

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810033313.1

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101497920A

[22] 申请日 2008.1.31

[21] 申请号 200810033313.1

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

[72] 发明人 阮康成 李 巍

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 3 页

[54] 发明名称

通过酶联免疫吸附方法检测小分子 RNA 芯片的方法

[57] 摘要

本发明属于生物技术领域，公开了一种通过酶联免疫吸附方法检测 miRNA 芯片的方法。本发明的方法首次将酶联免疫技术用于检测 miRNA，并且所述方法检测灵敏度高，只需要普通的数码相机、显微镜或扫描仪就可以检测芯片的数据，从而大大降低 miRNA 芯片检测的成本。

1. 一种检测 RNA 样品中待测 miRNA 的方法，其特征在于，所述方法包括：

(a) 将 RNA 样品加样于 miRNA 芯片，所述 miRNA 芯片上固定有对应于待测 miRNA 的探针，所述 RNA 样品携带酶联免疫可检测信号；从而使得待测核酸样品中的 miRNA 与 miRNA 芯片上相应的探针结合，在芯片上形成“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；和

(b) 利用酶联免疫法检测“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物中的酶联免疫可检测信号，从而确定 RNA 样品中待测 miRNA 的存在与否以及存在的量。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的酶联免疫可检测信号是生物素。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，步骤(b)包括：

(b1) 用所述酶联免疫可检测信号的偶联物与“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物反应，所述酶联免疫可检测信号的偶联物是亲和素，且该偶联物上携带酶标记物；从而在芯片上形成“酶标记物-偶联物-酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；和

(b2) 利用所述酶标记物对应的底物与“酶标记物-偶联物-标记物-miRNA-探针”复合物反应，从而确定待检测样品中待测 miRNA 的存在与否以及存在的量。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的酶标记物选自：辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的酶标记物对应的底物选自：用于碱性磷酸酶的对硝基苯磷酸酯或 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝；或用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺或四甲基联苯胺或 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 以碱性磷酸酶作为酶标记物且以 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝作为底物, 并且, 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝与“酶标记物-偶联物-酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物的反应时间是 15-120 分钟。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的 miRNA 芯片上的探针从 5' 到 3' 依次含有: 氨基-(A)_n-与 miRNA 互补的核苷酸序列;
其中, n=5-20。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, miRNA 芯片上, 探针的点样浓度是 0.7-47 μM。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 携带酶联免疫可检测信号的 RNA 样品的制备方法如下: 用高碘酸钠氧化 RNA 的 3'端邻羟基为双醛基, 再用酶联免疫可检测信号进行标记。

10. 一种检测待测 miRNA 的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有:
miRNA 芯片, 所述 miRNA 芯片上含有对应于待测 miRNA 的探针;
酶联免疫可检测信号分子; 和
识别酶联免疫可检测信号分子的酶联免疫试剂。

通过酶联免疫吸附方法检测小分子 RNA 芯片的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，更具体地，本发明涉及一种通过酶联免疫吸附方法检测小分子 RNA(miRNA) 芯片的方法。

背景技术

近年来，microRNA 作为调控基因的一个大类渐渐被人们所熟知。microRNA 广泛的存在于多细胞生物中，并且在发育调节，细胞凋亡，细胞增殖，应急反应等诸多生物过程中起着重要的调节作用。面对种类繁多的 miRNA，基因芯片凭借其微量、快速、大规模平行检测等优势，在 miRNA 的研究中发挥着越来越重要的作用。

目前检 miRNA 的技术主要采用 miRNA 表达谱检测技术，常用的研究方法是 miRNA 的克隆和 Northern 杂交。通过克隆特异生物样品的 miRNA 不但可以发现新的 miRNA，而且 miRNA 被克隆的频率也反映其丰度。Northern 杂交可以比克隆更为精确地反映 miRNA 表达谱，是研究 miRNA 表达谱的常规方法。但是，Northern 杂交一次只能研究一种 miRNA 在不同组织或器官中的分布，而且不同 miRNA 的 Northern 杂交不可比较。Northern 杂交和克隆的方法一样，都非常费时费力，而且还要应用放射性同位素标记。

寡核苷酸芯片技术是一种微量、快速、大规模平行检测 mRNA 表达谱的技术，它通过探针设计，使得其所有探针在同一杂交条件下可以特异性地与相应的 mRNA 结合。反应时总 RNA 或者带 poly(A) 的总 mRNA 通过荧光标记引物 (oligo(T) 或随机引物) 或者反转录过程中掺入荧光标记的方法标记 cDNA，然后与芯片杂交进行检测。只需要微量的样品，就可以平行的检测所有的 microRNA 在组织，细胞中的表达情况。然而 miRNA 表达谱的检测不同于 mRNA 表达谱的检测之处在于 miRNA 与 mRNA 相比太短，难以进行探针设计，而且序列上没有象 mRNA 一样的 poly(A) 尾巴，不能象 mRNA 一样可以用荧光标记的 oligo(T) 进行反转录标记。所以，荧光标记是 miRNA 芯片的一个难点。现有技术中所用的 miRNA 荧光标记方法各不相同，或者采用通过随机引物反转录标记 miRNA 的

cDNA 的方法，或者采用 RT-PCR 的方法标记 miRNA 正义链，或者采用直接标记 miRNA 的荧光标记方法。相应于标记的方法的不同，探针也有所不同。

综上所述，现有的 miRNA 芯片大多基于荧光标记技术，芯片的检测需要昂贵的荧光扫描仪，限制了 miRNA 芯片的广泛应用，尤其是在临床检测中的应用。因此本领域迫切需要开发简便有效且低成本的检测 miRNA 芯片的方法。

