



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112080552 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202010975612.8

(22) 申请日 2020.09.16

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112080552 A

(43) 申请公布日 2020.12.15

(73) 专利权人 清华大学深圳国际研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区丽水路  
2279号清华大学深圳国际研究生院A  
栋

(72) 发明人 蒋宇扬 谭英 陈俊粤 谭春燕

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 闫书宁

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12Q 1/682 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 109097446 A, 2018.12.28

CN 110592187 A, 2019.12.20

US 2014057256 A1, 2014.02.27

CN 109477105 A, 2019.03.15

CN 104789667 A, 2015.07.22

Junyue Chen等. Zeptomolar-level one-pot simultaneous detection of multiple colorectal cancer microRNAs by cascade isothermal amplification.《Biosensors and Bioelectronics》.2020,第169卷文献号112631.

Deanna N. Edwards等. Intramolecular Telomeric GPolymerases, Revealing their Potential to Lead to -Quadruplexes Dramatically Inhibit DNA Synthesis by Replicative and Translesion Genetic Change.《PLOS ONE》.2014,第9卷(第1期),文献号e80664.

审查员 毛颖

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种基于G四链体分子信标双酶级联等温扩增的检测目的miRNA的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于G四链体分子信标双酶级联等温扩增的检测目的miRNA的方法。该方法包括如下步骤：取含有miRNA、反应缓冲液、Bsu DNA聚合酶、Lambda核酸外切酶和G4MB的反应体系，孵育；检测荧光强度；根据荧光强度判断miRNA中是否含有目的miRNA或目的miRNA的含量。G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3；DNA片段2的核苷酸序列与目的miRNA的核苷酸序列反向互补；G4MB的一端修饰荧光标记和磷酸基团，另一端修饰猝灭基团。实验证明，本发明提供的方法可以同时检测多种目的miRNA，且准确率高、灵敏度高且特异性好。本发明具有重要的应用价值。

CN 112080552 B

1. 一种检测目的miRNA的方法,包括如下步骤:

(1) 取含有miRNA、反应缓冲液、DNA聚合酶、核酸外切酶和G4MB的反应体系,孵育;

(2) 完成步骤(1)后,检测荧光强度;

根据荧光强度判断miRNA中是否含有目的miRNA或目的miRNA的含量;

G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3;

DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列1组成;富G序列1为GGGACGGG;

DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补;

DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列2组成;富G序列2为GTGGAGGG;

DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构;

所述DNA聚合酶作用于与G4MB的3'末端结合的引物,将引物进行延伸,形成双链DNA;

所述核酸外切酶作用于双链DNA,逐步切去单核苷酸,且不能从DNA的切刻或缺口处起始消化;

G4MB的5'端具有磷酸基团,3'端具有引物结合位置,且以打开的G4MB为模板,通过引物和DNA聚合酶引发合成双链杂合结构;

所述DNA聚合酶为Bsu DNA聚合酶;

所述核酸外切酶为Lambda核酸外切酶;

所述方法用于非疾病的诊断与治疗。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述反应体系还含有核糖核酸酶抑制剂。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:

所述反应缓冲液为含40-60mM NaCl、15-25mM MgCl<sub>2</sub>、15-25mM KCl、130-170mM NH<sub>4</sub>Cl和0.8-1.2mM DDT的pH7.8-8.0、15-25mM Tris-HCl缓冲液。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,孵育为35-39℃孵育20min-3h。

5. 如权利要求1至4任一所述的方法,其特征在于:当检测N个目的miRNA时,需要加入N个G4MB且各个G4MB的荧光标记完全不同;N为1以上的自然数。

6. DNA聚合酶、核酸外切酶、G4MB和反应缓冲液在检测目的miRNA中的应用;

G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3;

DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列1组成;富G序列1为GGGACGGG;

DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补;

DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列2组成;富G序列2为GTGGAGGG;

DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构;

所述反应缓冲液为含40-60mM NaCl、15-25mM MgCl<sub>2</sub>、15-25mM KCl、130-170mM NH<sub>4</sub>Cl和0.8-1.2mM DDT的pH7.8-8.0、15-25mM Tris-HCl缓冲液;

G4MB的5'端具有磷酸基团,3'端具有引物结合位置,且以打开的G4MB为模板,通过引物和DNA聚合酶引发合成双链杂合结构;

所述DNA聚合酶为Bsu DNA聚合酶;

所述核酸外切酶为Lambda核酸外切酶;

所述应用用于非疾病的诊断与治疗。

## 一种基于G四链体分子信标双酶级联等温扩增的检测目的miRNA的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种基于G四链体分子信标双酶级联等温扩增的检测目的miRNA的方法。

### 背景技术

[0002] microRNAs (miRNA) 是一类短的非编码RNA (约18-23nt),在肿瘤的诊断、治疗和预后检测中发挥着重要的作用。miRNA是基因表达的转录后调节因子,调控约30%的已知蛋白编码基因的表达,在细胞增殖、迁移和凋亡等许多基本的细胞过程中发挥关键作用。成熟的miRNA存在于血清、粪便等各种体液中。临床证据表明,miRNA表达含量的异常往往与癌症的发病、癌细胞的侵袭、病灶的转移等有关,例如,miR-21 (miR-21-5p)、miR-92a (miR-92a-3p)、miR-31 (miR-31-5p) 等致癌miRNA经常在结直肠癌发病过程中表现为上调,已被初步用于结直肠癌的早期检测。

[0003] 早期患者血液中的miRNA的浓度极低,同时miRNA具有体积小、家族成员间序列同源性高、总RNA样本丰度低、易降解等特点,因而很难准确地检测miRNA,阻碍其在临床检测中的发展。RT-PCR由于其高敏感性和易于实施,至今仍是最常用的miRNA检测方法。但是,RT-PCR仍然有关键的限制,包括热循环依赖性高、仪器要求高、样品制备复杂,在实际应用中,其选择性和简单性仍不理想。因此,快速、方便、灵敏、特异的miRNA检测方法仍有很大的发展需求。

