



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102443644 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201110429079. 6

(22) 申请日 2011. 12. 20

(71) 申请人 苏州福英基因科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 A2 楼 324 室

(72) 发明人 裘建英 张云福 张玉丽 裘霖

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所
(普通合伙) 31218

代理人 翟羽 施春花

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

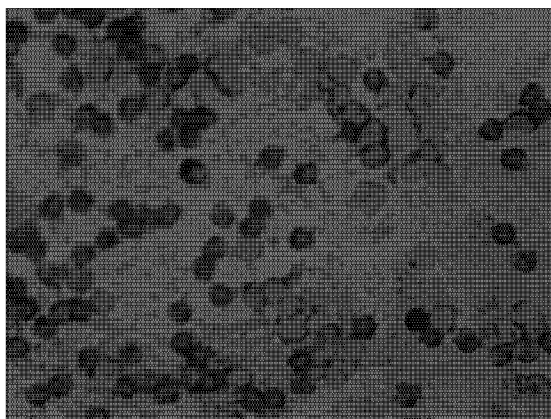
序列表 1 页 附图 3 页

(54) 发明名称

结肠癌病理演变前期 MICRORNA-29A 水平原位杂交检测试剂盒及检测方法和应用

(57) 摘要

本发明公开一种原位杂交检测试剂盒,包括杂交探针和标记物。还公开使用本试剂盒原位杂交检测与结肠癌早期病理演变有密切相关 microRNA-29a 的方法,包括以下步骤:(1)在杂交探针与靶序列可形成稳定杂交复合体的条件下,将底物中待测 RNA 与杂交探针接触,形成杂交复合体;和(2)检测所述杂交复合体。本发明的试剂盒和检测方法可在 RNA 水平上检测 microRNA-29a 表达量,比影像医学和现有的临床生化检测指标更早期,能实现真正的癌变前期 RNA 水平筛查,同时,本发明的检测方法简单方便,成本低,便于县区级医院推广应用。



1. 一种原位杂交检测试剂盒,包括杂交探针和标记物,其特征在于,所述的杂交探针为序列表 SEQ ID NO. 1 所示序列的互补序列。
2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的标记物选自放射性物质、化学发光或显色物质、生物素、金属螯、荧光素、酶及纳米材料。
3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括杂交液。
4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括增效剂。
5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,该试剂盒还包括显色剂。
6. 一种 microRNA-29A 基因原位杂交检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:
 - (1) 在权利要求 1 所述的杂交探针与靶序列可形成稳定杂交复合体的条件下,将底物中待测 RNA 与杂交探针接触,形成杂交复合体;和
 - (2) 检测所述杂交复合体。
7. 如权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于,所述的可形成稳定杂交复合体的条件为:核酸杂交的温度为 42℃;核酸杂交的时间为 16 — 24 小时。
8. 如权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于,所述的底物选用人的血液白细胞标本。
9. 如权利要求 8 所述的检测方法,其特征在于,所述的血液白细胞标本选自癌症、高危人群、正常人标本。
10. microRNA-29A 基因在制备检测结肠癌病变原位杂交试剂盒中的应用,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求 1 所述的杂交探针。

结肠癌病理演变前期 MICRORNA-29A 水平原位杂交检测试剂盒及检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,更具体地说,是涉及与结肠癌病理演变 RNA 表达改变(病理演变过程)的相关检测技术。

背景技术

[0002] 根据国内外权威机构提供的资料,我国每年癌症的新增人数 260 万,死亡人数近 210 万,患者 700 多万,全球每年新增癌症患者 800 万,死亡人数接近 800 万,患者约有 8400 多万人,到 2020 年以上人数将翻一番,这是一组可怕的数字。癌症诊治成本越来越高,按癌症患者的年治疗费用 20 万(贫穷地区可能偏高,发达地区可能远远高出 20 万),700 多万患者,每年的花费是 1.4 万亿人民币,扣除成本 35% 约 4 千亿,每年约有 1 万亿人民币白白消耗了。而且,癌症患者大部分会在治疗后不久死亡。因此,现有的临床癌症诊治模式一定要改变,本发明的创新点是提前做到预防性筛查,然后及时介入预防性调控和预防性治疗,做到基因水平癌症的治未病。

[0003] 2005 年美国卫生研究院、癌症研究院、疾控中心等八家单位做了一个年度报告,对 1972 年发起的抗癌大战进行回顾,报告认为人类在抗癌大战中是失败,结论是癌症死亡率没有降低,其列举出造成抗癌大战失败的几个因素是:1. 肿瘤细胞异质性(多态性);2. 肿瘤细胞耐药性;3. 抗癌药物设计思路不完善(动物模型设计不科学)等。同时,该报告中亦提出应重新审视现有诊治癌症的措施。