发明内容

本发明的目的就是提供一种简便有效且低成本的检测 miRNA 芯片的方法。

在本发明的第一方面，提供一种检测 RNA 样品中待测 miRNA 的方法，所述方法包括：

(a) 将 RNA 样品加样于 miRNA 芯片，所述 miRNA 芯片上固定有对应于(如与待测 miRNA 互补)待测 miRNA 的探针，所述 RNA 样品携带酶联免疫可检测信号；从而使得待测核酸样品中的 miRNA 与 miRNA 芯片上相应的探针结合，在芯片上形成“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；和

(b) 利用酶联免疫法检测“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物中的酶联免疫可检测信号，从而确定 RNA 样品中待测 miRNA 的存在与否以及存在的量。

在另一优选例中，所述的酶联免疫可检测信号是生物素或其类似物。

在另一优选例中，步骤(b)包括：

(b1) 用所述酶联免疫可检测信号的偶联物与“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物反应，所述酶联免疫可检测信号的偶联物是亲和素或其类似物，且该偶联物上携带酶标记物；从而在芯片上形成“酶标记物-偶联物-酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；

(b2) 利用所述酶标记物对应的底物与“酶标记物-偶联物-标记物-miRNA-探针”复合物反应，从而确定待检测样品中待测 miRNA 的存在与否以及存在的量。

在另一优选例中，所述的酶标记物选自(但不限于)：辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

在另一优选例中，所述的酶标记物对应的底物选自(但不限于)：用于碱性磷酸酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP)或 5-溴-4-氯-3-

吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝 (BCIP/NBT)；或用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺 (OPD)、四甲基联苯胺 (TMB) 或 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸) (ABTS)。

在另一可选例中，所述的酶联免疫可检测信号是地高辛；所述酶联免疫可检测信号的偶联物是抗地高辛抗体。

在另一可选例中，所述的酶联免疫可检测信号直接是酶标记物。较佳地，所述的酶标记物选自：辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

在另一优选例中，以碱性磷酸酶作为酶标记物且以 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝作为底物，并且，5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸/硝基四氮唑蓝与“酶标记物-偶联物-酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物的反应时间是 15-120 分钟；优选的是 40-100 分钟；更优选 70-90 分钟。

在另一优选例中，所述的 miRNA 芯片上的探针从 5' 到 3' 依次含有：氨基-(A)_n-与 miRNA 互补的核苷酸序列；其中 n=5-20 (优选 8-12)。

在另一优选例中，miRNA 芯片上，探针的点样浓度是 0.7-47 μM；优选的是 3-47 μM；更优选的是 6-25 μM。

在另一优选例中，RNA 样品中 RNA 浓度为 35pM-40nM；优选的是 70pM-35.2nM；更优选的是 280pM-35.2nM。

在另一优选例中，携带酶联免疫可检测信号的 RNA 样品的制备方法如下：用高碘酸钠氧化 RNA 的 3'端邻羟基为双醛基，再用酶联免疫可检测信号进行标记。

在另一优选例中，所述的 RNA 样品是 15-40bp 的 RNA；更优选 18-31bp 的 RNA。

在本发明的第二方面，提供一种检测待测 miRNA 的试剂盒，所述试剂盒含有：

miRNA 芯片，所述 miRNA 芯片上含有对应于待测 miRNA 的探针；
酶联免疫可检测信号分子；和
识别酶联免疫可检测信号分子的酶联免疫试剂。

在另一优选例中，所述的酶联免疫可检测信号选自：生物素、生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯、长臂生物素、或其混合物。

在另一优选例中，试剂盒中还包含高碘酸钠。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1 显示了应用酶联免疫吸附法检测 miRNA 芯片信号的原理。其中，图 1A 为利用高碘酸钠处理 RNA 使之 3' 端标记上生物素的过程。图 1B 为本发明的一种优选的 miRNA 的检测过程。

图 2 显示了酶联免疫吸附反应时间对灰度值的影响。其中，芯片上寡聚核苷酸的浓度为 $20\ \mu\text{M}$ 。生物素偶联的模拟 miRNA 的浓度分别为 50nM ， 5nM ， 0.5nM 。

图 3 显示了点的灰度值和芯片上固定的寡聚核苷酸探针浓度的依赖关系。其中，内插图是不同浓度的寡聚核苷酸探针所形成的微阵列的酶联免疫吸附反应检测图像。1 到 7 列的寡聚核苷酸探针点样浓度依次为： $47\ \mu\text{M}$ ， $23\ \mu\text{M}$ ， $12\ \mu\text{M}$ ， $6\ \mu\text{M}$ ， $3\ \mu\text{M}$ ， $1.5\ \mu\text{M}$ ， $0.7\ \mu\text{M}$ 。生物素偶联的模拟 miRNA 浓度为 50nM 。酶联免疫吸附反应时间为 1 小时，温度为 37°C 。曲线中的数据取自内插图中 4 个重复点的平均值。

图 4 显示了溶液中不同浓度生物素偶联的模拟 miRNA 的检测。其中，内插图是用酶联免疫吸附方法检测溶液中不同浓度的生物素偶联的模拟 miRNA 的图像。微阵列中所有的点都是由 $23\ \mu\text{M}$ 的寡聚核苷酸探针形成的。生物素偶联的模拟 miRNA 的浓度依次为： 70.4nM ， 35.2nM ， 17.6nM ， 8.8nM ， 4.4nM ， 2.2nM ， 1.1nM ， 0.55nM ， 0.28nM ， 0.14nM ， 0.07nM ， 0.03nM 。酶联免疫吸附反应的时间为 1 小时，温度为 37°C 。曲线的数据取自内插图中 4 个重复点的平均值。

图 5 显示了酶联免疫吸附方法和荧光方法检大鼠附睾测 miRNA 芯片的图像。其中，酶联免疫吸附时间为 80min ，温度为 37°C 。荧光图像为 Perkin Elmer 公司的 ScanArray 5000 扫描。

