



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103276074 B

(45) 授权公告日 2015.08.19

(21) 申请号 201310189835.1

(22) 申请日 2013.05.21

(73) 专利权人 昆山彭济凯丰生物科技有限公司
地址 215300 江苏省苏州市昆山市高新区晨丰路 209 号

(72) 发明人 彭长庚 温婷

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101213311 A, 2008.07.02, 说明书第 2 页.

CN 101213310 A, 2008.07.02, 权利要求书, 说明书.

CN 101445797 A, 2009.06.03, 说明书实施例及图 1-5.

Jakob S Lohmann, Magnus Stougaard and Jøslash

rn Koch. Kanpo Seizai no Bunkenteki na Kosatsu. 《BMC Biotechnology》. 2007, 1-9.

古先祥, 李鸿岩, 袁毅君. 有效扩增小片段 DNA 的一种方法. 《天水师范学院学报》. 2011, 29-32.

李岩, 李珊珊和张玉祥. 一种高效扩增小片段 DNA 方法的建立. 《首都医科大学学报》. 2011, 121-124.

审查员 宋梦

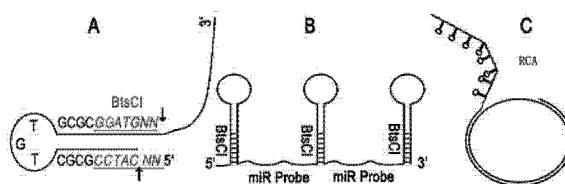
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法

(57) 摘要

本发明属于 DNA 生物合成领域, 具体涉及一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针方法及其应用, 可用于检测小的非编码核糖核酸, 如微核糖核酸, 包括如下步骤: (1) 制备重组有模板 DNA 的质粒; (2) 切割并连接模板 DNA, 从重组质粒上酶切获得模板 DNA, 使模板 DNA 首尾连接成环; (3) 切单链, 滚环复制, 用切口酶切断模板 DNA 的一条链, 加入聚合酶以环状带切口的 DNA 为模板进行滚环复制, 扩增出含颈环-探针结构的 DNA 单链; (4) 目的短单链 DNA 的制备, 对步骤(3)的产物采用 II 型内切酶切割形成目的单链 DNA 探针和副产物 DNA, 通过 PAGE 分离纯化得到无突变的单链 DNA 探针。本发明在小非编码 RNA 检测领域和小非编码 RNA 相关疾病的诊断和治疗领域具有广泛用途。



1. 一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备重组有模板 DNA 的质粒

设计模板 DNA 序列;模板 DNA 为双链,两端含有相同的酶切位点;模板 DNA 设有至少一个颈环-探针结构,所述颈环为含内切酶位点的可成环结构,所述探针为与任一微 RNA 完全互补的单链 DNA 探针;模板 DNA 还带有切口酶位点;

合成所述的模板 DNA 并连接至质粒中,经测序验证无突变并扩增;

(2) 酶切并连接模板 DNA

从重组质粒上酶切获得模板 DNA,使模板 DNA 首尾连接成环;

(3) 切单链,滚环复制

用切口酶切断模板 DNA 的一条链,加入 phi29DNA 聚合酶以环状带切口的 DNA 为模板进行滚环复制,扩增出含颈环-探针结构的 DNA 单链;

(4) 目的短单链 DNA 的制备

对步骤(3)的自发形成颈环二级结构的 DNA 单链产物采用内切酶切割,在颈环和 DNA 探针序列之间切断,形成与微 RNA 完全互补的目的单链 DNA 探针和副产物 DNA,通过 PAGE 分离纯化得到含单一序列的无突变的单链 DNA 探针。

2. 根据权利要求 1 所述的一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于:所述的内切酶为 BtsCI 或 BspPI,所述的内切酶位点为 BtsCI 位点或 BspPI 位点,内切酶与内切酶位点相对应。

3. 根据权利要求 1 所述的一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于:所述的切口酶位点为 Nt. BstNBI 位点,所述的切口酶为 Nt. BstNBI。

4. 根据权利要求 1 所述的一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于:采用末端转移酶在纯化后的单链 DNA 探针端部加上标记物;或者在聚合酶扩增时加入带标记物的扩增底物。

