



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104774914 B

(45)授权公告日 2018.01.09

(21)申请号 201410010994.5

(22)申请日 2014.01.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104774914 A

(43)申请公布日 2015.07.15

(73)专利权人 复旦大学附属儿科医院
地址 201102 上海市闵行区万源路399号

(72)发明人 郑珊 董瑞 陈功

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

US 2006/0189561 A1,2006.08.24,

CN 101821391 A,2010.09.01,

WO 2011/119852 A1,2011.09.29,

CN 102818866 A,2012.12.12,

Shan Zheng等.Serum microRNA

microarray analysis identifies miR-4429
and miR-4689 are potential diagnostic

miR-4689 are potential diagnostic..

《SCIENTIFIC REPORTS》.2016,第1-11页.

李桂生.胆道闭锁诊治现状与展望.《临床外
科杂志》.2004,第12卷(第5期),第266-268页.

审查员 夏文静

权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征的
microRNA血清标志物检测及其应用

(57)摘要

本发明属生物医药和分子生物学领域,涉及一种新的胆道闭锁诊断标志物。具体提供了一组microRNA在制备胆道闭锁诊断制剂中的应用,所述的microRNA由hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429组成。试验表明,胆道闭锁血清中,上述miRNA与淤胆型婴儿肝炎综合征的相应miRNA的表达量具有统计学意义上的显著性差异。本发明还提供了这组miRNA的检测方法,该检测方法比现有技术检测省时、灵敏度与准确度更高、成本更低、和/或更高效。另外,本发明还提供了用于这些应用相关的试剂盒以及芯片等。

1. 一组针对microRNA检测的试剂在制备用于区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征的制剂中的应用,

所述的microRNA由hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429组成;

所述的试剂通过下述方法检测血清中hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达:

(a) 采用microRNA芯片技术检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达;

或者

(b) 采用荧光定量PCR技术检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429的表达情况;

其中,检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达所用的探针包括:

CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG;

UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU;

UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC;

AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG。

2. 一种芯片,其特征在于,所述的芯片偶联检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的探针,所述的探针包括:

CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG;

UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU;

UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC;

AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG。

3. 一种检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有权利要求2所述的芯片或探针;

所述的芯片偶联检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的探针,所述的探针包括:

CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG;

UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU;

UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC;

AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG。

4. 如权利要求3所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括用于提取RNA、PCR、杂交或者显色所需的试剂。

5. 如权利要求3所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的标准品。

胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征的microRNA血清标志物检测及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,本发明涉及一类可用于区分胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的microRNA血清标志物的检测以及用途。本发明还涉及检测所述microRNA标志物的芯片和试剂盒。

背景技术

[0002] 胆道闭锁是以肝内外胆管闭锁和梗阻性黄疸为特点的小儿外科常见畸形,其发病率为1/5000-1/8000。是一种发生于儿童,以进行性硬化性胆管炎症,各级胆管梗阻和破坏,肝纤维化和肝硬化形成为基本病理特点的疾病。许多患儿往往在确诊胆道闭锁时即已存在严重的肝脏纤维化,并且很快发展成为肝硬化,最终导致肝功能衰竭。因此,胆道闭锁的尽早诊断就愈发显得迫切。

[0003] 基因作为生命的遗传介质,在生物体的生、老、病、死中处于基础内因的地位。绝大部分基因通过转录生成核糖核酸,再翻译生成蛋白质而发挥生物学功能。

[0004] microRNA(微小RNA)是一类在较高等的真核生物体内广泛存在的,长度约21到23个碱基的单链RNA分子。它可以通过碱基配对原则特异性地与一些mRNA上的靶位点相结合,引起靶mRNA降解或翻译抑制,进而在转录后水平对靶基因进行调控。从而抑制转录后基因表达,在调控基因表达、细胞周期、生物体发育时序等方面起重要作用。在动物中,一个microRNA通常可以调控数十个基因。

[0005] microRNA来源于长度约为1000bp的长链RNA初始转录产物(Pri-microRNA),Pri-microRNA分子在细胞核中经Drosha酶剪切形成长度约60-80nt的具有茎环结构的microRNA前体。microRNA前体转运至胞质后,被Dicer酶进一步切割成长约22nt的双链microRNA。双链microRNA解开后,成熟的microRNA进入RNA诱导基因沉默复合物,与互补mRNA完全或不完全配对,降解靶mRNA或阻遏其表达。

[0006] 尽管microRNA在细胞总RNA中所占的比重很小,但由于它可以高效地对所有具有靶位点的mRNA产生调控作用,microRNA在生物体的发育乃至疾病的发生、发展过程所起的作用仍不可小视。然而,迄今为止,本领域对于与胆道闭锁相关的microRNA了解甚少,因此本领域迫切需要进一步地分离各种microRNA,尤其是与疾病的发生、预后或检测有关的microRNA。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一类新的、可用于区分胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的microRNA标志物及其在制备相关疾病检测制剂中的应用。