具体实施方式

本发明人通过深入而广泛的研究，首次揭示一种基于酶联免疫技术 (ELISA) 的检测 miRNA 的方法，所述方法可以有效的检测 miRNA 芯片的杂交结果，检测灵敏度高；并且只需要普通的数码相机、显微镜或扫描仪就可以检测芯片的数

据，从而大大降低 miRNA 芯片检测的成本。在此基础上完成了本发明。

检测方法

本发明的方法基于酶联免疫技术和芯片技术。也即：将对应于 miRNA 的探针（如所述探针与该 miRNA 互补）固定在固相载体上，使标记有酶联免疫可检测信号的 RNA 样品与探针反应，从而相应的 miRNA 可被捕获。由于相应的 miRNA 上携带酶联免疫可检测信号，因而可通过常规的酶联免疫方法加以检测。酶联免疫技术有着制备方便，低成本，以及检测设备简单等优点。

因此，本发明提供一种检测 RNA 样品中待测 miRNA 的方法，所述方法包括：

(a) 将 RNA 样品加样于 miRNA 芯片，所述 RNA 样品携带酶联免疫可检测信号；从而使得待测核酸样品中的 miRNA 与 miRNA 芯片上相应的探针结合，在芯片上形成“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；和

(b) 利用酶联免疫法检测“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物中的酶联免疫可检测信号，从而确定待检测样品中待测 miRNA 的存在与否以及存在的量。

所述的酶联免疫可检测信号是指适合于被标记到 RNA 样品上且可通过酶联免疫方法进行检测的信号。优选的，所述的酶联免疫可检测信号选自：生物素，或其类似物（如生物素 N-羟基丁二酰亚胺酯、长臂生物素）。

将酶联免疫可检测信号标记到 RNA 样品上的方法可以选择直接氧化法，逆转录法或 PCR 法，这些方法的具体操作过程是本领域已知的技术。作为本发明的优选方式，预先对 RNA 样品进行处理，所述的处理方法是：用高碘酸钠氧化 RNA 的 3' 端邻羟基为双醛基，再用酶联免疫可检测信号进行标记。例如，当酶联免疫可检测信号是生物素时，先用高碘酸钠氧化 RNA 的 3 端邻羟基为双醛基，再将生物素酰肼标记到所述双醛基位置，如图 1A 所示。由于该方法的标记针对 RNA 的 3' 端，而非在磷酸骨架上直接标记（该标记法影响 RNA 与探针的杂交效率），因而对于 RNA 与探针的杂交没有明显的影响，从而有利于提高检测的灵敏度，有效避免假阴性。特别是对于 miRNA 而言，由于其序列短，如在磷酸骨架上直接标记更可能影响到杂交。

由于 miRNA 均是具有约 22bp 序列的短链 RNA，因此作为本发明的优选方式，为了提高检测效率，还可对从组织（如动物组织或植物组织）中分离得到的总 RNA 进行进一步分离，从中选出序列长度在 15-40bp 的 RNA（小片段 RNA）；更优

选的是选出序列长度在 18-31bp 的 RNA。

作为本发明的优选方式，所述的酶联免疫可检测信号是生物素或其类似物。因此可通过检测生物素的酶联免疫方法来进行检测。优选的，步骤(b)包括：

(b1) 用生物素的偶联物与“酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物反应，所述偶联物是亲和素或其类似物(如卵白亲和素、链亲和素)，且该偶联物上携带酶标记物；从而在芯片上形成“酶标记物-偶联物-酶联免疫可检测信号-miRNA-探针”复合物；

(b2) 利用所述酶标记物对应的底物与“酶标记物-偶联物-标记物-miRNA-探针”复合物反应，从而确定待检测样品中 miRNA 的存在与否以及存在的量。

在确定了酶联免疫可检测信号或其偶联物的类型后，本领域技术人员熟知如何选择合适的酶标记物。例如，所述的酶标记物选自(但不限于)：辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸(酯)酶(AP)、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶等。它们均是商品化的试剂。

在确定了所用的酶标记物的类型后，本领域技术人员熟知如何选择对应于所述酶标记物的底物。所述的底物通常能够被相应的酶标记物催化且显色。所述的底物比如：用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)(ABTS)；用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP)等等。它们均是商品化的试剂。

另外可选的酶联免疫可检测信号还有地高辛或其类似物，可采用偶联有酶标记物的抗地高辛抗体与地高辛结合，从而利用酶标记物的底物显色。

另一种可选的方式是，直接将酶标记物(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)标记于 RNA 样品，从而利用酶标记物的底物显色。然而这种方法的难点是将酶标记物直接标记于 RNA 样品上较为不稳定，酶容易在标记过程中失活，易于出现假阴性。

酶联免疫吸附反应时间的选择较为关键，因此作为本发明的优选方式，在 RNA 样品上标记生物素，与亲和素-碱性磷酸酶反应，且以 BCIP/NBT 作为底物。优选的，BCIP/NBT 与“碱性磷酸酶-亲和素-生物素-miRNA-探针”复合物的反应时间是 15-120 分钟；更优选的是 40-100 分钟，最优选 70-90 分钟。

作为本发明的优选方式，RNA 样品中 RNA 浓度为 35pM-40nM；优选的是 70pM-35.2nM；更优选的是 280pM-35.2nM。

作为本发明的优选方式，miRNA 芯片上，探针的点样浓度是 0.7-47 μ M；优选的是 3-47 μ M；更优选的是 6-47 μ M。

miRNA 芯片的制备方法是本领域已知的，通常，miRNA 芯片包括常规固相载体(即基片)，和位于基片上点样区的寡聚核苷酸探针，所述探针例如可通过共价固定方式连接到固相载体上。点样探针可以是与任何种类的 miRNA 互补的寡聚核苷酸序列或者与 miRNA 序列对应的寡聚核苷酸序列。作为本发明的优选方式，所述的 miRNA 芯片上的探针从 5' 到 3' 依次含有：氨基-(A)_n-与 miRNA 互补的核苷酸序列；其中 n=5-20(优选 8-12，如 10)。所述的固相载体就是在其上点有寡聚核苷酸探针的基片材料，常见的载体包括：玻璃片，塑料片，硝酸纤维(NC)膜，PDVF 膜等，其中特别优选的是玻璃载玻片。

