

# microRNA 定量检测方法的研究进展

祝申蓉, 吴旭日, 陈依军<sup>\*</sup>

(中国药科大学生命科学与技术学院化学生物学研究室, 南京 210009)

**摘要** 随着对 microRNA (miRNA) 种类、结构和生物学功能研究的不断深入, 其在生物发育、代谢调控、疾病发生与治疗干预等方面的重要性受到了广泛关注。由于 miRNA 稳定性差、表达量低和序列差异小等特征, 建立快速简便、灵敏度高、特异性强的 miRNA 定量检测方法对研究这类生物活性分子的功能至关重要。本文对 miRNA 的定量检测方法进行分析和比较, 为选择合适的 miRNA 检测方法开展生物学功能研究提供参考和借鉴。

**关键词** microRNA; 定量检测; 等温指数扩增反应; 滚环扩增法; 酶辅助 microRNA 检测法

**中图分类号** Q74    **文献标志码** A    **文章编号** 1000–5048(2015)01–0040–10

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20150104

## Current progress in quantitative detection of microRNA

ZHU Shenrong, WU Xuri, CHEN Yijun<sup>\*</sup>

*Laboratory of Chemical Biology, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

**Abstract** With the recent development of investigating biological functions of microRNA (miRNA), the importance of miRNA in the biological processes including developmental biology, metabolic regulation, disease progression and treatment has been well recognized. Due to its the instability, low level of expression and minor difference in sequence, more sophisticated analytical methods for rapid and easy quantitative detection of miRNA with strong specificity and high sensitivity play an important role in the study of the biological functions of miRNA. This review analyzes and compares recent quantitative methods to detect miRNA, with an attempt to provide a foundation for choosing an appropriate method to quantitatively analyze miRNA.

**Key words** microRNA; quantitative detection; exponential amplification reaction; rolling circle amplification; enzyme-assisted microRNA detection

This study was supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20130096120006), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKQZ2013024), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

microRNA (miRNA) 是一类长度为 19~23 个核苷酸(nt)的内源性非编码单链 RNA, 其可通过与 AGO 蛋白结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC), 与目标 mRNA 完全或不完全互补配对, 导致 mRNA 降解(完全配对)或抑制其翻译(不完全配对), 以实现转录后水平的基因表达调控<sup>[1]</sup>。研究发现, 在动物、植物和真菌中 miRNA 的表达具有显著的组织特异性和时序性, 对细胞生长和发育过

程起多种调控作用。目前, 人体内已发现的 miRNA 有 2 千多种, 占人类基因组的 1%, 调控着 30% 基因的表达<sup>[2]</sup>, 不仅参与体内正常生理过程的调控, 如细胞增殖、分化、发育、凋亡等, 还与肿瘤的发生发展<sup>[3]</sup>、心脏病<sup>[4]</sup>、神经性疾病<sup>[5]</sup> 等密切相关。

miRNA 基因的初始转录体 (pri-miRNA) 是由 RNA 聚合酶 II 转录生成的具有茎环结构的 RNA, 长度可达 1~3 kb, 然后在细胞核内被 RNase III 内

\* 收稿日期 2014-11-10 \* 通信作者 Tel:025–83271045 E-mail:yjchen@cpu.edu.cn

基金项目 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20130096120006); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (No. JKQZ2013024); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

切酶 Drosha 和双链 RNA 特异性结合蛋白 DGCR8 加工成长度 70~100 nt 具有发卡结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 由 Exportin-5 转运出细胞核,并进一步被细胞质中 RNase III Dicer 剪接成 18~24 nt 的双链 miRNA:miRNA \*。双链分离后,miRNA 形成 RISC 发挥作用,而 miRNA \* 则被降解或参与调节 miRNA 的稳定性<sup>[1]</sup>。通常 miRNA 的定量分析是研究其结构和功能的前提条件,但由于成熟 miRNA 片段小、缺少多聚腺苷酸的尾巴,其定量检测困难重重<sup>[6]</sup>:① miRNA 稳定性差,易降解;②家族成员间序列同源性高,同一家族的 miRNA 序列差别仅为 1~2 个碱基;③细胞中 miRNA 水平较低;④样品制备难度大。成熟 miRNA 样品制备过程中常会夹杂一部分 miRNA 前体,干扰检测的准确性。为解决这些难题,近年来科学家已建立了多种新颖、快捷简便、灵敏度高、特异性好以及高通量的 miRNA 定量检测策略。本文将重点对一些具有应用价值和最新报道的检测方法进行详细阐述和分析,为研究者开展 miRNA 研究工作提供参考。

## 1 microRNA 的传统检测方法

### 1.1 Northern blotting

Northern blotting 是最早建立的 miRNA 检测方法,其主要原理是利用标记的寡核苷酸探针与结合在硝酸纤维素膜上的目标 miRNA 互补杂交,然后显影检测。Northern blotting 一直被视为 miRNA 检

测和鉴定的标准方法,但该方法存在费时费力、灵敏度低(检测限为纳摩尔级别)、样品用量大(约 10~30 μg)、效率低等缺点<sup>[7]</sup>。为了克服上述缺点,在经典 northern blotting 的基础上已经衍生出多种改良方法。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种双环 RNA 类似物,其糖-磷酸骨架中呋喃环的 2'-O 和 4'-C 通过亚甲基桥连接使其被锁定为 N 构象。LNA 与 miRNA 具有高亲和力,采用 LNA 修饰的寡核苷酸探针可使 northern blotting 的检测灵敏度提高 10 倍<sup>[8]</sup>。此外,为提高 miRNA 与膜的结合效率,Pal 等<sup>[9]</sup>使用可溶性的碳二亚胺(EDC)实现了 RNA 与尼龙膜的高效交联,与传统的 UV 交联法相比,miRNA 的检测灵敏度提高了 25~50 倍。

