

miRNA 定量检测方法的研究进展

蓝琳, 喻芬, 黄明敏*, 孟祥贤

(湖南大学 生物学院, 中国湖南 长沙 410082)

摘要: MicroRNA (miRNA)是广泛存在于真核生物当中的一类长度为18~25个核苷酸的小分子RNA,由DNA转录产生。作为一种内源性非编码小分子RNA,miRNA在许多生命活动中起着重要作用,如当机体内的某些miRNA表达下调时,就会更容易罹患癌症和其他一系列疾病。这一现象提示,人们可通过对miRNA进行定量检测来实现对相关疾病的早期诊断。本文综述了基于杂交、扩增和测序原理的miRNA检测技术的研究进展,并对miRNA的研究方法及方向予以了阐述。

关键词: miRNA; 检测方法; 杂交; 扩增; 测序

中图分类号: Q752

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)06-0491-05

Research Progresses of miRNA Quantitative Detection Methods

LAN Lin, YU Fen, HUANG Ming-min*, MENG Xiang-xian

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a group of small RNAs with a length of 18~25 nucleotides that are widely present in eukaryotes and are produced by transcription of DNA. They are endogenous non-coding small RNAs and play an important role in some important life activities. For example, when the expression of miRNAs is downregulated, the body will be more susceptible to cancer and other diseases. This phenomenon enables us to make early diagnosis of disease through quantitative detection of miRNAs. Herein, the research progress of miRNA detection techniques based on the principles of hybridization, amplification and sequencing was described.

Key words: miRNA; detection method; hybridization; amplification; sequencing

(*Life Science Research*, 2018, 22(6): 491~495)

miRNA是一种由18~25个成熟核苷酸(nt)组成的内源性小分子非编码RNA,由pre-miRNA(precursor microRNA)剪切而来,广泛存在于各种真核生物中。1993年,Ambros课题组在研究线虫时首次发现了miRNA的存在^[1]。

随着真核生物的不断进化,miRNA仍旧保持着它具有的三大特色,即保守性、组织特异性和时序性^[2]。近期研究报道,miRNA在一系列的生命活动过程中具有不可替代的作用,当体内miR-195含量过度表达时,会导致扩张型心肌病和心肌梗死等疾病的发生^[2];当体内的某些miRNA表达下

调时,机体会更容易罹患癌症和其他一系列疾病。这些现象提示,可通过对miRNA进行定量检测来实现对相关疾病的早期诊断。与此同时,在肿瘤的判别和血细胞生成等重要的生理过程中,miRNA也作为一种重要调控物质参与其中^[3]。因此,探索有效并且适用的miRNA定量分析技术对生命的各项生理活动均具有重要意义。成熟miRNA片段本身具有两个不可规避的缺点:片段小,而且没有poly(A)尾巴。这导致其在定量检测过程中会遇到如下难题^[4]: 1) miRNA的序列不稳定,容易降解; 2) 家族成员间具有很高的相似性,

收稿日期:2018-04-16;修回日期:2018-05-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21275043)

作者简介:蓝琳(1993-),女,湖南岳阳人,硕士研究生,主要从事分子水平上的生物分析化学研究;*通讯作者:黄明敏(1980-),女,湖南常德人,助理教授,主要从事肿瘤及干细胞研究,Tel: 0731-88823211, E-mail: xiaoqin1423@126.com。

同一家族的 miRNA 在序列上仅仅只相差 1~2 个碱基; 3) 各种细胞在不同时期的表达水平都有差异, 但是普遍偏低; 4) miRNA 前体中包含 miRNA 序列, 对检测的特异性容易造成干扰。为了攻克这 4 个难题, 科学家们近年来发现并建立了多种 miRNA 定量检测技术^[9], 这些技术具有 4 个主要的特点: 简洁快速、高通量、灵敏度高以及好的特异性。本文从检测出发, 着重综述了基于杂交、扩增和测序原理的三大技术在 miRNA 检测中的研究进展, 并阐述了 miRNA 的研究方法及其方向。

