(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2006 年5 月26 日 (26.05.2006)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2006/053463 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/001340

(22) 国际申请日: 2004 年11 月23 日 (23.11.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410090423.3
2004 年11 月18 日 (18.11.2004) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **北京博奥生物芯片有限责任公司(CAPITALBIO CORPORATION)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国北京市 海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

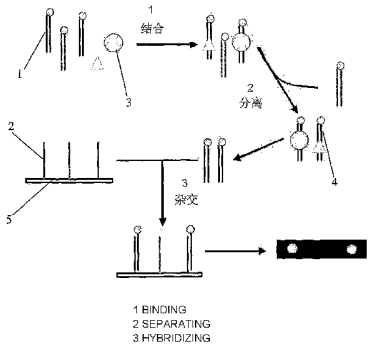
(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **邵威(SHAO, Wei)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **赵永超(ZHAO, Yongchao)** [CN/CN]; MISSING, Beijing 102206 (CN)。 **孙义民(SUN, Yimin)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **乔继英(QIAO, Jiying)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **魏华江(WEI, Huajiang)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **杨卫平(YANG, Weiping)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **周玉祥(ZHOU, Yuxiang)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。 **程京(CHENG, Jing)** [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园路18号, Beijing 102206 (CN)。

[见续页]

(54) **Title:** A TESTING METHOD OF NUCLEIC ACID BINDING PROTEIN BASED ON BIOCHIP

(54) **发明名称:** 一种基于生物芯片检测核算结合蛋白的方法



(57) **Abstract:** A testing method of nucleic acid binding protein based on biochip, comprises the following steps: 1. puts a plurality of groups solution including nucleic acid captured probes into biological sample including a plurality of nucleic acid binding protein to be test, and thus forming nucleic acid captured probe-nucleic acid binding protein complexes; such nucleic acid captured probe includes at least a segment of binding sequence which can bind with aimed nucleic acid binding protein; 2. separates such nucleic acid captured probe-nucleic acid binding protein complexes, then recoveries nucleic acid captured probes; 3. hybridizes the nucleic acid captured probes according to step 2 with a plurality of single strand blotting probes on biochip substrate; the sequence of such blotting probe compensates with such nucleic acid captured probe or one of its strand; 4. detects the result of hybridization.

(57) 摘要:

一种基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法，包括如下步骤：1，将含有若干组核酸捕获探针的溶液加入到含有若干待检测核酸结合蛋白的生物样品中，形成核酸捕获探针-核酸结合蛋白复合物，所述核酸捕获探针含有至少一段能与目的核酸结合蛋白相结合的结合序列；2，分离出所述核酸捕获探针-核酸结合蛋白复合物，然后回收核酸捕获探针；3，将步骤 2 所回收核酸捕获探针与固定在生物芯片基质上，且与所述核酸捕获探针对应的若干条单链固定化探针进行杂交，所述固定化探针的核酸序列与其对应的所述核酸捕获探针或核酸捕获探针中的一条链互补；4，检测杂交结果。

WO 2006/053463 A1

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市宣武门西大街甲129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国（除另有指明，要求每一种可提供的国家保护）: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国（除另有指明，要求每一种可提供的地区保护）: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号，请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

一种基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法

技术领域

本发明涉及核酸结合蛋白的检测方法，特别是涉及一种基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法。

背景技术

核酸结合蛋白包括双链 DNA 结合蛋白，单链 DNA 结合蛋白和 RNA 结合蛋白等。

双链 DNA 结合蛋白是一类可以与一段特定序列的双链 DNA 特异结合的蛋白质分子或是蛋白质分子复合物。双链 DNA 结合蛋白主要包括原核生物中的阻遏子、操作子蛋白和真核生物中的转录因子等。这些双链 DNA 结合蛋白通过与特定序列的 DNA 双链（operator/promoter）结合，从而激活、抑制、减弱或是增强特定基因的表达。原核生物中的阻遏子蛋白和操作子蛋白的功能相对简单，可以调控编码细胞代谢过程所需酶类、编码抗生素耐受基因的表达，使得细胞的生理活动与外界的环境相适应；真核生物的转录因子的功能繁多，细胞周期、细胞凋亡、癌变等各种现象都与特定的转录因子密切相关。在生物体，尤其是真核生物的基因表达调控网络中，编码蛋白质的基因的表达要经过转录因子介导的转录激活，转录，转录后修饰（包括 RNA 的剪切、加帽和加尾），翻译，翻译后修饰（包括磷酸化、糖基化、乙酰化等）等过程，在转录前、转录后和翻译后三个水平受到调控。

转录因子介导的转录激活作为整个基因表达调控网络的第一环是非常重要的。生物体对外界环境的应激反应大多是通过特定的转录因子开启或是关闭一些特定的基因实现的。研究表明，绝大多数的真核生物的基因的表达都受到一个或是一些特定的转录因子的调节。愈是复杂的生物体，编码转录因子的基因一般愈多，基因表达调控的机制也更为复杂。据预测，人类基因组中有超过 5%的编码蛋白质的基因是编码转录因子的。许多转录因子与癌症密切相关。例如有些转录因子是一些仅仅在恶性肿瘤组织中才表达或是会增强表达的原癌基因的产物（如 FOS 和 C-Myc），而又有一些转录因子仅仅在恶性肿瘤组织中微弱表达或是没有表达（如 p53 和 E2F）。因此，如果可以检测生物体某一时刻的部分转录因子或是全部转录因子的表达水平，再结合已

知的转录因子调控基因的数据，就可以得到转录前水平的调控信息，可能用以诊断组织是否发生癌变，还可以筛选药物靶点，研究一些细胞应激反应的机制，观察细胞的信号通路的激活或是关闭等。

现有的 cDNA 微阵列技术可以给出全基因组水平所有转录因子编码基因的 mRNA 表达状况的数据。但是只有具有活性的转录因子才可以调控基因的表达，而转录因子的活性往往受到磷酸化，乙酰化，糖基化等多种修饰方式的调控，转录因子在细胞中的定位也会影响转录因子的活性，所以具有活性的转录因子的数量和转录因子的 mRNA 或是蛋白水平的表达状况并不是直接相关的。例如在细胞周期各个阶段中，转录因子 Yin Yang 1（YY1）的 mRNA 和蛋白水平的表达几乎是恒定的，但是具有活性的 YY1 数量是随着细胞周期有规律变化。所以 cDNA 微阵列从理论上是不能给出生物学家感兴趣的转录因子表达谱数据的。

