



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105934439 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201480074125.7

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2014.11.25

代理人 刘辛 李炳爱

(30)优先权数据

61/909,834 2013.11.27 US

61/985,000 2014.04.28 US

(51)Int.Cl.

G07H 21/04(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/067321 2014.11.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/094609 EN 2015.06.25

(71)申请人 西格马-奥尔德里奇有限责任公司

地址 美国密苏里州

(72)发明人 C.克里德

权利要求书1页 说明书18页 附图15页

(54)发明名称

从生物流体中分离微小RNA

(57)摘要

本公开提供用于从生物流体中分离miRNA的方法和试剂盒。具体地说,所述方法包括使生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触,其中所述表面活性剂使生物流体组分分离并且所述抗miRNA结合蛋白试剂与和miRNA缔合的miRNA结合蛋白相互作用从而形成免疫沉淀miRNA复合物;并且将miRNA从所述免疫沉淀miRNA复合物中释放。进一步提供可与循环miRNA缔合的miRNA结合蛋白的实例。

1. 一种用于从生物流体中分离微小RNA(miRNA)的方法,所述方法包括(a)使所述生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触,其中所述表面活性剂使生物流体组分解离并且所述抗miRNA结合蛋白试剂与和miRNA缔合的miRNA结合蛋白相互作用从而形成免疫沉淀miRNA复合物;和(b)在未纯化的情况下使miRNA从所述免疫沉淀miRNA复合物中释放。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述生物流体包括囊泡miRNA和非囊泡miRNA。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述生物流体是血浆或血清。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述生物流体同时与所述表面活性剂和所述抗miRNA结合蛋白试剂接触。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中将所述生物流体、所述表面活性剂和所述抗miRNA结合蛋白试剂孵育约30分钟。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中在室温下孵育所述生物流体、所述表面活性剂和所述抗miRNA结合蛋白试剂。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述抗miRNA结合蛋白试剂包括附接至固体载体的抗Argonaut抗体。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述固体载体是磁性珠粒。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使所述免疫沉淀miRNA复合物与蛋白水解酶接触。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述蛋白水解酶是蛋白酶K。

12. 如权利要求10或权利要求11所述的方法,其中所述免疫沉淀miRNA复合物与蛋白水解酶接触约10分钟。

13. 如权利要求10至12中任一项所述的方法,其中所述免疫沉淀miRNA复合物在室温下与蛋白水解酶接触。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中从所述免疫沉淀miRNA复合物释放的所述miRNA不含其它类型的RNA分子。

15. 一种用于从生物流体中分离微小RNA的试剂盒,所述试剂盒包括表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂。

16. 如权利要求15所述的试剂盒,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

17. 如权利要求15或权利要求16所述的试剂盒,其还包括蛋白酶K。

18. 如权利要求15至17中任一项所述的试剂盒,其中所述抗miRNA结合蛋白试剂包括附接至固体载体的抗Argonaut抗体。

19. 如权利要求18所述的试剂盒,其中所述固体载体是磁性珠粒。

## 从生物流体中分离微小RNA

### 技术领域

[0001] 本公开涉及从生物流体中分离微小RNA的方法。

[0002] 背景

[0003] 微小RNA(miRNA)是小的非编码RNA,其通过经由特定碱基配对相互作用来对特定信使RNA(mRNA)靶标进行转录后调控而影响基因调控网络。miRNA已被证明以无细胞形式存在于人生物液体中。这些无细胞miRNA可为非囊泡的、由miRNA-蛋白质复合物中的蛋白质来结合并保护、封闭于膜结合囊泡诸如外来体或微泡中,或两种情况同时存在。鉴于miRNA在疾病中的重要功能作用,此组核酸分子含有候选物,所述候选物用于诊断和预后疾病,并且在各种患者和表现疾病之前的受试者中,在易于得到的生物样品,诸如血清和血浆、尿液或唾液中监测对于治疗的响应。当前分离miRNA的方法针对细胞和组织中的相对丰富的miRNA,使用不容易自动化或扩大规模的吸附柱,较复杂并且涉及毒性化合物,或可能特定地分离囊泡或非囊泡miRNA。此外,在诊断或预后方面受到关注的miRNA经常以低丰度存在于生物流体中,使得使用当前分离方法来对其进行检测具有挑战性。因此,需要用于分离生物流体中的全部或大部分miRNA的简单、有效、可自动化和可规模化的方法。

[0004] 发明概述

[0005] 本公开的一个方面提供从生物流体中分离微小RNA(miRNA)的方法。所述方法包括使生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触,其中表面活化剂使生物流体组分解离并且抗miRNA结合蛋白试剂与和miRNA缔合的miRNA结合蛋白相互作用从而形成免疫沉淀miRNA复合物。所述方法还包括将miRNA从免疫沉淀miRNA复合物中释放。

[0006] 本公开的另一个方面包涵用于从生物流体中分离微小RNA的试剂盒。试剂盒包括表面活性剂、抗miRNA结合蛋白试剂和miRNA释放试剂。

[0007] 本公开的其它方面和重复在以下更详细描述。

[0008] 附图简述

[0009] 图1提供将使用TriReagent<sup>®</sup>BD或RNA免疫沉淀反应(RIP)从0.2ml血浆分离miRNA进行比较的两个图表。通过RIP分离的miRNA的量表示为使用TriReagent<sup>®</sup>BD分离的miRNA的倍数差异。(A)描绘let-7a-5p、23a-3p和191-5p miRNA的水平,并且(B)示出142-3p和451a miRNA的水平。

[0010] 图2提供展示使用Ago-RIP或Qiagen柱纯化试剂盒(Q1,Q2)从血浆分离的miRNA的水平的三个图表。展示let-7a、23a和142miRNA(A)、191miRNA(B)和451a miRNA(C)的以洗脱miR拷贝数/ $\mu$ l为单位的分离miRNA的量。

[0011] 图3提供展示使用利用生物素化(b-Ago2或b-Ago)或非生物素化(Ago2)抗体与链霉抗生物素蛋白或蛋白质A珠粒进行的RIP从血浆分离的miRNA的水平的三个图表。展示了let-7a(A)、23a(B)和191(C)miRNA的以洗脱miR拷贝数/ $\mu$ l为单位来表示的分离miRNA的量。所使用的抗体(圆括号中的克隆)在x轴上表示。

[0012] 图4提供展示使用伴以放热的Ago-RIP从血浆分离的miRNA的水平的两个图表。Q代表Qiagen柱纯化;RIP-Q代表免疫沉淀反应随后Qiagen柱纯化;bRIP-Q代表使用生物素化抗

体的免疫沉淀反应随后Qiagen柱纯化。(A)描绘使用Qiagen柱纯化、与柱纯化组合的RIP和伴以蛋白水解酶K释放的RIP的合成cel-miR-39-3p跟踪标定物的水平。跟踪标定物的水平表示为在分离期间跟踪标定的合成cel-miR-39-3p的总百分比。(B)描绘使用Qiagen柱纯化、与柱纯化组合的RIP和具有蛋白水解酶K释放的RIP的从血浆分离的let7a miRNA的水平。let7a的水平以1 $\mu$ l回收样品中的let7a的拷贝数来表示。

[0013] 图5提供展示使用在不同温度下伴以蛋白水解酶K释放的Ago-RIP从血浆分离的miRNA的水平两个图表。(A)描绘由蛋白水解酶K释放的let7a miRNA的水平(在每个温度下的左侧棒),和保持于珠粒上的水平(在每个温度下的右侧棒)。let7a miRNA的水平表示为在使用Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒来分离的0.2ml相同血浆中的let7a miRNA的总百分比。(B)描绘由蛋白水解酶K释放的miR451a miRNA的水平(在每个温度下的左侧棒),和保持在珠粒上的水平(每个温度下的右侧棒)。miR451a miRNA的水平表示为在使用Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒来分离的0.2ml相同血浆中的miR451a miRNA的总百分比。

[0014] 图6提供展示使用可购得的miRNA分离方法,或使用在标准试管中伴以蛋白水解酶K释放的RIP的分离从血浆中分离的let7a(A)或miR451a(B)miRNA的水平两个图表。E1和E2代表使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体的miRNA分离。Q1和Q2代表使用来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒的miRNA分离。RIP-std-Q代表免疫沉淀反应随后Qiagen柱纯化。miRNA的水平表示为从0.2ml血浆回收的总拷贝数。

[0015] 图7提供展示使用可购得的miRNA分离方法,或使用伴以蛋白水解酶K释放的Ago-RIP的分离(RIP1-4)从血浆中分离的let7a miRNA的水平两个图表。(A)示出试验1并且(B)示出试验2。E1和E2代表使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体的miRNA分离。Q1和Q2代表使用来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒的miRNA分离。let7a的水平表示为从0.2ml血浆回收的let7a的总拷贝数。

[0016] 图8提供展示在存在或不存在蛋白水解酶和RNA酶抑制剂的情况下,以及在存在或不存在清洁剂预处理的情况下,使用Ago-RIP随后蛋白水解酶K释放从血浆中分离的miRNA的水平两个图表。+pre,+inh;将lgpal和抑制剂添加至血浆并且孵育~30分钟,然后添加至Ago2-珠粒。+pre,-inh;在没有抑制剂的情况下将lgpal添加至血浆并且孵育~30分钟,然后添加至Ago2-珠粒。-pre,+inh;lgpal和抑制剂与Ago2-珠粒同时添加至血浆。-pre,-inh;lgpal在没有抑制剂的情况下与Ago2-珠粒同时添加至血浆。(A)描绘回收的let7a miRNA的拷贝数,并且(B)描绘回收的miR451a miRNA的拷贝数。

[0017] 图9提供展示作为总IGEPAL处理miRNA的百分比的自由(每个miRNA的左侧棒)和囊泡(每个miRNA的右侧棒)指示miRNA的水平图表。

[0018] 图10提供展示使用Ago-RIP随后蛋白水解酶K释放(RIP)从0.2或0.4ml血浆中,或使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体(E)从0.2ml血浆中分离的miRNA的水平三个图表。(A)描绘回收的let7a miRNA的拷贝数,(B)描绘回收的miR191miRNA的拷贝数,并且(C)描绘回收的miR451a miRNA的拷贝数。

[0019] 图11提供展示使用Ago-RIP随后蛋白水解酶K释放从血浆中分离的let7a的水平图表。RIP孵育是在室温下历时5、15、30或60分钟(5'、15'、30'、60')。5、15或30分钟的那些孵育全部在蛋白酶K释放之前洗涤5次。60分钟的那些孵育洗涤5、4、3、2或1次(5w、4w、3w、

2w、1w)。展示从0.2ml血浆中回收的let7a的总产率。

[0020] 图12A示出使用Ago-R1P或柱基miRNA分离试剂盒从血浆中分离的let7a miRNA的水平。提供三个不同实验(Exp)。S1和S2代表使用Ago-R1P的分离;E1和E2代表使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体的分离;并且Q1和Q2代表使用来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒的分离。

[0021] 图12B提供使用Ago-R1P或柱基miRNA分离试剂盒从血浆中分离的RNU6小核RNA和SNORD48小核仁RNA的水平。提供三个不同实验。S1和S2代表使用Ago-R1P的分离;E1和E2代表使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体的分离;并且Q1和Q2代表使用来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒的分离。

[0022] 图12C示出使用Ago-R1P或柱基miRNA分离试剂盒从血浆中分离的GAPDH信使RNA、RN18S核糖体RNA和RN28S核糖体RNA的水平。提供三个不同实验。S1和S2代表使用Ago-R1P的分离;E1和E2代表使用来自Exiqon的miRCury RNA分离试剂盒-生物流体的分离;并且Q1和Q2代表使用来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒的分离。

[0023] 图13提供展示经由Ago-R1P使用抗Ago1抗体、抗Ago2抗体或抗Ago1和抗Ago2抗体的组合从血浆中分离的指定miRNA的水平的图表。

[0024] 发明详述

[0025] 已经发现分离循环miRNA的有效和快速的方法。如实例中示出,本公开的方法可同时分离囊泡缔合和非囊泡缔合的循环miRNA。有利地,本公开的方法和试剂盒允许快速和特定地分离纯miRNA制剂而没有其它类型RNA的污染。另外,本文公开的方法和试剂盒允许以高产率从稀的细胞外流体中分离miRNA。此外,本发明的方法可规模化,允许从增加体积的细胞外生物流体中分离miRNA。

[0026] miRNA的水平与疾病相关联,包括癌症、心血管疾病,以及在许多其它疾病和发育过程中,包括精神分裂症、阿耳茨海默氏病、免疫细胞发育和适应性和先天性免疫的调节、干细胞维持和多能性、神经系统发育、内分泌病包括糖尿病、胰腺的发育、脆折X综合征、皮肤伤口愈合、细胞周期进程、移植组织排斥、缺氧、骨骼肌分化。另外,miRNA还由病毒表达,并且已经识别出那些miRNA的目标基因。因此,本公开的方法和试剂盒可用于使用易于得到的生物样品,诸如血液、血清或血浆来制备miRNA以便用于诊断疾病或疾病状况的测定。

[0027] 1. 方法

[0028] 本公开涵盖从生物流体中分离微小RNA(miRNA)的方法。所述方法包括使生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。表面活性剂使生物流体组分解离并且抗miRNA结合蛋白试剂与和miRNA缔合的miRNA结合蛋白相互作用从而形成免疫沉淀miRNA复合物。所述方法还包括将miRNA从免疫沉淀miRNA复合物中释放。

[0029] 本文公开方法特定地分离miRNA。如以下实施例12中详述,其它类型的小RNA(诸如小核RNA或小核仁RNA)不通过所公开方法来分离,并且较大RNA分子(诸如信使RNA或核糖体RNA)不通过所公开方法来分离。

[0030] (a) 生物流体

[0031] 本公开的方法包括在从受试者获得的生物流体样品中分离细胞外循环miRNA。如本文所使用的术语“受试者”是指人或动物。受试者可为胚胎、幼年或成体。受试者可为雄性或雌性。合适的动物包括脊椎动物诸如哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物和鱼类。适合哺

哺乳动物的实例可包括但不限于啮齿动物、伴侣动物、家畜和灵长类动物。啮齿动物的非限制实例包括小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠和豚鼠。合适的伴侣动物包括但不限于猫、犬、兔、刺猬和雪貂。家畜的非限制实例包括马、山羊、绵羊、猪、牛、骆驼和羊驼。合适灵长类动物包括但不限于卷尾猴、黑猩猩、狐猴、猕猴、绒猴、绢毛猴、蜘蛛猴、松鼠猴以及黑长尾猴。鸟类的非限制实例包括鸡、火鸡、鸭和鹅。示例性受试者是人。

[0032] 术语“生物流体”可意指从任何给定受试者分离的所有生物流体和排泄物。生物流体的非限制实例可包括血液和其部分、血清、血浆、尿液、排泄物、精液 (semen)、精液 (seminal fluid)、精液浆、前列腺液、射精前的分泌物(考珀液)、胸膜腔积液、眼泪、唾液、痰、汗、活检、腹水、脑脊液、羊水、淋巴、骨髓、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫内膜分泌物、胃肠分泌物、支气管分泌物、乳腺分泌物、卵巢囊肿分泌物、组织流体、肿瘤吸出物和组织流体样品。在一些实施方案中,生物流体是血清。在其它实施方案中,生物流体是血浆。

[0033] 从受试者获得血浆或血清样品的方法在本领域中是熟知的。例如,在存在或不存在导管的情况下,静脉穿刺可用于收集血液样品以便制备血清。从血液样品制备血浆和血清的方法在本领域中为已知的。通常,血液样品足够大以便供应足够量的血浆或血清以供如下进一步描述来处理。血浆或血清样品可在收集样品之后立即处理。或者,血浆或血清样品可冷冻以便稍后处理。

[0034] 生物流体样品可通过新近收集样品而从受试者获得。或者,生物流体样品可从以前收集并存储的样品获得。例如,在生物流体是血浆或血清时,样品可从存储并保存的血液样品的集合中获得。在一些实施方案中,样品通过新近收集样品来获得。在其它实施方案中,样品从以前收集并存储的样品获得。