1 基于杂交原理的检测技术

1.1 印迹杂交检测

RNA 印迹法(Northern blotting)是 miRNA 检测技术中最早建立的杂交检测方法之一。其通常可以分为 3 个过程: 1) 提取样本的总 RNA, 亲和层析法分离纯化 miRNA, 然后通过甲醛变性将 miRNA 进一步按大小分离, 并通过溴化乙锭染色检测质量; 2) 转膜。尼龙膜带有正电荷, 对带有负电荷的核酸具有很高的亲和性, 在热和紫外线的作用下, 尼龙膜和 miRNA 之间会形成共价键, 从而起到固定作用; 3) 杂交显影检测。印迹杂交技术一直被视为 miRNA 检测和鉴定的标准方法。但这个方法存在一些缺点, 比如: 劳动力密集、费时间、样品用量大(10~30 μg)、灵敏度低(检测限为纳摩尔级别)、检测效率低等^[9], 限制了该技术的广泛使用。为了克服传统印迹杂交技术的上述缺点, 人们在经典印迹杂交技术上衍生了多种改进方法, 如: 引入锁核酸(locked nucleic acid, LNA), 由于 LNA 与 miRNA 具有高亲和力, 采用 LNA 修饰的核苷酸探针可以使印迹杂交检测灵敏度显著提高 10 倍^[7]; 使用可溶性的碳二亚胺(EDC), 实现 miRNA 与尼龙膜的高效交联, 与传统的 UV 交联法相比, miRNA 检测灵敏度提高 25~30 倍^[5]。

1.2 原位杂交检测

原位杂交检测 miRNA 是首先将目标 miRNA 固定在细胞中, 再利用碱基互补配对的原理和探针杂交, 最后可以使用免疫组织化学法对靶物质 miRNA 进行检测。Kerstens 等^[8]结合锁核酸技术和酪酰胺信号放大技术(tyramide signal amplification, TSA), 发展了高效的原位杂交方法, 显著提高了检测灵敏度, 使低丰度 miRNA 实现原位可视化。目前, 原位杂交方法已被开发用于检测冰冻切片中的 miRNA。例如 Silaharoglu^[9]课题组建立了基

于荧光原位杂交(miRNA FISH)技术的冰冻切片中 miRNA 检测方法, 并指出该方法对染色体的鉴定和 miRNA 在细胞内的定位及其在不同时间和空间上的积聚分布等研究领域有重要作用。荧光原位杂交方法已经逐步实现从实验室走向临床 miRNA 样品检测, Schepeler 等^[10]通过检测大脑发育过程中 prognostic miRNA 含量的变化, 判定结肠癌发生风险, 做到及时干预治疗。

1.3 微阵列芯片和微球技术的高通量检测

微阵列芯片技术是在一块芯片上, 构建多个靶物质互补的探针序列, 将靶物质与芯片孵育杂交, 然后冲洗去除没有杂交部分, 扫描芯片, 最后对数据进行统计分析, 从而实现 miRNA 快速高通量检测。但是芯片上不同的探针分子和待测分子之间容易发生交叉反应, 该方法具有灵敏度低、特异性不好、重复性差等缺点^[11]。基于微球杂交建立起来的流式细胞检测方法克服了微阵列芯片的上述不足^[12]。每个微球相当于微阵列芯片上的一个点, 与传统芯片相比, 微球处于液相悬浮状态, 其表面固定的探针更有利于捕获待测靶 miRNA 序列, 可有效避免固态芯片中的交叉反应, 使检测具有更好的重复性和特异性。

2 基于扩增原理的检测技术

2.1 RT-PCR 扩增法

RT-PCR 扩增法是通过实时荧光 PCR 仪对核酸进行检测的一种技术手段。其过程为先将 miRNA 逆转录成相应的互补 DNA (cDNA), 随后进行普通的实时荧光 PCR。该方法以逆转录得到的 cDNA 作为模板, 可以实现对扩增产物的定量实时检测。