常规的“活性”双链 DNA 结合蛋白（转录因子）的检测方法是凝胶滞留法 （EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay, gel shift, band shift）。将待测蛋白质样品与已知的带有同位素标记的 DNA 双链分子混合反应后，在非变性的条件下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。由于在电泳过程中，结合了蛋白质的双链核酸分子比没有结合蛋白质的双链核酸分子迁移的慢一些，电泳后通过放射自显影，可以在胶片上得到分立的电泳条带，从而可以判断是否有预期的双链核酸和结合蛋白的相互作用的发生。近年来，凝胶滞留技术也得到了一些改进，例如使用荧光或是化学放光技术替代同位素进行检测。针对非特异结合现象，使用特异的双链 DNA 结合蛋白的抗体进行 DNA-结合蛋白复合物的检测，称为 Super-shift。凝胶滞留法这项技术的出现极大地推动了 DNA 和蛋白质相互作用的研究工作，但是它存在着明显的缺点：操作复杂；耗时耗力，往往需要一整天的时间进行实验；检测通量低，一次仅仅能对一种双链核酸结合蛋白进行检测，检测多种双链核酸结合蛋白时，需要的样品量较多；检测如果使用同位素，对人体有潜在的伤害，如果使用化学发光或是荧光，价格昂贵。

美国的 BD Biosciences Clontech 公司（Palo Alto, CA）推出了一种 Mercury™ 转录因子试剂盒（Mercury™ Transcription Factor Kit）。该试剂盒给出了用以检测转录因子的 96 孔板。96 孔板上的每个孔里包被有带有可以与

一种转录因子特异结合的核酸序列的双链 DNA 探针。将待检测样品加入孔中进行反应，探针就会与待测样品中对应的转录因子结合。清洗后，再加入特异识别该转录因子的一抗，再加入酶标记的二抗与一抗结合，进行化学发光检测。该技术大大缩短了传统的凝胶滞留方法的实验时间，使用化学发光技术替代了可能对人体产生伤害的同位素。但是仍然存在通量较低的问题，即一次（一个孔中进行的反应）仅仅能对一种转录因子进行检测；检测多种双链核酸结合蛋白时，需要的样品量较多；反应需要使用特异识别转录因子的抗体，而大多数转录因子并没有满足上述方法需要的商业化的一抗。

生物体内还有一些序列特异的单链 DNA 结合蛋白和 RNA 结合蛋白，它们大多可以调节生物体的生理活动。此外，通过体外进化（*in vitro* evolution）的方法，可以筛选出与靶标蛋白分子特异结合的类似于抗体的核酸配体，这些核酸结合蛋白还没有相应的高通量的分析方法。

发明公开

本发明的目的是提供一种检测通量高、灵敏特异的基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法。

本发明所述提供的基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法，包括如下步骤：1）将含有若干组核酸捕获探针的溶液加入到含有若干待检核酸结合蛋白的生物样品体系中，形成核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，所述核酸捕获探针的核酸序列含有至少一段能与目的核酸结合蛋白相结合的结合序列；2）分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，然后回收核酸捕获探针；3）将步骤 2）所回收核酸捕获探针与固定在生物芯片基质上，且与所述核酸捕获探针对应的若干条单链固定化探针进行杂交，所述固定化探针的核酸序列与其对应的所述核酸捕获探针或核酸捕获探针中的一条链互补；4）检测杂交结果。

其中，步骤 2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下五种过程进行：a)将步骤 1）所得混合样品用常规凝胶电泳分离，经切胶、用试剂盒分离或用电洗脱得到所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。b)将步骤 1)所得混合样品采用色谱柱方法分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。c)将步骤 1）所得混合样品通过滤膜，分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，所述滤膜可以吸附蛋白。d）将步骤 1）所得混合样品中

加入可以特异识别各个核酸结合蛋白的抗体，使用类似于抗体纯化的方法（例如使用 protein A/G 包被的 agarose 珠体结合抗体），分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。e）将步骤 1）所得混合样品用毛细管电泳设备进行分离，自动收集所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。

本发明方法可命名为“末端标记法”，可以用来检测核酸结合蛋白，如双链 DNA 结合蛋白，单链 DNA 结合蛋白，RNA 结合蛋白（如 HuB, HuC, ELAV 等）等，通过体外进化方法筛选出来的非天然的可以结合蛋白分子的核酸配体（如凝血酶（thrombin）的核酸配体（aptamer）等）也可以应用本发明方法进行检测。

在本发明中，所述核酸结合蛋白优选为双链 DNA 结合蛋白，更优选的是转录因子，如 AP1, Sp1, p53, E2F 等。

在应用本发明方法进行检测时，其中优选的情况是：所述核酸捕获探针的核酸序列含有一段能与目的核酸结合蛋白相结合的结合序列；每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的一端均带有一段突出端序列。

为了能提高核酸捕获探针与固定化探针的杂交能力，所述固定化探针与其对应的所述核酸捕获探针中的带有突出端序列的核酸链完全互补。

为方便进行杂交信号检测，所述核酸捕获探针中的带有突出端序列的核酸链的一端还带有标记分子，其中，优选为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒，纳米颗粒。

为提高检测灵敏度，可以对本发明方法进行如下改进（“杂交前进行单链扩增法”）：每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的 3’端还均带有一段 3’突出端序列，进行步骤 3）所述杂交前，还利用一条引物对所述回收核酸捕获探针进行扩增，所述引物能与所述核酸捕获探针中的带有 3’突出端序列的核酸链杂交，以便于进行随后的核酸扩增步骤。

其中，优选的情况是：每组所述核酸捕获探针的一条带有 3’突出端序列的核酸链中的所述 3’突出端序列均相同，所述引物的序列与所述 3’突出端序列完全互补。

此时，为方便进行杂交信号检测，可以在体系中加入标记分子，可以先使引物分子末端带有标记分子再进行扩增，也可以在进行扩增时在扩增原料中掺有带标记分子的核苷酸，其中，标记分子优选为生物素，第高辛，荧光

标记，量子点，金颗粒，纳米颗粒。

为提高检测灵敏度，可以对本发明方法进行另一种改进（“杂交前进行双链扩增法”）：每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的3’端和5’端还均分别带有一段3’突出端序列和一段5’突出端序列；进行步骤3）所述杂交前，还利用两条引物对所述回收核酸捕获探针进行扩增，所述两条引物中的一条能与所述核酸捕获探针中的带有3’突出端序列和5’突出端序列的核酸链的3’突出端杂交，另外一条引物的序列和所述核酸捕获探针中的带有3’突出端序列和5’突出端序列的核酸链的5’突出端一致。

其中，优选的情况是：所述核酸捕获探针的带有3’突出端序列和5’突出端的核酸链中的所述3’突出端序列均相同，所述核酸捕获探针的带有3’突出端序列和5’突出端的核酸链中的所述5’突出端序列均相同，所述两条引物一条能与所述核酸捕获探针中的带有3’突出端序列和5’突出端序列的核酸链的3’突出端杂交，另外一条引物的序列和所述核酸捕获探针中的带有3’突出端序列和5’突出端序列的核酸链的5’突出端一致。