[0035] 在一些实施方案中,生物流体样品未稀释。在其它实施方案中,生物流体样品在分离miRNA之前稀释。稀释度可取决于若干因素包括但不限于miRNA、样品中的生物流体的类型、受试者、受试者的疾病状况、用于测量miRNA的测定的类型,和在用于测量miRNA的测定中使用的试剂。在一个实施方案中,生物流体样品通过添加原始样品体积的约1/2至原始样品体积的约50,000倍范围内的体积的稀释剂来稀释。稀释剂可为不干扰miRNA分离或用于后续处理步骤的其它方法的任何流体。合适稀释剂的非限制实例包括脱离子水、蒸馏水、盐水溶液、林格氏溶液、磷酸缓冲盐水溶液、TRIS缓冲盐水溶液、标准盐水柠檬酸和HEPES缓冲盐水。

[0036] (b)表面活性剂

[0037] 生物流体与表面活性剂(或者被称为“表面活性剂”或“清洁剂”)接触。如本文使用,术语“表面活性剂”可用于描述能够使可包括循环miRNA的生物流体组分解离的任何试剂。可包括循环miRNA的生物流体组分的非限制实例包括细胞外囊泡诸如脂蛋白、外来体、微泡、核外颗粒体、凋亡主体和其它细胞外囊泡。

[0038] 如本领域技术人员认识到,能够使生物流体组分解离的任何表面活性剂可用于本公开的方法中,只要表面活性剂不干扰本公开的免疫沉淀miRNA复合物的形成。例如,表面活性剂可为阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂、非离子表面活性剂或其组合。本发明的表面活性剂的特性可能并且将会变化,取决于生物流体中的可包括循环miRNA、抗miRNA结合蛋白试剂和分离miRNA的生物流体组分的特性。

[0039] 在一些实施方案中,表面活性剂是阴离子表面活性剂。合适阴离子表面活性剂包

包括但不限于十二烷基苯磺酸铵;辛醇聚醚硫酸铵;枯烯磺酸铵;二羟硬脂酸铵;十二烷基苯磺酸铵;月桂醇聚醚硫酸铵;月桂醇聚醚-12硫酸铵;月桂醇聚醚-30硫酸铵;月桂基肌氨酸铵;月桂基硫酸铵;月桂基磺基琥珀酸铵;木质素磺酸铵;肉豆蔻醇聚醚硫酸铵;萘磺酸铵;壬苯醇醚-20硫酸铵;壬苯醇醚-30硫酸铵;壬苯醇醚-4硫酸铵;壬苯醇醚-6硫酸铵;壬苯醇醚-9硫酸铵;油硫酸铵;全氟辛酸铵;硬脂酸铵;二甲苯磺酸铵;丁基萘磺酸酯;丁基磷酸酯;十二烷基苯磺酸钙;硬脂酰乳酸钙;四丙烯基苯磺酸钙;辛醇聚醚-9羧酸;鲸蜡基磷酸酯;枯烯磺酸;DEA-鲸蜡基磷酸酯;DEA-十二烷基苯磺酸酯;DEA-月桂基硫酸酯;癸醇聚醚-4磷酸酯;月桂基磺基琥珀酸二铵;硬脂基磺基琥珀酰胺酸二铵;磺基琥珀酸二戊基钠;磺基琥珀酸双环己基钠;磺基琥珀酸二己基钠;磺基琥珀酸二异丁基钠;二月桂醇聚醚-7柠檬酸酯;聚二甲硅氧烷醇;二壬苯醇醚-4磷酸;磺基琥珀酸二辛基铵;磺基琥珀酸二辛基钠;鲸蜡硬脂磺基琥珀酰胺酸二钠;椰油酰胺基MEA-磺基琥珀酸二钠;椰油酰胺基PEG-3磺基琥珀酸二钠;癸醇聚醚-6磺基琥珀酸二钠;癸基二苯醚二磺酸二钠;十二烷基氧基丙基磺基琥珀酰胺酸二钠;异癸基磺基琥珀酸二钠;羊毛脂醇聚醚-5磺基琥珀酸二钠;月桂酰胺DEA-磺基琥珀酸二钠;月桂酰胺MEA-磺基琥珀酸二钠;月桂醇聚醚磺基琥珀酸二钠;月桂基磺基琥珀酸二钠;肉豆蔻酰胺MEA-磺基琥珀酸二钠;油酰胺基MEA-磺基琥珀酸二钠;油酰胺基PEG-2磺基琥珀酸二钠;油醇聚醚-3磺基琥珀酸二钠;PEG-4椰油酰胺基MIPA磺基琥珀酸二钠;蓖麻油酰胺基MEA-磺基琥珀酸二钠;硬脂基磺基琥珀酰胺酸二钠;十一碳烯酰胺基MEA-磺基琥珀酸二钠;磺基琥珀酸双十三基钠;十二碳烯基琥珀酸酐;十二烷基二苯醚二磺酸;十二烷基二苯醚二磺酸;十二烷基苯磺酸;甘油基二油酸酯SE;甘油基二硬脂酸酯SE;甘油基蓖麻酸酯SE;甘油基硬脂酸柠檬酸酯;甘油基硬脂酸酯SE;硬脂酸乙二醇酯SE;磷酸己基酯;磷酸异丙基酯;异丙胺十二烷基苯磺酸酯;异硬脂醇聚醚-2磷酸酯;异十三烷醇聚醚-3磷酸酯;异十三烷醇聚醚-6磷酸酯;月桂醇聚醚-1磷酸酯;月桂醇聚醚-12羧酸;月桂醇聚醚-3磷酸酯;月桂醇聚醚-4磷酸酯;月桂醇聚醚-6磷酸酯;月桂醇聚醚-7柠檬酸酯;月桂醇聚醚-9磷酸酯;月桂基磷酸酯;月桂基硫酸锂;月桂醇聚醚硫酸镁;PEG-3椰油酰胺硫酸镁;MEA-月桂醇聚醚磷酸酯;MEA-月桂基硫酸酯;MIPA-月桂醇聚醚硫酸酯;MIPA-月桂基硫酸酯;肉豆蔻酰基肌氨酸;萘-甲醛磺酸酯;壬苯醇醚-10磷酸酯;壬苯醇醚-12磷酸酯;壬苯醇醚-3磷酸酯;壬苯醇醚-4磷酸酯;壬苯醇醚-4硫酸酯;壬苯醇醚-6磷酸酯;壬苯醇醚-7磷酸酯;壬苯醇醚-8磷酸酯;壬苯醇醚-9磷酸酯;壬基壬苯醇醚-10磷酸酯;壬基壬苯醇醚-15磷酸酯;壬基壬苯醇醚-7磷酸酯;油醇聚醚-10羧酸;油醇聚醚-10磷酸酯;油醇聚醚-3羧酸;油醇聚醚-4磷酸酯;油醇聚醚-5磷酸酯;油醇聚醚-6羧酸;油醇聚醚-7磷酸酯;PEG-2二月桂酸酯SE;PEG-2二油酸酯SE;PEG-2二硬脂酸酯SE;PEG-2月桂酸酯SE;PEG-2油酸酯SE;PEG-2硬脂酸酯SE;PEG-9硬脂酰胺羧酸;鲸蜡基磷酸钾;癸醇聚醚-4磷酸钾;十二烷基苯磺酸钾;异硬脂醇聚醚-2磷酸钾;月桂酰肌氨酸钾;月桂基硫酸钾;油酸钾;油硫酸钾;全氟辛酸钾;蓖麻油硫酸钾;PPG-2月桂酸酯SE;PPG-2油酸酯SE;PPG-2硬脂酸酯SE;PPG-5-鲸蜡醇-10磷酸酯;丙二醇月桂酸酯SE;丙二醇油酸酯SE;丙二醇蓖麻酸酯SE;丙二醇硬脂酸酯SE;PVM/MA共聚物;2-乙基己基磷酸钠;2-乙基己基硫酸钠;石蜡磺酸钠;烯丙氧基羟基丙基磺酸钠;山嵛酰乳酸钠;丁氧基乙氧基乙酸钠;丁基萘磺酸钠;油酸丁酯硫酸钠;油酸丁酯磺酸钠;丁基磷酸钠;己酰基乳酸钠;辛酰基磺酸钠;鲸蜡基硫酸钠;胆酸钠;枯烯磺酸钠;癸醇聚醚硫酸钠;癸基二苯醚磺酸钠;癸基硫酸钠;脱氧胆酸钠;二丁基萘磺酸钠;二十二烷基苯磺酸钠;二异辛基磺基琥珀酸钠;二异

丙基萘磺酸钠;二月桂醇聚醚-7柠檬酸钠;二壬基磺基琥珀酸钠;十二烷基二苯醚二磺酸钠;十二烷基二苯醚二磺酸钠;十二烷基苯磺酸钠;甘油基三油酸酯硫酸钠;十六基联苯二磺酸钠;十六基二苯醚二磺酸钠;己基二苯醚二磺酸钠;异硫代硫酸钠;异癸基硫酸钠;异辛基硫酸钠;硬脂酰基乳酸钠;异十三烷醇聚醚-15硫酸钠;乳酸钠;月桂酰胺DEA-磺基琥珀酸钠;月桂醇聚醚磷酸钠;月桂醇聚醚硫酸钠;月桂醇聚醚磺基琥珀酸钠;月桂醇聚醚-10磷酸钠;月桂醇聚醚-11羧酸钠;月桂醇聚醚-12硫酸钠;月桂醇聚醚-13乙酸钠;月桂醇聚醚-13羧酸钠;月桂醇聚醚-3羧酸钠;月桂醇聚醚-4羧酸钠;月桂醇聚醚-4磷酸钠;月桂醇聚醚-6羧酸钠;月桂醇聚醚-7羧酸钠;月桂醇聚醚-7硫酸钠;月桂醇聚醚-8硫酸钠;月桂酰谷氨酸钠;月桂酰乳酸钠;月桂酰乳酸钠;月桂酰甲基氨基丙酸钠;月桂酰肌氨酸钠;月桂基磷酸钠;月桂基硫酸钠;月桂基磺基乙酸钠;木质素酸钠;木质素磺酸钠;甲基烯丙基磺酸钠;甲基月桂酰牛磺酸钠;甲基肉豆蔻酰基牛磺酸钠;甲基油酰基牛磺酸钠;甲基棕榈酰牛磺酸钠;甲基硬脂酰牛磺酸钠;甲基萘磺酸钠;m-硝基苯磺酸钠;肉豆蔻醇聚醚硫酸钠;肉豆蔻酰基谷氨酸钠;肉豆蔻酰基肌氨酸钠;肉豆蔻硫酸钠;壬苯醇醚硫酸钠;壬苯醇醚-10硫酸钠;壬苯醇醚-10磺基琥珀酸钠;壬苯醇醚-15硫酸钠;壬苯醇醚-4硫酸钠;壬苯醇醚-5硫酸钠;壬苯醇醚-6磷酸钠;壬苯醇醚-6硫酸钠;壬苯醇醚-8硫酸钠;壬苯醇醚-9磷酸钠;壬苯醇醚-9硫酸钠;辛苯聚醇-2乙烷磺酸钠;辛苯聚醇-3硫酸钠;辛基硫酸钠;辛基苯氧基乙氧基乙基磺酸钠;油硫酸钠;油醇聚醚-7磷酸钠;油醇磷酸钠;油醇硫酸钠;油醇磺基琥珀酰胺酸钠;棕榈酰肌氨酸钠;苯基磺酸钠;丙基油酸酯硫酸钠;硬脂酰乳酸钠;硬脂基磺基琥珀酰胺酸钠;十三烷醇聚醚硫酸钠;十三烷醇聚醚-3羧酸钠;十三烷醇聚醚-6羧酸钠;十三烷醇聚醚-7羧酸钠;十三烷基硫酸钠;十三烷基苯磺酸钠;二甲苯磺酸钠;硬脂酰肌氨酸;TEA-月桂酰谷氨酸酯;TEA-月桂基硫酸酯;二羧乙基硬脂基磺基琥珀酰胺酸四钠;T1PA-月桂醇聚醚硫酸酯;三鲸蜡硬脂醇聚醚-4磷酸酯;三鲸蜡醇聚醚-5磷酸酯;十三烷醇聚醚-2磷酸酯;十三烷醇聚醚-3磷酸酯;十三烷醇聚醚-5磷酸酯;十三烷基磷酸酯;和三月桂醇聚醚-4磷酸酯;和磷酸三辛酯。

[0040] 在其它实施方案中,表面活性剂是阳离子表面活性剂。合适阳离子表面活性剂的实例包括但不限于,烷基三甲基溴化铵;苯扎氯铵;苯扎氯铵;苄基二甲基十六烷基氯化铵;苄基二甲基十四烷基氯化铵;苄基十二烷基二甲基溴化铵;苄基三甲基四氯碘酸铵;鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB);二甲基二十八烷基溴化铵;十二烷基乙基二甲基溴化铵;十二烷基三甲基溴化铵;十二烷基三甲基溴化铵;十二烷基三甲基氯化铵;乙基十六烷基二甲基溴化铵;吉拉德试剂T;十六烷基三甲基溴化铵;十六烷基三甲基溴化铵;N,N',N'-聚氧乙烯(10)-N-牛脂-1,3-二氨基丙烷;通佐溴铵;和三甲基(十四基)溴化铵。

[0041] 在其它实施方案中,表面活性剂是两性离子表面活性剂。合适两性离子表面活性剂包括但不限于3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基铵基]-2-羟基-1-丙烷磺酸(CHAPSO);3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸(CHAPS);3-(4-庚基)苯基-3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸(C7BzO);3-(N,N-二甲基辛基铵基)丙烷磺酸内盐(SB3-8);3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐(SB3-10;辛酰基磺基甜菜碱);3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐(SB3-12);3-(N,N-二甲基十四烷基铵基)丙烷磺酸(SB3-14);3-(N,N-二甲基棕榈基铵基)丙烷磺酸(SB3-16);3-(N,N-二甲基十八烷基铵基)丙烷磺酸(SB3-18);3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸(ASB-14)。取决于实施方案,其它合适两性离子清洁剂包括:

