(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104271768 A
(43)申请公布日 2015.01.07

(21)申请号 201380019658.0

(22)申请日 2013.02.13

(30)优先权数据
61/598,513 2012.02.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/025860 2013.02.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/122996 EN 2013.08.22

(71)申请人 约翰霍普金斯大学
地址 美国马里兰州

(72)发明人 泽-辉·王 凯文·J·刘 宋云柯

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

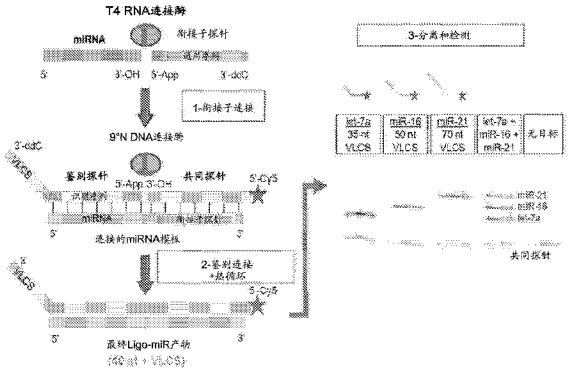
权利要求书4页 说明书16页 附图4页

(54)发明名称

miRNA分析方法

(57)摘要

本发明提供了用于miRNA表达分析的无PCR、多路连接检验，该检验在单一反应中产生高度定量、10-100路的miRNA谱。本发明的方法使用2步连接检验来产生miRNA特异性连接产物的阵列，该阵列能够通过大小鉴别方法例如凝胶电泳或单分子分离来解码和定量。一种实施方式是低成本检验，其能够使用在几乎所有的分子生物学实验室中可用的标准工具来进行。该检验仅要求凝胶设备和阅读器(reader)用于检测。其它实施方式包括磁珠和其它大小排除设备大小排阻设备的使用，其给出日益更高的灵敏度、较低的样品消耗、以及减少的处理步骤。



CN 104271768 A

1. 一种用于检测样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的方法，包含：

a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品；

b) 向 a) 的所述样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶；

c) 通过孵育以及允许所述衔接子探针连接到所述样品中所述一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3'-OH 端，进行第一连接步骤；

d) 向 b) 的所述样品加入足够量的共同探针和鉴别探针、以及足够量的第二连接酶；

e) 通过孵育 c) 的所述样品足够量的时间来引起 d) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针的杂交，并允许所述鉴别探针和共同探针之间的连接，进行第二连接步骤；以及

f) 通过一种或更多种大小鉴别方法分析所述产物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述衔接子探针包含长度为 5-50 个 DNA 核苷酸，并且在 5' 端被磷酸化。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述衔接子探针在 5' 端被预腺苷酸化。

4. 根据权利要求 2 或 3 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针在 3' 端用 ddC 或 NH_2 封闭。

5. 根据权利要求 2-4 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针在 3' 端包含可检测标记。

6. 根据权利要求 2-5 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针包含可检测内部标记。

7. 根据权利要求 2-6 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针在 3' 端包含生物素或链霉亲和素。

8. 根据权利要求 2-7 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针在 3' 端结合到磁珠。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中在 c) 第一连接步骤之后进行磁性分离、洗涤、以及重悬。

10. 根据权利要求 2-9 中的任一项所述的方法，其中所述衔接子探针包括 RNA 核苷酸。

11. 根据权利要求 1-10 中的任一项所述的方法，其中所述共同探针包含长度为 5-50 个 DNA 核苷酸，并与所述衔接子探针序列互补，以及还包含 3'-OH。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述共同探针在 5' 端包含可检测标记。

13. 根据权利要求 11 或 12 中的任一项所述的方法，其中所述共同探针包含可检测内部标记。

14. 根据权利要求 1-13 中的任一项所述的方法，其中所述鉴别探针包含 5' 识别序列，所述 5' 识别序列具有具有与感兴趣的特定 miRNA 的反义互补性的 DNA 寡核苷酸序列，并且具有具有长度为至少 5 到约 200 个核苷酸的 3' 可变长度编码序列 (VLCS)。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述 VLCS 标签长度是对一种或更多种感兴趣的 miRNA 特异性的。

16. 根据权利要求 14 或 15 中的任一项所述的方法，其中所述鉴别探针在 3' 端用 ddC 或 NH_2 封闭。

17. 根据权利要求 14-16 中的任一项所述的方法，其中所述鉴别探针在 3' 端包含可检

测标记。

18. 根据权利要求 14-17 中的任一项所述的方法，其中所述鉴别探针包含可检测内部标记。

19. 根据任一权利要求 14-18 所述的方法，其中所述鉴别探针在 5’端被磷酸化。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述鉴别探针在 5’端被预腺苷酸化。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法，其中所述可检测标记选自以下组成的组：荧光探针、近红外探针、FRET 探针、发光探针和放射性核素。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述可检测标记是 Cy 染料、Alexa Fluors、荧光素染料、ATTO 染料、IRDyes、WellRED 染料、和若丹明染料。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法，其中所述探针包含修饰的核酸碱基，例如 LNA 或 PNA。

24. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 f) 中的大小鉴别使用电泳进行。

25. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 f) 中的大小鉴别使用单分子游离液流体动力学分离 (SML-FSHS) 进行。

26. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 f) 中的大小鉴别使用色谱法进行。

27. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 c) 中的第一连接在 ATP 的不存在下进行。

28. 根据权利要求 1 所述的方法，其中 e) 中的第二连接在 ATP 的不存在下进行。

29. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述孵育包含在 45℃到约 95℃变性约 0.25 到约 5 分钟、之后是在 4℃到约 80℃连接约 0.25 到约 100 分钟的 1-100 个循环的热循环。

30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的方法，其中加入添加剂诸如 PEG 或 DMSO 来增加连接效率和减少连接偏差。

31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的方法，其中加入内部对照来报偿连接效率的变化。

32. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述第一连接酶是 T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2 截短型、T4RNA 连接酶 2K227Q、T4RNA 连接酶 2 截短型 KQ 和 Mth. RNA 连接酶。

33. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述第二连接酶是大肠杆菌 (E. Coli)DNA 连接酶、Taq DNA 连接酶、9° N DNA 连接酶、T4DNA 连接酶、T4RNA 连接酶 2 和 Ampligase。

34. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在 c) 所述第一连接步骤和 e) 所述第二连接步骤之后进行热变性步骤。

34. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在 e) 所述第二连接步骤之后但 f) 大小鉴别之前进行所述反应产物的 PCR 扩增。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中一个 PCR 引物是与所述 VLCS 序列反义的，以及所述第二引物是与所述衔接子探针序列反义的。

36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的方法，其中所述感兴趣的目标 RNA 是包含长度为 8-150 个核苷酸之间的 miRNA、siRNA 或其它 RNA 序列。

37. 一种用于在受试者中诊断或预后疾病或状况的方法，包含：

a) 从所述受试者获得生物样品；

b) 使用权利要求 1-36 中任一项所述的方法，分析 a) 的所述样品的一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平；

c) 比较所述样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平和对照样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平；

d) 当与所述对照样品比较时，如果一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平与特定的模式相关，则诊断所述受试者患有所述疾病或状况，或预后所述疾病或状况的结果或响应。

38. 根据权利要求 37 所述的方法，其中所述目标 RNA 是包含长度为 8-150 个核苷酸之间的 miRNA、siRNA 或其它 RNA 序列。

39. 一种用于衔接子探针和短 RNA 序列的高效和低偏差连接的方法，包含：

a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品；

b) 向所述样品加入饱和量的衔接子探针；

c) 向所述样品加入饱和量的连接酶；

d) 向所述样品加入饱和量的 PEG；以及

e) 通过孵育以及允许所述衔接子探针连接到所述样品中所述一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3'-OH 端，进行第一连接步骤。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中反应体积是 5-100μL。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中反应体积是 20μL。

42. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述样品包含 1-10,000ng 总 RNA。

43. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述样品包含 500ng 总 RNA。

44. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述连接酶的量在 100-1000 单位之间。

45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述连接酶的量是 300 单位。

46. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述 PEG 在 10-40％之间。

47. 根据权利要求 46 所述的方法，其中所述 PEG 是 25％。

48. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述孵育温度在 4-95℃之间。

49. 根据权利要求 48 所述的方法，其中所述孵育温度在 25℃。

50. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述孵育时间在 0.25-24 小时之间。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述孵育时间是 4 小时。

52. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述连接酶包含 T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2 截短型、T4RNA 连接酶 2K227Q、T4RNA 连接酶 2 截短型 KQ 和 Mth.RNA 连接酶。

53. 根据权利要求 52 所述的方法，其中所述连接酶包含 T4RNA 连接酶 2K227Q。

54. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述衔接子探针包含 DNA 碱基，并且长度为 5-50nt。

55. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述衔接子探针包含 RNA 和 DNA 碱基的混合物，并且长度为 5-50nt。

56. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述衔接子探针包含与连接位点相邻的 RNA 碱基。

57. 一种用于检测样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的方法，包含：

a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品；

b) 向 a) 的所述样品加入足够量的 poly(A) 聚合酶；

c) 通过孵育以及加入 poly(A) 尾到所述样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的末端

进行 poly(A) 延伸 ;

d) 向 b) 的所述样品加入足够量的共同探针和鉴别探针、以及足够量的第二连接酶 ;

e) 通过孵育 c) 的所述样品足够量的时间来引起 d) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针的杂交,以及允许所述鉴别探针和共同探针之间的连接,进行第二连接步骤 ;以及

f) 通过一种或更多种大小鉴别方法分析所述产物。

miRNA 分析方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求 2012 年 2 月 14 日提交的美国临时专利申请号 61/598,513 的权益，其为了所有目的通过引用方式特此并入，如同在本文完全阐述。

[0003] 政府权益的声明

[0004] 本发明是在经费号 1R01CA155305、1R43GM103360 和 1U54CA151838 下，以美国政府的支持做出的。美国政府在本申请具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 微 RNA(miRNA) 是短的、非编码 RNA，在细胞过程例如分化和疾病状态例如癌症中，具有贯穿基因表达的广泛作用。揭露这些分子在发育和肿瘤发生中的作用是对稳健的、新的生物标志物和潜在疾病治愈的发现的关键步骤。