采用双链扩增法进行检测的操作流程如图7所示，将捕获探针1与目的蛋白3（图中为圆形和三角形）混合反应，经分离后得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物4，回收捕获探针；用两条引物6对所回收捕获探针进行扩增，扩增后的产物与固定有固定化探针2的芯片5进行杂交，检测杂交信号即可得到检测结果。所用的捕获探针、固定化探针和引物的优选结构如图8所示：捕获探针含有一个目的蛋白的结合序列，其两条链中的一条带有3’突出端和5’突出端；引物1的序列与该3’突出端序列互补，引物2的序列和5’突出端一致；固定化探针序列与该结合序列一致。

同样，为方便进行杂交信号检测，可以在体系中加入标记分子，可以先使引物分子末端带有标记分子再进行扩增，也可以在进行扩增时在扩增原料中掺有带标记分子的核苷酸，其中，标记分子优选为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒，纳米颗粒。

<u>附图说明</u>

图1为本发明的使用“末端标记法”检测多种核酸结合蛋白的操作流程示意图；

图2为本发明的使用“末端标记法”检测多种核酸结合蛋白的探针结构

示意图；

图 3A 为实施例 1 芯片点阵设计图；

图 3B 为实施例 1 同时检测三种结合蛋白的实验结果；

图 3C 为实施例 1 同时检测三种结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了 AP1 的竞争性结合探针；

图 3D 为实施例 1 同时检测三种结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了 NFkB 的竞争性结合探针；

图 3E 为实施例 1 同时检测三种结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了 Sp1 的竞争性结合探针；

图 4 为本发明的使用“单链扩增法”检测多种核酸结合蛋白的操作流程示意图；

图 5 为本发明的使用“单链扩增法”检测多种核酸结合蛋白的探针、引物结构示意图；

图 6A 为实施例 2 使用“单链扩增法”同时检测三种结合蛋白（AP1、NFkB、Sp1）的实验结果；

图 6B 为实施例 2 采用与实施例 1 相同的“末端标记法”进行检测的实验结果；

图 7 为本发明的使用“双链扩增法”检测多种核酸结合蛋白的操作流程示意图；

图 8 为本发明的使用“双链扩增法”检测多种核酸结合蛋白的探针、引物结构示意图。

实施发明的最佳方式

实施例 1、使用 DNA 芯片同时检测 3 种核酸结合蛋白 AP1, NFkB 和 Sp1（末端标记法）

采用末端标记法进行检测的操作流程如图 1 所示，将捕获探针 1 与目的蛋白 3（图中为圆形和三角形）混合反应，经分离后得到核酸捕获探针一核酸结合蛋白复合物 4，回收捕获探针，然后与固定有固定化探针 2 的芯片 5 进行杂交，检测杂交信号即可得到检测结果。

其中，所用的捕获探针和固定化探针的优选探针结构如图 2 所示：捕获探针含有一个目的蛋白的结合序列，其两条链中的一条带有突出端和标记分

子，图中为生物素（biotin）；固定化探针与捕获探针中的长链互补。

试验材料：

转录因子 AP-1(c-Jun) (#E3061), NFkB(p50) (#E3770)和 Sp1 (#E6391)来自 Promega 公司(Madison, WI)。通用结合缓冲液的成分为：10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4%甘油, 1 mM MgCl2, 0.5 mM EDTA, 5mM DTT, 50 mM NaCl, 0.05 mg/mL poly (dI-dC)•(dI-dC)。使用的电泳缓冲液是 0.5×TBE (0.9 M Tris 碱, 0.9 M 硼酸, 0.02 M EDTA, pH 8.0)。PBST(磷酸缓冲液, 0.1% Tween 20)作为清洗液。电泳用琼脂糖来自 Biowest 公司 (Miami, FL)。牛血清白蛋白(BSA)购自 Amresco 公司 (Solon, OH). Cy3 标记的链霉亲和素购自 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)。

实验步骤：

A. DNA 探针的制备：所有的探针都由上海博亚公司合成，探针的序列见表 1（表中 AP-1-IP 为 AP1 的固定探针，AP-1-LP、AP-1-FP 组成为 AP1 的捕获探针，AP-1-CP 和 AP-1-FP 组成为 AP1 的竞争性结合探针，其他探针的表示与此类似；本实施例 LP 探针的突出端序列为 5'-CGGGA-3'。）。每组中的固定探针都先用水溶解，配置在 50%二甲亚砜（DMSO）的溶液中，探针的终浓度为 10 微摩尔每升。蛋白捕获探针都用水溶解，再把对应的探针（每组探针中的 FP 和 LP 探针）退火形成双链，其中每组探针的终浓度都为 60 纳摩尔每升。

B. DNA 芯片的制作：使用 PixSys5500 (Cartesian Technologies, Irvine, CA)机械手将上述的固定探针按照图 3A 的点阵模式点制到氨基修饰的玻片上，点间距为 350 微米。点样完毕后，玻片在 80 摄氏度的温箱中烘烤 1 小时，再使用紫外胶连仪，在 250 毫焦的能量下胶连以固定点在玻片表面的核酸分子。图 3A 中 A1-A5 为 AP1 固定探针，B1-B5 为 NFkB 固定探针，C1-C5 为 Sp1 固定探针，D1-D5 为 TFIID 固定探针，E1-E5 为 NC 固定探针，F1-F5 为 HC 固定探针，A6、B6、C6、D6、E6、F6 为点样对照，该点样对照是一种本身带有荧光素的核酸分子，在点样结束后扫描玻片，可以检测到点样对照，证明玻片点样的步骤正确。

C. 核酸—蛋白结合体系的配置：将三种转录因子(1.0μg AP1, 300ng NFkB 和 1.0μg Sp1)和蛋白捕获探针（就是 LP 和 FP 的退火产物）混合，加入通用

结合缓冲液，使得缓冲液的终浓度达到 1X。反应体系在室温结合 30 分钟。进行图 3C、图 3D、图 3E 所描述的实验时，在反应体系中还加有竞争性结合探针（CP）。

