

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201804002

基于纳米孔通道检测 microRNAs 对乳腺癌 辅助诊断的研究

李贝贝*, 李梦臻, 张芑芑, 管希云
(河南金泰生物技术股份有限公司, 郑州 450000)

摘要: 乳腺癌的发生、发展与 miRNA 31、miRNA 195、miRNA 892b 等的异常表达明显相关。因此, miRNA 31、miRNA 195、miRNA 892b 可作为乳腺癌的生物标志物及治疗预后指标。本文研究了一种对乳腺癌早期检测的新方法: 设计探针 (probe) 并使用 α -溶血素 (α HL) 纳米孔道单分子检测方法检测乳腺癌 miRNAs。DNA 探针与 miRNA 的中间序列完全匹配, 特异性识别目标 miRNA。miRNA · probe 复合物分子穿过纳米孔道时, 由于 probe 序列不同导致复合物分子与 α HL 相互作用不同, 以至于 miRNA 31 · probe 31、miRNA 195 · probe 195、miRNA 892b · probe 892b 有不同形状和不同堵塞时间特征信号, 可以有效区分这三种 miRNAs。因此, 未来有望实现乳腺癌的早期检测。

关键词: microRNA; 早期诊断; 乳腺癌; α -溶血素

中图分类号: 文献标志码: A 文章编号: 1672-5565(2018)04-269-07

Research on the auxiliary diagnosis of breast cancer based on the detection of microRNAs by nanopore channel detection

LI Beibei*, LI Mengzhen, ZHANG Pengpeng, GUAN Xiyun
(Henan Jintai Biological Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China)

Abstract: The occurrence and development of breast cancer is clearly associated with abnormal expression of miRNA 31, miRNA 195, and miRNA 892b, which can be used as valuable biomarkers and prognostic indices for breast cancer. Herein, we report a new method for early detection of breast cancer, where an α -hemolysin (α HL) nanopore was utilized as a sensing element for the breast cancer-associated miRNAs analysis in the presence of selective DNA probes. The DNA probe was well-matched with the middle sequence segment of the target miRNA, offering specific recognition of the analyte miRNA. When miRNA · probe hybridization molecules passed through the nanopore, the difference in the probe sequences led to a significant difference in the interactions between the hybridization molecules and the α HL pore, so that miRNA 31 · probe 31, miRNA 195 · probe 195, and miRNA 892b · probe 892b produced different characteristic signals, thus achieving the effective distinguishment among the three miRNAs. It is expected that early breast cancer detection might be accomplished in the near future.

Keywords: MicroRNA; Early diagnosis; Breast cancer; α HL

乳腺癌是我国常见多发疾病, 在妇科疾病中其发病率和死亡率已高居各种恶性肿瘤的首位, 大多数患者被临床诊断发现后已是肿瘤生长的晚期阶段, 失去了临床早期治疗的宝贵机会。因此该疾病对患者生命健康具有严重的威胁, 严重影响患者的生活质量。

缺乏早期诊断技术、没有持久有效的治疗方案仍然是乳腺癌诊治中存在的棘手问题。目前, 常用的实时定量 qRT-PCR 法存在非特异性杂交以及错误扩增等问题^[1], 而传统的检测方法 Northern 杂交法, 对 miRNA 检测灵敏度低^[2], 而其他的方法则大多需要对目标分子进行化学修饰或特殊标记。由于

收稿日期: 2018-04-13; 修回日期: 2018-06-12.

基金项目: 基于纳米通道技术的癌症早期检测研究 (河南省科技开放合作计划项目 152106000021).

* 通信作者: 李贝贝, 女, 研究方向: 纳米通道技术的癌症早期检测。E-mail: wu304473982@yeah.net.

早期诊断有助于改善乳腺癌的治疗和预后效果,因此寻找新的、有效的乳腺癌早期标志分子成为目前国际上肿瘤研究的一个焦点。由于纳米孔传感器具有高灵敏度、高选择性、高通量、无标记和无扩增的检测优势,可简单快捷的实现乳腺癌的早期检测。1996年,Kasianowicz和他的同事们在NIST上第一次报道了关于 α -溶血素纳米通道在核酸检测中的应用^[3],迄今为止,研发人员也相继研发出各种新型生物纳米孔道^[4-7]。纳米孔单通道检测技术也随之被应用到DNA测序^[4,6]、多肽检测^[8-10]、及RNA检测^[11-14]等研究领域。由于生物分子的物理占位效应,当生物分子通过纳米通道时,堵塞会引起方波信号,当分子长度较长时,引起的调制电流持续时间变长。所以不同待测物分子通过纳米孔通道时离子流的改变不同,特征信号的堵塞程度和持续时间不同^[15-16],因此,纳米孔单通道可视为一种天然的探测单分子的传感器,实现单分子水平高灵敏的特异性检测。

