



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109030429 B

(45) 授权公告日 2022. 06. 21

(21) 申请号 201710445317.X

(22) 申请日 2017.06.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109030429 A

(43) 申请公布日 2018.12.18

(73) 专利权人 南京大学
地址 210023 江苏省南京市栖霞区仙林大道163号南京大学

(72) 发明人 丁霖 鞠焜先 霍敏

(51) Int. Cl.
G12Q 1/6876 (2018.01)

(56) 对比文件
CN 102625696 A, 2012.08.01
US 2015252358 A1, 2015.09.10
KR 20160064723 A, 2016.06.08

陈新 等. 基于PCR技术的miRNA定量检测方

法.《中国生物工程杂志》.2010,第30卷(第11期),第88-93页.

Nicholas E. Larkey 等.Detection of miRNA Using a Double-Strand Displacement Biosensor with a Self-Complementary Fluorescent Reporter.《Analytical Chemistry》.2014,第86卷(第3期),第1853-1863页.

Filippo Causa 等.Supramolecular spectrally encoded microgels with double strand probes for absolute and direct miRNA fluorescence detection at high sensitivity.《Journal of the American Chemical Society》.2015,第137卷(第5期),第1758-1761页.

审查员 张维景

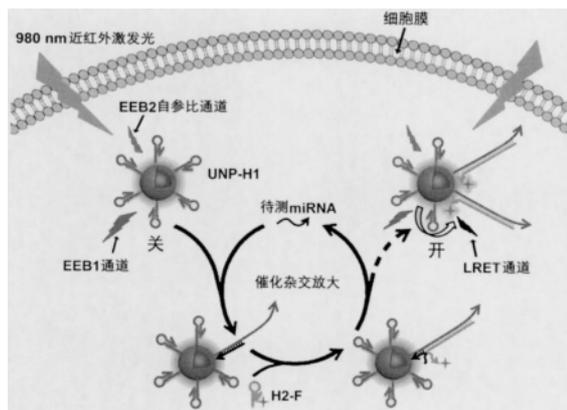
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种可对活细胞内microRNA21进行原位成像的纳米放大自参比探针

(57) 摘要

本发明涉及一种对活细胞内microRNA (miRNA) 原位成像的纳米放大自参比探针及其制备方法。该探针是将核酸发卡修饰的上转换纳米粒子 (UNP-H1) 和荧光分子修饰的发卡分子 (H2-F) 通过脂质体包裹而成。当探针进入细胞后, UNP-H1和H2-F被释放, 只有当H1与miRNA杂交后, H2可以取代miRNA而与UNP-H1杂交, 释放出的miRNA启动下一个循环以放大信号。在近红外光激发下, UNP的发射带1 (EEB1) 与F之间发生发光共振能量转移 (LRET)。以UNP的发射带2 (EEB2) 通道为自参比, LRET与EEB2通道的发光强度比值 (I_{LRET}/I_{EEB2}) 可用于细胞内miRNA的相对定量。



1. 一种可对活细胞内microRNA21进行原位成像的纳米放大自参比探针,其特征为,将核酸修饰的上转换纳米粒子UNP-H1和荧光染料修饰的发卡分子H2-F两个组分通过脂质体包裹形成所述纳米放大自参比探针,H1与H2为催化杂交组装发卡对,只有当H1被待测microRNA21打开后才能与H2杂交并释放出microRNA21,UNP为具有多波长发射能力的羧基修饰的上转换纳米粒子,H1的序列为5' -NH₂-TCAACATCAGTCTGATAAGCTACCATGTGTAGATAGCTTATCAGACT,H2-F为TAAGCTATCTACACATGGTAGCTTATCAGACTCCATGTGTAGA-F-3',H1的5'端修饰有氨基,可共价连接UNP表面的羧基,H2的3'端修饰荧光分子F,F的吸收峰与UNP的任一发射峰重叠。