乙酰化卵磷脂; 杏酰胺丙基甜菜碱; 巴巴苏油酰胺丙基甜菜碱; 山嵛基甜菜碱; 双2-羟乙基牛脂甘氨酸; C12-14烷基二甲基甜菜碱; 低芥酸菜子油酰胺丙基甜菜碱; 辛酸/辛酰基酰胺丙基甜菜碱; 辛酰胺丙基甜菜碱; 鲸蜡基甜菜碱; 椰油酰胺丙基甜菜碱; 椰油酰胺丙基二甲基氨基羟基丙基水解胶原蛋白; N-[3-椰油酰胺基)-丙基]-N,N-二甲基甜菜碱, 钾盐; 椰油酰胺丙基羟基磺基甜菜碱; 椰油酰胺丙基磺基甜菜碱; 椰油氨基丁酸; 椰油氨基丙酸; 椰油酰两性基二丙酸; 椰油甜菜碱; 椰油基二甲基铵-3-磺丙基甜菜碱; 椰油亚氨基二甘氨酸; 椰油亚氨基二丙酸; 椰油/油酰胺基丙基甜菜碱; 椰油酰基肌氨酰胺DEA; DEA-椰油酰两性基二丙酸; 二羟乙基牛脂甘氨酸; 聚二甲基硅氧烷丙基PG-甜菜碱; N,N-二甲基-N-月桂酸-酰胺丙基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; N,N-二甲基-N-肉豆蔻基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; N,N-二甲基-N-棕榈基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; N,N-二甲基-N-硬脂酰胺基丙基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; N,N-二甲基-N-硬脂基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; N,N-二甲基-N-牛脂-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; 癸酰两性基二乙酸二钠; 癸酰两性基二丙酸二钠; 辛酰两性基二乙酸二钠; 辛酰两性基二丙酸二钠; 椰油两性基二乙酸二钠; 椰油两性基二丙酸二钠; 异硬脂两性基二丙酸二钠; 月桂醇聚醚-5羧基两性基二乙酸二钠; 月桂亚氨基二丙酸二钠; 月桂酰两性基二乙酸二钠; 月桂酰两性基二丙酸二钠; 辛基b-亚氨基二丙酸二钠; 油酰两性基二乙酸二钠; 油酰两性基二丙酸二钠; PPG-2-异癸醇聚醚-7羧基两性基二乙酸二钠; 大豆油酰两性基二乙酸二钠; 硬脂酰两性基二乙酸二钠; 妥尔油酰两性基二丙酸二钠; 牛脂酰两性基二乙酸二钠; 牛脂酰亚氨基二丙酸二钠; 麦胚油酰两性基二乙酸二钠; N,N-二硬脂酰基-N-甲基-N-(3-磺丙基)-铵甜菜碱; 芥酸酰胺丙基羟基磺基甜菜碱; 乙基己基二丙酸; 乙基羟甲基油醇恶唑啉; 乙基PEG-15可可胺硫酸酯; 氢化卵磷脂; 水解蛋白质; 异硬脂酰胺丙基甜菜碱; 月桂酰胺丙基甜菜碱; 月桂酰胺丙基二甲基甜菜碱; 月桂酰胺丙酸; 月桂两性基二丙酸; 月桂酰赖氨酸; 月桂基甜菜碱; 月桂基羟基磺基甜菜碱; 月桂基磺基甜菜碱; 亚油酰胺丙基甜菜碱; 溶血卵磷脂; 乳脂质酰胺丙基甜菜碱; 肉豆蔻酰胺丙基甜菜碱; 辛基二丙酸; 辛基亚氨基二丙酸; 油酰胺基丙基甜菜碱; 油醇甜菜碱; 4,4(5H)-恶唑二甲醇, 2-(十七烯基)-; 棕榈酰胺丙基甜菜碱; 棕榈胺氧化物; 蓖麻醇酸酰胺丙基甜菜碱; 蓖麻醇酸酰胺丙基甜菜碱/1PD1共聚物; 芝麻酰胺丙基甜菜碱; C12-15烷氧基丙基亚氨基二丙酸钠; 癸酰两性基乙酸钠; 辛酰两性基乙酸钠; 辛酰两性基羟丙基磺酸钠; 辛酰两性基丙酸钠; 羧甲基牛脂聚丙胺钠; 椰油基氨基丙酸钠; 椰油基两性基乙酸钠; 椰油基两性基羟丙基磺酸钠; 椰油基两性基丙酸钠; 二羧乙基椰油基磷酸乙基咪唑啉钠; 氢化牛脂二甲基甘氨酸钠; 异硬脂两性基丙酸钠; 月桂亚氨基二丙酸钠; 月桂酰两性基乙酸钠; 油酰两性基羟丙基磺酸钠; 油酰两性基丙酸钠; 硬脂两性基乙酸钠; 妥尔油酰两性基丙酸钠; 大豆油酰胺丙基甜菜碱; 硬脂基甜菜碱; 牛脂酰胺基丙基羟基磺基甜菜碱; 牛脂两性基聚羧基丙酸; 月桂酰两性基PG-乙酸三钠磷酸氯化物; 十一碳烯酰胺丙基甜菜碱; 和小麦胚芽油酰胺丙基甜菜碱。

[0042] 在其它实施方案中, 表面活性剂优选地是非离子表面活性剂。合适非离子表面活性剂的实例包括但不限于聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(BRIJ®56); 聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(BRIJ®58); 聚氧乙烯二醇十二烷基醚(BRIJ®35); 聚氧乙烯(9)p-t-辛基苯酚(NONIDET™ P-40); 聚氧乙烯(4-5)p-t-辛基苯酚(TRITON™ X-45); 聚氧乙烯(7-8)p-t-辛基苯酚(TRITON™ X-114); 聚氧乙烯(9-10)p-t-辛基苯酚(TRITON™ X-100); 聚氧乙烯(9-10)壬基酚(TRITON™ N-101); 聚氧乙烯(20)山梨糖醇单月桂酸酯(TWEEN®20); 聚氧乙烯(20)山

梨糖醇单棕榈酸酯(TWEEN®40);聚氧乙烯(20)山梨糖醇单油酸酯(TWEEN®80);二甲基癸基膦氧化物(APO-10);二甲基十二基膦氧化物(APO-12);环己基-n-乙基-β-D-麦芽糖苷;环己基-n-己基-β-D-麦芽糖苷;环己基-n-甲基-β-麦芽糖苷;n-癸酰基蔗糖;n-癸基-β-D-吡喃葡萄糖苷;n-癸基-β-吡喃麦芽糖苷;n-癸基-β-D-硫代麦芽糖苷;n-十二烷酰蔗糖;十乙二醇单十二烷基醚;N-癸酰-N-甲基葡萄糖胺;n-癸基α-D-吡喃葡萄糖苷;癸基β-D-吡喃麦芽糖苷;n-十二烷酰-N-甲基葡萄糖酰胺;n-十二烷基α-D-麦芽糖苷;n-十二烷基β-D-麦芽糖苷;庚烷-1,2,3-三醇;七乙二醇单癸醚;七乙二醇单十二烷基醚;七乙二醇单十四烷基醚;n-十六基β-D-麦芽糖苷;六乙二醇单十二烷基醚;六乙二醇单十六烷基醚;六乙二醇单十八烷基醚;六乙二醇单十四烷基醚;甲基-6-0-(N-庚基氨甲酰基)-α-D-吡喃葡萄糖苷;九乙二醇单十二烷基醚;N-壬酰-N-甲基葡萄糖胺;N-壬酰-N-甲基葡萄糖胺;八乙二醇单癸醚;八乙二醇单十二烷基醚;八乙二醇单十六烷基醚;八乙二醇单十八烷基醚;八乙二醇单十四烷基醚;辛基-β-葡萄糖苷;辛基-β-硫代葡萄糖苷;辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷;辛基-β-D-1-硫代吡喃葡萄糖苷;五乙二醇单癸醚;五乙二醇单十二烷基醚;五乙二醇单十六烷基醚;五乙二醇单己醚;五乙二醇单十八烷基醚;五乙二醇单辛醚;聚乙二醇二环氧甘油醚;聚乙二醇醚;聚氧乙烯10十三烷基醚;聚氧乙烯(100)硬脂酸盐;聚氧乙烯(20)异十六烷基醚;聚氧乙烯(20)油醇醚;聚氧乙烯(40)硬脂酸盐;聚氧乙烯(50)硬脂酸盐;聚氧乙烯(8)硬脂酸盐;聚氧乙烯双(咪唑基羰基);聚氧乙烯(25)丙二醇硬脂酸盐;来自皂树树皮的皂角苷;十四基-β-D-麦芽糖苷;四乙二醇单癸醚;四乙二醇单十二烷基醚;四乙二醇单十四烷基醚;三乙二醇单癸醚;三乙二醇单十二烷基醚;三乙二醇单十六烷基醚;三乙二醇单辛醚;三乙二醇单十四烷基醚;泰洛沙泊;n-十一基β-D-吡喃葡萄糖苷,(辛基苯氧)聚乙氧基乙醇(IGEPAL®CA-630);聚氧乙烯(5)壬基苯醚(IGEPAL®CO-520);和聚氧乙烯(150)二壬基苯醚(IGEPAL®DM-970)。在一个实施方案中,表面活性剂是聚氧乙烯(5)壬基苯醚(IGEPAL®CO-520)。在另一个实施方案中,表面活性剂是聚氧乙烯(150)二壬基苯醚(IGEPAL®DM-970)。在一个实施方案中,表面活性剂优选地是(辛基苯氧)聚乙氧基乙醇(IGEPAL®CA-630)。

[0043] 如本领域技术人员认识到,添加至生物流体的表面活性剂的量可能并且将会变化,取决于生物流体中的可包括循环miRNA的生物流体组分的特性。在一些实施方案中,生物流体中的表面活性剂的最终浓度可在约0.001至约10%范围内。在一个实施方案中,表面活性剂的浓度可在约0.001至约0.01%范围内。在另一个实施方案中,表面活性剂的浓度可在约0.01%至约0.1%范围内。在另一个实施方案中,表面活性剂的浓度可在约0.1%至约1%范围内。在另一个实施方案中,表面活性剂的浓度可在约1至约5%范围内。在另外的实施方案中,表面活性剂的浓度可在约5%至约10%范围内。

[0044] (c)抗miRNA结合蛋白试剂

[0045] 生物流体与抗miRNA结合蛋白试剂接触。抗miRNA结合蛋白试剂可为能够结合与循环miRNA缔合的miRNA结合蛋白的任何试剂。与循环miRNA缔合的miRNA结合蛋白可直接结合miRNA,或可间接地与包括miRNA的RNA-蛋白质复合物缔合。可与循环miRNA缔合的miRNA结合蛋白质的非限制实例可包括Argonaut、Dicer、人免疫缺陷病毒(HIV)反式激活响应RNA结合蛋白(TRBP)、干扰素诱导蛋白激酶的蛋白质活化剂(PACT)、SMN复合物、脆折X智力低下蛋白质(FMRP)、含有Tudor葡萄球菌核酸酶结构域的蛋白质(Tudor-SN)、假定DNA解旋酶

MOV10,和含有RNA识别基元的蛋白质TNRC6B,或RISC复合物的其它组分或可与RISC复合物瞬时或永久缔合的物质。

[0046] 在一些实施方案中,生物流体优选地与抗Argonaut试剂接触。Argonaut蛋白质的非限制实例可包括Ago1、Ago2、Ago3和Ago4。在一个实施方案中,生物流体与抗Ago1试剂接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago2试剂接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago3试剂接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago4试剂接触。在另一个实施方案中,生物流体优选地与能够结合一种以上Argonaut蛋白质的试剂接触。举例来说,生物流体可与抗Ago1和抗Ago2试剂接触。在仍然另一个实施方案中,生物流体优选地与能够结合Ago1、Ago2、Ago3和Ago4的试剂接触。

[0047] 抗miRNA结合蛋白试剂可为表位结合剂。取决于目标分子,合适表位结合剂的非限制实例包括选自以下组成的组的剂:适体、抗体、抗体片段、双链DNA序列、修饰核酸、核酸模拟物、配体、配体片段、受体、受体片段、多肽、肽、辅酶、辅助调节因子、变构分子和离子。

[0048] 在一些实施方案中,表位结合剂是抗体。可使用的抗体的非限制实例包括多克隆抗体、腹水、Fab片段、Fab'片段、单克隆抗体、单链抗体、单结构域抗体、人源化抗体和含有抗体的表位结合位点的其它片段。

[0049] 在一些实施方案中,生物流体与抗Argonaut抗体接触。在一个实施方案中,生物流体与抗Ago1抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago2抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago3抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与抗Ago4抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与选自抗Ago1、抗Ago2、抗Ago3或抗Ago4抗体的两种抗Ago抗体接触。举例来说,生物流体与抗Ago1和抗Ago2抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与选自抗Ago1、抗Ago2、抗Ago3或抗Ago4的三种抗Ago抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与所有四种抗Ago抗体接触。在另一个实施方案中,生物流体与能够识别一种以上Argonaut蛋白质的抗体接触。这类抗体可识别一种、两种、三种或四种Argonaut蛋白质。在一个实施方案中,生物流体与能够识别所有四种人Argonaut蛋白质的抗Argonaut抗体接触。

[0050] 生物流体与本公开的抗miRNA结合蛋白试剂接触形成免疫沉淀miRNA复合物。因此,在生物流体与固定抗miRNA结合蛋白试剂接触时,抗miRNA结合蛋白试剂通常附接至固体载体以形成免疫沉淀miRNA复合物。固体载体可为可加以改性以含有适合于抗miRNA结合蛋白试剂附接或缔合的离散个别位点的材料。固体载体材料的非限制实例包括玻璃、改性或功能化玻璃、塑料包括丙烯酸树脂、聚苯乙烯和苯乙烯与其它材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨基甲酸酯,或TeflonJ、尼龙、硝化纤维素、多糖、树脂、二氧化硅或基于二氧化硅的材料包括硅和改性硅、碳、金属、无机玻璃和塑料。固体载体的大小和形状可变化而不背离本发明范围。固体载体可为平面,固体载体可为孔,即,364孔板,或替代地,固体载体可为珠粒或滑片。在一些实施方案中,固体载体是多层板的孔。在其它实施方案中,固体载体是吸移管尖端的内表面。在其它实施方案中,固体载体优选地是珠粒。在一些实施方案中,固体载体优选地是磁性珠粒。

[0051] 抗miRNA结合蛋白试剂可以多种方式附接至固体载体,如本领域技术人员认识到。抗miRNA结合蛋白试剂和固体载体可用化学官能团衍生化以便随后将两者附接。举例来说,固体载体可用包括但不限于氨基、羧基、氧代基团或硫醇基团的化学官能团来衍生化。使用

这些官能团,抗miRNA结合蛋白试剂可使用官能团直接附接,或间接地使用接头来附接。或者,抗miRNA结合蛋白试剂也可非共价附接至固体载体。举例来说,可制备生物素化抗miRNA结合蛋白试剂,其可结合至用链霉抗生物素蛋白共价涂布的固体载体,导致附接。将抗miRNA结合蛋白试剂附接至固体载体的其它方法在本领域中是熟知的,并且可如公布实验室手册诸如“Current Protocols in Molecular Biology”Ausubel等人John Wiley&Sons, New York,2003或“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”Sambrook&Russell,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,第3版,2001中所描述。在一些实施方案中,制备生物素化抗miRNA结合蛋白试剂,其可结合至用链霉抗生物素蛋白共价涂布的珠粒固体载体,导致附接。如在以下部分1(d)中所描述,在本公开的方法中,抗miRNA结合蛋白试剂可附接至固体载体,然后接触生物流体。或者,本公开的生物流体可同时与抗miRNA结合蛋白试剂和固体载体接触,其中抗miRNA结合蛋白试剂附接至固体载体。本公开的生物流体也可在使生物流体与固体载体接触之前与抗miRNA结合蛋白试剂接触,其中抗miRNA结合蛋白试剂附接至固体载体。如本领域技术人员认识到,抗miRNA结合蛋白试剂的量和浓度可能并且将会变化,取决于抗miRNA结合蛋白试剂的特性、所使用生物流体的体积、生物流体中的miRNA的浓度和miRNA结合蛋白以及其它因素,并且可在实验上确定。当抗miRNA结合蛋白试剂是纯化抗体时,每0.2ml血浆或血清样品可使用约0.5至约10 $\mu$ g抗体。

[0052] (d)接触生物流体并分离miRNA

[0053] 在本公开的方法中,生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。如本领域技术人员认识到,生物流体可与各种其它试剂接触而不背离本发明范围。例如,生物流体可与硫醇-还原剂接触以阻断二硫键的形成并且在miRNA分离期间抑制核糖核酸酶活性。合适硫醇-还原剂包括二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇、2-巯基乙胺和三(羧乙基)膦(TCEP)。生物流体也可与消泡剂接触。消泡剂的实例包括消泡剂204和消泡剂O-30、消泡剂A、消泡剂B、消泡剂C、消泡剂Y-30和Sag 471。生物流体也可与RNA和蛋白质降解抑制剂接触来保存miRNA和miRNA-蛋白质复合物。

[0054] 在一些实施方案中,缓冲剂可用于保持适合于分离miRNA的pH。作为非限制实例,缓冲剂可包括但不限于三羟甲基氨基甲烷乙酸酯、EDTA、三(羟甲基)氨基甲烷、甘氨酸和柠檬酸。

[0055] 在一些实施方案中,本公开的方法包括使生物流体与表面活性剂接触以解离生物流体组分,然后使生物流体与抗miRNA结合蛋白试剂接触以形成免疫沉淀miRNA复合物。在其它实施方案中,生物流体同时与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。

[0056] 在一些实施方案中,生物流体的未稀释样品与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。在其它实施方案中,生物流体在与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触之前稀释。生物流体的稀释可如以上部分1(a)所描述。

[0057] 生物流体、表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂之间的接触总体上包括孵育期以允许形成免疫沉淀miRNA复合物。生物流体可与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约1、5、10、15、30、45、60、90、120、240或480分钟或更长。在一些实施方案中,生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或约15分钟。在其它实施方案中,生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或约30