### 1.2 微阵列法

微阵列法(microarray)可同时定量检测多个 miRNA 的表达量,属于高通量检测方案,适用于 miRNA 表达谱分析<sup>[10]</sup>。该方法的原理是:首先将多个与目标 miRNA 序列互补的探针固定于固相支持物上制备检测芯片,然后将芯片与标记的 miRNA 杂交后检测信号。高通量是微阵列法检测 miRNA 最大的优点,但是其同样存在芯片制作和检测费用高、检测灵敏度低、检测特异性差、重复性不好等缺点<sup>[7,11]</sup>。虽然近些年科学家对微阵列法进行了一系列的改进,特别是样品的标记方法(表 1)和探针设计策略<sup>[12]</sup>,但均未能从根本上解决问题,还有待进一步的升级改造。

**Table 1** Labeling methods in miRNA microarray

Labeling method	Examples	Reference
Radioactive isotopes labeling	The microRNA was end-labeled with $\gamma^{33}\text{P}$ dATP by T4 polynucleotide kinase	[13]
Fluorescent labeling	Fluorescent dye such as Cy3	[10]
Enzymatic labeling	Using T4 RNA ligase to add a fluorescence-modified nucleotide onto the 3' end of miRNA; A poly(U) tail with amine-modified UTP is first appended to the 3' end of miRNA using the poly(A) polymerase, the tailed miRNA are subsequently labeled with amine-reactive fluorescent dyes	[14-15]
Chemical labeling	Alkylation-based labeling along the miRNA (for example, miRNAs Bio Label IT) and approaches based on platinum coordination chemistry with nucleic acids (for example, Kreatech ULS)	[16]
Nanoparticles labeling	Poly(A) polymerase creates poly(A) tails on miRNAs hybridized onto LNA microarrays, DNA-modified nanoparticles are then adsorbed onto the poly(A) tails	[17]

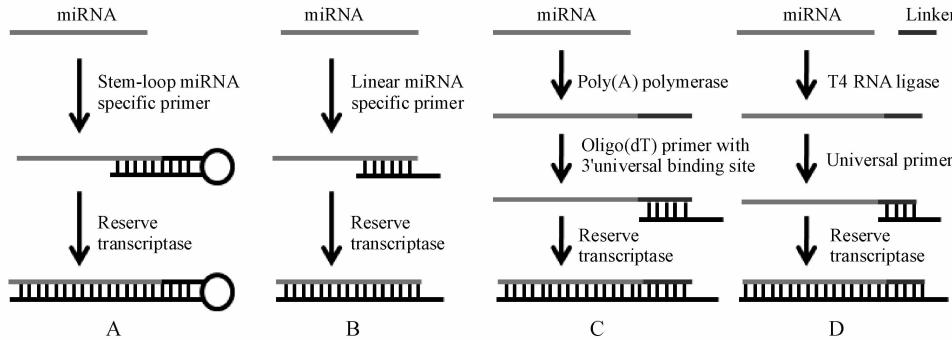
### 1.3 定量-逆转录 PCR 法

定量-逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 是目前检测低表达水平 miRNA 的主要方法之一<sup>[18]</sup>。该方法首先将 miRNA 反转录成相应的 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行

PCR, 实时检测扩增产物的数量, 间接实现 miRNA 的定量分析。qRT-PCR 具有灵敏度高、特异性强、简便快速、成本低等突出优点<sup>[19]</sup>, 常用于 miRNA 表达谱分析以及 Northern blotting 和微列阵法等其他方法检测结果的进一步验证和确认<sup>[1]</sup>。由于

miRNA 序列短,缺少 poly(A) 尾,以及在 miRNA 样品制备过程中易夹杂少许 pri-miRNA 或 pre-miRNA 等,导致传统的 qRT-PCR 检测法无法满足 miRNA 定量分析的需求<sup>[19]</sup>。为解决这些问题,传统 RT-

PCR 方法被进行了多方面的升级改造:茎环引物 RT-PCR,引物延伸 RT-PCR,poly(A) 加尾 RT-PCR 和 miQPCR(图 1)。



**Figure 1** qRT-PCR approaches for quantitative analysis of miRNA. Reverse transcription of individual mature miRNA using stem-loop (A) or linear (B) primers and enzymatic tailing of the miRNA by using poly (A) polymerase (C) or T4 RNA ligase (D)

RT-PCR 中茎环引物的序列一般由 3 个功能部分组成,即与 miRNA 的 3' 端互补的单链部分、双链部分(茎)和通用引物结合序列的环结构部分。茎环引物与 miRNA 互补结合的特异性强,通常不会与 pre-miRNA 发生退火,不过设计难度相对较大,且茎环形成的条件较为苛刻<sup>[20]</sup>。引物延伸 RT-PCR 是用特异性加尾引物(GSP)将 miRNA 反转录成加尾的 cDNA(cDNA-GSP),然后用 LNA 修饰的反向引物和与加尾序列一致的通用引物进行常规 PCR 扩增和检测<sup>[21]</sup>。虽然相对于茎环引物而言,线性引物的设计更为简单,但是线性引物不能很好地区分成熟 miRNA 及其前体,需要优化退火及逆转录步骤。Poly(A) 加尾 RT-PCR 法是利用 poly(A) 聚合酶在 miRNA 的 3' 端加上一段寡聚腺苷酸序列,然后再用 5' 端含有 oligo(dT) 的通用引物与之进行反转录生成 cDNA<sup>[22]</sup>,但是该法不能区分成熟 miRNA 和 pre-miRNA,也不适用于 3' 端 2' 位甲基化的 miRNA<sup>[23]</sup>。miQPCR 法的原理和操作与 poly(A) 加尾 RT-PCR 法类似,首先利用 T4 RNA 连接酶将 miRNA 与 DNA/RNA 连接子相连接形成长度增加的融合子,再借助通用引物反转录生成 cDNA 后进行定量检测<sup>[20]</sup>。与 poly(A) 加尾 RT-PCR 法相比,miQPCR 法的 cDNA 的合成效率更高、特异性更强和灵敏度更好<sup>[24]</sup>,但 miRNA 与 DNA/RNA 的连接是否成功是决定其成功与否的关键。