D. 核酸一蛋白结合体系的分离：预先配置 2%的琼脂糖凝胶和电泳用的 TBE 缓冲液，并预冷到 4℃。将上述结合反应体系加入凝胶的加样孔，在 120 伏电压下电泳 20 分钟。根据电泳缓冲液中溴酚兰指示剂的位置，切出所需要的凝胶部分。

E. 核酸的回收：使用 Qiagen 公司的 QIAGEN II 型凝胶回收试剂盒回收上一步骤中得到的凝胶中的核酸，按照产品说明书进行。

F. 芯片的杂交分析：将上步得到的核酸，配置成 15 微升体系的杂交液（杂交液中还加有 HC-LP 探针），其中含有 3XSSC 和 0.1%的 SDS，加到 DNA 芯片上，在 65℃杂交 1 小时。然后使用 0.2XSSC 和 0.1%SDS 的清洗液清洗玻片，室温 10 分钟，再 1000 转/分甩干玻片。在芯片上加入 1%BSA 进行封闭，反应条件为 37℃30 分钟。使用 PBST 清洗玻片，室温 10 分钟，再 1000 转/分甩干玻片。加 15 微升的 1 微克/毫升浓度的 Cy3 标记的链霉亲和素到芯片表面，37℃反应 1 小时。使用 PBST 清洗玻片，室温 10 分钟，再 1000 转/分甩干玻片。使用 Scanarray 4000 扫描仪进行图像扫描，图像使用 GenePix 进行分析处理。其中图 3A 是芯片的点阵设计图；图 3B 是使用“末端标记法”在芯片上同时检测 3 种核酸结合蛋白的实验结果；图 3C 是使用“末端标记法”在芯片上同时检测 3 种核酸结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了核酸结合蛋白 AP1 的竞争性结合探针；图 3D 是使用“末端标记法”在芯片上同时检测 3 种核酸结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了核酸结合蛋白 NFkB 的竞争性结合探针；图 3E 是使用“末端标记法”在芯片上同时检测 3 种核酸结合蛋白的实验结果，结合反应体系中加入了核酸结合蛋白 Sp1 的竞争性结合探针。结果表明，采用本发明的“末端标记方法”可以很明显地检测出三种转录因子，而 NC 中的序列来自于原核生物噬菌体的启动子序列，和真核生物的转录因子结合序列差异很大，不能与任何一个上述转录因子结合，所以 NC 探针的信号始终为阴性；HC 是作为杂交对照，在杂交之前加入，用以对不同的点阵进行归一化处理，所以 HC 信号始终为阳性。

表 1. 几种转录因子的固定探针和捕获探针的探针序列表

组编号	转录因子	探针编号	探针名称	探针序列

1	AP-1	1	AP-1-IP	5'-T_{20}-CGCTTGATGAGTCAGCCGGA-***TCCCG***-3'
		2	AP-1-LP	5'-biotin-***CGGGA***-TCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'
		3	AP-1-FP	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGA-3'
		4	AP-1-CP	5'-TCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'
2	NFκB	5	NFκB-IP	5'-T_{20}- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGA-***TCCCG***-3'
		6	NFκB-LP	5'-biotin-***CGGGA***-TCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
		7	NFκB-FP	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGA-3'
		8	NFκB-CP	5'-TCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
3	SP1	9	SP1-IP	5'-T_{20}- AAAGCCCCGCCCCGATATAAT-***TCCCG***-3'
		10	SP1-LP	5'-biotin-***CGGGA***-ATTATATCGGGGCGGGGCTTT-3'
		11	SP1-FP	5'-AAAGCCCCGCCCCGATATAAT-3'
		12	SP1-CP	5'- ATTATATCGGGGCGGGGCTTT-3'
4	TFIID	13	TFIID-IP	5'-T_{20}-CGCCTACCTCATTTTATATGCTCTGC-***TCCCG***-3'
		14	TFIID-LP	5'-biotin-***CGGGA***-GCAGAGCATATAAAATGAGGTAGGCG-3'
		15	TFIID-FP	5'-CGCCTACCTCATTTTATATGCTCTGC-3'
		16	TFIID-CP	5'-GCAGAGCATATAAAATGAGGTAGGCG-3'
5	NC	17	NC-IP	5'-T_{20}-CTATGTGGTGAACTCCTCCTAAATA-***TCCCG***-3'
		18	NC-LP	5'-biotin-***CGGGA***-CGGGATATTTAGGAGGAGTTCACCACATAG-3'
		19	NC-FP	5'-CTATGTGGTGAACTCCTCCTAAATA-3'
6	HC	20	HC-IP	5'-T_{20}-AGACGGAAGACATATGGCCGCTC-***TCCCG***-3'
		21	HC-LP	5'-biotin-***CGGGA***-GAGCGGCCATATGTCTTCCGTCT-3'

实施例 2、使用 DNA 芯片同时检测 3 种核酸结合蛋白 AP1, NFkB 和 Sp1（单链扩增法）

采用单链扩增法进行检测的操作流程如图 4 所示，将捕获探针 1 与目的蛋白 3（图中为圆形和三角形）混合反应，经分离后得到核酸捕获探针一核酸结合蛋白复合物 4，回收捕获探针；用引物 6 对所回收捕获探针进行扩增，扩增后的产物与固定有固定化探针 2 的芯片 5 进行杂交，检测杂交信号即可得到检测结果。

其中，所用的捕获探针、固定化探针和引物的优选设计原理如图 5 所示：捕获探针含有一个目的蛋白的结合序列，其两条链中的一条带有 3'突出端；

引物序列与该3'突出端互补；固定化探针与该结合序列一致。

试验材料：

转录因子AP-1(c-Jun) (#E3061), NFkB(p50) (#E3770)和 Sp1 (#E6391)来自Promega公司(Madison, WI)。通用结合缓冲液的成分为：10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4%甘油, 1 mM MgCl2, 0.5 mM EDTA, 5mM DTT, 50 mM NaCl, 0.05 mg/mL poly (dI-dC)•(dI-dC)。使用的电泳缓冲液是0.5×TBE (0.9 M Tris碱, 0.9 M 硼酸, 0.02 M EDTA, pH 8.0)。PBST(磷酸缓冲液, 0.1% Tween 20)作为清洗液。电泳用琼脂糖来自Biowest公司 (Miami, FL)。牛血清白蛋白(BSA)购自Amresco公司 (Solon, OH). Cy3标记的链霉亲和素购自Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)。

实验步骤：

A.DNA探针的制备：探针都由上海博亚公司合成，探针的序列见表2（每组探针中的LFP和LP'探针组成为对应转录因子的捕获探针；IP探针为固定探针）。每组中的固定探针制备方法同实施例1中的“DNA探针制备”部分。蛋白捕获探针都用水溶解，再把对应的探针（每组探针中的LFP和LP'探针）退火形成双链，其中每组探针的终浓度都为60纳摩尔每升。

B.DNA芯片的制作：同实施例1中的“DNA芯片的制作”部分。

C.核酸—蛋白结合体系的配置：将三种转录因子(1.0μg AP1，100ng NFkB和0.1μg Sp1)和蛋白捕获探针混合，加入通用结合缓冲液，使得缓冲液的终浓度达到1X。反应体系在室温结合30分钟。

D.核酸—蛋白结合体系的分离：预先配置2%的琼脂糖凝胶和电泳用的TBE缓冲液，并预冷到4℃。将上述结合反应体系加入凝胶的加样孔，在120伏电压下电泳20分钟。根据电泳缓冲液中溴酚兰指示剂的位置，切出所需要的凝胶部分。