5. 根据权利要求 4 所述的一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于:所述的标记物包括地高辛、荧光素、生物素或同位素。

6. 根据权利要求 1 所述的一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于:所述的目的单链 DNA 探针大小为 10-30bp。

一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法

技术领域

[0001] 本发明属于 DNA 生物合成领域,具体涉及一种合成短单链脱氧核糖核苷酸(short single strand DNA, sssDNA) 探针的方法,可用于检测小的非编码核糖核酸(small non-coding RNAs),如微核糖核酸(microRNA)。

背景技术

[0002] 短单链脱氧核糖核苷酸(sssDNA) 可作为探针用于科研和医学诊断。最近十几年关于小非编码 RNA 的研究非常火热,尤其是微 RNA,科学家和医药公司对以微 RNA 作为靶点来研发诊断试剂盒和药物的前景也非常看好。由于微 RNA 通常只有 18-30 个碱基(Bartel, 2004),而且一个家族的微 RNA 差异可能只有 1-2 个碱基(www.mirbase.com),因此用杂交方法来检测微 RNA 的话,对探针的纯度要求高。如果探针有碱基突变的话,会导致检测结果为假阴性或假阳性。

[0003] 现有合成短核苷酸技术主要是通过固相化学合成(Reese, 2005),这个方法虽然广泛应用于生产寡核苷酸,但其有一定的错误率,且错误率随合成的核苷酸的长度增加而增加。这种方法是从核酸的 3' 向 5' 端逐渐加上单个的碱基,因为每加上一个碱基时效率都达不到 100%,现在通常的效率是 99% 左右,所以用这种方法合成的含 21 个碱基的脱氧核糖核苷酸通常只有 79% 左右的纯度(Lohmann et al., 2007; Pon et al., 1996)。虽然合成后的纯化(常用 HPLC 或 PAGE 纯化)能帮助富集预期目的大小的脱氧核糖核苷酸,但无法减少拥有同样大小的突变的脱氧核糖核苷酸杂质。因而现有的固相化学合成的寡核苷酸产品经纯化后也不可能达到 100% 纯度。这对那些需求 100% 纯度(序列一致)的寡核苷酸的应用是个致命缺点。

[0004] 科研者也在寻求以生物酶合成方法生产高纯度的短单链脱氧核糖核苷酸的方法。PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 被用于生产长度为 30 个碱基的短核苷酸探针(Bertilsson et al., 2002, Appl Environ Microbiol),但这种方法存在两个缺点:一是 PCR 需要以化学合成的引物来扩增,而合成的引物总会有突变的,这就使 PCR 的产物中携带了引物中的突变,导致产物达不到 100% 的纯度,而且对扩增的产物长度有限制;另一个缺点是 PCR 合成的产物是双链,需要额外的步骤来把双链分离并纯化出目的单链。

[0005] 2003 年 Van Ness J 等描述了一种恒温扩增单链寡核苷酸片段的方法(Van Ness et al., 2003)。具体是利用一种热稳定的切口内切酶 N. BstNBI 在双链寡核苷酸片段打上切口,这样有切口的一条寡核苷酸片段就会从双链模板上脱落,产生一个 5' 突出的末端,随后 DNA 聚合酶就可以补齐这个末端产生新的双链寡核苷酸,新合成的双链寡核苷酸又可以被切口内切酶 Nt. BstNBI 打上切口,聚合酶又可以进行复制,这样就达到了扩增小片段核苷酸的目的。这种方法有很大的局限性:恒温扩增对扩增的寡核苷酸的长度有严格的要求,如果要扩增的寡核苷酸太长, T_m 值就会太高,切口内切酶作用于双链寡核苷酸片段后产生的寡核苷酸片段就不会从模板上脱落;相反,如果要扩增的寡核苷酸太短, T_m 值就会太低,寡核苷酸片段就很容易从模板上脱落。因此,这种方法只适合扩增 8-16 个碱基的寡核苷酸