综上所述,传统的 miRNA 检测法虽然是

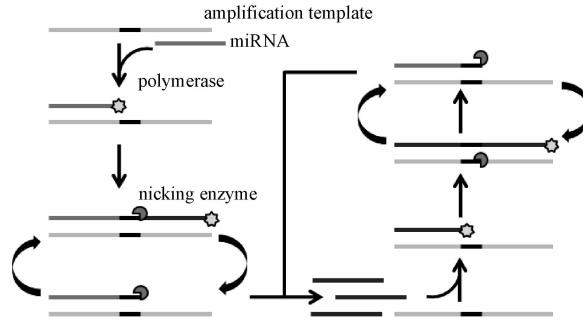
miRNA 鉴定、检测和分析的通用标准方法,但是仍存在操作繁琐、灵敏度低、检测上样量大等缺点,不能满足科学研究及临床诊断治疗的需求。因此,科学家们设计建立了大量灵敏度高、特异性好、快速简便的新型 miRNA 检测方法。

## 2 microRNA 定量检测的新方法

### 2.1 基于指数扩增反应的 microRNA 检测法

指数扩增反应(exponential amplification reaction, EXPAR)是 Van Ness 等<sup>[25]</sup>于 2003 年提出的一种等温核酸扩增新技术。该技术仅需数分钟就能够使长度为 10~20 bp 的寡核苷酸在等温条件下扩增 10<sup>6</sup> 倍以上<sup>[26]</sup>,扩增效率极高,且反应体系相对简单稳定。Jia 等<sup>[27]</sup>研究发现 miRNA 的长度非常适用于 EXPAR,于是其研究组尝试将等温扩增技术应用于 miRNA 的定量分析,并获得了较为满意的结果。等温指数扩增法需要两种工具酶,DNA 聚合酶[如 Vent(exo-)DNA 聚合酶]和切口酶(nicking enzyme,如 Nt. BstNBI)以及一条特殊设计的模板。模板的 3' 端与 5' 端序列完全相同且与目标 miRNA 互补,中间部分用特异序列隔开,该特异序列多为切口酶识别序列的互补序列。如图 2 所示,目标 miRNA 退火杂交至扩增模板的 3' 端后,在聚合酶的作用下延伸形成含目标 miRNA 的杂合双链,然后切口酶识别切割序列并产生切割作用,释放出大量的单链 DNA(ssDNA)。释放的 ssDNA

与目的 miRNA 序列相同(除了核苷酸变成脱氧核苷酸, 尿嘧啶变成胸腺嘧啶), 又可作为引物引发新的 EXPAR, 产生更多的 ssDNA, 如此反复, 形成指数扩增。



**Figure 2** Schematic representation of the exponential amplification reaction (EXPAR) with miRNA as the trigger

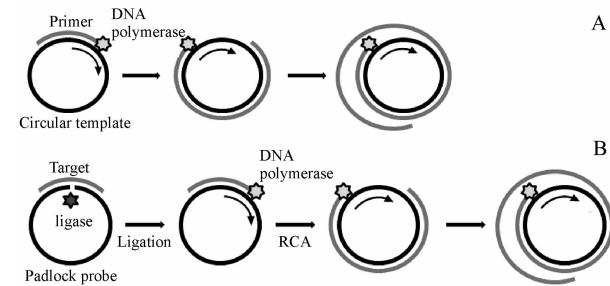
Jia 等<sup>[27]</sup>通过利用 Vent(exo-)DNA 聚合酶和 Nt. BstNBI 切口酶并结合 SYBR 染料对 let-7a 进行定量分析, 完成了 EXPAR 定量检测 miRNA 的可行性考察。实验结果表明: 等温指数扩增检测法不仅能够在 zmol 水平上定量测定 miRNA, 而且能够区分检测仅存在单个碱基差异的 miRNA 家族成员 (let-7a ~ g 和 i)。在此之后, 科学家们对上述方法不断改进, 衍生出一系列的升级方法。Zhang 等<sup>[28]</sup>将两步 EXPAR 和单量子点纳米传感器技术相结合完成了对 let-7a 的痕量检测, 其灵敏度可达到 0.1 amol/L。Wang 等<sup>[29]</sup>亦采用类似的方法在 0.1 amol/L 水平上实现了对 let-7a 的定量分析。为快速检测细胞裂解物中 miRNA 的含量, Liu 等<sup>[30]</sup>设计了靶向等温指数扩增反应 (target-assisted isothermal exponential amplification, TAIEA) 并将其与 DNA-scaffolded 银纳米簇探针检测技术相偶联, 使细胞裂解物中的 miRNA 检测灵敏度达到 10 amol/L, 避免了 miRNA 的分离纯化。Wang 等<sup>[31]</sup>将 EXPAR 的线状扩增模板结构改变成发卡式结构后, miRNA 的检测限可达  $3.80 \times 10^{-13}$  mol/L, 检测范围跨越 4 个数量级。Bi 等<sup>[32]</sup>采用特殊设计的哑铃状模板探针也得到相似的结果, 并将 miRNA 的检测限提高至 1 zmol/L, 检测范围跨越 9 个数量级。此外, 通过改变 EXPAR 扩增产物的检测方法, 引入 G-四链体脱氧核糖核酸酶催化信号检测技术, Wang 等<sup>[33]</sup>在 fmol/L 水平上实现了 miR-141 的定量检测, 检测的线性范围为  $1 \times 10^{-15} \sim 1 \times$

$10^{-7}$  mol/L。

等温指数扩增 miRNA 检测法的最低检测限可达到 0.1 zmol, 检测范围最大可跨越 10 个数量级, 且能区别具有单个碱基差别的 miRNA, 并且具有对仪器要求简单, 检测时间短、灵敏度高、特异性强等优点。因此, EXPAR 已逐渐成为一种与 qRT-PCR 并驾齐驱的 miRNA 检测方法, 但是该方法仍存在待改进和完善之处, 如模板的通用化、检测样本的高通量化, 等。