[0007] 分析 miRNA 表达的现有方法由基于单目标 PCR 的方法和高度多路的阵列的方法组成。PCR 非常灵敏，但是只能分析单一目标。因此，miRNA 板的检测要求大量的平行反应，大大地增加了成本、样品消耗、和复杂性。现有的基于阵列的方法在单一反应中能够分析数百 miRNA，但是具有每个样品的高成本、低样品通量、和有限的灵敏度。这些有前景的 miRNA 板的成功的临床验证和转化将要求，以成本有效、高通量和稳健方式准确定量 10-100 种 miRNA。没有现有技术能够弥合高度多路但是昂贵的基于阵列的方法与灵敏但是单路的 qPCR 方法之间的这种分歧。目前，没有方法能够实现在罕见的临床样品中低成本 miRNA 表达谱 (profiling) 所需的高灵敏度、多路检测。

[0008] 因此，对于用于 miRNA 表达分析的低成本、无 PCR、多路的阵列存在需求，其在单一反应中以少于目前现有方法的时间进行高度定量、10-100 路的 miRNA 表达谱。

[0009] 发明概述

[0010] 为了解决这一需求，发明人已经开发了一种靶向短 RNA 序列例如 miRNA 用于 RNA 表达谱 (RNA profiling) 的低廉和易得的多路连接检验。

[0011] 根据一种或更多种实施方式，本发明提供了用于 miRNA 分析的新的组合物和方法。这些创造性的组合物和方法共同命名为“Ligo-miR TM”检验。

[0012] 在称为“Ligo-miR EZ 检验”的一个实施方式中，该实施方式平衡了罕见临床样品中的 miRNA 的无 PCR 和无 RT 的分析的连接机制的高度多路能力和高特异性。本发明的方法使用 2 步连接方法来创建快速（约 4 小时）、灵敏（$<10^{-18}$ 摩尔）、和高度特异性 (>1000:1) 的 miRNA 表达谱工具。与占主导地位的微阵列技术比较，检验成本将少 20 倍，检验时间将短 5 倍，以及灵敏度将高 100 倍。

[0013] 本发明的组合物和方法使用新的 2 步连接方法来产生大小编码的 miRNA 连接产物，该产物能够通过凝胶分离 (Ligo-miR EZ)、单分子分析（称为“Ligo-miR HD”）、毛细管电泳、色谱法或任何其它核酸分筛方法来单独鉴定和定量。50 个循环的线性扩增（非 -PCR) 能够被合并到第二连接步骤中来提高灵敏度，同时保留极好的线性。

[0014] 在一种或更多种实施方式中，本发明提供了用于检测受试者的血液、血清、唾液、尿液、粪便、或其它体液中 miRNA 生物标志物的方法，其包含无创诊断或预后技术，其足够

灵敏来在哺乳动物受试者的生物样品中检测或预测疾病状态的结果或响应，例如致瘤的、癌性的、恶变前的或化生改变。

[0015] 在一种或更多种实施方式中，本发明提供了用于检测受试者组织中 miRNA 生物标志物的方法，其包含诊断或预后技术，其足够灵敏来在哺乳动物受试者的生物样品中检测或预测疾病状态的结果或响应，例如致瘤的、癌性的、恶变前的或化生改变。

[0016] 根据一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的方法，包含 ：a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品 ；b) 向 a) 的样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶 ；c) 通过孵育以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3’-OH 端，进行第一连接步骤 ；d) 向 b) 的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶 ；e) 通过孵育 c) 的样品足够量的时间来引起 d) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针的杂交，并允许鉴别探针和共同探针之间的连接，进行第二连接步骤 ；以及 f) 通过一种或更多种大小鉴别方法分析产物。

[0017] 根据另一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的方法，包含 ：a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品 ；b) 向 a) 的样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3’-OH 端 ；c) 向 b) 的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶 ；d) 热循环 c) 的样品足够量的时间来引起 c) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针杂交以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接 ；e) 通过凝胶电泳分离 d) 的产物 ；f) 通过凝胶成像检测 e) 的产物。

[0018] 根据再一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的方法，包含 ：a) 获得含有一种或更多种感兴趣的 miRNA 的样品 ；b) 向 a) 的样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的 3’-OH 端 ；c) 向 b) 的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶 ；d) 热循环 c) 的样品足够量的时间来引起 c) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的 miRNA 和衔接子探针杂交以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接 ；e) 通过大小鉴别分析产物。

[0019] 根据一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的方法，包含 ：a) 获得含有一种或更多种感兴趣的 miRNA 的样品 ；b) 向 a) 的样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的 3’-OH 端 ；c) 向 b) 的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶 ；d) 热循环 c) 的样品足够量的时间来引起 c) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的 miRNA 和衔接子探针的杂交以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接 ；e) 使用单分子游离液流体动力学分离 (single molecule free solution hydrodynamic separation, SML-FSHS) 分离 d) 的产物 ；f) 通过在所得的色谱中峰的分析检测 e) 的产物。

[0020] 根据另一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的方法，包含 ：a) 获得含有一种或更多种感兴趣的 miRNA 的样品 ；b) 向 a) 的样品加入足够量的与多个磁性颗粒结合的衔接子探针和足够量的第一连接酶以及允许与磁性颗粒结合的衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的 miRNA 的 3’-OH 端 ；c) 磁性地分

离具有连接到结合的衔接子探针的感兴趣的 miRNA 的颗粒 ;d) 洗涤 c) 的颗粒并在缓冲液中重悬颗粒 ;e) 向 d)) 的颗粒的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶，和水 ;f) 热循环 e) 的样品足够量的时间来引起 e) 的探针与 b) 的连接的感兴趣的 miRNA 和衔接子探针杂交以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接 ;g) 通过凝胶电泳分离 f) 的产物 ;h) 通过凝胶成像检测 g) 的产物。

[0021] 根据另一种实施方式，本发明提供了衔接子探针对短 RNA 序列的高效和低偏差 (bias) 连接的方法，包括 :a) 获得包含一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品 ;b) 向样品加入饱和量的衔接子探针 ;c) 向样品加入饱和量的连接酶 ;d) 向样品加入饱和量的 PEG ;以及 e) 通过孵育进行连接步骤以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3'-OH 端。

[0022] 根据一种实施方式，本发明提供了诊断受试者中疾病的存在的方法，包含 :从受试者获得生物样品以及使用本发明的方法测量一种或更多种感兴趣的 miRNA 的表达水平，其与疾病或状态的存在关联。

[0023] 根据一种实施方式，本发明提供了产生受试者中至少一种或更多种肿瘤的 miRNA 谱的方法，包含 :从受试者获得生物样品以及使用本发明的方法测量一种或更多种感兴趣的 miRNA 的表达水平，其与特定癌症谱关联。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 显示了本发明的整体 Ligo-miR TM 分析方法的图解。

[0026] 图 2 显示了使用本发明的无 PCR、6 路 Ligo-miR TM 检验，使用单一反应进行 let-7a、miR-16、miR-21、miR-26a、miR-29b、和 miR-34a 的多路检测的凝胶。仅当正确的 miRNA 目标存在时，相应长度编码的连接产物才被形成，使得能够通过大小进行鉴定。在探针组之间没有观察到串扰。

[0027] 图 3 显示了滴定的 miRNA 的 6 路分析的典型的凝胶图像，其中所有 6 种 miRNA 目标是同时连续稀释的。

[0028] 图 4 描绘了使用 Ligo-miR EZ 获得的 miR-21 的滴定曲线。实现了高灵敏度 (<$2.5x10^{-18}$ 摩尔)、极好的线性、和高重复性。显示的是来自 3 个独立的试验的平均值和标准偏差。分子流体 Ligo-miR HD 将使得能够甚至更高的幺摩尔 (yoctomole) 水平灵敏度 (10^{-23} 摩尔)。

[0029] 图 5 描绘了用于 Ligo-miR HD 分析的 SML-FSHS 微流体装置的图解，其是由硅向玻璃的阳极键合制造的。分离在缓冲液填充的蜿蜒的分离通道中进行，其后，基于圆柱形照明共焦光谱 (cylindrical illumination confocal spectroscopy,CICS) 的单分子检测被用于分析分离的峰。为了 100％质量检测效率，CICS 激光片覆盖整个通道的横截面 (插图)。通道的尺寸通过平衡硅蚀刻深度与二氧化硅的厚度控制 (右)。

[0030] 图 6 描绘了使用 Ligo-miR HD 进行的 20 路 miRNA 分析的典型的色谱图。SML-FSHS 被用于通过大小鉴定 Ligo-miR TM 产物，以及通过单分子计数对其定量。每一个 Ligo-miR TM 产物基于其可变长度编码序列被鉴定为大小特异性峰。数量通过 Alexa-647 标记的单分子计数确定。

[0031] 图 7 显示了本发明的 Ligo-miR 珠实施方式的图解。本实施方式使用磁珠和 2 步连接将 miRNA 捕获和多路检测整合到单一流线方法 (single streamlined process) 中。第

一连接从血清捕获miRNA，以及形成在珠表面上集中的miRNA模板。磁性分离去除所有的背景杂质。第二连接包括50倍线性扩增，以及产生单链miRNA特异性连接产物，其通过单分子分析被鉴定和定量。

[0032] 图8显示了仅使用高效和低偏差的第一步骤连接，来自衔接子探针与miRNA连接的凝胶图像以及捕获效率分析。(a)Cy3标记的miRNA使用优化的方案被捕获。所有的miRNA被高效地一致捕获。(c)(a)的定量的miRNA捕获效率。

[0033] 发明详述

[0034] 本文使用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”，以及一般指DNA或RNA的聚合体，其可以是单链的或双链的、合成的或从自然资源获得的（例如分离和/或纯化），其能够含有天然、非天然或变化的核苷酸，以及其能够含有天然、非天然或变化的核苷酸间键合，例如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键，代替在未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间发现的磷酸二酯键。一般优选的是，核酸不包含任何插入、缺失、倒位、和/或取代。然而，在一些情况中，如本文讨论的，核酸包含一个或更多个插入、缺失、倒位、和/或取代可以是合适的。

[0035] 在一种实施方式中，本发明的核酸是重组的。如本文使用的，术语“重组”是指(i)通过加入天然或合成核酸区段到在活细胞中能够复制的核酸分子而在活细胞外构建的分子，或(ii)从在上述(i)中描述的那些分子的复制得到的分子。为了本文的目的，复制可以是体外复制或体内复制。

[0036] 如本文使用的，术语“感兴趣的目标RNA”可以是任何短的核糖核酸序列。这样的目标RNA序列的长度是从约8到约100个核苷酸。在一些实施方式中，目标RNA可以长于100个核苷酸。目标RNA的例子包括在诊断和治疗疾病和其他用途中有用的miRNA、siRNA和其它RNA序列。根据一种实施方式，感兴趣的目标RNA是miRNA。