分钟。在其它实施方案中,生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85或约90分钟。在其它实施方案中,生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约90、120、240或480分钟或更长。在一个实施方案中,生物流体优选地与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触并且孵育约20、25、30、35、40、45、50、55或约60分钟。

[0058] 生物流体可在约0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或约30℃或更高的温度下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。在一些实施方案中,生物流体在约0、1、2、3、4、5或约6℃的温度下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。在其它实施方案中,生物流体在约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或约15℃的温度下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。在其它实施方案中,生物流体在约11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或约25℃的温度下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。在其它实施方案中,生物流体在约20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或约30℃的温度下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。

[0059] 典型地,生物流体在搅拌下与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触。另外,在形成复合物之后,生物流体可总体上移除以分离免疫沉淀miRNA复合物,并且将免疫沉淀miRNA复合物洗涤。

[0060] (e)释放miRNA

[0061] 根据本公开的方法,使miRNA从免疫沉淀miRNA复合物中释放。从蛋白质复合物释放核酸诸如miRNA的方法在本领域中是熟知的并且可包括蛋白水解酶消化,和使核酸-蛋白质复合物中的蛋白质变性。在一些实施方案中,miRNA通过蛋白质变性从免疫沉淀miRNA复合物释放。例如,miRNA可通过使免疫沉淀miRNA复合物与硫氰酸胍-苯酚-氯仿溶液组合来从免疫沉淀miRNA复合物释放。然后,释放miRNA可通过沉淀或使用吸附柱色谱来纯化。

[0062] 在其它实施方案中,miRNA优选地通过蛋白水解酶消化从免疫沉淀miRNA复合物释放。术语“蛋白水解酶(protease)”、“蛋白酶(proteinase)”和“肽酶”在本文中可互换使用并且是指催化共价肽键的水解的酶群组。蛋白水解酶在本领域中是熟知的并且可包括酸性蛋白水解酶和丝氨酸蛋白水解酶。在一些实施方案中,在本公开的方法中可用于释放miRNA的蛋白水解酶是酸性蛋白水解酶。在一个实施方案中,在本公开的方法中可用于释放miRNA的酸性蛋白水解酶是胃蛋白酶。

[0063] 在其它实施方案中,在本公开的方法中可用于释放miRNA的蛋白水解酶是酸性蛋白水解酶。已经识别丝氨酸蛋白水解酶的六个集群,其中两个最大集群是胰凝乳蛋白酶样和枯草杆菌蛋白酶样集群。很多枯草杆菌酶是已知的。广泛研究的一些枯草杆菌酶包括从各种芽孢杆菌属获得的枯草杆菌酶,包括枯草杆菌蛋白酶DY、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶BPN' (还称为枯草菌蛋白酶)、碱性杆状菌蛋白酶以及从林伯氏白色念球菌获得的蛋白酶K,和从普通嗜热放线菌获得的嗜热蛋白酶。在本发明的某些实施方案中,蛋白酶K优选是蛋白水解酶。然而,在某些实施方案中也可使用其它蛋白水解酶,例如像枯草杆菌蛋白酶。因此,蛋白水解酶可为导致免疫沉淀miRNA复合物中的蛋白质的至少部分分解以使得释放miRNA的许多蛋白水解酶中的任何一种。在一些实施方案中,在本公开的方法中可用于释放miRNA的蛋白水解酶优选是蛋白酶K。

[0064] 在本质上,通过使复合物与蛋白水解酶接触使miRNA从免疫沉淀miRNA复合物释

放。如本领域技术人员认识到,用于释放miRNA的蛋白水解酶的量可能并且将会变化,取决于蛋白水解酶、免疫沉淀miRNA复合物的丰度、蛋白水解酶消化期间的温度、用于消化的缓冲液条件和消化持续时间以及其它因素。通常,免疫沉淀miRNA复合物可与约0.3单位的酶活性至约30单位的酶活性接触。在某些实施方案中,与免疫沉淀miRNA复合物接触的蛋白水解酶的量可在约0.3至约1单位、约1至约3单位、约3单位至约10单位,或约10单位至约30单位范围内。

[0065] 在一些实施方案中,如实施例1所描述,在室温下使用蛋白水解酶消化。如本文使用,术语“室温”用于描述约10°C至约30°C的温度。

[0066] 免疫沉淀miRNA复合物可与蛋白水解酶一起孵育约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或约30分钟或更长。在一些实施方案中,免疫沉淀miRNA复合物与蛋白水解酶一起孵育约0.5、1、2、3、4或约5分钟。在其它实施方案中,免疫沉淀miRNA复合物与蛋白水解酶一起孵育约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或约15分钟。在其它实施方案中,免疫沉淀miRNA复合物与蛋白水解酶一起孵育约15、16、17、18、19、20、25或约30分钟或更长。

[0067] 释放miRNA可适合于在没有进一步纯化的情况下供下游使用。或者,释放miRNA可进一步纯化供下游使用。核酸纯化方法,诸如吸附柱色谱或过滤技术,在本领域中是熟知的,例如,根据公布实验室手册诸如“Current Protocols in Molecular Biology”Ausubel等人John Wiley&Sons,New York,2003或“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”Sambrook&Russell,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,第3版,2001所描述的方法。

[0068] 释放miRNA的下游使用可变化。释放miRNA的非限制性使用包括定量实时PCR、微阵列分析、测序、限制片段长度多态性(RFLP)分析、单一核苷酸多态性(SNP)分析、小随体分析、短串联重复(STR)分析和比较基因组杂交(CGH)。

#### [0069] 11. 试剂盒

[0070] 本发明进一步提供试剂盒,其包括表面活性剂、抗miRNA结合蛋白试剂,和可用于本公开的方法的其它试剂。在一些实施方案中,提供用于从生物流体分离miRNA的试剂盒,所述试剂盒包括抗miRNA结合蛋白试剂和表面作用试剂。抗miRNA结合蛋白试剂和表面活性剂可如上述部分(1)所描述。在一些实施方案中,试剂盒中的抗miRNA结合蛋白试剂是附接至固体载体的抗Ago抗体。在某些实施方案中,固体载体可为珠粒、磁性珠粒或多层板的孔。在其它实施方案中,固体载体可为吸移管尖端的内表面。在一些实施方案中,试剂盒中的表面作用剂是IGEPAL。试剂盒可还包括从免疫沉淀miRNA复合物释放miRNA的构件。在一些实施方案中,试剂盒包括用于从免疫沉淀miRNA复合物释放miRNA的蛋白水解酶,例如,蛋白水解酶K。

#### [0071] 定义

[0072] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术性和科学性术语具有本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的含义。以下参考文献为本领域技术人员提供用于本发明中的许多术语的一般定义:Singleton等人Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第2版.1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker ed.,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等人(eds.),Springer Verlag

(1991);和Hale&Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文所用,除非另外指明,以下术语具有赋予其的含义。

[0073] 当介绍本公开或其一个或多个优选方面的要素时,冠词“一个/种(a)”、“一个/种(an)”、“所述(the)”以及“所述(said)”意图意指存在一个或多个要素。术语“包括”、“包含”和“具有”意在是包括性的,并且意指除所列出的要素之外可存在另外的要素。

[0074] 如本文使用,“微小RNA”或“miRNA”是指可在生物标本中检测到的5至40个核苷酸长度的小的非编码RNA序列。一些miRNA从发夹前体得到,所述前体例如通过酶DICER来处理成成熟物质,例如,约18-25个核苷酸,优选地21-23个核苷酸。微小RNA变体例如在不同动物物种之间是常见的。另外,miRNA的5'和3'末端处的变化是常见的,并且可由在成熟期间通过酶诸如DICER的不精确裂解所导致。这些变体展现miRNA序列中的不削弱功能或检测miRNA的能力的一系列可接受变化。另一种类型变体是Dicer处理后添加非模板核苷酸至miRNA的3'末端(这些核苷酸是非模板的,因为其不匹配人基因组)。最常见变体是具有添加至3'末端的额外A或U的miRNA序列。

[0075] 如本文使用,术语“生物流体”或“体液”可互换使用并且是指从受试者分离的流体。

[0076] 术语“生物流体”、“生物流体样品”或“生物样品”可互换使用并且意指从任何给定受试者分离的所有生物流体和排泄物。在本发明的情形中,这类样品包括但不限于血液和其部分、血清、血浆、尿液、排泄物、精液(semen)、精液(seminal fluid)、精液浆、前列腺液、射精前的分泌物(考珀液)、胸膜腔积液、眼泪、唾液、痰、汗、活检、腹水、脑脊液、羊水、淋巴、骨髓、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫内膜分泌物、胃肠分泌物、支气管分泌物、乳腺分泌物、卵巢囊肿分泌物和组织流体样品。

[0077] “分离”多核苷酸是经过识别并且与在其天然来源中通常与其缔合的至少一种污染物分离的核酸分子。分离的核酸分子处于其在自然界中被发现时以外的形式或环境。因此,分离的核酸分子不同于当它存在于天然细胞中时的特定核酸分子。

[0078] 因为可在不脱离本发明的范围下对上述动物、细胞和方法做出各种改变,所以在以上描述中和在以下给出的实施例中含有的所有事项都应解释为说明性的而非具有限制性意义。

## 实施例

[0079] 包含以下实施例以说明本公开。本领域技术人员应当了解在下面的实施例中公开的技术代表本发明者发现的在实践中本公开中起较好作用的技术。但是,鉴于本公开,本领域技术人员了解到可以在本公开中进行许多变化,并且仍然获得同样或类似的结果,而不背离本发明的精神和范围,因此,示出的所有事项应理解为例示性的,而不具有限制意义。

[0080] 实施例1:一般miRNA分离方案。

[0081] 用于分离循环miRNA的代表性方案包括在清洁剂存在下执行RNA免疫沉淀(RIP)以释放囊泡缔合miRNA。在此方案中,在不使用苯酚、离液剂或柱纯化的情况下,miRNA与其它细胞组分诸如其它RNA、血浆蛋白质等分离,并且可在40-70分钟内完成。

[0082] 方案由三个步骤组成:

[0083] 1)血浆组分用清洁剂处理,

[0084] 2)将miRNA/蛋白质复合物免疫沉淀,和

[0085] 3)miRNA从免疫沉淀miRNA复合物释放。

[0086] 蛋白质A(Sigma-Aldrich GE28-9670-56)、蛋白质G(Sigma-Aldrich GE28-9670-66)或链霉抗生物素蛋白(Sigma-Aldrich GE28-9857-38)珠粒用抗Ago抗体涂布,方法是将20 $\mu$ l磁性珠粒(10%浆液)转移至0.1ml RIP洗涤缓冲液(50mM Tris-HCl、pH 7.4、0.05% IGEPAL<sup>®</sup> CA-630),用RIP洗涤缓冲液洗涤珠粒一次,并且使用磁性立柱来从溶液中分离珠粒。然后,洗涤磁性珠粒重新悬浮于0.1ml RIP洗涤缓冲液,然后添加2.5-10 $\mu$ g非生物素化或生物素化抗Ago(Sigma-Aldrich SAB4800048)、抗Ago2(Sigma-Aldrich SAB4200085)或抗Ago1(Sigma-Aldrich SAB4200084)抗体。珠粒和抗体伴以旋转在室温下孵育约30分钟。然后,珠粒使用磁性立柱从溶液中分离。然后,抗体珠粒用0.5ml RIP洗涤缓冲液洗涤两次。

[0087] 在miRNA分离过程的第一步骤中,将0.2ml血浆、8 $\mu$ l 25% IGEPAL CA-630(Sigma-Aldrich 18896;产生1%最终浓度的40 $\mu$ l 25% IGEPAL/ml血浆)、2 $\mu$ l蛋白水解酶抑制剂混合物(PLC;Sigma-Aldrich P8340;10 $\mu$ l/ml血浆),和0.8 $\mu$ l RNA酶抑制剂(Sigma-Aldrich R1158;4 $\mu$ l/ml血浆)添加至制备的Ago抗体珠粒。或者,在制备珠粒时,血浆可用清洁剂和抑制剂处理,并且预处理血浆随后添加至抗体珠粒。

[0088] 在第二步骤中,miRNA/蛋白质复合物通过将样品伴以旋转在室温下孵育1hr或在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜来免疫沉淀。珠粒用1ml洗涤RIP缓冲液洗涤5X,并且使用磁性立柱收集以从上清液中分离珠粒。珠粒可短暂地离心并且送回到磁性立柱以移除残留上清液。

[0089] 在第三步骤中,使与抗体珠粒缔合的沉淀miRNA从蛋白质复合物中释放并且珠粒用TRI Reagent<sup>®</sup>BD或QIAzol溶解试剂萃取,随后用乙酸铵和线性丙烯酰胺来进行异丙醇沉淀,如Sigma-Aldrich Imprint RNA免疫沉淀试剂盒(RIP)技术公报所描述,或用Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒来纯化。替代地,并且优选地,miRNA通过蛋白酶K消化来释放。将20 $\mu$ l蛋白酶K混合物(14 $\mu$ l水、2 $\mu$ l 10X蛋白酶K释放缓冲液和4 $\mu$ l P4850蛋白酶K)添加至来自步骤二的珠粒,并且在室温下在vortex genie 2,设定4上孵育10分钟。10X蛋白酶K释放缓冲液包括100mM Tris、pH 8.0、15mM MgCl<sub>2</sub>、500mM KCl、100mM DTT和1% IGEPAL。孵育之后,珠粒立即通过安置于磁性立柱上并且将包括自由miRNA的上清液转移至新鲜试管来移除。上清液中的蛋白酶K然后通过将样品在95 $^{\circ}$ C下孵育5分钟来灭活。具体miRNA以Sigma-Aldrich的MystiCq RT-qPCR测定使用每次10 $\mu$ l聚腺苷酸加尾反应5 $\mu$ l每一种miRNA试剂来检测。合成miRNA,即,具有与miRBase列出的成熟miRNA相同序列的单链RNA,在0.02mg/ml线性丙烯酰胺中基于260nm下的储备溶液的吸光度来稀释至已知拷贝数,与从血浆制备的miRNA并行地测定,并且用作绝对定量的标准。

[0090] 实施例2:来自血浆的miRNA的免疫沉淀比单独Tri Reagent更有效。

[0091] 将使用RNA免疫沉淀反应(RIP)从血浆分离的miRNA的效率与使用TRI Reagent<sup>®</sup>BD(Sigma-Aldrich)的miRNA分离相比。TRI Reagent<sup>®</sup>BD是用于从血液衍生物诸如血清、血浆或全血同时分离RNA、DNA和蛋白质的试剂。

[0092] 使用TRI Reagent<sup>®</sup>BD来分离miRNA是根据制造商说明书。总之,0.2ml血浆与TRI Reagent<sup>®</sup>BD混合,并且miRNA使用氯仿萃取以用于相分离,然后在乙酸铵和线性丙烯酰胺

存在下进行异丙醇沉淀,并且洗涤RNA以供分析。使用RIP来分离miRNA用结合至20 $\mu$ l蛋白质A磁性珠粒的2.5 $\mu$ g抗Ago2抗体来执行。miRNA通过用TRI Reagent<sup>®</sup>BD萃取并且在乙酸铵和线性丙烯酰胺存在下的异丙醇沉淀来从珠粒回收,如对于直接血浆萃取一样。

[0093] 所制备样品中的let-7a-5p、miR23a-3p、miR191-5p、miR142-3p和miR451a miRNA的水平通过定量、实时RT-PCR来确定。来自血浆的miRNA的RIP的效率比TRI Reagent<sup>®</sup>BD高约5至约600倍(图1)。

[0094] 实施例3.RIP产率类似于商用试剂盒的产率。

[0095] 将使用RNA免疫沉淀(RIP)从血浆中分离miRNA的效率与使用Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒(Qiagen)的miRNA分离相比较。Qiagen miRNeasy使用包括选择性结合DNA或RNA的二氧化硅树脂的吸附柱,并且推荐用于从 $\leq 0.2$ ml血清或血浆中分离miRNA。

