如图 6 所示，140 拷贝（140 copies）和 28 拷贝（28 copies）为 Septin 9 甲基化样本的扩增曲线，分别为 140 拷贝/反应及 28 拷贝/反应的 Septin 9 甲基化基因样本，16000 拷贝（16000 copies）为非甲基化样本的扩增曲线，NC 为 ddH₂O 的扩增曲线。

由此说明，本申请能够灵敏、特异地检测 SEPTIN 9 基因中的甲基化 DNA。

实施例 7 Septin 9 基因甲基化的 ddPCR 检测

与实施例 6 相比，在 STILLA 公司 NaicaTM crystal 数字 PCR 仪器上进行 Septin 9 基因的甲基化检测，甲基化依赖型限制性内切酶采用 GlalI，其他条件与实施例 6 相同。

结果如图 7 所示为不同浓度的甲基化样本中 Septin 9 基因的拷贝数，左边为 100 拷贝/反应散点图，右边为 10 拷贝/反应散点图。其中，虚线以上散点为阳性液滴，虚线以下散点为阴性液滴。

由此可见，本申请可以在数字 PCR 仪上实现高灵敏 Septin 9 基因中的甲基化 DNA 检测。

实施例 8 人源 Septin 9 和 RASS-F1 基因的甲基化双重检测

本实施例采用甲基化转移酶处理的 Jurkat DNA 作为甲基化阳性标准品，其中 CG 位点为 5mCG，进行 Septin 9 和 RASS-F1 基因的甲基化双重检测，甲基化依赖型限制性内切酶采用 GlalI，阴性对照为无核酸酶水。其中，针对 Septin 9 基因的捕获寡核苷酸为 SEQ ID NO: 18、通用引物为 SEQ ID NO: 19、特异性引物为 SEQ ID NO: 20、检测探针为 SEQ ID NO: 21，针对 RASS-F1 基因的捕获寡核苷酸为 SEQ ID NO: 23、通用引物为 SEQ ID NO: 19、特异性引物为 SEQ ID NO: 24、检测探针为 SEQ ID NO: 25。

捕获寡核苷酸（SEQ ID NO: 23）

5-TGTCAGCCAACGGTATTCGCCCAGCGGGTGCGAAGCACGGGCCCCAAC；

特异性引物（SEQ ID NO: 24）

5-CCATGTCGGGGGAGCCTG；

检测探针（SEQ ID NO: 21）

5-VIC-CCATCATGTCGGACCC-MGB；

检测探针（SEQ ID NO: 25）

5-FAM-CTCCCGCAGCTCAATG-MGB。

结果如图 8（A）为不同浓度的甲基化样本中 Septin 9 基因的灵敏度检测，从左至右分别为 140 拷贝/反应和 28 拷贝/反应；图 8（B）为不同浓度的甲基化样本中 RASS-F1 基因的灵敏度检测，从左至右分别为 140 拷贝/反应和 28 拷贝/反应。

由此说明,本申请都能够同时实现灵敏、特异地检测 **Septin 9** 及 RASS-F1 基因中的甲基化 DNA。

实施例 9 人源 **Septin 9** 基因甲基化位点检测特异性优化

本实施例采用甲基化转移酶处理的 Jurkat DNA 作为人源 **Septin 9** 基因甲基化阳性标准品, Jurkat DNA 作为人源 **Septin 9** 基因甲基化阴性标准品, 阴性对照 nc 为无核酸酶水。采用甲基化依赖型限制性内切酶 **GlaI** 对样本进行酶切处理, 分别用普通捕获寡核苷酸或 LNA 修饰捕获寡核苷酸以及通用引物 (SEQ ID NO: 19)、特异性引物 (SEQ ID NO: 20) 和检测探针 (SEQ ID NO: 21) (普通捕获寡核苷酸使用 FAM 通道; LNA 修饰捕获寡核苷酸使用 VIC 通道) 进行扩增检测。

采用的捕获寡核苷酸包括:

普通捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 26)

5-GCCTGTCAGCCAACGGTATTCGTTGACCGCGGGCTCGCCGCTGCCCTCCGC;

LNA 修饰捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 27)

5-GCCTGTCAGCCAACGGTATTCGTTGACC+G+CGCTCGCCGCTGCCCTCCGC (+后面的碱基代表该碱基修饰锁核酸);