## 2.2 基于滚环扩增技术的 microRNA 检测方法

滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 技术是借鉴自然界中环状 DNA 分子滚环复制方式建立起来的一种体外等温核酸扩增技术, 目前已被广泛用于 DNA、RNA 和蛋白质的检测<sup>[34]</sup>。滚环扩增技术以其短时间内倍增目标分子数量, 放大检测信号, 反应过程无需特殊仪器设备等优势, 逐渐被应用于多种 miRNA 的定量分析。如图 3 所示, 引物与环状 ssDNA 模板结合后, 在具有链置换活性的聚合酶作用下, 实现 DNA 的连续扩增, 产生具有大量重复序列 (与环状模板完全互补) 的线状 ssDNA, 偶联相应的 DNA 检测技术即可对 miRNA 进行定量检测。根据模板形态不同, 该方法可分为两类。①直接滚环扩增法: 该方法滚环扩增过程中利用的是环状单链 DNA 作为模板 (图 3-A); ②锁探针-滚环扩增法: 设计一条两端序列与待检测 miRNA 序列完全互补的锁探针, 在连接酶 (如 T4 DNA ligase) 的作用下连接环化成环状模板, 然后以 miRNA 为引物进行滚环扩增 (图 3-B)。



**Figure 3** Rolling circle amplification (RCA) (A) and padlock-RCA (B)

2006 年, Jonstrup 等<sup>[35]</sup>首次报道了利用 RCA 检测 miRNA 的新技术, 他们以 miRNA 作为锁探针的连接模板进而作为引物引发 RCA 反应, 完成 ng 级总 RNA 中 miR-16 的表达量分析。此后, 相继出

现了各种改良的方法以期提高检测的灵敏度和特异性(表 2)。Cheng 等<sup>[36]</sup>发现利用 T4 RNA 连接酶 2 连接环化锁探针,可显著区分仅存在单碱基差别的 miRNA,明显提高检测方法的特异性,并且通过引入与 RCA 产物互补的第二引物进行分支滚环扩增(branched rolling circle amplification, BRCA)获得大量的 dsDNA 产物,可用 SYBR Green I 进行实时检测。在此基础上,Yasumasa 等<sup>[37]</sup>以反应产生的副产物焦磷酸盐为检测对象,通过腺苷酰转移酶将焦磷酸与 AMP 作用生成 ATP,然后再用荧光素酶 BL 定量检测 miRNA。为提高 RCA 的效率,

Zhou 等<sup>[38]</sup>设计了一种哑铃状锁探针,利用该探针进行 RCA 反应可使检测限提高至 fmol 级,且检测范围跨越 8 个数量级。Wen 等<sup>[39]</sup>通过将 RCA 与切口酶信号扩增技术以及 DNA 酶信号扩增技术相结合之后,使 RCA 法检测 miRNA 的灵敏度提高至 2 amol/L。Liu 等<sup>[40]</sup>结合锁探针-RCA 和切口酶信号扩增技术建立的 P-ERCA 法(padlock probe-based exponential RCA),使 miRNA 的检测灵敏度进一步提高至 0.24 zmol/L,在仅含有数百分子的水平上实现了 miRNA 的定量检测。

**Table 2** miRNA detections based on RCA

Method	Limit of detection	Detection range	Reference
Padlock probes and RCA	ng	—	[35]
Target-primed and BRCA	10 fmol/L	25 fmol/L-2.5 pmol/L	[36]
D-RCA	1 fmol/L	1 fmol/L-100 nmol/L	[38]
BRCA and pyrophosphate assay	20 amol	0.02 fmol-75 fmol	[37]
Encoded gel microparticles-RCA	15 zmol	300 amol/L-40 pmol/L	[41]
DNAzyme-based RCA	2 amol/L	—	[39]
P-ERCA	0.24 zmol	0.3 zmol-18 zmol	[40]
TIRCA	0.72 fmol/L	—	[42]
SDA-HRCA	0.18 pmol/L	0.1 pmol/L-10 nmol/L	[43]
RCA-CEAM	12 fmol/L	25 fmol/L-1 pmol/L	[44]
RCA-CC	100 fmol/L	100 fmol/L-1 nmol/L	[45]

BRCA;branched RCA;D-RCA:dumbbell probe-mediated RCA;P-ERCA:padlock probe-based exponential RCA;TIRCA:toehold-initiated RCA;SDA-HRCA:strand displacement amplification-mediated hyperbranched RCA;RCA-CEAM:cyclic enzymatic amplification method-RCA;RCA-CC:RCA and chronocoulometry

由此可见,基于滚环扩增技术的 miRNA 检测方法具有操作简单、灵敏度极高、特异性强等优点。重要的是,由于 RCA 的单链扩增特性和扩增产物一端可连接在固相支持物的特性,RCA 法可应用于构建 miRNA 高通量检测的微阵列。不过,在 miRNA 定量分析的实际应用中,RCA 法并不多见,这可能主要是由于:①RCA 扩增时间较长,一般需要 6 h 或更长;②RCA 模板合成难度大、费用高;③RCA 所用的工具酶价格昂贵等。因此 RCA 法还有待进一步改进。

### 2.3 酶辅助 microRNA 定量检测法

采用探针等量杂交法检测目标核酸分子的策略缺少信号扩增步骤,检测信号强度一般较弱,导致定量检测的灵敏度受限。酶辅助目标核酸分子再循环策略(enzyme-assisted target recycling,EATR)能够在相关工具酶的辅助下实现检测物或检测信号的进一步扩增,进而提高检测方法的灵敏度。EATR 大体过程为:首先根据目标核酸分子的

序列设计合成特异性识别探针,然后将探针与目标核酸分子共同孵育形成杂交复合物,再利用工具酶剪切探针产生检测信号,并释放目标分子,如此循环即可实现指数扩增,增强检测信号。由于具有反应温度低且恒定,工具酶便宜易得如限制性内切酶、双链特异性核酸酶和核酸外切酶等<sup>[46]</sup>以及操作简单等优点,EATR 已被逐渐应用于一些相对分子质量小、稳定性差的核酸分子(如 miRNA)的定量检测。