2. 根据权利要求1所述的探针,其特征在于,探针进入细胞后,释放UNP-H1和H2-F,只有当待测microRNA21存在时,UNP-H1和H2-F才会杂交生成UNP-H1/H2-F复合物,在980nm近红外光照射下,与F吸收峰重叠的UNP的发射带EEB1与F之间产生发光共振能量转移LRET信号,实现“关-开”转换,用共聚焦显微镜观察LRET通道的发光信号来实现活细胞内microRNA21的原位成像。

3. 根据权利要求1或2所述的探针,其特征在于,在980nm近红外光照射下,UNP可同时产生包含发射带EEB1和自参比通道EEB2的多个互不干扰的发射带,利用EEB2作为参比对LRET信号进行校正,LRET通道与EEB2通道的信号比值 I_{LRET}/I_{EEB2} 与细胞内microRNA21的浓度成正比,可用于不同细胞内microRNA21的相对定量比较,并可克服成像仪器参数波动造成的信号不稳定。

4. 根据权利要求1或2所述的探针,其特征在于,单个待测microRNA21可以循环使用,生成多个UNP-H1/H2-F复合物,从而对LRET信号进行放大,实现细胞内低浓度待测microRNA21的成像检测。

5. 根据权利要求1或2所述的探针,其特征在于,由于UNP可以保护其负载的核酸耐受细胞内核酸酶的影响,基于LRET过程的信号开关避免了假阳性信号,980nm近红外激发排除了细胞自荧光的影响,从而使该探针对microRNA21的检测具有高特异性。

一种可对活细胞内microRNA21进行原位成像的纳米放大自参 比探针

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种对细胞内microRNA原位成像的纳米放大自参比探针及其制备方法。

二、背景技术

[0002] MicroRNA (miRNA) 作为一种重要的肿瘤标志物,它在细胞中的分布和表达水平与癌症的发生发展有着重要关联。因此,实现细胞内miRNA的原位成像和检测对于肿瘤的早期诊断和预后监测都有着重大意义。常用于细胞内miRNA成像的探针主要分为两类:分子信标(MB)和核酸功能化纳米探针。然而它们在细胞内miRNA的成像检测中不能全面解决以下3个难题:(1)细胞内低丰度的miRNA信号难以实现有效放大;(2)核酸探针稳定性差,容易被细胞内的核酸酶降解而导致假阳性信号的产生;(3)由于缺少内参,实验中获取的信号强度受仪器参数波动的影响,很难保持数据的稳定和可靠性。因此,发展用于活细胞内microRNA原位成像的纳米放大自参比探针具有重要的意义。

[0003] 本发明将上转换纳米粒子(UNP)与“催化杂交组装”(CHA)无酶信号放大技术结合起来,制备了包含核酸修饰的上转换纳米粒子(UNP-H1)和荧光染料修饰的发卡分子(H2-F)的纳米放大自参比探针。CHA可以实现信号放大,提高了待测miRNA的检测灵敏度。UNP需要用近红外光激发,从而消除了细胞自荧光。UNP对于其上负载的核酸分子具有保护作用,使其耐受核酸酶的降解,因此可以解决纳米探针稳定性的问题。同时,UNP单激发多发射的特点,使得可以使用其中一个发射通道作为参比通道而实现检测信号的校正,提高方法的稳定性。

三、发明内容

[0004] 本发明的目的是:构建可对活细胞内待测miRNA产生响应的纳米放大自参比探针,当待测miRNA存在时,引发CHA放大过程,探针的2个组件UNP-H1和H2-F杂交生成UNP-H1/H2-F复合物,UNP的发射带1(EEB1)与F产生发光共振能量转移(LRET)信号,从而以miRNA21分子(miR21)为检测对象实现了活细胞内miRNA的原位成像。通过自参比通道EEB2对LRET通道进行校正,利用LRET通道与EEB2通道的信号比值(I_{LRET}/I_{EEB2})与miRNA浓度成正比的关系,实现了对不同细胞中miR21的相对定量比较。