[0004] 本发明人在长期研究中发现,导致癌症死亡率不降的重要原因是不能做到真正的早期诊断。依照现有的临床医学影像(B 超、CT、核磁共振成像等)及和其它生化(癌抗原、癌胚抗原、糖类激素、细胞膜因子、细胞核因子、细胞流式技术)指标来诊断癌症,都是肿瘤形成后诊断,前者要有组织学变化或已有占位性病变,后者大部分是肿瘤形成后所分泌、释放、或肿瘤的标记物。传统临床观念认为占位性癌块在 2 公分下是属于早期癌症的诊断,这一概念值得认真讨论,2 公分以下癌块属早期这一界定科学性是不够严谨的,从细胞学角度来分析,1 公分的肿块约有一亿个肿瘤细胞,2 公分的肿块其三维空间的细胞叠加数远不止 2 亿个肿瘤细胞,从癌变前期到单克隆癌细胞产生及形成 2 公分的癌块,其病理演变过程相当长,可能是 5 年或 10 年、甚至是 10 年以上(特殊病例除外),很难证实的是在这个病理演变过程中,肿块是癌症唯一的发生地和单独的病灶,可能癌细胞早已迁移到其它组织或器官生长。临床研究早已证实,一旦形成肿块的同时,其它癌细胞通过不同途径迁移到其它部位克隆生长,一旦切除原发灶后,其它器官复发灶或多发癌块灶先后形成。因此,在临床上以 2 公分以下的癌肿块大小来界定早期与否,不够严谨(有些病例,在发现原发病灶时,同时发现转移病灶,不在我们表述的内容中),其实这时已经是晚期诊断和晚期治疗,这是导致癌症死亡率不降的真正原因。

[0005] 随着分子生物技术日益完善,功能基因组学,癌症基因组学等研究的深入展开,为了寻求更早期的诊断癌症、治疗癌症、以及预防癌症,已取得长足进步。至今,我们已有可能

在基因的一级转录功能产物(mRNA 水平或 microRNA)上做更精确的早期筛查和诊断,在癌变前期或癌细胞形成(单克隆)前,就可以做到早期预测和筛查。

[0006] 微小核糖核酸(microRNA/miRNA)是一段长度约为 22 核苷酸的寡核糖核酸分子,它们可以藉由调控 mRNA 来抑制转译作用或是造成 mRNA 的降解,降低基因的表现。近来有许多研究发现,miRNA 与癌症具有高度的相关性。因此推论 miRNA 可能是癌化过程的一个导因。到目前为止,在人体上有超过 700 个 miRNA 被发现,而大约有 100 左右的 miRNA 被确认与人类癌症具有相关性,这其中包含有食道癌、乳癌、血癌、肺癌、脑癌、肝癌、直肠结肠癌、胶质细胞瘤、垂体瘤等多种肿瘤在食道癌细胞中,miR-17-92 家族等 microRNA 在多种肿瘤中表达上调。miR-21 在成胶质细胞瘤、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中上调表达。

[0007] 虽然肿瘤组织 microRNA 表达谱与肿瘤发病及预后相关,但是检测技术复杂、创伤大,难以真正应用于临床诊断。相比较而言,外周血血清较易获得和检测,临床应用便捷,利于推广。血清中是否存在血清 microRNA 的表达谱与对应肿瘤组织 microRNA 表达谱关联? 2008 年至今已报道多项血清 microRNA 与肿瘤关系的研究工作,为血清 microRNA 作为分子标记应用于肿瘤的早期诊断和预后提供了工作基础。