人的血浆中含有核糖核酸(RNA)^[17],从开始发现循环RNA,人们就一直研究它在临床疾病的诊断、预警等方面的应用。循环RNA的表达与多种癌症相关,得到注解的大约50%循环RNA在基因组上定位于与肿瘤相关的脆性位点,可通过检测癌症病人的循环RNA中的特异信使RNA(mRNA)来进行癌症的诊断治疗,因此血浆中的RNA作为生物标志物在癌症诊断中具有良好的应用前景^[18-19]。microRNA(miRNAs)是一类非编码的小RNA分子,它是重要的基因表达调控因子,许多研究已经证明异常的miRNA表达与癌症发生、发展有关,且miRNA表达不同则癌症的类型不同^[20],因此对癌症的早期诊断及预后判断具有重要的临床指导意义。研究结果发现,miRNA在乳腺癌患者组织中异常表达^[21],而且另一项研究表明在血浆中miRNA具有高度的稳定性^[22],由于其特殊的调控功能,miRNA不仅在细胞分化和生物发育过程中起重要作用,而且还与各种疾病的发生发展中发挥巨大作用,比如医学检验、肿瘤和免疫方面等^[23-25]。因此miRNA的检测,在分子生物学及医学领域都有着非常重要的指导意义。研究表明miRNA是乳腺癌的新一代的肿瘤标志物^[26]。经文献报道乳腺癌肿瘤大小与乳腺癌患者血浆中的miR-31、miRNA 195及miRNA 892b的表达水平密切相关^[27]。

本研究设计了能够特异性识别目标miRNA的DNA探针(Probe),probe与目标miRNA中间识别区完全互补配对,可用于miRNA的特异性检测。以miRNA两端为引导链中间为probe的识别区可以使

α HL对miRNA·probe分子迅速捕获。本研究主要目的是利用 α HL纳米孔单通道对miRNA·probe复合分子的高灵敏度分辨,实现乳腺癌miRNAs的高效检测。实验结果表明,由于probes序列的差异,miRNA 31·probe 31、miRNA195·probe 195、miRNA 892b·probe 892b三种复合物分子形成的不同形状、不同阻塞时间的特征电流信号,因此该特征信号可用有效区分miRNA 31、miRNA 195、miRNA 892b。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:miRNA, α -Hemolysin(Sigma Aldrich),卵磷脂(Sigma Aldrich),正戊烷,十六烷,Teflon膜(厚度25 μ m,Goodfellow(Malvern, PA)),参考之前文献^[12]实验中所使用的缓冲液由1 mol/L KCl、10 mmol/L Tris配制,用HCl调节pH为7.5;H液由1 mL戊烷(pentane)与100 μ L十六烷(hexadecane)配置;L液由25 mg磷脂(phospholipid)与2.5 mL戊烷(pentane)配置。所有试剂均为分析纯,实验中所用水均为超纯水(18.2 M Ω ·cm, 25 $^{\circ}$ C)。

仪器: Integrating patch clamp (Axon Instruments, Forest City, CA, USA), Digidata 1 550 series (Axon Instruments, Forest City, CA, USA), Arbitrary Function Generator (Axon Instruments, Forest City, CA, USA), 高速离心机,冰箱,电子天平,数值式水浴温度控制仪,自动双重纯水蒸馏器,可调式移液器,pH计。

1.2 样品的制备

本实验所用miRNAs和probes均由上海生工生物工程有限公司合成并HPLC纯化。本实验将miRNA和probe等量混合,先在95 $^{\circ}$ C水浴条件下孵育3 min,然后立刻放在在35 $^{\circ}$ C培养箱中培养1 min,高低温反复3次,制得miRNA·probe复合物。

1.3 实验方法

纳米孔道单分子检测方法为首先在Toflon薄膜两边靠近微米孔处分别滴上一滴约10 μ L戊烷与十六烷混合液,并迅速吹开,使其在膜上延展散开;其次在检测池的两个腔室中分别加入2 mL 1.0 mol/L KCl,10 mmol/L Tris,pH 8.0的缓冲液;然后在两个腔室中加入20 μ L磷脂戊烷溶液,形成磷脂双分子层;接着系统施加+180 mV跨膜电压,在检测池的cis端加入一定量的 α HL,自组装成稳定的单个纳米孔通道;最后在cis端加入待测物,记录信号。电流信号使用的是5 kHz低通滤波,采样频