[0037] 本发明的实施方式中用作引物的核酸可以基于化学合成和/或酶连接反应使用本领域中已知的程序被构建。参见，例如，Sambrook等（编著），Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(2001)和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY(1994)。例如，核酸可以使用天然存在的核苷酸或不同修饰的核苷酸化学合成，不同修饰的核苷酸被设计来增加分子的生物稳定性或来增加杂交形成的双链体的物理稳定性（例如，硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸）。可用于产生核酸的修饰的核苷酸的例子包括，但不限于，5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基）尿嘧啶、5-羧甲基氨甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基queosine、肌苷、N^6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N^6-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基queosine、5’-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N^6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基）尿嘧啶、和2,6-二氨基嘌呤。可选择地，本发明的核酸的一种或更多种可以从公司例如Integrated DNA

Technologies(Coralville,IA) 和 Genscript(Piscataway,NJ) 购买。

[0038] 本文用到的术语“分离与纯化”是指基本上没有与其它蛋白或多肽的缔合的蛋白，例如，作为通过使用抗体或其它方法已经从细胞和其它污染物中分离出来的天然存在的蛋白或作为重组宿主细胞培养的纯化产物。

[0039] 本文用到的术语“生物活性”是指具有天然存在的分子的结构、调节、或生化功能的酶或蛋白。

[0040] 如本文使用的，术语“受试者”是指任何哺乳动物，包括，但不限于，啮齿目(Rodentia) 的哺乳动物，例如小鼠和仓鼠，和兔形目 (Logomorpha) 的哺乳动物，例如兔。优选地，哺乳动物来自食肉目 (Carnivora)，包括猫科动物（猫）和犬科动物（狗）。更优选地，哺乳动物来自偶蹄目 (Artiodactyla)，包括牛科（奶牛）和猪科（猪）或奇蹄目)，包括马科动物（马）。最优选地，哺乳动物来自灵长目、Ceboids、或 Simoids（猴）或类人猿目（人类和猿猴）。特别优选的哺乳动物是人类。

[0041] 根据一种实施方式，本发明提供了用于检测样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的方法，包含 :a) 获得含有一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的样品 ;b) 向 a) 的样品加入足够量的衔接子探针和足够量的第一连接酶 ;c) 通过孵育以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3’-OH 端，进行第一连接步骤 ;d) 向 b) 的样品加入足够量的共同探针和鉴别探针，以及足够量的第二连接酶 ;e) 通过孵育 c) 的样品足够量的时间来引起 c) 的探针和 b) 的连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针的杂交，以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接，进行第二连接步骤 ;f) 通过大小鉴别方法分析 d) 的产物。

[0042] 根据本发明方法使用的大小鉴别方法可以是本领域已知的任何技术，诸如，例如，凝胶电泳、毛细管电泳、高压液相色谱法、质谱法、荧光光谱法、以及其他方法。

[0043] 本领域普通技术人员将理解，本文公开的创造性方法不仅能够检测感兴趣的目标 RNA，还能够定量样品中目标 RNA 的数量。感兴趣的目标 RNA 的定量允许阐明样品中目标 RNA 的表达水平。

[0044] 在上面方法的一些实施方式中，衔接子探针在 3’ 端结合到磁珠。

[0045] 在上面方法的一些替代的实施方式中，在 c) 第一连接步骤之后进行磁性分离、洗涤、和重悬。本领域普通技术人员将理解，磁珠和在分离中使用它们的方法是本领域中常用的。

[0046] 根据一种或更多种实施方式，本发明的方法可包括在 c) 第一连接步骤和 e) 第二连接步骤之后进行的热变性步骤。热变性，如本文使用的，可包括直接加热和孵育样品设定的时间段，或者能够通过使用在核酸领域常用的热循环装置完成。在一些实施方式中，孵育步骤包含热循环，其是在 45℃到约 95℃变性约 0.25 到约 5 分钟，之后在 4℃到约 80℃连接约 0.25 到约 100 分钟的 1-100 个循环。在一种优选的实施方式中，孵育步骤包含热循环，其是在 95℃变性约 30 秒，之后在 45℃连接约 30 秒的 1-100 个循环。

[0047] 根据一种或更多种实施方式，本发明的方法还能包括反应产物的 PCR 扩增，其在 e) 第二连接步骤之后但在 f) 大小鉴别之前进行。

[0048] 在包括 PCR 扩增的可选择的实施方式中，一个 PCR 引物是对 VLCS 序列反义的，以及第二引物是对衔接子探针序列反义的。

[0049] 根据一种或更多种实施方式，本发明的方法能够被用来鉴定感兴趣的目标 RNA，包

括包含 8 到 150 个核苷酸之间的长度的 miRNA、siRNA，或其它 RNA 序列。

[0050] 本领域普通技术人员将理解，本发明的方法包含两个一般性步骤。第一步骤为第一连接步骤，其中感兴趣的目标 RNA 与衔接子探针一起孵育，以及允许衔接子探针连接到样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的 3'-OH 端。第二一般性步骤为第二连接步骤，其中加入样品、足够量的共同探针和鉴别探针、和足够量的第二连接酶，以及孵育样品足够量的时间来引起探针与连接的感兴趣的目标 RNA 和衔接子探针之间的杂交，以及允许鉴别探针和共同探针之间的连接。根据一些实施方式，这些方法的两个步骤可以被分离和在基本上不同的时间进行。例如，第一步骤可以被应用到样品，以及储存用于以后使用第二步骤的分析。

[0051] 在可选择的实施方式中，只有第一步骤被应用到样品，然后可以应用可选择的分析方法，例如 PCR、qPCR、微阵列、测序、或本领域已知的其他方法。由于它们的短的长度，几乎所有的微 RNA 分析技术的第一步是通过 poly(A)- 加尾或，更常见地，连接来延伸微 RNA 目标。通过衔接子探针连接的微 RNA 捕获是在大多数基于 PCR、微阵列，多路、和测序的检验中的普遍的第一步骤。然而，这一连接能对微 RNA 表达谱分析的结果引入实质的偏差。本发明实施方式使得能够使用许多技术的任一种下游评估高保真的表达谱，由于高效和低偏差衔接子连接，这大大免除了连接偏差的模糊效果。主要检验参数例如 PEG%、衔接子探针浓度、连接酶类型、连接酶数量、孵育时间、孵育温度、和衔接子探针设计，被用于减少连接偏好。

[0052] 在一种可选择的实施方式中，100-1000 单位的连接酶、1-12pmol 腺嘌呤化的衔接子探针、10-40％的 PEG8000 或 PEG4000、以及 T4RNA 连接反应缓冲液 (New England Biolabs) 被加入到 1-10,000ng 的总 RNA 来形成 5-100μL 的反应混合物。该反应在 4-95℃孵育 0.25-24 小时。潜在的连接酶包含 T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2 截短型、T4RNA 连接酶 2K227Q、T4RNA 连接酶 2 截短型 KQ 和 Mth.RNA 连接酶。

[0053] 在一种可选择的实施方式中，200-400 单位的 T4RNA 连接酶 2 截短型 K227Q、4-8pmol 腺嘌呤化的衔接子探针、20-30％的 PEG8000 或 PEG4000，以及 T4RNA 连接反应缓冲液 (New England Biolabs) 被加入到 100-1000ng 的总 RNA 来形成 10-30μL 的反应混合物。反应在 4-37℃孵育 1-8 个小时。

[0054] 在一种可选择的实施方式中，300 单位的 T4RNA 连接酶 2 截短型 K227Q、6pmol 腺嘌呤化的衔接子探针、25％的 PEG8000、以及 T4RNA 连接反应缓冲液 (New England Biolabs) 被加入到 500ng 的总 RNA 来形成 20μL 的反应混合物。反应在 25℃孵育 4 个小时。

[0055] 在一种可选择的实施方式中，衔接子探针包括 DNA 碱基。在另一种实施方式中，衔接子探针包括 DNA 和 RNA 碱基的混合物。在再一种实施方式中，衔接子探针在连接位点处或接近连接位点处包括 RNA 碱基。如图 8 所示，本方法能够实现跨 20 路 miRNA 板的高效 (85％的平均捕获效率) 和低偏差 (11％ CV)。之前没有实现过这样的高效和低偏差。通过使用基本上高于通常推荐的 PEG8000 水平 (25％ vs.15％)、饱和衔接子探针水平 (≥ 6pmol 对于 500ng 的总 RNA)、以及饱和酶量 (≥ 300 单位对于 500ng 的总 RNA)，连接效率被大大增强，以及偏差被显著抑制。衔接子探针序列的例子在表 1 中给出。

[0056] 在可选择的实施方式中，只有第二步骤被应用到样品，以及可选择的分析方法预先被应用到微 RNA，例如逆转录或 poly(A) 加尾。

[0057] 根据本发明的一种或更多种实施方式，可以理解使用本文提供的方法可进行癌症诊断的类型不必要限制。为了本文的目的，该癌症可以是任何癌症。如本文使用的，术语“癌症”是指由不正常的和不受控制的细胞分裂导致的任何恶性生长或肿瘤，其可以通过淋巴系统或血流扩散至身体的其他部位。

[0058] 癌症可以是转移性癌症或非转移性（例如，局部的）的癌症。如本文使用的，术语“转移性癌症”指其中癌症的细胞已经转移的癌症，例如，癌症特征在于癌细胞的转移。转移可以是局部转移或远端转移，如本文描述的。

[0059] 其中使用本发明的方法对miRNA和其它RNA的分析可以被应用的其他疾病或状况包括心血管疾病、肝脏疾病、神经性紊乱、精神紊乱、糖尿病、脓毒症、关节炎、病毒性感染、阿尔茨海默病、和免疫系统紊乱。

[0060] 如本文使用的，术语“治疗”、和“预防”还有由此产生的词，不必意味着100％或完全治疗或预防。而是，存在本领域普通技术人员认识到其具有潜在的益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这一方面，本发明方法能够提供在哺乳动物中的任何水平任何数量的诊断、分期、筛选、或其他患者管理，包括治疗或预防癌症。此外，本发明的方法提供的治疗或预防可以包括被治疗或被预防的疾病，例如，癌症，的一种或更多种状况或症状的治疗或预防。另外，为了本文的目的，“预防”可包含延迟疾病或其症状或状况的发作。

[0061] 本文用到的“互补(Complement)”或“互补性(complementary)”指核酸可以是指在核酸分子的核苷酸或核苷酸类似物之间的Watson-Crick(例如A-T/U和C-G)或Hoogsteen碱基配对。