[0008] microRNA 在血清中可长期稳定存在,耐 RNA 酶降解,煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血清 microRNA 的损失。血清 microRNA 的来源尚无定论,现在普遍认为其来源于组织细胞的主动分泌过程。成熟的 microRNA 在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切酶体(Exosome),分泌至胞外并进入血液;进入血液的外切酶体可经内吞作用进入受体细胞并去包被,释放出 microRNA 发挥生物学功能。外切酶体介导的细胞间 microRNA 的交换,是细胞通讯的一种新的途径,对维持内环境的稳态有重要作用。血清 microRNA 作为肿瘤诊断和预后的标志物,主要有以下优点:检测的损伤小、稳定性好、灵敏度高,可应用于早期肿瘤的检测。但是,由于血清中 microRNA 的表达量较低,寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是目前血清 microRNA 应用于肿瘤临床检测亟待解决的问题。microRNA 是一类高度保守的非编码小 RNA,主要通过结合靶基因 mRNA 的 5pUTR、编码区或 3pUTR 而在转录后水平上对基因的表达行负调控功能,microRNA 参与基因表达调控的方式主要是抑制翻译过程的进行,少数情况下也可引起 mRNA 降解,生物信息学分析表明,每个 microRNA 可能调节数百个靶基因,提示 microRNA 可能参与调节细胞生命活动中众多的信号转导途径,在细胞增殖、分化、凋亡、免疫反应及血管生成等一系列过程中发挥作用。miRNA 有望成为诊断结肠癌的新的生物标志物。正常细胞和癌细胞都能释放 miRNA 到外周血。循环中的 miRNA 被高度稳定的复合体(最常见的是胞外体和微小囊泡)包裹,以阻止 miRNA 被 RNA 酶降解。miR-17-3p 和 miR-92a 在结肠癌患者血浆中明显升高,而在切除肿瘤组织后,这两种 miRNA 都显著下降,miR-92a 还能与结肠癌和其他疾病,如胃癌和炎症性肠病进行鉴别,进一步分析表明,miR-92a 能够产生 88.5% 的 ROC 面积,在相对 RNU6B 核内小 RNA 表达的临界值为 240 时,其敏感性和特异性分别为 89% 和 70%。miR-92a 的诊断价值进一步被确定,Huang 等指出,miR-92a 和 miR-29a 能从正常人群中区分结肠癌和高危的腺瘤,从而证实 miR-92a 对早期诊断结肠癌有用。除了外周血,因为结肠细胞不断脱落到肠腔中,大便中也有结肠癌特异性的 miRNA,可作为另一有价值的诊断途径。本发明选择多组临床标本(癌症病人、高危人群、正常对照)采用核酸原位杂交技术和免疫组化方法

对 microRNA-29a 与结肠癌的早期预警进行检测分析。

[0009] 本发明人在研究中发现 microRNA-29a 在结肠癌患者、癌症高危人群、正常对照人有明显的表达量变化,将 microRNA-29a 作为早期筛查结肠癌变前期有非常重要的临床诊断意义。MICRORNA-29A 在结肠癌变前期过程中高表达。他作为于癌变前期筛查、及结肠癌治疗后的复发、转移预警也有非常重要的临床意义。

[0010] 发明人在长期的研究中,得出了一种新理念,癌症和其它临床的重大疾病的临床诊治模式一定要改变,不能只停留现在治已病(发病后诊治),要做到预防性诊治,做到治已病,只有这样才能降低重大疾病的发病率和死亡率,降低社会成本和医疗成本。因此,发明人在开发和生产重大疾病的 RNA 水平筛查试剂盒及治疗药物中,在理论和技术上都做了创新。特别是筛选临床标本(正常人群、癌症高危人群、肿瘤患者),突破了正常组织与肿瘤组织比较的一贯性研发思路,来寻找和开发癌前变的 RNA 水平,与癌症早期基因病理生理学演变密切相关,而且临床意义非常重要靶标,将临床上肿瘤形成后诊治模式变成肿瘤的预防性诊治,争取了肿瘤诊治的时间和空间,达到预防癌症。

[0011] 目前, MICRORNA-29A 表达谱检测方法用 Northern 杂交、表达芯片、实时荧光定量 PCR 和 Solexa 测序等分析技术,而这些方法多用于科研方面,不适应临床应用,而检测 RNA 比基因分析更科学(DNA 分析大部分在易感性的表象上, RNA 是功能性体现),比蛋白分析更可靠(RNA 与蛋白转录有时候不同步)。根据现有的文献资料采用原位杂交技术和组化免疫方法检测 MicroRNA-29a 水平表达量的检测技术及试剂盒未见报道。

[0012] 本发明人在针对创新性发明的要求,设计了(结肠癌患者、高危人群、正常对照)不同数据例组,用原位杂交技术进行检测,结果表明以上结肠癌病人 MICRORNA-29A 高表达,高危人群有不同程度表达 15-25%,正常对照都是低表达。表明 MICRORNA-29A 结肠癌变前期筛查的重要标志物。

[0013] 原位杂交技术(*in situ hybridization*)是将分子生物学与细胞化学技术结合起来,以标记的核酸分子为探针,在组织细胞原位检测特异性核酸分子的技术。其原理是使含有特异序列、经过标记的核酸单链(即探针),在适宜条件下与组织细胞中的互补核酸单链即靶核酸发生杂交,再以放射自显影或免疫细胞化学方法对标记探针进行探测,从而在细胞原位显示特异的 DNA 或 RNA 分子。