率是50 kHz。所得数据使用 ClampFit 10.4(Molecular Devices, ForestCity, CA, USA) 和 OriginLab 8.5 进行分析。

2 实验结果与分析

2.1 纳米单通道检测 miRNA 的检测原理

纳米单通道检测 miRNA 是基于 DNA 杂交的原理(见图 1)。在一定的电压下,不同 DNA 或 RNA

分子穿过纳米通道时产生的下降脉冲电流是不一样的,脉冲的宽度和阻塞时间与碱基的个数有关,脉冲的数量与浓度有关。当 Probe 与 Target 单独通过通道时由于其分子比纳米孔小,所以很快的通过通道,信号也就相对较短;当 Probe 与 Target 配对后通过通道时,由于其分子比纳米孔大,所以通过通道时所需时间较长,信号也长;当 Probe 与 Target 配对,但有一个碱基错配后通过通道时的阻塞时间也比完全配对的时间要短,信号也相对较短。

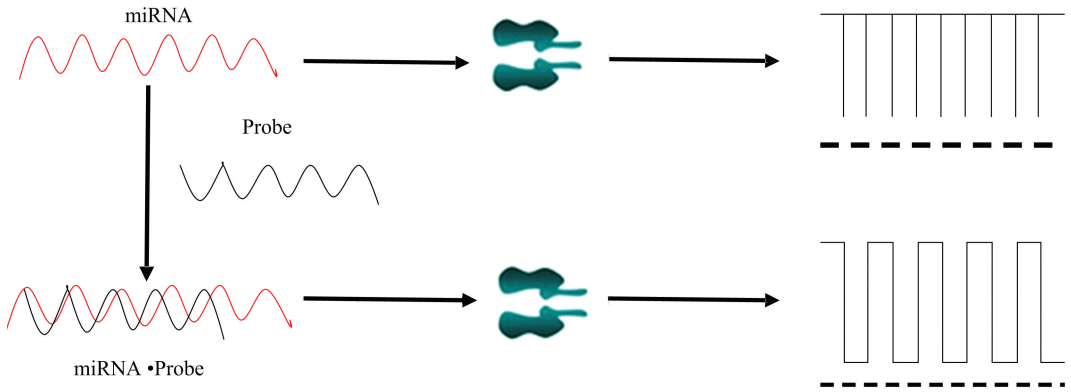


图 1 纳米通道检测 miRNA

Fig.1 Detection of miRNA in a nanopore

2.2 不同 miRNA 的对比实验

图 2 是 Probe、miRNA 31 及 miRNA 31 · probe 31 通过纳米单通道时的信号图与其对应的散点分析图,图 3 是上面所提到的几种核酸的平均阻塞时间值。其中 Amplitude 是脉冲电流的大小, Dwell Time 是阻塞时间,结果可以看出不同核酸在穿过纳米孔通道时脉冲电流大小不同,阻塞时间也不同, probe、miRNA 31 及 miRNA 31 · probe 31 的脉冲电流与阻塞时间依次增大,实验结果表明 miRNA 在穿过纳米孔通道时其脉冲电流及阻塞时间的大小与链的长短和碱基的数量有关。

2.3 与 miRNA 31 不同配对位置的对比实验

实验 2.2 设计的 Probe 与 miRNA 31 中间配对的 miRNA 31 · probe 31,为了更好地验证该设计方法更有利于后期结果的分析,做了与 miRNA 31 不同位置配对位置的对比实验。图 4 分别是 Probe 与 miRNA 31 后端配对和前端配对的单通道信号与散点分析图。从结果可以看出无论后配还是前配该 miRNA 都有两种信号,这是因为 miRNA 通过通道时的位置顺序不一样。尾端配对的 miRNA 进入通道时若是前端先通过,由于前端部分是单链则通过的快,阻塞时间短,脉冲电流小,信号就短,则图中的短信号就有可能是尾端配对 miRNA 前端通过通道

时的信号但也有可能是未配对的 Target 与 Probe 信号;若是尾端先进入通道,由于尾端是双链则阻塞时间长,脉冲电流大,信号长,则图中的长信号就是尾端配对 miRNA 尾端先进入通道时的信号。反之前端配对的 miRNA 也同样理论。结果证明无论哪端配对通过纳米通道都有两种信号结果而且增加了结果分析的难度,所以我们选取与 miRNA 31 中间位置完全匹配的 Probe。