然而, 由于 miRNA 序列短(18~25 nt), 仅为一条 PCR 引物的长度, 常规的 RT-PCR 检测方法对 miRNA 检测具有很大的局限性。因此, 国内外科研工作者对传统的 RT-PCR 方法进行改善, 建立了加尾法以及茎环法等检测 miRNA 的方法, 达到对 miRNA 的快速灵敏检测。加尾法通常有两种方法: 第一种是利用末端转移酶将 poly(A)尾巴加在 miRNA 分子的 3'末端, 进而延长 miRNA, 得到长的 cDNA^[13], 以这个长的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增检测; 第二种方法主要是设计特定的长的探针, 该探针 3'端与 miRNA 的 5'端部分互补, 从而以 miRNA 为模板逆转录成一条更长的 cDNA, 以这个 cDNA 为模板进行 PCR 扩增检测^[14]。我们实

实验室在通用茎环法基础上,设计了一种诱导茎环结构的线性探针,将其作为 RT-PCR 的特异性探针来检测 let-7 家族,与已有文献相比,具有更低的背景,并且检测灵敏度和特异性更好。

2.2 等温扩增法

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)虽然达到了对 miRNA 进行高灵敏检测的水平,但是该方法对温度有精确的要求,且对设备也有一定的要求。目前,一系列不需要精确控温的等温扩增技术已被相继研发^[15-19],尤其是滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)和指数扩增(exponential amplification reaction, EXPAR)两类技术,在 miRNA 检测中具有明显优势。

2.2.1 滚环扩增技术

滚环扩增技术是新近发展起来的一种在体外实施的、温度恒定的检测核酸的扩增方法,该方法以环状 DNA 分子为模板进行滚环复制扩增^[15]。滚环扩增方法的主要优势在于温度恒定并且无需复杂仪器等。2006 年,Jonstrup 等^[16]首次发现滚环扩增可以实现 miRNA 的检测。在这个过程中,miRNA 起到了两个作用,首先是作为模板,在 DNA 连接酶的作用下,将挂锁探针连接成环状;其次是作为引物,在聚合酶的作用下对整个反应进行聚合延伸放大。其扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳的方式进行验证,实现 miRNA 的检测分析。此后,科学家们探索出了一系列的改良方法,检测的灵敏度和特异性得到进一步提高。Cheng 等^[17]利用 T4 RNA 连接酶 2 连接环化锁探针,通过荧光染料对反应过程进行实时监测,检出 miRNA 下限为 10 fmol/L。Mashimo 等^[18]将滚环扩增技术成功地应用于健康人肺组织总 RNA 中 miRNA 的检测。Zhou 等^[19]设计了一种哑铃状锁探针(D-RCA),可显著提高检测的特异性和灵敏度,并被应用于结肠肿瘤相关 miRNA 的检测。

2.2.2 指数扩增技术

等温指数扩增是由 Jia 等^[20]首先提出的一种 miRNA 检测技术。其模板包含 2 个重复序列,通过一个酶切,触发扩增反应,在 30 min 就可检测到 10 amol/L 的 miRNA。在此基础上,科学家们对上述方法进行了进一步的优化和改善。比如:结合两步 EXPAR 和单量子点纳米传感器技术,实现了对 let-7 家族中 let-7a 的微量检测,且其检测限达到了 0.1 amol/L^[21, 22]。此外, Liu 等^[23]设计了靶向等温指数扩增(target-assisted isothermal ex-

ponential amplification, TAIEA),实现了细胞裂解物中 miRNA 的快速检测。Wang 等^[24]构建发卡式结构模板,将 miRNA 检测的灵敏度提高到 3.80×10^{-13} mol/L。

等温指数扩增技术在 miRNA 检测中具有以下优势:1) 检测范围广,可跨越 10 个数量级,且最低检测限可达到 0.1 zmol 的水平;2) 特异性高,其能对仅相差单个碱基的 miRNA 进行很好的区分;3) 对仪器的要求比较简单,仅通过水浴就可以实现;4) 反应时间较短,可在一个小时内完成。因此,EXPAR 技术发展迅速,成为一种新的检测 miRNA 的策略。

3 基于测序的检测技术

基于杂交和扩增的技术方法具有一系列优点,比如:灵敏度高、特异性好等,但是被测定的 miRNA 序列均要求是已知的,对自然界中很多未知的、有待被开发的 miRNA 并不能进行定量检测。基于测序的检测技术可以适用于任何 miRNA 的检测和研究,包括未被发现的序列和已知的序列。