E.核酸的回收：使用Qiagen公司的QIAGEN II型凝胶回收试剂盒回收上一步骤中得到的凝胶中的核酸，按照产品说明书进行。最后用20微升的洗脱液进行洗脱。

F.芯片的杂交分析：将上步得到的核酸，真空抽干，加入5微升水重新溶解，加入dNTP和PCR的缓冲液，再加入带有Cy3标记的T7 Pro的引物进行核酸扩增。PCR程序是：95度5分钟；95度30秒，53度30秒，72度20

秒，重复 40 个循环；73 度 7 分钟。扩增产物真空抽干，用 5 微升水重新溶解，配置成 15 微升体系的杂交液（HC-LP 探针也于此时加入到杂交液中），其中含有 3XSSC 和 0.1%的 SDS，加到 DNA 芯片上，在 65℃杂交 1 小时。然后使用 0.2XSSC 和 0.1%SDS 的清洗液清洗玻片，室温 10 分钟，再 1000 转/分甩干玻片。使用 Scanarray 4000 扫描仪进行图像扫描，图像使用 GenePix 进行分析处理。

以采用实施例 1 的“末端标记法”进行本实施例三种蛋白的检测，作为本实施例检测结果的对照。

检测结果分别如图 6A 和图 6B 所示，图 6A 是采用“单链扩增法”进行检测的实验结果图；图 6B 为采用实施例 1 的“末端标记法”进行检测的结果图，图中，A1-A5 为 AP1 检测结果点；B1-B5 为 NFkB 检测结果点；C1-C5 为杂交对照点(HC 点，HC-IP 与 HC-LP 序列见表 1)；D1-D5 为 Sp1 检测结果点。结果表明，采用单链扩增法进行检测可以提高本发明方法的检测灵敏度，使采用末端标记法不能检测出来的信号点也能清楚、灵敏地检测出来。

表 2. 带 3’突出端序列的探针序列表

组编号	TF	探针编号	探针名称	探针序列
1	AP-1	1	AP-1-IP	5'-T_{20}-CGCTTGATGAGTCAGCCGGA-***TCCCG***-3'
		22	AP-1-LFP	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGA-***CCCTATAGTGAGTCGTATTACCCC***-3'
		26	AP-1-LP’	5'-***CGGGA***-TCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'
2	NFκB	5	NFκB-IP	5'-T_{20}- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGA-***TCCCG***-3'
		23	NFκB-LFP	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGA-***CCCTATAGTGAGTCGTATTACCCC***-3'
		27	NFκB-LP’	5'-***CGGGA***-TCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
3	SP1	9	SP1-IP	5'-T_{20}- AAAGCCCCGCCCCGATATAAT-***TCCCG***-3'
		24	SP1-LFP	5'-AAAGCCCCGCCCCGATATAAT-***CCCTATAGTGAGTCGTATTACCCC***-3'
		28	SP1-LP’	5'-***CGGGA***-ATTATATCGGGGCGGGGCTTT-3'
4		25	T7 Pro	5’-Cy3-***GGGGTAATACGACTCACTATAGGG***-3’

工业应用

本发明采用生物芯片方法进行核酸结合蛋白，特别是转录因子的检测，

通过捕获探针与固定化探针的杂交信号检测，具有检测灵敏度高和检测通量高的优点；而且，当采用本发明的两种改进方法（杂交前单链扩增、杂交前双链扩增）时，可以先对引物进行预先标记，而不再需要对每组核酸捕获探针进行分子标记修饰，能大大降低实验成本。本发明方法可以广泛用于疾病诊断、药物靶标筛选、疾病机理等领域。

权 利 要 求 书

1、一种基于生物芯片检测核酸结合蛋白的方法，包括如下步骤：1）将含有若干组核酸捕获探针的溶液加入到含有若干待检核酸结合蛋白的生物样品体系中，形成核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，所述核酸捕获探针的核酸序列含有至少一段能与目的核酸结合蛋白相结合的结合序列；2）分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，然后回收核酸捕获探针；3）将步骤2）所回收核酸捕获探针与固定在生物芯片基质上，且与所述核酸捕获探针对应的若干条单链固定化探针进行杂交，所述固定化探针的核酸序列与其对应的所述核酸捕获探针或核酸捕获探针中的一条链互补；4）检测杂交结果。

2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于：步骤2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下过程进行：将步骤1）所得混合样品用凝胶电泳分离，经切胶、用试剂盒分离或用电洗脱得到所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。

3、根据权利要求1所述的方法，其特征在于：步骤2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下过程进行：将步骤1）所得混合样品采用色谱柱方法分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。

4、根据权利要求1所述的方法，其特征在于：步骤2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下过程进行：将步骤1）所得混合样品通过滤膜，分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物，所述滤膜可以吸附蛋白。

5．根据权利要求1所述的方法，其特征在于：步骤2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下过程进行：将步骤1）所得混合样品中加入可以特异识别各个核酸结合蛋白的抗体，使用抗体纯化的方法，分离得到核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。

6．根据权利要求1所述的方法，其特征在于：步骤2）所述分离出所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物按如下过程进行：将步骤1）所得混合样品用毛细管电泳进行分离，收集所述核酸捕获探针－核酸结合蛋白复合物。

7、根据权利要求1所述的方法，其特征在于：所述核酸结合蛋白为双链DNA结合蛋白，RNA结合蛋白，单链DNA结合蛋白或通过体外进化方法筛选出

来的非天然的可以结合蛋白分子的核酸配体。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述双链 DNA 结合蛋白为转录因子。

9、根据权利要求 1－8 任一所述的方法，其特征在于：所述核酸捕获探针的核酸序列含有一段能与目的核酸结合蛋白相结合的结合序列。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的一端均带有一段突出端序列。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于：所述固定化探针与其对应的所述核酸捕获探针中的带有突出端序列的核酸链完全互补。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于：所述核酸捕获探针中的带有突出端序列的核酸链还带有标记分子。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其特征在于：所述标记分子为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒或纳米颗粒。

14、根据权利要求 1－8 任一所述的方法，其特征在于：每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的 3'端还均带有一段 3'突出端序列，进行步骤 3）所述杂交前，还利用一条引物对所述回收核酸捕获探针进行扩增，所述引物能与所述核酸捕获探针中的带有 3'突出端序列的核酸链杂交。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于：每组所述核酸捕获探针的一条带有 3'突出端序列的核酸链中的所述 3'突出端序列均相同，所述引物的序列与所述 3'突出端序列完全互补。

16、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述利用一条引物进行扩增时所述引物中还掺有标记分子。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于：所述引物分子的 5'端带有标记分子。

18、根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于：所述标记分子为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒或纳米颗粒。

19、根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述利用一条引物进行扩增时还在扩增原料中掺有带标记分子的核苷酸。

20、根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于：所述标记分子为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒或纳米颗粒。