[0008] 本发明的另一目的就是提供所述microRNA标志物的检测方法,该方法比现有检测技术省时、灵敏度与准确度更高、成本更低、和/或更高效。

[0009] 本发明提供了hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429在制

备胆道闭锁诊断制剂中的应用。

[0010] 例如,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429作为区分胆道闭锁或者淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的microRNA血清标志物。又如,将hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429作为治疗或者辅助治疗胆道闭锁或者淤胆型婴儿肝炎综合征的药剂的筛药靶标。

[0011] 试验表明,胆道闭锁血清中,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p表达量高于淤胆型婴儿肝炎综合征,而hsa-miR-4429表达量下降。表达量差异具有统计学意义上的显著性差异。

[0012] 本发明提供了检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达的方法:

[0013] (1)采用microRNA芯片技术检测胆道闭锁血清中hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达;

[0014] 或者

[0015] (2)采用荧光定量PCR技术检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429的表达情况。

[0016] 所述的检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达所用的探针,包括:

[0017] CUGGUACAGGCCUGGGGACAG (SEQ ID N01);

[0018] UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (SEQ ID N02);

[0019] UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC (SEQ ID N03);

[0020] AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG (SEQ ID N04)。

[0021] 本发明提供了一种芯片,该芯片偶联检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的探针。

[0022] 上述芯片,可以用于检测样品中hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达;检测方法包括步骤:

[0023] (1)提供分离的血清RNA样品,在所述的RNA上设置标记物;

[0024] (2)将(1)的RNA与所述的芯片接触,使所述的RNA与固相载体上的寡核苷酸探针发生杂交反应,从而在固相载体上形成“寡核苷酸探针-RNA”二元复合物;

[0025] (3)检测(2)形成的二元复合物的标记物,从而确定血清RNA样品中hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达。

[0026] 所述的检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达所用的探针,包括:

[0027] CUGGUACAGGCCUGGGGACAG (SEQ ID N01);

[0028] UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (SEQ ID N02);

[0029] UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC (SEQ ID N03);

[0030] AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG (SEQ ID N04)。

[0031] 本发明还提供了一种检测试剂盒。

[0032] 所述的试剂盒含有上述芯片,或者含有检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的探针。

[0033] 所述的检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的表达所用的探针,包括:

[0034] CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG (SEQ ID N01);

[0035] UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (SEQ ID N02);

[0036] UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC (SEQ ID N03);

[0037] AAAAGCUGGGCUGAGAGGCG (SEQ ID N04)。

[0038] 所述的试剂盒中可包括用于提取RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂。

[0039] 所述的试剂盒可以包括检测hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的引物对。

[0040] 所述的试剂盒还可以包括hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-4429的标准品。

[0041] 所述的试剂盒能够用于检测区分胆道闭锁或者淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的microRNA血清标志物。

[0042] 具体而言,在第一方面,本发明提供了胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的差异表达microRNA可作为诊断标志物。

[0043] 本发明中,多方面试验表明hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429可作为胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征的分子标志及其药物筛选靶标:

[0044] 1,利用microRNA芯片(Agilent human miRNA8*60K V18.0)比较了胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿血清的microRNA表达谱,发现胆道闭锁血清中,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p表达量高于淤胆型婴儿肝炎综合征,而hsa-miR-4429表达量下降($p < 0.005$,差异大于2倍)。

[0045] 2,利用荧光定量PCR技术,对差异表达的microRNA进一步验证,发现胆道闭锁血清中,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p表达量高于淤胆型婴儿肝炎综合征,而hsa-miR-4429表达量下降($p < 0.01$)。

[0046] 3,利用荧光定量PCR技术,通过双盲检查,发现联合应用hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429区分胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异性均大于90%。

[0047] 本发明的试验结果表明,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429在胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合征患儿血清中表达明显差异,联合应用可作为具有较高灵敏度与准确度的诊断标志物,有效地提高胆道闭锁的诊断水平。

[0048] 在第二方面,本发明提供了用于检测的hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429检测芯片、检测试剂盒、基因诊断用的荧光定量PCR试剂盒。所述试剂盒中,其包括基于hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429的特异性探针与引物对。

[0049] 本发明经实验证实,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429可作为一种有效的诊断标志物。具体的,hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429可作为胆道闭锁诊断的标志物,包括各种免疫组化诊断方法、原位杂交、RT-PCR、病理诊断及早期诊断方面的应用;hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429可作为胆道闭锁基因治疗及药物筛选靶标的应用。本发明用于诊断具有特异性

高,检测准确性高的优点;用于药物筛选靶分子,具有靶标明确的优点。

[0050] 为了便于理解,以下将通过具体的附图和具体实施方式对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。

附图说明

[0051] 图1microRNA芯片显示了hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429在胆道闭锁中的表达情况。其中,1.胆道闭锁组:S134、S137、S138、S139;2.淤胆型婴儿肝炎综合征组:S204、S206、S207、S208;3.绿色代表相对低甲基化,颜色越深表示甲基化程度越低;4.红色代表相对高甲基化,颜色越深表示甲基化程度越高。