酸,对于更短或更长的寡核苷酸扩增就无能为力了。

[0006] 也有报道用滚环扩增的方法生产核苷酸(李岩等,2011,一种高效扩增小片段 DNA 方法的建立;Lohmann et al.,2007)。Lohmann 等 2007 年报道用滚环扩增的方法生产 66 个碱基的核苷酸。最近李岩等报道用滚环扩增的方法生产更短核苷酸,他们是先把化学合成的单链寡核苷酸链接成环,用这个环状寡核苷酸作为模板,利用 phi29DNA 聚合酶以单向或双向短引物开始复制,其产物分别是一条很长的单链 DNA(单向引物)或者是一条很长的双链 DNA(双向引物)。这个方法的缺点:一是把化学合成的模版和引物中的错误带至产物中了;二是没找到把长单链切割成特异短链的方法;三是长双链 DNA 虽然可以被内切酶切割,但要求被复制扩增的目的 DNA 片段含有酶切位点,即不能扩增特定的不含内切酶的序列,并且切割后的产物还是双链,不能用于需要单链探针的实验和诊断。

[0007] 本发明是将经测序验证无突变的 DNA 连接至质粒中扩增,然后用内切酶切出目的片段,连接成环,再以切口酶切断其中一条链,然后用 phi29DNA 聚合酶以滚环扩增的方法扩增出需要的 DNA 单链,这个 DNA 单链会自发形成颈环的二级结构,从而能被预先设计好的 II 型内切酶切割形成短的(10-30bp)的目的单链 DNA 和副产物颈环 DNA,通过 PAGE 分离纯化可得到单一的含一致序列(无突变)的短单链 DNA。这个方法的优点:一是模板经测序验证无突变;二是经巧妙设计,生成的长单链 DNA 能被切割成只含目的序列的短单链 DNA,没有序列性限制,而且是单链,经简单分离纯化后可作为探针使用;三是 phi29DNA 聚合酶的纠错能力强,错误率约为 1×10^{-7} ,显著优于用 Taq DNA 聚合酶(错误率为 2×10^{-4})进行 PCR 扩增得到的单链 DNA,比用其它方法合成的错误率低很多。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服上述问题,提供一种准确性高、用于小非编码 RNA 的精确检测的合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法。

[0009] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案为:

[0010] 一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0011] (1) 制备重组有模板 DNA 的质粒

[0012] 设计模板 DNA 序列;模板 DNA 为双链,两端含有相同的酶切位点;模板 DNA 设有至少一个颈环-探针结构;模板 DNA 还带有切口酶位点。

[0013] 合成所述的模板 DNA 并连接至质粒中,经测序验证无突变并扩增;

[0014] (2) 酶切并连接模板 DNA

[0015] 从重组质粒上酶切获得模板 DNA,使模板 DNA 首尾连接成环;

[0016] (3) 切单链,滚环复制

[0017] 用切口酶切断模板 DNA 的一条链,加入 DNA 聚合酶以环状带切口的 DNA 为模板进行滚环复制,扩增出含颈环-探针结构的 DNA 单链;

[0018] (4) 目的短单链 DNA 的制备

[0019] 对步骤(3)的自发形成颈环二级结构的 DNA 单链产物采用内切酶切割形成与微 RNA 完全互补的目的单链 DNA 探针和副产物 DNA,通过 PAGE 分离纯化得到含单一序列的无突变的单链 DNA 探针。

[0020] 进一步的技术方案包括:颈环为含内切酶位点的可成环结构,探针为任何一个

DNA 序列；内切酶切割内切酶位点以在颈环和任何一个 DNA 序列之间切断。

[0021] 进一步地，所述的探针为任一微 RNA 的反义序列；所述的内切酶切割内切酶位点以在颈环和任一微 RNA 的反义序列之间切断，切离出与微 RNA 序列完全互补的微 RNA 的反义序列。

[0022] 进一步地，所述的内切酶为 BtsCI 或 BspPI，所述的内切酶位点为 BtsCI 位点

5'...GGATGNN...3' 或 BspPI 位点 5'...GGATC(N)...3' 或 BspPI 位点 3'...CCTAG(N)...5'，内切酶与内切酶位点对应。或与这些