基于酶联免疫反应技术，如 miRNA 与探针发生了特异性结合，则可发生显色反应或沉淀反应。因此，从芯片上读取检测结果的方法非常简单，例如可以用普通数码相机，优选地配合普通显微镜获取图像。

利用本发明的方法不仅可以确定待测 RNA 样品中是否存在特定的 miRNA，而且还可以确定存在的 miRNA 的丰度。例如可通过观察一定时间内沉淀在 miRNA 芯片表面沉积物的量(如反映为灰度值)或显色的强度来确定。

优选的，可测量芯片上每个点的灰度值(或显色强度)，与同一芯片上的标准曲线对照，从而间接地确定每个点所结合 miRNA 的量。

作为本发明的优选实例，miRNA 的检测过程如图 1B 所示，在该代表性的优选例中，miRNA 芯片点样区的点样探针是与 miRNA 互补的寡聚核苷酸探针，生物素标记的 miRNA 与探针杂交并结合于探针，然后将可与生物素偶联的亲合素-碱性磷酸酶复合物加样于芯片，从而碱性磷酸酶被连接上去，在加入碱性磷酸酶底物 BCIP/NBT 后，发生沉淀反应。该优选方法的检测准确性好、灵敏度高。

本发明实现了最低固定在载玻片上的寡聚核苷酸探针的检测限量为 0.7 μ M，线性动态范围从 0.7 μ M 到 47 μ M。可以检测到溶液中 miRNA 的最低浓度

为 35pM，线性动态范围为 35pM 到 35.2nM。因此，与常规的荧光芯片检测方法相比，本发明的酶联免疫吸附方法得到了和荧光检测方法相近的结果，可以达到实际应用的要求，同时成本却可以大大降低。

试剂盒

本发明还提供一种检测 miRNA 的试剂盒，所述试剂盒含有：miRNA 芯片；酶联免疫可检测信号分子；和识别酶联免疫可检测信号分子的酶联免疫试剂。

在另一优选例中，所述的试剂盒中还含有高碘酸钠。更优选的还含有亚硫酸钠等试剂。

作为本发明的优选方式，所述的酶联免疫可检测信号选自：生物素或其类似物、地高辛或其类似物。

作为本发明的优选方式，所述的识别酶联免疫可检测信号分子的酶联免疫试剂选自：亲和素或其类似物；抗地高辛抗体；酶标记物如可选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸(酯)酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶等；底物如用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺、四甲基联苯胺、2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)；用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯等。

本发明的主要优点在于：

(1) 本发明将酶联免疫检测技术有效引入到 miRNA 芯片的检测中。建立了一种简易，低成本的 microRNA 芯片检测方法，大大降低了 miRNA 芯片的使用门槛。

(2) 本发明的方法不需要昂贵的荧光试剂，检测试剂的制备和应用都很方便且成本低廉；不需要昂贵的专用检测仪器，检测设备简单易操作。因此，本发明的方法在临床检验和一般的实验室应用中有广泛的应用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。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 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例1 大鼠miRNA芯片的制备

材料

玻璃载玻片、(3-缩水甘油醚基丙基)三甲氧基硅烷 [(3-glycidyoxypropyl)-trimethoxysilane, GOPTS] 购自Sigma公司。亲和素偶联的碱性磷酸酶购自R&D公司, BCIP/NBT购自Calbiochem公司。DNA探针合成于Invitrogen公司。RNA抽提试剂为来自华舜公司的RNArose。实验用大鼠为购自上海实验动物中心的9周SD雄性大鼠。

设备

Olympus C-4000Z数码照相机、普通显微镜。生物芯片点样仪为Cartesian公司产品PixSys 5500, 装配点样针为TeleChem公司产品SMP4。激光共聚焦生物芯片扫描仪为Genepix 4000B。

芯片制作

标准的25 mm × 75 mm的玻璃载玻片按照Liang, R. Q. 等, Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. *J Immunol Methods*, 2004 (285), 157-163中所描述的方法活化。经过活化的玻片即可共价固定带有氨基修饰的探针分子, 探针序列见表1, 8个探针均取自miRNA Registry(参见Griffiths-Jones, S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 2006 (342), 129-138)。每一条探针的5'端均为氨基修饰, 然后是10个A构成的连接序列以避免杂交中可能产生的空间位阻效应, 然后是所针对的特异miRNA的全长互补序列。探针溶于50 mM pH 8.5的磷酸缓冲液(含10 mM EDTA, PBSE)中, 浓度为20 μM。用装有ArrayIt SMP4点样针(TeleChem公司)的PixSys 5500生物芯片点样仪(Cartesian公司)将探针点到活化好的片基上。相对湿度保持为55%。点间距设置为0.25 mm, 点直径为100 μm左右。

芯片在使用前用含1% BSA的PBSE溶液封闭以淬灭芯片表面没有反应的活性基团。用于考察miRNA芯片检测灵敏度和动态范围的模拟miRNA序列为5' > TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G (SEQ ID NO: 1)-生物素 <3', 模型芯片的探针按表1的相同原则设计。用PBSE缓冲液配制47 μM的模拟芯片探针, 级联2

倍稀释10次。各取10 μ l 加到384孔板中，在55%的相对湿度下用PixSys 5500生物芯片点样仪在GOPTMS活化的载玻片上制作所需的微阵列，每个点的体积约为1nl，点距为300 μ M，点的直径约为100 μ m。

