

(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
2018 年 4 月 26 日 (26.04.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/072745 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/107101
- (22) 国际申请日: 2017 年 10 月 20 日 (20.10.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610917128.3 2016年10月21日 (21.10.2016) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 胥传来(XU, Chuanlai); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。匡华(KUANG, Hua); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。李斯(LI, Si); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓

岳, Jiangsu 214122 (CN)。徐丽广(XU, Liguang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。马伟(MA, Wei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。刘丽强(LIU, Liqiang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。宋珊珊(SONG, Shanshan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。吴晓玲(WU, Xiaoling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。孙茂忠(SUN, Maozhong); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501耿晓岳, Heilongjiang 150028 (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) **Title:** METHOD FOR DOUBLE-SIGNAL IN-SITU DETECTION OF INTRACELLULAR MICRORNA BASED ON GOLD-UPCONVERSION NANOPARTICLE TETRAHEDRON

(54) 发明名称: 基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内microRNA的方法

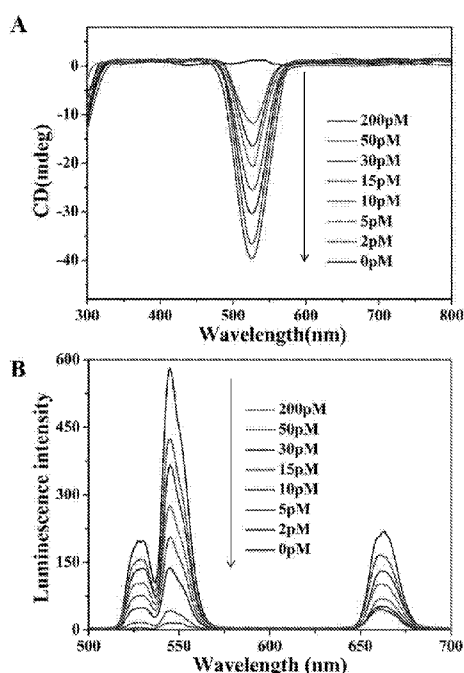


图 4

(57) **Abstract:** The invention provides a method for double-signal in-situ detection of intracellular microRNA based on a gold-upconversion nanoparticle tetrahedron. The method includes: preparing a configuration of a nucleic acid for use with a detection probe, preparing a gold-upconversion nanoparticle tetrahedron detection probe, functionalization of the tetrahedron, and detecting an intracellular microRNA.

(57) **摘要:** 本发明提供了基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内microRNA的方法, 包括制备检测探针所用核酸的设计, 金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备, 四面体的功能化, 胞内microRNA检测。

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法

技术领域

基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法，属于材料化学生物领域。

背景技术

MicroRNA (miRNA) 是一类小分子的非编码调控基因 (19~22 碱基)，广泛地存在于植物、动物及病毒基因之中。miRNA 在细胞分化、增殖、凋亡及癌变等生物过程中都扮演着重要的角色，miRNA 的表达水平与人类的重大疾病，尤其癌症，密切相关。传统的 miRNA 检测方法局限于胞内 miRNA 成像以及基于荧光信号的定量检测。但是荧光信号的光不稳定性、短的量子寿命、易光漂白等特性大大限制了基于荧光信号的胞内原位检测方法的应用。

由纳米粒子可控自组装的纳米结构有规则的几何形状，稳定的结构，很强的光学活性。基于这些性质，自组装的纳米结构已经被广泛的应用于生物传感。但是基于纳米组装结构的胞内 microRNA 的检测还没有报导。近年来，手性等离子光学活性已经成为一个热点话题引起了广泛的关注。发展了很多基于手性纳米组装体的超灵敏的传感检测方法检测核酸片段和血液中的癌症标志物。但是，在生物领域活的癌细胞中的应用仍然有待探索。

发明内容

本发明的目的是提供一种基于手性金-上转换纳米粒子四面体的双模态信号的胞内 microRNA 的超灵敏检测方法，是一种超灵敏，高特异性的胞内 microRNA 的原位检测方法。

本发明的技术方案，基于金-上转换纳米粒子四面体的发光信号和手性信号原位检测细胞中 microRNA 的方法，包括制备检测探针所用核酸的设计，金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备，四面体的功能化，胞内 microRNA 检测方法的建立；具体步骤为：

(1) 20nm 金纳米粒子的制备

洁净的三口烧瓶中加入 97.5mL 超纯水，加入 2.5mL 0.4% 氯金酸溶液，搅拌并加热至沸腾，7-8min 后加入 1.6mL 1%柠檬酸三钠溶液，溶液从无色变为红色后，停止加热，继续搅拌 15min，自然冷却后放置在 4℃冰箱备用。

(2) 19nm 上转换纳米粒子(NaGdF₄:Yb,Er)的制备

在含有 14mL OA (配体十八烯酸) 和 16mL ODE (非配位有机溶剂十八烯) 的混合液中加入 0.80mmol 的 GdCl₃·6H₂O，0.18mmol 的 YbCl₃·6H₂O 和 0.02mmol 的 ErCl₃·6H₂O，溶解。在氮气的保护下加热到 150℃形成均相的溶液。降至室温后，含有 0.100g 的 NaOH 和

0.148g 的 NH_4F 的 10 mL 甲醇溶液慢慢加入。反应混合液在 50°C 下慢慢搅拌 30min, 然后在 100°C 在真空下处理 10min 除去甲醇, 在氮气的保护下加热到 320°C , 并且保持 1h。将混合物降至室温, 反应结束。乙醇中沉淀的合成的 NaGdF_4 粒子用离心收集, 并用乙醇洗涤几次, 最后重悬在 THF 或者环己烷溶液中供后续实验使用。上转换纳米粒子的转相: 100mg 用马来酰亚胺基团和磷酸基团修饰的 PEG 和 10mg 油酸包裹的 NaGdF_4 粒子混合在 THF 溶液里面, 在室温下搅拌过夜。PEG 包裹的 NaGdF_4 粒子在环己烷中沉淀, 并用环己烷洗涤三次, 在室温真空的条件下干燥, 得到了可以在水中溶解的 PEG 包裹的 NaGdF_4 粒子。