[0004] 基于等温放大的新策略(如基于级联酶扩增策略)比传统的基于PCR的检测具有优势。但大多数级联酶扩增策略通常需要几个单独的步骤,以适应多种酶参与复杂的反应环境所需的不同反应条件。此外,单个miRNA通常与多种疾病相关,因此对单个miRNA的检测和分析不能提供可靠的早期癌症诊断和治疗监测所需的明确结果。鉴于检测多个miRNA所需的并行分析方案实施的复杂性,迄今为止开发的扩增方案很少能够在一个体系内同时实现对多个miRNA的检测。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测目的miRNA的方法。

[0006] 本发明首先保护一种检测目的miRNA的方法,可包括如下步骤:

[0007] (1) 取含有miRNA、反应缓冲液、DNA聚合酶、核酸外切酶和G4MB的反应体系,孵育;

[0008] (2) 完成步骤(1)后,检测荧光强度;

[0009] 根据荧光强度判断miRNA中是否含有目的miRNA或目的miRNA的含量;

[0010] G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3;

[0011] DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列(如(GGGACGGG))组成;

[0012] DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补;

[0013] DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列(如GTGGAGGG)组成;

- [0014] DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构；
- [0015] 所述DNA聚合酶作用于与G4MB的3'末端结合的引物，将引物进行延伸，形成双链DNA；
- [0016] 所述核酸外切酶作用于双链DNA，逐步切去单核苷酸，且不能从DNA的切刻或缺口处起始消化。
- [0017] 上述方法中，所述G4MB的5'末端可修饰磷酸基团。
- [0018] 上述方法中，所述G4MB的3'末端可修饰淬灭基团。
- [0019] G4MB是一个发夹结构探针，拥有一个与miRNA反向互补的环状序列和两端的富G的茎序列。在缺乏靶标miRNA的情况下，富G的茎自组装成分子内的G四链体结构，荧光基团在淬灭基团附近被有效地淬灭。5'末端修饰的磷酸基团是后续形成的DNA双链中该链被Lambda核酸外切酶剪切的关键。
- [0020] 上述方法中，所述反应体系具体可由miRNA、反应缓冲液、DNA聚合酶、核酸外切酶和G4MB组成。
- [0021] 上述方法中，所述反应体系还含有核糖核酸酶抑制剂。
- [0022] 上述方法中，所述反应体系具体可由miRNA、反应缓冲液、DNA聚合酶、核酸外切酶、G4MB和核糖核酸酶抑制剂组成。
- [0023] 上述任一所述的方法中，所述DNA聚合酶可为Bsu DNA聚合酶。
- [0024] 上述任一所述的方法中，所述核酸外切酶可为Lambda核酸外切酶。
- [0025] 上述任一所述的方法中，所述反应缓冲液可为含40-60mM NaCl、15-25mM MgCl<sub>2</sub>、15-25mM KCl、130-170mM NH<sub>4</sub>Cl和0.8-1.2mM DDT的pH7.8-8.0、15-25mM Tris-HCl缓冲液。
- [0026] 上述任一所述的方法中，所述反应体系具体可由浓度为80-120nM的G4MB、浓度为20-30ng/100uL的miRNA、4-6U/100uL Bsu DNA聚合酶、8-12U/100uL Lambda核酸外切酶、35-45U/100uL核糖核酸酶抑制剂和反应缓冲液组成。
- [0027] 所述步骤(1)中，孵育为35-39℃孵育20min-3h。
- [0028] 所述步骤(2)中，荧光强度可采用酶标仪测定。
- [0029] 上述方法中，当检测N个目的miRNA时，需要加入N个G4MB且各个G4MB的荧光标记完全不同；N为1以上的自然数。由于各个G4MB的荧光标记完全不同，所以通过检测不同激发波长和发射波长的荧光强度可以判断各个目的miRNA。
- [0030] 本发明还保护一种用于检测目的miRNA的试剂盒，可包括DNA聚合酶、核酸外切酶和G4MB；
- [0031] G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3；
- [0032] DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列(如GGGACGGG)组成；
- [0033] DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补；
- [0034] DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列(如GTGGAGGG)组成；
- [0035] DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构。
- [0036] 所述G4MB的5'末端可修饰磷酸基团。
- [0037] 所述G4MB的3'末端可修饰淬灭基团。
- [0038] 所述用于检测目的miRNA的试剂盒具体可由DNA聚合酶、核酸外切酶和G4MB组成。
- [0039] 上述用于检测目的miRNA的试剂盒还可包括反应缓冲液；所述反应缓冲液可为含

40-60mM NaCl、15-25mM MgCl<sub>2</sub>、15-25mM KCl、130-170mM NH<sub>4</sub>Cl和0.8-1.2mM DDT的pH7.8-8.0、15-25mM Tris-HCl缓冲液。

[0040] 本发明还保护DNA聚合酶、核酸外切酶、G4MB和反应缓冲液在检测目的miRNA中的应用。

[0041] 上述应用中,G4MB从5'末端至3'末端依次包括DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3;

[0042] DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列组成;

[0043] DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补;

[0044] DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列组成;

[0045] DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构。

[0046] 上述应用中,所述反应缓冲液可为含40-60mM NaCl、15-25mM MgCl<sub>2</sub>、15-25mM KCl、130-170mM NH<sub>4</sub>Cl和0.8-1.2mM DDT的pH7.8-8.0、15-25mM Tris-HCl缓冲液。

