论文

DNA 功能化纳米金结合基因芯片可视化检测 microRNAs

王萍^{①②}, 赵建龙^①, 胡斌^③, 程祖乐^{②④}, 白亚楠^{②④}, 金庆辉^②, 刘慧颖^⑤, 毛红菊^{②*},
李三强^{①*}, 赵建龙^{②*}

① 河南科技大学医学院, 肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, 洛阳 471003;

② 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050;

③ 上海徐汇中心医院, 生物传感技术临床研究中心, 上海 200040;

④ 中国科学院大学, 北京 100049;

⑤ 大连医科大学口腔医学院, 口腔修复教研室, 大连 116023

* 联系人, E-mail: hjmao@mail.sim.ac.cn; sanqiangli2001@163.com; jlzhao@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2015-09-23; 接受日期: 2015-10-23; 网络版发表日期: 2016-01-28

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB933303)、国家自然科学基金(批准号: 61571429, 61571077, 61401442)、河南科技大学创新团队(批准号: 2015XTD003)、上海市科委生物医药项目(批准号: 12441902600, 1402H233900)和中国科学院上海临床研究中心/上海徐汇中心医院项目(批准号: BRC2012002)资助

摘要 开发了一种纳米金探针结合基因芯片用于 microRNAs(miRNAs)检测的高灵敏度便携式生物传感器。靶标 miRNAs 特异性捕获探针固定在芯片上, 通过与纳米金探针杂交进行检测, 最后利用过氧化氢(H_2O_2)还原四氯金酸($HAuCl_4$)来放大检测信号。利用单个纳米金探针结合基因芯片可以检测到 10 pmol/L 的靶标 miRNAs, 测得 miR-126 在胎牛血清中的回收率为 81.5%~109.1%。用这种生物传感器检测肺癌组织样本总 RNA 中的 miR-126, 结果与定量 PCR 结果具有一致性。利用双纳米金探针进一步提高了检测灵敏度, 可以检测到 1 fmol/L 的 miR-125a-5p。整个分析时间不超过 1 h, 并且实验结果可以用肉眼观察。这个平台可以同时检测肺癌相关 miR-126 和 miR-125a-5p, 并且具有费用低、快速和便捷的优势, 有望用于 miRNAs 的超灵敏可视化检测。

关键词 microRNA, 纳米金, 基因芯片, 生物传感器, 可视化检测

MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性和高保守的非编码小分子 RNA(长度约 21~25 个核苷酸), 它们主要通过靶 mRNAs 的 3'非编码区(3' untranslated regions, UTRs)互补来调节基因的表达^[1-3]。miRNAs

表达水平的改变与多种疾病密切相关, 尤其是肿瘤。miRNAs 的检测对于疾病的早期诊断以及发现药物新靶标具有重要作用。然而, 由于 miRNAs 分子序列短小, 在体液中丰度较低以及 miRNA 家族成员之间

引用格式: 王萍, 赵建龙, 胡斌, 等. DNA 功能化纳米金结合基因芯片可视化检测 microRNAs. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 314-320, doi: 10.1360/05SCLS-2015-0233.R3

英文版见: Wang P, Zhao J L, Hu B, et al. Chip-based visual detection of microRNA using DNA-functionalized gold nanoparticles. Sci China Life Sci, 2016, 59, in press, doi: 10.1007/s11427-015-4987-0

的同源性高,使得 miRNAs 的研究具有挑战性^[4~7]. Northern blot 是检测 miRNAs 最常用的方法^[8,9],然而,它具有灵敏度较低、操作繁琐和耗时的缺点,限制了其在临床研究中的应用. 实时定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)具有线性范围宽和灵敏度高的优点,但它需要精确的温控条件,并且 miRNAs 的序列短小使得引物设计比较复杂^[7,10~12]. 基于电化学的检测方法具有很高的灵敏度^[13~16],但是这种方法很难实现多个 miRNAs 靶标的同时检测. 因此,有必要发展一种具有灵敏度高、操作简单并且成本低的 miRNAs 检测方法.