[0062] 本文在两种或更多种核酸或多肽序列的上下文用到的“相同的”或“同一性”可以是指序列有特定百分比的残基跨特定的区域是相同的。百分比可以如下被计算：通过最佳地比对两种序列，比较跨特定区域的两种序列，确定两种序列中出现相同残基的位置的数量来得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以特定区域中的位置的总数目，以及将结果乘以100来得到序列同一性的百分比。在两条序列是不同长度的或比对产生一种或更多种交错末端，以及比较的特定区域仅包括单一序列的情形中，单一序列的残基被包括在分母中，而不是计算的分子中。当比较DNA和RNA时，胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以被认为相同。同一性能够手动地进行，或通过使用计算机序列算法例如BLAST或BLAST2.0进行。

[0063] 本文使用的“探针”可指能够通过一种或更多种类型的化学键，通常是通过互补碱基配对，通常通过氢键形成，结合到互补序列的目标核酸的寡核苷酸。取决于杂交条件的严格性，探针可结合缺少与探针序列的完全互补性的目标序列。可存在任何数量的碱基对错配，其将干扰本文描述的目标序列和单链核酸之间的杂交。然而，如果，突变数大到即使是最严格的杂交条件下也没有杂交能够发生，该序列不是互补的目标序列。探针可以是单链或部分单链和部分双链。探针的链性由目标序列的结构、组成和性质所决定。探针可以被直接标记或间接标记，例如以生物素标记，后续链霉亲和素复合体可与其结合。

[0064] 本文使用的“基本上互补”可指第一序列与第二序列的互补序列跨8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个核苷酸的区域至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、98％或99％相同，或这两个序列在严格杂交条件下杂交。

[0065] 本文使用的“基本上相同”可指第一序列与第二序列跨8、9、10、11、12、13、14、15、

16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核苷酸或氨基酸的区域至少 60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、98％或 99％相同，或对于核酸，如果第一序列与第二序列的互补序列基本上互补。

[0066] 本文使用的“目标”可指寡核苷酸或其部分或片段，其可在严格的杂交条件下被一种或更多种探针结合。本文使用的“目标”也可指特定 miRNA 或其部分或片段，其可在严格的杂交条件下被一种或更多种探针结合。

[0067] 本发明的核酸还可包含 miRNA 或其变体的序列。miRNA 序列可包含 13-33、18-24 或 21-23 个核苷酸。miRNA 可包含共至少 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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90 以及高达 100 个核苷酸。miRNA 的序列可以是 pre-miRNA 的前 13-33 个核苷酸。miRNA 的序列也可以是 pre-miRNA 的最后 13-33 个核苷酸。

[0068] 本文使用的术语“第一连接酶和 / 或第二连接酶”指根据本发明的方法能够使用的许多不同类型的连接酶。这样的连接酶的例子包括大肠杆菌 (E.Coli)DNA 连接酶、Taq DNA 连接酶、9° N DNA 连接酶、T4DNA 连接酶、T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2、Ampligase、天然的 DNA/RNA 连接酶的遗传修饰的变体，以及本领域已知的其他。

[0069] 根据一种或更多种实施方式，试剂例如连接酶和探针的浓度可以是“饱和量”。如本文用到的，饱和量的试剂（酶、探针、反应时间等）是以下点 :增加超过该点使得反应效率不再增加。该点通过如下被发现 :掺加每种 miRNA 到总 RNA 的背景中，并缓慢增加参数（酶、探针、反应时间），直到不再观察到 miRNA 捕获效率增加。关键性的是这在掺加到总 RNA 背景时而不是纯缓冲液进行，因为通过使用总 RNA 背景获得的最佳的条件与通过使用缓冲液背景获得的那些非常不同。

[0070] 根据一种或更多种实施方式，在本发明的方法中能够使用添加剂。例如，添加剂诸如 PEG 或 DMSO 被加入来增加连接效率和减少连接偏差。

[0071] 根据一种或更多种实施方式，内部对照被加入来报偿连接效率的变化。

[0072] 还提供了鉴定与疾病或病理状况关联的核酸的方法。方法包含测量不同于对照的水平的样品中的核酸水平。根据一种实施方式，核酸是 miRNA，以及检测可通过将样品与本文描述的探针或生物芯片接触，并检测杂交产物的数量进行。

[0073] 样品中的核酸水平还可与对照细胞（例如，正常细胞）比较来确定核酸是否差异表达（例如，过表达或低表达）。鉴定在病理细胞中与对照相比差异表达的 miRNA 的能力，能够提供高分辨率、高灵敏度的数据集，其可用于诊断学、预后学、治疗学、药物开发、药物遗传学、生物传感器开发的领域、和其他相关领域。

[0074] 疾病相关的核酸或 miRNA 的表达水平以许多方式提供信息。例如，疾病相关的核酸与对照相比的差异表达可以被用于诊断患有疾病的患者。疾病相关的核酸的表达水平还可被用于监测患者的治疗和疾病状态。此外，疾病相关的 miRNA 的表达水平可允许为了改变特定的表达谱或抑制与疾病关联的表达谱筛选候选药物。

[0075] 目标核酸或其部分或片段可以被检测，以及测量目标核酸的水平，所述测量通过将包含目标核酸的样品与包含与目标核酸充分互补的连接探针的生物芯片接触，以及检测超出对照水平的对探针的杂交。

[0076] 根据本发明的另一种实施方式，可以理解术语“生物样品”或“生物流体”包括，但

不限于，任意数量的来自活体的或曾经活体的患者或哺乳动物的物质。这样的物质包括，但不限于，血液、血清、血浆、尿液、细胞、器官、组织、骨、骨髓、淋巴、淋巴结、滑液组织、软骨细胞、滑液巨噬细胞、内皮细胞和皮肤。在一个优选的实施方案中，所述流体是血液或血清。

[0077] 还提供了一种诊断的方法。该方法包含检测两种或更多种疾病相关的 miRNA 在生物样品中的差异表达水平。该样品可以来源于受试者。受试者疾病状态的诊断可允许预后和治疗策略的选择。此外，细胞的发育阶段可以通过确定瞬时表达的疾病相关的 miRNA 来分级。

[0078] 根据一种实施方式，本发明提供了用于诊断受试者疾病或状况的方法，包含 a) 从受试者获得生物样品 ；b) 使用上述的方法，分析 a) 的样品的一种或更多种感兴趣的目标 RNA ；c) 比较样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平和对照样品中一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平 ；d) 当与对照样品比较时，如果在受试者样品中检测到与疾病或状况的存在关联的一种或更多种感兴趣的目标 RNA 的表达水平，则诊断受试者具有疾病或状况。

[0079] 在用于受试者疾病或状况的诊断的方法的一些实施方式中，目标 RNA 是包含 8 到 150 个核苷酸长度的 miRNA、siRNA 或其他 RNA 序列。

[0080] 样品中 miRNA 的身份和相对量能够被用于提供特定样品的 miRNA 表达谱。样品的 miRNA 表达谱包括有关样品中包含的 miRNA 的身份、样品中包含的 miRNA 的定量水平、和 / 或 miRNA 的定量水平相对于其它样品的变化的信息。例如，样品的 miRNA 谱包括与特定的细胞类型、过程、感兴趣的状况、或其它细胞的状态关联的 miRNA 的身份、定量水平、和 / 或定量水平的变化的信息。这样的信息可以被用于诊断目的、药物开发、药物筛选和 / 或药效试验。

[0081] 在另一种实例中，对于诊断，如果已知特定 miRNA 或 miRNA 的组的存在或不存在与感兴趣的特定状况的存在或不存在相关联，则状况的诊断能够通过获得取自被诊断的患者的样品的 miRNA 谱来进行。

实施例

[0082] 基本的 Ligo-miR TM 检验原理 . 根据一种或更多种实施方式，本文提供的本发明的 Ligo-miR TM 方法包含用于多路 miRNA 检测的无 PCR、2 步连接检验，其基于探针长度，编码和检测感兴趣的 miRNA。在第一连接步骤中，通用的衔接子探针使用第一连接酶被连接到样品中的每个 miRNA 的 3’-OH 来形成连接的寡核苷酸模板。在第二连接步骤中，感兴趣的 miRNA 特异性鉴别探针和通用共同探针之后被加入到溶液中，以及允许与 miRNA 衔接子模板杂交，以及使用第二连接酶连接，来形成最终 Ligo-miR TM 反应产物。

[0083] 根据一种实施方式，共同探针和衔接子探针彼此互补，以及是跨所有的 miRNA 共享的。每一个鉴别探针与每一个感兴趣的 miRNA 在 5’端特异性的互补，以及其在 3’端还包含可变长度的编码序列部分 (VLCS)。每一个鉴别探针包含相应的 5-150nt VLCS，其用于通过其独特的长度使用例如电泳的大小鉴别方法鉴定特异性 miRNA 探针。如此，在一组将被用于多路 miRNA 检测的探针中，将有用于被检测的每一个感兴趣的 miRNA 的 1 个鉴别探针、单一衔接子探针和单一共同探针。只有感兴趣的特异性 miRNA 存在时，在第二步骤中特异性鉴别探针和共同探针将被连接在一起。这一 2 步连接方法确保只有成熟 miRNA 被高效

的检测。在第一连接步骤中，衔接子探针必须被紧密毗邻成熟 miRNA 序列连接，以使第二连接步骤恰好发生。

[0084] Ligo-miR TM 反应产物的检测．根据另一种实施方式，反应产物的分析通过连接到共同探针的 5’端的荧光标记的检测进行。每一个特异性 miRNA 导致相应的反应产物，其之后通过长度被鉴定。根据一种可选择的实施方式，鉴别探针另外地在 3’端被荧光标记。产物的分析通过 3’鉴别探针信号和 5’共同探针信号的一致分析进行，其只有当连接已发生时才发生。

[0085] 根据再一实施方式，鉴别探针和共同探针被荧光染料标记，以便当形成连接产物时，荧光共振能量转移 (FRET) 发生。

[0086] 还根据另一实施方式，鉴别探针被内部标记，而不是末端标记。鉴别探针也能够用相同或不同的标记来标记。

[0087] 本领域技术人员可以理解在某种实施方式中，探针通过任何已知手段被可检测地标记，手段包括，例如，放射性标记、荧光标记、比色标记等。

[0088] 根据本发明的方法，杂交产物长度的检测能够通过凝胶电泳、毛细管电泳、游离液流体动力学分离、色谱方法等进行。

[0089] 本发明的 Ligo-miR TM 分析方法的可选的变化形式．根据一种实施方式，单一衔接子探针、单一共同探针、和一组鉴别探针被设计来进行多路检测，其中相对链上第二连接位点的位置，是与第一连接位点精确相对的。根据另一种实施方式，第二连接位点向 3’或 5’方向移动，以便其从第一连接位点偏移来增加特异性。