内切酶类似的其它内切酶，能在颈环和任一微 RNA 的反义序列之间切断，且切离出与微 RNA 序列完全互补的微 RNA 的反义序列。

[0023] 进一步地，所述的切口酶位点包括 Nt. BstNBI 位点，所述的切口酶包括 Nt. BstNBI。

[0024] 进一步地，采用末端转移酶在纯化后的单链 DNA 探针端部加上标记物；或者在聚合酶扩增时加入带标记物的扩增底物。

[0025] 进一步地所述的标记物包括地高辛、荧光素、生物素或同位素。

[0026] 进一步地，所述的目的单链 DNA 探针大小为 10-30bp。

[0027] 进一步地，所述的 DNA 聚合酶为 phi29DNA 聚合酶。

[0028] 综上，本发明提供一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法，即用 phi29DNA 聚合酶以测序正确的环状缺口 DNA 为模板，扩增出可形成颈环结构的长单链 DNA，经内切酶在颈环部位切断后可分离得到目的单链 DNA，作为探针在小非编码 RNA 检测领域和小非编码 RNA 相关疾病的诊断和治疗领域具有广泛用途。

附图说明

[0029] 图 1 和图 2：设计的用于扩增的 DNA 模板序列，其 5' 端为含 II 型内切酶 BtsCI 位点的可形成颈环结构的序列，3' 端为一个微 RNA 的反义序列（探针），或为任何一个 DNA 的序列（图 1A）；把上述颈环-微 RNA 探针序列叠加，形成颈环-探针-颈环-探针-颈环的序列，再在这个序列的 5' 端加上 Nt. BstNBI 切口酶识别位点 GAGTGatat，最后在两端各加上一个 EcoRI 内切酶识别位点 GAATTC（图 1B 和图 2）；phi29DNA 聚合酶以带切口的环状的模板 DNA 为模板，以链取代的方式滚环复制与完整环状链互补的链（图 1C）；

[0030] 图 3：经内切酶 EcoRI 消化的 pUC57-miR124 质粒通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离的图谱；左侧泳道为 100bp 的 DNA marker，右侧泳道为切出的约 130bp 的模板 DNA 片段；

[0031] 图 4：15% 的 PAGE 胶分离经 BtsCI 切割后的单链 DNA 产物的图谱，泳道 1 中最上的一条带是 miR-124 的探针（即目的单链 DNA 探针），中间一条带为颈环 DNA 片段，最下面一条带是含 EcoRI 和 Nt. BstNBI 位点的 DNA 片段；泳道 2 是化学合成的 20 个碱基的寡核苷酸，作为 marker；

[0032] 图 5：用本发明生产的 miR-124 探针（即目的单链 DNA 探针）检测到 miR-124 在 E12.5 小鼠胚胎中脑的分化的神经元（mantle zone）中表达的图谱。

具体实施方式

[0033] 以下结合附图，以具体实施例对本发明作进一步说明。应理解，以下实施例仅用于

说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0034] 一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法,包括如下步骤:

[0035] a、设计需要扩增的模板 DNA 序列,其 5' 端为含 II 型内切酶 BtsCI 位点的可形成颈环结构的序列,3' 端为一个微 RNA 的反义序列(探针结构),或为任何一个 DNA 的序列。这两部分为一个单元,可以叠加这样的单元,就形成了本发明所设计的颈环-探针-颈环-探针-颈环的序列。再在这个序列的 5' 端加上 Nt. BstNBI 切口酶识别位点 GAGTGatat,最后在两端各加上一个 EcoRI 内切酶识别位点 GAATTC。

[0036] b、DNA 合成公司合成设计的序列,克隆至载体中,经测序无突变后,转染至细菌中扩增质粒。

[0037] c、提取质粒后,用内切酶 EcoRI 切出模板 DNA 片段,然后用 T4DNA 连接酶把模板 DNA 连接成环状 DNA,再用切口酶 Nt. BstNBI 把 DNA 双链中的一条链切开。