2.4 三种 miRNAs · probe 的有效区分

由于探针 probe 只能与目标 miRNA 的识别区完全互补配对,所以不同的 miRNA · probe 经过纳米孔通道时产生的特征信号不同,因此就可以有效区分多种 miRNAs。基于此,设计了 probe 195 来检测 miRNA 195,设计了 probe 892b 来检测 miRNA 892b。miRNA 195 · probe 195 的阻塞时间 $t = 1.21 \pm 0.14$ ms(见图 5(b)),约为 miRNA 31 · probe 31 的阻塞时间 7.13 ± 0.34 ms 的 1/6(见图 5(a))。miRNA 892b · probe 892b 的阻塞时间 $t = 17.25 \pm 2.13$ ms(见图 5(c)),大于 miRNA 31 · probe 31 的阻塞时间。因此,通过调控 probe 序列,可以使 miRNA 31 · probe 31、miRNA 195 · probe 195、miRNA 892b · probe 892b 三种复合物分子具有不同特征信号和阻塞时间,因此可以有效区分 miRNA 31、miRNA 195、miRNA 892b 三种 miRNAs。

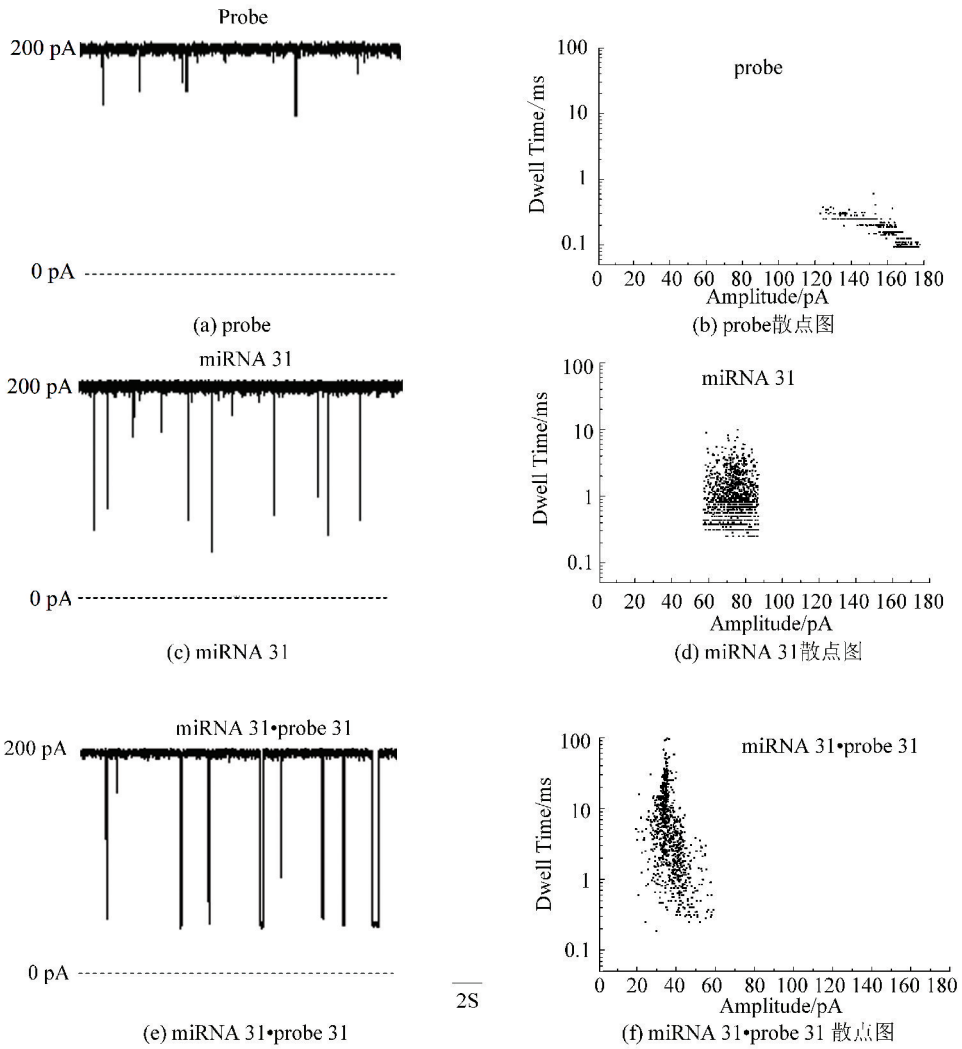


图2 纳米通道检测不同核酸样品典型的单通道信号及其相对的散点图

Fig.2 Nanopore detection of various nucleic acid samples and corresponding scatter diagrams