[0014] 原位杂交的探针是已知序列的分子或序列未知但分子已知的核酸分子(虽不明确该分子全部序列,但已知其针对何靶分子),探针的种类按核酸性质不同又可分为 DNA 探针、cDNA 探针、cRNA 探针和合成寡核苷酸探针。为了便于示踪,探针必须用一定的手段加以标记,以利于以后的检测。常用的标记物包括放射性核素和非放射性标记物两大类。常用的同位素标记物有 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 和 ^{32}P 。同位素标记物虽然有灵敏性高、背景较为清晰等优点,但是由于放射性同位素对人和环境均会造成伤害,近来有被非同位素取代的趋势。非同位素标记物中目前最常用的有生物素、地高辛和荧光素三种。检测这些标记物的方法都是极其灵敏的。

[0015] 根据所用探针及所要检测核酸的不同又可分为 DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-RNA 杂交。但不论哪一种形式的杂交,都必须经过五大过程,即组织细胞的固定,预杂交、杂交、冲洗和显示。本发明采用 RNA-RNA 的杂交方式,合成的探针(RNA)和检测的靶 RNA 是采用碱基互补(杂交互补)的原理,同时经过长时间研究和观察,启动和中止处得残基对检测的结果没

有影响。

[0016] 鉴于目前临床上癌症的诊断(影像医学和生化指标物都是肿瘤形成后的诊断)是晚期诊断,治疗也是晚期治疗,导致死亡率不降的医治模式。本发明的初衷是想改变目前临床上重大疾病的诊治模式,从治已病变成预防性治未病,达到预防性诊治,将目前影像医学手段和众多生化标记物无法检测到癌前变 RNA 水平量化改变技术,做了创新性的技术突破,提供癌前变 RNA 水平筛查技术。使临床上有了项新的癌前变 RNA 水平真正早期筛查的技术,为临床癌症的诊治争取时间和空间。

发明内容

[0017] 本发明的目的首先是提供一种原位杂交检测试剂盒,其包含原位杂交检测探针和标记物。其次,本发明还要提供上述试剂盒用于与结肠癌变前期筛查及治疗后转移早期预警相关的原位杂交检测方法。

[0018] 为实现本发明的目的,本发明的技术方案如下:本发明首先提供一种原位杂交检测试剂盒,其包括杂交探针和标记物,其中,所述的杂交探针为序列表 SEQ ID NO.1 所示序列的互补序列,序列号:NR_029503.1,核苷酸序列长度是 64bp,位于染色体 7q32.3" 上。

[0019] 本发明试剂盒的一个优选方案是,所述的标记物选自放射性物质、化学发光或显色物质、生物素、金属螯、荧光素、酶及纳米材料。

[0020] 本发明试剂盒的一个优选方案是还包括杂交液。

[0021] 本发明试剂盒的一个优选方案是还包括增强剂。

[0022] 本发明试剂盒的一个优选方案是还包括显色剂。

[0023] 本发明的癌变前期 MICRORNA-29A 筛查试剂盒应用价值在于,对各种癌变前期筛查,及癌变后或治疗后复发、转移、扩散发生预警,进一步配合临床治疗。

[0024] 本发明还提供一种 MICRORNA-29A 原位杂交的检测方法,包括以下步骤:

(1) 在上面所述的杂交探针与靶序列可形成稳定杂交复合体的条件下,将底物中待测 RNA 与杂交探针接触,形成杂交复合体;和

(2) 检测所述杂交复合体。

[0025] 本发明所述的检测方法,其中优选地是,所述的可形成稳定杂交复合体的条件为:核酸杂交的温度为 42℃;核酸杂交的时间为 16—24 小时。

[0026] 本发明所述的检测方法,其中优选地是,所述的底物选用人的血液白细胞标本或其它器官组织细胞标本。更优选地是,所述的血液标本或其它器官组织细胞标本来自结肠癌患者、结肠癌高危人群、健康正常人群。

[0027] 本发明的检测试剂盒是采用核酸杂交技术和组化免疫方法相结合,以 MICRORNA-29A 为检测对象,合成探针是 MICRORNA-29A 序列的互补序列,检测的底物是人体血液标本白细胞或组织细胞的 RNA 的表达量。原位杂交技术的显示方法能提供 MICRORNA-29A 的半定量或定量表达程度判定。根据杂交后免疫组化显色判定以上 RNA 的表达量,正常人 MICRORNA-29A 低表达,即少量显色, MICRORNA-29A 在结肠癌病人和正常对照有显著差异,该基因的表达量比正常人表达量都高。