[0052] 图2荧光定量PCR技术显示了hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429在胆道闭锁中的表达情况。hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429表达情况与芯片结果一致,其中hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p在胆道闭锁中高表达,hsa-miR-4429低表达。

[0053] 图3ROC曲线分析显示了hsa-miR-150区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度。hsa-miR-150ROC为0.881,其区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度分别为91%、86%。

[0054] 图4ROC曲线分析显示了hsa-miR-4429区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度。hsa-miR-4429ROC为0.778,其区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度分别为83%、73%。

[0055] 图5ROC曲线分析显示了hsa-miR-4689区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度。hsa-miR-4689ROC为0.889,其区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度分别为83%、93%。

[0056] 图6ROC曲线分析显示了hsa-miR-92a-3p区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度。hsa-miR-92a-3p ROC为0.830,其区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征患儿的灵敏度和特异度分别为63%、93%。

具体实施方式

[0057] 本发明将通过具体的实施例来进行示例性的说明,其中,如有未尽之处,可参见《分子克隆实验指南(第三版)》(科学出版社,北京)等实验手册以及市售的试剂和仪器的使用说明。

[0058] 本发明人经过长期而广泛的研究,通过检测胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征样本的microRNA表达谱水平,用统计学方法,首次从中筛选出4个特异性的microRNA。经检验证明,这些特异性的microRNA标志物可非常有效地区分胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征样本。在此基础上完成了本发明。

[0059] 本发明人采用芯片杂交的方法得到胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征样本的microRNA表达谱,通过比较两种组织的表达谱,得到胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征这两种样本间差异表达的microRNA。以这些差异microRNA作为候选,使用C-SVC或V-SVC分类器算法筛选得到分类准确度为大于90%的一组分类器(含4个microRNA)。由这4个microRNA组成的分类器,可预测样本是来自胆道闭锁还是淤胆型婴儿肝炎综合征,其预测

准确度达到93%。基于本发明的这4个microRNA,可以开发成小型microRNA芯片或RT-PCR试剂盒用于区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征。

[0060] 本发明提供了一类新的人miRNA标志物。如本文所用,所述的“miRNA”是指一种RNA分子,从可形成miRNA前体的转录物加工而来。成熟的miRNA通常具有18-26个核苷酸,也不排除具有其它数目核苷酸的miRNA分子。miRNA通常可被Northern印迹检测到。

[0061] microRNA表达谱芯片通常含有多达几百个探针,涵盖多种microRNA,利用DNA双链同源互补的原理在全基因组水平上检测样本中所含各种microRNA的含量。因此,可在同一时间对待测样本中全基因组范围内的microRNA的转录水平进行检测。利用本发明所述的miRNA序列,还可以制备相应的miRNA芯片,进而研究其表达谱以及miRNAs的调节方式。

[0062] 在一方面,本发明提供一种用于分析miRNA表达谱的芯片,所述的芯片可用于区分胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征。本发明的所述的miRNA芯片包括:固相载体;以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针,所述的寡核苷酸探针特异性地对应于miRNA所示的序列。

[0063] 具体地,可根据本发明所述的miRNA,设计出适合的探针,固定在固相载体上,形成“寡核苷酸阵列”。所述的“寡核苷酸阵列”是指具有可寻址位置(即以区别性的,可访问的地址为特征的位置)的阵列,每个可寻址位置均含有一个与其相连的特征性寡核苷酸。根据需要,可将寡核苷酸阵列分成多个亚阵。所述固相载体可采用基因芯片领域的各种常用材料,例如但不限于尼龙膜,经活性基团(如醛基、氨基等)修饰的玻片或硅片、未修饰的玻片、塑料片等。所述的miRNA芯片的制备可采用本领域已知的生物芯片的常规制造方法。例如,如果固相载体采用的是修饰玻片或硅片,探针的5'端含有氨基修饰的聚dT串,可将寡核苷酸探针配制成溶液,然后采用点样仪将其点在修饰玻片或硅片上,排列成预定的序列或阵列,然后通过放置过夜来固定,就可得到本发明的miRNA芯片。如果核酸不含氨基修饰,则其制备方法也可参照:王申五主编的《基因诊断技术-非放射性操作手册》。

[0064] 另一个方面,本发明还提供了一种通过miRNA芯片检测人血清中miRNA表达谱的方法,包括步骤:

[0065] (1) 提供分离自人血清的RNA样品,在所述的RNA上设置标记物;

[0066] (2) 将(1)的RNA与所述的芯片接触,使所述的RNA与固相载体上的寡核苷酸探针发生杂交反应,从而在固相载体上形成“寡核苷酸探针-RNA”二元复合物;

