

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

[21] 申请号 200810115185.5

[43] 公开日 2009年12月23日

[11] 公开号 CN 101608232A

[22] 申请日 2008.6.18

[21] 申请号 200810115185.5

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 殷勤伟 赵春华 张洪杰

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

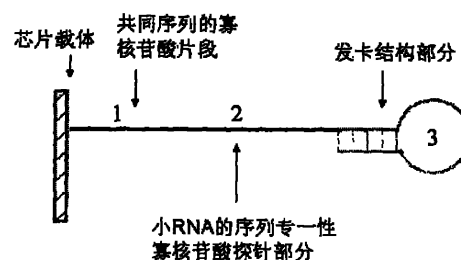
权利要求书2页 说明书26页 附图4页

[54] 发明名称

用于筛选和鉴定低丰度小RNA表达谱的新型小RNA芯片的制备方法和应用

[57] 摘要

本发明提供一种新型的小RNA芯片，用于筛选和检测那些已被鉴定或预测的内源性 shRNA、miRNA 和/或其它类型的小RNA，和介绍专用于小RNA的寡核苷酸探针的制备以及低丰度小RNA的纯化和富集方法。该短小核苷酸捕获探针由三部分组成：第一部分为共同序列(1)，第二部分为能与成熟小RNA杂交的寡核苷酸(2)，第三段为由高CG含量组成的可形成发夹结构的无义链核苷酸(3)。样品中低丰度的小于40nt的小RNA可通过联合使用小RNA分离柱和大管径制备电泳来富集。该方法可灵敏地检测到细胞/组织中低丰度表达的小RNA分子，可用于鉴定和比较细胞分化前后小RNA的变化，以及诊断和评价肿瘤细胞的来源和分化程度。



1. 一种检测低丰度小 RNA 的寡核苷酸探针，其特征在于，从 5'端到 3'端依次由下述三部分组成：第一部分为共同的无义寡聚核苷酸 (1)，第二部分为能与成熟小 RNA 杂交的序列专一性寡聚核苷酸 (2)，第三部分为发夹结构 (3)，其是由高 CG 含量组成的可形成发夹结构的无义链核苷酸。

2. 按照权利要求 1 所述的寡核苷酸探针，其中所述寡核苷酸探针具有下述特征之一：所述寡核苷酸探针的总长度在 40-70 个碱基之间，所述寡核苷酸探针中能够与成熟小 RNA 杂交的寡聚核苷酸 (2) 的长度在 15-40 碱基之间，或者发夹结构 (3) 的长度在 10-30 碱基之间。

3. 按照权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸探针，其中所述第一部分的共同的无义寡核苷酸 (1) 为 TTTTTTTTTT 或 AAAAAAAAAA，所述第三部分的由高 CG 含量组成的可形成发夹结构的无义链核苷酸 (3) 为 CCGGCCTATTATGGCCGG，或者所述第二部分的能够与成熟小 RNA 形成互补结构的寡聚核苷酸 (2) 中的每一个核苷酸是无修饰的，或者是经不同化学方法修饰的，如肽核苷酸 (PNA)、闭锁核苷酸 (LNA)、或甲氧-或乙氧-修饰的核苷酸。

4. 一种制备权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸探针的方法，其包括：在常规直链探针的 5'端连接上发夹结构 (3)。

5. 一种用于筛选和鉴定低丰度小 RNA 表达谱的小 RNA 芯片，其包括权利要求 1 所述的寡核苷酸探针。

6. 一种试剂盒，其包括按照权利要求 5 所述的小 RNA 芯片。

7. 按照权利要求 6 所述的试剂盒的应用，其用于检测不同细胞之间、正常细胞和肿瘤细胞之间或细胞分化前后基因表达的差异，或者通过检测小 RNA 表达谱而鉴定细胞/组织的特异性，或者诊断和评价肿瘤细胞的来源和分化程度。

8. 按照权利要求 7 所述的应用，在人骨髓间充质干细胞 (BMSC) 分化前后，表达水平被显著下调的小 RNA 包括 SEQ ID No.1-13，表达水平被显著上调的小 RNA 包括 SEQ ID No. 14-17。

9. 按照权利要求 7 所述的应用, 在分化前的人骨髓干细胞 (BMSC)、人纤维母细胞 (HLF) 和 A549 细胞中都表达的小 RNA 包括 SEQ ID No. 36-45, 仅在 BMSC 细胞中表达的小 RNA 包括 SEQ ID No. 31-35, 仅在 HLF 细胞中表达的小 RNA 包括 SEQ ID No. 25-30, 仅在 A549 细胞中表达的小 RNA 包括 SEQ ID No. 18-24。

10. 一种适合于基因芯片检测的小 RNA 分子的纯化和富集方法, 其特征在于联合使用提取小 RNA 的分离柱和玻璃管电泳柱来富集长度 <40 nt 的小 RNA 的实验方法。

用于筛选和鉴定低丰度小 RNA 表达谱的新型小 RNA 芯片的制备方法和应用

技术领域

本发明属于基因芯片技术领域，更具体地涉及一种新型的小 RNA 的寡核苷酸探针和使用所述寡核苷酸探针制备的小 RNA 芯片，并且涉及一种能够富集低丰度、低分子量 (<40nt) 的小 RNA 的方法。本发明可以显著提高基因芯片检测细胞/组织中低丰度的小 RNA 的灵敏度和特异性。本发明的小 RNA 芯片可用于制备鉴定和比较细胞分化前后小 RNA 的变化，通过检测小 RNA 表达谱而鉴定细胞/组织的特异性，以及诊断和评价肿瘤细胞的来源和分化程度的试剂盒。

背景技术

小 RNA，核酸的长度在 21-35 个核酸碱基之间的非蛋白质编码核酸序列，广泛存在于各种生物体中。目前小 RNA 至少可以分为六类：微核酸 (miRNA)，小的非编码核酸 (tncRNA)，短的干扰核酸 (siRNA)，重复结合的小干扰核酸 (rasiRNA)，小的调节核酸 (smRNA) 以及与 Piwi 相互作用的核酸 (piRNA) [1,2]。在上述六类核酸中 miRNA 被研究的最为广泛[3]。这些 miRNA 是从蛋白编码基因的内含子或外显子以及非蛋白编码基因转化而来。目前已有几百个 miRNA 被克隆并被测序[4,5]。从小 RNA 发现的历史来看，大多数小 RNA 是通过实验方法鉴定的[6,7,8]，而且通过使用焦磷酸测序 (pyrosequence) 技术越来越多的小 RNA，包括 miRNA, siRNA 以及 21U-RNA 被鉴定出来。虽然克隆和测序是鉴定新的小 RNA 最常用的方法，但低丰度的小 RNA 却常被漏掉[9]。经典克隆测序的方法要求大量的总 RNA，而在样品数量有限的情况下得到相当量的总 RNA 会遇到困难。为了避免上述局限性，人们发展了许多预测小 RNA 的方法 [10-13]，这包括计算机筛选，芯片检测，比较基因组分析以及从已经存在的小 RNA 基因结构预测它与启动子，终止子结合的结构。因为含高密度