[0038] d、以环状带切口的模板 DNA 为模板,用 phi29DNA 聚合酶以链取代的方式滚环复制与完整环状链互补的链。

[0039] e、用 II 型内切酶 BtsCI 切断扩增的单链 DNA 产物。

[0040] f、用 15% 的 PAGE 胶分离纯化目的单链 DNA,可作为探针用于科研和医学诊断。

[0041] 实施例一:制备微 RNA 探针方法一

[0042] 第一步:设计需要扩增的 DNA 序列,其 5' 端为含 II 型内切酶 BtsCI 位点的可形成颈环结构的序列,3' 端为一个微 RNA 的反义序列(探针),或为任何一个 DNA 的序列,见图 1A。为了优化生产和后续实验,把上述颈环-微 RNA 探针序列叠加,形成颈环-探针-颈环-探针-颈环的序列,再在这个序列的 5' 端加上 Nt. BstNBI 切口酶识别位点 GAGTGatat,最后在两端各加上一个 EcoRI 内切酶识别位点 GAATTC,如图 1B。

[0043] 所需检测的小鼠微 RNA mmu-miR-124-3p (序列号 MIMAT0000134) 的序列为 5' UAAGGCACGCGGUGAAUGCC3' (seq No. 3)。设计的用于生产 miR-124 探针的序列见表 1。

[0044] 表一用于生产 miR-124 探针的模板 DNA 序列

[0045]

生产 MiR-124 探针的正向序列 (seq No. 1)	5' GAATTCGAGTGATATCCATCCGCGCTGTGCGGGATGGAGGCATTCACCGCGTGCCTTACATCCGCGCTGTGCGGGATGTAGGCATTCACCGCGTGCCTTACATCCGCGCTGTGCGGGATGTAGAATTC3'
生产 MiR-124 探针的反向互补序列 (seq No. 2)	5' GAATTCTACATCCGCGCACAGCGCGGATGTAAGGCACGCGGTGAATGCCTACATCCGCGCACAGCGCGGATGTAAGGCACGCGGTGAATGCCTCCATCCGCGCACAGCGCGGATGGATATCAC TCGAATTC3'

[0046] 为了更好地显示序列结构,正向序列为 5' Gaattc GAGTGatat CCATCC GCGC tgt gcgc GGATGGA GGCATTACCGCGTGCCTTA CATCC GCGC tgt gcgc GGATGTA GGCATTACCGCGTGCCTTA CATCC GCGC tgt gcgc GGATGTA gaattc3' (图 2)。Nt. BstNBI 位点的上、下链的序列分别为 GAGTGNNNNN、CTCACNNNNN,切点在上链的最后一个 N(N 指 A、T、C、G 中的任意一种,下同)之前。BtsCI 位点的上、下链的序列分别为 GGATGNN、CCTACNN,切

点在上链的末端和下链的最后两个 N 之前。

[0047] 第二步:让 DNA 合成公司合成上述设计的序列,克隆至 pUC57 载体中,经测序验证合成的序列无突变后,转染至细菌中扩增质粒,质粒命名为 pUC57-miR124。

[0048] 第三步:提取质粒后,用 1 μ l 含 20 单位的内切酶 EcoRI (NEB) 消化 1 μ gpUC57-miR124 质粒,切出模板 DNA 片段,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(120V, 30min)分离出约 130bp 的模板 DNA 片段,见图 3。割胶,并用胶回收试剂盒回收模板 DNA 片段, DNA 用 20 μ l 去离子水洗脱。

[0049] 第四步:取 10 μ l 回收的模板 DNA,用 1 μ l 含 400 单位的 T4DNA 连接酶(NEB)把模板 DNA 连接成环状 DNA,总反应体系 20 μ l, 16 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。然后 65 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟把连接酶失活。

[0050] 第五步:取 5 μ l 上述连接产物,用 1 μ l 含 10 单位的切口酶 Nt.BstNBI (NEB) 把一条链切开,反应在 1X NEBuffer3.1 缓冲液中置于 55 $^{\circ}$ C 进行 2 小时。然后 80 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟把切口酶失活。

[0051] 第六步:取 5 μ l 第五步酶切的产物,用 1 μ l 含 10 单位的 phi29DNA 聚合酶(NEB)以带切口的环状的模板 DNA 进行链取代的方式滚环复制(RCA)与完整环状链互补的链(示意图见图 1C),反应在 20 μ l 体系(含 2 单位的 phi29DNA 聚合酶, 1X phi29DNA 聚合酶缓冲液, 0.1mg/ml BSA, 0.2mM dTTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM dATP 和 0.2mM dCTP)中于 30 $^{\circ}$ C 进行 6 小时。然后置于 65 $^{\circ}$ C 10 分钟让酶失活。第七步:用 II 型内切酶,即 1 μ l 含 20 单位的 BtsCI 酶切断扩增的单链 DNA 产物。反应在 1X CutSmart 缓冲液(50mM 醋酸钾, 20mM Tris- 醋酸盐, 10mM 醋酸镁, 100 μ g/ml BSA, pH7.9)中于 50 $^{\circ}$ C 进行 1 小时。