[0067] (3) 检测(2)形成的二元复合物的标记物,从而确定人血清中相应的miRNA的表达。

[0068] 从人血清中提取RNA的方法是本领域技术人员熟知的方法。更优选的,在步骤(1)中,在从人血清中分离出RNA样品后,对RNA样品进行适当处理,以富集具有一定长度的RNA,所述长度一般在10-100之间(小片段RNA)。在经过上述处理后,利用这些小片段RNA进行后续的杂交,这样可提高芯片捕获miRNA的准确性。本领域人员可方便地分离出具有一定片段长度的RNA,比如可采用凝胶电泳法来分离。对RNA进行标记也是本领域技术人员熟知的方法,其可通过在杂交时加入与RNA特异性结合的标记物的方法实现,所述标记物比如是标记基团。所述的标记基团包括但不限于:地高辛分子(DIG)、生物素分子(Bio)、荧光素及其衍生物分子(FITC等)、其它荧光分子(如Cy3、Cy5等)、碱性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶(HRP)等。这些标记及其标记方法都已是本领域众所周知的常规技术。将上述的RNA与miRNA芯片进行杂交时,可以先将miRNA芯片与预杂交缓冲液进行预杂交。

[0069] 本发明所述的RNA与miRNA芯片之间的固相杂交按照本领域的经典方法进行,本领域一般人员依据经验容易确定有关缓冲液、探针和样本浓度、预杂交温度、杂交温度以及时间等的最适条件。或者也可以参照《分子克隆实验指南》中所述的。然后根据标记信号在miRNA芯片上的位置、强度等信息获取待测信息。若扩增产物用荧光基团标记,也可直接用荧光检测设备(如激光共聚焦扫描仪Scanarray3000等)获取待测信息。

[0070] 本发明还提供了一种试剂盒,所述的试剂盒中含有本发明的芯片。所述的试剂盒可用于检测miRNA的表达谱;或用于区分胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征。更优选的,所述的试剂盒中还含有用于标记RNA样品的标记物,以及与所述标记物相对应的底物。还可以含有定量的miRNA标准样品。

[0071] 此外,所述的试剂盒中还可包括用于提取RNA、PCR、杂交、显色等所需的各种试剂,包括但不限于:抽提液、扩增液、杂交液、酶、对照液、显色液、洗液、抗体等。此外,所述的试剂盒中还可包括使用说明书和/或芯片图像分析软件。

[0072] 本发明的主要优点在于:

[0073] (1) 本发明提供了一类可用于区分胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征的新的microRNA标志物。

[0074] (2) 由本发明新的microRNA标志物所构成的分类器,可非常有效地区分胆道闭锁样本和淤胆型婴儿肝炎综合征。

[0075] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0076] 实施例1 RNA样本的制备

[0077] 40个胆道闭锁和35个淤胆型婴儿肝炎综合征血清样本来自于复旦大学附属儿科医院。上述所有标本的取得均通过上海市政府授权的WHO合作组织伦理委员会的同意。采用mirVana™ PARISTM(专用于抽提血的miRNA)(Cat#AM1556, Ambion, Austin, TX, US)并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的total RNA抽提,抽提所得total RNA经Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)电泳质检合格后备用。基因芯片: microRNA表达谱芯片,采用Agilent有限公司的miRNA表达谱芯片(单通道芯片)。

[0078] 实施例2 microRNA的提取和标记

[0079] 用Ambion公司的miRNAs抽提试剂盒抽提获得miRNA,具体操作按照相应说明书。样品用T4RNA连接酶标记步骤依照Thomson的方法。

[0080] 简而言之,方法如下:

[0081] (1) 从实施例1获得总RNA,然后用Ambion公司的miRNAs抽提试剂盒抽提获得miRNA;取出1.4ug miRNA和500ng的5'-磷酸盐-胞嘧啶-尿嘧啶-cy3-3'(Dharmacon, Chicago, USA)及2单位T4RNA ligase(NEB, Ipswich, USA),于4℃孵育2小时,对miRNA进行标记。每份miRNA样品均设等量的相应阴性对照。

[0082] (2) 标记的RNA用0.3M醋酸钠和2.5体积乙醇进行沉淀,再用15ul含3X SSC、0.2%

SDS和15%甲酰胺的杂交液重悬,所有的杂交重复两次,杂交用LifterSlip™(Erie,PA USA)以保证杂交液在芯片和盖片之间均匀流动。

[0083] (3)将杂交室放在杂交仪BioMixer™II上(Capital Bio Corp,Beijing,China)于42℃水浴杂交过夜,之后用洗液洗两遍。

[0084] 实施例3定量PCR试剂盒检测microRNA表达

[0085] (1)microRNA反转录

[0086] 采用ABI反转录试剂盒(Applied Biosystems),

[0087] 反应体系如下:

[0088] 100mM dNTPs(with dTTP) 0.2μl

[0089] MultiScribe™Reverse Transcriptase,50U/μL1μl

[0090] 10×Reverse Transcription Buffer1μl

[0091] RNase Inhibitor,20U/μL0.13μl

[0092] RT Primer for microRNA(1μl each)