[0047] 上述任一所述DNA聚合酶具体可为Bsu DNA聚合酶。

[0048] 上述任一所述核酸外切酶可为Lambda核酸外切酶。

[0049] 上述任一所述G4MB从5'末端至3'末端具体可由所述DNA片段1、所述DNA片段2和所述DNA片段3组成。

[0050] 实验证明,本发明提供的方法可以同时检测多种目的miRNA,且准确率高、灵敏度高且特异性好。本发明具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0051] 图1为采用G4MB双酶级联等温扩增检测miRNA的原理示意图。

[0052] 图2为在不同条件下miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0053] 图3为灵敏度分析。

[0054] 图4为特异性分析。

[0055] 图5为采用本发明的方法检测多种miRNA的结果图。

[0056] 图6为本发明的方法和RT-qPCR方法对HCT-116细胞和FHC细胞中多种miRNA的表达分析。

[0057] 图7为本发明的方法和RT-qPCR方法对健康人和结直肠癌病人血清样本中多种miRNA的表达分析。

## 具体实施方式

[0058] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0059] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0060] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0061] 下述实施例中,总miRNA的提取采用MiRcute miRNA分离试剂盒(天根公司)进行。RT-qPCR采用Mir-X™miRNA第一链合成试剂盒(Takara)和2×SYBR Green qPCR Master混合

试剂盒 (Bimake) 进行。使用恒温金属浴 (中国天健生化技术 (北京) 有限公司) 进行双酶级联等温扩增反应。使用微孔板读数器 (Tecan Infinite M1000 Pro, 瑞士) 在 96 孔微孔板 (Costar, 美国) 上进行读数。采用 NanoDrop 2000c 分光光度计 (德国威明顿) 直接定量提取的总 miRNA 浓度。miRNA 的逆转录在 Veriti™ 96 孔热循环仪 (Applied Biosystems™, 新加坡) 中进行。实时荧光定量 PCR 在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 系统上运行 (Applied 生物系统公司)。

[0062] Lambda 核酸外切酶和 Bsu DNA 聚合酶 (大片段) 均为 New England Biolabs 公司的产品。RNase 抑制剂 (RRI)、dNTP 和焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水均为生工 (中国上海) 公司的产品。

[0063] 人血清由深圳市第二人民医院 (中国深圳) 提供。人血清的提供者均知情同意。

[0064] 下述实施例中, 所有实验均使用 DEPC 处理过的水来避免 RNA 降解。所有样品和试剂均用反应缓冲液稀释。反应缓冲液: 含 50mM NaCl、20mM MgCl<sub>2</sub>、20mM KCl、150mM NH<sub>4</sub>Cl 和 1mM DDT 的 pH7.9、20mM Tris-HCl 缓冲液。

[0065] 下述实施例中, 所有经 HPLC 纯化的 miRNA 均由生工生物工程 (中国上海) 合成, 其核苷酸序列详见表 1。

[0066] 表 1

名称	核苷酸序列 (5' — 3')
G4MB-21	P-/i6FAMdT/GGGACGGGTCAACATCAGTCTGATAAGCTAGTGGAGGGA-BHQ1
G4MB-92a	P-/i6Cy3dT/GGGACGGGACAGGCCGGGACAAGTGCAATAGTGGAGGGA-BHQ2
G4MB-31	P-/i6Cy5dT/GGGACGGGAGCTATGCCAGCATCTTGCCTGTGGAGGGA-BHQ3
miRNA-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miRNA-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
miRNA-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
miRNA-141	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG

[0068] 注: FAM 为羧基荧光素; Cy3 为花青 3, Cy5 为花青 5。P- 为 5' 末端修饰磷酸基团, /i6FAMdT/ 为 C 六号位修饰羧基荧光素的胸腺嘧啶, /i6Cy3dT/ 为 C 六号位修饰花青 3 的胸腺嘧啶, /i6Cy5dT/ 为 C 六号位修饰花青 5 的胸腺嘧啶, 下划线为与靶标 miRNA 的互补区域, BHQ1、BHQ2 和 BHQ3 均为荧光猝灭基团。

[0069] 实施例 1、采用 G 四链体分子信标 (G4MB) 双酶级联等温扩增检测 miRNA 的方法的建立

[0070] 本发明的发明人经过大量实验, 建立了采用 G4MB 双酶级联等温扩增检测 miRNA 的方法, 其基本原理如下: 添加靶标 miRNA 后, G4MB 与 miRNA 完全杂交; 由于双链结构的形成, G 四链体结构被释放, 引物有机会在 G4MB 的 3' 端与引物结合; 在引物和 Bsu DNA 聚合酶的作用下, 以打开的 G4MB 为模板合成双链杂化结构, 并替换原来的靶 miRNA; 被取代的 miRNA 可以与其他 G4MB 结合, 参与下一个周期。在这个循环中, 单个 miRNA 可以触发多个 G4MBs 信号的恢复, 实现 miRNA 信号的一轮扩增。同时, 一旦 Bsu DNA 聚合酶催化合成杂交双链, Lambda 核酸外切酶可以从 5' 磷酸化端逐步消化 G4MB 成寡核苷酸, 使新合成链释放到环境中。新合成的链与 G4MB 完全互补, 也可以与 G4MB 结合, 导致 G4MB 被 Lambda 核酸外切酶剪切, 触发下一个酶反应循环, 诱导荧光信号的恢复, 实现 miRNA 信号的进一步放大。此外, 多个 miRNA 序列可以

通过不同种类的荧光基团启动多个G4MBs的裂解,从而实现多个miRNA的同时检测。

[0071] 具体步骤如下:

[0072] 1、设计并人工合成G4MB。

[0073] G4MB从5'末端至3'末端依次由DNA片段1、DNA片段2和DNA片段3组成。

[0074] DNA片段1由1个5'端磷酸化并修饰荧光基团的dT和富G序列(GGGACGGG)组成。

[0075] DNA片段2的核苷酸序列与miRNA的核苷酸序列反向互补。

[0076] DNA片段3由1个3'端修饰淬灭基团的dA和富G序列(GTGGAGGG)组成。

[0077] DNA片段1和DNA片段3由于都存在富G序列在分子内形成绑定的G四链体结构。

[0078] G4MB的5'末端修饰磷酸基团。

[0079] G4MB的3'末端修饰淬灭基团。

[0080] G4MB是一个发夹结构探针,拥有一个与miRNA反向互补的环状序列和两端的富G的茎序列。在缺乏靶标miRNA的情况下,富G的茎自组装成分子内的G四链体结构,荧光基团在淬灭基团附近被有效地淬灭。5'末端修饰的磷酸基团是后续形成的DNA双链中该链被Lambda核酸外切酶剪切的关键。

[0081] 如果检测多个miRNA,则合成多个G4MB且各个G4MB的荧光标记完全不同。

[0082] 2、制备反应体系。反应体系为100uL,由G4MB、细胞或血清的总miRNA(约500ng)、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)、核糖核酸酶抑制剂(40U)和反应缓冲液组成。该反应体系中,G4MB的浓度为100nM。

[0083] 反应缓冲液:含50mM NaCl、20mM MgCl<sub>2</sub>、20mM KCl、150mM NH<sub>4</sub>Cl和1mM DDT的pH7.9、20mM Tris-HCl缓冲液。

[0084] 3、完成步骤2后,取所述反应体系,37℃孵育30min以上(具体的,单靶标30min,多靶标2h)。

[0085] 4、完成步骤3后,采用酶标仪测量荧光强度。具体的,酶标仪在500-700nm内收集所有发射光谱,激发和发射缝隙宽度为10.0nm。FAM通道、Cy3通道和Cy5通道的激发和发射波长分别设置为480nm和520nm,545nm和566nm,643nm和667nm。

[0086] 根据荧光强度判断是否含有相应的miRNA或miRNA的含量。

[0087] 上述方法的原理图见图1。

[0088] 实施例2、实施例1建立的方法的可行性分析

[0089] 本实施例选择G4MB-21作为模型探针,按照实施例1建立的方法探究生物传感器检测靶标miRNA-21的可行性。

[0090] 按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育30min)在不同条件下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。

[0091] 条件a:反应体系为100uL,由反应缓冲液和G4MB-21组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM。

[0092] 条件b:反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21和miRNA-21组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0093] 条件c:反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-21、Bsu DNA聚合酶(5U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0094] 条件d:反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-21、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0095] 条件e:反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-21、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0096] 检测结果见图2(无miRNA-21、Bsu DNA聚合酶和Lambda核酸外切酶为条件a;miRNA-21,无Bsu DNA聚合酶和Lambda核酸外切酶为条件b,miRNA-21、Bsu DNA聚合酶,无Lambda核酸外切酶为条件c,miRNA-21、无Lambda核酸外切酶,无Bsu DNA聚合酶为条件d,miRNA-21、Bsu DNA聚合酶和Lambda核酸外切酶为条件e)。

[0097] 结果表明,与只有一种酶存在或没有酶存在的条件相比,Bsu DNA聚合酶和Lambda核酸外切酶同时存在的条件下荧光强度显著提高。由此可见,本发明制备的生物传感器可以灵敏的检测miRNA。

[0098] 实施例3、灵敏度分析

[0099] 按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育30min)在反应体系下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。其中反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-21、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为0zM、100zM、1aM、10aM、100aM、1pM、10pM、100pM、1nM或10nM。

[0100] miRNA-21的浓度与荧光强度的关系见图3( $F_0$ 为不存在miRNA-21的情况下体系的荧光强度, $F$ 为存在miRNA-21的情况下体系的荧光强度)。结果表明,随着miRNA-21的浓度从0zM增加到100nM,荧光强度也逐渐增加;在100zM-10nM范围内,荧光响应( $F/F_0-1$ )与miRNA-21浓度的对数呈良好的线性关系,校准方程为 $F/F_0=0.2406\lg C+2.599$ ,相关系数 $R^2=0.9934$ 。

[0101] 实施例4、特异性分析

[0102] 按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育30min)在反应体系下获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。miRNA-21、miRNA-31、miRNA-92a和miRNA-141均为与结直肠癌相关的miRNA。

[0103] 反应体系1为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系1中,G4MB-21的浓度为100nM。

[0104] 反应体系2为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-21、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系2中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-21的浓度为10nM。

[0105] 反应体系3为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-31、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系3中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-31的浓度为10nM。

[0106] 反应体系4为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-92a、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系4中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-92a的浓度为10nM。

[0107] 反应体系5为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、miRNA-141、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系5中,G4MB-21的浓度为100nM,miRNA-141的浓度为10nM。

[0108] 检测结果见图4(空白为反应体系1,miRNA-21为反应体系2,miRNA-31为反应体系3,miRNA-92a为反应体系4,miRNA-141为反应体系5, $F_0$ 为反应体系1的荧光强度,F为其它反应体系的荧光强度)。结果表明,miRNA-31、miRNA-92a和miRNA-141的荧光响应结果( $F/F_0-1$ )至少比miRNA-21低9.8倍。此外,加入非靶标miRNA后观察到几乎可以忽略的荧光变化,进一步证明了该生物传感器具有良好的选择性。

[0109] 实施例5、采用实施例1建立的方法同时检测多种miRNA

[0110] 为了测定生物传感器同时检测多种miRNA能力,进行如下实验。

[0111] 样品1:含有10nM miRNA-21、10nM miRNA-92a和10nM miRNA-31的样品

[0112] 样品2:含有10nM miRNA-92a和10nM miRNA-31的样品

[0113] 样品3:含有10nM miRNA-21和10nM miRNA-31的样品

[0114] 样品4:含有10nM miRNA-21和10nM miRNA-92a的样品

[0115] 样品5:含有10nM miRNA-92a的样品

[0116] 样品6:含有10nM miRNA-31的样品

[0117] 样品7:含有10nM miRNA-21的样品

[0118] 按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育2h)检测每个样品,获得miRNA检测体系的荧光发射光谱。其中检测体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、G4MB-92a、G4MB-31、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;检测体系中,G4MB-21、G4MB-92a和G4MB-31的浓度均为100nM。

