



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107436317 A

(43)申请公布日 2017. 12. 05

(21)申请号 201710599870.9

(22)申请日 2017.07.21

(71)申请人 河南金泰生物技术股份有限公司
地址 450000 河南省郑州市经济技术开发
区航海东路1356号创业大厦A座509-
520室

(72)发明人 李贝贝 李梦臻 张芑芑 管希云
李华中

(51) Int. Cl.
G01N 27/327(2006.01)

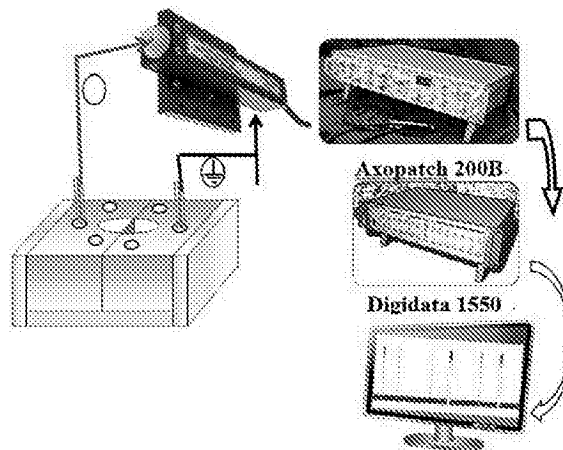
权利要求书1页 说明书3页 附图5页

(54)发明名称

一种利用纳米通道技术检测癌症的方法

(57)摘要

本发明提供一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,通过检测癌症相关的microRNA标志物,实现癌症的早期检测,以填补该项目研究领域的空白。经验证,采用本方法可以简单、快速的检测出肿瘤生物标志物microRNA,并可根据其阻塞时间、电流幅度等判断出microRNA的种类。



1. 一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,该方法需要用到一种样品池,样品池分为 cis 和 trans 两个隔室(B,B'),隔室之间由120 -159 μm 的 Toflon 薄膜隔离开,孔A与孔A'是用来第一次加液体和插入电极的,通过电极与膜片钳相连,将化学信号转化为电信号,之后液体的加入从下面三个小孔孔C和孔C'操作,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后分别从孔A和孔A'中注入超纯水;

(2) 取出磁子,倒出超纯水,并反复冲洗Toflon薄膜、腔室及孔洞,最后用无水乙醇冲洗;

(3) 冲洗干净后,用氮气将腔室内以及Toflon薄膜上残留的液滴吹干;

(4) 在Toflon薄膜两边靠近微米孔处分别加入H液,并迅速吹开,使其在膜上延展散开;

(5) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后,从孔A和孔A'分别用移液器加入缓冲液,再分别插入Ag/AgCl电极;

(6) 孔A的电极与探头的trans端相连,孔A'的电极与探头的cis端相连;

(7) 分别在腔室B和腔室B'中加入L液,迅速轻吹,使L液在液面上均匀地铺开,然后等待30s-1min;

(8) 从孔C和孔C'分别再加入缓冲液,观察是否形成磷脂双分子层,如形成,则进行后续实验;如未形成,则从孔C和孔C'端反复吹打几次,直至其形成磷脂双分子层;

(9) 在形成磷脂双分子层后,对系统施加电压,在孔B'中加入 α -溶血素溶液,并开启孔B'的搅拌系统,控制合适的转速,搅拌约2min,形成纳米通道;

(10) 形成纳米通道后,在孔B'中加入一定量的microRNA,开启搅拌系统,搅拌约5s后,开始收集检测信号。

2. 根据权利要求1所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(1)中超纯水添加量以液面高于微米孔为准,计算出所需超纯水的体积2mL。

3. 根据权利要求1和2所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(4)中加入的H液为10~15 μL ,H液为1mL戊烷与100 μL 十六烷的混合液。

4. 根据权利要求1和2所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(5)中加入的缓冲液包含10mM Tris和1M KCl,加入量为0.8~1.1mL。

5. 根据权利要求1和2所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(7)中加入的L液为15~25 μL ,L液为25mg磷脂与2.5mL戊烷的混合液。