表 1

miRNA	针对特异miRNA的寡核苷酸探针
rno-miR-290	5' -氨基-(A) ₁₀ AAAAAAGTGCCCCATAGTTTGAG (SEQ ID NO: 2) - 3'
rno-miR-450a	5' -氨基-(A) ₁₀ CATTAGGAACACATCGCAAAAA (SEQ ID NO: 3) - 3'
rno-miR-487b	5' -氨基-(A) ₁₀ AGTGGATGACCCTGTACGATT (SEQ ID NO: 4) - 3'
rno-miR-183	5' -氨基-(A) ₁₀ AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID NO: 5) - 3'
rno-miR-347	5' -氨基-(A) ₁₀ TGGGCGACCCAGAGGGACA (SEQ ID NO: 6) - 3'
rno-miR-128a	5' -氨基-(A) ₁₀ AAAGAGACCGGTTCACTGTGA (SEQ ID NO: 7) - 3'
rno-miR-154	5' -氨基-(A) ₁₀ CGAAGGCAACACGGATAACCTA (SEQ ID NO: 8) - 3'
rno-miR-297	5' -氨基-(A) ₁₀ CATGCATACATGCACATACAT (SEQ ID NO: 9) - 3'
阴性对照	5' -氨基-(A) ₁₀ GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT (SEQ ID NO: 10) - 3'

实施例2 大鼠miRNA的获得和标记

用RNArose按说明书从液氮冷冻的9周龄的SD大鼠附睾中抽提出总RNA，在15%的聚丙烯酰胺尿素变性胶电泳，紫外灯下割胶回收位于18nt和31nt的DNA Ruler间的聚丙烯酰胺胶。浸胶回收小片段RNA，并用乙醇沉淀，-20℃保存。小分子RNA的生物素化按Liang, R. Q.等, An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res*, 2005 (33), e17中所描述的方法进行：自90 μ g总RNA获得的18 μ l 的0.5 μ g/ μ l小分子RNA用9 μ l的 0.25 M pH 5.6的乙酸钠缓冲液和4 μ l的DEPC水稀释，加5 μ l 的5 mM高碘酸钠溶液，25℃避光反应90 min。然后加入2倍于高碘酸钠的亚硫酸钠25℃避光反应15 min。最后加入37.5 nmol的生物素-X-酰肼(购自sigma公司)，37℃避光反应3小时。生物素化的小分子RNA用乙醇沉淀，置-20℃保存。22-nt的模拟miRNA按同样的方法标记。

实施例 3 酶联免疫吸附法检测和荧光检测法的比较

本实施例中，采用实施例 1 制备的大鼠 miRNA 芯片，分别用酶联免疫吸附法和荧光检测法进行分析和比较。

miRNA 芯片与标记了生物素的大鼠附睾的 miRNA 反应后，与链霉亲和素标记的碱性磷酸酶(1 μ g/ml)反应，随后加入碱性磷酸酶底物: BCIP/NBT 混合液(其中，BCIP: 0.577mM; NBT: 0.122mM)，图像采集与数据处理与前述模型实验完全相同；同时用荧光检测方法进行对照实验，miRNA 芯片与标记了生物素的大鼠附睾的 miRNA 反应后，再与链霉亲和素标记的量子点反应，用 ScanArray 5000(Packard Biochip Technologies, Billerica, MA)进行图像采集。具体如下：

将前述制备的 miRNA 芯片和 1.5 μ g 生物素化的小分子 RNA 在 10 μ l PerfectHyb 杂交液 (购自 TOYOBO 公司) 中 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜，然后用含 0.5% SDS 的 1 \times SSC 洗涤 10min。用荧光检测方法检测时(量子点法)，与 10 μ l 的 2 nM 的链霉亲和素偶联的 Quantum dot 655(量子点 655, 购自 invitrogen 公司) 室温反应 1 小时，经含 0.1% Tween-100 的 1 \times PBS、PBS 和水(每次 10 min) 洗涤后，用 ScanArray 5000 激光共聚焦生物芯片扫描仪(PerkinElmer 公司) 扫描，设置为 1 号激光器(633 nm) 和 8 号滤光片、功率 100%、光电倍增管增益 80%、扫描精度 5 μ m。用基于 ELISA 的比色法检测时，与 10 μ l 的 1:1000 的链霉亲和素偶联的碱性磷酸酶室温反应 1 小时，用碱性磷酸酶缓冲液(100mM Tris, PH7.5, 0.1% Tween20) 洗涤后，加 BCIP/NBT 底物 37 $^{\circ}$ C 避光反应 80 分钟，然后置低倍显微镜下用 Olympus C-4000Z 数码相机拍照。

数据处理：用量子点法检测的图像用 Genepix 软件(Axon) 处理。用比色法检测的灰度图像先用 Photoshop 将最亮的像素和最暗的像素映射为黑色和白色，然后用 Photoshop 或 Genepix 软件处理。图像中每个点的信号强度定义为点的平均强度减去背景的平均强度。

结果如图 5，显示了酶联免疫吸附方法和荧光检测方法的对照，从图中可以看出，对于不同的探针，两种方法相比较，得到的结果基本上是一致的。可见酶联免疫吸附方法在成本低廉的同时，检测准确度高。

实施例 4 酶联免疫吸附法检测中 BCIP/NBT 混合液与 miRNA 芯片混合时间对结果的影响

采用的模拟 miRNA 序列为 5' > TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G -生物素 <3' (作为待测样品, 溶于 PerfectHyb 杂交液 (购自 TOYOBO 公司), 浓度为 50nM); 针对该模拟 miRNA 的寡核苷酸探针设计为 5' - 氨基- (A)₁₀-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO: 11)-3' 。

芯片的点样、反应方法同前述(此处芯片上点的点均是针对模拟 miRNA 的同一种探针, 反应条件等与实施例 3 中相应方法一致)。不同点在于: 控制 BCIP/NBT 混合液与 miRNA 芯片反应时间, 分别在 5 分钟, 15 分钟, 30 分钟, 50 分钟, 80 分钟, 120 分钟, 170 分钟, 230 分钟, 300 分钟, 380 分钟中止反应。然后测定灰度值。