[0028] 本发明的诊断试剂盒的组份是由杂交探针,杂交液,显色剂,增效剂等组成。本试剂盒的核酸杂交原理是分子生物学业内人士均熟知,具体操作步骤是标本处理、预杂交、杂

交、免疫组化染色、镜下进行定量分析、结果报告,其中杂交的具体步骤包括:

- 1). 将待测标本放入反应槽中;
- 2). 仪器自动弃去液体,自动加消化液;
- 3). 仪器自动弃去液体,自动后固定;
- 4). 仪器自动弃去液体,自动预杂交(42℃);
- 5). 仪器自动弃去液体,自动清洗;
- 6). 仪器自动弃去液体,自动杂交(42℃);
- 7). 仪器自动弃去液体,自动清洗;
- 8). 仪器自动弃去液体,自动与 DIG 抗体培养(室温);
- 9). 仪器自动弃去液体,自动清洗,显色;
- 10). 取出封片镜检。

[0029] 本发明的一个优选实施例的方案是:以 MICRORNA-29A 合成的核酸探针用地高辛标记(地高辛标记的 cDNA、RNA 和寡核苷酸探针,不但探针的具有生物素标记优点,还克服了生物素标记的探针在原位杂交过程中受组织内源性生物素干扰等缺点),将该杂交探针与人体血液白细胞的待测 RNA 核酸进行杂交,再用免疫组化的方法显色,在光镜下观察 RNA 的存在和定位,根据染色的细胞数,判断目的 RNA 的表达量。

[0030] 本发明方法是目前常用的核酸原位杂交技术,该方法通过检测底物细胞中的 MICRORNA-29A 表达量,用来确定结肠癌病理演变前期的 RNA 变化量,预警各种癌变是否发生及结肠癌患者治疗后是否复发、转移的预测。因为 MICRORNA-29A 在正常人中低表达,如果 MICRORNA-29A 表达量增高,说明有患癌的风险,说明癌变已发生,或癌症病人术后已经复发、转移,从而获得癌症的诊断信息。一个试剂盒可以多人份使用或一人份使用。

[0031] 本发明具有如下有益效果:

本发明的临床意义是更早期跟踪检测各种癌变发生和病理演变过程中 MICRORNA-29A 表达量的变化,预警结肠癌发生、发展趋势。本发明的诊断试剂盒与临床上其它检测与癌症标志物,以及影像医学检查有显著不同。本发明可以在 RNA 水平检测 MICRORNA-29A 异常表达,在影像医学检查未发现占位性癌病灶复发之前,癌症生化指标未产生异常之前,亦未形成肿瘤之前,能及早做到以上基因表达异常的信息采集,给临床癌病患者一个真正的早期预警以及治疗后转移复发及早预测。这样才有可能实施癌症的早期筛查、早期预防、早期治疗,有可能从源头上彻底根治结肠癌恶疾。

[0032] 此外,本发明提供的试剂盒具有灵敏度高、特异性强的特点,同时,本发明的检测方法操作方便、简单,能在区级以上医院普遍使用和推广。

附图说明

[0033] 图 1 是本发明 MICRORNA-29A 原位杂交技术流程图。

[0034] 图 2 是本发明实施例中结肠癌病人 MICRORNA-29A 表达图片。

[0035] 图 3 是高危人群图片。

[0036] 图 4 是本发明实施例中正常人 MICRORNA-29A 表达图片。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例,更具体地说明本发明的内容。应该理解,下面的实施例用于说明而非限定本发明内容,任何形式上的改变或变通将落入本发明的保护范围。

[0038] 实施例 1

按照常规方法制备本实施例的原位杂交试剂盒,该试剂盒包括以 MICRORNA-29A 设计的杂交探针、标记物、说明书,其中:本实施例的探针标记物选用地高辛。

[0039] 试剂盒杂交液组成:

消化液	100 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
保护液	100 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
预杂交液	1300 μ L/管	2 管/盒	无色透明液体
正义杂交液	10 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
反义杂交液	10 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
封闭液	1000 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
碱性磷酸酶抗体	1 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
显色剂 A	175 μ L/管	1 管/盒	黄色液体
显色剂 B	320 μ L/管	1 管/盒	无色透明液体
缓冲液 I	90mL/瓶	1 瓶/盒	浅黄色或无色透明液体
缓冲液 II	80mL/瓶	1 瓶/盒	浅黄色或无色透明液体
缓冲液 III	20mL/瓶	3 瓶/盒	浅黄色或无色透明液体
缓冲液 IV	90mL/瓶	1 瓶/盒	浅黄色或无色透明液体
固定液	90mL/瓶	1 瓶/盒	无色透明液体
阳性对照标本	6 片/盒		