6. 根据权利要求1和2所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(8)中加入的的缓冲液为10mM Tris,加入量为0.8~1.1mL。

7. 根据权利要求1和2所述的一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,其特征在于,步骤(9)中对系统施加的电压为+180V~+200V, α -溶血素溶液的终浓度为0.0125~0.145ng/mL。

一种利用纳米通道技术检测癌症的方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米通道基因测序技术领域,具体涉及一种利用纳米通道技术检测癌症的方法。

背景技术

[0002] 纳米通道检测技术是将 α 溶血素插入脂质双分子层中形成天然的纳米通道,纳米通道与两个流体池相连,对纳米通道两端电极施加电压时,可以产生一个恒定的基准离子电流。当核酸序列通过时,由于物理占位,将会改变纳米通道的电阻,电阻的变化将导致离子电流的变化,形成类似方波信号的调制电流。调制电流的波形与生物分子的物理信息直接相关,分析方波信号的幅度、持续时间,就能辨识核酸序列长度和类别,这可视为一种天然探测单分子的传感器(见图1)。microRNA发挥着致癌或者抑癌的作用,通过转录后调节机制,参与机体生理和病理过程,与肿瘤的发生、发展、转移及预后相关,可作为癌症的生物标志及治疗预后指标。利用纳米通道检测技术检测microRNA被认为是检测癌症领域的新发展方向之一,一旦获得实质性突破将会给医学检测带来一场技术性革新。本发明基于纳米通道检测技术,为快速、准确、低成本实现癌症早期诊断提供新的方法,以填补该项目研究领域的空白。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,通过检测癌症相关的microRNA标志物,实现癌症的早期检测。本发明提供详细的实验步骤以及最佳发应条件,以填补该项目研究领域的空白。本发明所采取的技术方案如下。

[0004] 一种利用纳米通道技术检测癌症的方法,该方法需要用到一种样品池,样品池分为cis和trans两个隔室(B,B'),隔室之间由120-159 μ m的Toflon薄膜隔离开。孔A与孔A'是用来第一次加液体和插入电极的,通过电极与膜片钳相连,将化学信号转化为电信号,之后液体的加入从下面孔C和孔C'操作。该方法包括以下步骤:

(1) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后分别从孔A和孔A'中注入超纯水,以液面高于微米孔为准,计算出所需超纯水的体积2mL;

(2) 取出磁子,倒出超纯水,并反复冲洗Toflon薄膜、腔室及孔洞,最后用无水乙醇冲洗;

(3) 冲洗干净后,用氮气将腔室内以及Toflon薄膜上残留的液滴吹干;

(4) 然后,在Toflon薄膜两边靠近微米孔处分别滴上一滴约10~15 μ L H液,并迅速吹开,使其在膜上延展散开。其中,H液为1mL戊烷与100 μ L十六烷的混合液;

(5) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后,从孔A和孔A'分别用移液器加入0.8~1.1mL 含10 mmol/L Tris和1 mol/L KCl缓冲液,再分别插入Ag/AgCl电极;

(6) 然后,孔A的电极与探头的trans端相连,孔A'的电极与探头的cis端相连;

(7) 用25 μ L的微量移液器分别在腔室B和腔室B'中加入15~25 μ L L液,使L液在液面上均

匀地铺开,然后等待30s-1min。其中,L液为25mg磷脂与2.5mL戊烷的混合液迅速轻吹;

(8)从孔C和孔C'的中分别再加入0.8~1.1mL的10 mmol/L Tris缓冲液,观察是否形成磷脂双分子层,如形成,则进行后续实验;如未形成,则从孔C和孔C'端反复吹打几次,直至其形成磷脂双层;

(9)在形成磷脂双分子层后,对系统施加电压+180 mV~+200 mV,在孔B'中加入 α -溶血素溶液其终浓度为0.0125~0.145ng/mL,并开启孔B'的搅拌系统,控制合适的转速,搅拌约2min,形成纳米单通道;