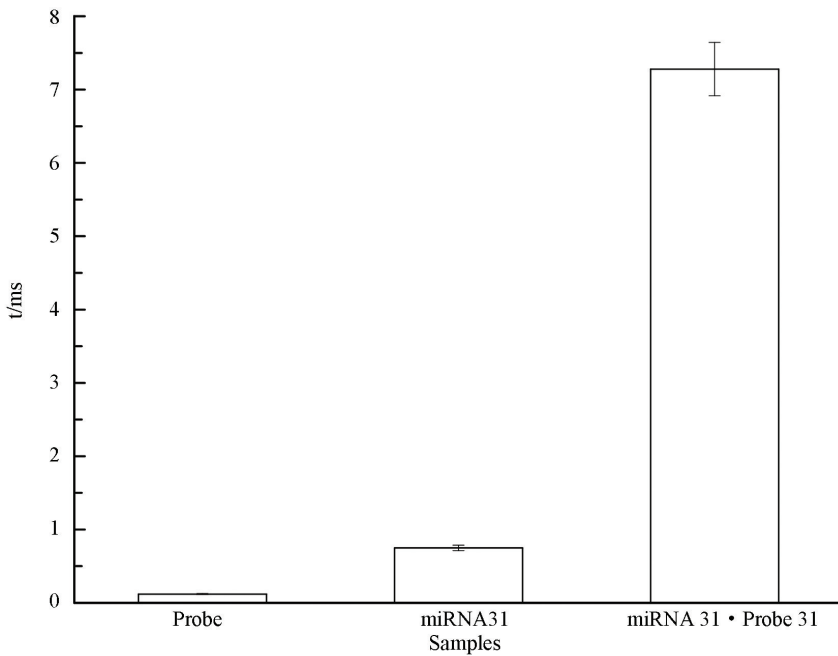


图3 不同核酸样品的平均阻塞时间

Fig.3 Mean residence time values of various nucleic acid samples

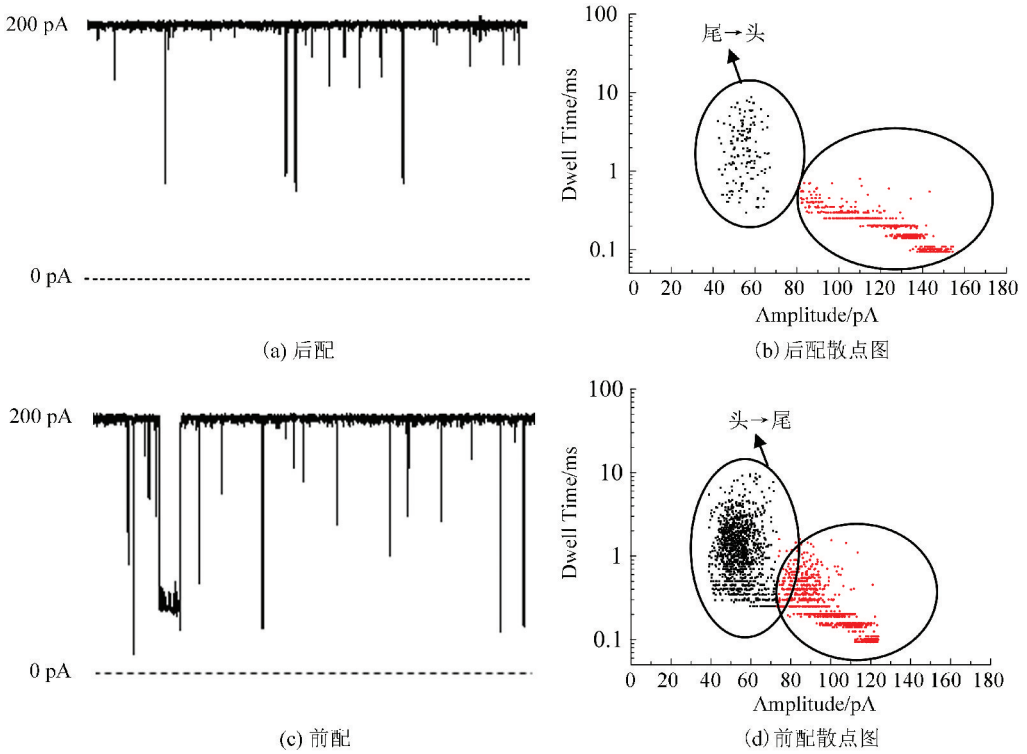


图 4 纳米单通道检测 miRNA 31 后配与前配典型的单通道记录及对应的散点图

Fig.4 Nanopore detection of miRNA 31 end match and front match and corresponding scatter diagrams