[0119] 空白体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、G4MB-92a、G4MB-31、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;空白体系中,G4MB-21、G4MB-92a和G4MB-31的浓度均为100nM。

[0120] 检测结果见图5( $F_0$ 为空白体系的荧光强度,F为检测体系的荧光强度)。结果表明,当加入一种miRNA时,只能获得该miRNA对应G4MB的荧光谱图;当加入任意两种miRNA时,能获得两种对应的荧光信号;当加入三种miRNA时,能获得三种对应的荧光信号。除此之外,获得的信噪比与单个miRNA检测时基本一致,可见该生物传感器具有良好的特异性和多种miRNA检测能力。

[0121] 实施例6、实施例1建立的方法在检测生物样品(如细胞)中miRNA含量的应用

[0122] 待测细胞为结直肠癌细胞HCT-116(以下简称HCT-116细胞)或正常结直肠细胞FHC(以下简称FHC细胞)。

[0123] 1、将待测细胞接种至Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)(该培养基含10%的胎牛血清),37℃、5%CO<sub>2</sub>培养至贴壁。

[0124] 2、完成步骤1后,用PBS缓冲液将细胞( $1 \times 10^6$ 个)洗涤2次,之后提取miRNA,用Nanodrop测定浓度,-80℃保存。

[0125] 3、按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育2h)检测待测细胞的miRNA中miRNA-21、miRNA-92a和miRNA-31的荧光强度。其中,反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、G4MB-92a、G4MB-31、待测细胞的miRNA、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶

(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21、G4MB-92a和G4MB-31的浓度均为100nM,待测细胞的miRNA的浓度为0.25ng/uL。

[0126] 将FHC细胞的荧光强度的表达量设为1,计算HCT-116细胞的相对表达量。

[0127] 检测结果见图6中左图。

[0128] 4、采用RT-qPCR方法检测待测细胞的miRNA中miRNA-21、miRNA-92a和miRNA-31的相对表达量。

[0129] 检测结果见图6中右图。

[0130] 结果表明,与FHC细胞相比,HCT-116细胞中三种miRNA的表达水平均显著升高,本发明的方法与RT-qPCR结果完全一致,并与文献(Francavilla,A.,et al.Exosomal microRNAs and other non-coding RNAs as colorectal cancer biomarkers:a review.Mutagenesis,2019(3):3)结果一致。由此可见,实施例1建立的方法可以检测细胞中的miRNA含量,具有应用于临床检测的潜力。

[0131] 实施例7、实施例1建立的方法在检测生物样品(如血清)中miRNA含量的应用待测人血清共8份,其中4份来自健康人,4份来自结直肠癌病人。

[0132] 1、提取待测人血清的miRNA,用Nanodrop测定浓度,-80℃保存。

[0133] 2、按照实施例1建立的方法(步骤3中具体为:37℃孵育2h)检测待测人血清的miRNA中miRNA-21、miRNA-92a和miRNA-31的荧光强度。其中,反应体系为100uL,由反应缓冲液、G4MB-21、G4MB-92a、G4MB-31、待测人血清的miRNA、Bsu DNA聚合酶(5U)、Lambda核酸外切酶(10U)和核糖核酸酶抑制剂(40U)组成;反应体系中,G4MB-21、G4MB-92a和G4MB-31的浓度均为100nM,待测人血清的miRNA的浓度为0.25ng/uL。

[0134] 将健康人血清的荧光强度的表达量设为1,计算结直肠癌病人血清的相对表达量。

[0135] 部分检测结果见图7中左图。

[0136] 3、采用RT-qPCR方法检测待测人血清的miRNA中miRNA-21、miRNA-92a和miRNA-31的相对表达量。

[0137] 部分检测结果见图7中右图。

[0138] 结果表明,结直肠癌病人血清样本中三种miRNA的平均表达水平均高于健康人。本发明的方法与RT-qPCR结果完全一致,并与文献(Tateishi,Y.,et al.The potential role of microRNA-31expression in early colorectal cancer.Pathol.Int.2015,65(10):513-518;Uratani,R.,et al.Diagnostic Potential of Cell-Free and Exosomal MicroRNAs in the Identification of Patients with High-Risk Colorectal Adenomas.Plos One,2016,11(10):e160722)结果一致。由此可见,实施例1建立的方法可以检测血清中的miRNA含量,具有应用于临床检测的潜力。

[0139] 实施例8、效果比较实验

[0140] 比较最新报道的miRNA检测方法与本发明提供的检测方法检测miRNA的效果。效果见表2。结果表明,本发明提供的方法在检测时长、检测灵敏度、操作简便性、应用多样性方面均具有显著优势,并可以用于同体系的多miRNA检测,表现出良好的综合应用能力。同时本发明方法具有普适性,可以适应任何miRNA的多靶标检测,在高通量检测中具有巨大的优势。

[0141] 最新报道的miRNA检测方法包括记载于如下文献中:Efficient and Exponential

Rolling Circle Amplification Molecular Network Leads to Ultrasensitive and Label-Free Detection of MicroRNA. (Li,D.,et al.Anal.Chem.2020,92(2),2074-2079. 中的方法(简称方法一)和记载于如下文献中:Rolling Circular Amplification(RCA)-Assisted CRISPR/Cas9 Cleavage(RACE)for Highly Specific Detection of Multiple Extracellular Vesicle MicroRNAs.Wang,R.,et al.Anal.Chem.2020,92(2),2176-2185. 中的方法(简称方法二)。

[0142] 表2

[0143]