**2.3.1 序列依赖性酶辅助 miRNA 检测法** 限制性核酸内切酶和切口酶均属于序列依赖性的工具酶,其功能的发挥需要识别特异性切割位点,但切口酶能在 dsRNA 的某一条特定链上产生切口而不破坏模板分子,因此更适合 miRNA 的定量检测<sup>[46-47]</sup>。Dong 等<sup>[48]</sup>以 AgNCs 为荧光基团,设计了以 Hg<sup>2+</sup> 介导的分子信标探针,结合切口酶 Nt. BbvCI 的信号扩增特性在 0.6 fmol/L 水平完成了对 has-miR-16 的定量检测,且检测范围跨越 5 个

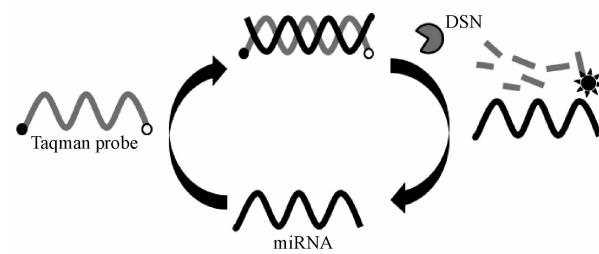
数量级( $10 \text{ pmol/L} \sim 1 \text{ fmol/L}$ )，具体过程如下：目标 miRNA 与分子信标探针及辅助探针退火形成 Y 型交叉结构，切口酶 Nt. BbvCI 识别分子信标上的特定核苷酸序列并产生切割，释放荧光检测信号。而再次游离的目标 miRNA 和辅助探针又可参与下一轮杂交、切割反应，如此循环反复，使荧光检测信号强度不断增加，更加易于检测。其实，在 EATR 的基础上引入了其他扩增技术亦可获得令人满意的检测效果。Yin 等<sup>[49]</sup>通过将 EATR 技术与 DNA 聚合酶的链置换扩增技术(strand displacement amplification, SDA)偶联，实现了在  $1 \text{ fmol/L} \sim 100 \text{ nmol/L}$  范围内对 miR-141 的精确定量。Zou 等<sup>[50]</sup>则在 EATR 基础上利用 *Afu* flap 核酸内切酶的侵入信号扩增能力建立了一种级联酶信号扩增技术(cascade enzymatic signal amplification, CES-A)，但是其检测灵敏度未获得明显提高( $1 \text{ fmol/L}$ )，反而使实验过程变得更加复杂。

### 2.3.2 非序列依赖性酶辅助 miRNA 检测法

识别位点的序列特异性是限制性内切酶和切口酶的优点，同时也是其存在的一大缺点，因为识别序列的特异性增加了探针设计的难度，限制了探针的多样性和可行性，而非序列依赖性的剪切酶则较好地避免了上述问题。

双链特异性核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN)是一种从堪察加拟石蟹的肝胰腺中分离得到的核酸酶，其能够识别并切割 dsDNA 或 RNA:DNA 杂交双链中的 DNA，对 ssDNA、ssRNA 和 dsRNA 均无切割作用。基于 DSN 非序列依赖性切割的特征，Yin 等<sup>[51]</sup>建立了一种基于 DSN 的信号扩增技术(duplex-specific nuclease signal amplification, DSNSA)的多重 miRNA 定量检测法，使检测限达到 fmol 级。如图 4 所示，Taqman 探针与目标 miRNA 退火形成 RNA:DNA 杂合双链，DSN 降解 Taqman 探针产生荧光信号，并释放 miRNA 用于下一轮的循环。通常一个目标分子在 30 min 内即可通过 DSN 循环降解数千个探针分子，产生并扩增检测信号。由于 DSN 不需要特异性识别位点，所以理论上可用于所有种类 miRNA 的检测。Lin 等<sup>[52]</sup>在 DSNSA 的基础上设计了引入 2-OMe-RNA 修饰的 DNA 模板用于 miRNA 检测。2-OMe-RNA 修饰可防止由于 DNA 模板自身形成局部双链而被 DSN 识别切割，产生假阳性结果。该方法在避免假阳性

的同时使 let-7a 的检测限达到  $0.4 \text{ pmol/L}$ ，且能区分仅存在单碱基差别的 let-7 同家族成员。



**Figure 4** MicroRNA direct detection based on duplex-specific nucleic acid signal amplification (DSNSA)

核酸外切酶Ⅲ(exonuclease Ⅲ, Exo Ⅲ)可作用于双链 DNA，沿  $3' \rightarrow 5'$  方向逐步切去单核苷酸，每次反应只能切除几个核苷酸。Exo Ⅲ能够降解平末端或  $3'$  凹陷末端的 dsDNA，但不能降解  $3'$  末端突出(多于 4 个核苷酸)的 dsDNA 和 ssDNA。根据这一催化特点，Huang 等<sup>[53]</sup>利用 Exo Ⅲ和氧化石墨烯建立的 miRNA 检测法检测限可达 fmol/L。脱氧核糖核酸酶 I(deoxyribonuclease I, DNase I)是一种以 ssDNA、dsDNA 或 DNA:RNA 杂交双链为底物，催化水解磷酸二酯键产生  $3'$  磷酸基团、 $5'$  羟基的二、三或寡核苷酸。由于该酶对 RNA 无水解作用，理论上适用于 miRNA 的定量检测。例如 Cui 等<sup>[54]</sup>将 DNase I 与氧化石墨烯技术相结合，建立的 miRNA 检测新方法能够在  $20 \text{ pmol/L} \sim 1 \text{ nmol/L}$  的检测范围内实现 miRNA 的定量检测，最低检测限达到  $9 \text{ pmol/L}$ 。来自噬菌体的 T7 核酸外切酶(T7 exonuclease)能够催化双链 DNA 沿  $5' \rightarrow 3'$  方向切除  $5'$  单核苷酸<sup>[46]</sup>。此外，研究还发现 T7 核酸外切酶能够沿  $5' \rightarrow 3'$  方向降解 RNA:DNA 杂交双链上的 RNA 或 DNA，但不能降解 dsRNA 或 ssRNA。Wang 等<sup>[55]</sup>利用 T7 核酸外切酶这一特性建立的 miRNA 检测法，检测限为  $0.17 \text{ fmol/L}$ 。