核苷酸的基因芯片已经表现出检测 mRNA 表达的强大威力，因而用基因芯片检测并确证小 RNA 的表达有可能获得成功。出于上述目的有些研究人员已经发展出利用组合方法鉴定新的 miRNA 的方法，例如 Bentwich[13] 通过综合运用计算机预测和芯片分析发现了一些新的 miRNA。其它几个独立的研究组也报道微矩阵芯片是高通量探测 miRNA 表达谱的有效的，灵敏的，而且是专一的检测方法[14-23]。但以往的芯片检测探针为 20 个左右的寡核苷酸，与样品中的小 RNA 相互作用的强度不够高，对于低分子量和低丰度的小 RNA 的检测中存在着漏检的问题，同时目前采用的检测探针容易受样品中的小 RNA 前体的干扰。因而提高探针检测小 RNA 的灵敏度和专一性以及提供高质量的小 RNA 纯化样品，提高小 RNA 尤其是分子量低于 40 个碱基的实验样品是进一步发现新的具有重要生物功能的小 RNA 需要克服的主要技术瓶颈。

发明内容

本发明的目的是提供一种能够通过综合使用小 RNA 的结构预测，小 RNA 的富集技术以及通过包括用特定方法制备的探针的小 RNA 芯片的高通量检测，鉴定从人蛋白编码基因的内含子区生成的小 RNA 分子，提高检测小 RNA 信号的灵敏度以及提高对样本中低丰度小 RNA 的检测能力。

在本发明的第一方面，提供了一种能高效结合成熟小 RNA 的新型寡核苷酸探针，如图 1 所示，以及制备这种探针的方法。这种探针由三个部分组成：共有序列 1，与成熟小 RNA 杂交的序列专一性寡核苷酸部分 2（即，杂交序列 2）和发夹结构 3，探针的总长度为 40-70 个碱基，其中能识别成熟小 RNA 的杂交序列 2 的长度为 15-35 个碱基，其特征在于，DNA 探针部分 2 的 5'端还连接着 10-30 个碱基的高 GC 含量的无义链 DNA 序列（发夹结构 3），例如，但不限于，CCGGCCTATTATGGCCGG（本领域的技术人员应该理解，本发明不限于所举例中的序列，包括各种能形成发夹结构的序列），此序列能形成一种发夹结构；在探针部分 2 的 3'端连有一段共同的核苷酸序列 1，例如，但不限于，TTTTTTTTTTT 或 AAAAAAAAAAA。当用于本文时，本领域的技术人员应该理解，所述“共有序列 1”或“共同的核苷酸序列 1”是指按照常规方法在大部分的寡核

核苷酸探针中都可以使用的寡核苷酸序列，也可以叫作“通用序列”。在每条寡核苷酸探针的与芯片基质相连端（探针的3'端）带有氨基连接基团，能够和涂布在基因芯片的载体（例如，玻璃片）表面的有机硅聚合物通过Schiff碱反应固定在芯片表面，从而容易点样到涂有有机硅的载体（例如，玻璃板）上而制成基因芯片。

另外，所述寡核苷酸探针中能够与成熟小RNA形成互补结构的寡聚核苷酸中的每一个核苷酸可以是自然无修饰的，也可以是经不同化学方法修饰的，如肽核苷酸（PNA）、闭锁核苷酸（LNA）、或甲氧-或乙氧修饰的核苷酸。

与现有技术的寡核苷酸探针（其不包括发夹结构3，为直链探针）相比较，本发明的寡核苷酸探针的优点在于，除了共有序列1和专一性杂交序列2之外，在探针部分2的5'端还连接着发夹结构3（即，10-30个碱基的高GC含量的能够形成发夹结构的无义链DNA序列）。所述发夹结构3形成较大的发夹环，其优点在于，使得所述寡核苷酸探针提供了较大的空间阻抑作用，避免与小RNA的前体或更长的同源片段杂交，提高了探针针对小于40nt的小RNA的特异性。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了制备本发明的寡核苷酸探针的方法，其包括在常规直链探针的5'端连接上发夹结构3。

在检测新的小RNA时，该探针制备方法的新颖性在于选择了通过计算机设计获得的或已鉴定的潜在小RNA的正义链和反义链DNA序列，该序列只能与成熟的小RNA片段杂交，形成互补的二聚体，而不能与小RNA的前体或更长的同源片段杂交形成互补的二聚体。这是因为较大的发夹环的阻抑作用。所以这种DNA探针可以提高探针与待检测样品中的互补小RNA的特异性结合，降低非特异性背景信号，提高检测的灵敏度，更适合于检测样本中的低丰度的成熟的小RNA（图5和6）。这样成功地去除了小RNA前体的影响。

本发明的第二方面提供应用本发明第一方面的寡核苷酸探针而制备的小RNA芯片。本发明第一方面的寡核苷酸探针的3'端带有氨基连接基团，能够和涂布在基因芯片的载体（例如，玻璃片）表面的有机硅聚合物通过Schiff碱反应固定在芯片表面，从而容易点样到涂有有机硅的载体（例

如，玻璃板）上而制成基因芯片。

在本发明的优选的实施方案中，本发明的小 RNA 芯片可用于制备鉴定和比较不同细胞之间，正常细胞和肿瘤细胞之间或细胞分化前后小 RNA 的变化，通过检测小 RNA 表达谱而鉴定细胞/组织的特异性，以及诊断和评价肿瘤细胞的来源和分化程度的试剂盒。

本发明的第三方面在于改良了小 RNA 样品纯化和富集方法。目前分离样品中的总 RNA 以及 mRNA 的常规的标准操作程序[15-21]并不适合低丰度、低分子量的小 RNA 的纯化与回收，其实验成本高，纯化的产量低，而每次芯片检测需要至少 1 μg 的小 RNA，按照常规方法通常需要进行 3-5 次纯化，才能满足进行芯片杂交检测的实际需要，增加了实验的劳动和时间成本。然而，按照本发明的方法，采用两步法可以获得高纯度、高回收率（至少 1 μg ）的小 RNA，尤其是低分子量，碱基数小于 40 的小 RNA（本发明的两步法在下文称为“联合方法”）。

然而，本领域的技术人员应该理解，本发明的小 RNA 分子的纯化、富集方法还可以用来纯化和富集长度为 40-200 nt 的小 RNA。

在本发明的一个优选的实施方案中，小 RNA 纯化、回收的第一步可以采用商品化的 miRNA 提取试剂盒，如美国 Ambion 公司的 *mirVana* (货号为 1560)，先从样品中富集碱基数为 200 以及更小的小 RNA，将洗脱出来的小 RNA 组分用乙醇沉淀法回收，然后将该沉淀组分在直径为 4 厘米，高度为 4 厘米的玻璃管电泳柱（见图 2）内进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳的电流和电压根据具体情况调节，以达到能将小于 40 的小 RNA 与大于 40 的 RNA 片段完全分离的目的。电泳仪可为国产或进口的产品，例如，BioRed 的 PowerPac，以分离收集碱基数低于 40 的小 RNA。但是，本发明不局限于直径为 4 厘米和高度为 4 厘米的玻璃管电泳柱，其直径和高度范围为 1cm 到 10cm，选择的原则是一次性获得 1 μg 左右的小 RNA 分子。所获得的小 RNA 用 RNA 定量试剂盒，如美国 Invitrogen 公司的 RiboGreenTM 试剂盒（货号：R-11490）进行定量。用该方法可一次性获得足量的短的小 RNA，以便用于进一步的 RNA 标记和杂交分析。