3.1 扩增克隆测序法

2006 年 Takada 等^[25]提出了 miRNA 扩增克隆法(miRNA amplification profiling, mRAP)。该方法的进程总共分为两个步骤:1) 逆转录反应。在 miRNA 的 3'端毗连一个接头,将与接头互补的短 RNA 序列作为引物,进行逆转录反应;2) 常规 PCR 反应。在整个反应体系中加入一对共用引物,实现常规的 PCR 反应。mRAP 高度灵敏,可以直接用克隆和测序技术检测组织中微量 miRNA 的表达量。但该克隆测序法每次只能检测 5 个不同的 miRNA,不能实现高通量检测,检测效率偏低。Cummins 等^[26]提出了 miRAGE (miRNA serial analysis of gene expression)克隆测序法,其通过单个测序反应即可检测 35 个不同 miRNA,检测效率明显提高。

3.2 新一代大规模测序技术

新一代大规模测序技术能在一次测序过程中对几百万个样本进行同时测序,极大提高了测序效率,为更好地发现和定量 miRNA 提供了一种有力的工具^[27]。其中 454 测序以及 Solexa 基因组测序是该测序技术平台的两大代表。454 测序是将珠子与两端连接有接头的 miRNA 结合在一起,然后在油滴(含有 PCR 反应体系)中对其进行独立的扩增^[28]。Solexa 基因组测序是将芯片表面带有

的单链引物与两端连接有接头的 miRNA 结合,应用边扩增边测序的原理,对其进行序列测定^[29]。这两种测序技术不用考虑 miRNA 序列短和同一个家族高度相似性的问题,降低了探针设计难度^[30]。它们能够对 miRNA 的表达进行有效定量,检测灵敏度可达 100 ng^[31];同时,通过生物信息学的方法,这些技术能够实现未知 miRNA 的分析^[32]。

4 总结与展望

miRNA 由于在疾病发生发展中具有重要的作用,因而成为生物医药领域研究的焦点。相关研究报道,当 miR-195 含量过度表达时,会导致扩张型心肌病和心肌梗死等疾病的发生。这一现象提示我们可通过对 miRNA 进行定量检测来实现对疾病的早期诊断。但是由于成熟 miRNA 具有片段小、难富集、丰度低等特点,人们在对其进行定量检测时往往会遇到不少难题。针对上述问题,现已研究出多种 miRNA 检测方法,但是每一种方法都存在着不可规避的缺点,且技术上有待完善。比如:基于扩增原理的 PCR 技术,其并不能对 miRNA 进行精确测定,但因技术相对成熟且成本较低,在临床实验室中相对被广泛使用;基于测序原理的大规模测序技术虽然能够快速且高灵敏度地检测 miRNA,但其对数据库较大和复杂的样本进行测序时,需耗费较高的成本。因此,开发通量更高、灵敏度更高、检测范围更广、检测时间短的检测方法仍是相关科研工作者的一个艰巨任务和挑战。

参考文献(References):