酶辅助 miRNA 定量检测法虽然满足了高灵敏度、高特异性、成本低廉、省时省力等要求，但其仍不完善，如扩增模板序列设计难度较大，模板易自身退火形成双链而造成假阳性结果或产生高检测背景信号。

## 2.4 基于纳米技术的 microRNA 检测方法

纳米粒(nanoparticles, NPs)以其表面积大、导电性好、生物相容性佳等优良特性已被用于生物

技术的多个领域。虽然利用纳米技术定量检测 miRNA 的尝试早已开始,但为获得更加简便、高效、高通量的检测方法,至今仍在不断探索,其中纳米金标记技术的最为成熟。纳米金颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)具有发光强度高、抗光漂白能力强、毒性低等优点,一般可用作检测 miRNA 所用的标记载体<sup>[56]</sup>。

与常规的纳米颗粒相比,纳米磁性颗粒更易于目标核酸的浓缩和纯化分析,可明显提高检测灵敏度。Lee 等<sup>[57]</sup>利用纳米金标记的生物条码和磁性微粒建立了一种无需酶扩增,可在凝胶电泳平台上定量检测 miRNA 的创新方法,检测范围涵盖 amol/L 到 nmol/L。该方法的基本原理和过程如图 5 所示。①生物条码探针(barcode probe)设计:上千条条码 DNA(barcode DNA)结合于 AuNPs 上构成生物条码探针,其中条码 DNA 序列包含 miRNA 互补结合序列(约 11 nt)和不同长度的编码序列;②磁

性探针(magnetic probe)设计:磁性探针是在磁性微粒上结合了多条与目标 miRNA 序列中另一部分互补的序列(长度同样也是约 11 nt);③目标 miRNA 的捕获:当有目标 miRNA 存在时,磁性探针和条码探针以“三明治”结合方式将目标 miRNA 捕获,然后通过磁场作用将其与未捕获 miRNA 的条码探针分离;④目标 miRNA 的定量检测:将捕获 miRNA 的探针用 KCN 溶解 AuNPs 颗粒释放出条码 DNA,再加入与条码 DNA 互补的寡核苷酸序列杂交形成双链 DNA(double-helix barcode DNA, dx-barcode DNA),最后进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SYBR Green I 染色后即可定量检测 miRNA。该方法不仅能够在 amol/L 水平实现 miRNA 的特异性定量分析,并且由于结合在 AuNPs 上的条码 DNA 可对应不同的 miRNA,具有同时检测多种 miRNA 的高通量特性,因此对分析组织器官中的 miRNA 表达谱具有重要的意义。

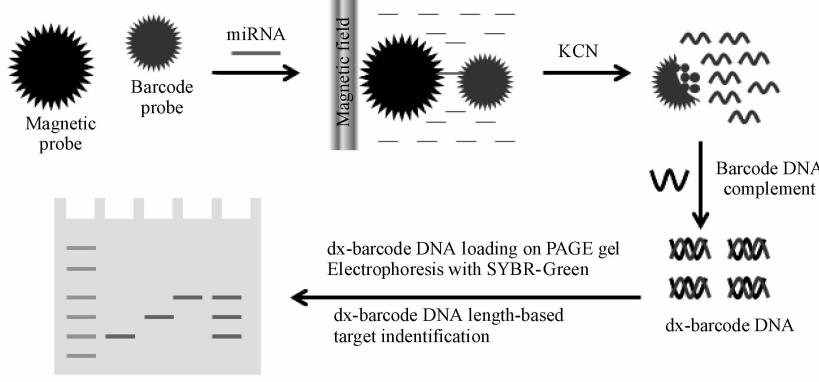


Figure 5 Bio-barcode gel assay for miRNA (dx-barcode: double-helix barcode)

纳米材料通常具有良好的导电性,可促使电子在生物活性分子和电极表面间直接转移,因此基于纳米材料的 miRNA 电检测技术亦能获得满意的检测结果。Fan 等<sup>[58]</sup>基于聚苯胺纳米线网络间隙之间形成电子传导的原理,建立了一种简单而灵敏的电子生物传感器用于直接检测 miRNA,其检测限达 5 fmol/L,检测范围跨越 10 fmol/L ~ 20 pmol/L。为了进一步增加检测的灵敏度以期获得更低的检测限,科学家通常会将在电纳米颗粒的基础上引入化学或生物学扩增技术。Yin 等<sup>[59]</sup>用生物素标记单链信号 DNA 和锁核酸固定于 AuNPs 表面形成生物素标记探针,然后将固定于玻碳电极的发卡探针与 miRNA 特异性杂交,最后向杂交体系中加入

生物素标记探针和链霉亲和素标记辣根过氧化物酶,进行检测信号的酶学扩增,建立了 miR-21 的电化学检测法,检测限可低至 0.06 pmol/L。

光学检测与纳米检测技术联用是提高生物样品检测的灵敏度高和检测范围的有效手段之一。Alhasan 等<sup>[60]</sup>设计并建立了一种 Scanometric miRNA 检测技术平台用于测定低丰度的 miRNA,该方法特异性强、重现性好。首先 miRNA 通过 T4 RNA 连接酶 2 与通用 DNA 连接子相连接,然后再与 miRNA 微阵列杂交。紧接着,利用通用球状核苷酸化的 AuNPs 复合物捕获结合在微阵列上的 miRNA。最后,通过金沉积以扩增检测信号并扫描成像。利用该方法可在 1 fmol/L 的水平上定量检

测血清中 miRNA 的含量。

虽然基于纳米技术的 microRNA 检测方法具有检测灵敏度高,特异性好,高通量等诸多优点,但是纳米颗粒的稳定性易受环境影响,特别是溶液 pH 和离子强度的影响。此外,纳米颗粒表面杂交探针的密度对杂交效率影响较大,DNA 探针密度太高或太低都会降低杂交效率。因此,在选择基于纳米技术的 microRNA 检测方法时,应充分考虑上述问题。