[0093] RNA(10ng/μl) 3μl

[0094] 水1.67μl

[0095] Total110μl

[0096] (2)microRNA荧光定量PCR检测

[0097] 采用TaqMan MicroRNA试剂盒(Applied Biosystems),

[0098] 反应体系如下:

[0099] TaqMan MicroRNA Assay(20×) 0.5μl(探针减半用)

[0100] 模板:2ul稀释液(原液稀释10倍)

[0101] PCR Mix10ul

[0102] 水7.5ul

[0103] Total20ul

[0104] 反应条件如下:

[0105] 95度5min

[0106] 95度10s40cycles

[0107] 60度60s

[0108] 40度1min

[0109] 实施例4筛选差异显著的microRNA

[0110] 胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征本分别经荧光染料标记后,与microRNA表达谱芯片上的探针竞争性杂交。杂交后的芯片用晶芯©LuxScan™ 10K微阵列芯片扫描仪扫描获得结果图像,再通过其随机附带的LuxScan3.0通用微阵列图像分析软件对杂交结果定量。由此得到胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎综合征表达谱数据。

[0111] 将上述芯片结果首先用LOWESS(局部加权回归分析)归一化。之后,经归一化后的芯片结果取以2为底的对数($\log_2 X$),使用经配对T检验方法校正后的随机方差模型(RVM)筛选得到显著性差异microRNA。只有在上述统计学方法中,只有P值<0.01的microRNA才会被筛选为显著性差异microRNA。为寻找用于区分两类样本,本发明人使用Matlab软件的Lib-SVM工具包,使用C-SVC(参数C的支持矢量分类器)和V-SVC(参数V的支持矢量分类器)两种

方法,并各自采用四种核函数,共计8种方法构建SVM分类器。SVM(support vector mechine,支持矢量机)分类器是两类样本间差异microRNA的差异倍数的对数值的非线性函数,它寻找能最大化两类样本间距离的超平面,因而可以最好地区分两类样本。

[0112] 为检验分类器的分类准确度,选用在所有的交叉检验方法中最稳定的10乘10折交叉检验法。10折交叉检验法,是将样本总体分成10个子份,每次选1个子份作为测试数据集,其余9个子份作为训练数据集,重复10次(每次以不同的一个子份作为测试数据集)。如此得到的10个检验结果相结合形成对分类器分类准确度的一个评估值。再由8种算法中选择分类准确度最高的一种作为最佳分类器。为直观地显示同组样本间的相似以及不同组样本间的相异,在3维视效中引入多维标度法。以被分类器(一组microRNA)定义的样本-样本间相似度矩阵为基础,确定每一个样本在低维空间内的位置,并使之适应于3维视效。在此3维空间中,两样本越接近,则它们越相似;反之,若两样本相距越远,则它们之间越不同。

[0113] 结果,胆道闭锁与淤胆型婴儿肝炎综合征选到31个差异microRNA。以这些差异microRNA作为分类器候选。套入8种SVM分类器算法并使用前述的10乘10折的交叉检验来验证分类器的分类准确度。经1000次数据置换的10乘10折交叉验证得到分类器。

[0114] 为测试该分类器的预测能力和准确度,随机挑选15个样本作为未知样本,以该分类器对每个样本的组织来源进行预测,观察其预测准确度。综合8种算法,由C-SVC或者V-SVC这几种算法得到的分类准确度最高。这几种算法得到的用于区胆道闭锁与淤胆型婴儿肝炎综合征样本的4个microRNA组成(见表1),其分类准确度大于90%,对未知样本的预测准确率大于90%。

[0115] 表1设计及合成表达hsa-miR-150、hsa-miR-4689、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4429探针

[0116]

Assay ID	Assay Name	Reporter	Context Sequence
2637	hsa-miR-150-3p	FAM	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG
431	has-miR-92a-3p	FAM	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
463337_mat	hsa-miR-4689	FAM	UUGAGGAGACAUGGUGGGGGCC
464083_mat	hsa-miR-4429	FAM	AAAAGCUGGGCUGAGAGGCC

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 复旦大学附属儿科医院	
[0003]	<120> 胆道闭锁及淤胆型婴儿肝炎综合症的microRNA 血清标志物检测及其应用	
[0004]	<130> 201401	
[0005]	<160> 4	
[0006]	<170> PatentIn version 3.1	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 22	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> Artificial	
[0011]	<400> 1	
[0012]	cugguacagg ccugggggac ag	22
[0013]	<210> 2	
[0014]	<211> 22	
[0015]	<212> DNA	
[0016]	<213> Artificial	
[0017]	<400> 2	
[0018]	uauugcacuu gucccggccu gu	22
[0019]	<210> 3	
[0020]	<211> 22	
[0021]	<212> DNA	
[0022]	<213> Artificial	
[0023]	<400> 3	
[0024]	uugaggagac augguggggg cc	22
[0025]	<210> 4	
[0026]	<211> 20	
[0027]	<212> DNA	
[0028]	<213> Artificial	
[0029]	<400> 4	
[0030]	aaaagcuggg cugagaggcg	20