附图说明

图 1. 新型小 RNA 检测探针的结构示意图。探针的蓝色部分表示芯片上的每一条 DNA 探针中的相同的共有序列部分 1，黑线部分表示每一条探针中的专一性杂交寡核苷酸序列 2，绿色部分是每一条探针中相同的能形成发夹结构的核苷酸序列 3。该探针的 3'端通过氨基与芯片载体的活性基团连接。

图 2. 改进的小 RNA 柱状电泳装置的正视图。图 2A，制胶装置图；图 2B，电泳装置图。

图 3. 本发明实施例 1 中采用的实验步骤、主要方法以及某些实验参数的流程图。实施例 1 中包括新的小 RNA 预测，样品的富集和纯化，小 RNA 标记，芯片杂交以及小 RNA 表达谱的分析。

图 4. 用美国 Ambion 公司的 *mirVana* miRNA 分离试剂盒获得的小 RNA 的电泳分析。用 *mirVana* miRNA 分离试剂盒将从细胞中分离纯化的总 RNA (TOT) 进一步分离纯化为碱基数高于 200 (HMW) 以及低于 200(LMW)的 RNA 组分。图 4A 和 4B 给出了 1 微克 RNA 的各样品经 1.2% 的变性琼脂糖凝胶 (图 4A) 和 15%变性聚丙烯酰胺凝胶 (图 4B) 的电泳图。

图 5. 用改良的大直径 (4 厘米) 的玻璃管电泳，从低于 200(LMW) 的 RNA 组分中分离纯化出低于 40nt 的 RNA 用于进一步的分子杂交试验。图 5 给出了分别来自 A549 和 HLF 细胞的 10 微克 RNA 的各样品的 RNA 印迹 (Northern Blot) 杂交图。图中 30nt 大小的杂交带显示来自两种不同富集方法 (即，纯化低于 200nt 的小 RNA 的常规方法和纯化低于 40nt 的小 RNA 的本发明的联合方法) 的差异。

图 6. 传统的直链小 RNA 探针与新型小 RNA 检测探针的特异性比较。其中，“传统的”为传统的直链探针 (不包括发夹结构 3)，其不但能与成熟的(Mature) (<40nt) 小 RNA 片段杂交，形成互补的二聚体，也能与小 RNA 的前体(Precursor) (>60nt) 或更长的同源片段杂交形成互补的二聚体；“改进的”为本发明的探针，因为较大的发夹环的阻抑作用，其只能与成熟的 (<40nt) 小 RNA 片段杂交，形成互补的二聚体，而不能与小 RNA 的前体或更长的同源片段杂交形成互补的二聚体。所以这种 DNA 探针可以提高探针与待检测样品中的互补小 RNA 的特异性结合，降低非特异性

背景信号，提高检测的灵敏度，更适合于检测样本中的低丰度的成熟的小 RNA。

图 7. 单独用 *mirVana* miRNA 试剂盒以及用本发明的联合方法分离的小 RNA 进行基因芯片检测小 RNA 表达谱的比较。总 RNA 用 *mirVana* miRNA 试剂盒分为碱基数高于 200 的高分子量组分 (HMW) 和碱基数低于 200 的低分子量组分 (LMW)。随后低分子量组分进一步分为两个组分，其中一个组分的 RNA 大于 40 个碱基，另一组分的 RNA 小于 40 个碱基 (Enrich (富集))。为了评价这两种操作在小 RNA 芯片分析上的差异，40-200nt 的低分子量 RNA (图 7A, LMW) 和小于 40nt-RNA (图 7B) 经荧光探针标记后在小 RNA 芯片上进行杂交。图 7A 和图 7B 的杂交扫描谱的前三行给出的某些强信号点代表实验中的不同对照。图 7C 给出了这两张芯片中相应探针处信号强度的定量比较。

图 8. 小 RNA 芯片技术能够检测骨髓干细胞分化前后小 RNA 的差异表达。骨髓干细胞分化前 (BMSC) (图 8A) 和分化后 (HSC) (图 8B) 的总 RNA 分为碱基数低于 200 的大分子量组分和碱基数低于 40 的低分子量组分。低分子量组分经荧光探针标记后在小 RNA 芯片上进行杂交。图 8C 给出了这两张芯片中相应探针处信号强度的定量比较。

图 9. 小 RNA 基因芯片技术可区分不同细胞类型的小 RNA 表达谱。从骨髓干细胞 (BMSC) (蓝色)，人纤维母细胞 (HLF) (黄色) 和 A549 细胞 (红色) 分离的总 RNA 纯化成高分子量 RNA 和低分子量 RNA (LWM)。低分子量 RNA 经标记后杂交，并计算出三种不同细胞类型的杂交总荧光强度信号 (图 9A)。图 9B 给出了每一种细胞中可鉴定的小 RNA 的数目，并分解成在三种细胞中共同出现的，在每两种细胞中共同出现的以及仅在某一种细胞中出现的小 RNA 的数目。图 9C 给出了三种不同细胞中小 RNA 表达谱的荧光强度分布。

具体实施方式

以下将通过实施例对本发明作进一步的阐述。但是，本领域的普通技术人员应该理解，下述实施例仅是用于举例说明的目的，并不限制本发明的保护范围，本发明的精神和范围由后附的权利要求所限定。本领域有关

的技术人员完全可以根据本发明的构思和所公开的技术方案，进行不背离本发明的精神和范围的修改和变动，这也在本发明的保护范围之内。

实施例 1

用基因芯片检测方法从人基因组中的内含子以及蛋白编码区鉴定小 RNA

虽然本实施例仅限于小 RNA 基因芯片检测的探针制备和用于低丰度小 RNA 的纯化、富集的方法，为便于说明本发明的应用，本实施例介绍一个比较完整的小 RNA 的高通量测定来检测经计算机预测分析可能存在的小 RNA。图 3 给出了从人基因组中的内含子以及蛋白编码区鉴定小 RNA 的实验流程图。

1. 芯片的制备

从人编码基因的相关数据库中下载了 21000 条内含子序列 (<http://www.meduohio.edu/bioinfo/eid/index.html>), 通过计算机预测分析发现具有生成小 RNA 可能的内含子序列有 1256 条, 从中随机选出 536 条序列, 这些序列的宿主基因包括多种功能基因如与转录因子、细胞周期、细胞凋亡、信号通路、代谢调节等有关。采用美国应用生物系统公司 3900 型高通量 DNA 合成仪合成这些序列。利用上述核苷酸序列的正义链和反义链做为小 RNA 俘获探针的一部分 (即, 专一性寡核苷酸序列 2), 该部分的核苷酸的平均长度为 25 个碱基, 它的 3'端与共有序列 1 的 5'端相接, 在它的 5'端接上 15 个碱基组成的无义链寡核苷酸 (即, 发夹结构 3), 使得每一条核苷酸探针的总长度约为 50 个碱基。将每条探针的 3'端进行氨基修饰, 使之能够和玻璃板上的聚合硅发生共价反应从而固定到芯片表面。然后将这些探针分别在用于制备芯片的玻璃板上平行点样三次, 每张芯片上共含 4080 个探针点样点, 其中的 864 个探针点为不同的对照探针。对照探针包括内源性和外源性的阳性和阴性探针, 其中 tRNA, *let-7*, U6 和 U2 snRNA (序列见表 1) 作为内源性阳性探针, 另外还合成了多个外源性阴性探针 (序列见表 1)。