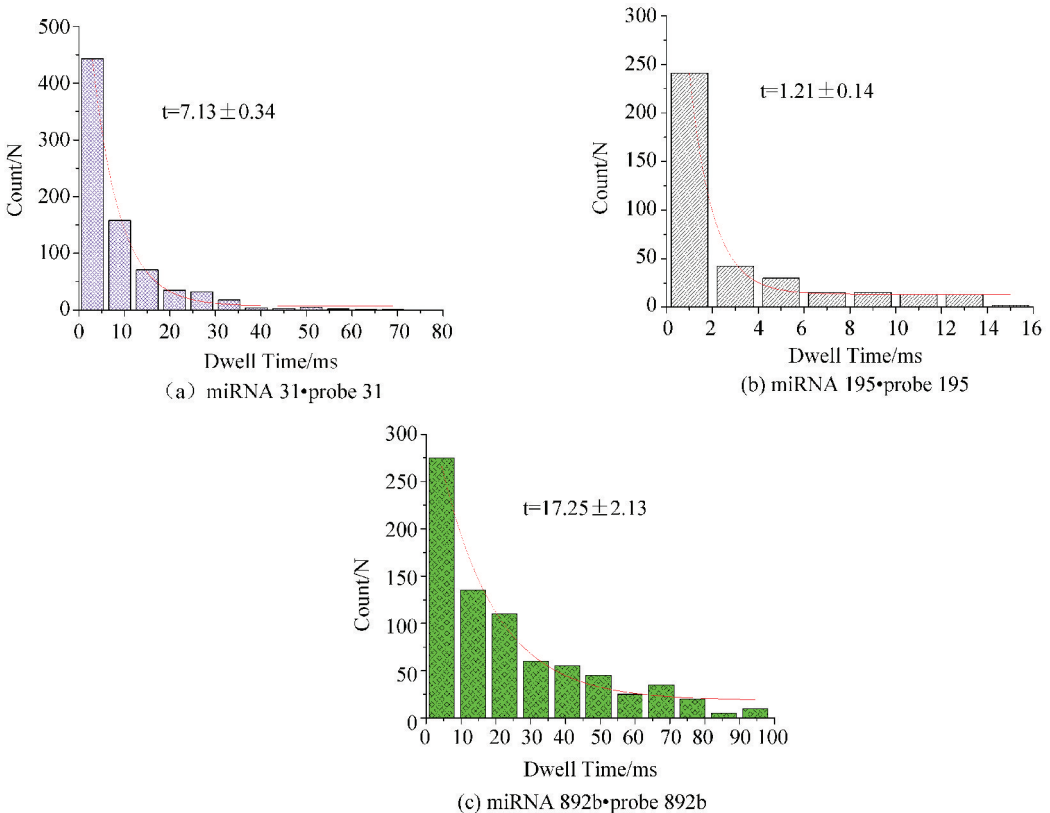


图 5 不同 miRNAs · probe 过孔的特征电流信号的阻塞时间柱状统计图

Fig.5 Residence time histogram of typical current for different miRNAs · probes

2.5 纳米单通道检测混合 miRNAs

查找其他5种癌症 miRNA:肺癌 miRNA 25,胰腺癌 miRNA 221,卵巢癌 miRNA 215,胃癌 miRNA 106a,前列腺癌 miRNA 141。将这五种癌症的 miRNA 与 miRNA 31 · probe 31 混合,然后通过纳米通道检测 miRNA 31 · probe 31(见图6),实验结果分析表明混合物中有两类信号:短信号是其他5种

癌症的 miRNA,长信号是 miRNA 31 · probe 31 的信号,该方法可以有效地将 miRNA 31 · probe 31 成功检测出来且与单独检测 miRNA 31 · probe 31 的信号一致,说明该方法可以从复杂的样品中快速有效的检测 miRNA 31,同样也说明如果设计其他五种癌症的 Probe,该方法也能将各自的 miRNA 检测出来。