### 3 总结与展望

miRNA 在发育、代谢和疾病发生过程中都具有重要的作用,可作为生命活动研究的生物标志物或临床疾病诊断治疗的药物靶点。miRNA 的定量检测和分析技术已经成为科学家们研究 miRNA 生物学功能的重要工具之一。理想的 miRNA 检测方法应具有检测通量高,时效性好,特异性强,检测样品量小,检测灵敏度高且检测范围广等优点。虽然已有多种检测技术被运用到 miRNA 的定量检测,但是每一种方法都或多或少存在一些不足或待改进及完善之处。因此,理想的 miRNA 检测技术的建立仍需要科学家们的不断努力以及相关科学技术的不断进步。

### 参 考 文 献

- [1] Dong H,Lei J,Ding L,*et al.* MicroRNA: function, detection, and bioanalysis[J]. *Chem Rev*,2013,113(8):6207–6233.
- [2] Lewis BP,Burge CB,Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*,2005,120(1):15–20.
- [3] Lee YS,Dutta A. MicroRNA in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*,2009,4:199–227.
- [4] Chen JF,Murchison EP,Tang R,*et al.* Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(6):2111–2116.
- [5] Lukiw WJ,Zhao Y,Cui JG. An NF-kappaB-sensitive microRNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells[J]. *J Biol Chem*,2008,283(46):31315–31322.
- [6] de Planell-Saguer M,Rodicio MC. Detection methods for microRNA in clinic practice[J]. *Clin Biochem*,2013,46(10/11):869–878.
- [7] Cissell KA,Shrestha S,Deo SK. MicroRNA detection: challenges for the analytical chemist[J]. *Anal Chem*,2007,79(13):4754–4761.
- [8] Várrallyay E,Burgýn J,Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes[J]. *Nat Protoc*,2008,3(2):190–196.
- [9] Pall GS,Codony-Servat C,Byrne J,*et al.* Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA,miRNA and piRNA by northern blot[J]. *Nucleic Acids Res*,2007,35(8):e60.
- [10] Li W,Ruan K. MicroRNA detection by microarray[J]. *Anal Bioanal Chem*,2009,394(4):1117–1124.
- [11] Wang B,Xi Y. Challenges for MicroRNA Microarray Data Analysis[J]. *Microarrays*,2013,2(2),doi:10.3390/microarrays2020034.
- [12] Liu CG,Calin GA,Volinia S,*et al.* MicroRNA expression profiling using microarrays[J]. *Nat Protoc*,2008,3(4):563–578.
- [13] Krichevsky AM,King KS,Donahue CP,*et al.* A microRNA array reveals extensive regulation of microRNA during brain development[J]. *RNA*,2003,9(10):1274–1281.
- [14] Thomson JM,Parker J,Perou CM,*et al.* A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression[J]. *Nat Methods*,2004,1(1):47–53.
- [15] Shingara J,Keiger K,Shelton J,*et al.* An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling[J]. *RNA*,2005,11(9):1461–1470.
- [16] Pritchard CC,Cheng HH,Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations[J]. *Nat Rev Genet*,2012,13(5):358–369.
- [17] Fang S,Lee HJ,Wark AW,*et al.* Attomole microarray detection of microRNA by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions[J]. *J Am Chem Soc*,2006,128(43):14044–14046.
- [18] Schmittgen TD,Lee EJ,Jiang J,*et al.* Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA[J]. *Methods*,2008,44(1):31–38.
- [19] Yan J,Zhang N,Qi C,*et al.* One-step real time RT-PCR for detection of microRNA[J]. *Talanta*,2013,110:190–195.
- [20] Benes V,Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available [J]. *Methods*,2010,50(4):244–249.
- [21] Raymond CK,Roberts BS,Garrett-Engle P,*et al.* Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNA and short-interfering RNA[J]. *RNA*,2005,11(11):1737–1744.
- [22] Reichenstein I,Aizenberg N,Goshen M,*et al.* A novel qPCR assay for viral encoded microRNA[J]. *J Virol Methods*,2010,163(2):323–328.
- [23] Ro S,Park C,Jin J,*et al.* A PCR-based method for detection and quantification of small RNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2006,351(3):756–763.
- [24] Mou G,Wang K,Xu D,*et al.* Evaluation of three RT-qPCR-based miRNA detection methods using seven rice miRNA[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,2013,77(6):1349–1353.