[0096] 使用QiagenmiRNeasy血清/血浆试剂盒分离miRNA是根据制造商的说明书。总之,0.2ml血浆与Q1Azol试剂混合,并且miRNA使用所提供的吸附柱从水层纯化。使用RIP来分离miRNA使用2.5 $\mu$ g抗Ago2抗体结合的20 $\mu$ l蛋白质A磁性珠粒来执行。miRNA通过Q1Azol试剂从珠粒中释放并且用Qiagen试剂盒纯化,与直接血浆萃取一样。

[0097] 所制备样品中的let-7a、miR23a、miR191、miR142和miR451a miRNA的水平通过定量、实时RT-PCR来确定。使用RIP的miRNA的产率类似于使用单独Qiagen试剂盒的miRNA产率(图2)。

[0098] 实施例4.将使用生物素化和非生物素化抗Ago抗体和链霉抗生物素蛋白珠粒为RIP进行比较。

[0099] 蛋白质A和蛋白质G珠粒均结合人IgG,其在血浆中极端丰富。为了避免共分离IgG,抗Ago(克隆2A8)和抗Ago2(克隆11A9)抗体用Pierce EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin(Thermo Scientific)来生物素化以便使用链霉抗生物素蛋白珠粒进行RIP。Ago-RIP使用2.5 $\mu$ g生物素化抗Ago2(b-Ago2)或抗Ago(b-Ago)抗体和20 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白磁性珠粒,或使用2.5 $\mu$ g非生物素化抗Ago2抗体和20 $\mu$ l蛋白质A珠粒来执行。使用生物素化抗Ago2(b-Ago2)抗体和链霉抗生物素蛋白珠粒的RIP给出与使用抗Ago2抗体与蛋白质A珠粒的RIP相同的miRNA产率(参见图3)。使用生物素化抗Ago的RIP给出显著较低miRNA产率,与非生物素化抗Ago和蛋白质A珠粒的产率一样。

[0100] 实施例5.使用RIP分离的miRNA的放热负面地影响产率。

[0101] 无核酸酶水中的加热作为RIP之后释放miRNA的手段来测试。Ago-RIP使用0.2ml血浆和2.5 $\mu$ g的在蛋白质A磁性珠粒上的非生物素化抗Ago或抗Ago2抗体或在链霉抗生物素蛋白磁性珠粒上的生物素化抗Ago或抗Ago2抗体来执行。将14 $\mu$ l无核酸酶水添加至珠粒,并且这些混合物在移除珠粒之前在40 $^{\circ}$ 、50 $^{\circ}$ 或60 $^{\circ}$ C下加热2分钟。将RIP随后放热与RIP随后使用Qiagen miRNeasy血清/血浆试剂盒的miRNA纯化,和使用Qiagen试剂盒直接从血浆纯化miRNA进行比较。合成cel-miR-39-3p(1.4e8拷贝)在Qiagen制备物添加Q1Azol之后或在添加至RIP后珠粒的水中予以跟踪标定。

[0102] 合成cel-miR-39-3p跟踪标定物在2分钟之后在60 $^{\circ}$ C下用珠粒上的RIP产物未检测到(图4)。在2分钟之后在40 $^{\circ}$ 、50 $^{\circ}$ 或60 $^{\circ}$ C下也未检测到内源性miRNA。对于miR23a、miR142、miR191和miR451a观察到类似结果。Let7a miRNA也在样品加热至50 $^{\circ}$ 或60 $^{\circ}$ C时损失。miRNA的损失可能归因于RNA酶在RIP中的遗留污染,因为血液已知含有极高水平的RNA酶。

[0103] 实施例6.使用蛋白酶K消化来释放miRNA。

[0104] 蛋白酶K消化作为在Ago-RIP之后释放miRNA的手段来测试。RIP使用0.2ml血浆和结合至20 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白磁性珠粒的2.5 $\mu$ g生物素化抗Ago2抗体来执行。RIP后珠粒在含有4 $\mu$ l蛋白酶K(Sigma-Aldrich P4850)的消化缓冲液(20 $\mu$ l的10mM Tris-HCL、pH 8.0、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10mM DTT、0.1% IGEAL)中伴以搅拌在室温或37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,或伴以搅拌在65 $^{\circ}$ C下孵育2分钟。移除珠粒之后,蛋白酶K在95 $^{\circ}$ C下灭活5分钟并且将5 $\mu$ l每一种蛋白酶K消化物添加至10 $\mu$ l聚腺苷酸加尾反应以便使用Sigma-Aldrich的MystiCq RT-qPCR测定来进行特异性miRNA检测。为了比较,RIP后珠粒的并行制备物使用QIAzol溶解试剂来萃取并且用miRNeasy血清/血浆(“总量”,设定为100%)来纯化。来自RIP-蛋白酶K的miRNA水平相对于来自其中使用miRNeasy试剂盒释放miRNA的RIP的水平来表示。

[0105] 在室温下使用蛋白酶K消化来释放miRNA产生比在较高温度下所释放更多的miRNA(图5)。在所有情况下,损失大量的总miRNA。损失很可能归因于样品中的残留RNA酶。

[0106] 类似实验在pH 2、3或4下的缓冲液中使用胃蛋白酶消化针对miRNA而不是蛋白酶K的释放来执行。使用胃蛋白酶的miRNA释放回收小于1%的miRNA(数据未展示)。

[0107] 实施例7.将RIP与从互物流体中萃取miRNA的其它方法比较。

[0108] miRNA使用生物素化抗Ago2和链霉抗生物素蛋白磁性珠粒和蛋白水解酶K释放来分离,基本上如实施例6所描述。为了比较,miRNA还使用来自Exiqon的miRCury<sup>TM</sup>RNA分离试剂盒-生物液体,或来自Qiagen的miRNeasy血清/血浆试剂盒来从血浆中直接纯化(图6)。这些数据示出来自使用Exiqon试剂盒纯化的RNA的let7a miRNA产率比使用Qiagen试剂盒纯化的产率高3-4倍。在大多数实验中,使用Ago-RIP和蛋白酶K释放来制备的大多数miRNA的在Exiqon和Qiagen的产率中间。let7a的结果在图6和图7中示出,但是miR23a、miR142和miR191的结果是类似的。另一方面,对于Ago-RIP和Exiqon来说,miR451a的产率是类似的。miR451a需要Ago2切割器活性以便处理至成熟miRNA,因此,只在Ago2复合物中发生。除了Ago2以外,其它miRNA可与Ago1、Ago3或Ago4缔合。由于所使用的抗体对于Ago2具有特异性,因此与它对于所有其它成熟miRNA相比,它更有效地分离miR451a。

[0109] 实施例8.具有或不具有蛋白水解酶抑制剂和RNA酶抑制剂的RIP。

[0110] Ago-RIP用于在存在(+inh)或不存在(-inh)蛋白水解酶抑制剂和RNA酶抑制剂的情况下分离miRNA,并且miRNA通过蛋白水解酶K从珠粒释放。与未用抑制剂处理的样品相比,在抑制剂存在下执行的Ago-RIP产生更多let7a miRNA。对于miR191,发现类似结果。对于miR451a,没有显著差异(图8)。

[0111] 还执行用具有或不具有抑制剂的IGEAL来预处理血清(+pre),并且与在添加抗体珠粒的同时添加具有或不具有抑制剂的IGEAL(-pre)进行比较。结果示出在与共处理相比时,用蛋白水解酶和RNA酶抑制剂预处理血清未改进let7a或 miR451a的产率(图8)。

[0112] 实施例9.使用或不使用清洁剂的情况下的miRNA回收。

[0113] 为了确定清洁剂对于分离miRNA的效应,Ago-RIP(使用0.2ml血浆)在存在或不存在IGEAL清洁剂的情况下使用10 $\mu$ g生物素化抗Ago2抗体/链霉抗生物素蛋白磁性珠粒来执行。认为在不存在清洁剂时分离的任何miRNA是自由的(即,不在囊泡中),并且在清洁剂存在下分离的任何miRNA是囊泡的。总miRNA是从IGEAL处理血浆回收的miRNA的水平,并且设定为100%。自由miRNA(未与囊泡缔合的miRNA)是从未用IGEAL处理的血浆回收的miRNA的

水平。囊泡缔合miRNA计算为总miRNA样品中的miRNA的水平减去自由miRNA样品中的所述miRNA的水平。图9示出let7a、miR23a、miR142和miR451a miRNA的自由和囊泡缔合水平。这些结果示出可需要清洁剂处理以通过RIP有效地从血浆中回收一些miRNA。

[0114] 实施例10.RIP是可规模化的。

[0115] RIP使用0.2ml血浆和10 $\mu$ g生物素化抗Ago2/链霉抗生物素蛋白珠粒,或0.4ml血浆和20 $\mu$ g生物素化抗Ago2/链霉抗生物素蛋白珠粒,随后通过蛋白酶K消化进行释放来执行。为了比较,miRNA使用Exiqon的miRCuryRNA分离试剂盒-生物液体从0.2ml相同血浆分离。使用每一种制备方法回收的let7a、miR191和miR451a的总产率在图10中示出。与Ago-RIP一样,两倍同样多的血浆(即,0.4ml相比于0.2ml)产生1.5-2倍同样多的测试miRNA,而柱基试剂盒(诸如来自Exiqon和Qiagen的试剂盒)是容量受到限制的并且建议使用不超过0.2ml血浆。

[0116] 实施例11.RIP的最小孵育和洗涤时间。

[0117] RIP使用0.2ml血浆和5 $\mu$ g生物素化抗Ago2/链霉抗生物素蛋白珠粒来执行,伴以旋转在室温下孵育5、15、30或60分钟。孵育5、15或30min的miRNA在孵育完成之后全部洗涤5次。孵育60min的miRNA用RIP洗涤缓冲液洗涤5、4、3、2或1次。所有miRNA通过蛋白酶K来释放。let7a的产率提供于图11中。结果示出超过15分钟的孵育期似乎为在所使用的条件(例如,抗体和珠粒的类型和量)下最大miRNA回收所必需,但是在使用Sigma-Aldrich的MystiCq测定(聚腺苷酸加尾,RT,qPCR)来检测miRNA之前只需要一次洗涤。对于miR122、miR191和miR451a,获得类似结果。

[0118] 实施例12.RIP对于miRNA具有特异性。

[0119] 执行以下实例以确定是否Ago-RIP对于miRNA具有特异性或是否Ago-RIP还分离物其它RNA。使用Ago-RIP(S)、Exiqon的miRCuryRNA分离试剂盒-生物液体(E),或Qiagen的miRneasy血清/血浆试剂盒(Q)从0.2ml新鲜血浆(实验1和2)或0.2ml冷冻血浆(实验3)中执行分离。实验1用2.5 $\mu$ g生物素化抗ago2抗体/20 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白珠粒来执行。实验2和3用2.5 $\mu$ g生物素化抗ago2抗体/20 $\mu$ l链霉抗生物素蛋白珠粒来执行。基本上如上实施例6所述的蛋白酶K消化用于从珠粒中释放miRNA。特定miRNA(例如,let7a)和特定小核或核仁RNA(例如,RNU6或SNORD48)使用MystiCq RT-qPCR测定来检测,并且更长mRNA或个rRNA(例如,GAPDH、RN18S、RN28S)使用KiCqStart<sup>®</sup>RT-qPCR(Sigma-Aldrich)测定来检测。来自海拉(HeLa)细胞(使用TR1Reagent<sup>®</sup>BD来分离)的总RNA用于定量标准。

[0120] 如预期,miRNA诸如let7a使用Ago-RIP或任一种柱基试剂盒来分离(参见图12A)。然而,其它小RNA或大RNA未通过Ago-RIP来分离,而是使用Exiqon和Qiagen试剂盒来分离。如图12B和图12C中示出,几乎没有RNU6、SNORD48、GAPDH、RN18S或RN28S RNAs使用Ago-RIP得到分离,而是所有这些其它类型的RNA使用Exiqon和Qiagen试剂盒得到分离。因此,Ago-RIP仅特异性地分离miRNA。

[0121] 实施例13.使用抗Ago1和抗Ago2抗体增加RIP产率。

[0122] 由于不同miRNA与不同Ago蛋白质缔合,因此可能某些miRNA的产率可经由针对不同Ago蛋白质的抗体的组合使用来改进。因此,miRNA使用10 $\mu$ g抗Ago1抗体/20 $\mu$ l蛋白质A珠粒、10 $\mu$ g抗Ago2抗体/20 $\mu$ l蛋白质A珠粒,或20 $\mu$ l的每一种类型抗体珠粒的1:1混合物从0.2ml血浆中分离。miRNA从珠粒的释放使用Q1Azol溶解试剂来执行并且使用Qiagen试剂盒

来纯化,基本上如上实施例3所述。特定miRNA(例如,let7a、miR142-3p、miR122、miR191和miR451a)使用MystiCq RT-qPCR测定来检测。

[0123] 如图13中示出,共同使用两种抗体的产率大约是单独使用的每一种抗体的总和。对于大多数miRNA,使用抗Ago2导致比使用抗Ago1更大的产率。然而,在使用抗Ago1时,回收更多miR122,与Turchinovich等人2012, RNA Biology 9(8):1066-75)一致。另外,miR451a只使用抗Ago2来回收,如以上实施例7中所说明。