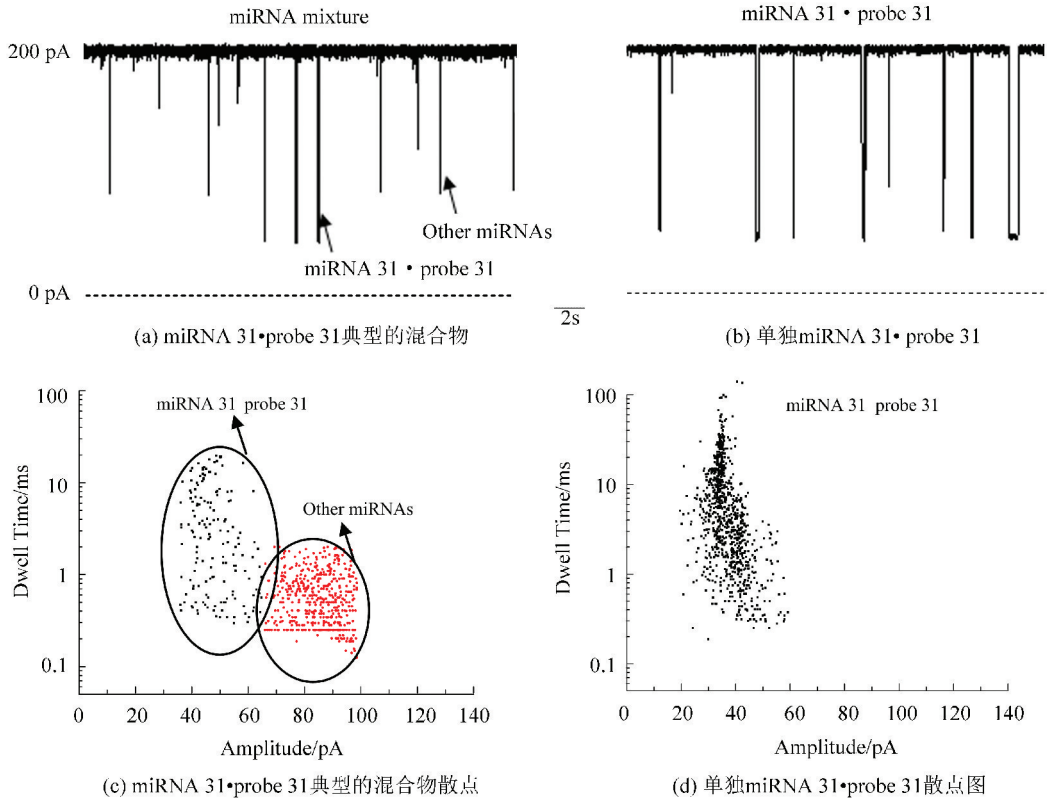


图6 纳米孔检测混合 miRNAs 中的 miRNA 31 · probe 31 典型的混合物及单独 miRNA 31 · probe 31 单通道记录及对应的散点图
Fig.6 Nanopore detection of miRNA 31 · probe 31 in the presence of other miRNAs and the corresponding scatter diagrams

3 结论

1) 本文采用纳米通道技术对乳腺癌的早期检测进行研究。实验中设计了特殊序列的 probe 与目标 miRNA 结合,通过生物纳米孔单通道单技术对 miRNA · probe 复合物分子进行高灵敏度、快速检测,实现了对乳腺癌 miRNAs 的高效检测。

2) miRNA 31 · probe 31、miRNA195 · probe 195、miRNA 892b · probe 892b 三种复合物分子在通过纳米孔通道时,由于不同的 probe 序列,形成了不同的信号形态、不同堵塞时间的特征信号,最终实现此三种 miRNAs 的有效区分。

3) 纳米孔单通道技术以其无需标记、无需扩增、高分辨、高灵敏等特点为 miRNA 的检测提供了有效的平台,也在癌症的早期诊断、治疗方面有广

阔的发展前景。

参考文献(References)

- [1] PARK J L, PARK S M, KWON O H, et al. Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35 (21 - 22): 3062 - 3068. DOI: 10.1002/elps.201400075.
- [2] VARALLYAY E, BURGYNAN J, HAVELDA Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 190-196. DOI: 10.1038/nprot.2007.528.
- [3] KASIANOWICZ J J, BRANDIN E, BRANTON D, et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1996, 93(24): 13770-13773. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13770.