结果如图 2 所示, 在不同浓度(芯片上寡聚核苷酸的浓度为 20 μM。生物素偶联的模拟 miRNA 的浓度分别为 50nM, 5nM, 0.5nM)下, BCIP/NBT 混合液与 miRNA 芯片混合时间宜为 15-120 分钟, 最优的约在 80 分钟左右。

实施例 5 结合于 miRNA 芯片中各点样区的点样探针的数量对结果的影响

采用的模拟 miRNA 序列为 5' > TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G -生物素 <3' (作为待测样品, 溶于 PerfectHyb 杂交液 (购自 TOYOBO 公司), 浓度为 50nM); 针对该模拟 miRNA 的寡核苷酸探针设计为 5' - 氨基- (A)₁₀-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO: 11)-3' 。

芯片的点样、反应方法同前述。不同点在于: 改变结合于 miRNA 芯片中各点样区的点样探针的数量。然后测定灰度值。

结果如图 3 所示, 显示了点的灰度值和芯片上固定的寡聚核苷酸探针浓度的依赖关系。其中, 内插图是不同浓度的寡聚核苷酸探针所形成的微阵列的酶联免疫吸附反应检测图像。1 到 7 列的寡聚核苷酸探针点样浓度依次为: 47 μM, 23 μM, 12 μM, 6 μM, 3 μM, 1.5 μM, 0.7 μM。生物素偶联的模拟 miRNA 浓度为 50 nM。酶联免疫吸附反应时间为 1 小时, 温度为 37°C。曲线中的数据取自内插图中 4 个重复点的平均值。

结果表明, 最低固定在载玻片上的寡聚核苷酸探针的检测限量为 0.7fMol(按点的体积为 1nl 计算的绝对量), 线性动态范围从 0.7 fMol 到 47 fMol。

实施例 6 检测样品中待测物质的浓度对结果的影响

采用的模拟 miRNA 序列为 5' > TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G -生物素 <3' (作为待测样品, PerfectHyb 杂交液 (购自 TOYOBO 公司), 浓度为 50nM); 针对该模拟 miRNA 的寡核苷酸探针设计为 5' - 氨基 - (A)₁₀-CGCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO: 11)-3'。

芯片的点样、反应方法同前述。不同点在于: 改变待测样品中待检测物质的数量浓度。然后测定灰度值。

结果如图 4 所示, 显示了溶液中不同浓度生物素偶联的模拟 miRNA 的检测。其中, 内插图是用酶联免疫吸附方法检测溶液中不同浓度的生物素偶联的模拟 miRNA 的图像。微阵列中所有的点都是由 23 μM 的寡聚核苷酸探针形成的。生物素偶联的模拟 miRNA 的浓度依次为: 70.4 nM, 35.2nM, 17.6 nM, 8.8 nM, 4.4 nM, 2.2 nM, 1.1 nM, 0.55 nM, 0.28 nM, 0.14 nM, 0.07nM, 0.03 nM。酶联免疫吸附反应的时间为 1 小时, 温度为 37℃。曲线的数据取自内插图中 4 个重复点的平均值。

结果表明, 可以检测到溶液中 miRNA 的最低浓度为 35pM, 线性动态范围为 35pM 到 35.2nM。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 通过酶联免疫吸附方法检测小分子RNA芯片的方法

<130> 078370

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 1

tagcagcacg taaatattgg cg

22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 2

aaaaagtgcc cccatagttt gag

23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 寡核苷酸

<400> 3

cattaggaac acatcgcaaa aa

22

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

<400> 4
 agtggatgac cctgtacgat t

21

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

<400> 5
 agtgaattct accagtcca ta

22

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 寡核苷酸

<400> 6
 tgggcgaccc agaggaca

19

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 7
aaagagaccg gttcactgtg a 21

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 8
cgaaggcaac acggataacc ta 22

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 9
catgcataca tgcacacata cat 23

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 10
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gt 22