(3) 检测用的核酸探针的设计与合成

表 1. microRNA 检测用 DNA 序列设计

序列号	5'-3'
	(DNA 序列 5'端修饰巯基, 下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰)
1: DNA-Py1:	<u>TTTT</u> CAACATCAGTCTGATAAGCTACTGTTCTTTCCCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTACGGTTTTCAACATCAGTCTGATAAGCT ACTT <u>GAC</u>
2: DNA-Py2:	<u>TTT</u> CCGTAGCTTATCAGTTAAGCTAGGGTTTCATTAATCAACAT CAGTTCGATAAGCTATTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTACAA <u>CTT</u>
3: DNA-Py3:	<u>TTT</u> ACTAAGCGATTACTGATGTTGATTAATGTTTACAACATCAG TCTGATAAGCTAACTGATTTTGAACAGTAGCTTATCAGGACTC GTGG <u>TC</u>
4: DNA-Py4:	<u>TTT</u> AAGTTGTAGCTTATCAGCTGACTACATTTTTGTCAAGTAG CTTATCAGTTACAGCTCGCTTTATCAGTTAGCTTATCAGAGATC GTAG <u>CT</u> 人工序列
5: miR-21:	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
6: control1:	AAGCUUAUCUGACUGAUGUUGU
7: control2:	UACCUUAUCAGACUGAUGCUGA
8: miR-200b:	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
9: let-7d:	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU

注: 本发明所使用的 DNA 均购自中国上海生工生物工程有限公司, 并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化。

(4) 金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备

首先制备金纳米粒子和核酸的偶联物: 把 20nM 金纳米粒子 (AuNP) 分别和 DNA-Py3,

DNA-Py4 按摩尔比 1 : 3.5 的比例混合在一起, 反应 1h 后加入 NaCl 溶液至终浓度为 50mM, 混合均匀, 反应过夜, 离心去除游离的核酸, 即得到 AuNP-DNA-Py 3, AuNP-DNA-Py 4。然后制备上转换纳米粒子和核酸的偶联物: 把 20nM 上转换纳米粒子(UCNP)分别和 DNA-Py1, DNA-Py2 按摩尔比 1 : 3.5 比例混合在一起, 反应 1h 后加入 NaNO₃ 溶液至终浓度为 50mM, 混合均匀, 反应过夜, 离心去除游离的核酸, 即得到 UCNP-DNA-Py1, UCNP-DNA-Py 2。接下来把得到的 AuNP-DNA-Py3 和 AuNP-DNA-Py4, UCNP-DNA-Py1 和 UCNP-DNA-Py 2 分别混合, 加入 NaCl 至终浓度为 50mM, 95℃水浴 5min, 然后 37℃孵育 8h, 即得到金二聚体及上转换二聚体。把金二聚体和上转换二聚体按照摩尔比 1 : 1 的比例混合, 37℃孵育 24h, 即制备得到检测 microRNA-21 用的金-上转换纳米粒子四面体检测探针溶液。

(5) 四面体的功能化

将巯基修饰的 PEG (分子量: 5000) 溶液按照 PEG : 四面体摩尔比 1000 : 1 的比例加入到四面体检测探针溶液中, 15min 后离心除去多余的 PEG 分子。然后把穿膜肽分子 (TAT) 按照 TAT : 四面体摩尔比 1000 : 1 的比例加入到 PEG 修饰过的四面体溶液中, 室温反应 24h, 离心除去多余的未连在四面体上的穿膜肽。

(6) 活细胞内 microRNA-21 检测方法的建立

首先用商业转染试剂 (lipofectamine RNAiMAX transfection reagent) 和不同量的 microRNA-21 来增加细胞中 microRNA-21 的量, 或者用 microRNA-21 的反义序列来降低细胞中的 microRNA-21 的量, 然后用 RT-PCR 来确定转染后细胞中的 microRNA-21 的量。具体方法如下: 首先建立人工合成的有梯度的 microRNA-21 的扩增曲线, 然后建立循环数和 microRNA-21 的浓度之间的线性关系。然后提取转染后的细胞中的总 RAN, 然后用 RT-PCR 扩增得到里面含有 microRNA-21 的扩增曲线, 根据扩增曲线得到循环数, 然后根据循环数从标准曲线中确定含有的 microRNA-21, 然后用含有四面体的培养基(1640+10%FBS+双抗)来培养转染后的细胞, 8h 后洗去细胞外面的四面体, 测定细胞内的 CD 信号及上转换荧光强度, 然后分别建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度之间的标准曲线。

(7) 不同细胞中 microRNA-21 的检测

用含有四面体的培养基 (1640+10%FBS+双抗) 分别培养 MCF-7, HeLa, PCS-460-010 细胞, 8h 后, 检测细胞中的 CD 信号及上转换荧光强度, 然后根据分别建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度之间的标准曲线来确定细胞中 microRNA-21 的含量。

本发明的有益效果：本发明将 DNA 驱使的金-上转换纳米粒子组装的四面体用于胞内 miRNA 的实时检测。金-上转换纳米粒子四面体具有双重的光学活性，在 521nm 呈现了很强的等离子圆二色谱信号，并在 500-600nm 有显著的上转换荧光强度，因此可以利用这双重信号来检测细胞中的 miRNA。在目标 miRNA 的存在下，CD 信号会减弱，荧光强度会增强。实验结果显示，CD 信号与目标 miRNA 浓度在 0.073 到 43.65 fmol/10 μ g RNA 范围内有很好的线性关系，检测限可以达到 0.03 fmol/10 μ g RNA，而上转换荧光强度与目标 miRNA 浓度的线性范围是 0.16 - 43.65 fmol/10 μ g RNA，最低检测限是 0.12 fmol/10 μ g RNA。这些结果说明了 CD 信号对 miRNA 的浓度变化比荧光强度有更高的灵敏度。强的 CD 信号来自于光子自旋角动量的相互作用以及四面体中 DNA 分子对手性的增强作用。

本发明不仅建立了胞内 miRNA 的超灵敏定量检测方法，同时也为组装体等离子手性的生物应用开辟了道路。本发明建立了一种基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的检测方法，是一种超灵敏，高特异性的胞内 microRNA 的原位检测方法。

附图说明

图 1：(A)金-上转换纳米粒子四面体检测细胞中 microRNA 的示意图；(B)四面体的核酸骨架，1 和 2 的位点与上转换纳米粒子联接，3 和 4 的位点与金纳米粒子联接。

图 2：组装的四面体的透射电镜图。

图 3：组装的四面体的产率统计图。

图 4：细胞外检测能力的评价：(A) 添加一系列不同浓度目标 microRNA 得到的手性信号图；(B)添加一系列不同浓度目标 microRNA 得到的荧光信号图。对于图中的各条曲线，按照各曲线谷底的高低顺序，从高到底，分别代表 microRNA 浓度为 200pM、50pM、30pM、15pM、10pM、5pM、2pM、0pM 的情形。