(10)形成纳米通道后,在孔B'中加入一定量的microRNA,开启搅拌系统,搅拌约5s后,开始收集检测信号。

[0005] 经验证,采用本方法可以简单、快速的检测出肿瘤生物标志物microRNA,并可根据其阻塞时间、电流幅度等判断出microRNA的种类。

附图说明

[0006] 图1纳米通道技术原理示意图。

[0007] 图2 样品池结构示意图。

[0008] 图3 纳米通道检测Mir-31:(左)典型的单通道信号记录 (右)对应的散点图。

[0009] 图4 不同的核酸样品与平均阻滞时间图。

[0010] 图5 纳米通道检测Mir-31:(左)典型的单通道信号记录 (右)对应的散点图。

[0011] 图6 不同浓度Mir-31的电流振幅直方图与浓度曲线图。

具体实施方式

[0012] 下面以乳腺癌为例对本发明做进一步的解释说明。

[0013] 介绍具体实施例前,对本发明所用到的主要仪器设备和试剂介绍如下。

[0014] 主要设备:单探头超低噪声膜片钳放大器: Axopatch 200B,美国MD公司(Axon);

Axon Digidata1550B数据采集系统: 1550B0/B1/B4,美国MD公司(Axon);

防震台: TS/TM,上海亿奥信息光学科技有限公司;

高速离心机: JW-3021H,安徽嘉文仪器装备有限公司;

电子天平: BSA124S-CW,北京赛多利斯科学仪器有限公司;

超纯水机: smart-N30uV,上海康雷分析仪器有限公司;

pH计: UB-7,北京赛多利斯科学仪器有限公司。

[0015] 主要试剂:卵磷脂:西格玛奥德里奇贸易有限公司 批号 850356-03-145;

正戊烷:西格玛奥德里奇贸易有限公司 批号 SZBD300BV;

十六烷:西格玛奥德里奇贸易有限公司 批号 SHBD8135V;

Tris:北京索莱宝科技有限公司 批号1120I0712;

α 溶血素:西格玛奥德里奇贸易有限公司 批号124M4065V;

氯化钾:天津市科密欧化学试剂有限公司 批号 20160305。

[0016] 1、乳腺癌生物标记物的查找与确定

查找乳腺癌相关的MicroRNA标志物有miR-31,miR-21,miR-200c,miR-145,miR-21,miR-147,miR-10b,miR-34a,miR-195,let-7a,miR-205,miR-373,miR-520。本实验选取

MicroRNA标志物miR-31进行检测。

[0017] 2、基于纳米单通道对乳腺癌生物标记物的检测

实验需要使用样品池,如图2示,样品池分为cis和trans两个隔室(B,B'),隔室之间由120-159 μm 的Toflon薄膜隔离开。孔A与孔A'是用来第一次加液体和插入电极的,之后液体的加入从下面三个小孔C和孔C'操作。实验步骤如下:

(1) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后分别从孔A和孔A'中注入超纯水,以液面高于微米孔为准,计算出所需超纯水的体积2mL;

(2) 取出磁子,倒出超纯水,并反复冲洗Toflon薄膜、腔室及孔洞,最后用无水乙醇冲洗;

(3) 冲洗干净后,用氮气将腔室内以及Toflon薄膜上残留的液滴吹干;

(4) 然后,在Toflon薄膜两边靠近微米孔处分别滴上一滴约10 μL H液,并迅速吹开,使其在膜上延展散开;

(5) 在腔室B和腔室B'中分别放入磁子,然后,从孔A和孔A'分别用移液器加入1mL 含10 mmol/L Tris,1 mol/L KCl缓冲液,再分别插入Ag/AgCl 电极;

(6) 然后,孔A的电极与探头的trans端相连,孔A'的电极与探头的cis端相连;

(7) 用25 μL 的微量移液器分别在腔室B和腔室B'中滴加1-2滴约15 μL L液,迅速轻吹,使L液在液面上均匀地铺开,然后等待30s-1min;

(8) 随后,从孔C和孔C'中分别再加入1mL缓冲液,观察是否形成磷脂双分子层,如形成,则进行后续实验;如未形成,则从孔C和孔C'端反复吹打几次,直至其形成磷脂双层;