<210> 11

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<223> 寡核苷酸

<400> 11
cgccaatatt tacgtgctgc ta

22

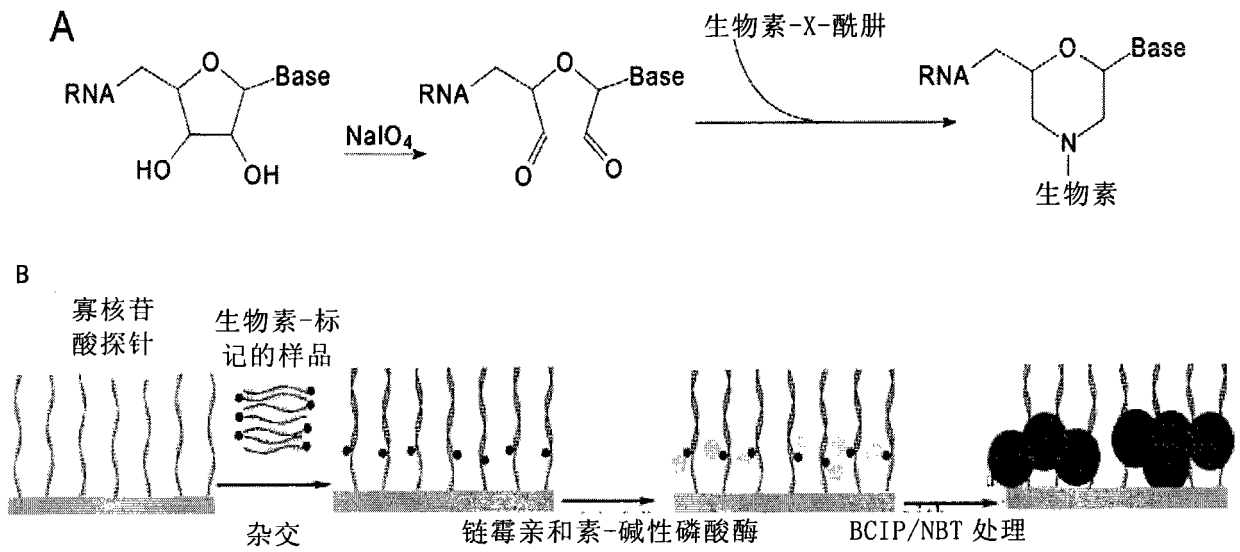


图 1

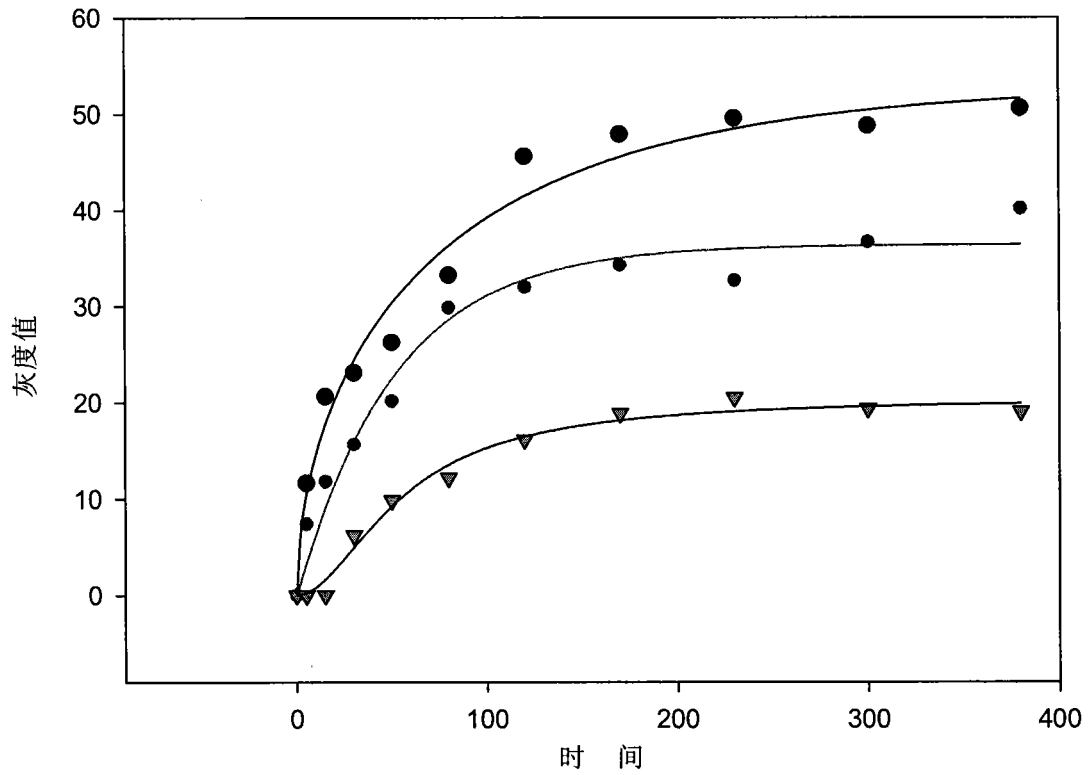


图 2

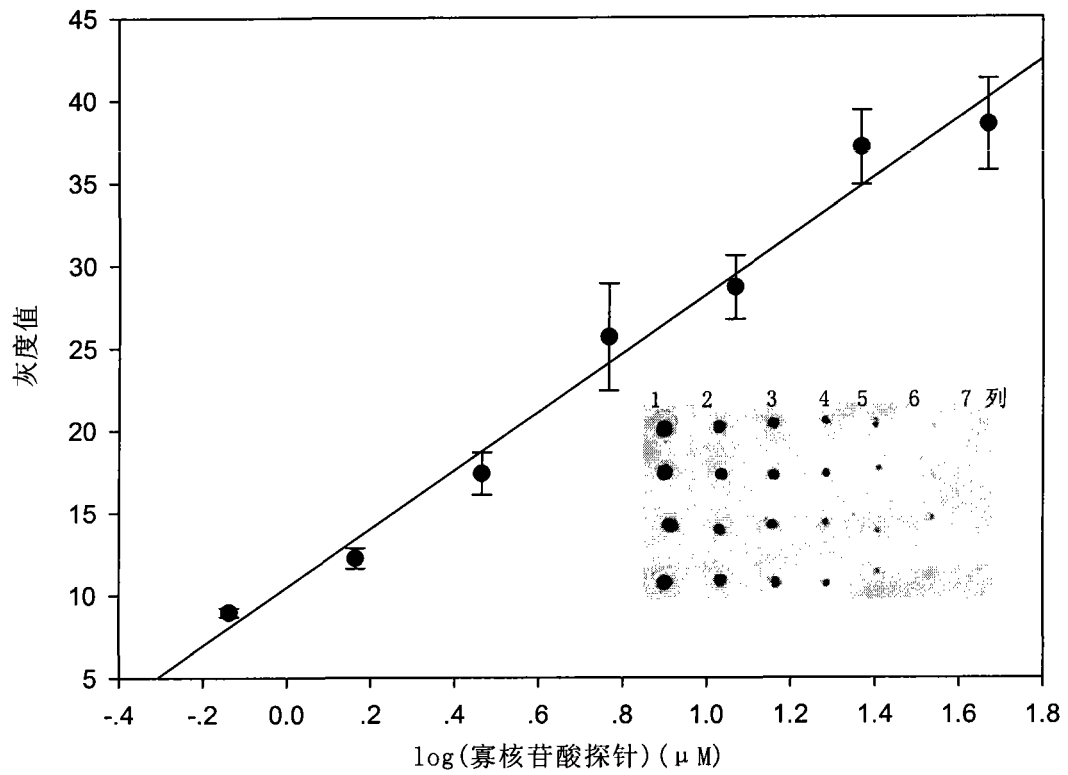


图 3

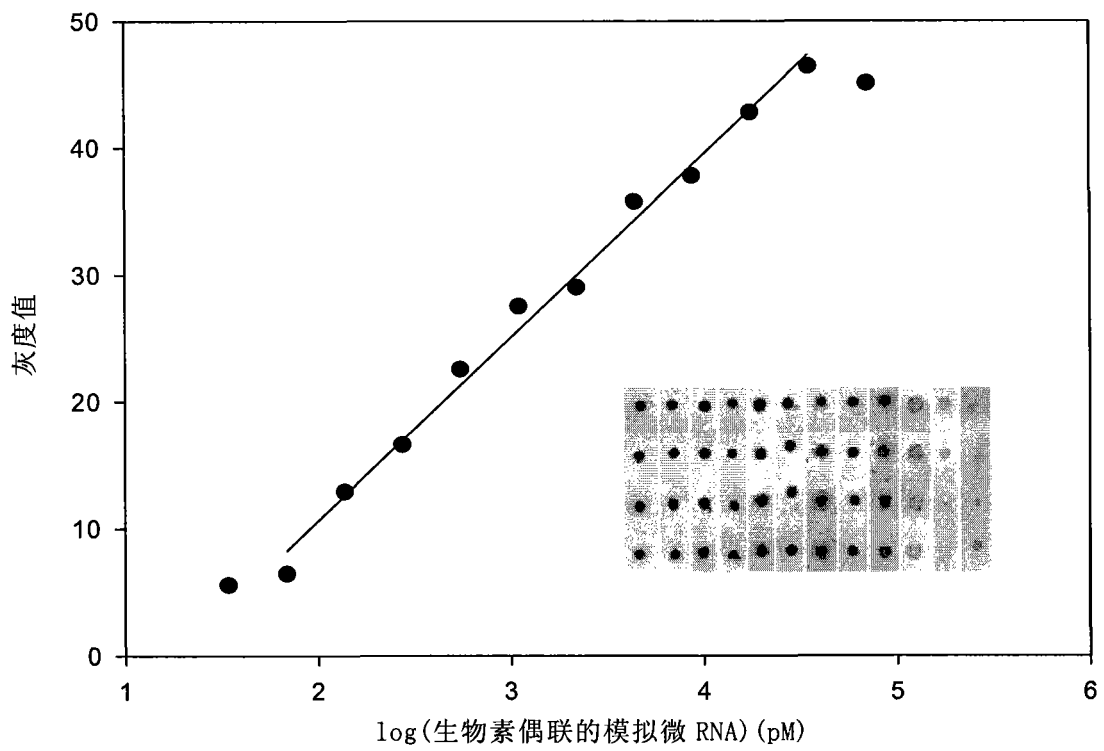
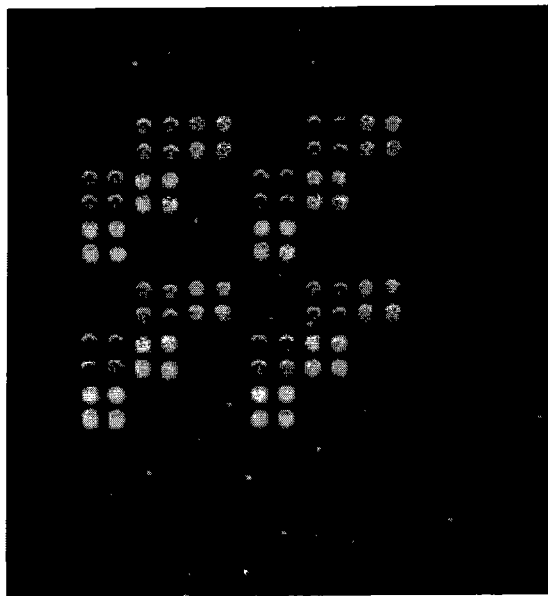
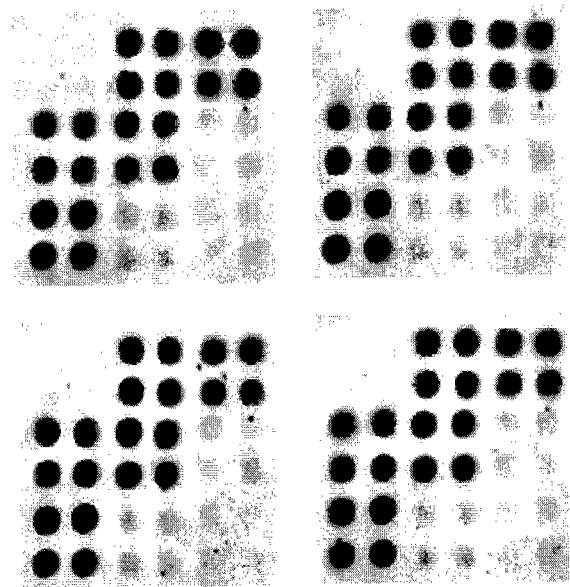


图 4



荧光法



酶联免疫吸附法

图 5

专利名称(译)	通过酶联免疫吸附方法检测小分子RNA芯片的方法		
公开(公告)号	CN101497920A	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200810033313.1	申请日	2008-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	阮康成 李巍		
发明人	阮康成 李巍		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/535		
代理人(译)	范征		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，公开了一种通过酶联免疫吸附方法检测miRNA芯片的方法。本发明的方法首次将酶联免疫技术用于检测miRNA，并且所述方法检测灵敏度高，只需要普通的数码相机、显微镜或扫描仪就可以检测芯片的数据，从而大大降低miRNA芯片检测的成本。