传统的基因芯片技术利用荧光标记的探针进行检测^[17~19]. 它不仅需要昂贵的仪器而且需要经验丰富的操作人员来读取和分析杂交信号,因此应用受到限制^[20]. 纳米材料的兴起为生物医学研究和临床应用提供了新的机遇^[21,22]. 例如,纳米金具有依赖于尺寸和形状的光学和电学特性、比表面积大、良好的生物相容性以及表面可以修饰各种基团等性质^[23],使得它在生物检测中具有重要应用价值. 利用核苷酸修饰的纳米金探针结合 DNA 芯片可以用于 DNA 的检测^[24,25],与传统的荧光检测体系相比,这种方法大大提高了检测的灵敏度. 同样,利用纳米金探针和具有拉曼活性的染料分子可以检测靶标核酸^[26]. 拉曼

标签可以作为窄带光谱指纹,检测限为 20 fmol/L. 这些结果说明纳米金结合基因芯片在核酸分子检测中具有很高的灵敏度.

本研究开发了一种纳米金探针结合基因芯片用于 miRNAs 检测的高灵敏度便携式生物传感器. 如图 1 所示,氨基修饰的核苷酸(捕获探针)通过希夫碱反应固定在醛基化的芯片上. 接着,在反应体系中加入靶标 miRNAs、报告探针和纳米金探针,它们可以通过碱基互补配对结合在芯片上. 最后,加入由四氯金酸(tetrachloroauric (III) acid, HAuCl_4)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)和 2-吗啉乙磺酸(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES)组成的增强反应液, H_2O_2 可以在 MES 缓冲液中将 HAuCl_4 还原为 Au^0 . 增强反应的过程可以视为一个自催化反应: 纳米金作为成核位置催化金离子还原为金原子. 还原反应的产物沉积在芯片上,并且反应结果肉眼可见.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

四氯金酸三水合物($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)购自比利时 Acros 公司; 2-吗啉乙磺酸(MES)购自美国 Sigma 公司; 15 nm 的纳米金溶液购自上海水源生物公司; RNA 酶

图 1 纳米金探针结合基因芯片检测 miRNAs 示意图(网络版彩图)

抑制剂购自美国 ABI 公司. 实验所需核苷酸均在 TaKaRa 公司合成(表 1). 所用试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水(电阻率大于 18.3 MΩ/cm).

ProSys-5510 型芯片点样仪(美国 Cartesian Technology 公司)用于将捕获探针点到芯片上; JascoV-670 型紫外-可见光光谱仪(日本)用于测定紫外-可见吸收光谱; 实验图片用连有 DP-70 数码相机和 DP controller 软件(日本 Olympus 公司)的 BX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)拍摄.

1.2 纳米金探针的制备

纳米金粒子的形态用透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 进行观察. 用 0.2 mol/L 的 K₂CO₃ 将纳米金溶液的 pH 调至 8.2~8.5. 8603×g, 离心 50 min, 弃上清, 加入检测探针至其浓度为 3 μmol/L, 体系总体积为 100 μL. 在 4℃ 静置 16 h 后, 分 3 次加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB; 0.1 mol/L, pH 7.2)和 NaCl(1 mol/L)至其终浓度分别为 0.01 和 0.1 mol/L, 每次间隔 1 h. 将溶液充分混匀后室温放置 48 h, 用 1 mL 0.01 mol/L PB 和 0.1 mol/L NaCl 组成的缓冲液(pH 7.2) 8603×g 离心 50 min 清洗两次, 弃上清, 用 100 μL 上述缓冲液重悬, 4℃ 储存备用. 制备的纳米金探针用紫外-可见光光谱仪和琼脂糖凝胶电泳进行验证.

1.3 基因芯片的制备

ProSys-5510 型点样仪将捕获探针(50 μmol/L)固定在醛基化的芯片上, 每个探针点样量为 0.7 nL, 点直径为 100 μm, 点间距为 500 μm. 将芯片放在 37℃ 固定 48 h, 未结合的探针用去离子水冲洗, 然后浸泡于 40 mmol/L 的巯基琥珀酸溶液中 30 min 以钝化其余结合位点. 最后, 以去离子水冲洗 3 次, 4℃ 备用.