(9) 在形成磷脂双分子层后,对系统施加电压+180mV,在孔B'中加入 α -溶血素溶液其终浓度为0.0125ng/mL,并开启孔B'的搅拌系统,控制合适的转速,搅拌约2min,形成纳米单通道;

(10) 形成纳米单通道后,在孔B'中加入一定量的microRNA,开启搅拌系统,搅拌约5s后,开始收集检测信号。

[0018] 3、检测结果与分析

(1) 如图3、图4所示,成功检测了Mir-31、一个碱基错配的Mir-31及组成Mir-31的probe与Target,结果表明不管是probe、Target还是一个碱基错配都与Mir-31有不同时间和电流,该方法都能将其准确快速地检测并与标记物区分开;

(2) 如图5所示,同样做了区分Mir-31的前配与后配实验,实验结果表明不管probe与Target前端相配还是后端相配,由于进入通道的端位不同,其检测信号都有两种结果,都能与Mir-31区分开来;

(3) 如图6所示,成功检测了不同浓度的Mir-31,最低浓度可测0.01 nmol/L,并做出其浓度曲线。

[0019] 综上所述,基于纳米通道在1 mol/L KCl、10 mmol/L Tris的缓冲液(pH 7.5)中检测乳腺癌标志物Mir-31,实验中对其做了对比实验、干扰试验等。实验结果表明:本方法能成功将Mir-31检测,并且对其做了浓度梯度实验,最低检测浓度可以达到0.01 nmol/L。