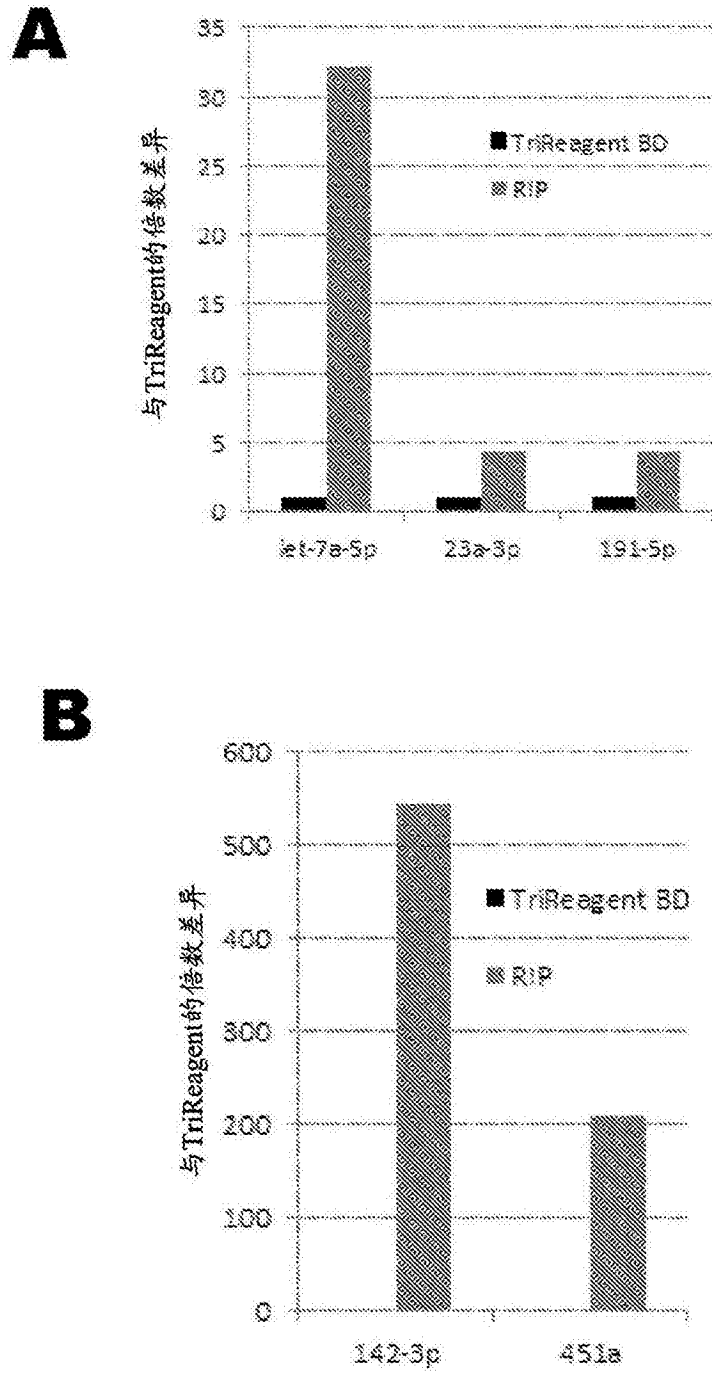


图1

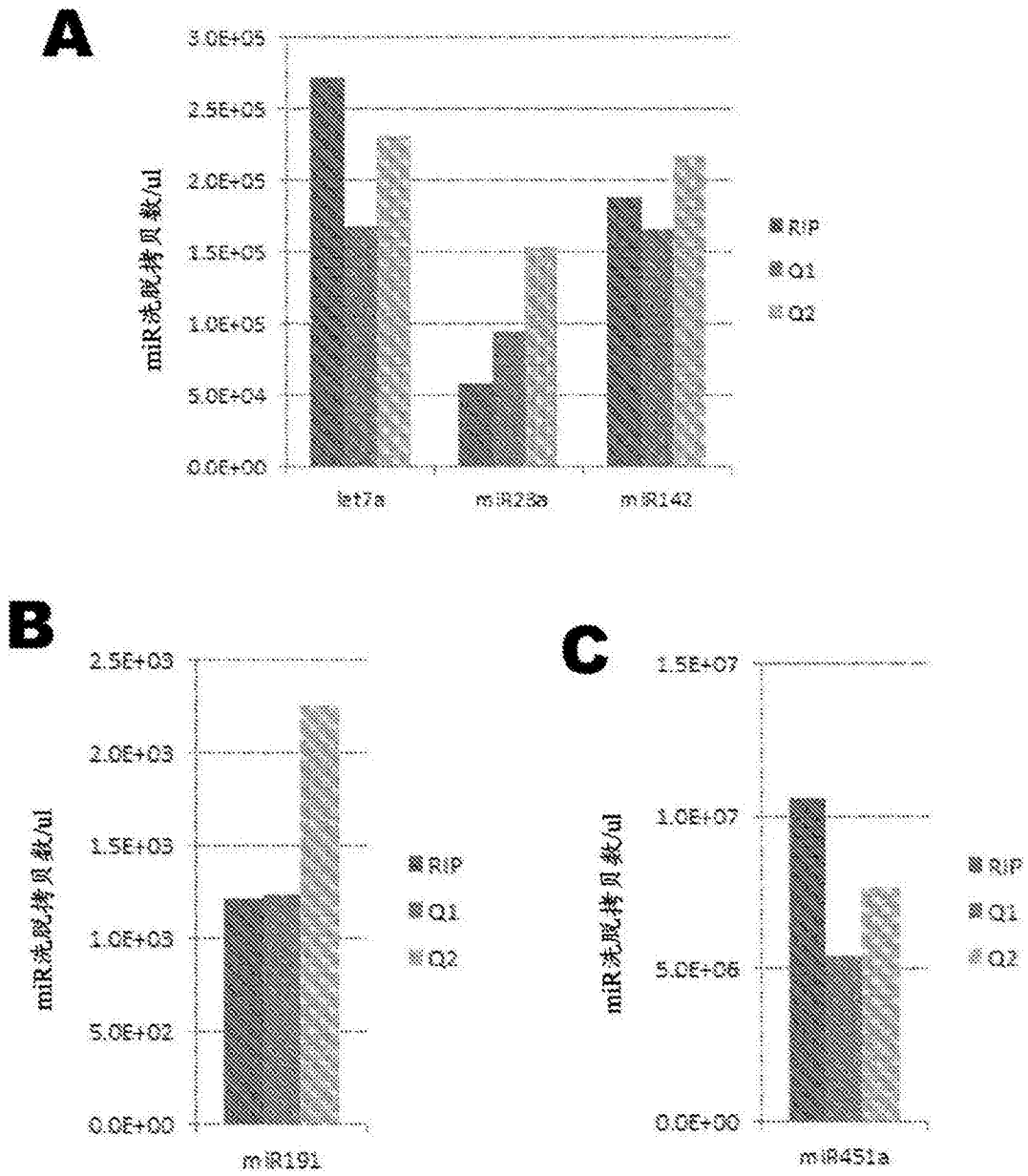


图2

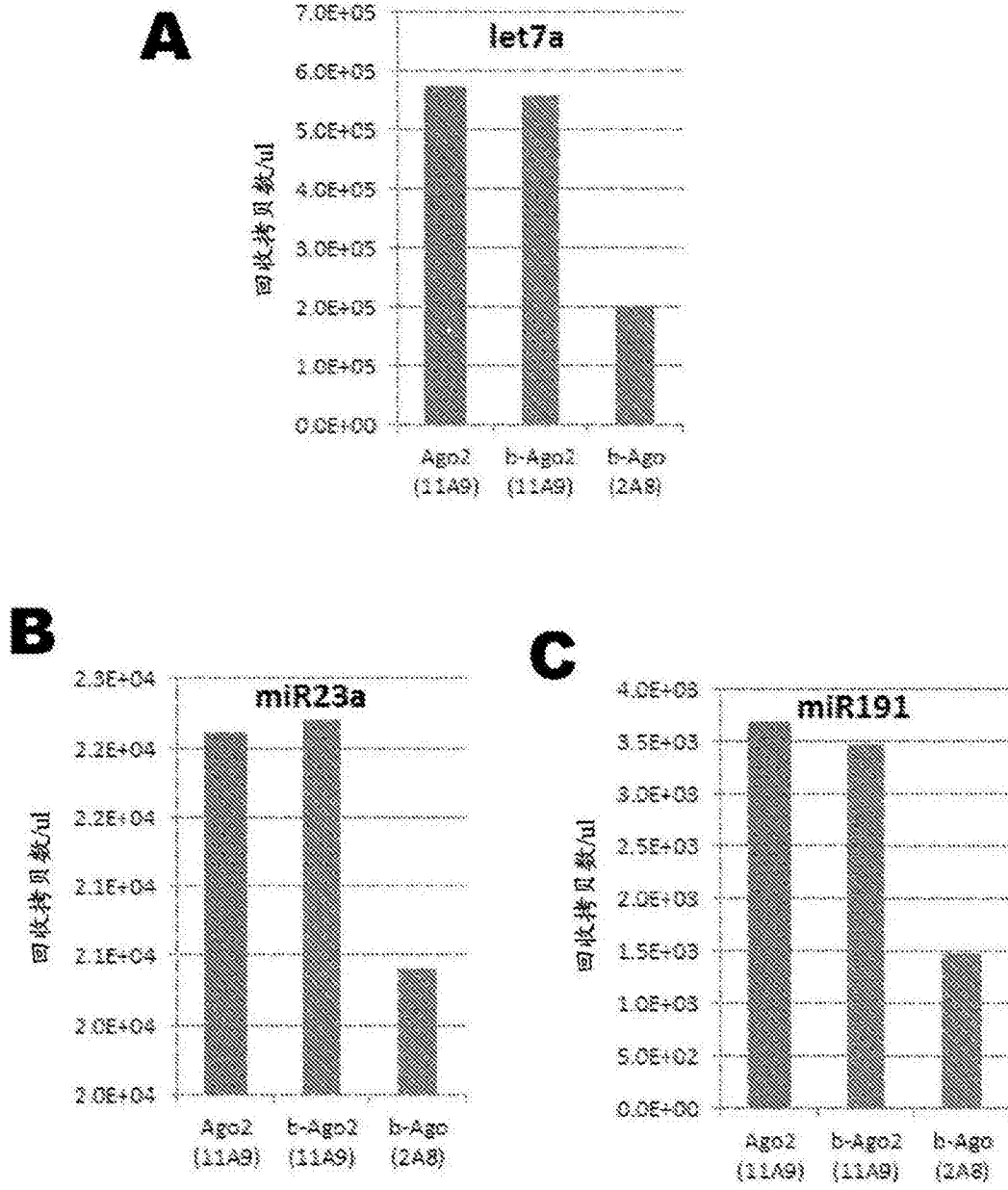


图3

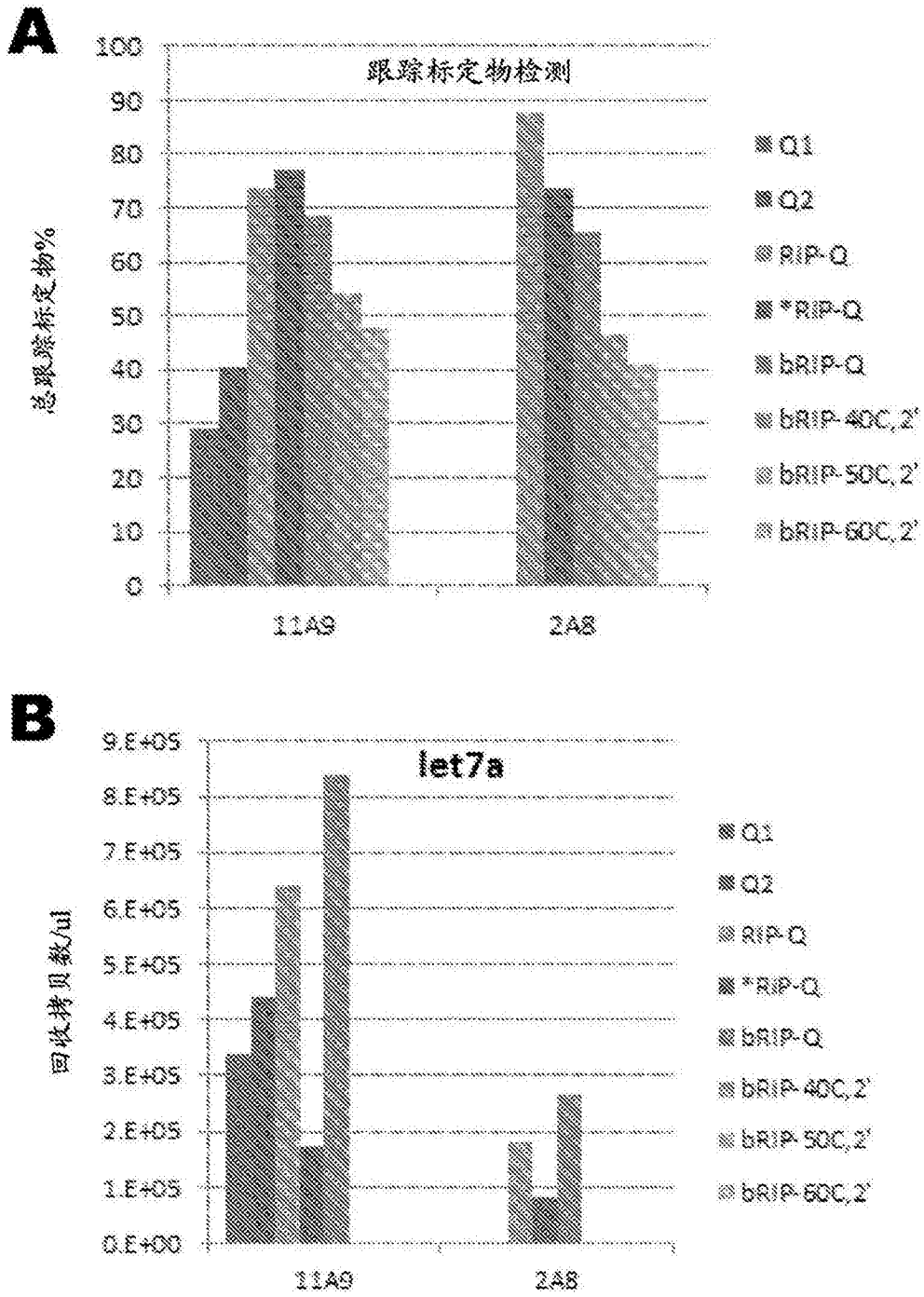


图4

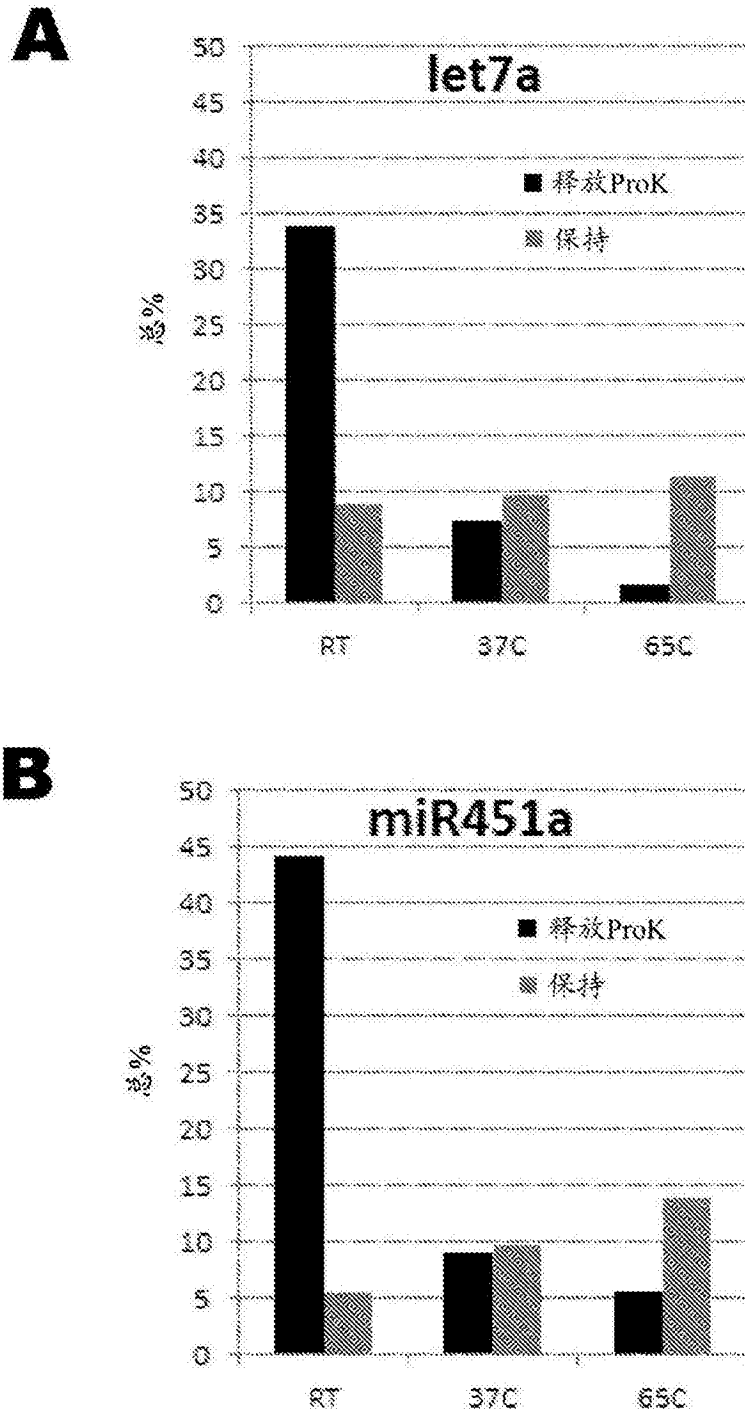


图5

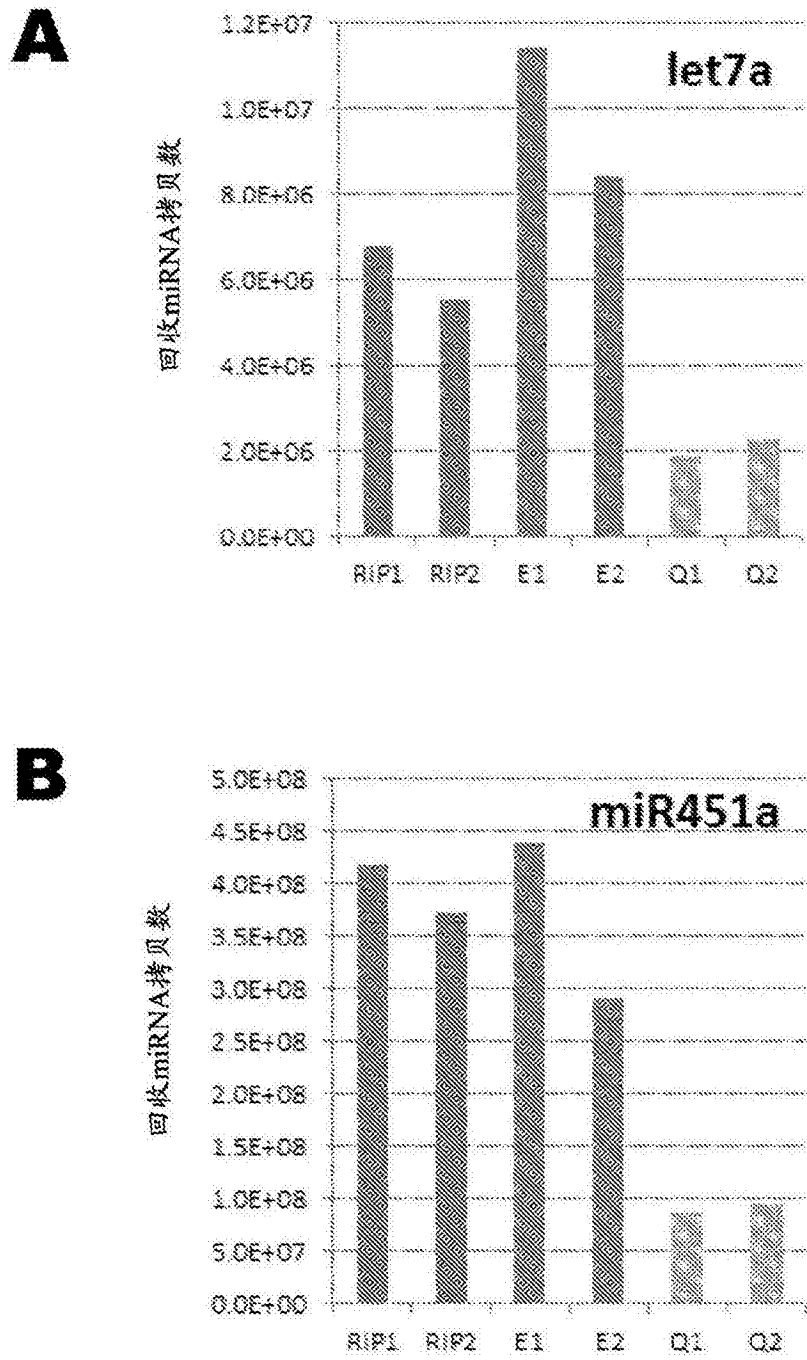


图6

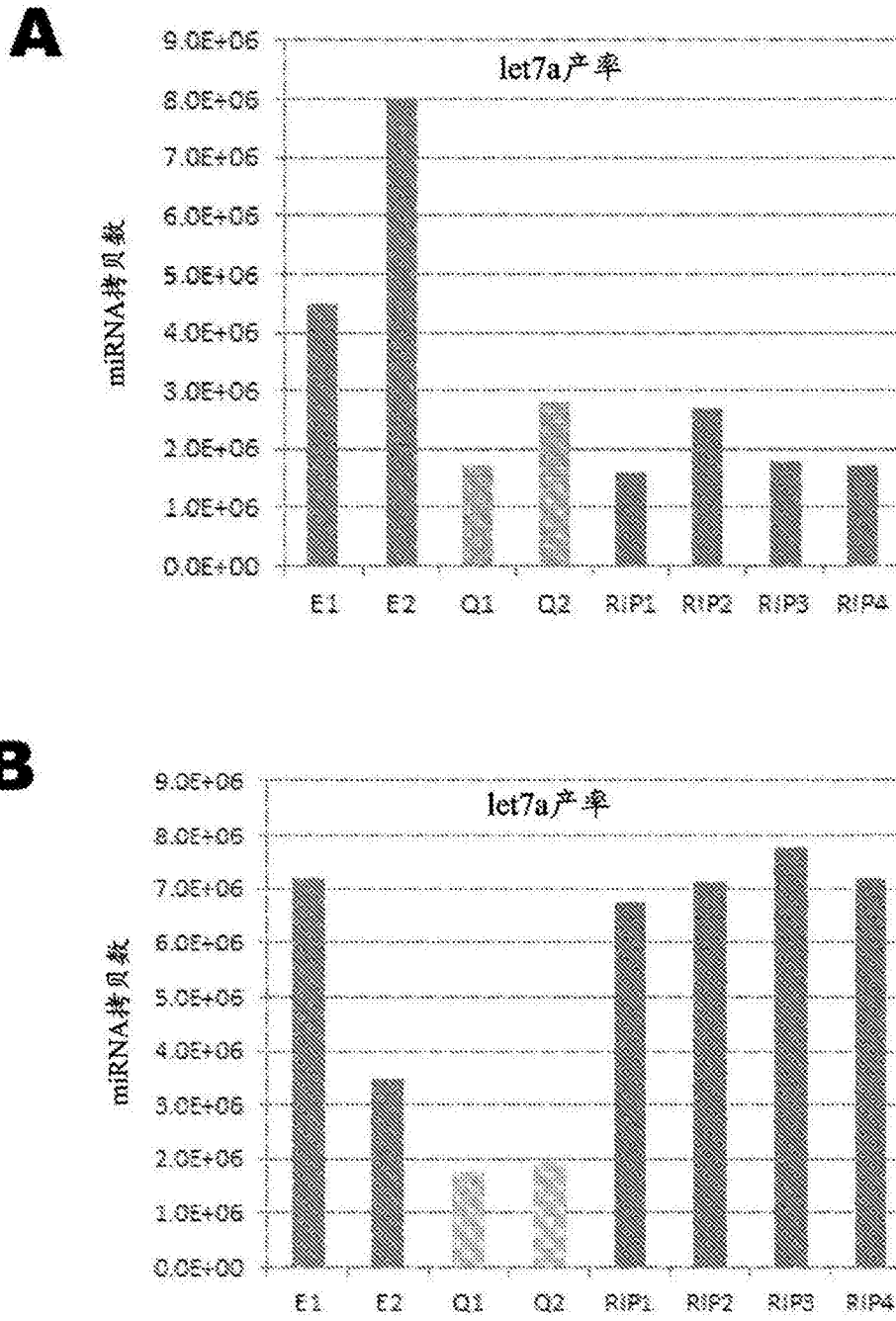


图7

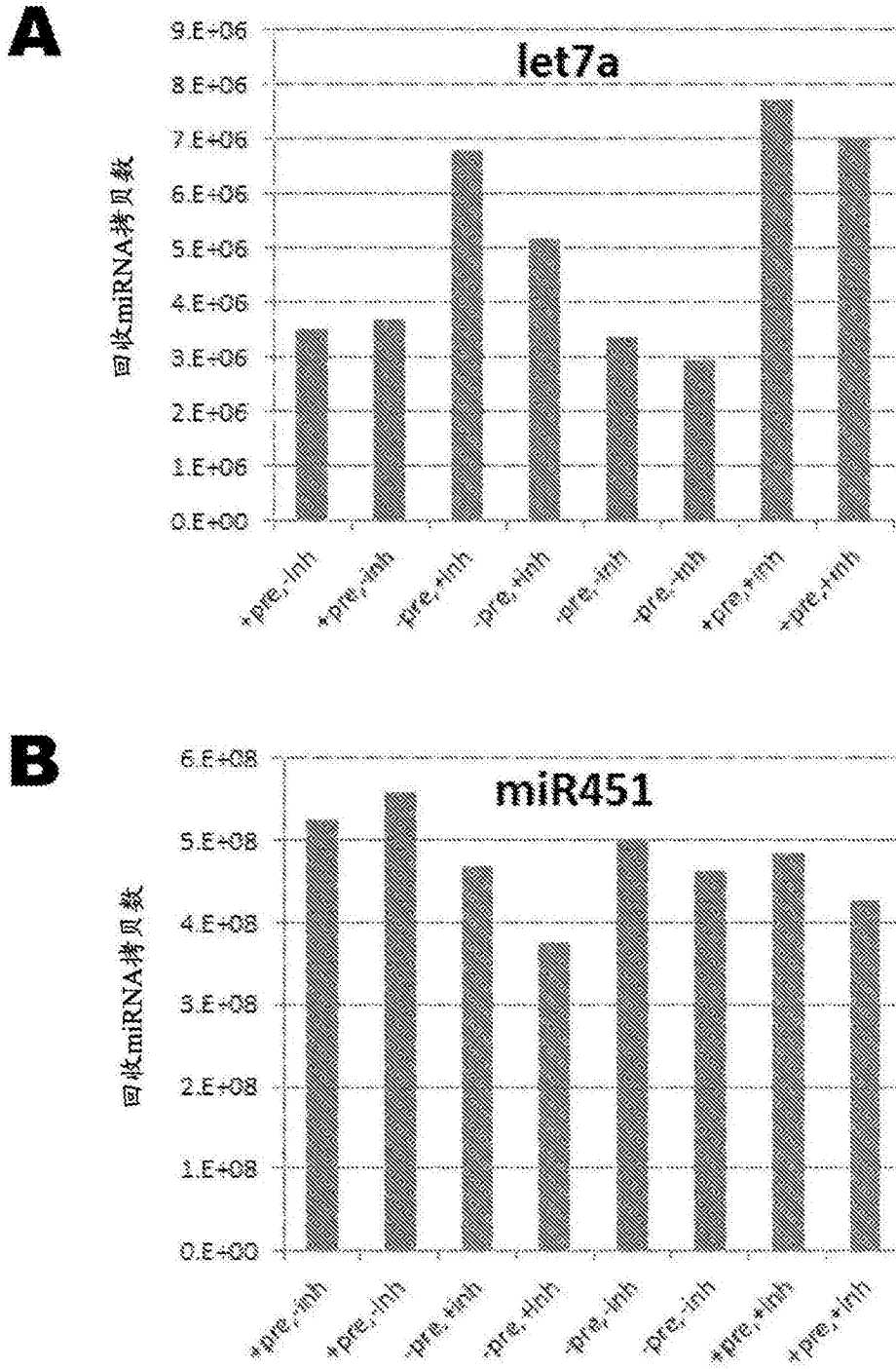


图8

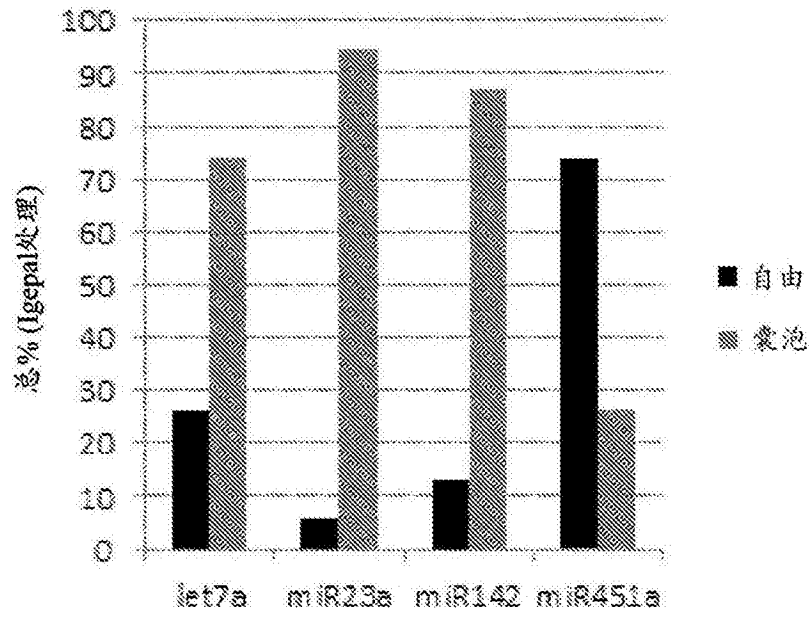


图9

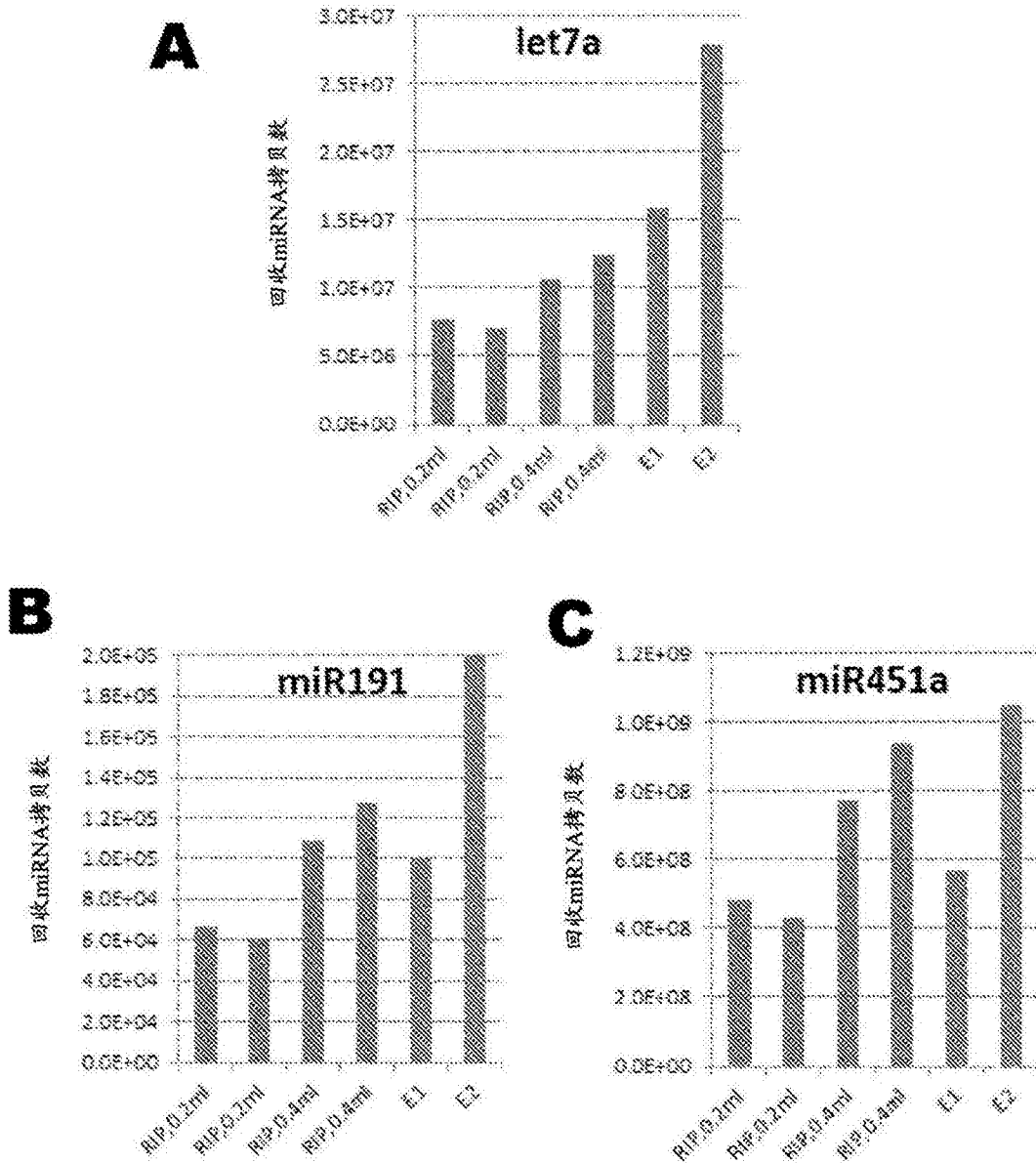


图10

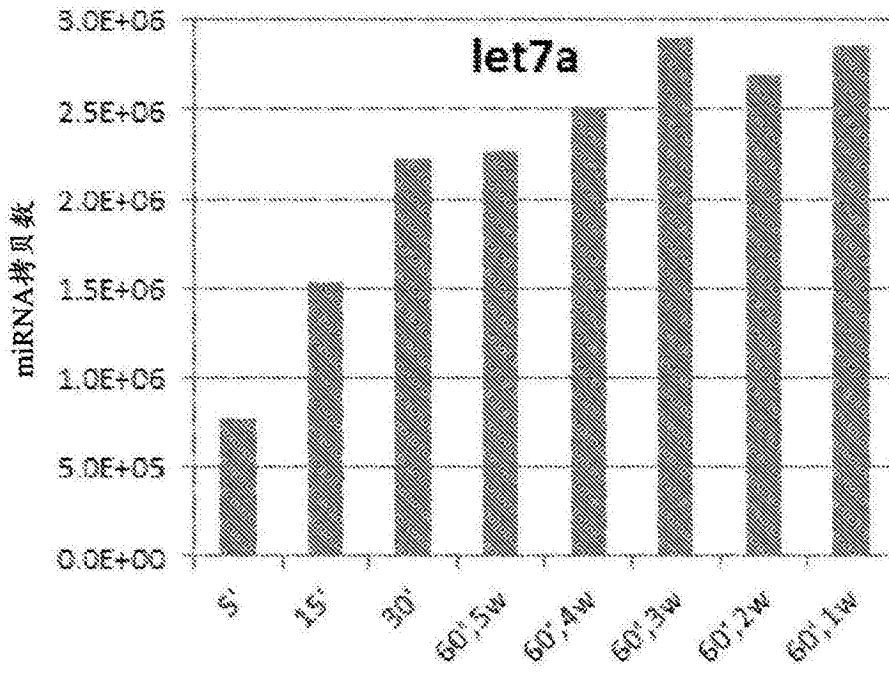


图11

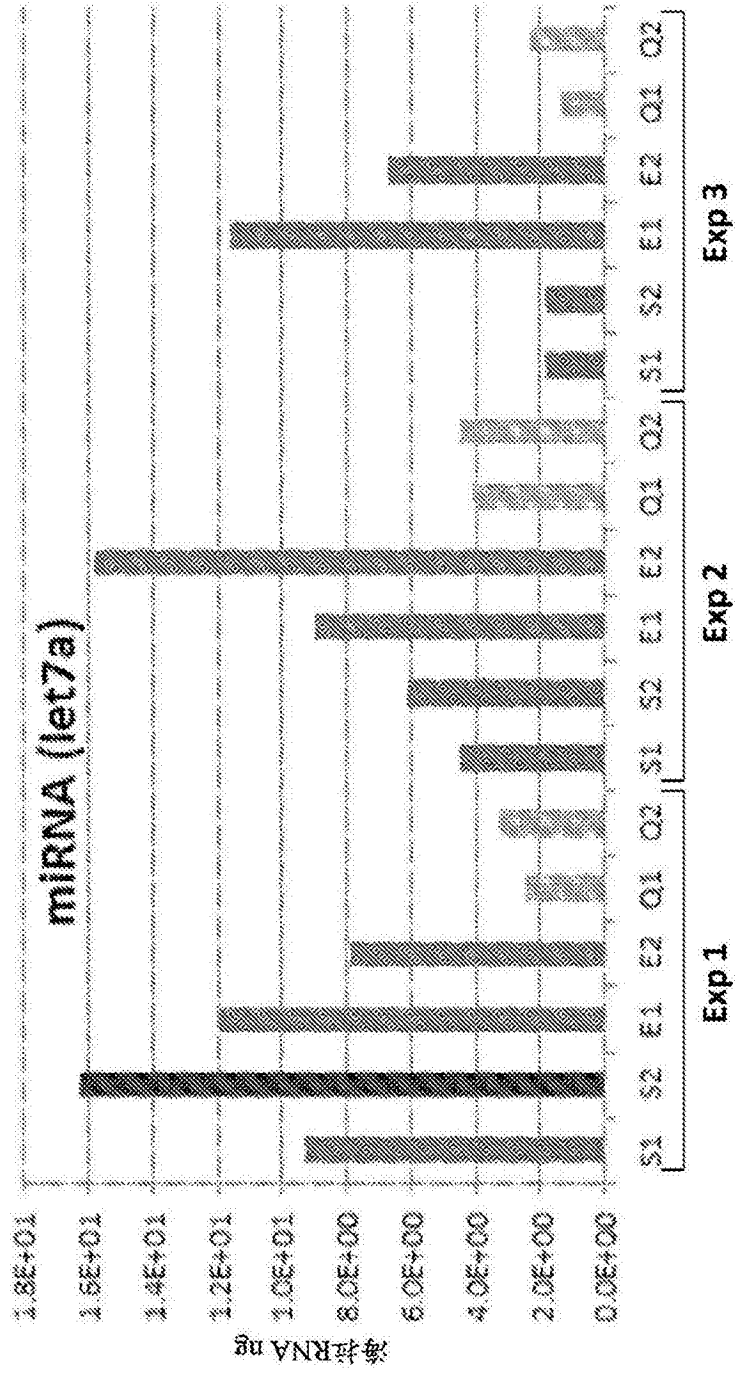


图12A