方法	检测用时(单靶标)	检测限	多检	同体系多检	一步法	应用
方法一	2h20min	0.86fM	否	未知	否	血清
方法二	2h35min	90fM	是	是	否	血清/细胞//临床样本
本发明	30min	85.8zM	是	是	是	血清/细胞/临床样本

[0144] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

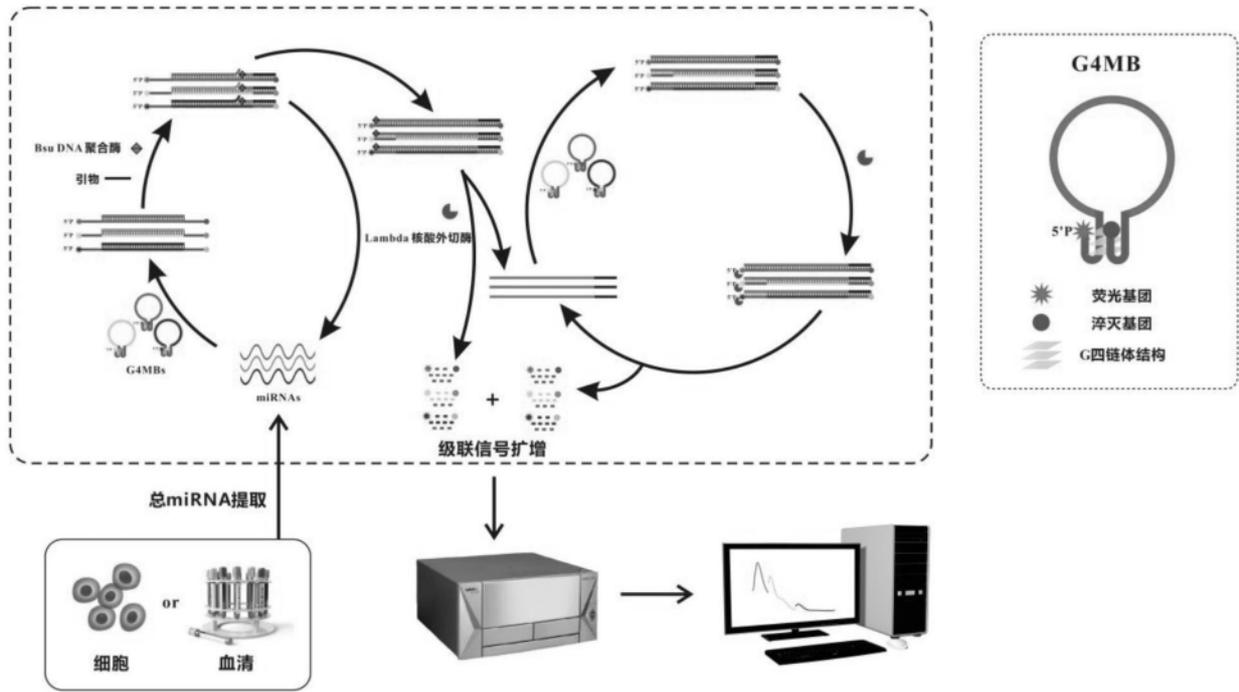


图1

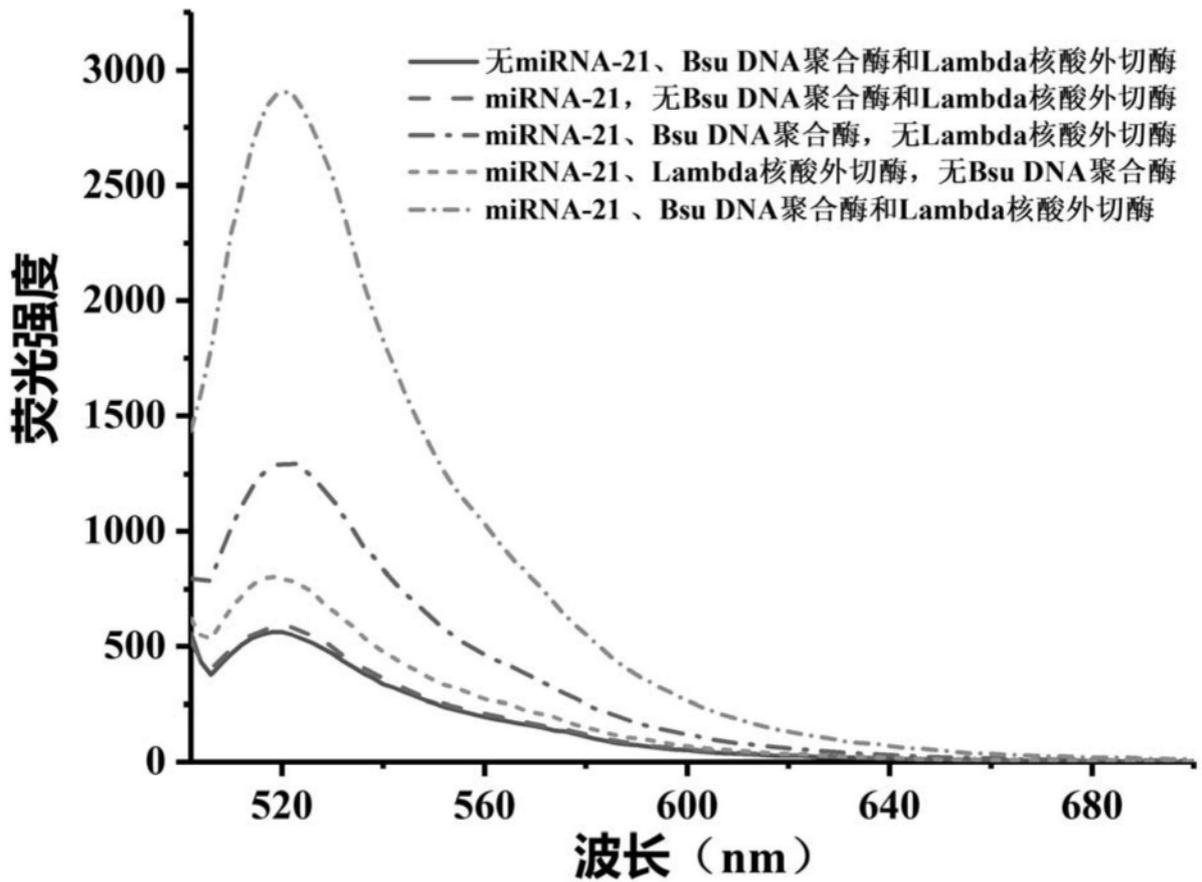


图2

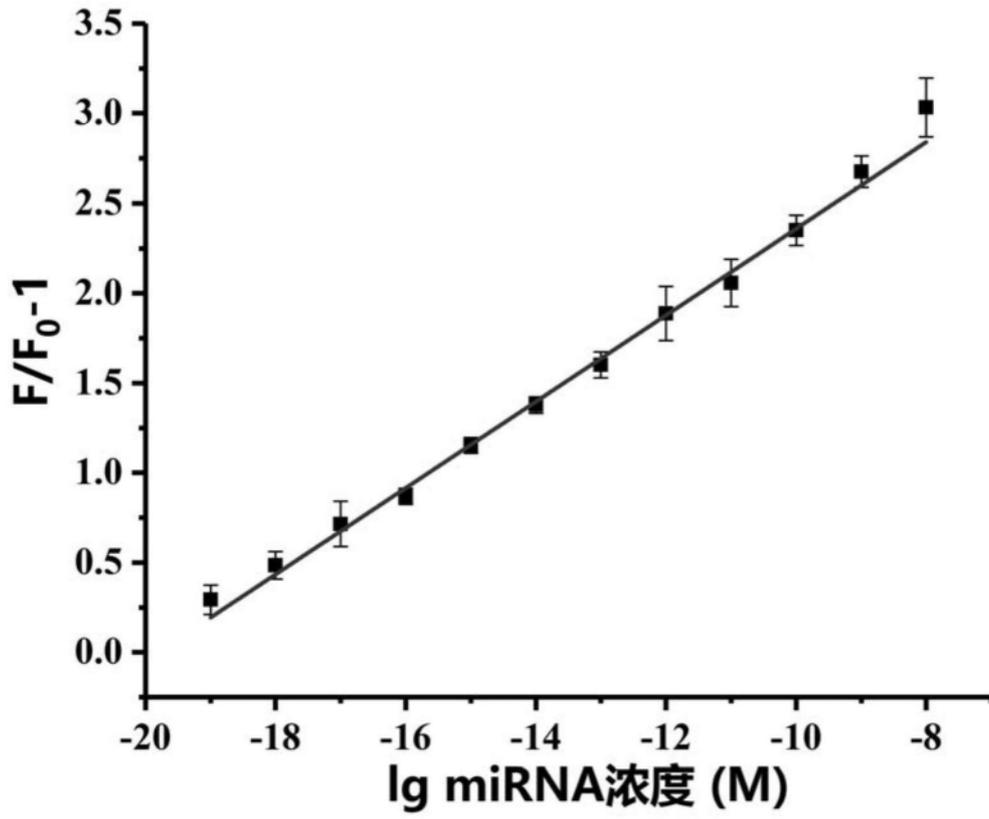


图3