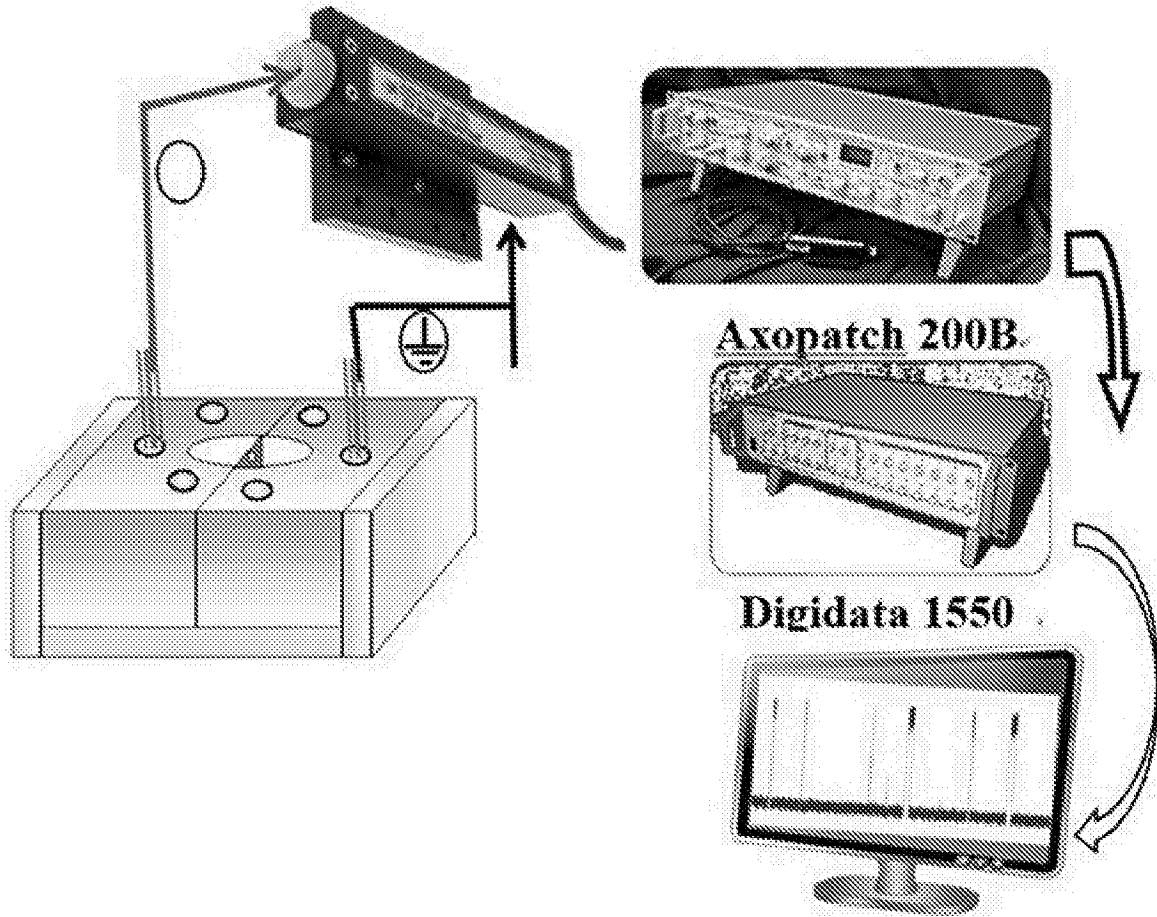


图1

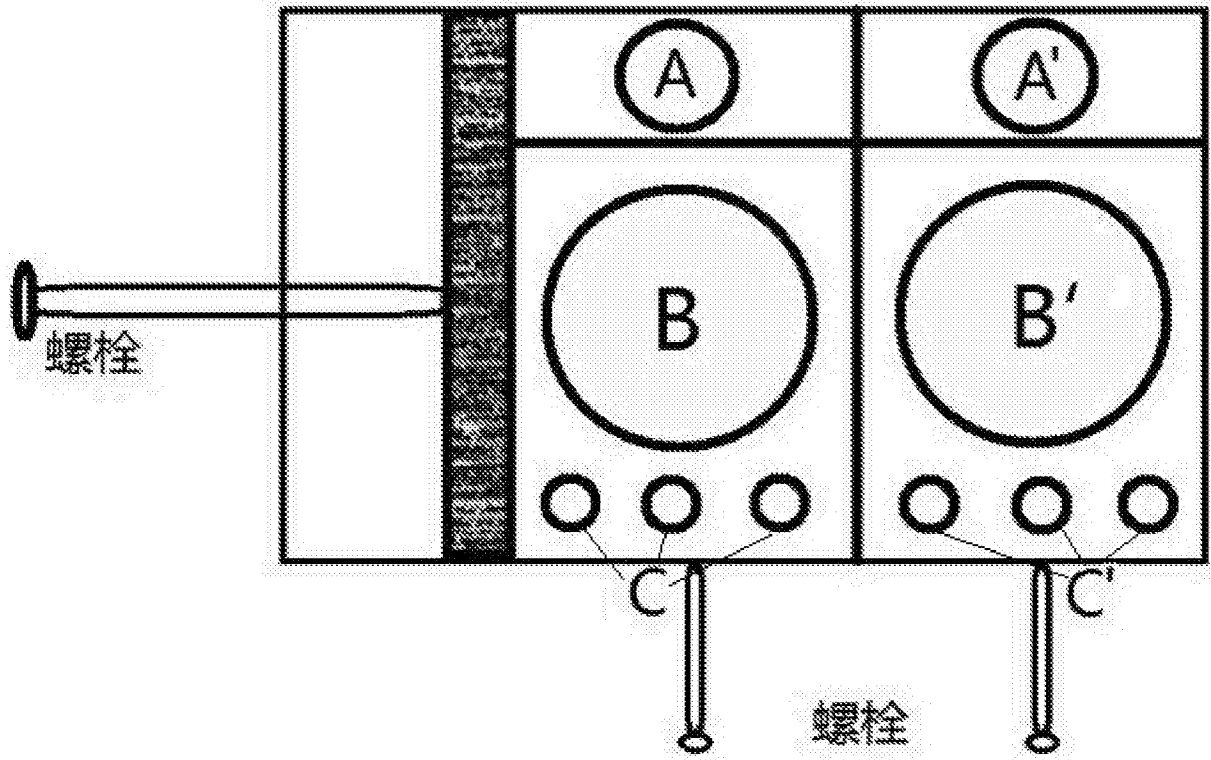