表 1 实验中所用序列

序列名称	序列 (5'-3')
miR-125a-5p 捕获探针	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTCACAGGTAAA
miR-126 捕获探针	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTCGCATTATTAC
miR-125a-5p 报告探针	GGGTCTCAGGGA(T) ₁₅ GTCGTCTGTTGCTCCTGTGC
miR-126 报告探针	TCACGGTACGA(T) ₁₅ GTCGTCTGTTGCTCCTGTGC
检测探针 1	SH-TTTTTTTTTTGACAGGAGCAACAG
检测探针 2	SH-TTTTTTTTTTCTGTTGCTCCTGTGC
miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG

1.4 增强液的配制

将 25 mmol/L 的 MES 缓冲液, 30%的 H₂O₂ 和 100 mmol/L 的 H₂SO₄ 溶液按照 5:3:2 的体积比混匀以配制增强液. 增强液应避光配制, 并且现配现用.

1.5 RNA 提取

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国), 根据说明书从 8 例肺癌组织样本中提取总 RNA. 此研究经过上海中山医院机构审查委员会同意, 并且样本的收集得到每位患者的知情同意. 利用超微量分光光度计(Berthold, 德国)测定 RNA 的浓度.

1.6 基因芯片检测 miRNA

取 2 μL 靶标 miRNA 和 2 μL 报告探针, 用杂交缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 1 mol/L NaCl; 预混有 RNA 酶抑制剂)将体系补足至 30 μL, 混匀, 均匀滴入芯片点阵区, 室温下杂交 30 min. 以 0.2×柠檬酸钠缓冲液(saline sodium citrate, SSC)(含 0.1% 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)洗液清洗芯片 3 min, 氮气吹干待用. 取纳米金探针 1 和 2 各 2 μL, 与杂交液混匀后滴入芯片点阵区, 室温下杂交 30 min. 将芯片用上述洗液清洗后, 氮气吹干. 在每个点阵加 30 μL 增强液, 避光反应 5 min 后置于去离子水中以终止反应, 显微镜下观察结果.

2 结果与讨论

2.1 纳米金探针的表征

纳米金粒子的 TEM 图如图 2A 所示. 从图中可以看出, 纳米金粒子大小均一, 可以用于后续实验. 如图 2B 所示, 纳米金溶液的紫外-可见吸收光谱在 520 nm 处有一个等离子吸收峰. 在纳米金表面修饰

图2 纳米金探针表征结果图

A: 纳米金粒子的 TEM 图; B: 纳米金溶液修饰 DNA 检测探针前后的紫外-可见吸收光谱图; C: 3%的琼脂糖凝胶电泳验证检测探针结合到纳米金上. 泳道 1: 20 bp DNA ladder; 泳道 2: DNA 检测探针; 泳道 3: 纳米金溶液; 泳道 4: 纳米金探针

上检测探针后, 其表面等离子共振吸收峰发生红移, 最大吸收峰由 520 nm 移至 525 nm. 纳米金溶液的吸光峰位置与粒径大小和局部化学环境有关^[27,28]. 红移现象可能是由于纳米金表面修饰上检测探针后粒径改变引起的. 本研究也用琼脂糖凝胶电泳来验证 DNA 检测探针与纳米金表面的结合. 如图 2C 所示, 纳米金探针(泳道 4)在电泳中的迁移速率快于纳米金溶液(泳道 3), 这是由于纳米金探针上修饰有 DNA 而带有过多的负电荷所致. 这些结果说明检测探针成功地结合到纳米金上.

2.2 基于单纳米金探针结合基因芯片检测 miRNAs

首先利用一个纳米金探针(纳米金探针 1)来检测 miR-125a-5p 和 miR-126. 根据朗伯比尔定律估算纳米金探针的浓度为 13.4 nmol/L. 将纳米金探针 1 的浓度固定为 13.4 nmol/L, 报告探针浓度固定为 100 nmol/L, 对浓度 10 pmol/L~100 nmol/L 的靶标 miRNAs 进行检测(图 3 和 4). 通过增强反应, 肉眼可以看到灰色的点阵, 并用显微镜观察记录结果. 检测信号的强度与靶标 miRNAs 的浓度具有一致性(图 3 和 4). 从图中曲线可以看出, miR-125a-5p 和 miR-126 的线性范围为 10 pmol/L~100 nmol/L(R^2 值分别为 0.999 和 0.995).