人源 **Septin 9** 基因如 SEQ ID NO: 22 所示。

结果如图 9 (A) 和图 9 (B) 所示, 两种捕获寡核苷酸在 120 拷贝和 12 拷贝的阳性模板中都能显示阳性结果; 但是在普通捕获寡核苷酸体系中, 当非甲基化基因组 (jurkat DNA) 添加到 100 ng 的时候, 普通捕获寡核苷酸组产生非特异性扩增, 是由于捕获寡核苷酸的合成副产物与靶标分子结合延伸所引发的; 在捕获寡核苷酸的折叠序列引入 LNA 修饰后, 既能保证扩增效率 (能检测出 120 拷贝和 12 拷贝的阳性), 而且在高浓度非甲基化基因组 (100 ng) 中, 不会引发非特异性扩增, 其抑制非特异性扩增的机制是, 当折叠序列引入核酸类似物修饰后, 能在保证折叠区域碱基互补配对的情况下, 抑制引物的合成副产物延伸。所以通过结果可以看出, 折叠序列的核酸类似物修饰能提高检测体系的特异性。

实施例 10 折叠区域序列不完全相同的扩增结果

本实施例对人源 RASS-F1 基因的甲基化 DNA 进行检测, 步骤如下:

(1) 利用甲基化转移酶处理 Jurkat DNA, 构建完全甲基化的阳性基因组, 测序鉴定 RASS-F1 基因的甲基化状态;

(2) 采用甲基化依赖型限制性内切酶 **GlaI** 分别对甲基化阳性 Jurkat 基因组 DNA、阴性对照进行酶切反应, 反应体系为 10×酶切缓冲液 2 μL, 不同浓度的基因组 DNA, 体系共 20 μL; 反应条件为 37℃ 孵育 1 小时; 酶切反应结束后, 将体系加热至 85℃, 孵育 10 分钟, 对 **GlaI** 进行热灭活;

(3) 分别向上述酶切反应体系中加入 RASS-F1 基因捕获寡核苷酸、通用引物、特异性反向引物和检测探针, PCR 检测 RASS-F1 基因的甲基化状态, 采取的 PCR 扩增体系包括酶切 DNA 模板、5 nM 捕获寡核苷酸、150 nM 通用引物、150 nM 特异性引物、150 nM 检测探针、1U Taq 聚合酶、200 μM dNTP、4.5 mM MgCl₂ 和 2×PCR 缓冲液, 终体积为 20 μL; PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 10 s, 66℃ 90 s, 10 个循环; 94℃ 10 s, 65℃ 20 s, 40 个循环; 在 ROCHE 仪器 (480) 上进行实时 PCR, 对相应的荧光数值进行采集。

采用的捕获寡核苷酸、通用引物、检测探针的组合包括:

捕获寡核苷酸 (SEQ ID NO: 28)

5-GCCTGTCAGCCAACGGTATTCGCCCCAG+C+GGTTTTTGCCAG/spacer
18/GCGAAGCACGGGCCCAAC (+后面的碱基代表该碱基修饰锁核酸);

通用引物 (SEQ ID NO: 19)

5-GCCTGTCAGCCAACGGTATTC;

特异性引物 (SEQ ID NO: 29)

5-CCATGTCGGGGGAGCCTGAG;

检测探针 (SEQ ID NO: 30)

5-FAM-CTCCCGCAGCTCAATG-MGB;

人源 RASS-F1 基因如 SEQ ID NO: 31 所示;

5-GCGC//GCCAGCGGGTGCCAGCTCCCGCAGCTCAATGAGCTCAGGCTCCCCGACATGGCCCG
GTTGGGCCCCGTGCTTCGCTGG;

下划线为甲基化位置，//为酶切位置。

本实施例中，捕获寡核苷酸的折叠区域与靶标分子 5'末端序列不完全相同。采用 qPCR 检测不同浓度的甲基化阳性样本 RASS-F1 基因的甲基化状态，如图 10 所示，曲线 1、2、3 为 RASS-F1 甲基化样本的扩增曲线，分别为 120 拷贝/反应、40 拷贝/反应及 28 拷贝/反应的 RASS-F1 甲基化基因样本，阴性对照为添加 ddH₂O 的扩增曲线。

由此说明，本申请的捕获寡核苷酸折叠区域与靶标分子 5'末端序列只需有部分序列相同，即可实现扩增。

综上所述，本申请采用经过特殊设计的捕获寡核苷酸扩增 5'端序列明确的样本，形成发夹式结构产物，作为通用引物扩增反应的模板，实现了利用通用引物进行多重 PCR 扩增检测不同靶标分子的效果，避免了序列差异导致的扩增效率的偏差，特异性好，适于推广应用。