表 1. 实施例 1 中所用的一些探针 (包括一些阳性探针和阴性探针) 的序列。

结构部分	序列
基本序列（共有序列1）	AAAAAAAAAA
发夹环部分3	CCGGCCTATTATGGCCGG
杂交部分2:	
hsa-let-7a	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7a*	CTATAACAATCTACTGTCCTTC
hsa-let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
hsa-let-7b*	CTATAACAACCTACTGCCTTCCC
hsa-let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
hsa-let-7c*	TAGAGTTACACCCTGGGAGTTA
hsa-let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
hsa-let-7d*	CTATACGACCTGCTGCCTTTCT
hsa-let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7e*	CTATACGGCCTCCTAGCTTTCC
hsa-let-7f	AACTATAACAATCTACTACCTCA
hsa-let-7g	ACTGTACAAACTACTACCTCA
hsa-let-7i	ACAGCACAAACTACTACCTCA
hsa-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT
hsa-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACTTGTG
hsa-miR-17	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
hsa-miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
hsa-miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
hsa-miR-638	AGGGATCGCGGGCGGGTGGCGGC
hsa-miR-923	GTCAGCGGAGGAAAAGAACT
Has-ShR-1a	ATCCTGTAAGTACTGAGCTGCCCCGA
Has-ShR-1s	CTCGGGGCAGCTCAGTACAGGA
Has-ShR-2a	AATCTGATAATTTTGCCTTTAG
Has-ShR-2s	GAACTAAAGGCAAATTATCAG
Has-ShR-3a	TCATTACAGGCTGGAGTGCAGTG
Has-ShR-3s	CTCACTGCACTCCAGCCTGAAT
Has-ShR-4a	CCTGATAATTCATCCTCTCCCT
Has-ShR-4s	AGAGGGAGAGGATGAATTATCA
Has-ShR-5a	TTGTAGAGACAGGGTCTTGCTA
Has-ShR-5s	GCAACATAGCAAGACCCTGTCT
Has-ShR-6a	GGGTTTCGCCATGTTGGCCAGG
Has-ShR-6s	AGACCAGCCTGGCCAACATGGC
Has-ShR-7a	ATCTCATCTTGAATTGTAATCT
Has-ShR-7s	GATTATGGGGATTACAATTCAA
Has-ShR-8a	GGACCACCTCCTTGTGCCCCCT
Has-ShR-8s	TGCCATGGCAGAGGAGGGGGCA
U6	GGCCCTGCGCAAGGATGCCTGT
U2	GATTCTAGTTCACATCATAGACA

tRNA	TCGAATTAATTTACCCGACTAAA
snRNA	GCATCGGTTACTCCAGATAGGCT
阴性对照	CTTCTCCGAACGTGTCACGTTT
	GACGTGACACGTTTCGGAGAATT

芯片的制备采用涂有有机硅的 Corning GAPS-2 玻璃板（目录号：#40003，供应商：Corning Inc.，美国）为支持材料，并用 SmartArray 点样机（型号：SmartArray-48，供应商：CapitalBio Corp，中国）点样，每个探针点的直径为 150 μm ，相邻探针点中心间的距离为 240 μm ，点完探针样品后让玻璃片在室温下干燥 24 小时，然后按下述方法清洗掉未共价结合的 DNA 和点样缓冲液：把玻璃片放在一个烧杯中并在烧杯中放一个搅拌子，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 用 0.2% 的 SDS 洗涤两次，每次 5 分钟，然后在 50 $^{\circ}\text{C}$ 用蒸馏水洗两次，每次 5 分钟，再在 25 $^{\circ}\text{C}$ 用 0.1M 四氢硼二钠溶液洗涤 5 分钟，用 0.2% SDS 洗涤三次，每次 1 分钟，用蒸馏水洗 2 次，每次 1 分钟。将玻璃片室温下于空气中彻底晾干后用于杂交检测。

本实施例中的小 RNA 芯片可以进一步制成试剂盒，所述试剂盒包括本发明的小 RNA 芯片，以及本领域的技术人员已知的检测所需要的各种试剂。

2. 低丰度小 RNA 的纯化和标记

人的 A549 肿瘤细胞系（ATCC No. HTB-22，美国）作为纯化低丰度小 RNA 材料的一个例子。按照美国 Invitrogen 公司提供的实验操作说明书，收集 2×10^5 个细胞，经生理盐水洗涤后用 Trizol 试剂提取细胞中的总 RNA，混合在其中的基因组 DNA 用美国 Ambion 公司的不含 RNase 的 DNase I 分解去除。RNA 的纯化量用紫外 260nm 的光吸收测量。RNA 的纯度通过测量样品在 260nm 和 280nm 处的光吸收的比值来评价。260nm/280nm 的比值在 1.8-2.0 之间表示 RNA 的纯化质量好。RNA 的完整性通过琼脂糖凝胶电泳检测分子量分别为 5000 个碱基和 1900 个碱基的 28S 和 18S 的核糖体 RNA 而说明（图 4）。出现清晰的 28S 和 18S 核糖体核酸条带表明所纯化的 RNA 保持着高度的完整性，相反如果发现 28S 和 18S 条带变得弥散，表明所制备的 RNA 发生了显著的降解。为了避免

mRNA 降解的影响, 可以用试剂盒如 Sigma 公司的 CellLytic NuCLEARTM 抽提试剂盒 (目录号: N-XTRACT. 46) 先把细胞核从细胞中分离出来。总 RNA 可以分别从细胞核和细胞浆中提取。然后用美国 Ambion 公司的 mirVana miRNA 试剂盒 (目录号: AM1560) 从总 RNA 中富集大小为 200nt 及用改良的大直径 (直径为 4 厘米) 的玻璃管电泳, 从低于 200(LMW) 的 RNA 组分中分离纯化出低于 40nt 的 RNA 用于进一步的分子杂交试验 (图 7)。低分子量小 RNA 的量可以用美国 Invitrogen 公司的 RiboGreenTM 试剂盒 (目录号: R-11490) 进行定量。

纯化的小 RNA 经 T4 连接酶和过量的 5'-磷酸-胞苷-尿苷-Cy3 (5'-phosphate-cytidyl-uridyl-Cy3-3') 供体与小 RNA 受体的 3'-羟基定量连接[19, 24], 进行标记。15 μ l 的核酸标记反应体系中含 2 μ g 的低分子量 RNA (<200 nt) 或 200 ng 的小 RNA (<40 nt), 0.5 mM ATP, 50 mM HEPES (pH7.8), 5 mM DTT, 20 mM MgCl₂, 150 mg/ml PEG, 10 mg/ml BSA, 10% DMSO, 1000 ng 的 5'-磷酸-胞苷-尿苷-Cy3 和 3 个活力单位的 T4 连接酶, 25 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

3. 阵列杂交和检测结果分析比较

3.1 阳性对照探针的检测结果

将标记的小 RNA 与芯片上的寡核苷酸探针用通用的杂交方法[15-21] 杂交后, 用 LuxScan 10K-A 芯片扫描仪 (型号: LuxScanTM 10K-A, 供应商: CapitalBio Corp, 中国) 记录各寡核苷酸探针位置处被标记的小 RNA 荧光探针的荧光发射强度, 并用计算机软件, 如 Axon 公司的 GenePix Pro 4.0 进行分析。和小 RNA *let-7a* (序列见表 1) 相比, 小 RNA *let-7c* (序列见表 1)、*let-7f* (序列见表 1) 的序列只有一对碱基不能配对, 而 *let-7a* 探针检测到的信号明显的比 *let-7c* 和 *let-7f* 探针检测到的信号强 2.1 倍[25], 并且用已被广泛使用的小 RNA 探针检测到的结果具有明显的可重复性 [26, 27]。