[0090] 又根据另一种实施方式，第二连接位点被移动，以及多个共同探针、多个衔接子探针、和一组鉴别探针被设计来使得能够通过颜色和长度实现多路。

[0091] 根据一种或更多种实施方式，第一连接在 ATP 的不存在下进行。

[0092] 根据一种或更多种实施方式，第二连接在 ATP 的不存在下进行。

[0093] 根据再一种实施方式，聚合酶链式反应 (PCR) 引物位点被设计到探针序列中来使得能够掺入下游的 PCR 扩增步骤。所有鉴别探针的 3’端被设计成含有共同 PCR 引物位点。对此位点反义的正向引物被合成。对衔接子探针序列反义的反向引物也被合成。以这种方式，所有的 miRNA 特异性连接产物能够使用单一 PCR 引物组被 PCR 扩增。PCR 扩增在第二连接步骤之后通过加入上述的 PCR 引物、聚合酶和 PCR 试剂到连接产物并热循环进行。列举在表 1 中的对 miR-26a、miR-34a、和 miR-29b 的鉴别探针包括这样的共同 PCR 引物位点。

[0094] 还根据另一种实施方式，poly(A) 加尾被用于在第一步骤中代替连接，以及 poly(T) 共同探针被用于第二步骤。将足够量的 poly(A) 聚合酶、poly(A) 聚合酶反应缓冲液、和 ATP 加入到含有感兴趣的 RNA 的样品中，以及在 37℃孵育 10 分钟。这将 poly(A) 尾加入到样品中每一个 RNA 分子的末端。之后在 65℃热灭活聚合酶 20 分钟。之后使用 poly(T) 共同探针，以及相应地进行该检验。在还另一种实施方式中，5 单位的 poly(A) 聚合酶、1 倍 poly(A) 聚合酶反应缓冲液、以及 1mM ATP 被加入到 500ng 总 RNA 中，以及在 37℃孵育 10 分钟。

[0095] 衔接子探针设计．被用于本发明的方法的衔接子探针是商业合成的、HPLC 或 PAGE 纯化的 DNA 寡核苷酸。根据一种实施方式，典型的衔接子探针为带有 5’-App（腺苷酸化）和 3’-ddC（双脱氧胞苷）的约 19nt 的长度。

[0096] 根据另一种实施方式，衔接子探针的3’端被-ddC封闭来阻止不需要的连接产物。本领域已知的其它封闭部分也可以被使用，例如，NH_2部分。

[0097] 根据一种或更多种可选择的实施方式，3’端也可以被本领域已知的可检测部分标记，例如，指示物，诸如Cy3、Cy5、Alexa488、Alexa647、FITC等能够被使用。

[0098] 根据一种或更多种实施方式，衔接子探针包含可检测内部标记。

[0099] 根据一种或更多种实施方式，衔接子探针的5’端被预腺苷酸化，以便连接能够在ATP的不存在下进行，减少不需要的连接产物。预腺苷酸化可以使用已知的方法酶促或化学地进行。

[0100] 根据另一种实施方式，5’残基是RNA而不是DNA以减少连接偏差和增加连接效率。

[0101] 还根据另一种实施方式，可选择的核酸残基，例如锁核酸(LNA)或肽核酸(PNA)，可以在不同位置上被取代来增加结合特异性。本领域普通技术人员可以理解，LNA可以显著增强核酸探针的结合特性。LNA碱基可以被取代进入鉴别探针以及衔接子和/或共同探针的识别序列。LNA碱基的取代增加了单独探针的整体熔化温度。这样的策略能够被用于：1)为区分密切相关的miRNA增加探针特异性，2)匹配探针熔化温度来最小化反应效率中的变异性，以及3)通过增加探针结合强度增加整体反应效率。肽核酸能够被相似地使用。

[0102] 本发明的衔接子探针序列能够单独或与感兴趣的miRNA联合被设计成消除或促进二级结构的形成。这样的二级结构能够用于适当地减少或增加连接效率。典型的衔接子探针序列在表1中提供。

[0103] 根据一种或更多种实施方式，衔接子探针在3’端包含生物素或链霉亲和素。

[0104] 根据一种或更多种实施方式，衔接子探针在3’端结合到磁珠。

[0105] 根据一种或更多种实施方式，其中衔接子探针包括RNA核苷酸。

[0106] 共同探针设计．根据本发明的一种或更多种实施方式，共同探针是商业合成的、HPLC或PAGE纯化的DNA寡核苷酸。根据一种实施方式，通常地，在每一个探针组中利用单一共同探针。典型的共同探针长度约19nt，序列与衔接子探针互补，以及在5’端具有可检测部分，例如5’-Cy5，以及还包含3’-OH端。在可选择的实施方式中，本发明的共同探针的5’端能够用其他可检测部分标记，例如Cy3、Alexa488、Alexa647、FITC、荧光素等。

[0107] 根据一种或更多种实施方式，共同探针包含10-30个DNA核苷酸长度，以及与衔接子探针序列互补，以及还包含3’-OH。

[0108] 根据一种或更多种实施方式，共同探针包含可检测内部标记。

[0109] 根据另一种实施方式，可选择的核酸残基例如锁核酸或肽核酸，能够在不同位置被取代来增加结合特异性。

[0110] 本领域普通技术人员可以理解，共同探针序列能够单独或与miRNA目标联合被设计成消除或促进二级结构的形成。这样的二级结构能够用于适当地减少或增加连接效率。典型的共同探针序列在表1中提供。

[0111] 鉴别探针设计．被用于本发明的方法的鉴别探针是商业合成的、HPLC或PAGE纯化的DNA寡核苷酸。被检测的每一个miRNA要求至少一种鉴别探针。根据一种实施方式，约5-100种鉴别探针被用于每一个探针组。每一个鉴别探针在其5’端包含识别序列，其与被检测的感兴趣的目标miRNA互补，以及在3’端还包含可变长度编码序列(VLCS)，其能够用于通过其独特的长度鉴定杂交探针。在一种实施方式中，识别序列与微RNA目标的长度

完全相同，并且与微 RNA 序列完全互补。

[0112] 在其它实施方式中，识别序列可从完全互补变化，例如，在另一实施方式中，识别序列的长度短于微 RNA 目标，而保留完全的互补性。在另一实施方式中，识别序列的长度长于微 RNA 目标，而保留完全的互补性并且延长到衔接子序列。

[0113] 根据一种实施方式，鉴别探针包含 5’识别序列，该序列具有具有与感兴趣的特异性 miRNA 的反义互补性的 DNA 寡核苷酸序列，并且具有 3’可变长度编码序列 (VLCS)，其具有至少 5 到约 200 个核苷酸的长度。

[0114] 在一种或更多种实施方式中，鉴别探针上的 VLCS 可以在长度 5-150nt 变化，然而，根据其它实施方式，该长度可以做成更长或更短来使得能够不同的鉴定。较长的鉴别探针序列可使用已知克隆技术产生，来创造 100-100,000bp 之间的探针。VLCS 标签之间的最小长度差异由多路的期望水平和用于鉴定它们的下游大小鉴别技术的大小分辨率 (sizing resolution) 和大小动态范围确定。在使用带有单核苷酸分辨率的检测平台，例如聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳、或单分子游离液流体动力学分离的实施方式中，VLCS 标签通常由 3-10 个核苷酸分离。在使用琼脂糖凝胶电泳的实施方式中，VLCS 标签通常由 10-100 个核苷酸分离。

[0115] 根据一种实施方式，鉴别探针的 3’端被 -ddC 封闭来阻止不需要的连接产物。在可选择的实施方式中，其它封闭部分也可被使用，例如，诸如 NH_2。根据再一种实施方式，鉴别探针的 3’端能够用可检测部分标记，例如，诸如 Cy3、Cy5、Alexa488、Alexa647、FITC 等。

[0116] 根据一种实施方式，鉴别探针的 5’端被预腺苷酸化，以便能够在 ATP 的不存在下进行，减少不需要的连接产物。预腺苷酸化可以使用本领域任何已知的方法，包括酶促或化学地进行。

[0117] 根据另一种实施方式，鉴别探针包含可选择的核酸残基，例如锁核酸或肽核酸，能够在不同位置被取代来增加结合特异性。

[0118] 本领域普通技术人员可以理解，每一个鉴别探针包含 2 区域，识别序列和 VLCS 标签。根据一种实施方式，识别序列通常与感兴趣的目标 miRNA 序列完全互补。根据其它实施方式，识别序列可以从具有与感兴趣的目标 miRNA 序列的完全互补序列变化。

[0119] 根据一些实施方式，识别探针包含可检测内部标记。

[0120] 根据一种实施方式，VLCS 标签通常包括在宿主基因组内没有发现的序列，来防止不需要的与背景 RNA/DNA 分子的杂交。在一种或更多种可选择的实施方式中，鉴别探针序列能够单独或与 miRNA 目标联合被设计成消除或促进二级结构的形成。这样的二级结构能够用于适当地减少或增加连接效率。一些鉴别探针序列的例子在表 1 中给出。

[0121] 如本文描述的方法使用的，感兴趣的目标 RNA 使用大小鉴别方法被分析和鉴定。大小鉴别方法的例子包括，但不限于，凝胶电泳、毛细管电泳和 SML-FSHS。

[0122] Ligo-miR EZ 方法．图 1 显示了本发明的总体 Ligo-miR TM 分析方法的图解。根据一种实施方式，在第一连接步骤中，方法以获得约 0.1-5μL 的总 RNA 样品开始，并且加入足够量的腺苷酸化的衔接子探针 (50-1000nM)、连接酶 (50-500 单位)、连接酶缓冲液 (0.1-5μL) 和水。本领域普通技术人员可以理解，可被用于本发明的方法的连接酶包括，例如，T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2 截短型、T4RNA 连接酶 2 截短型 KQ、T4RNA 连接酶 2 截短型 K227Q、耐热 5’App DNA/RNA 连接酶等。在某一实施方式中，添加剂例如 PEG(聚乙二

醇)(0-40%)和DMSO(二甲基亚砜)(0-30%),能够被添加来增加连接效率。最终反应体积为约10μL。然后混合物在25℃孵育0.25到48小时,并且之后65℃热变性步骤约1-60分钟,优选约1、2、5、10、15、20、30、直至60分钟。在一些实施方式中,孵育步骤还能够在较低温度例如4℃,或较高温度例如65℃进行,来减少连接偏差和增加连接效率。