配制试剂使用浓度

- 1). 将 10 \times 缓冲液 I 用三蒸水按 1:10 稀释成 1 \times 缓冲液 I ;
- 2). 将 20 \times 缓冲液 II 用三蒸水按 1:10 稀释成 2 \times 缓冲液 II ;
按 1:100 稀释成 0.2 \times 缓冲液 II ; 按 1:200 稀释成 0.1 \times 缓冲液 II ;
- 3). 将 10 \times 缓冲液 III 用三蒸水按 1:10 稀释成 1 \times 缓冲液 III ;
- 4). 10 \times 缓冲液 IV 用三蒸水按 1:10 稀释成 \times 缓冲液 IV (取 1#, 2#, 3# 各 10mL, 加水至 100mL 既可)。

[0040] 实施例 2

应用核酸原位杂交检测方法对各组血液标本 MICRORNA-29A 表达量的实施过程:

- 1). 取待测标本两张 ;
- 2). 在玻璃缸里加入消化液 (消化液 100 μ L 加 1 \times 缓冲液 I 99.9ml,即为使用浓度) 50 ml, 37 $^{\circ}$ C 水浴预热 10min, 放进 16 张玻片, 37 $^{\circ}$ C 处理 12 min, 再用 1 \times 缓冲液 I 洗 5min ;
- 3). 用 0.2% 的保护液 (保护液 1ml 加 1 \times 缓冲液 I, 99ml 即为使用浓度) 洗 10min, 三蒸水洗 5min (以上过程都在玻璃缸进行), 取出玻片, 让其自然干燥 ;
- 4). 将玻片放入保湿盒内, 加预杂交液 25 μ L/片 (加在有细胞的地方), 盖上盖玻片, 盖紧保湿盒, 放在 42 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中 3h 以上 ;
- 5). 取出玻片, 弃去盖玻片, 将玻片放入玻璃缸内, 用 70%、90%、95% 的乙醇各洗 2min, 取出, 自然干燥 ;
- 6). 将玻片放入保湿盒内, 一张加正义杂交液 25 μ L/片, 另一张加反义杂交液 25 μ L/片, 盖上盖玻片, 盖紧保湿盒, 放在 42 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中 16-24h ;
- 7). 取出玻片, 弃去盖玻片, 将玻片放入玻璃缸内 :
在 42 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中用 2 \times 缓冲液 II 洗两次, 每次 15min ;
在 42 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中用 0.2 \times 缓冲液 II 洗一次, 每次 15min ;

在 42℃ 恒温水浴箱中用 0.1× 缓冲液 II 洗两次, 每次 15min ;

8). 用 1× 缓冲液 III 洗 30s, 取出玻片, 自然干燥 ;

9). 将玻片放入保湿盒内, 加 0.5% 封闭液 (1ml 封闭液加 5ml 1× 缓冲液 III) 100 μ L/ 片, 盖紧保湿盒, 在室温下作用 30min。 (此步骤不需加盖玻片) ;

10). 取出玻片, 用 1× 缓冲液 III 洗 30s, 自然干燥 ;

11). 将玻片放入保湿盒内, 加 X-AP 抗体 (取一管碱性磷酸酶抗体, 向其中加入 1.8ml 1× 缓冲液 III) 100 μ L/ 片, 盖紧保湿盒在室温下作用 30min, 时间不能过长, 否则会产生假阳性 (此步骤不需加盖玻片) ;

12). 取出玻片, 用 1× 缓冲液 III 洗 3 次, 每次 15min ;

13). 用 1× 缓冲液 IV 洗 2min, 加显色剂 (显色剂 A73.3 μ L, 显色剂 B157.5 μ L 加到 30mL 1× 缓冲液 IV 中, 混匀), 室温避光 16h 到 18h 以上 ;

14). 用三蒸水洗 5min, 自然干燥, (用甘油加 10% 的 1× 缓冲液 I 混匀) 封片镜检。

[0041] 本发明的核酸原位杂交检测方法将目的基因用地高辛标记, 成为 RNA 核酸探针, 将探针与人体白细胞的待测 RNA 核酸进行杂交, 再用免疫组化的方法显色, 因此在光镜下观察 RNA 的存在和定位, 根据染色的细胞数, 判断目的 RNA 的表达量。