21、根据权利要求 1－8 任一所述的方法，其特征在于：每组所述核酸捕获探针的一条核酸链的 3'端和 5'端还均分别带有一段 3'突出端序列和一段 5'突出端序列；进行步骤 3）所述杂交前，还利用两条引物对所述回收核酸捕获探针进行扩增，所述两条引物中的一条能与所述核酸捕获探针中的带有 3'突出端序列和 5'突出端序列的核酸链的 3'突出端杂交，另外一条引物的序列和所述核酸捕获探针中的带有 3'突出端序列和 5'突出端序列的核酸链的 5'突出端一致。

22、根据权利要求 21 所述的方法，其特征在于：所述核酸捕获探针的带有 3'突出端序列和 5'突出端的核酸链中的所述 3'突出端序列均相同，所述核酸捕获探针的带有 3'突出端序列和 5'突出端的核酸链中的所述 5'突出端序列均相同，所述两条引物一条能与所述核酸捕获探针中的带有 3'突出端序列和 5'突出端序列的核酸链的 3'突出端杂交，另外一条引物的序列和所述核酸捕获探针中的带有 3'突出端序列和 5'突出端序列的核酸链的 5'突出端一致。

23、根据权利要求 22 所述的方法，其特征在于：所述利用两条引物进行扩增时所述引物中还掺有标记分子。

24、根据权利要求 23 所述的方法，其特征在于：所述引物分子的 5'端带有标记分子。

25、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于：所述标记分子为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒或纳米颗粒。

26、根据权利要求 22 所述的方法，其特征在于：所述利用两条引物进行扩增时还在扩增原料中掺有带标记分子的核苷酸。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于：所述标记分子为生物素，第高辛，荧光标记，量子点，金颗粒或纳米颗粒。

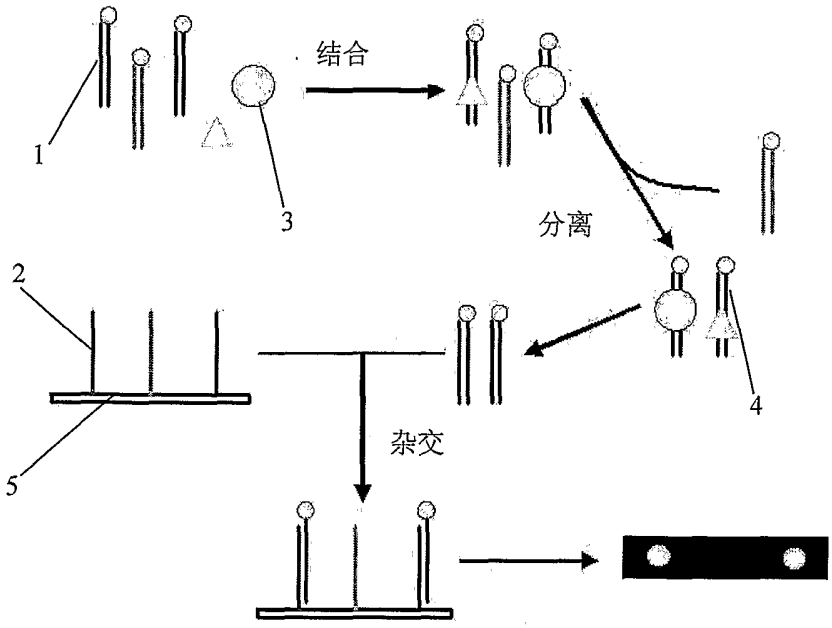

结合
1
3
分离
2
4
杂交
5

图 1

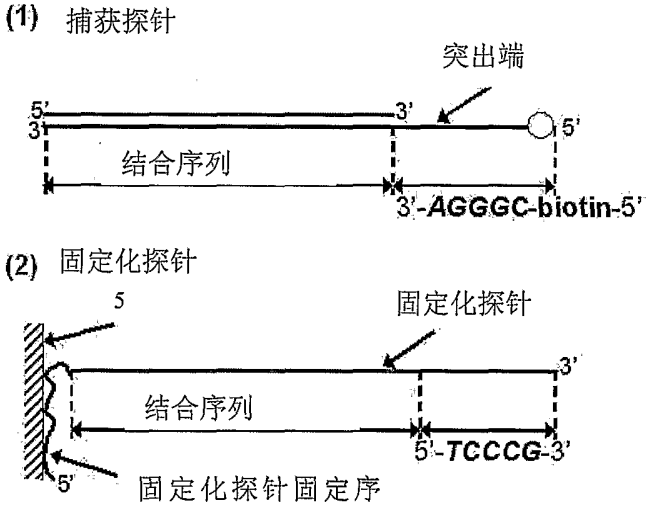

(1) 捕获探针
突出端
5'
3'
3'
5'
结合序列
3'-AGGGC-biotin-5'
(2) 固定化探针
5
固定化探针
3'
结合序列
5'-TCCCG-3'
5'
固定化探针固定序