[0123] 根据一种实施方式,在第二连接步骤中,约5μL的前述反应混合物被获得,并且足够量的共同探针(10-1000nM)、鉴别探针(10-1000nM)、连接酶(50-500单位)、连接酶缓冲液(0.1-5μL)和水被加入。本领域普通技术人员可以理解,对于第二步骤,可被使用的酶包括,例如T4 DNA连接酶、9° N DNA连接酶、Ampligase、T4RNA连接酶2、大肠杆菌DNA连接酶、Taq连接酶等。在一些实施方式中,添加剂,例如PEG(聚乙二醇)(0-40%)和DMSO(二甲基亚砜)(0-30%),也能够被加入来增加连接效率。最终反应体积为约10μL。之后对反应进行热循环,95℃(0.5-5分钟保持)和45℃(1-100分钟保持)1-100个循环,取决于要求多少扩增。

[0124] 热循环之后,根据一种实施方式,之后对样品进行PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)来分离杂交产物。通常,5μL样品被与凝胶上样缓冲液混合,并且在300V在变性的15%TBE-尿素聚丙烯酰胺凝胶上分析50分钟,使能够分离微RNA反应产物。在可选择的实施方式中,琼脂糖凝胶电泳也可以被用于分离杂交产物。分离的凝胶产物在Typhoon Variable Mode Imager(GE)上被成像。图2提供了典型的凝胶图像。图3显示了滴定miRNA目标的6路分析的典型凝胶图像。在可选择的实施方式中,基于CCD或基于胶片的成像仪也能够被用于获得凝胶图像。图像分析被用于基于凝胶带的位置和整合的带强度鉴定微RNA表达水平。图4显示了从使用图3的miR-21的图像分析获得的典型的滴定曲线。

[0125] 根据另一种实施方式,热循环的样品能够使用毛细管电泳代替平板凝胶电泳被分析。得到的电泳图之后能够基于峰位置和整合的峰强度被分析来获得微RNA的表达水平。

[0126] 表1:衔接子探针、共同探针、和鉴别探针的序列

[0127]

探针名称	长度	5' 修饰	3'修饰	序列 5'-> 3'
rA-1 衔接子探针	18	phos	ddC	5'- /5Phos/rAC TGT AGG CAC CAT CAA T/3ddC/ -3' (SEQ ID NO:1)

[0128]

rA-2 衔接子探针	18	phos	生物素-TEG	5'- /5Phos/rAC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3 生物素 TEG/ -3'(SEQ ID NO:2)
rA-3 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/rAC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/ -3'(SEQ ID NO:3)
rG 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/rGC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/ -3'(SEQ ID NO:4)
rU 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/rUC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/ -3'(SEQ ID NO:5)
rC 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/rCC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/ -3'(SEQ ID NO:6)
dA-1 衔接子探针	19	phos	ddC	5'- /5Phos/AC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3ddC/ -3'(SEQ ID NO:7)
dA-2 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/AC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/ -3'(SEQ ID NO:8)
dG 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/GC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/-3'(SEQ ID NO:9)
dT 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/TC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/-3'(SEQ ID NO:10)
dC 衔接子探针	19	phos	Cy5	5'- /5Phos/CC TGT AGG CAC CAT CAA TC/3Cy5Sp/-3'(SEQ ID NO:11)
共同探针	19	Cy5	-	5'- /5Cy5/GA TTG ATG GTG CCT ACA GT -3'(SEQ ID NO:12)
miR-34a 鉴别探针	50	phos	-	5'- /5Phos/AC AAC CAG CTA AGA CAC TGC CAA TCC TGT TAC CAT CGT AGG CAC CTG AAA -3'(SEQ ID NO:13)
let-7a 鉴别探针	57	phos	FAM	5'- /5Phos/AA CTA TAC AAC CTA CTA CCT CAA TCC TGT TAC CAG TGG CTG CTG CCA GTG GCG ATA A/36-FAM/ -3'(SEQ ID NO:14)
miR-29b 鉴别探针	64	phos	-	5'- /5Phos/AA CAC TGA TTT CAA ATG GTG CTA ATC CTG TTA CCA GTG GCT GCT GCC ATC GTA GGC ACC TGA AA -3'(SEQ ID NO:15)
miR-16 鉴别探针	72	phos	-	5'- /5Phos/CG CCA ATA TTT ACG TGC TGC TAA TCC TGT TAC CAG TGG CTG CTG CCA GTG GCG ATA AGT CGT GTC TTA CCG G -3'(SEQ ID NO:16)
miR-26a 鉴别探针	82	phos	-	5'- /5Phos/AG CCT ATC CTG GAT TAC TTG AAA TCC TGT TAC CAG TGG CTG CTG CCA GTG GCG ATA AGT CGT GTC ATC GTA GGC ACC TGA AA -3'(SEQ ID NO:17)
miR-21 鉴别探针	92	phos	-	5'- /5Phos/TC AAC ATC AGT CTG ATA AGC TAA TCC TGT TAC CAG TGG CTG CTG CCA GTG GCG ATA AGT CGT GTC TTA CCG GGT TGG ACT CAA GAC GAT AGT -3'(SEQ ID NO:18)

[0129] Ligo-miR HD方法. 对于本发明的HD方法,在一种实施方式中,第一和第二连接反应如上面对Ligo-miR TM EZ实施方式详述的进行。

[0130] 杂交产物的分离和分析使用单分子游离液流体动力学分离 (SML-FSHS) 来进行。在一种实施方式中，SML-FSHS 使用 PicoSep 设备 (Circulomics) 在 100psi 进行，其装有 2μm 内径、75cm 长的熔融硅石微细管，以 TE 缓冲液作为上样和洗脱缓冲液。在一种可选择的实施方式中，1μm 内径微细管能够被用于更高的大小分辨率。在某一其它实施方式中，变性缓冲液条件能够被使用。

[0131] 根据又一实施方式，微流体装置能够被使用代替微细管来进行 SML-FSHS 分析。SML-FSHS 微流体装置的示意图显示在图 5 中。该装置含有宽度和深度为 1μm 和长度为 1m 的蜿蜒状的微流体通道。

[0132] 所得的 SML-FSHS 色谱图之后能被基于峰位置和单分子计数分析来获得微 RNA 表达水平，峰位置与大小关联，单分子计数与数量关联。图 6 提供了代表性的色谱图。

[0133] Ligo-miR Bead 方法 . 图 7 显示了本发明的完整的方法的实施方式的图解。通过使用在本领域中已知的标准的链霉亲和素 - 生物素的结合化学反应，衔接子探针通过将 3'- 生物素标记的衔接子探针与链霉亲和素包被的磁珠共轭来偶合到磁珠。对于第一连接步骤，约 1.5μL 的未加工的样品被获得，并且偶合衔接子探针的磁珠被添加，一起加入足够量的连接酶、连接酶缓冲液、和水。未加工的样品可包括血液、血清、细胞裂解液等。普通技术人员可以理解，可被用于本发明的方法的连接酶包括，例如，T4RNA 连接酶 1、T4RNA 连接酶 2 截短型、T4RNA 连接酶 2 截短型 KQ、T4RNA 连接酶 2 截短型 K227Q、耐热 5'App DNA/RNA 连接酶，等。在一些实施方式中，添加剂，例如 PEG(聚乙二醇) 和 DMSO(二甲基亚砜)，能够被添加来增加连接效率。最终反应体积为约 10μL。在 25℃孵育约 1 到 4 个小时，之后 65℃热变性步骤约 20 分钟。在可选择的实施方式中，孵育溶液也能够被在较低温度例如 4℃，或较高温度例如 65℃进行，来减少连接偏差和增加连接效率。根据一种或更多种实施方式，本方法连接每个 miRNA 上存在的 3'-OH 到衔接子探针偶合的珠上的 5'-App，来创造拴系到珠表面的 miRNA 模板。

[0134] 珠之后被磁性分离、洗涤、重悬在缓冲液中。对于第二连接步骤，约 5μL 的重悬珠混合液被获得，并且添加共同探针、鉴别探针、连接酶、连接酶缓冲液、和水。如上面讨论的其它实施方式，可以被用于本发明方法的连接酶包括 T4DNA 连接酶、9° N DNA 连接酶、Ampligase、T4RNA 连接酶 2、大肠杆菌 DNA 连接酶、Taq 连接酶等。在可选择的实施方式中，添加剂，例如 PEG(聚乙二醇) 和 DMSO(二甲基亚砜)，也能够被加入来增加连接效率。最终反应体积为约 10μL。

[0135] 之后上述产物进行热循环，95℃ (0.5-5 分钟保持) 和 45℃ (1-100 分钟保持)1-100 个循环，这取决于要求多少扩增。

[0136] 分离的样品之后使用 PAGE 分离。根据一种或更多种实施方式，约 5μL 样品被与凝胶上样缓冲液混合，并且在 300V 在变性的 15% TBE- 尿素聚丙烯酰胺凝胶上分析 50 分钟，使得能够分离微 RNA 反应产物。可选择地，在一些实施方式中，琼脂糖凝胶电泳也可以被使用。分离的凝胶在 Typhoon Variable Mode Imager(GE) 上成像。可选择地，取决于使用的可检测部分，基于 CCD 或基于胶片的成像仪也能够被用于获得凝胶图像。图像分析被用于基于凝胶带的位置和整合的带强度鉴定微 RNA 表达水平。

[0137] 根据另一种实施方式，样品还能够使用毛细管电泳被分析，或在一些实施方式中，样品能够使用 SML-FSHS 被分析。

[0138] 本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请、和专利，通过引用特此并入，至如同每一篇参考文献都独自地和具体地指示为通过引用并入并且在本文中全文阐述的相同程度。

[0139] 在描述发明的上下文中（尤其是在下面权利要求的上下文中），术语“一 (a)”和“一 (an)”和“该 (the)”以及类似的指代的使用被解释为覆盖单数和复数的，除非本文另有说明或上下文明显矛盾。术语“包含 (comprising)”、“具有 (having)”、“包括 (including)”、和“含有 (containing)”被解释为开放式术语（例如，意思“包括，但不限于，”）除非另有解释。本文值的范围的列举仅旨在用作单独提及落在该范围内的每一个单独的值的速记方法，除非本文另有说明，并且每一个单独值被并入说明书中，如同它在本文被单独列举。本文描述的所有方法能够以任意合适的顺序被进行，除非本文另有说明或上下文明显矛盾。任意和所有例子的使用，或本文提供的示例性语言（例如，“例如”）仅旨在更好的阐述发明，并不构成本发明的范围的限制，除非另有声明。说明书中的措辞不应该被解释为指示任何未要求保护的元素对发明的实施是必要的。

[0140] 本发明的优选实施方式在本文被描述，包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读了前面的描述后，这些优选实施方式的变化形式对于本领域普通技术人员可变得明显。发明人预计熟练的技术人员适当地利用这样的变化形式，以及发明人希望本发明以不同于本文具体描述的被实施。因此，本发明包括本文附加的权利要求书中记载的主题的所有的修饰和等价形式，如适用法律所允许的。此外，上面描述的元素以其所有可能的变化形式的任意组合被本发明涵盖，除非本文另有说明或上下文明显矛盾。