图 5：检测特异性的评价：(C) 添加不同种类的 microRNA 得到的手性信号图；(D)添加不同种类的 microRNA 得到的荧光信号图。

图 6：实施例 6 中含有不同量 microRNA21 的细胞与检测探针孵育 8 小时后的 CD 信号。对于图中的各条曲线，按照各曲线谷底的高低顺序，从高到底，分别代表 43.65 fmol/10 μ g RNA、15.81 fmol/10 μ g RNA、3.18 fmol/10 μ g RNA、0.48 fmol/10 μ g RNA、0.16 fmol/10 μ g RNA、0.073 fmol/10 μ g RNA、空白对照的情形。

图 7：实施例 6 中含有不同量 microRNA21 的细胞与检测探针孵育 8 小时的荧光信号。

图 8 为图 6 中 521 nm 处的 CD 信号的强度与细胞内用 RT-PCR 检测得到的 microRNA 的量之间的线性关系。

图 9 为图 7 中 543 nm 处的上转换强度与细胞内用 RT-PCR 检测得到的 microRNA 的量之间的线性关系。

图 10: 用检测探针检测不同细胞中 microRNA21 的量, 得到不同细胞中的 microRNA 的 CD 信号图。对于图中的各条曲线, 按照各曲线谷底的高低顺序, 从高到底, 分别代表细胞为 MCF-7、HeLa、PCS-460-010 的情形。

图 11: 用检测探针检测不同细胞中 microRNA21 的量, 得到不同细胞中的 microRNA 的上转换荧光信号图。

具体实施方式

实施例 1 金纳米粒子和上转换纳米粒子(NaGdF₄:Yb,Er)的制备

(1) 20nm 金纳米粒子的制备

洁净的三口烧瓶中加入 97.5mL 超纯水, 加入 2.5mL 0.4% 氯金酸溶液, 搅拌并加热至沸腾, 7-8min 后加入 1.6mL 1%柠檬酸三钠溶液, 溶液从无色变为红色后, 停止加热, 继续搅拌 15min。自然冷却后放置在 4℃冰箱备用。

(2) 19nm 上转换纳米粒子(NaGdF₄:Yb,Er)的制备

在含有 14mL OA (配体十八烯酸) 和 16mL ODE (非配位有机溶剂十八烯) 的混合液中加入 0.80mmol 的 GdCl₃·6H₂O, 0.18mmol 的 YbCl₃·6H₂O 和 0.02mmol 的 ErCl₃·6H₂O, 溶解。在氮气的保护下加热到 150℃形成均相的溶液。降至室温后, 含有 0.100 g 的 NaOH 和 0.148 g 的 NH₄F 的 10 mL 甲醇溶液慢慢加入。反应混合液在 50℃下慢慢搅拌 30min, 然后在 100℃在真空下处理 10min 除去甲醇, 在氮气的保护下加热到 320℃, 并且保持 1h。将混合物降至室温, 反应结束。乙醇中沉淀的合成的 NaGdF₄ 粒子用离心收集, 并用乙醇洗涤几次, 最后重悬在 THF 或者环己烷溶液中供后续实验使用。上转换纳米粒子的转相: 100mg 马来先亚胺基团和磷酸基团修饰的 PEG 和 10mg 油酸包裹的 NaGdF₄ 粒子混合在 THF 溶液里面, 在室温下搅拌过夜。PEG 包裹的 NaGdF₄ 粒子在环己烷中沉淀, 并用环己烷洗涤三次, 在室温真空的条件下干燥, 得到了可以在水中溶解的 PEG 包裹的 NaGdF₄ 粒子。

实施例 2 microRNA 检测用 DNA 序列设计

序列号	5'-3' (DNA 序列 5'端修饰巯基, 下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰)
1: DNA-Py1:	<u>TTTT</u> CAACATCAGTCTGATAAGCTACTGTTCTTTCCCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTACGGTTTTCAACATCAGTCTGATAAGCT ACTT <u>GAC</u>
2: DNA-Py2:	<u>TTTCCG</u> TAGCTTATCAGTTAAGCTAGGGTTTCATTAATCAACAT

	CAGTTCGATAAGCTATTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTACAA CTT
3: DNA-Py3:	TTTACTAAGCGATTACTGATGTTGATTAATGTTTACAACATCAG TCTGATAAGCTAACTGATTTTGAACAGTAGCTTATCAGGACTC GTGGTC
4: DNA-Py4:	TTTAAGTTGTAGCTTATCAGCTGACTACATTTTTGTCAAGTAG CTTATCAGTTACAGCTCGCTTTATCAGTTAGCTTATCAGAGATC GTAGCT
5: miR-21:	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
6: control1:	AAGCUUAUCUGACUGAUGUUGU
7: control2:	UACCUUAUCAGACUGAUGCUGA
8: miR-200b:	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
9: let-7d:	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU

注：本发明所使用的 DNA 均购自中国上海生工生物工程有限公司，并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化。

实施例 3 检测探针的制备

首先，制备金纳米粒子和核酸的偶联物：把 20nM 的金纳米粒子（AuNP）分别和 DNA1-Py3，DNA-Py4 按摩尔比 1：3.5 的比例混合在一起，反应 1h 后加入 NaCl 溶液至终浓度为 50mM，混合均匀，反应过夜，离心去除游离的核酸，即得到 AuNP-DNA-Py3，AuNP-DNA-Py4。

然后，制备上转换纳米粒子和核酸的偶联物：把 20nM 上转换纳米粒子（UCNP）分别和 DNA-Py1，DNA-Py2 按摩尔比 1：3.5 的比例混合在一起，反应 1h 后加入 NaNO₃ 溶液至终浓度为 50mM，混合均匀，反应过夜，离心去除游离的核酸，即得到 UCNP-DNA-Py1，UCNP-DNA-Py2。

接下来，把得到的 AuNP-DNA-Py3 和 AuNP-DNA-Py4，UCNP-DNA-Py1 和 UCNP-DNA-Py2 分别混合，加入 NaCl 至终浓度为 50mM，95℃水浴 5min，然后 37℃孵育 8h，即得到金二聚体及上转换二聚体。

把金二聚体和上转换二聚体按照摩尔比 1：1 的比例混合，37℃孵育 24h，即制备得到检测 microRNA-21 用的金-上转换纳米粒子四面体检测探针溶液。图 2 为用金和上转换纳米粒子以及 DNA 核酸序列制备的检测探针的透射电镜图。图 3 为通过拍摄 200 张不同视野的 TEM 照片，对最终组装的四面体进行产率统计。

通过在检测探针溶液中添加不同浓度的目标 microRNA，然后测试溶液的 CD 和荧光信号，通过 CD 和荧光信号的变化来检测四面体检测 microRNA21 的检测能力。检测结果如图 4 所示，目标 microRNA 浓度的变化，能在 CD 和荧光信号上得到显著的体现。