[0005] 本发明提出的探针的制备过程如图1所示。以聚丙烯酸(PAA)修饰的UNP(UNP-PAA)作为载体,通过共价作用在其表面连接氨基修饰的发卡H1,制得UNP-H1。然后将UNP-H1与H2-F共同包裹在脂质体囊泡(lipo-3000)中,制得用于活细胞内miRNA成像的探针。

[0006] 本发明通过以下技术方案来实现:

[0007] 1) H1的核苷酸序列为 5'-NH₂-TCAACATCAGTCTGATAAGCTACCATGTGTAGATAGCTTATCAGACT。如图1所示,在N-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)存在下,将UNP-PAA表面的羧基利用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)活化,将H1发卡分子通过5'端氨基的共价

作用修饰到UNP-PAA表面,形成结构稳定的UNP-H1。

[0008] 2) H2-F的核苷酸序列为TAAGCTATCTACACATGGTAGCTTATCAGACTCCATGTGTAGA-F-3', 3'端修饰的荧光分子F的吸收峰位置与任一UNP发射峰位置重合,将UNP-H1、H2-F分子与lipo-3000温育,制得包裹了2种组分的探针。

[0009] 本发明的工作原理:

[0010] 本发明的工作原理如图2所示。所述的可对细胞内miRNA原位成像的探针包含核酸修饰的上转换纳米粒子UNP-H1和荧光染料修饰的发卡分子H2-F两个组分。探针进入细胞后可将两个组分释放。在没有待测miRNA存在时,两个组分彼此不杂交。在待测miRNA存在时,待测miRNA与H1杂交,破坏了H1的发卡结构,使得H1暴露和H2的互补结构域,由于H2-H1的稳定性大于miRNA-H1的稳定性,H2会竞争取代下待测miRNA,形成UNP-H1/H2-F复合物。在980nm近红外光激发下,UNP的EEB1发射通道与F吸收峰重叠,通过发光共振能量转移,产生LRET信号,用于指示细胞内miRNA的分布。释放出的miRNA可以启动下一个CHA循环以实现信号放大。以UNP另一个不受影响的EEB2通道的信号强度作为自参比对LRET信号进行校正, LRET通道与EEB2通道信号的比值(I_{LRET}/I_{EEB2})与待测miRNA的浓度成正比,可以用于不同细胞内miRNA的相对定量比较,并且克服了不同细胞内环境不同和仪器参数波动的影响。

[0011] 与现有技术相比,本发明具有以下特点:

[0012] 本发明基于UNP的单激发多发射优势、对核酸的保护作用和CHA方法对于信号的放大,制备用于活细胞内miRNA成像和相对定量的探针。该探针可用于不同细胞内miRNA的相对定量比较,以及药物作用下miRNA表达变化的监测。与已有细胞内miRNA成像方法相比,本发明具备以下优点:

[0013] 1. 本发明所用的UNP和各类核酸发卡分子的合成均为已成熟的技术,相关制备过程操作简单,因而可快速大量制备该探针;

[0014] 2. 本发明设计的核酸修饰UNP具有稳定的球形核酸结构,不仅适用于溶液中miRNA的检测,特别适用于复杂的细胞体系中miRNA的原位高灵敏成像检测;

[0015] 3. 本发明所用的UNP具有单近红外激发多发射的优点,无细胞自荧光的干扰,利用LRET的信号产生进行miRNA的检测提高了检测特异性。同时利用UNP未发生能量转移的其它通道作为自参比通道对LRET信号进行校正,实现了在不同细胞体系和仪器环境中可靠的荧光成像和相对定量检测;

[0016] 4. 本发明所用的纳米探针具有CHA信号放大机制,一个待测miRNA可触发多个信号复合物的生成,提高了miRNA检测的灵敏度;

[0017] 5. 本发明所用的探针具有模块化特点,针对不同的miRNA,可以通过改变H1、H2对应结构域中的碱基序列来实现成像检测,比一般miRNA检测体系具有更广的适用范围和应用价值。