2.3 单纳米金检测体系的准确性

为了考察单纳米金探针检测体系的准确性, 将 3 个不同浓度的标准品 miR-126 加入到胎牛血清中(预混有 RNA 酶抑制剂)并进行分析. 如表 2 所示, 测得 miR-126 的回收率为 81.5%~109.1%, 表明这种传感器具有一定的准确性.

图3 基于单纳米金探针结合基因芯片检测 miR-125a-5p 结果图

A: miR-125a-5p(浓度从 10 pmol/L~100 nmol/L)和空白对照的检测结果图; B: miR-125a-5p 浓度与灰度值之间的关系图. 每个浓度对应结果取 3 次独立实验均数

2.4 临床样本分析

为了考察这种方法的实际应用价值, 从上海中山医院收集肺癌组织样本, 利用这种传感器分析肺癌组织总 RNA 中 miR-126 的含量. 从表 3 可以看出, 用这种传感器对样本分析得到的结果与定量 PCR 具有一致性, 说明这种传感器对临床样本的检测具有良好的适用性.

图4 基于单纳米金探针结合基因芯片检测 miR-126 结果图
A: miR-126(浓度从 10 pmol/L~100 nmol/L)和空白对照的检测结果图; B: miR-126 浓度与灰度值之间的关系图. 每个浓度对应结果取 3 次独立实验均数

表 2 基于单纳米金探针结合基因芯片检测 miR-126 的准确性

序号	miR-126 加入量	miR-126 测得量	回收率	标准偏差
1	10 nmol/L	8.15 nmol/L	81.5%	3.6%
2	1 nmol/L	1.091 nmol/L	109.1%	5.4%
3	100 pmol/L	104.7 pmol/L	104.7%	4.9%

表 3 基于单纳米金探针结合基因芯片及定量 PCR 检测肺癌组织总 RNA 中 miR-126 的结果

样本序号	本方法 ($\times 10^5$ 拷贝/ μ L)	定量 PCR ($\times 10^5$ 拷贝/ μ L)
1	47.6 $\pm$ 4.92	35.0 $\pm$ 1.63
2	5.50 $\pm$ 1.07	4.0 $\pm$ 0.62
3	28.8 $\pm$ 3.15	23.2 $\pm$ 0.80
4	8.32 $\pm$ 1.24	6.52 $\pm$ 0.27
5	17.3 $\pm$ 2.50	10.8 $\pm$ 0.88
6	47.9 $\pm$ 3.17	12.6 $\pm$ 0.27
7	46.8 $\pm$ 3.25	27.5 $\pm$ 0.35
8	9.12 $\pm$ 0.71	4.72 $\pm$ 0.40

2.5 基于双纳米金探针结合基因芯片检测 miR-125a-5p

(1) 探针的优化. 为了进一步提高检测灵敏度,

使用不同浓度的纳米金探针和报告探针来检测 miR-125a-5p, 并进行条件优化. 首先, 将靶标 miR-125a-5p 的浓度固定为 1 nmol/L, 报告探针浓度固定为 100 nmol/L, 纳米金探针 1 的浓度固定为 13.4 nmol/L, 将纳米金探针 2 稀释成一系列不同的浓度并进行杂交. 如图 S1A 所示, 纳米金探针 2 的最佳浓度为 6.7 nmol/L. 然后, 将纳米金探针 2 的浓度固定为 6.7 nmol/L 并优化纳米金探针 1 的浓度. 由图 S1B 可以看出, 当纳米金探针 1 的浓度为 0.134 nmol/L 时, 杂交信号达到平台期. 最后, 将纳米金探针 1 和 2 的浓度分别固定为 0.134 和 6.7 nmol/L, 并对报告探针的浓度进行优化. 图 S1C 表明, 报告探针的最佳浓度为 1 nmol/L.