通过向检测探针溶液中添加高浓度的非目标 microRNA，然后测试溶液的 CD 和荧光信号，通过 CD 和荧光信号的变化来检测四面体探针的特异性，确认检测探针的信号是否会受非目标 microRNA 或者其他物质的干扰。检测结果如图 5 所示，非目标 microRNA 或者其他物质的 CD 和荧光信号强度，与目标 microRNA 的 CD 和荧光信号强度，形成了非常显著的差异，非目标 microRNA 或者其他物质不会干扰目标 microRNA 的检测。

实施例 4 四面体的功能化

将巯基修饰的 PEG（分子量：5000）溶液按照 PEG：四面体摩尔比 1000：1 的比例加入到四面体检测探针溶液中，15min 后离心除去多余的 PEG 分子。然后把穿膜肽分子（TAT）按照 TAT：四面体摩尔比 1000：1 的比例加入到 PEG 修饰过的四面体溶液中，室温反应 24h，离心除去多余的未连在四面体上的穿膜肽。

实施例 5 活细胞内 microRNA-21 检测方法的建立

首先，用商业转染试剂(lipofectamine RNAiMAX transfection reagent)和不同量的 microRNA-21 来增加细胞中 microRNA-21 的量，或者用 microRNA-21 的反义序列来降低细胞中的 microRNA-21 的量，然后用 RT-PCR 来确定转染后细胞中的 microRNA-21 的量。具体方法如下：首先建立人工合成的有梯度的 microRNA-21 的扩增曲线，然后建立循环数和 microRNA-21 的浓度之间的线性关系。然后提取转染后的细胞中的总 RAN，然后用 RT-PCR 扩增得到里面含有 microRNA-21 的扩增曲线，根据扩增曲线得到循环数，然后根据循环数从标准曲线中确定含有的 microRNA-21 的量（浓度）。

然后，用含有四面体的培养基(1640+10%FBS+ 双抗)来培养转染后的细胞（如 MCF-7），8h 后洗去细胞外面的四面体，测定细胞内的 CD 信号和上转换荧光强度。

然后，分别建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度之间的标准曲线。

实施例 6 不同细胞中 microRNA-21 的检测

参照实施例 5 中的方法，用含有四面体的培养基(1640+10%FBS+双抗)分别培养 MCF-7，HeLa，PCS-460-010 细胞，8h 后检测细胞中的 CD 信号及上转换荧光强度，然后根据建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度之间的标准曲线来确定细胞中 microRNA-21 的含量。

如图 6 所示, 含有不同量 microRNA21 的细胞与检测探针孵育 8 小时后, 得到的 CD 信号。可以看出, CD 信号能够明显体现出 microRNA21 含量间的差异。如图 8 所示, 横坐标为以 RT-PCR 检测细胞内的 microRNA 的含量, 纵坐标为图 6 中 521 nm 处的 CD 信号的强度, 两者之间具有很好的线性关系; 说明采用本发明的检测探针检测的结果与采用 RT-PCR 检测的结果非常吻合。

如图 7 所示, 含有不同量 microRNA21 的细胞与检测探针孵育 8 小时后, 得到了荧光信号。可以看出, 荧光信号能够明显体现出 microRNA21 含量间的差异。如图 9 所示, 横坐标为以 RT-PCR 检测细胞内的 microRNA 的含量, 纵坐标为图 7 中 543 nm 处的上转换强度, 两者之间具有很好的线性关系; 说明采用本发明的检测探针检测的结果与采用 RT-PCR 检测的结果非常吻合。

如图 10 所示, 用检测探针检测不同细胞中 microRNA21 的量, 所得到的不同细胞中的 microRNA 的 CD 信号图。可进一步通过图 8 所建立的标准曲线以及 CD 光谱中 521nm 处的 CD 信号强度来计算不同细胞内含有的 microRNA 的量。

如图 11 所示, 用检测探针检测不同细胞中 microRNA21 的量, 所得到的不同细胞中的 microRNA 的上转换荧光信号图。可进一步通过图 9 所建立的标准曲线以及荧光光谱中 543nm 处的荧光信号强度来计算不同细胞中的 microRNA 的量。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

序列表

<110> 江南大学

<120> 基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ttttcaacat cagtctgata agctactgtt cttccctca acatcagtct gataagctac 60

ggttttcaac atcagtctga taagctactt gac 93

<210> 2

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tttccgtagc ttatcagtta agctaggggtt tcattaatca acatcagttc gataagctat 60

tttcaacatc agtctgataa gctacaactt 90

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

<210> 3

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tttactaagc gattactgat gttgattaat gtttacaaca tcagtctgat aagctaactg 60

atTTTgaaca gtagcttatac aggactcgtg gtc 93

<210> 4

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tttaagttgt agcttatcag ctgactacat tttgtcaag tagcttatca gttacagctc 60

gctttatcag ttagcttatac agagatcgta gct 93

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 5

uagcuuauca gacugauguu ga 22

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

<210> 6

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 6

aagcuuaucu gacugauguu gu

22

<210> 7

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 7

uaccuuaucu gacugaugcu ga

22

<210> 8

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 8

uaauacugcc ugguaaugau ga

22

<210> 9

<211> 22

< 核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

<213> 人工序列

<400> 9

agagguagua gguugcauag uu

22

权 利 要 求 书

1.一种基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法，其特征在于，包括制备检测探针所用核酸的设计、金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备、四面体的功能化、胞内 microRNA-21 检测方法的建立；步骤为：

- (1) 所用 DNA 序列设计；
- (2) 金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备；
- (3) 四面体的功能化；
- (4) 胞内 microRNA-21 检测方法的建立；
- (5) 不同细胞中 microRNA-21 的检测。

2.根据权利要求 1 所述基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法，其特征在于，所用 DNA 序列设计：

DNA-Py1 : 5'-SH-TTTTCAACAT CAGTCTGATA AGCTACTGTT CTTCCCTCA ACATCAGTCT GATAAGCTAC GGTTTTCAAC ATCAGTCTGA TAAGCTACTT GAC-3'，下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰；

DNA-Py2 : 5'- SH-TTTCCGTAGC TTATCAGTTA AGCTAGGGTT TCATTAATCA ACATCAGTTC GATAAGCTAT TTTCAACATC AGTCTGATAA GCTACAACTT-3'，下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰；

DNA-Py3 : 5'- SH-TTTACTAAGC GATTACTGAT GTTGATTAAT GTTTACAACA TCAGTCTGAT AAGCTAACTG ATTTTGAACA GTAGCTTATC AGGACTCGTG GTC-3'，下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰；