- [1] Vaca L. Point-of-care diagnostic tools to detect circulating microRNAs as biomarkers of disease[J]. *Sensors*, 2014, 14(5): 9117-9131.
- [2] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, *et al.* A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 226-230.
- [3] 周兰庭,冯雁婷,戴景兴,等. miRNA 调控脂肪干细胞分化的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志(Zhou Lan-ting, Feng Yan-ting, Dai Jing-xing, *et al.* miRNA regulation of adipogenic stem cell differentiation[J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*), 2017, 31(12): 1506-1511.
- [4] De Planell-Saguer M, Rodicio M C. Detection methods for microRNAs in clinic practice[J]. *Clinical Biochemistry*, 2013, 46(10-11): 869-878.
- [5] 祝申蓉,吴旭日,陈依军. microRNA 定量检测方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报(Zhu Shen-rong, Wu Xu-ri, Chen Yi-jun. Current progress in quantitative detection of microRNA[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2015, 46(1): 40-49.
- [6] Cissell K A, Shrestha S, Deo S K. MicroRNA detection: challenges for the analytical chemist[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(13): 4754-4761.
- [7] Kubota K, Ohashi A, Imachi H, *et al.* Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5311-5317.
- [8] Kerstens H M, Poddighe P J, Hanselaar A G. A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1995, 43(4): 347-352.
- [9] Silaharoglu A. Fluorescence in situ hybridization for detection of small RNAs on frozen tissue sections[M]//Nielsen B. *In Situ Hybridization Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Vol. 1211. New York: Humana Press, 2014: 95-102.
- [10] Schepeler T, Reinert J T, Ostenfeld M S, *et al.* Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(15): 6416-6424.
- [11] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, *et al.* miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 321-329.
- [12] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435: 834-838.
- [13] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. *BioTechniques*, 2005, 39(4): 519-525.
- [14] Raymond C K, Roberts B S, Garrett-Engele P, *et al.* Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs[J]. *RNA*, 2005, 11(11): 1737-1744.
- [15] Kobori T, Takahashi H. Expanding possibilities of rolling circle amplification as a biosensing platform[J]. *Analytical Sciences*, 2014, 30(1): 59-64.
- [16] Jonstrup S P, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification[J]. *RNA*, 2006, 12(9): 1747-1752.
- [17] Cheng Y, Zhang X, Li Z, *et al.* Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(18): 3268-3272.
- [18] Mashimo Y, Mie M, Suzuki S, *et al.* Detection of small RNA molecules by a combination of branched rolling circle amplification and bioluminescent pyrophosphate assay[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(1): 221-227.
- [19] Zhou Y, Huang Q, Gao J, *et al.* A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(15): e156.

- [20] Jia H, Li Z, Liu C, *et al.* Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(32): 5498–5501.
- [21] Zhang Y, Zhang C Y. Sensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a single-quantum-dot-based nano-sensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(1): 224–231.
- [22] Wang K, Zhang K, Lü Z, *et al.* Ultrasensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a time-resolved fluorescence sensor[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 57: 91–95.
- [23] Liu Y Q, Zhang M, Yin B C, *et al.* Attomolar ultrasensitive microRNA detection by DNA-scaffolded silver-nanocluster probe based on isothermal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5165–5169.
- [24] Wang G L, Zhang C Y. Sensitive detection of microRNAs with hairpin probe-based circular exponential amplification assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(16): 7037–7042.
- [25] Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, *et al.* Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(17): e115.
- [26] Cummins J M, He Y, Leary R J, *et al.* The colorectal microRNAome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(10): 3687–3692.
- [27] 't Hoen P A C, Ariyurek Y, Thygesen H H, *et al.* Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(21): e141.
- [28] Margulies M, Egholm M, Altman W E, *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376–380.
- [29] Bennett S. Solexa Ltd[J]. *Pharmacogenomics*, 2004, 5(4): 433–438.
- [30] Marson A, Levine S S, Cole M F, *et al.* Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(3): 521–533.
- [31] Rothberg J M, Leamon J H. The development and impact of 454 sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1117–1124.
- [32] Szittyá G, Moxon S, Santos D M, *et al.* High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families[J]. *BioMed Genomics*, 2008, 9: 593.

(上接第 453 页)

- [27] Tang Z, Li C, Kang B, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W98–W102.
- [28] Adler P, Kolde R, Kull M, *et al.* Mining for coexpression across hundreds of datasets using novel rank aggregation and visualization methods[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12): R139.
- [29] Vasaikar S V, Straub P, Wang J, *et al.* LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D956–D963.
- [30] Tripathi S, Pohl M O, Zhou Y, *et al.* Meta- and orthogonal integration of influenza “OMICs” data defines a role for UBR4 in virus budding[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 18(6): 723–735.
- [31] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(4): 271–289.
- [32] 黄健, 陈旭, 林天歆. 膀胱癌精准治疗现状与展望[J]. *中华泌尿外科杂志*(Huang Jian, Chen Xu, Lin Tian-xin. Current status and prospects of precision treatment of bladder cancer[J]. *Chinese Journal of Urology*), 2015, 36(7): 484–486.