3.2 传统的直链小 RNA 探针与新型小 RNA 检测探针的特异性比较

参见图 6, 比较了传统的直链小 RNA 探针与新型小 RNA 检测探针的特异性。本发明的探针只能与成熟的 (<40nt) 小 RNA 片段杂交, 形成互

补的二聚体，而不能与小 RNA 的前体 (>60nt) 或更长的同源片段杂交形成互补的二聚体（图 6 “改进的”）。这是因为较大的发夹环的阻抑作用。所以，本发明的这种 DNA 探针可以提高探针与待检测样品中的互补小 RNA 的特异性结合，降低非特异性背景信号，提高检测的灵敏度，更适合于检测样本中的低丰度的成熟的小 RNA。相反，传统的直链探针（不包含发夹结构）不但能与成熟的 (<40nt) 小 RNA 片段杂交，形成互补的二聚体，也能与小 RNA 的前体 (>60nt) 或更长的同源片段杂交形成互补的二聚体（图 6 “传统的”）。可见改进后的探针大大提高了小 RNA 芯片检测成熟 RNA 片段的特异性。

3.3 本发明的纯化和富集小 RNA 的联合方法的优点

图 7 比较了仅用 *mirVana* miRNA 试剂盒纯化的大小在 200nt 及其以下的小 RNA 以及进一步用本发明的联合方法纯化的大小为 40nt 及其以下的小 RNA 与本发明所制备的寡核苷酸探针杂交的不同结果。以 A549 细胞为例，用 *mirVana* miRNA 试剂盒纯化的小 RNA 通过用包括本发明的探针的小 RNA 基因芯片检测可以获得 66 种具有明显信号的小 RNA（图 7A），而用联合方法纯化的小 RNA 样品经与相同的芯片探针杂交后可以探测到 203 种具有显著信号的小 RNA（图 7B）。用本发明的联合方法所给出的检测信号强度也比用前一种方法高出几倍至 10 多倍（图 7C）。利用本发明的寡核苷酸探针可以有效去除碱基数高于 40 的小 RNA 与检测探针的杂交，正如用本发明的联合方法所富集的小 RNA 样品给出较前一种方法所富集的 RNA 样品给出的显著变强的检测信号（图 7C）所表明的。

实施例 2

检测细胞分化前后基因表达的差异

人骨髓间充质干细胞 (BMSC) (来源：知情的病人) 经诱导处理后分化为造血干细胞 (HSC 细胞) [28]。收集分化前和分化后的细胞，并用实施例 1 所述的联合方法提取小 RNA (<40 nt) 后，用包括实施例 1 中的小 RNA 检测芯片的试剂盒检测分化前和分化后的小 RNA 表达谱的变化，如图 8A，图 8B 所示。定量分析可以确定其中的 13 种小 RNA (序列见表 2, SEQ ID No.1-13) 在细胞分化后被显著下调，另外 4 种小 RNA (序列见表

2, SEQ ID No. 14-17) 被显著上调, 如图 8C 所示。

表 2. 分化前后人骨髓间充质干细胞 (BMSC) 中小 RNA 表达的差异。

SEQ ID No.	sRNA 名称	序列	下调 (倍)	SEQ ID No.	sRNA 名称	序列	上调 (倍)
1	sRNA693	CCCAAAGTCTGGGATTATA	300	14	sRNA249	TGTAACACAATGGTGAGTATT	5
2	sRNA871	CTGGGATTACAGGCATGGCCACCA	200	15	sRNA250	ACATTGTGTACCACCTCATAA	8
3	sRNA125	AACTCCTGGGCTCAAAGTGA	150	16	sRNA907	GCCTAGCCCTCCCAGCCTACATCTTT	13
4	sRNA633	TCCAGCCTGGGTGACAGAGC	80	17	sRNA908	AAAGATGTAGGCTGGGAGGCTAGGC	6
5	sRNA428	TGCCCAGGCTGGAGTACAGT	50				
6	sRNA313	AGGTTGGTCAAAAAGTGATT	50				
7	sRNA358	CTGTTGCCCAGGCTGGACTG	20				
8	sRNA401	GCACTCCAGCCTAGGTGACA	15				
9	sRNA381	CTCGGCTCCCAAAGTGCTG	15				
10	sRNA574	TTGCCCAGGCTGGAGTGCAA	14				
11	sRNA290	CCATGTTGCCCAGGCTGGTC	13				
12	RNA1011	CATGTTGCCCAGGCTGGTCTCGAA	12				
13	sRNA266	CTCTGTTGCCCAGGCTGGAG	12				

注释：表 2 中提供的序列是人工合成的寡核苷酸序列，其与芯片上的探针序列互补，但是本领域的技术人员应该理解，在广泛意义上，所述序列包括相应的 sRNA 序列。

实施例 3

通过检测小 RNA 表达谱鉴定细胞/组织的特异性

本实施例采用三种人源性细胞：分化前的人骨髓干细胞（BMSC）（来源：知情的病人），人纤维母细胞（HLF）（ATCC No. CCL-186，美国）和人 A549 细胞（ATCC No. HTB-22，美国）。从上述三种细胞中分离纯化小 RNA 后，采用包括实施例 1 中的小 RNA 检测芯片的试剂盒进行检测并分析检测信号的差异。图 9A 显示 BMSC 和 HLF 细胞中被检测到的小 RNA 的总荧光信号没有显著的差别，而和 A549 细胞相比，A549 中可被检测到的小 RNA 荧光信号显著降低，比较可检测到的各小 RNA 的荧光强度差异可以发现 10 种小 RNA（序列见表 3，SEQ ID No. 36-45）是这三种细胞所共有的，而有 5 种小 RNA（序列见表 3，SEQ ID No. 31-35）仅在 BMSC 细胞中表达，另外 6 种小 RNA（序列见表 3，SEQ ID No. 25-30）仅在 HLF 细胞中表达，有 7 种小 RNA（序列见表 3，SEQ ID No. 18-24）仅在 A549 细胞中表达，这种特异表达的小 RNA 谱可以成为鉴定细胞/组织特异性的一种实验方法。

表 3. 小 RNA 在不同细胞中的表达。

SEQ ID No.	SRNA 名称	序列	BMSC (荧光强度)	A549 (荧光强度)	HLF (荧光强度)
18	SRNA-758	TGGGATTACAGGCGTGAGCCA	<200	1120	<200
19	SRNA-725	GGATTACAGACGTGAGCCAC	<200	1251	<200
20	SRNA-73	CCTCCCAGCCATGTGGAAC	<200	1020	<200
21	SRNA-191	CCTCCACCTTGGCCTCCCA	<200	1132	<200
22	SRNA-803	AAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAG	<200	916	<200
23	SRNA-827	CCTCCCAAGTGCTGGGATTACAGG	<200	708	<200
24	SRNA-713	CCTCCAAGGTGCTGGGATT	<200	944	<200
25	SRNA-741	GCCCAGGCTGGTCTCAAACCT	<200	<200	3438
26	SRNA-129	CAGGCTGGTCTCGAACTCCT	<200	<200	6817
27	SRNA-279	CCAGGCTGGTCTTGAACCTCC	<200	<200	1734
28	SRNA-886	TGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTC	<200	<200	1049
29	SRNA-36	ACTTTGGGAGGCTGAGGCAG	<200	<200	6887
30	SRNA-28	CAGGCTGGAGTGCAGTGCCG	<200	<200	6413
31	SRNA-125	AAACTCCTGGGCTCAAGTGA	1846	<200	<200
32	SRNA-313	AGGTTGGTGCAAAAGTGATT	2360	<200	<200
33	SRNA-381	CTCGGCCTCCCAAAGTGCTG	2505	<200	<200
34	SRNA-401	GCACTCCAGCCTAGGTGACA	3000	<200	<200
35	SRNA-633	TCCAGCCTGGGTGACAGAGC	5281	<200	<200