DNA-Py4 : 5'- SH-TTTAAGTTGT AGCTTATCAG CTGACTACAT TTTTGTCAAG TAGCTTATCA GTTACAGCTC GCTTTATCAG TTAGCTTATC AGAGATCGTA GCT-3'，下划线标注的碱基用硫代磷酸修饰；

miR-21: 5'-UAGCUUAUCA GACUGAUGUU GA-3'，

control1: 5'- AAGCUUAUCU GACUGAUGUU GU-3'，

control2: 5'- UACCUUAUCA GACUGAUGCU GA-3'，

miR-200b: 5'- UAAUACUGCC UGGUAAUGAU GA-3'，

let-7d: 5'- AGAGGUAGUA GGUUGCAUAG UU-3'。

3.根据权利要求 1 或 2 所述基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法，其特征在于，金-上转换纳米粒子四面体检测探针的制备：

(1) 首先制备金纳米粒子和核酸的偶联物：把 20nM 的金纳米粒子 AuNP 分别和 DNA-Py3， DNA-Py4 按摩尔比 1 : 3.5 比例混合在一起，反应 1h 后加入 NaCl 溶液至终浓度

为 50mM, 混合均匀, 反应过夜, 离心去除游离的核酸, 即得到 AuNP-DNA-Py 3, AuNP-DNA-Py 4;

(2) 然后制备上转换纳米粒子和核酸的偶联物: 把 20nM 的上转换纳米粒子 UCNP 分别和 DNA-Py1, DNA-Py2 按摩尔比 1 : 3.5 比例混合在一起, 反应 1h 后加入 NaNO₃ 溶液至终浓度为 50mM, 混合均匀, 反应过夜, 离心去除游离的核酸, 即得到 UCNP-DNA-Py 1, UCNP-DNA-Py 2;

(3) 把步骤 (1)、(2) 得到的 AuNP-DNA-Py3 和 AuNP-DNA-Py4, UCNP-DNA-Py1 和 UCNP-DNA-Py 2 分别混合, 加入 NaCl 至终浓度为 50mM, 95℃ 水浴 5min, 然后 37℃ 孵育 8h, 即得到金二聚体及上转换二聚体; 把金二聚体和上转换二聚体按照摩尔比 1 : 1 的比例混合, 37℃ 孵育 24h, 即制备得到检测 microRNA-21 用的金-上转换纳米粒子四面体检测探针溶液。

4. 根据权利要求 1 所述基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法, 其特征在于四面体的功能化: 将巯基修饰的 PEG-5000 溶液按照 PEG : 四面体摩尔比 1000 : 1 的比例加入到四面体检测探针溶液中, 15min 后离心除去多余的 PEG 分子, 然后把穿膜肽分子 TAT 按照 TAT : 四面体摩尔比 1000 : 1 的比例加入到 PEG 修饰过的四面体溶液中, 室温反应 24h, 离心除去多余的未连在四面体上的穿膜肽。

5. 根据权利要求 1 所述基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法, 其特征在于, 胞内 microRNA-21 检测方法的建立:

首先用商业转染试剂 lipofectamine RNAiMAX transfection reagent 和不同量的 microRNA-21 来增加细胞中 microRNA-21 的量, 或者用 microRNA-21 的反义序列来降低细胞中的 microRNA-21 的量, 然后用 RT-PCR 来确定转染后细胞中的 microRNA-21 的量; 具体方法如下:

(1) 首先建立人工合成的有梯度的 microRNA-21 的扩增曲线, 然后建立循环数和 microRNA-21 的浓度之间的线性关系;

(2) 然后提取转染后的细胞中的总 RAN, 用 RT-PCR 扩增得到 microRNA-21 的扩增曲线, 根据扩增曲线得到循环数, 根据循环数从标准曲线中确定含有的 microRNA-21, 用含有四面体的培养基 1640+10%FBS+双抗来培养转染后的细胞, 8h 后洗去细胞外面的四面体, 测定细胞内的 CD 信号及上转换荧光强度, 分别建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度之间的标准曲线。

6. 根据权利要求 1 所述基于金-上转换纳米粒子四面体的双信号原位检测胞内 microRNA 的方法, 其特征在于, 不同细胞中 microRNA-21 的检测:

用含有四面体的培养基 1640+10%FBS+双抗分别培养 MCF-7, HeLa, PCS-460-010 细胞, 8h 后, 检测细胞中的 CD 信号及上转换荧光强度, 然后根据分别建立 CD 信号和细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线以及上转换荧光强度与细胞内 microRNA-21 的浓度的标准曲线来确定 细胞中 microRNA-21 的含量。