图 2

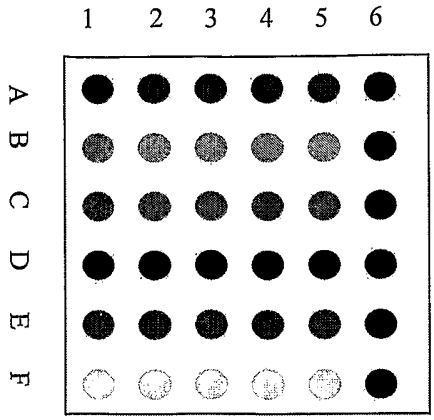


图 3A

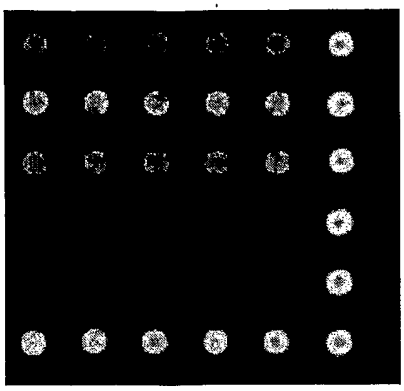


图 3B

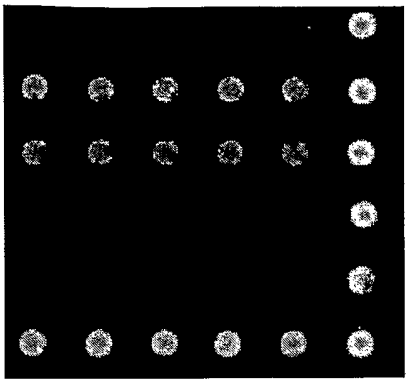


图 3C

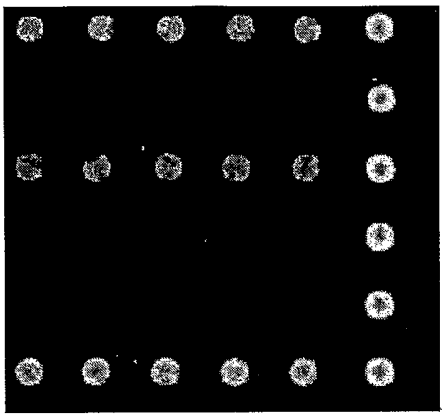


图 3D

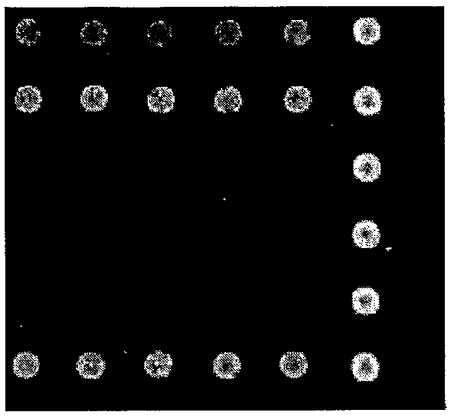


图 3E

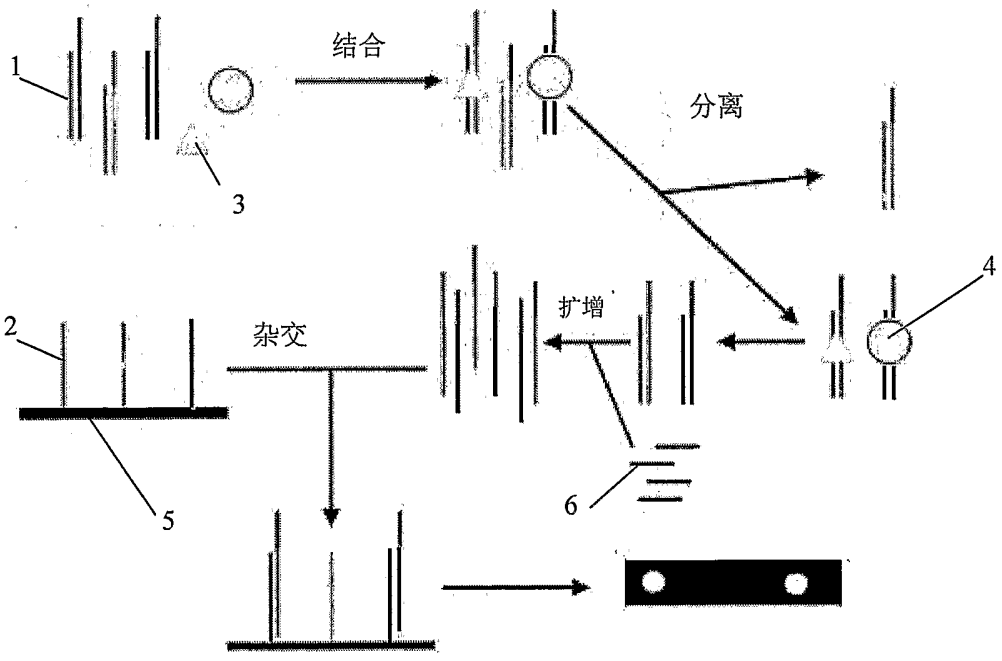


图 4

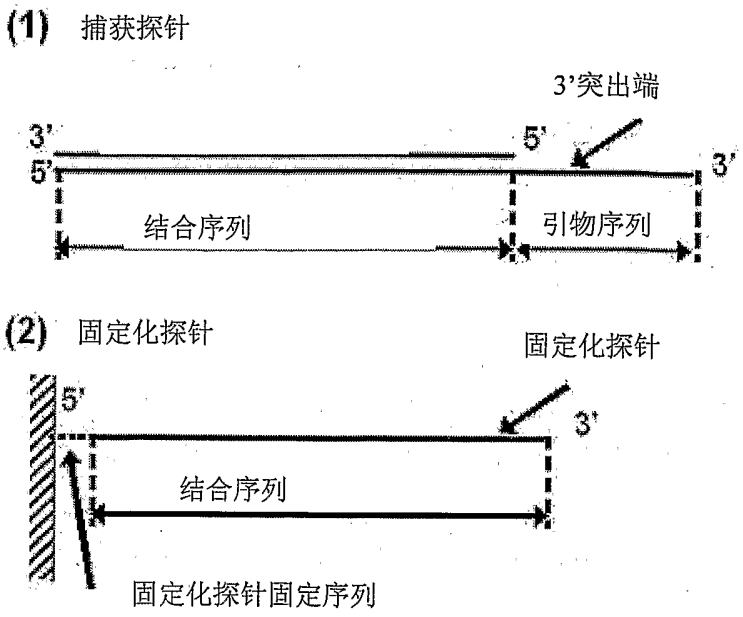

(1) 捕获探针
3'突出端
3'
5'
5'
3'
结合序列
引物序列
(2) 固定化探针
固定化探针
5'
3'
结合序列
固定化探针固定序列

图 5

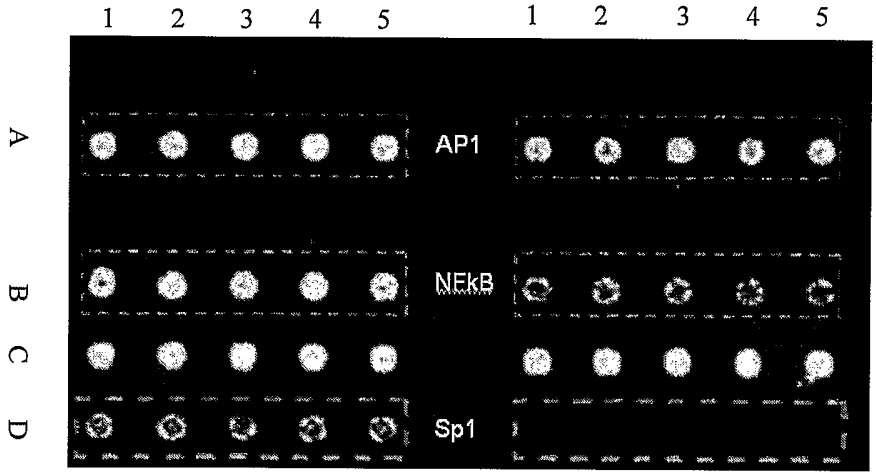

1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
A
B
C
D
AP1
NEkB
Sp1

图 6A

图 6B

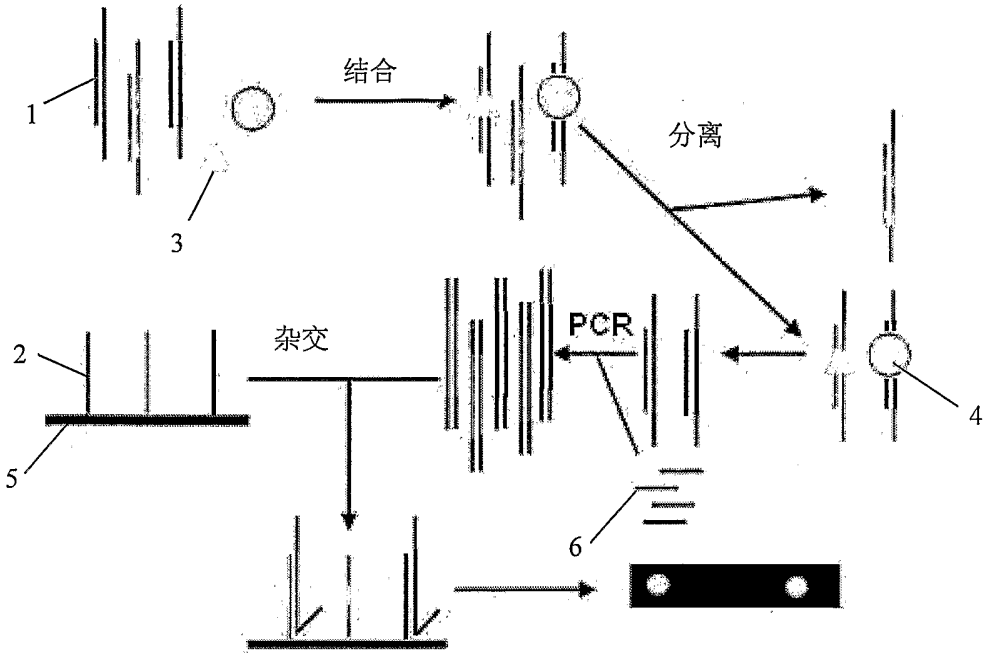

结合
分离
杂交
PCR
1
2
3
4
5
6

图 7

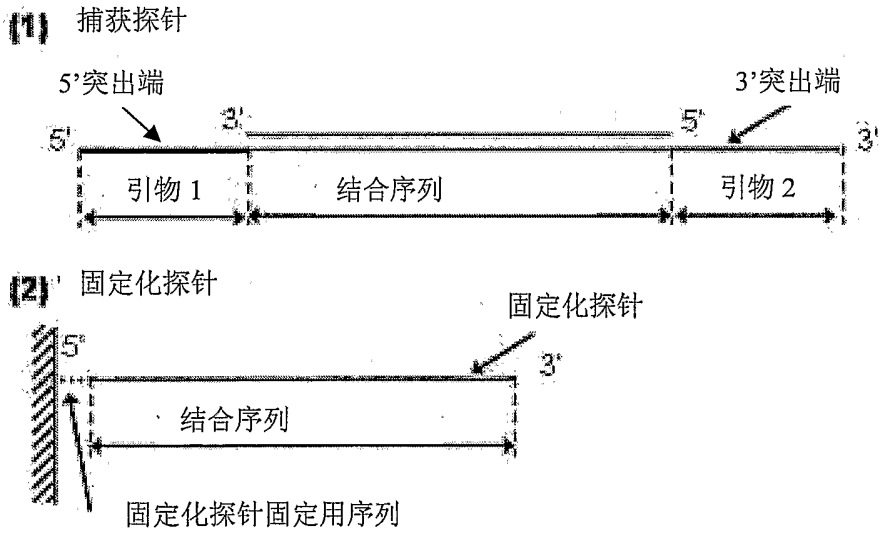

(1) 捕获探针
5'突出端
3'突出端
5'
3'
5'
3'
引物 1
结合序列
引物 2
(2) 固定化探针
固定化探针
5'
3'
结合序列
固定化探针固定用序列

图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/001340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[7]: G01N33/68, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[7]: G01N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese patent documents (1985-)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT; DNA, SSB, binding protein, combined protein, chip, biochip, array, microarray, matrix

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1435492A (UNIV SOUTHEAST) ,13.Aug.2003(13.08.2003), Whole documents	1-27
A	WO9315226A (HARVARD COLLEGE) ,05.Aug.1993(05.08.1993), Whole documents	1-27
A	US20030054378A (ISAO KARUBE ET AL) 20.Mar.2003(20.03.2003)Whole documents	1-27
A	US5449603A (KIRK B. ET AL) , 12.Sep.1995(12.09.1995), Whole documents	1-27
A	WO02083929A (CLONTECH LAB INC ET AL) 24.Oct.2004(24.10.2004) Whole documents	1-27
A	WO02086095A (CHOU M F) , 31.Oct.2004(31.10.2004), Whole documents	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25.Jul. 2005 (25.07.2005)

Date of mailing of the international search report
18 · AUG 2005 (18 · 08 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
LIU Ming

Telephone No. (86-10)62085852