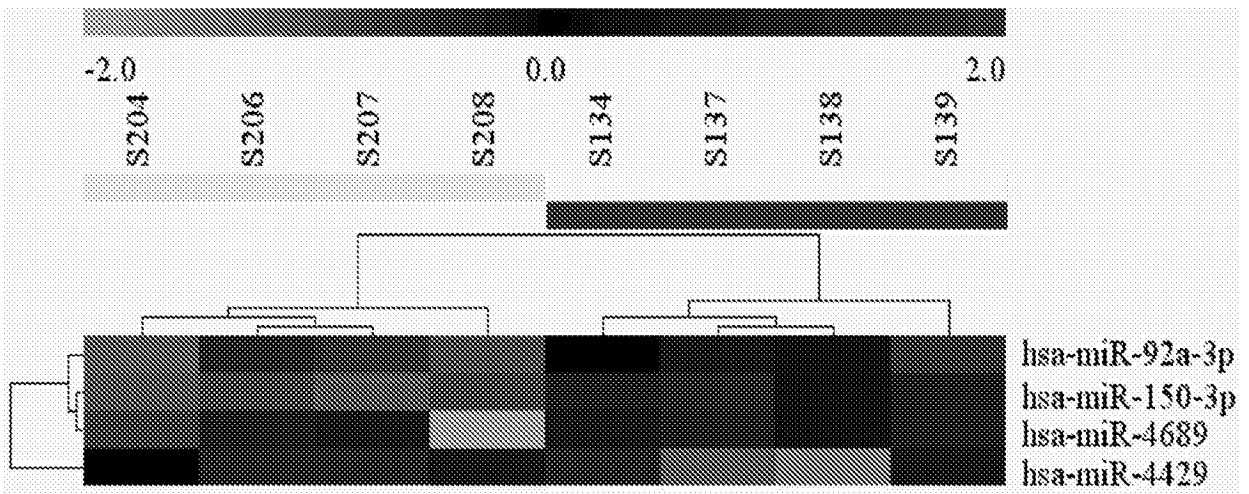


图1

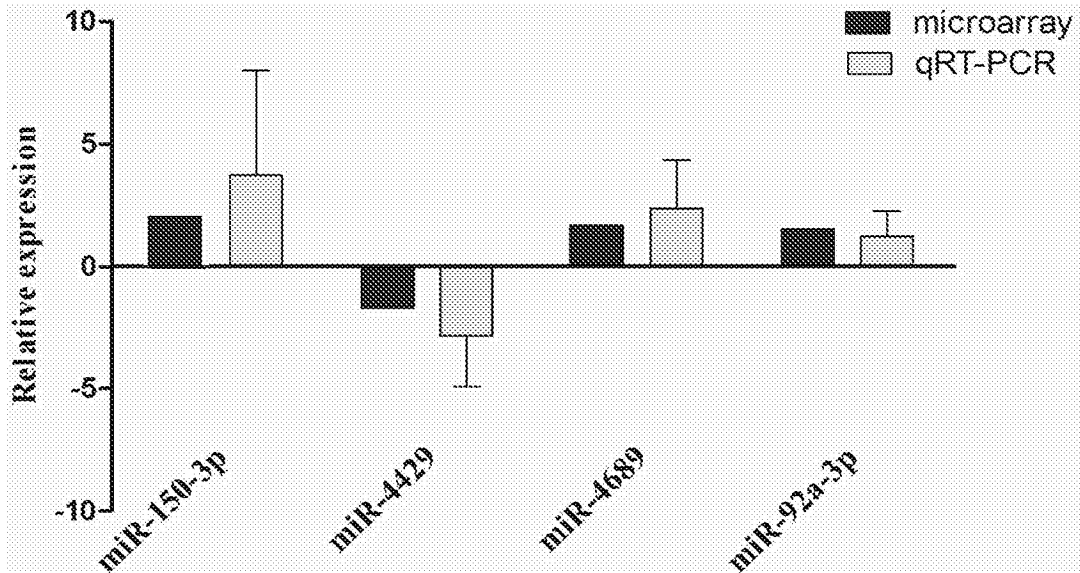


图2