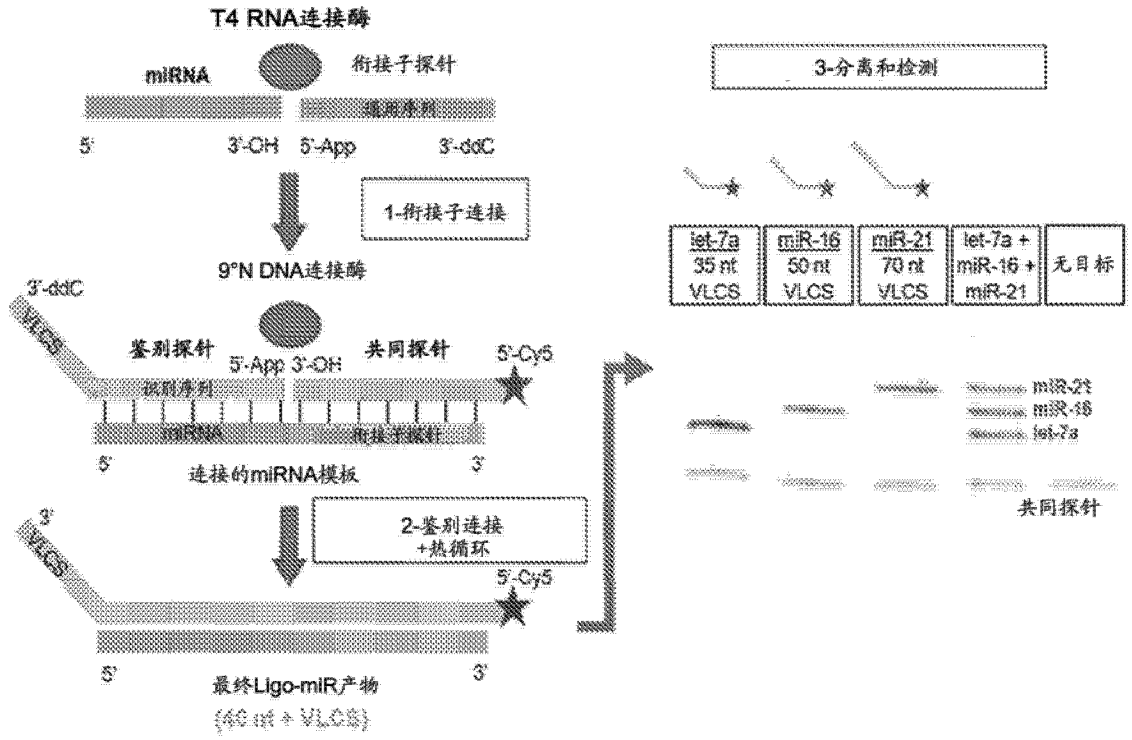

T4 RNA连接酶
miRNA
衔接子探针
通用序列
5'
3'-OH
5'-App
3'-ddC
1-衔接子连接
9°N DNA连接酶
3'-ddC
VLCS
鉴别探针
5'-App 3'-OH
共同探针
5'-Cy5
识别序列
miRNA
衔接子探针
5'
3'
连接的miRNA模板
2-鉴别连接
+热循环
最终Ligo-miR产物
(46 nt + VLCS)
3-分离和检测
let-7a
35 nt
VLCS
miR-16
50 nt
VLCS
miR-21
70 nt
VLCS
let-7a +
miR-16 +
miR-21
无目标
共同探针

图 1

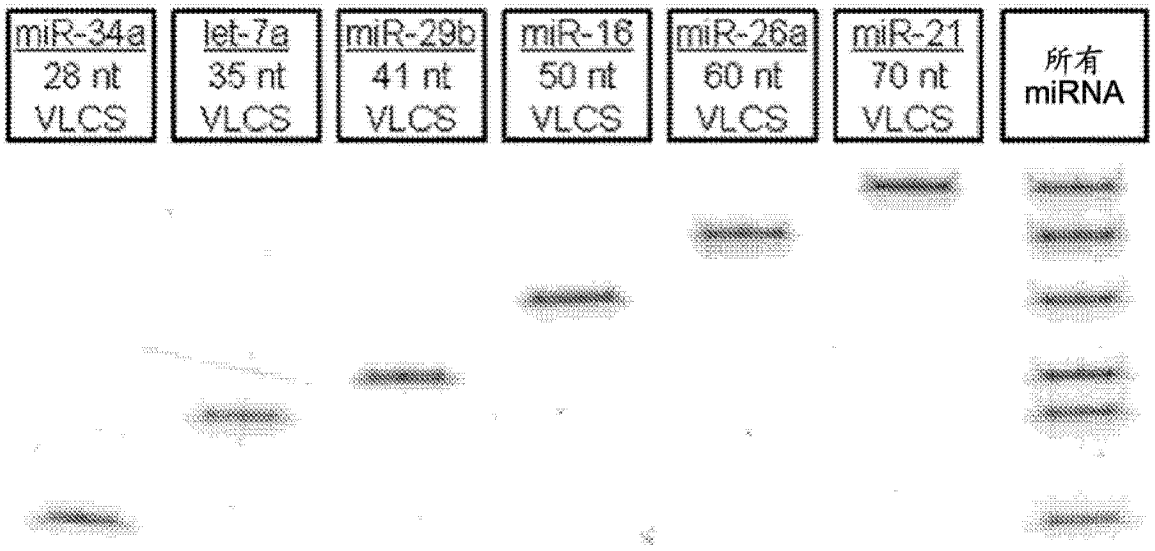

miR-34a
28 nt
VLCS
let-7a
35 nt
VLCS
miR-29b
41 nt
VLCS
miR-16
50 nt
VLCS
miR-26a
60 nt
VLCS
miR-21
70 nt
VLCS
所有
miRNA

图 2

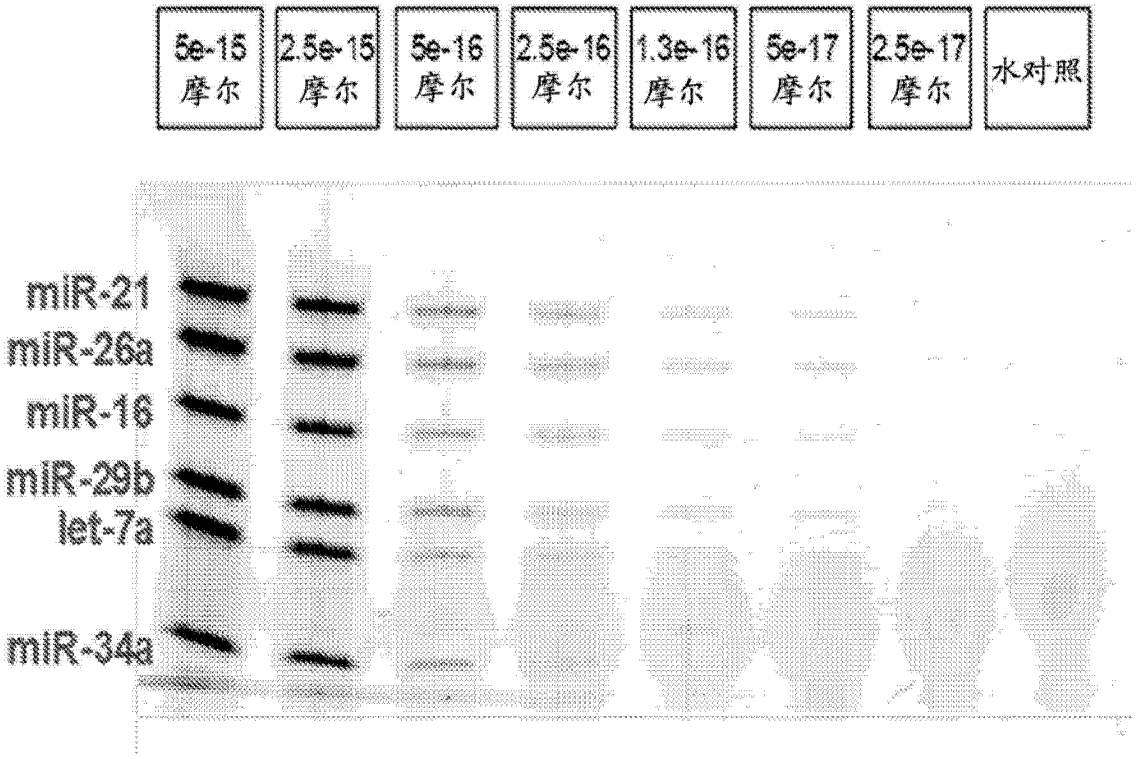

5e-15 摩尔
2.5e-15 摩尔
5e-16 摩尔
2.5e-16 摩尔
1.3e-16 摩尔
5e-17 摩尔
2.5e-17 摩尔
水对照
miR-21
miR-26a
miR-16
miR-29b
let-7a
miR-34a