[0052] 第八步:向第七步的反应液中加 6x DNA loading buffer 至终浓度为 1x DNA loading buffer。样品上至 15% 的 PAGE 胶,在 1xTBE 中用 150V 电泳 2 小时分离纯化目的单链 DNA。胶用 GelRed 染色后,用凝胶成像仪拍照,结果见图 4。

[0053] 第九步:切割含有 20bp 的 miR-124 探针的胶,把胶切成小碎片,用 3 倍体积的 1xTBE 洗脱摇过夜。瞬时离心(600g, 1min)后,把溶液转移至新的 1.5ml 管内,加 0.7 倍体积的异丙醇沉淀 DNA,用 70% 的乙醇洗涤一次,风干 DNA 沉淀,加 5 μ l TE buffer 溶解 DNA。

[0054] 第十步:利用末端转移酶(Terminal Transferase)标记探针。取 5pmol 第九步产生的 DNA 探针,加 1 μ l 含 20 单位的末端转移酶(NEB)在 1X Terminal 转移酶反应缓冲液, 0.2mM DIG-dUTP, 0.25mM CoCl₂中于 37 $^{\circ}$ C 孵育半小时,然后 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟使酶失活。这样 3' 端标记 DIG-dUTP 的 DNA 探针就可以用于检测 miR-124 了。

[0055] 实施例二:制备微 RNA 探针方法二

[0056] 方法二大体与方法一相同,只是在方法一的第六步反应中,用 0.1mM DIG-dUTP 和 0.1mM dTTP 代替 0.2mM dTTP, 这样 phi29DNA 聚合酶合成的单链 DNA 就掺入了 DIG-dUTP。DIG 是一种标记物,可以是地高辛、荧光素、生物素、同位素等。在完成第九步的割胶纯化 DNA 后,得到的就是标记好的 DNA 探针了。

[0057] 实施例三:用制成的目的单链 DNA 探针(即 miR-124 探针)检验小鼠 miR-124

[0058] 第一步:

[0059] 八微米厚的胚胎发育 12.5 天小鼠的脑切片,经下述步骤处理

[0060] 1. 二甲苯脱蜡两次,每次 15 分钟

- [0061] 2. 100% 乙醇洗两次, 每次 5 分钟
- [0062] 3. 70% 乙醇洗 5 分钟
- [0063] 4. 30% 乙醇洗 5 分钟
- [0064] 5. 去离子水中洗 5 分钟
- [0065] 6. 1x PBS 中洗两次, 每次 5 分钟
- [0066] 7. 4% PFA 冰上固定 20 分钟
- [0067] 8. 1xPBS 中洗两次, 每次 5 分钟
- [0068] 9. 10 μ g/ml 蛋白酶 K 在 1x 蛋白酶 K 缓冲液中处理 5 分钟
- [0069] 10. 1xPBS 中洗两次, 每次 2 分钟
- [0070] 11. 4%PFA 冰上固定 10 分钟
- [0071] 12. 1xPBS 中洗两次, 每次 5 分钟
- [0072] 13. 在含 600 μ l 乙酸酐的 1xTEA 【200ml of 0.1M 三乙醇胺 - 盐酸 (triethanolamine-HCl), pH8】中处理 10 分钟
- [0073] 14. 2xSSC 处理两次, 每次 5 分钟
- [0074] 第二步: 预杂交
- [0075] 加 100 μ l 的杂交缓冲液 (Ambion) 到上述处理好的脑片上, 盖上盖玻片, 放置在一个含 50% 甲酰胺、5xSSC 的保湿盒中, 把保湿盒放置在 52 $^{\circ}$ C 的温箱内预杂交 1 个小时。
- [0076] 第三步: 杂交
- [0077] 取 1pmol 用方法一制备的 miR-124 探针, 加入 100 μ l 的杂交缓冲液 (Ambion)、混匀。把脑片上的盖玻片移去, 加上含探针的 100 μ l 的杂交缓冲液, 盖上一个新的盖玻片, 放回保湿盒中, 放至温箱中 52 $^{\circ}$ C 杂交过夜。
- [0078] 第四步: 洗涤
- [0079] 1. 50% 甲酰胺, 2xSSC, 0.1% Tween-20 于 57 $^{\circ}$ C 洗四次, 每次 15 分钟
- [0080] 2. 50% 甲酰胺, 0.2xSSC, 0.1% Tween-20 于 57 $^{\circ}$ C 洗四次, 每次 15 分钟
- [0081] 3. 1xPBS 中洗两次, 每次 10 分钟
- [0082] 第五步: 抗体检测信号
- [0083] 1. 在室温下用含 10% 胎牛血清的 1x PBS 封闭脑片 1 小时
- [0084] 2. 加 400 μ l 1:2000 稀释的 HRP 交联的 anti-DIG 抗体 (Roche) 室温孵育 2 小时
- [0085] 3. 缓冲液 I (0.1M Tris 0.1M NaCl pH7.5) 中洗涤两次, 每次 15 分钟
- [0086] 4. 缓冲液 I (0.1M Tris 0.1M NaCl pH9.5) 中洗涤 15 分钟
- [0087] 5. 按说明书 1:50 稀释 NBT/BCIP 储存液 (18.75mg/ml 氮蓝四唑和 9.4mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐, Roche), 加 400 μ l 稀释的 NBT/BCIP 底物于脑片上, 37 $^{\circ}$ C 显色反应 3 小时, TE 缓冲液中终止
- [0088] 6. 封片后拍照, 结果见图 5, 通过原位杂交实验, 本发明的 miR-124 探针检测到 miR-124 在 E12.5 小鼠胚胎中脑的分化的神经元 (mantle zone) 中特异性地高表达。
- [0089] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其

等效物界定。

[0001]

序列表

<110> 昆山彭济凯丰生物科技有限公司

<120> 一种合成短单链脱氧核糖核苷酸探针的方法

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 131

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gaattcgagt gatatccatc cgcgctgtgc gcggatggag gcattcaccg cgtgccttac
atccgcgctg tgcgcggatg taggcattca ccgcgtgcct tacatccgcg ctgtgcgcgg
atgtagaatt c 131

<210> 2

<211> 131

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gaattctaca tccgcgcaca gcgcggatgt aaggcacgcg gtgaatgcct acatccgcgc
acagcgcgga tgaaggcac gcggtgaatg cctccatccg cgcacagcgc ggatggatat

[0002]

cactcgaatt c	131
<210> 3	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<400> 3	
uaaggcacgc ggugaaugcc	20