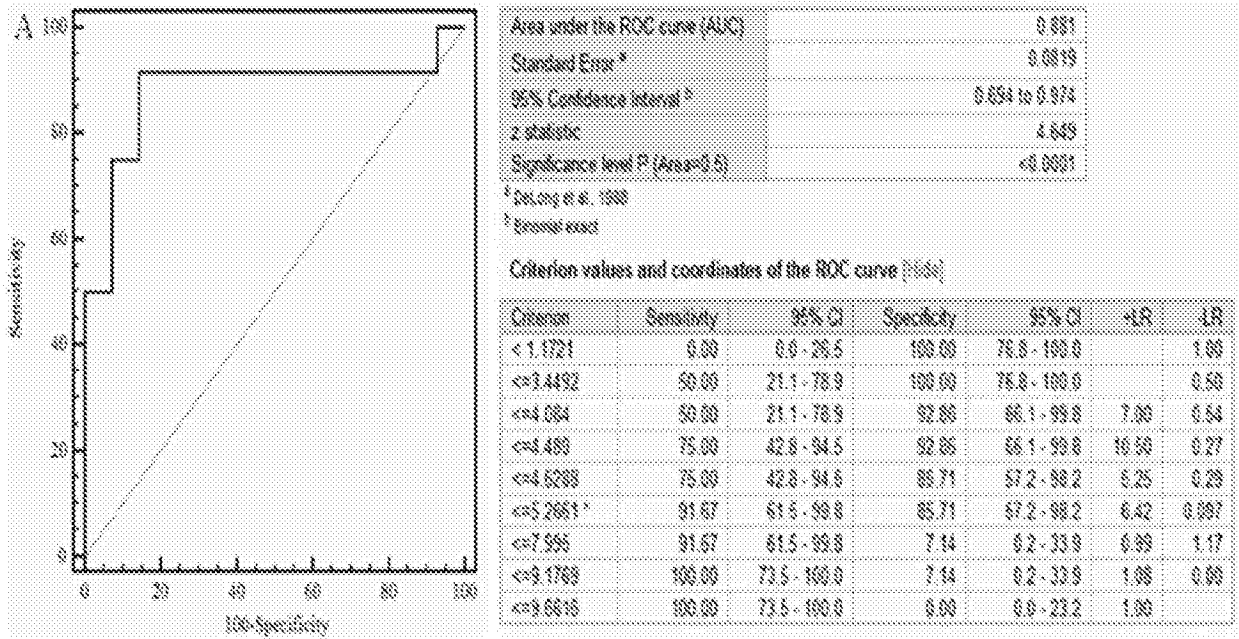


图3

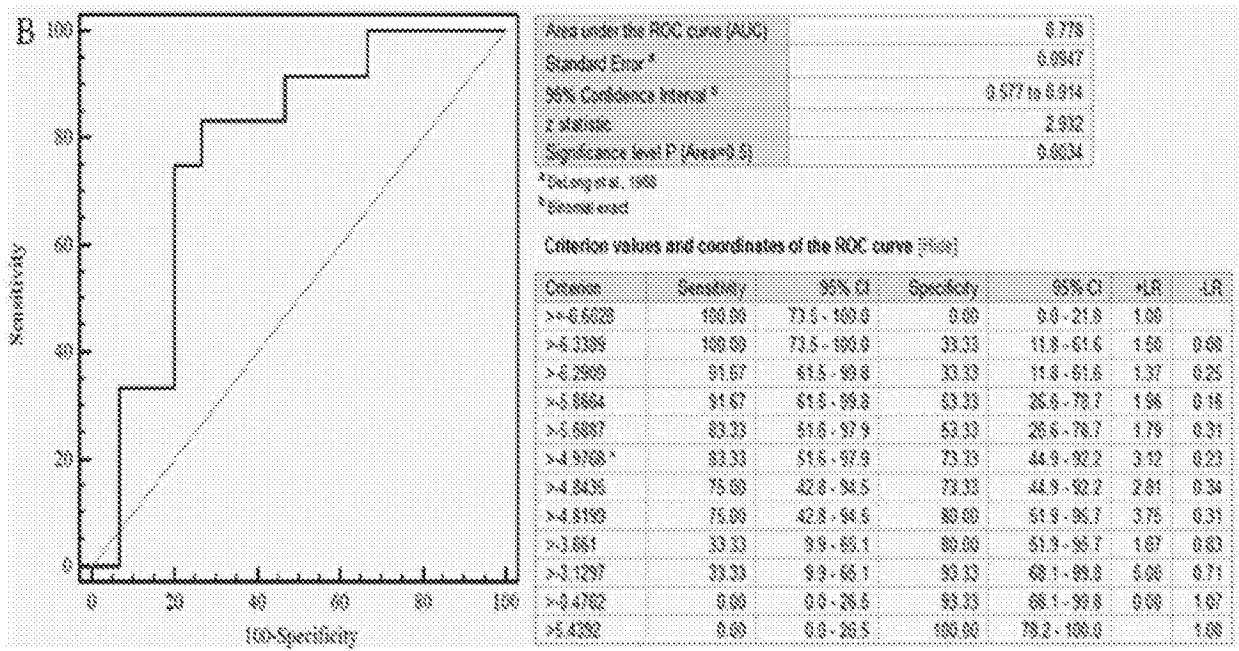


图4