- [4] CAO C, LIAO D F, YING Y L, et al. Detection of single oligonucleotide by an aerolysin nanopore [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2016, 74 (9): 734 - 737. DOI: 10.6023/A16070352.
- [5] WANG S, ZHAO Z, HAQUE F, et al. Engineering of protein nanopores for sequencing, chemical or protein sensing and disease diagnosis [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 51: 80-89. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.006.
- [6] MANRAO E A, DERRINGTON I M, LASZLO A H, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(4): 349-353. DOI: 10.1038/nbt.2171.
- [7] NICOLE R. Disruptive nanopores [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 35. DOI: 10.1038/nmeth.2292.
- [8] STEFUREAC R I, LONG Y T, KRAATZ H B, et al. Transport of α -Helical peptides through α -Hemolysin and aerolysin pores [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(30): 9172-9179. DOI: 10.1021/bi0604835.
- [9] SUTHERLAND T C, LONG Y T, STEFUREAC R I, et al. Structure of peptides investigated by nanopore analysis [J]. *Nano Letters*, 2004, 4(7): 1273-1277. DOI: 10.1021/nl049413e
- [10] WANG H Y, YING Y L, LI Y, et al. Nanopore analysis of β -amyloid peptide aggregation transition induced by small molecules [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(5): 1746-1752. DOI: 10.1021/ac1029874.
- [11] HU Z L, DU J H, YING Y L, et al. Single-molecule analysis of colorectal cancer-associated MicroRNAs via a biological nanopore [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2017, 75: 1087-1090. DOI: 10.6023/A17090433.
- [12] JASINSKI D, HAQUE F, BINZEL D W, et al. Advancement of the emerging field of RNA nanotechnology [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(2): 1142-1164. DOI: 10.1021/acsnano.6b05737.
- [13] SMITH J A, BRAGA A, VERHEYEN J, et al. RNA nanotherapeutics for the amelioration of astroglial reactivity [J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2018, 10: 103-121. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.11.008.
- [14] HAQUE F, PI F, ZHAO Z, et al. RNA versatility, flexibility, and thermostability for practice in RNA nanotechnology and biomedical applications [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2018, 9(1): e1452. DOI: 10.1002/wrna.1452.
- [15] WANG G, ZHAO Q, KANG X, et al. Probing mercury (II)-DNA interactions by nanopore stochastic sensing [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117: 4763-4769. DOI: 10.1021/jp309541h.
- [16] WANG L, HAN Y, ZHOU S, et al. Nanopore biosensor for label-free and real-time detection of anthrax lethal factor [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(10): 7334-7339. DOI: 10.1021/am500749p.
- [17] KAMM R C, SMITH A G. Nucleic acid concentrations in normal human plasma [J]. *Clinical Chemistry*, 1972, 18(6): 519-522.
- [18] XU C, HAQUE F, JASINSKI D L, et al. Favorable biodistribution, specific targeting and conditional endosomal escape of RNA nanoparticles in cancer therapy [J]. *Cancer Letters*, 2017, 5, 414: 57-70. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.09.04.
- [19] PI F, ZHANG H, LI H, et al. RNA nanoparticles harboring annexin A2 aptamer can target ovarian cancer for tumor-specific doxorubicin delivery [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(3): 1183-1193. DOI: 10.1016/j.nano.2016.11.015.
- [20] LU J, GETZ G, MISKA E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838. DOI: 10.1038/nature03702.
- [21] LORIO M V, FERRACIN M, LIU C G. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(16): 7065-7070. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.
- [22] CHEN X, BA Y, MA L J. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases [J]. *Cell Research*, 2008, 18(10): 997-1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- [23] 元艳, 汝琦. miRNA 检测技术进展及其在医学检验中的应用 [J]. *医学信息*, 2011, 8: 3809-3809. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2011.08.338.
- YUAN Yan, RU Qi. Progress of microRNA detection technology and its application in laboratory medicine [J]. *Medical Information*, 2011, 8: 3809-3809. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2011.08.338.
- [24] 石明, 仇雪梅, 樊红. 血浆 miRNA 检测在肿瘤临床应用的研究进展 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2012, 31(1): 122-125. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2012.01.030.
- SHI Ming, QIU Xuemei, FAN Hong. Advances in plasma miRNA detection in tumor clinical applications [J]. *Journal of Southeast University (Med Sci Edi)*, 2012, 31(1): 122-125. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2012.01.030.
- [25] XIAO C C, RAJEWSKY K. MicroRNA control in the immune system: Basic principles [J]. *Cell*, 2009, 136(1): 26-36. DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.027.
- [26] ZHAO H, SHEN J, MEDICO L, et al. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13735. DOI: 10.1371/journal.pone.0013735.
- [27] 张学营, 甄林林, 韩学东, 等. 血浆中 miR-31 水平与乳腺癌关系的研究 [J]. *现代医学*, 2012, 40(2): 133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2012.02.001.
- ZHANG Xueying, ZHEN Linlin, HAN Xuedong, et al. Circulating miR-31 in plasma of patient with breast cancer [J]. *Modern Medical Journal*, 2012, 40(2): 133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7562.2012.02.001.