申请人声明，本申请通过上述实施例来说明本申请的详细方法，但本申请并不局限于上述详细方法，即不意味着本申请必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了，对本申请的任何改进，对本申请产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等，均落在本申请的保护范围和公开范围之内。

1、一种用于核酸扩增的捕获寡核苷酸，其从 5'端到 3'端依次包括第一通用序列、折叠序列和结合捕获序列；

其中，

所述折叠序列与靶标分子的 5'末端序列至少部分相同；且

所述结合捕获序列与靶标分子的非 5'末端序列互补结合。

2、根据权利要求 1 所述的捕获寡核苷酸，其中，所述捕获寡核苷酸还包括第二通用序列；

优选地，所述第二通用序列位于结合捕获序列的 5'端。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的捕获寡核苷酸，其中，所述捕获寡核苷酸还包括核酸延伸阻断位点；

优选地，所述核酸延伸阻断位点位于折叠序列的 3'端；

优选地，所述核酸延伸阻断位点位于第二通用序列的 5'端；

优选地，所述核酸延伸阻断位点修饰有 Spacer、硫代基团或尿嘧啶碱基中的任意一种或至少两种的组合。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的捕获寡核苷酸，其中，所述折叠序列修饰有核酸类似物；

优选地，所述核酸类似物包括肽核酸、锁核酸、转置碱基、2'-O,4'-C-亚甲基桥 RNA、2'-O-甲基 RNA 或 2'-氟 RNA 中的任意一种或至少两种的组合。

5、一种用于核酸扩增的试剂盒，其包括权利要求 1-4 任一项所述的捕获寡核苷酸。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其中，所述试剂盒还包括靶标分子预处理试剂；

优选地，所述靶标分子预处理试剂包括进行位点特异性切割的核酸酶、核酸延伸阻断剂或特异性引物中的任意一种或至少两种的组合；

优选地，所述进行位点特异性切割的核酸酶包括核酸外切酶和/或核酸内切酶；

优选地，所述核酸内切酶包括甲基化依赖型限制性内切酶、甲基化敏感性限制性内切酶或错配修复酶中的任意一种或至少两种的组合；

优选地，所述核酸延伸阻断剂包括肽核酸和/或锁核酸；

优选地，所述特异性引物的 5'端含有修饰基团；

优选地，所述修饰基团包括磷酸基团和/或硫代基团。

7、根据权利要求 5 或 6 所述的试剂盒，其中，所述试剂盒还包括通用引物；

优选地，所述通用引物的核酸序列与捕获寡核苷酸的第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同；

优选地，所述试剂盒还包括特异性引物。

8、根据权利要求 5-7 任一项所述的试剂盒，其中，所述试剂盒还包括检测探针；

优选地，所述检测探针标记有荧光基团和/或淬灭基团；

优选地，所述荧光基团标记在检测探针的 5'端；

优选地，所述淬灭基团标记在检测探针的 3'端；

优选地，所述荧光基团包括 FAM、VIC、JOE、TET、CY3、CY5、ROX、Texas Red 或 LC RED460 中的任意一种；

优选地，所述淬灭基团包括 BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabcyl 或 Tamra 中的任意一种。

9、一种核酸扩增方法，其包括：

(1) 使 5'端序列确定的靶标分子与权利要求 1 至 4 中任一项所述的捕获寡核苷酸接触，由此，所述捕获寡核苷酸的结合捕获序列与所述靶标分子结合；

(2) 使捕获寡核苷酸以靶标分子为模板进行延伸反应，由此，在捕获寡核苷酸的 3'末端添加与靶标分子互补的核苷酸，从而形成延伸的捕获寡核苷酸；

(3) 将延伸的捕获寡核苷酸在允许分子内自我折叠的条件下孵育，由此，延伸的捕获寡核苷酸通过延伸序列与折叠序列进行碱基互补配对，形成半发夹结构产物；及

(4) 使半发夹结构产物再进行延伸反应，由此，在 3'末端添加与第一通用序列互补的核苷酸，进而形成完整的发夹结构产物。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其中，所述方法还包括：以完整的发夹结构产物作为模板，采用通

用引物和/或特异性引物进行指数式扩增，得到扩增产物；

优选地，所述通用引物的核酸序列与捕获寡核苷酸的第一通用序列或第二通用序列相同或部分相同；

优选地，所述指数式扩增包括聚合酶链式反应；

优选地，所述方法还包括扩增产物与检测探针结合，进行检测的步骤。