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/001340

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1435492A	13.08.2003	none	
US20030054378A	20.03.2003	none	
US5449603A	12.09.1995	WO9106679A	16.05.1991
		US5605824A	25.02.1997
WO9315226A	05.08.1993	AU3595493A	01.09.1993
		EP0672177A	20.09.1995
		US5534407A	09.07.1996
WO02083929A	24.10.2004	CA2442367A	24.10.2002
		US2002177218A	28.11.2002
		EP1381383A	21.01.2004
WO02086095A	31.10.2004	US2004053227A	18.03.2004

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/001340

A. 主题的分类

IPC[7]：G01N33/68, C12Q1/68

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC[7]：G01N，C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献 （1985-）

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT；核酸结合蛋白，芯片，探针，杂交，DNA，SSB，binding protein, combined protein, chip, biochip, array, microarray, matrix

C. 相关文件

类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1435492A（东南大学），13.8 月.2003(13.08.2003)，全文	1-27
A	WO9315226A（HARVARD COLLEGE），05.8 月.1993(05.08.1993)，全文	1-27
A	US20030054378A（ISAO KARUBE ET AL），20.3 月.2003(20.03.2003)，全文	1-27
A	US5449603A（KIRK B. ET AL），12.9 月.1995(12.09.1995)，全文	1-27
A	WO02083929A（CLONTECH LAB INC ET AL），24.10 月.2004(24.10.2004)，全文	1-27
A	WO02086095A（CHOU M F），31.10 月.2004(31.10.2004)，全文	1-27

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
25.7 月 2005（25.07.2005）	18 · 8月 2005 (18 · 08 · 2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号： (86-10)62019451	受权官员 刘铭 电话号码：(86-10)62085852

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001340

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1435492A	13.08.2003	无	
US20030054378A	20.03.2003	无	
US5449603A	12.09.1995	WO9106679A	16.05.1991
		US5605824A	25.02.1997
WO9315226A	05.08.1993	AU3595493A	01.09.1993
		EP0672177A	20.09.1995
		US5534407A	09.07.1996
WO02083929A	24.10.2004	CA2442367A	24.10.2002
		US2002177218A	28.11.2002
		EP1381383A	21.01.2004
WO02086095A	31.10.2004	US2004053227A	18.03.2004