36	SRNA-364	AGATGGGGTCTTGCTATGTT	20906	6519	5038
37	SRNA-960	CTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCAGTG	11452	1816	1289
38	SRNA-826	CTCTTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCA	11330	1424	2137
39	SRNA-1040	CTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCAGTG	9095	1498	1684
40	SRNA-852	TCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAGTA	8974	3263	5216
41	SRNA-859	TCCTGGGCTCAAGCGATCCTCCTGC	7852	2471	5364
42	SRNA-358	CTGTTGCCCAGGCTGGAGTG	3800	954	1079
43	SRNA-987	TCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAG	3311	1044	26501
44	SRNA-823	TGATCCACCCGCTCGGCCTCCCAA	3215	945	15230
45	SRNA-421	ATCCTCCTGCCTCAGCCTCC	2362	1062	18228

注释：表 3 中提供的序列是人工合成的寡核苷酸序列，其与芯片上的探针序列互补，但是本领域的技术人员应该理解，在广泛意义上，所述序列包括相应的 sRNA 序列。

参考文献：

1. A. Aravin, D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgraf, N. Iovino, P. Morris, M.J. Brownstein, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, *Nature*. 442 (2006) 203-7.
2. M.A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G.J. Hannon, R. Parker, *Genes Dev*. 20 (2006) 515-24.
3. D.H. Kim, L.M. Villeneuve, K.V. Morris, J.J. Rossi, *Nat Struct Mol Biol*. 13 (2006) 793-7.
4. M.S. Weinberg, L.M. Villeneuve, A. Ehsani, M. Amarguioui, L. Aagaard, Z.X. Chen, A.D. Riggs, J.J. Rossi, K.V. Morris, *RNA*. 12 (2006) 256-62.
5. D.P. Bartel, *Cell*. 116 (2004) 281-297
6. R.C. Lee, and V. Ambros, *Science* 294 (2001) 862–864.
7. M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* 294 (2001) 853–858
8. J.G. Ruby, C. Jan, C. Player, M.J. Axtell, W. Lee, C. Nusbaum, H. Ge, D.P. Bartel, *Cell*. 127 (2006) 1193-207.
9. N.C. Lau, L.P. Lim, E.G. Weinstein, D.P. Bartel, *Science*. 294 (2001) 858-62.
10. D.H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D.H. Turner, *J. Mol. Biol*. 288 (1999)

- 911–940.
11. I.L. Hofacker, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3429–3431.
 12. E. Berezikov, V. Guryev, B.J. van de, E. Wienholds, R.H. Plasterk, E. Cuppen, *Cell* 120 (2005) 21–24
 13. I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich. *Nat. Genet.* 37 (2005) 766–770.
 14. A. Grundhoff, C.S. Sullivan, D. Ganem *RNA.* 12 (2006) 733-50.
 15. A.M. Krichevsky, K.S. King, C.P. Donahue, K. Khrapko, K.S. Kosik, *RNA* 9 (2003) 1274–1281.
 16. S. Baskerville, D.P. Bartel, *RNA* 11 (2005) 241–247.
 17. I. Beuvink, F.A. Kolb, W. Budach, A. Garnier, J. Lange, F. Natt, U. Dengler, J. Hall, W. Filipowicz, J. Weiler *Nucleic Acids Res.* 2007 Mar 13; [Epub ahead of print]
 18. J.M. Thomson, J. Parker, C.M. Perou, S.M. Hammond, *Nature Meth.* 1 (2004) 47–53.
 19. P.T. Nelson, D.A. Baldwin, L.M. Scearce, J.C. Oberholtzer, J.W. Tobias, Z. Mourelatos, *Nature Meth.* 1 (2004) 155–161.
 20. T. Babak, W. Zhang, Q. Morris, B.J. Blencowe, T.R. Hughes, *RNA* 10 (2004) 1813–1819.
 21. H. Wang, R.A. Ach, Curry B. *RNA.* 13 (2007) 151-9.
 22. L.P. Lim, N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. J. Grimson, M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, J.M. Johnson, *Nature* 433 (2005) 769–773.
 23. J. Lu, G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, T.R. Golub, *Nature* 435 (2005) 834–838.
 24. G.L. Igloi, *Anal. Biochem.* 233 (1996.) 124–.28
 25. M.Y. Luo, Z.G. Tian, Z. Xu, L. Zhang, Y.X. Wang, J. Cheng. *Prog. Biochem. Biophys.* 34 (2007) 31-40.

-
26. M. Castoldi, S. Schmidt, V. Benes, M. Noerholm, A.E Kulozik, M.W. Hentze, M.U. Muckenthaler, *RNA*. 12 (2006) 913-20
 27. Y. Sun, S. Koo, N. White, E. Peralta, C. Esau, N.M. Dean, R.J. Perera, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 188-195.
 28. Y. Jiang et al., *Nature* 418 (2002) 41–49.

IB083242序列表. ST25
SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 用于筛选和鉴定低丰度小RNA表达谱的新型小RNA芯片的制备方法和应用

<130> IB083242

<160> 45

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 1
cccaaagtgc tgggattata 20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 2
ctgggattac aggcatgcgc cacca 25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 3
aaactcctgg gctcaagtga 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 1 tcagccctgg gtgacagagc	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 5 tgcccaggct ggagtacagt	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 6 aggttgggtgc aaaagtgatt	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 7 ctgttgccca ggctggagtg	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 8 gcactccagc ctaggtgaca	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 9 ctcggcctcc caaagtgtg	20
<210> 10	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 10	
ttgccccaggc tggagtgcaa	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 11	
ccaatgtgcc caggctggtc	20
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 12	
catgttgccc aggctggctc cgaa	24
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 13	
cctgttgcc caggctggag	20
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 14	
tgtaacacaa tggtagtat t	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	

<400> 15 acattgtgtt accactcata a	21
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 16 gcctagcctc ccagcctaca tcitt	25
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 17 aaagatgtag gctgggaggc taggc	25
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 18 tgggattaca ggcgtgagcc a	21
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 19 ggattacaga cgtgagccac	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 20 cctccccagc catgtggaac	20

<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 21	
ctctcccaact tggcctccca	20
<210> 22	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 22	
aaagtgctgg gattacaggc gtgag	25
<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 23	
cctccccaag tgctgggatt acagg	25
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 24	
cctcccaagg tgctgggatt	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 25	
gcccaggctg gtctcaaact	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> 人工

<400> 26
caggctggtc tcgaactcct 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 27
ccaggctggt ctggaactcc 20