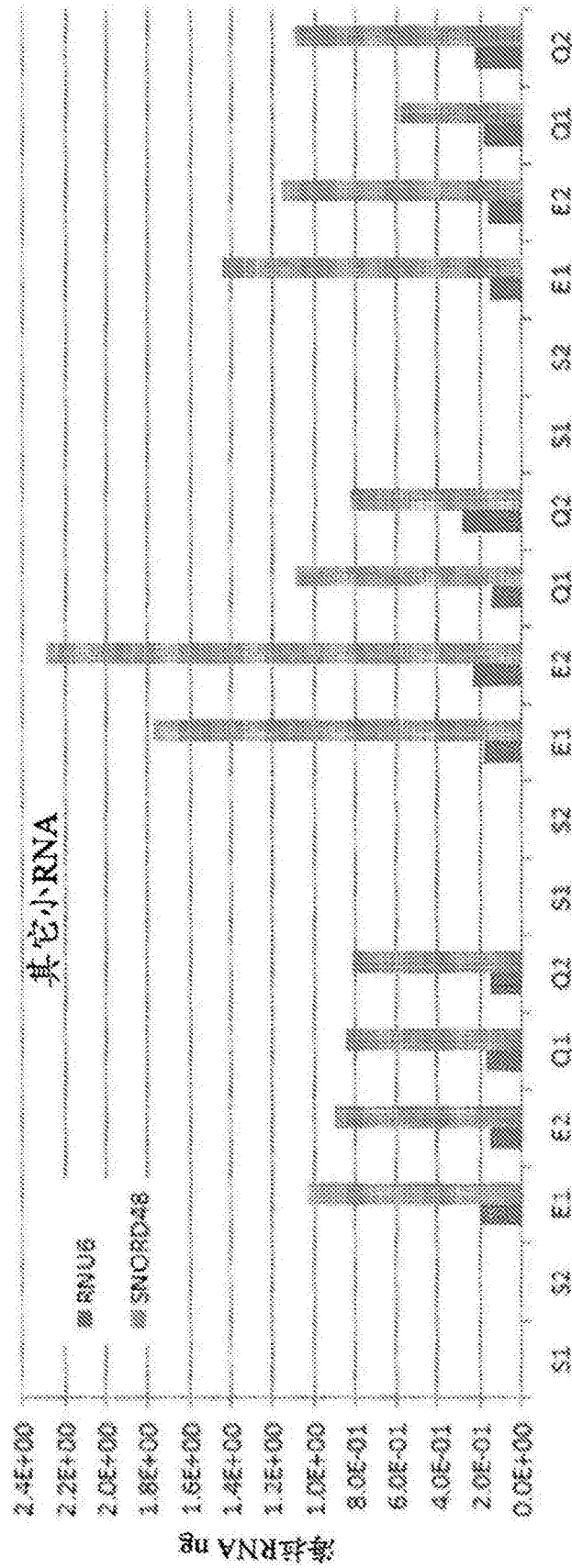


图12B

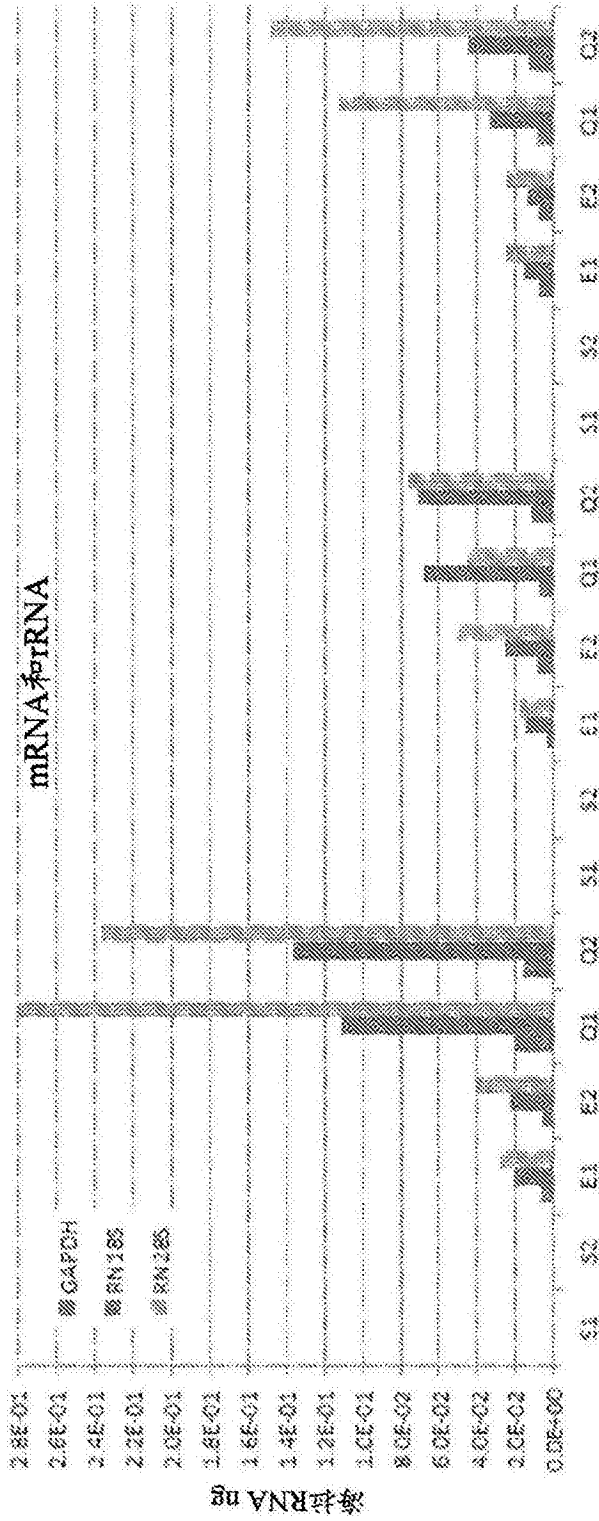


图12C

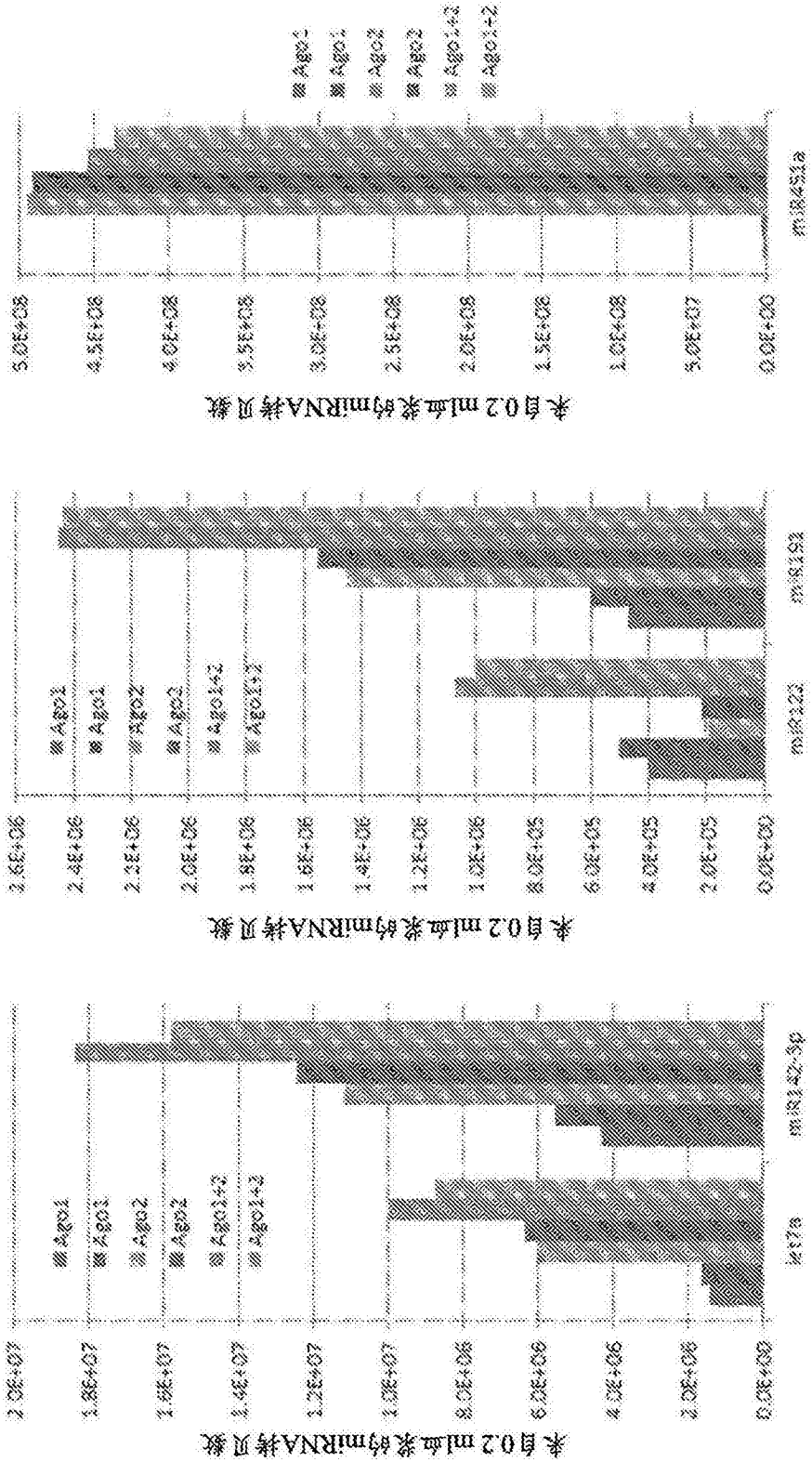


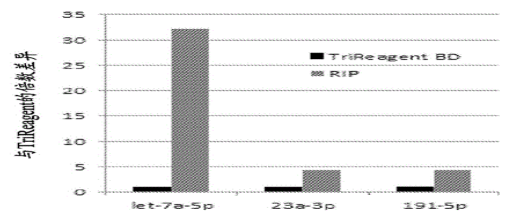
图13

专利名称(译)	从生物流体中分离微小RNA		
公开(公告)号	<a href="#">CN105934439A</a>	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201480074125.7	申请日	2014-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	西格玛-奥吉奇公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛-奥尔德里奇有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	西格玛-奥尔德里奇有限责任公司		
[标]发明人	C 克里德		
发明人	C.克里德		
IPC分类号	C07H21/04 G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C07H1/08 C12Q1/6804 C12Q2600/178 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C12Q2522/101 C12Q2565/113 C12N15/1013 C12N15/113 C12Q1/6806 C12Y304/21014		
代理人(译)	刘辛		
优先权	61/909834 2013-11-27 US 61/985000 2014-04-28 US		
其他公开文献	CN105934439B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本公开提供用于从生物流体中分离miRNA的方法和试剂盒。具体地说，所述方法包括使生物流体与表面活性剂和抗miRNA结合蛋白试剂接触，其中所述表面活性剂使生物流体组分分离并且所述抗miRNA结合蛋白试剂与和miRNA缔合的miRNA结合蛋白相互作用从而形成免疫沉淀miRNA复合物；并且将miRNA从所述免疫沉淀miRNA复合物中释放。进一步提供可与循环miRNA缔合的miRNA结合蛋白的实例。

**A**



**B**