图2

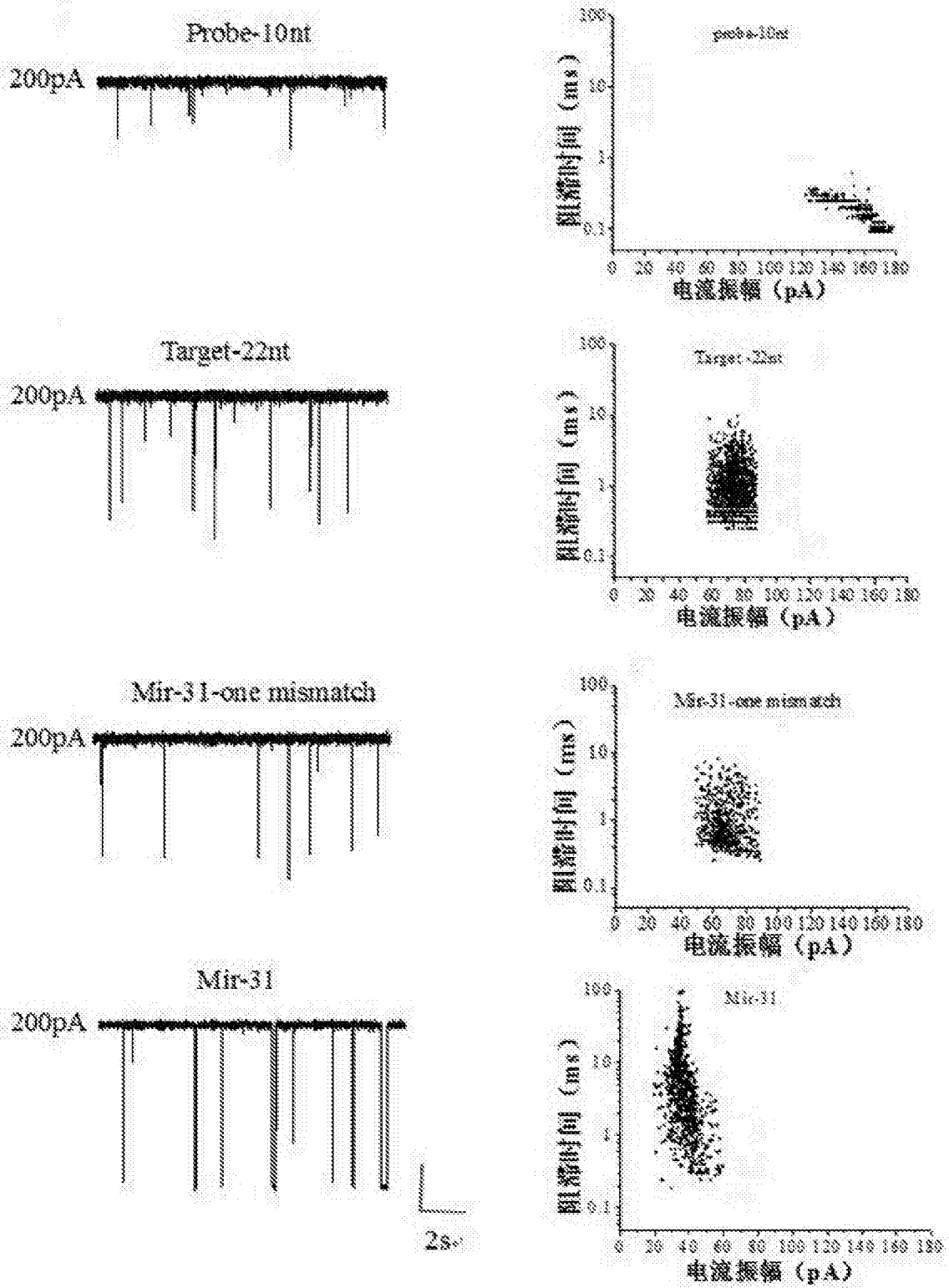


图3