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 28
tgttggccag gctggtctca aactc 25

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 29
actttgggag gctgaggcag 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 30
caggctggag tgcagtggcg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 31
aaactcctgg gctcaagtga 20

<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 32	
aggttgggtgc aaaagtgatt	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 33	
ctcggcctcc caaagtgtg	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 34	
gcactccagc ctaggtgaca	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 35	
tccagcctgg gtgacagagc	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 36	
agatggggtc ttgctatgtt	20
<210> 37	
<211> 25	

<212> DNA

<213> 人工

<400> 37

ctgttgccca ggctggagtg cagtg

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 38

ctcttgttgc ccaggctgga gtgca

25

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 39

ctgttgccca ggctggagtg cagtg

25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 40

tectccagcc tcagcctccc aagta

25

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 41

tcctgggctc aagcgatcct cctgc

25

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 42
ctgttgccca ggctggagtg 20

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 43
tcctctgect cagcctcctg agtag 25

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<400> 44
tgatccaccg gcctcggcct cccaa 25

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 45
atcctcctgc ctcagcctcc 20

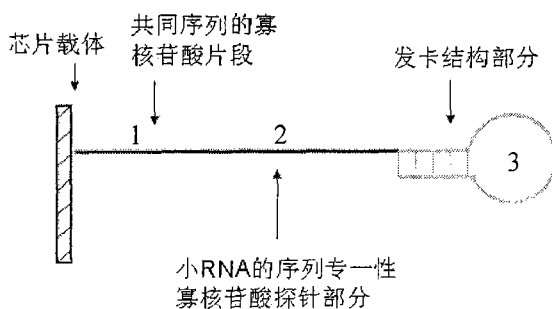


图 1

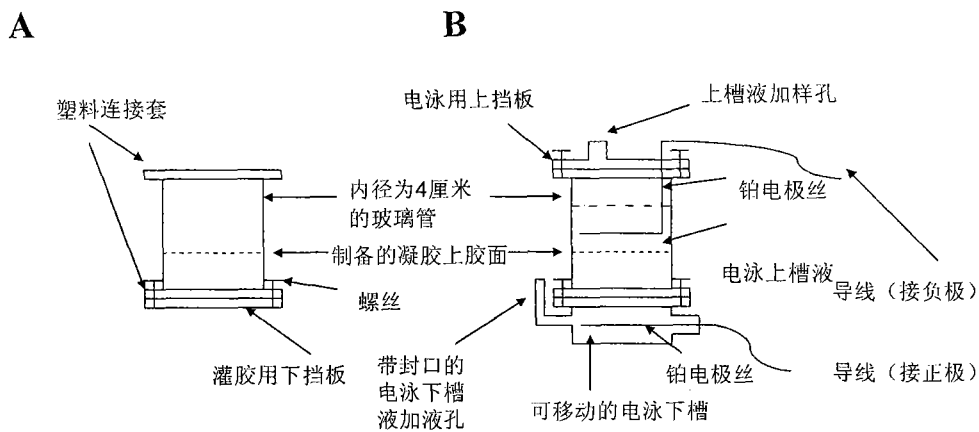


图2

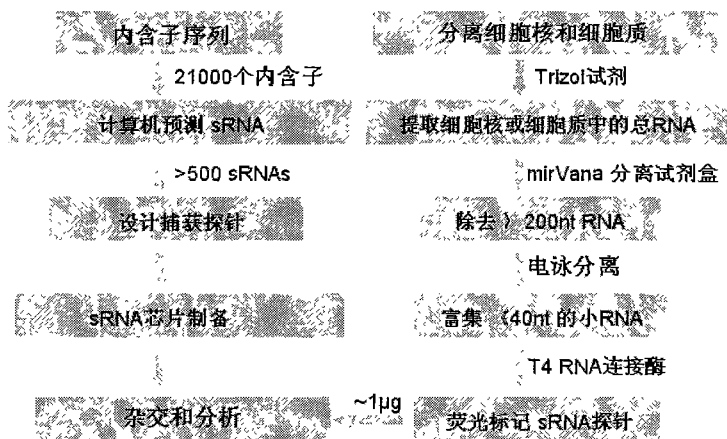


图 3

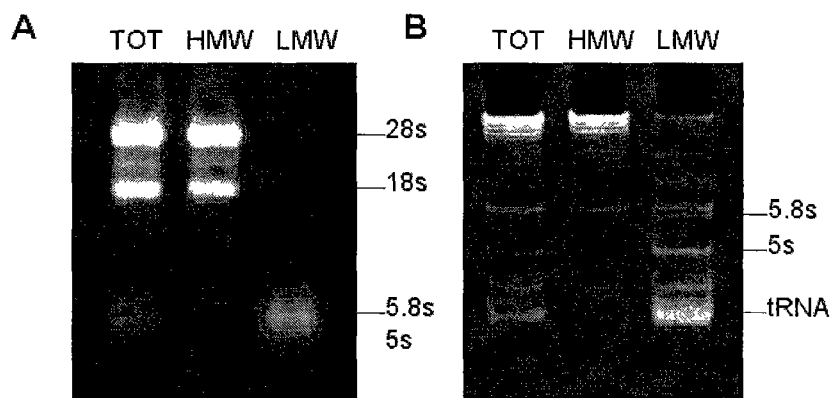


图 4

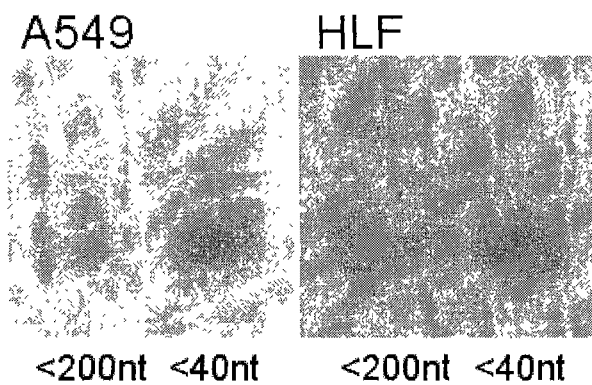


图 5

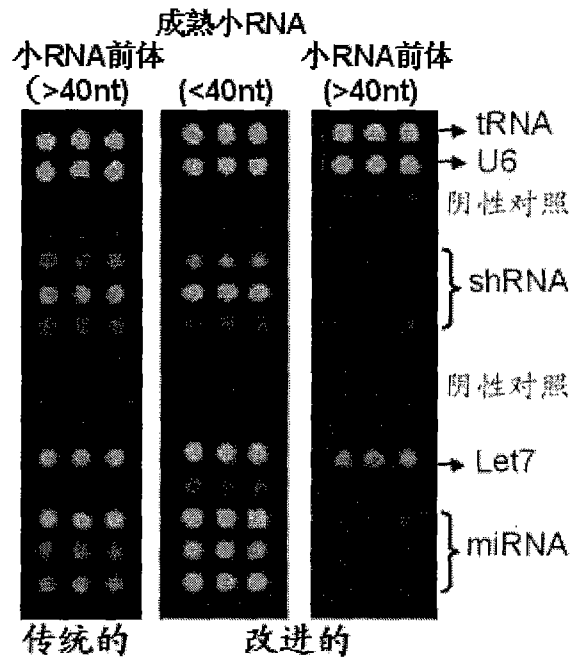


图 6

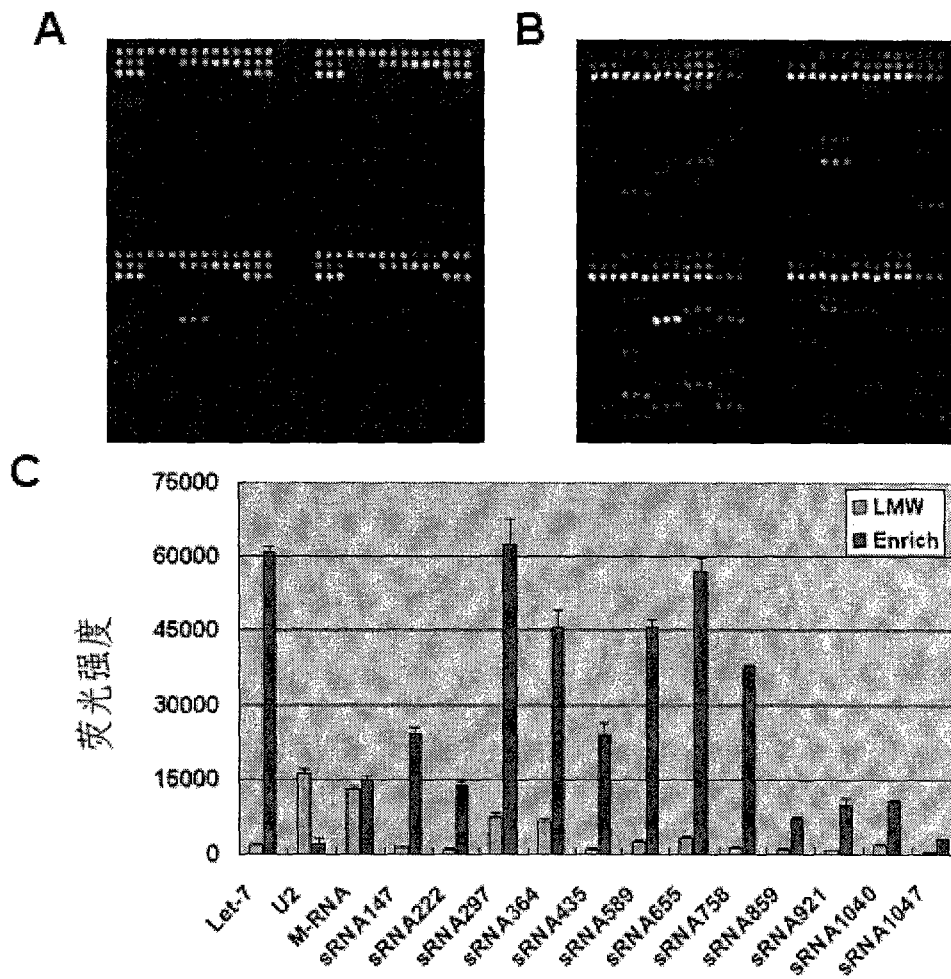


图 7

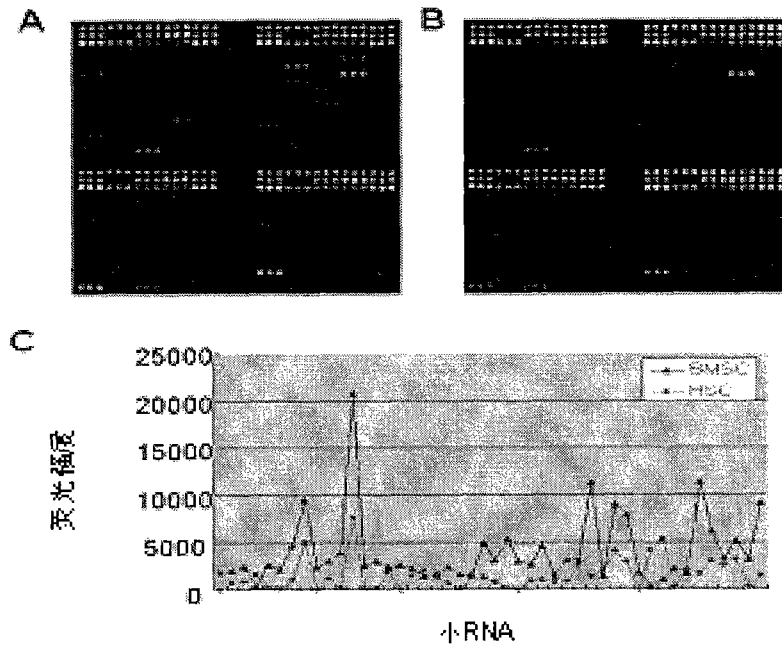


图 8

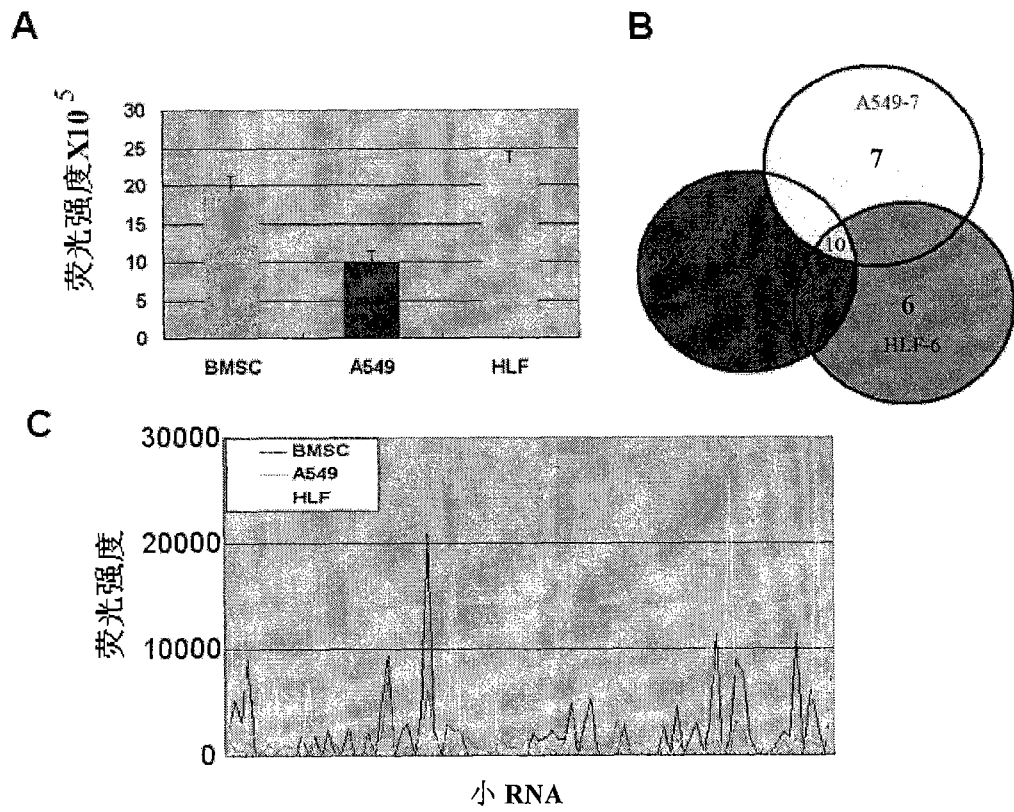


图 9