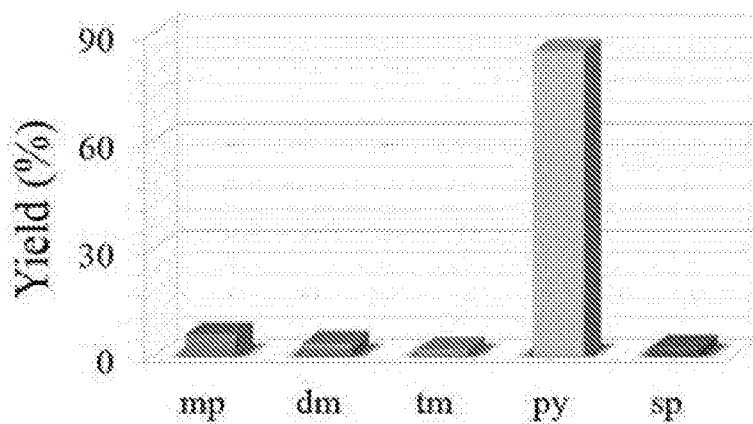


图 3

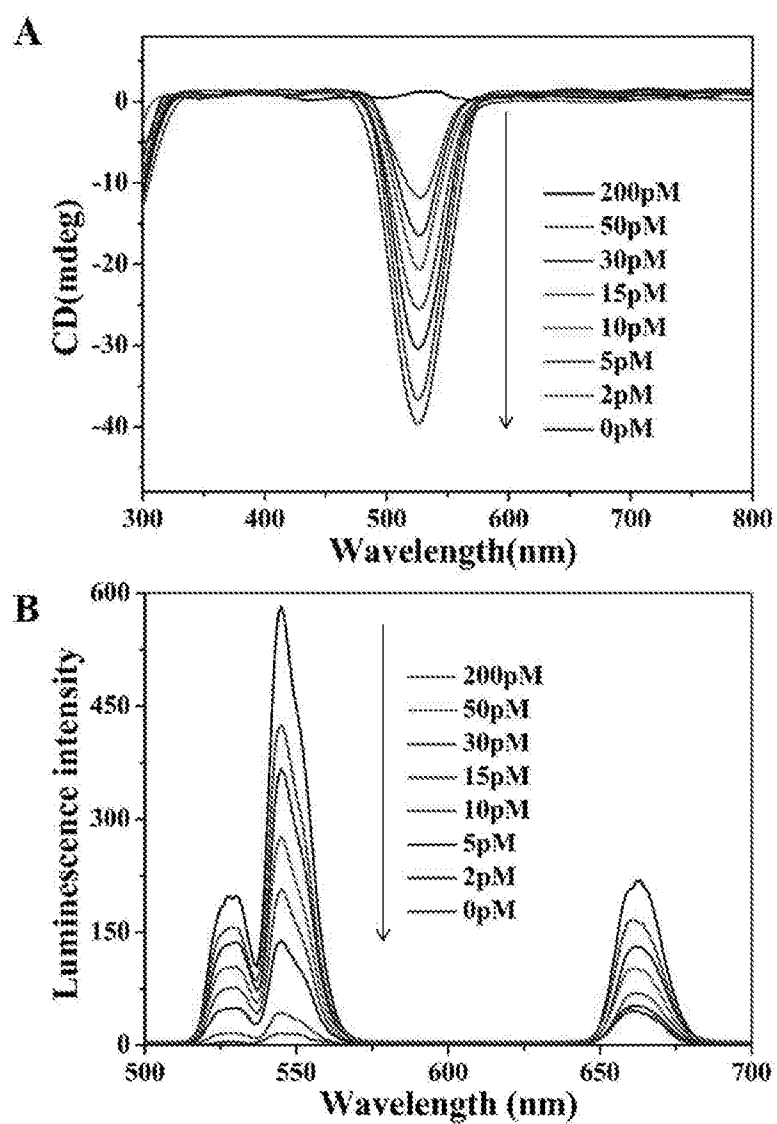


图 4

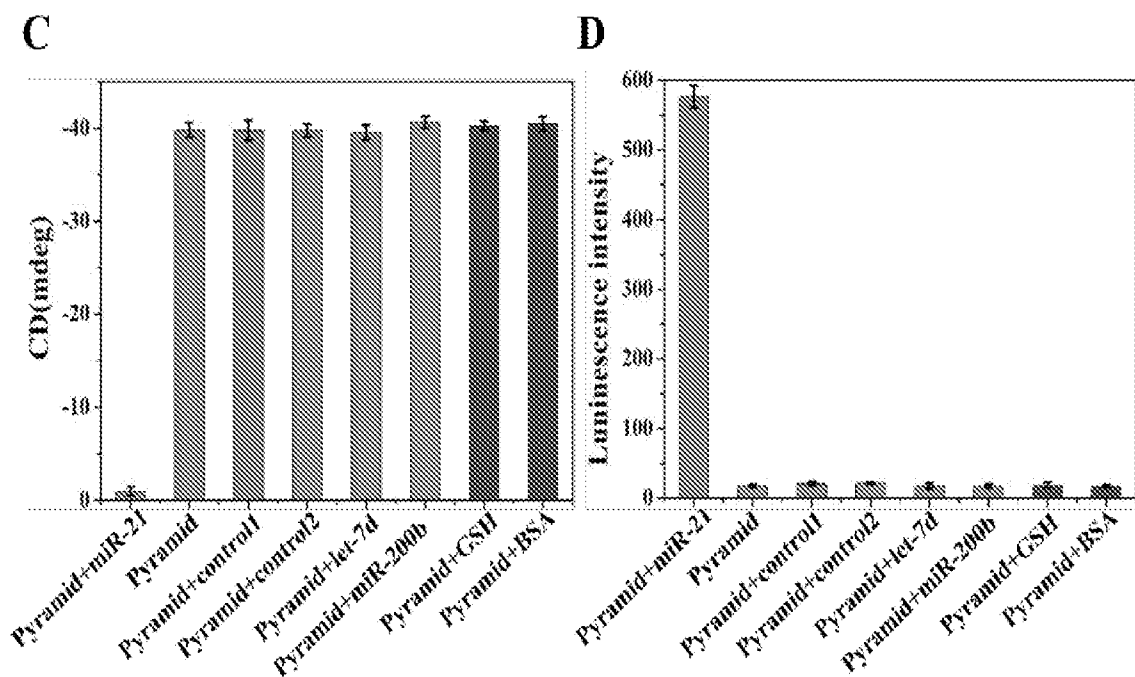


图 5

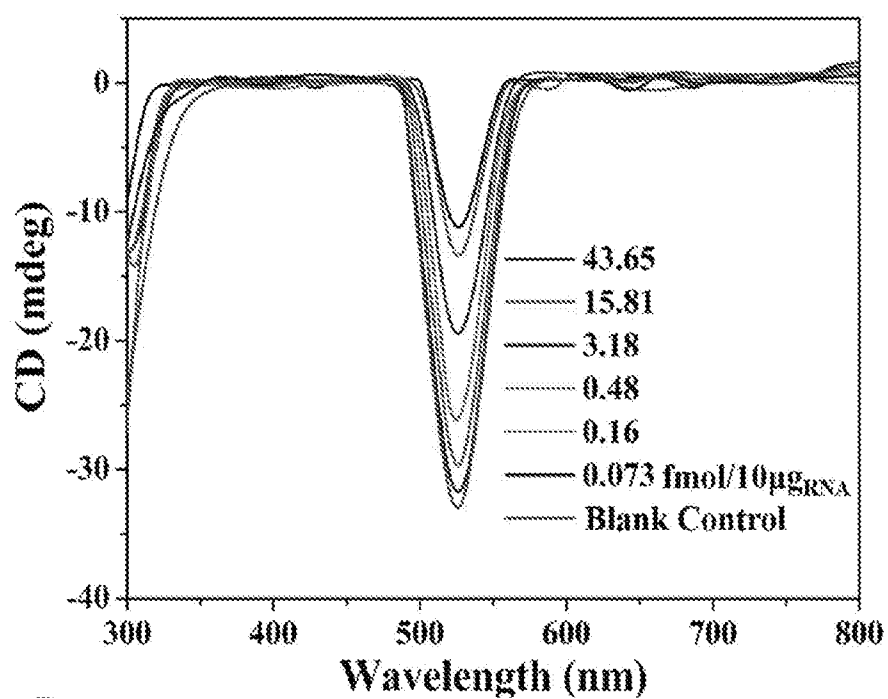


图 6

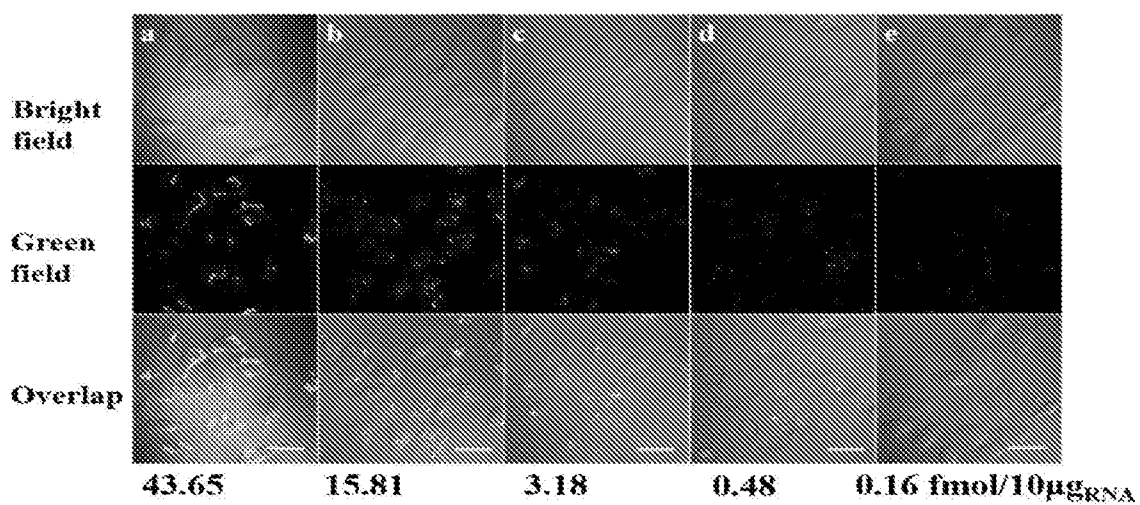


图 7

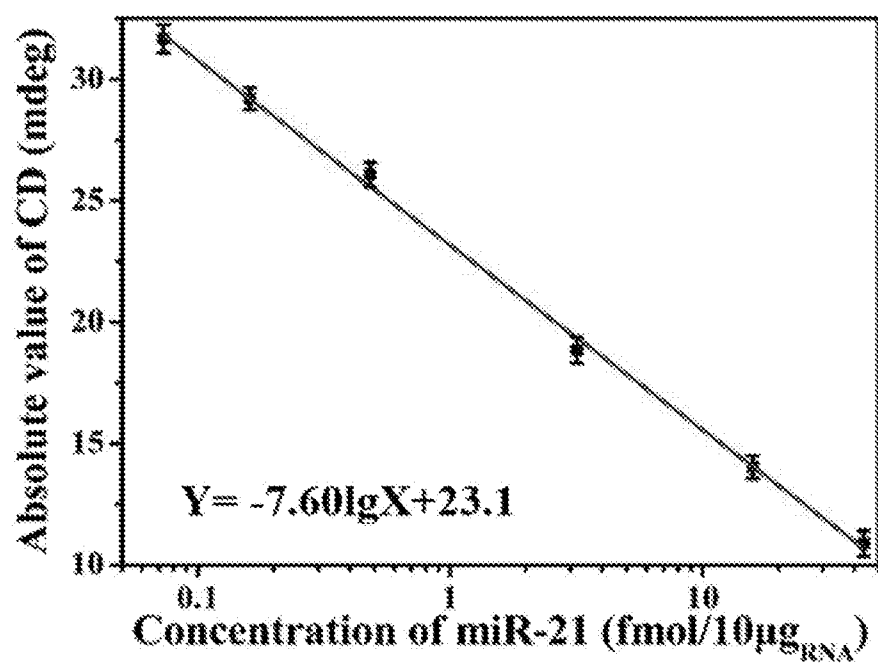


图 8

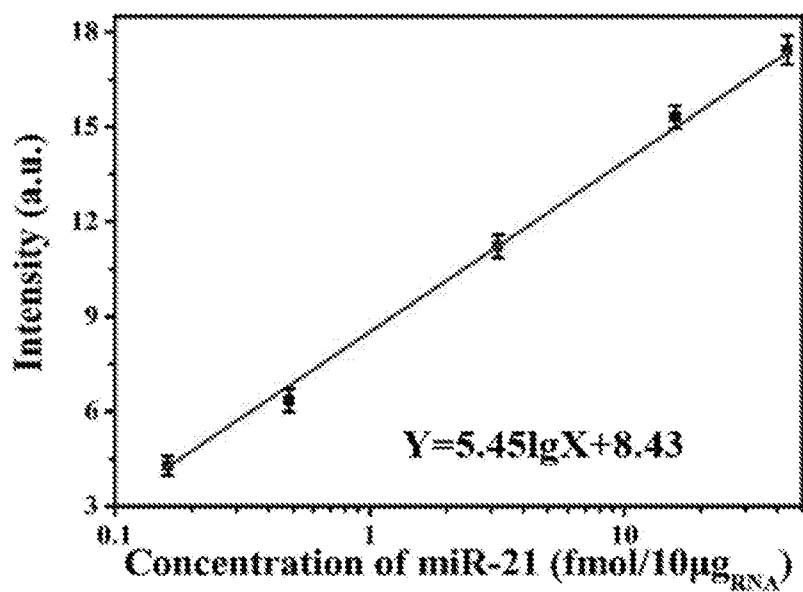


图 9

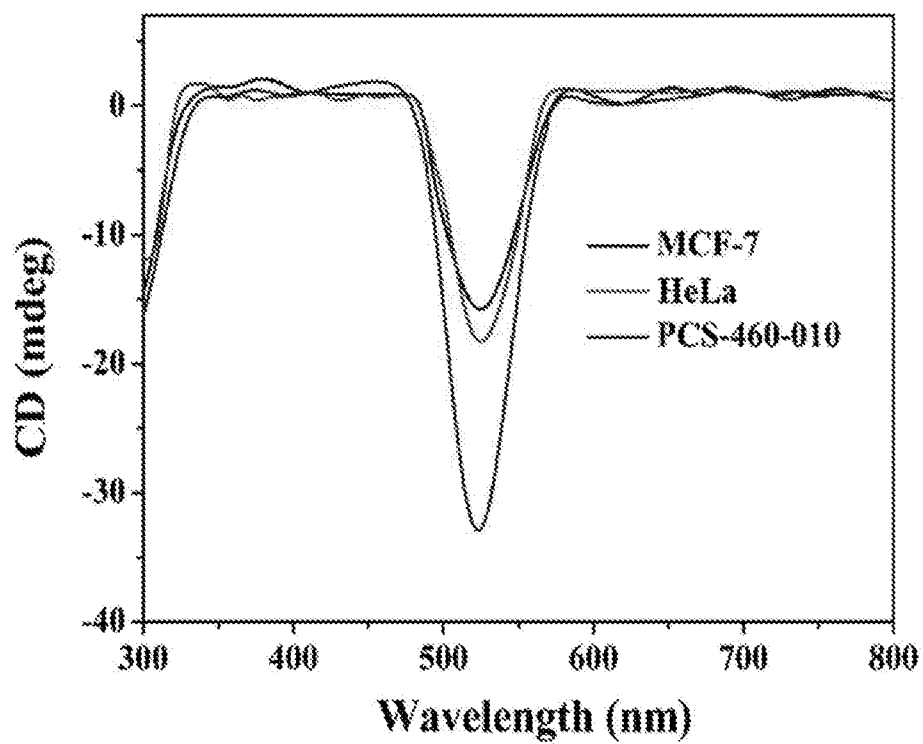


图 10

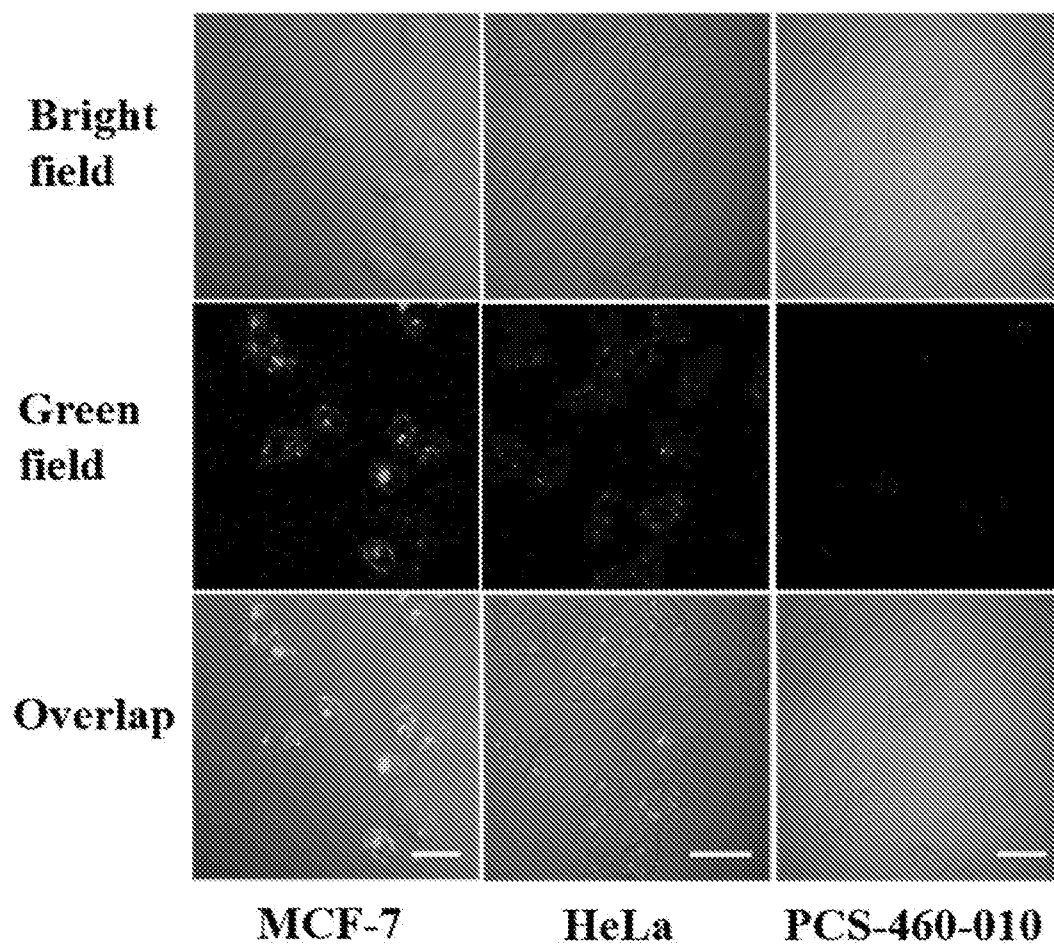


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/107101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/00 (2006.01) i; G01N 21/00 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i

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)

G01N; C12Q

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

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

DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI, Google Scholar, GenBank, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: 金, 纳米, 上转换, 小 RNA, 粒子, 颗粒, 偶联, 四面体, gold, nano, upconversion, particle, conjugate, bind, tetrahedron, microRNA, 权利要求 2 中所列序列的检索