四、附图说明

[0018] 图1. 纳米放大自参比探针制备方法图

[0019] 图2. 纳米放大自参比探针用于细胞内miRNA成像检测的原理图

五、具体实施方式

[0020] 实施例1:结合图1,制备探针。

[0021] 该探针制备过程分为2步:1) UNP-H1的制备,2) 利用lipo-3000包裹UNP-H1与H2-F制得探针。

[0022] 1) UNP-H1制备:以活细胞内miR21为检测对象,H1的核苷酸序列为 5'-NH₂-TCAACATCAGTCTGATAAGCTACCATGTGTAGATAGCTTATCAGACT;H2-F为 TAAGCTATCTACACATGGTAGCTTATCAGACTCCATGTGTAGA-F-3'。UNP以 NaYF₄:Er/Gd/Yb@NaGdF₄为例,EEB1在530-560nm,EEB2在640-670nm。F以AF555为例,其吸收峰与EEB1重叠。向200μL含有1mg/mL PAA-UNP的PBS溶液中迅速加入15.3mg EDC(终浓度为0.4μM)和4.34mg sulfo-NHS(终浓度为0.1μM),在室温下振荡4h。通过离心除去多余的EDC和sulfo-NHS,并再分散为200μL,制得羧基活化的PAA-UNP。随后向上述溶液加入H1,使终浓度为10μM。在室温下振荡3h,通过PBS离心洗涤三次之后制得UNP-H1。

[0023] 2) 纳米放大自参比探针制备:将45μL UNP-H1(1mg/mL,33nM)、0.9μL H2-F(100μM)与55μL 无血清的培养基在一个离心管中混合,孵育5min。在另一个离心管中,将0.75μL lipo-3000溶解于50μL 无血清的培养基中,同样孵育5min。再将以上两种溶液共同在37°C下孵育15min,使得lipo-3000能够将UNP-H1和H2-F共同包裹,从而制得纳米放大自参比探针。

[0024] 实施例2:结合图2,利用该纳米放大自参比探针进行活细胞内miRNA的原位成像和相对定量检测。

[0025] 以MDA-MB-231乳腺癌细胞的miR21检测为例,将0.5mL浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液种在20-mm四孔共聚焦培养皿中,培养24h。然后将上述制得的纳米放大自参比探针加入培养皿中(150μL/孔),与细胞共同孵育6h后,在980nm近红外光激发下,利用激光共聚焦荧光显微镜对LRET通道进行成像,可以获得待测miRNA在癌细胞中的荧光分布图。通过共聚焦软件分别读取单个细胞区域LRET和 EEB2通道的信号强度,并计算其比值($I_{\text{LRET}}/I_{\text{EEB2}}$),此比值代表细胞内待测miRNA的表达水平。将探针分别与不同种类的肿瘤细胞(MDA-MB-231、HeLa,MRC-5)温育后,测得各种细胞的 $I_{\text{LRET}}/I_{\text{EEB2}}$,可进行不同细胞内待测miRNA的相对定量比较。