图 3

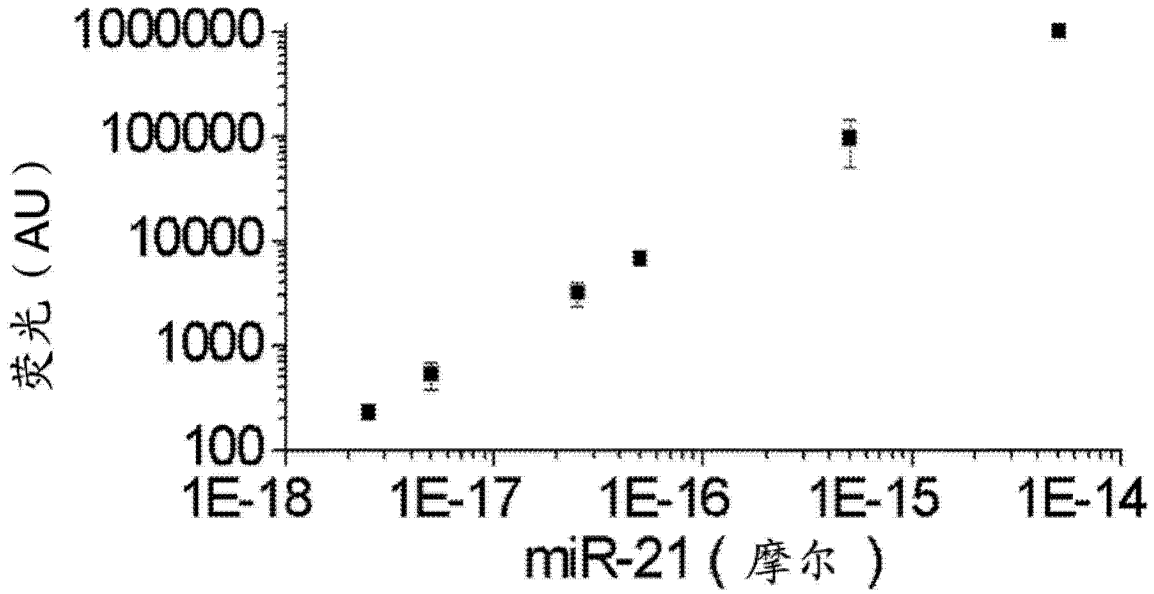

1000000
100000
10000
1000
100
荧光（AU）
1E-18
1E-17
1E-16
1E-15
1E-14
miR-21（摩尔）

图 4

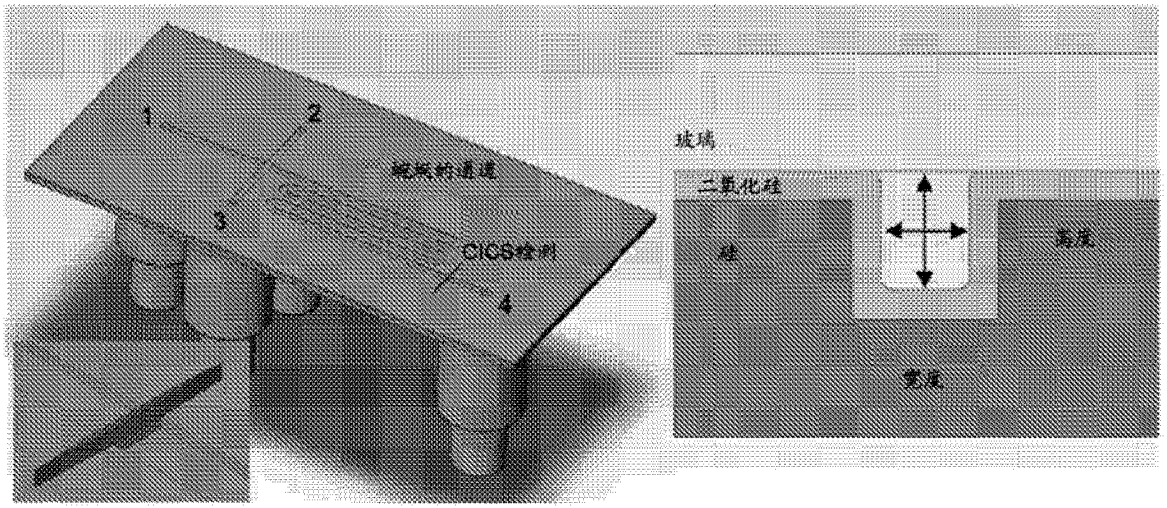

1
2
3
4
CICS检测
玻璃
二氧化硅
硅
硅基

图 5

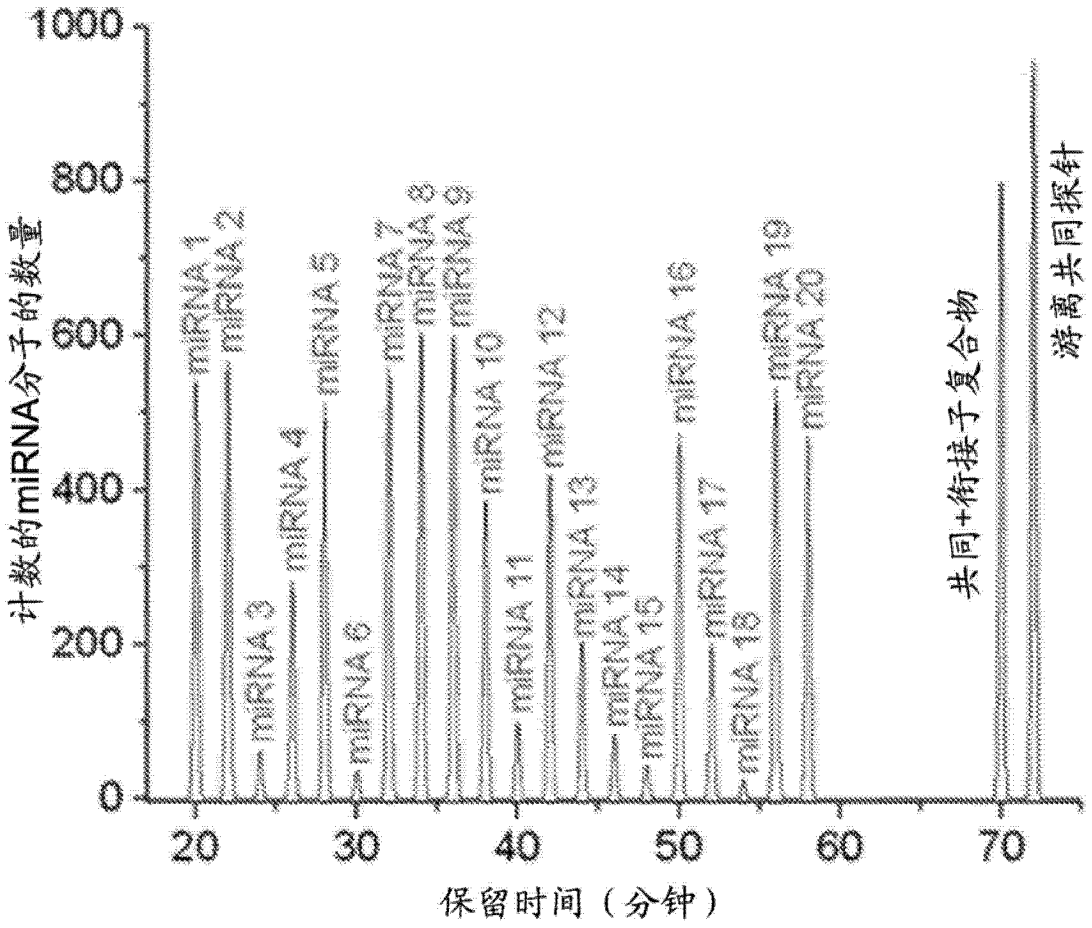

计数的miRNA分子的数量
保留时间（分钟）
miRNA 1
miRNA 2
miRNA 3
miRNA 4
miRNA 5
miRNA 6
miRNA 7
miRNA 8
miRNA 9
miRNA 10
miRNA 11
miRNA 12
miRNA 13
miRNA 14
miRNA 15
miRNA 16
miRNA 17
miRNA 18
miRNA 19
miRNA 20
共同+衔接子复合物
游离共同探针

图 6

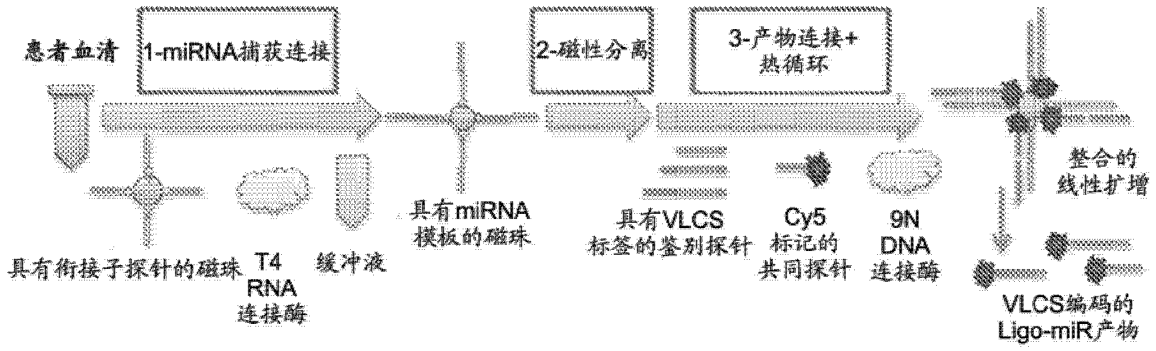

患者血清
1-miRNA捕获连接
2-磁性分离
3-产物连接+
热循环
具有衔接子探针的磁珠
T4
RNA
连接酶
缓冲液
具有miRNA
模板的磁珠
具有VLCS
标签的鉴别探针
Cy5
标记的
共同探针
9N
DNA
连接酶
整合的
线性扩增
VLCS编码的
Ligo-miR产物

图 7

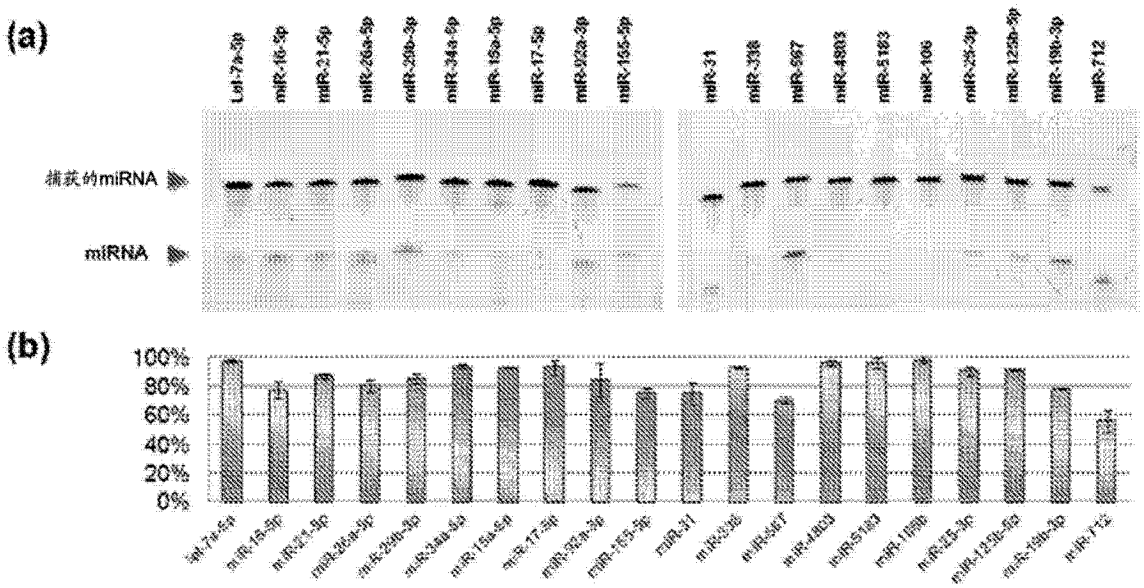

(a)
捕获的miRNA
miRNA
(b)
100%
80%
60%
40%
20%
0%

图 8