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105366730 A (FUZHOU UNIVERSITY), 02 March 2016 (02.03.2016), description, paragraphs 7-12	1, 2, 4-6
PX	CN 106290873 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 04 January 2017 (04.01.2017), claims	1-6
A	CN 106498047 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 15 March 2017 (15.03.2017), entire document	1-6
A	CN 105366730 A (FUZHOU UNIVERSITY), 02 March 2016 (02.03.2016), entire document	3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 27 November 2017	Date of mailing of the international search report 19 January 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Qi Telephone No. (86-10) 62411036

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/107101

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

International application No.
PCT/CN2017/107101

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/107101

A. 主题的分类

G01N 33/00(2006.01)i; G01N 21/00(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i

按照国际专利分类(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)

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

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))

DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI, Google Scholar, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: 金、纳米、上转换、小RNA、粒子、颗粒、偶联、四面体、gold、nano、upconversion、particle、conjugate、bind、tetrahedron、microRNA、权利要求2中所列序列的检索

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
X	CN 105366730 A (福州大学) 2016年 3月 2日 (2016 - 03 - 02) 说明书第7-12段	1、2、4-6
PX	CN 106290873 A (江南大学) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 权利要求书	1-6
A	CN 106498047 A (江南大学) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 全文	1-6
A	CN 105366730 A (福州大学) 2016年 3月 2日 (2016 - 03 - 02) 全文	3

☐ 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 (如具体说明的)

“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

2017年 11月 27日

国际检索报告邮寄日期

2018年 1月 19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

张起

电话号码 (86-10)62411036

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☐ 含在申请提交时的国际申请中
- ☒ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/107101

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105366730	A	2016年 3月 2日	CN 105366730 B	2017年 4月 12日
CN	106290873	A	2017年 1月 4日	无	
CN	106498047	A	2017年 3月 15日	无	