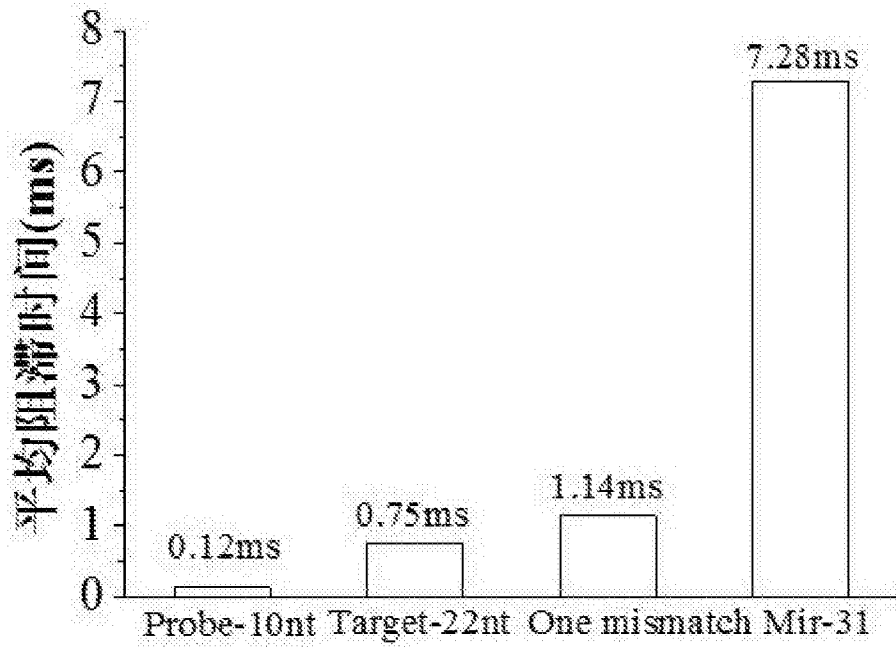


图4

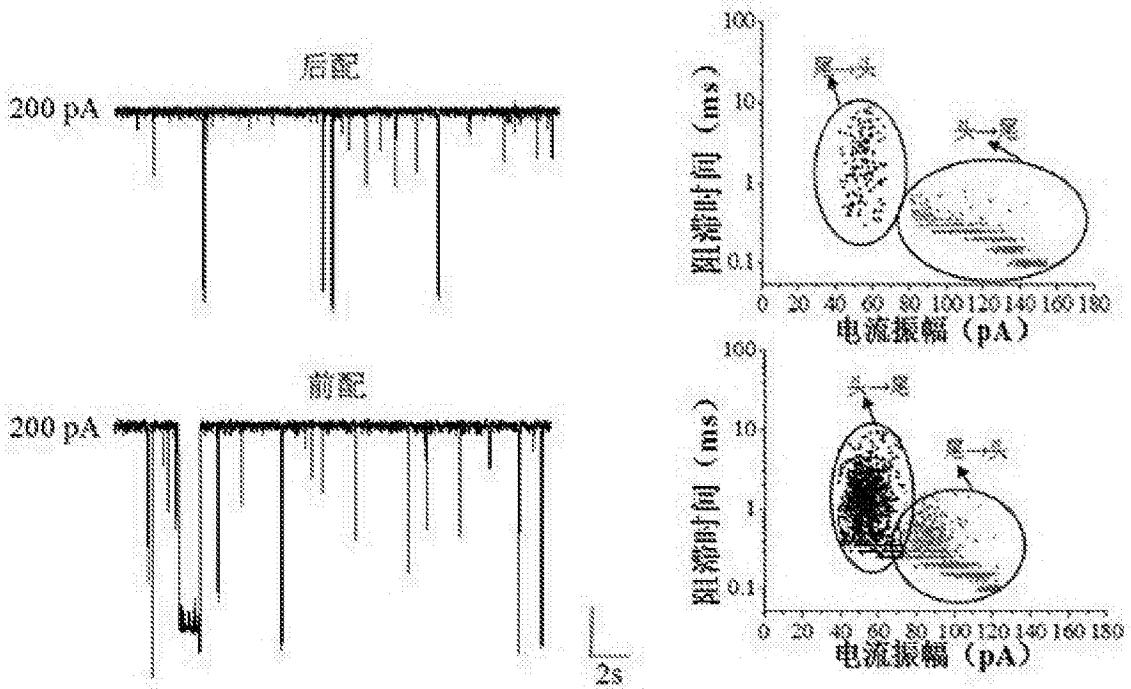