(2) 检测 miR-125a-5p. 用芯片检测了一系列不同浓度的 miR-125a-5p 标准品(1 fmol/L~10 pmol/L). 由图 5A 可以看出, 随着 miRNA 浓度的降低, 检测信号逐渐减弱, 最终可以检测到 1 fmol/L 的靶标 miR-125a-5p. 图 5B 表明 miR-125a-5p 的浓度与灰度值之间具有相关性, 检测的线性范围是 1 fmol/L~10 pmol/L($R^2=0.996$).

图5 基于双纳米金探针结合基因芯片检测 miR-125-5p 结果图

A: miR-125a-5p(浓度从 1 fmol/L~10 pmol/L)和空白对照的检测结果图; B: miR-125a-5p 浓度与灰度值之间的关系图. 每个浓度对应结果取 3 次独立实验均数

3 结论

本研究利用纳米金探针结合基因芯片发展了一种用于 miRNAs 检测的新型生物传感器. 利用这种传感器检测了肺癌组织中 miR-126 的含量, 其结果与定

量 PCR 具有一致性, 表明这种生物传感器对临床样本的检测具有良好的适用性. 整个分析时间不超过 1 h, 并且可以用肉眼观察反应结果. 这种分析方法具有费用低、快速及便捷的优点, 有望用于临床样本中 miRNAs 的检测.

参考文献

- 1 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281–297
- 2 Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci*, 2008, 99: 1147–1154
- 3 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431: 350–355
- 4 Yang H, Hui A, Pampalakis G, et al. Direct, electronic microRNA detection for the rapid determination of differential expression profiles. *Angew Chem Int Edit*, 2009, 48: 8461–8464
- 5 Koshiol J, Wang E, Zhao Y, et al. Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidem Biomar*, 2010, 19: 907–911
- 6 Leshkowitz D, Horn-Saban S, Parmet Y, et al. Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *RNA*, 2013, 19: 527–538
- 7 Duan R, Zuo X, Wang S, et al. Lab in a tube: ultrasensitive detection of microRNAs at the single-cell level and in breast cancer patients using quadratic isothermal amplification. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 4604–4607
- 8 Streit S, Michalski C W, Erkan M, et al. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc*, 2008, 4: 37–43
- 9 Cissell K A, Deo S K. Trends in microRNA detection. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 1109–1116
- 10 Ren Y, Deng H, Shen W, et al. A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum. *Anal Chem*, 2013, 85: 4784–4789
- 11 Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 2010, 16: 991–1006
- 12 Kroh E M, Parkin R K, Mitchell P S, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 2010, 50: 298–301
- 13 Wen Y, Pei H, Shen Y, et al. DNA nanostructure-based interfacial engineering for PCR-free ultrasensitive electrochemical analysis of microRNA. *Sci Rep*, 2012, 2: 267
- 14 Gao Z, Peng Y. A highly sensitive and specific biosensor for ligation-and PCR-free detection of microRNAs. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 3768–3773
- 15 Gao Z, Yu Y H. Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assays. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 933–940
- 16 Yin H, Zhou Y, Zhang H, et al. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system. *Biosens Bioelectron*, 2012, 33: 247–253
- 17 Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10614–10619
- 18 Shalon D, Smith S J, Brown P O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 1996, 6: 639–645
- 19 Amundson S A, Bittner M, Chen Y, et al. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene*, 1999, 18: 3666–3672
- 20 Wang Y, Mao H J, Zang G Q, et al. Detection of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid based on gold nanoparticle probe chip. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38: 1133–1138
- 21 Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 47–52
- 22 Cao Y C. Nanomaterials for biomedical applications. *Nanomedicine*, 2008, 3: 90–98

- 23 Giljohann D A, Seferos D S, Daniel W L, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Edit*, 2010, 49: 3280–3294
- 24 Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289: 1757–1760
- 25 Storhoff J J, Marla S S, Bao P, et al. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19: 875–883
- 26 Cao Y C, Jin R, Mirkin C A. Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297: 1536–1540
- 27 Link S, El-Sayed M A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *J Phys Chem B*, 1999, 103: 4212–4217
- 28 Jain P K, Lee K S, El-Sayed I H, et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 7238–7248