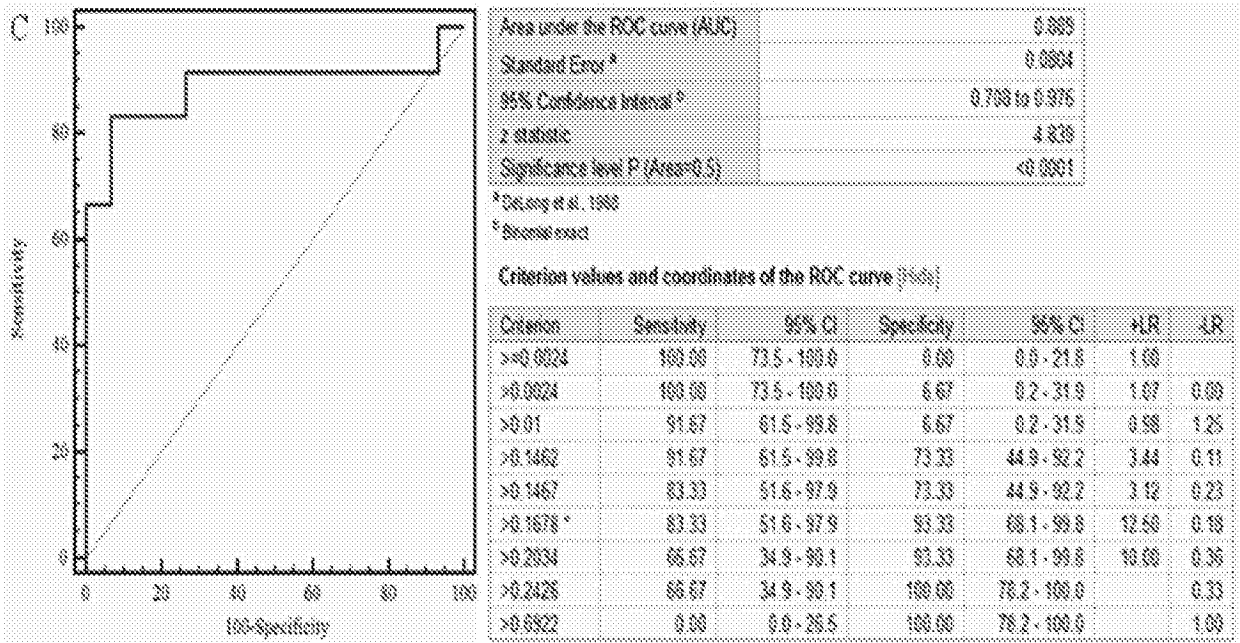


图5

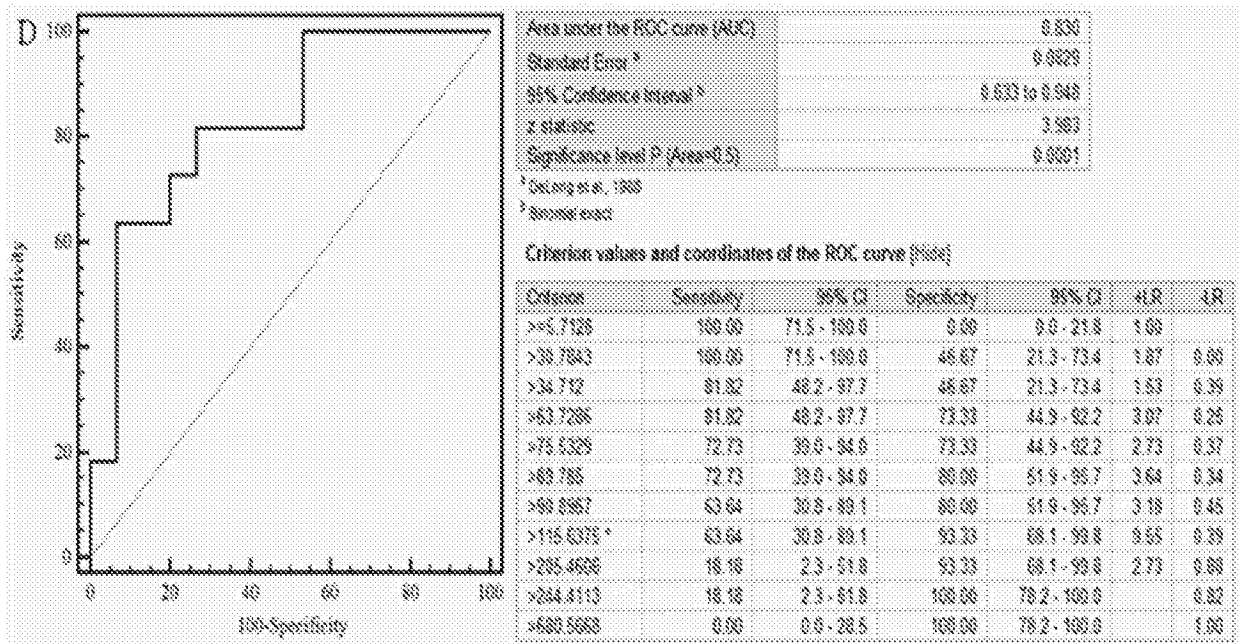


图6