图5

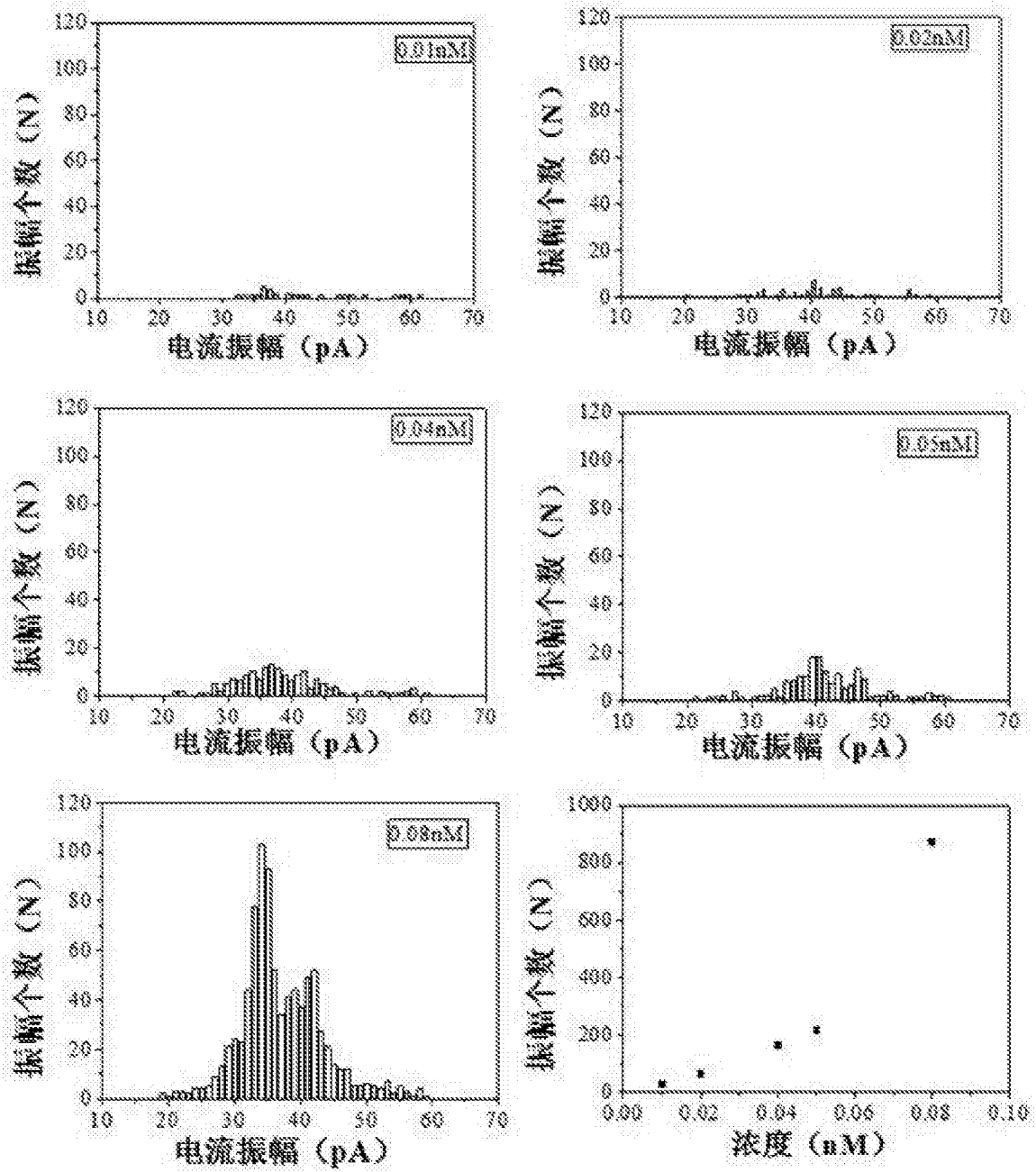


图6