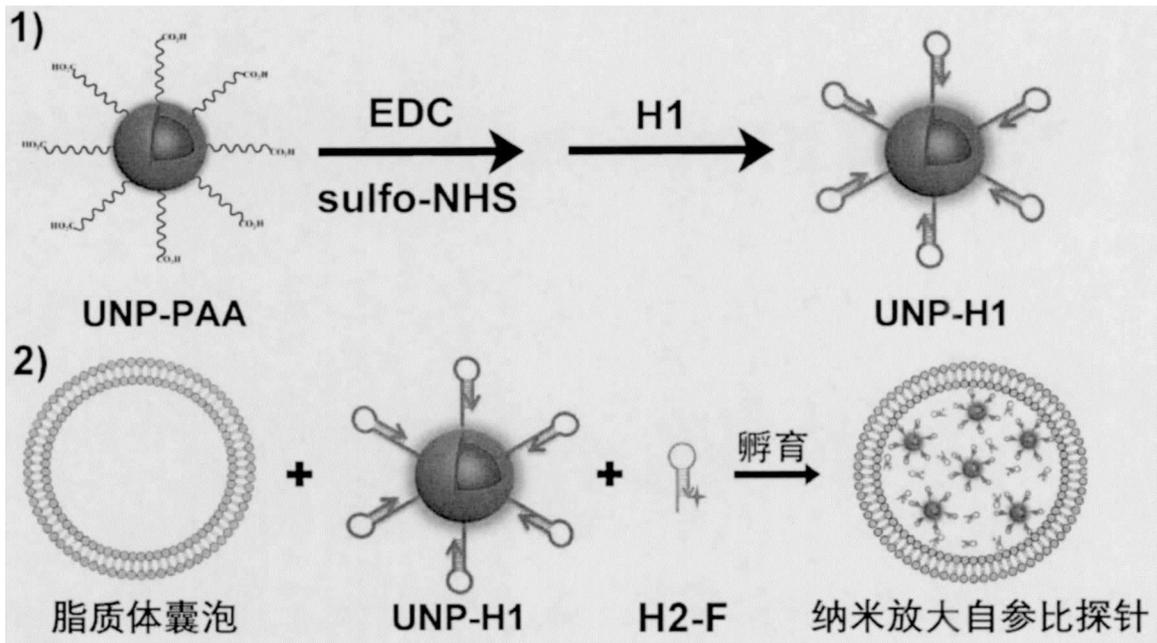


图1

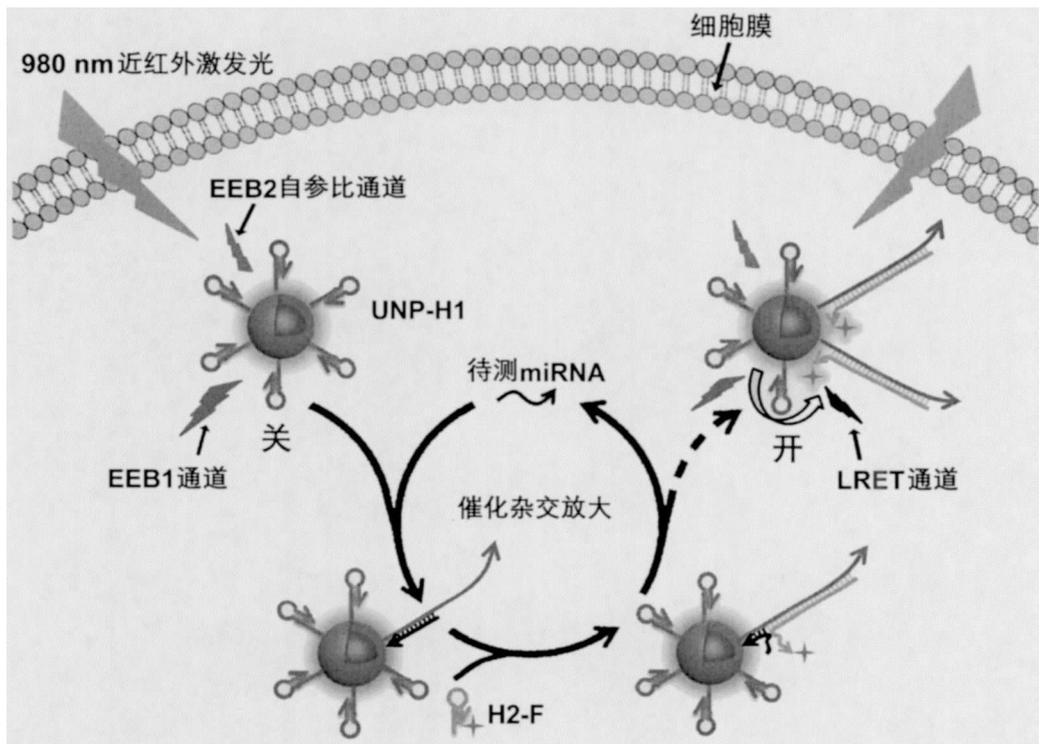


图2