- [25] Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(8):4504–4509.
- [26] Asiello PJ, Baeumner AJ. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review [J]. *Lab Chip*, 2011, **11**(8):1420–1430.
- [27] Jia H, Li Z, Liu C, et al. Ultrasensitive detection of microRNA by exponential isothermal amplification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, **49**(32):5498–5501.
- [28] Zhang Y, Zhang CY. Sensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a single-quantum-dot-based nanosensor [J]. *Anal Chem*, 2011, **84**(1):224–231.
- [29] Wang K, Zhang K, Lv Z, et al. Ultrasensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a time-resolved fluorescence sensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, **57**:91–95.
- [30] Liu YQ, Zhang M, Yin BC, et al. Attomolar ultrasensitive microRNA detection by DNA-scaffolded silver-nanocluster probe based on isothermal amplification [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(12):5165–5169.
- [31] Wang GL, Zhang CY. Sensitive detection of microRNA with hairpin probe-based circular exponential amplification assay [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(16):7037–7042.
- [32] Bi S, Cui Y, Li L. Dumbbell probe-mediated cascade isothermal amplification: a novel strategy for label-free detection of microRNA and its application to real sample assay [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, **760**:69–74.
- [33] Wang XP, Yin BC, Wang P, et al. Highly sensitive detection of microRNA based on isothermal exponential amplification-assisted generation of catalytic G-quadruplex DNAzyme [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, **42**:131–135.
- [34] Kobori T, Takahashi H. Expanding possibilities of rolling circle amplification as a biosensing platform [J]. *Anal Sci*, 2014, **30**(1):59–64.
- [35] Jonstrup SP, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification [J]. *RNA*, 2006, **12**(9):1747–1752.
- [36] Cheng Y, Zhang X, Li Z, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primer and branched rolling-circle amplification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(18):3268–3272.
- [37] 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]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, **401**(1):221–227.
- [38] Zhou Y, Huang Q, Gao J, et al. A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38**(15):e156.
- [39] Wen Y, Xu Y, Mao X, et al. DNAzyme-based rolling-circle amplification DNA machine for ultrasensitive analysis of microRNA in *Drosophila* larva [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(18):7664–7669.
- [40] Liu H, Li L, Duan L, et al. High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(16):7941–7947.
- [41] Chapin SC, Doyle PS. Ultrasensitive multiplexed microRNA quantification on encoded gel microparticles using rolling circle amplification [J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(18):7179–7185.
- [42] Deng R, Tang L, Tian Q, et al. Toehold-initiated rolling circle amplification for visualizing individual microRNA *in situ* in single cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(9):2389–2393.
- [43] Zhang LR, Zhu G, Zhang CY. Homogeneous and label-free detection of microRNA using bifunctional strand displacement amplification-mediated hyperbranched rolling circle amplification [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(13):6703–6709.
- [44] Cui L, Zhu Z, Lin N, et al. A T7 exonuclease-assisted cyclic enzymatic amplification method coupled with rolling circle amplification: a dual-amplification strategy for sensitive and selective microRNA detection [J]. *Chem Commun*, 2014, **50**(13):1576–1578.
- [45] Yao B, Liu Y, Tabata M, et al. Sensitive detection of microRNA by chronocoulometry and rolling circle amplification on a gold electrode [J]. *Chem Commun*, 2014, **50**(68):9704–9706.
- [46] Gerasimova YV, Kolpashchikov DM. Enzyme-assisted target recycling (EATR) for nucleic acid detection [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, **43**(17):6405–6438.
- [47] Chan SH, Stoddard BL, Xu SY. Natural and engineered nicking endonucleases—from cleavage mechanism to engineering of strand-specificity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(1):1–18.
- [48] Dong H, Hao K, Tian Y, et al. Label-free and ultrasensitive microRNA detection based on novel molecular beacon binding readout and target recycling amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, **153**:377–383.
- [49] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. Sensitive detection of microRNA in complex biological samples via enzymatic signal amplification using DNA polymerase coupled with nicking endonuclease [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(23):11487–11493.
- [50] Zou B, Ma Y, Wu H, et al. Ultrasensitive DNA detection by cascade enzymatic signal amplification based on *Afu* flap endonuclease coupled with nicking endonuclease [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(32):7395–7398.
- [51] Yin BC, Liu YQ, Ye BC. One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNA based on duplex-specific nuclease signal amplification [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(11):5064–5067.
- [52] Lin X, Zhang C, Huang Y, et al. Backbone-modified molecular beacons for highly sensitive and selective detection of microRNA based on duplex specific nuclease signal amplification [J]. *Chem Commun*, 2013, **49**(65):7243–7245.
- [53] Huang RC, Chiu WJ, Li YJ, et al. Detection of microRNA in tumor cells using exonuclease III and graphene oxide-regulated signal amplification [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(24):21780–21787.
- [54] Cui L, Lin X, Lin N, et al. Graphene oxide-protected DNA probes

- for multiplex microRNA analysis in complex biological samples based on a cyclic enzymatic amplification method [J]. *Chem Commun*, 2012, **48**(2): 194–196.
- [55] Wang M, Fu Z, Li B, et al. One-step, ultrasensitive, and electrochemical assay of microRNA based on T7 exonuclease assisted cyclic enzymatic amplification [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(12): 5606–5610.
- [56] Crew E, Tessel MA, Rahman S, et al. MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection [J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(1): 26–29.
- [57] Lee H, Park JE, Nam JM. Bio-barcode gel assay for microRNA [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**:3367.
- [58] Fan Y, Chen X, Trigg AD, et al. Detection of microRNA using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(17): 5437–5443.
- [59] Yin H, Zhou Y, Zhang H, et al. Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, **33**(1): 247–253.
- [60] Alhasan AH, Kim DY, Daniel WL, et al. Scanometric microRNA array profiling of prostate cancer markers using spherical nucleic acid-gold nanoparticle conjugates[J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(9): 4153–4160.

## · 新进展 ·

### 2014年美国上市的抗肿瘤新药

#### 1. 肺癌

◆色瑞替尼(Ceritinib,商品名:Zykadia)

用于晚期转移的非小细胞性肺癌。

公司:美国诺华

◆雷莫芦单抗(Ramucirumab,商品名:Cyramza)

扩大临床适应证,用于进展型发生转移的非小细胞肺癌。

公司:美国礼来

#### 2. 胃癌

◆雷莫芦单抗(Ramucirumab,商品名:Cyramza)

用于晚期胃癌或者食管胃结合部腺癌。

公司:美国礼来

#### 3. 卵巢癌

◆奥拉帕尼(Olaparib,商品名:Lynparza)

用于治疗brca基因缺陷相关的晚期卵巢癌患者。

公司:阿斯利康

#### 4. 子宫颈癌

◆贝伐珠单抗(商品名:Avastin)

属于被批准扩大使用新适应证,用于侵犯型和后期转移的子宫颈癌。

公司:罗氏下属的基因技术公司

#### 5. 黑色素瘤

◆曲美替尼与达拉非尼联合(商品名:Mekinist Tafinlar)

治疗手术无法切除和已经转移的晚期黑色素瘤。

公司:葛兰素威康

◆派姆单抗(Pembrolizumab,商品名:Keytruda)

用于晚期的,手术无法切除及对其他治疗无反应的黑色素瘤。

公司:默沙东

◆纳武单抗(Nivolumab,商品名:Opdivo)

用于手术无法切除和已经转移的对其他治疗无反应的晚期黑色素瘤。

公司:百时美-施贵宝