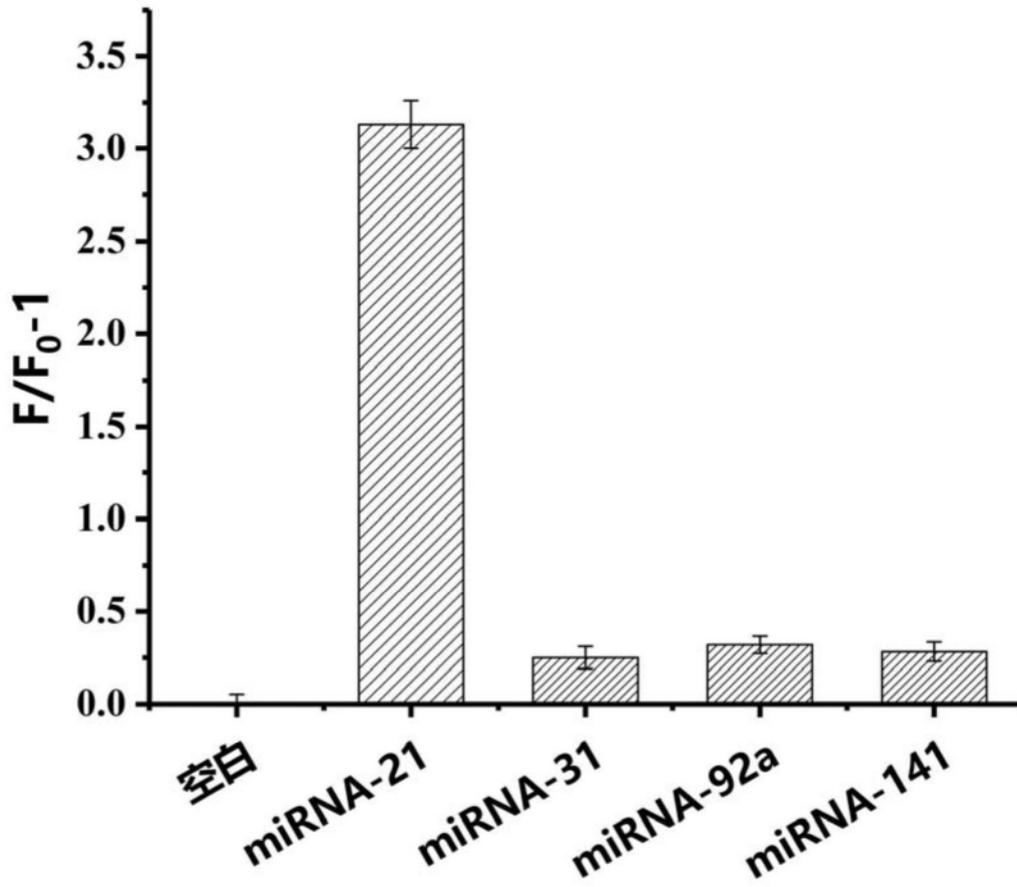


图4

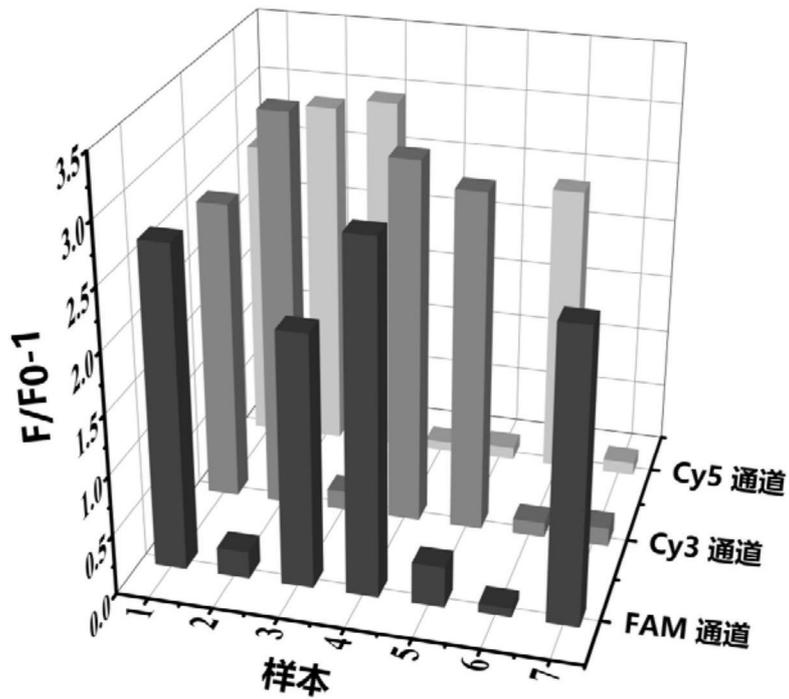


图5

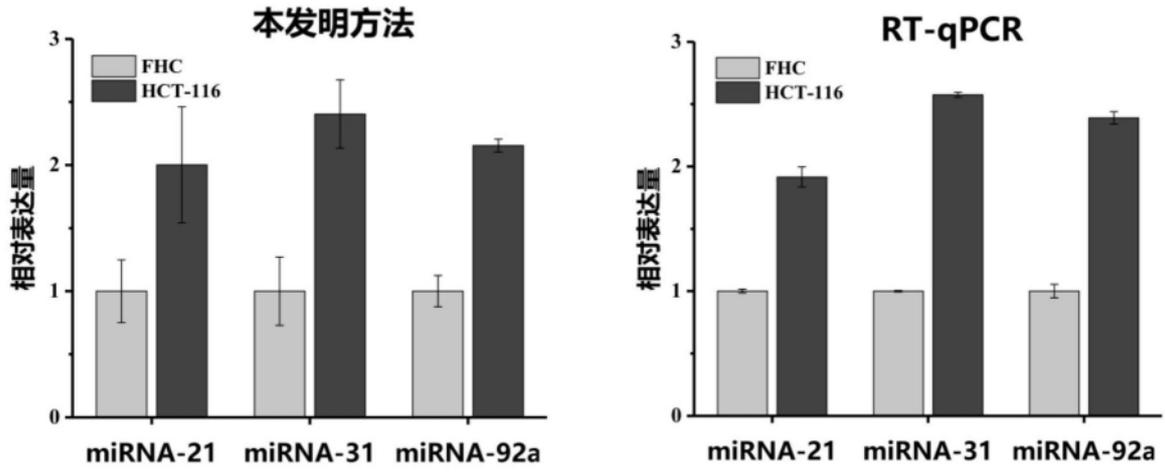


图6

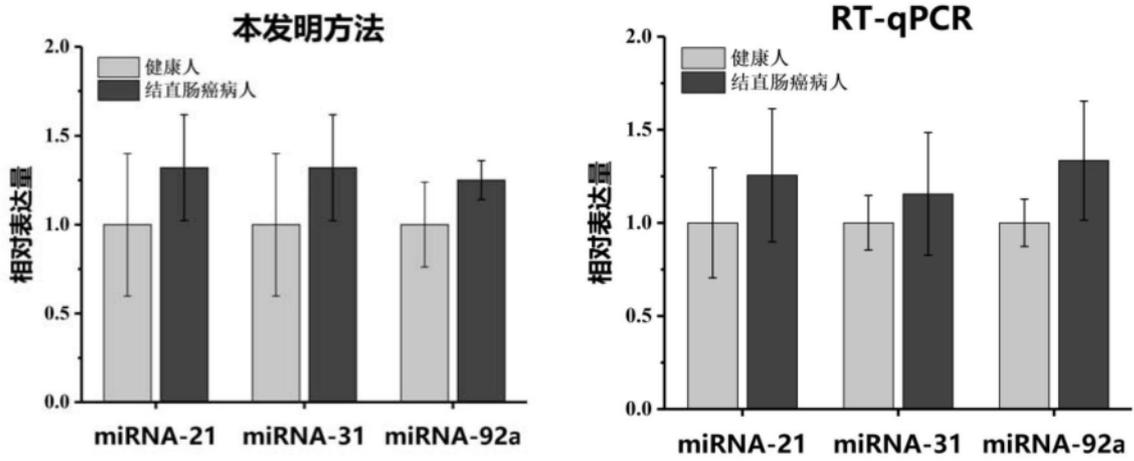


图7