[0042] 结肠癌病人 20 名, 高危人群 (肠息肉) 20 名, 正常对照组 20 名。抽所有待检人的外周血 3-5 毫升 (分离白细胞) 做原位杂交。结果表明, 所有癌症患者 MICRORNA-29A 表达量高, 细胞染色深; 高危人群表达稍降低, 小数染色; 正常对照组 MICRORNA-29A 表达量低, 细胞少数染色, 具体结果见图 2、图 3、图 4。

肠癌症人数	表达量 %	高危人数	表达量 %	正常人数	表达量 %
1	80	1	28	1	0
2	74	2	20	2	0
3	62	3	22	3	0
4	64	4	18	4	4
5	72	5	26	5	0
6	82	6	20	6	0
7	78	7	22	7	0
8	82	8	28	8	2
9	70	9	26	9	5
10	84	10	22	10	0
11	72	11	22	11	2
12	78	12	24	12	0
13	80	13	16	13	3
14	74	14	18	14	0
15	68	15	22	15	0
16	80	16	24	16	0
17	78	17	26	17	0
18	70	18	16	18	0
19	82	19	14	19	0
20	76	20	23	20	2

[0043] 。

1 atgactgatt tcttttgggtg ttcagagtca atataatfff ctagcaccat ctgaaatcgg
61 ttat

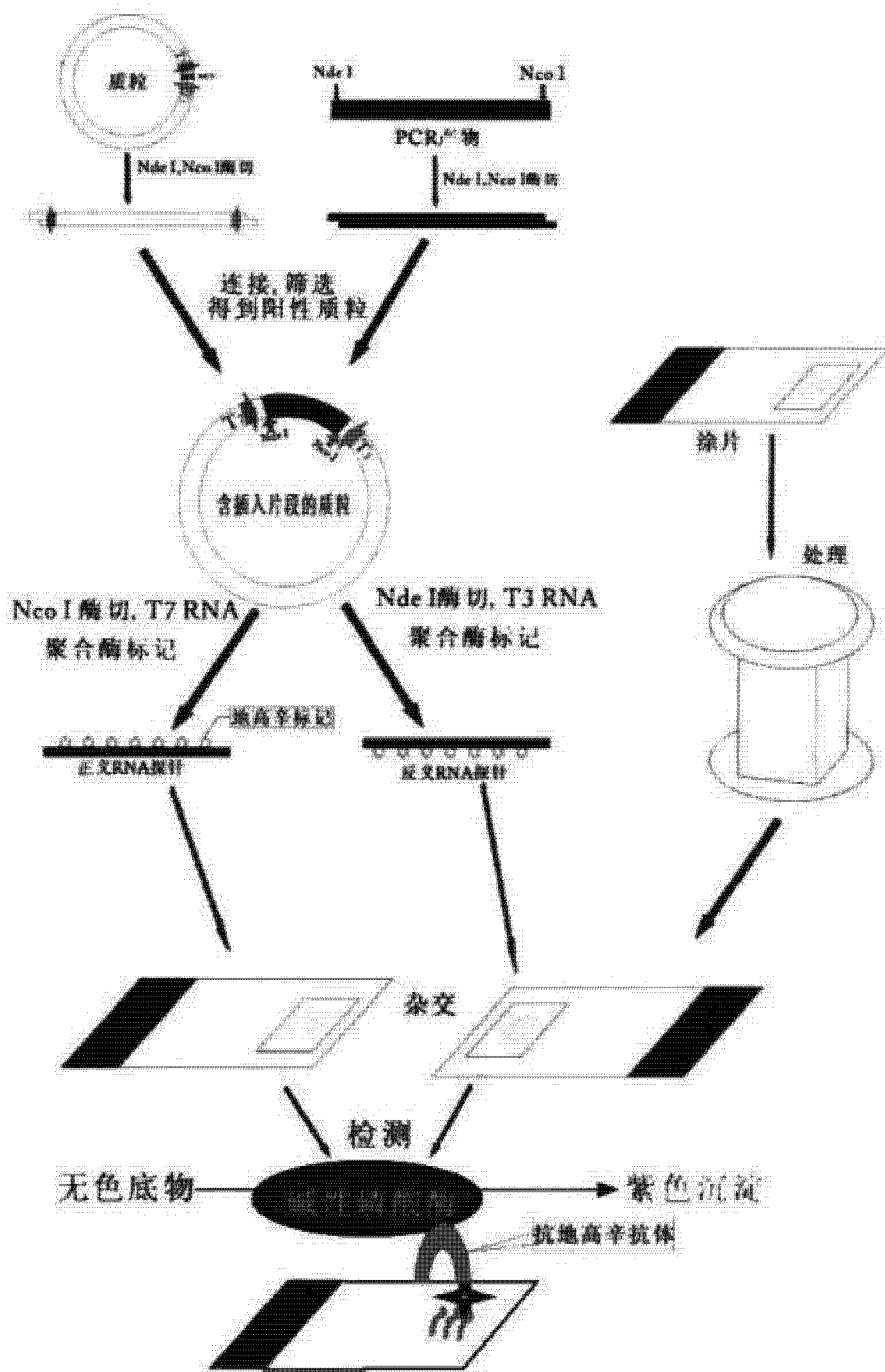


图 1

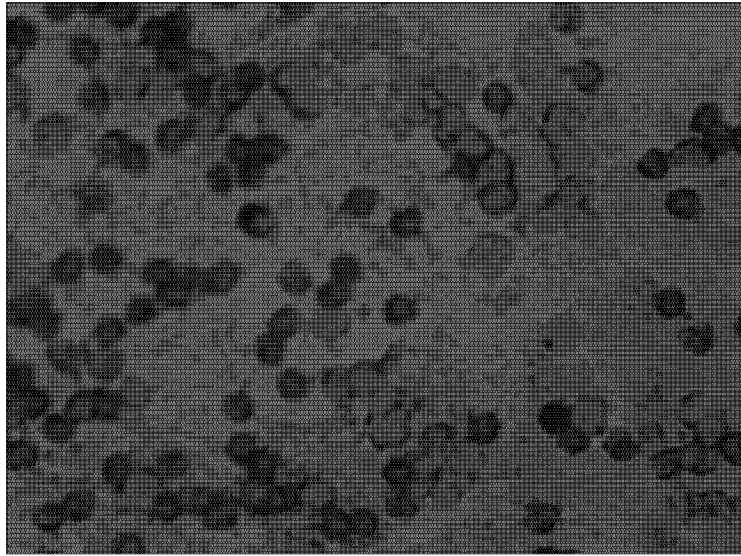


图 2

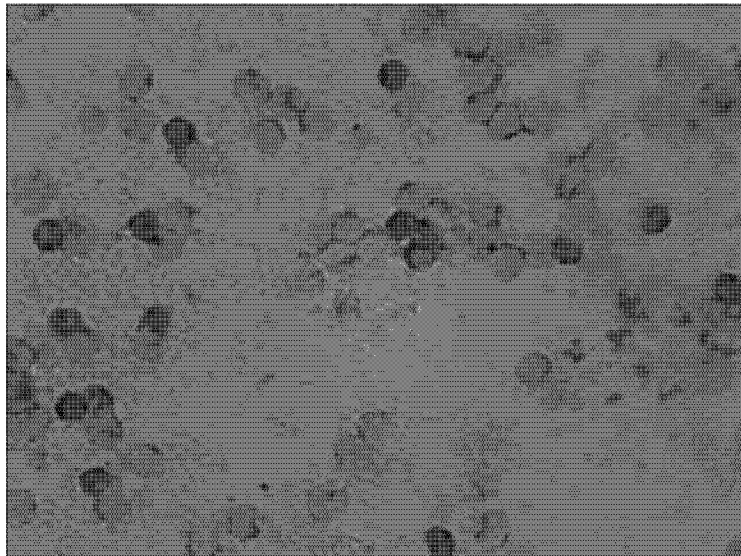


图 3

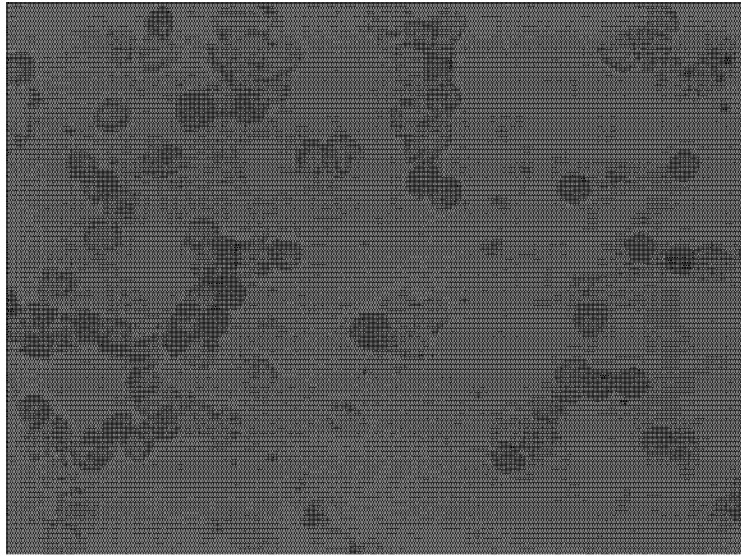


图 4