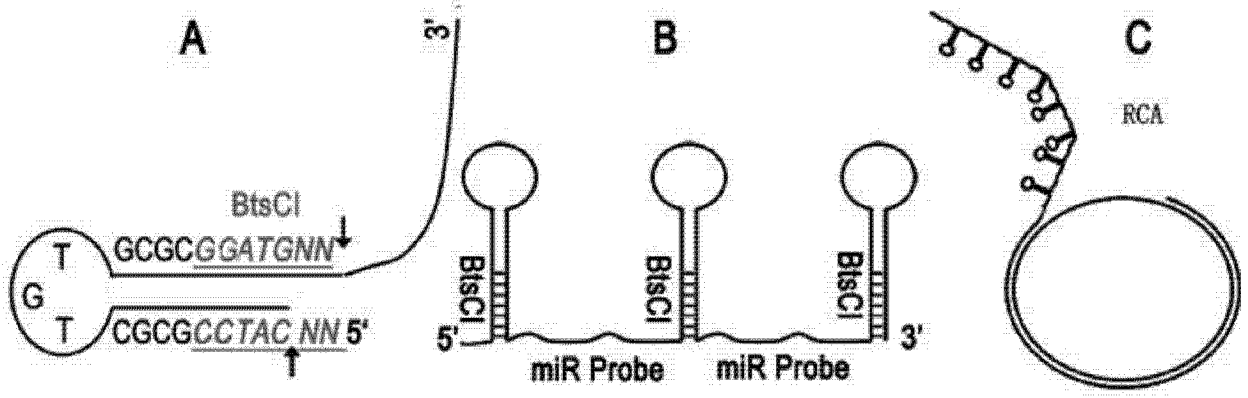


图 1

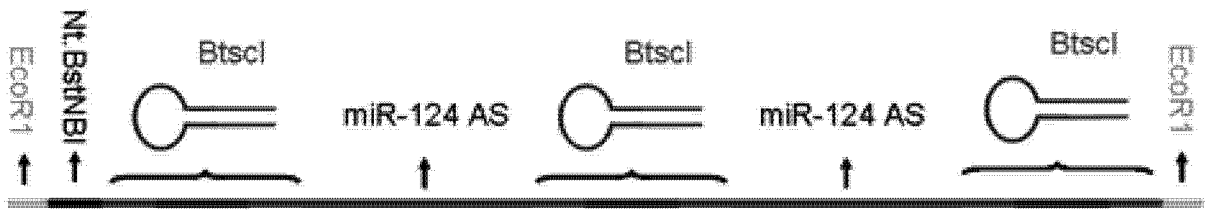


图 2

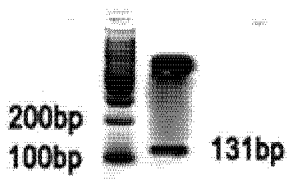


图 3

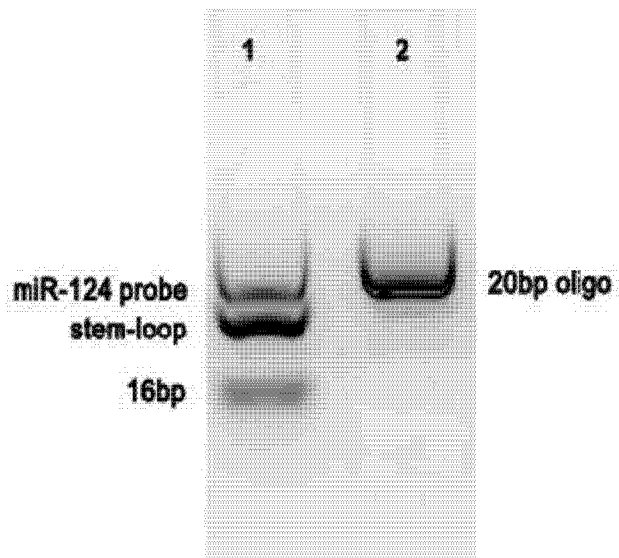


图 4

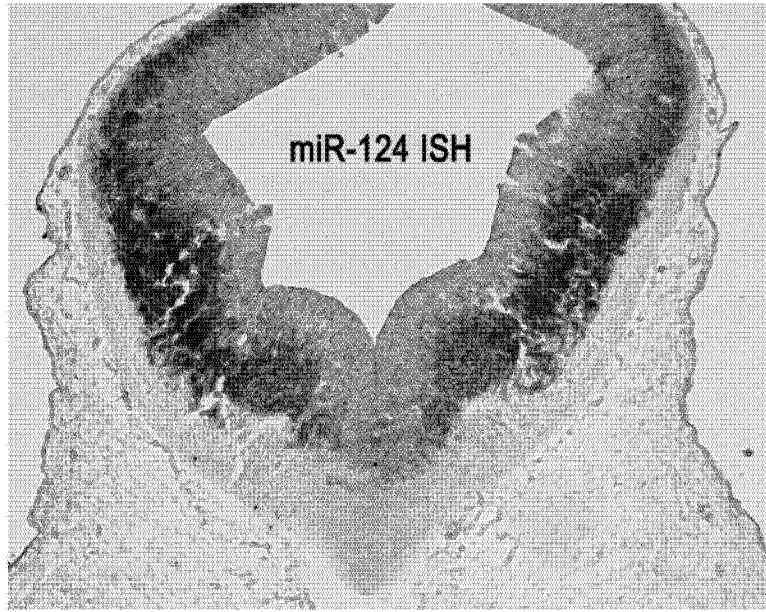


图 5