

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00031

MicroRNA 定量检测方法的研究进展

景花¹, 宋沁馨², 周国华^{1,3}

1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009;

2. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009;

3. 华东医学生物技术研究所, 南京 210002

摘要: MicroRNA 是一类内源性的非编码小分子 RNA, 通过下调蛋白编码基因的表达而对不同的细胞发育过程起到重要的调控作用。分析组织或细胞样本中 microRNA 的表达可为研究这类分子的生物学功能提供重要的信息。近年来, 研究者发展了许多方法检测不同的生理和病理学过程中 microRNA 的表达差异, 并发现 microRNA 的异常表达与癌症、神经紊乱和心脏疾病等的发生相关。文章系统地介绍了最新发展的 microRNA 定量检测方法, 详细阐述了基于探针杂交技术的 Northern blotting 法、微阵列芯片法、纳米金标记法、桥连同位素标记法, 以及基于扩增技术的定量 PCR 检测法、滚环扩增法、引物入侵法和新一代大规模高通量测序法等, 并对这些方法的优缺点进行了分析比较。

关键词: microRNA; 定量检测; 研究进展

Advances in approaches for the quantitative detection of microRNAs

JING Hua¹, SONG Qin-Xin², ZHOU Guo-Hua^{1, 3}

1. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3. Huadong Research Institute for Medicine and Biotechnics, Nanjing 210002, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous non-coding RNAs that play an important role in the control of developmental process of different cells by negative regulation of protein-coding gene expression. Analyzing miRNA expression in tissues or cells can supply valuable information for investigating the biological function of these molecules. Recently, researchers had proposed a number of approaches for analyzing the differences of miRNA expression among different physiological or pathological conditions, and found that aberrant expression of miRNA was related to cancers, neurological disorders and heart diseases, etc. This review focuses on newly developed strategies for miRNA quantification, and elucidates in detail the probe-hybridization based methods including Northern blotting, microarray, gold nanoparticle labelling, and splinted ligation with radioactive labels. The amplification-based methods including quantitative PCR, rolling cycle amplification, invader assay, and the next generation sequencing methods were also discussed. The advantages and disadvantages of these methods were compared.

Keywords: microRNA; quantitative detection; research progress

收稿日期: 2009-05-14; 修回日期: 2009-06-28

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(编号: BK2008067)资助

作者简介: 景花(1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。Tel: 025-84514223; E-mail: cpuhuaer2006@126.com

通讯作者: 周国华(1964-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 025-84514223; E-mail: ghzhou@public1.ptt.js.cn

近几年来, microRNA(miRNA)已经成为广大生物研究者关注的热点之一。miRNA是一类长度在19~24个核苷酸(nt)左右的内源性非编码小分子单链RNA,在进化过程中高度保守,能与靶基因mRNA特异性的碱基互补配对,引起靶基因mRNA的降解或者抑制其翻译,广泛地负调控靶基因的表达^[1,2]。自1993年被报道以来,已在动物、植物和病毒中发现了上万种miRNA,并由Sanger研究所整理和注释(<http://www.mirbase.org/>)^[3]。至2009年9月,Sanger研究所最新的miRNA数据库Release 14.0已收录了10 581条成熟miRNA序列,其中人类为721条。miRNA的异常表达将会导致生理的异常和疾病的产生,在许多癌细胞如大肠癌和乳腺癌细胞中,miRNA的表达水平会发生改变,有可能起到原癌基因和抑癌基因的作用^[4,5]。此外,在许多其他病变组织或细胞中也检测到了miRNA的异常表达^[6-8]。因此,对定量检测组织或细胞样本中miRNA方法的深入研究将有助于人们进一步了解miRNA与疾病发生发展的关系,为疾病的早期诊断提供新的思路。

成熟miRNA片段小,没有poly(A)尾巴,家族成员间通常只有一两个碱基的差别,并且在细胞中的表达水平普遍较低,这些特性给miRNA定量检测方法的建立带来了困难和挑战。尽管如此,科学家还是研究出了多种miRNA检测方法,如Northern blotting法^[9,10]、微阵列法^[11-14]、克隆和测序法^[15-17]、实时荧光定量PCR法^[18,19]等。已有方法大体可以归为两类:一类是不需要样本扩增的探针直接杂交法;另一类是基于样本miRNA扩增的方法。这两类方法各有优缺点:如不经过扩增的方法需要的样本量相对较大;而基于扩增的方法由于步骤过多可能会使测定结果误差较大,还有可能带来污染。一种理想

的miRNA定量检测方法应具有灵敏度高、特异性高、通量高和成本低等优点,本文对应用较多和新近报道的miRNA定量检测方法进行了述评。

1 基于探针杂交技术的检测方法

基于探针杂交技术的miRNA检测方法是一种直接检测法,不需要对样本RNA进行预扩增,其基本原理是首先在载体(如玻片或尼龙膜)上固定miRNA样本,再与经过标记的探针杂交,洗涤多余的杂交探针后进行信号检测;也可以在载体上先固定与靶miRNA序列互补的DNA探针,然后与经过标记的样本miRNA杂交,再进行信号检测。如图1所示,用于杂交反应的载体主要有平板、微球和膜等;用于信号标记的方法主要有同位素标记、荧光标记和纳米金标记等。本文侧重介绍了两种常用的探针杂交法以及最新发展的基于纳米金标记技术、桥连同位素标记技术和单分子检测技术的检测方法。

1.1 改进的 Northern blotting 法

Northern blotting法是经典的探针杂交检测方法^[20],但特异性和灵敏度不高,为此发展了用锁核酸(LNA)修饰的杂交探针来取代传统DNA探针的技术^[9,21],使Northern blotting法的检测灵敏度和特异性得到显著改善。LNA是一类寡核苷酸衍生物,具有高亲和性,可掺入到DNA中的任何位置,含有LNA的探针与靶分子结合后的双链热稳定性提高。基于LNA的探针杂交技术已被广泛应用于miRNA的检测(包括原位检测)中^[22-24]。

由于经典的Northern blotting法是基于固相探针杂交技术,所以杂交速度慢、灵敏度低,为此有研究者发展了核糖核酸酶保护法(RNase protection assay, RPA)来检测miRNA。该法基于液相杂交,较

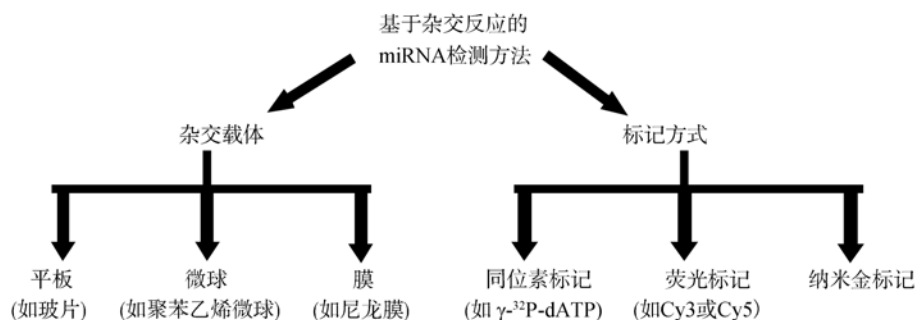


图1 探针杂交技术检测 miRNA 的载体和标记方式

常规Northern blotting法更为简便、灵敏,且样品用量明显减少^[25]。

1.2 基于微阵列芯片和微球技术的高通量检测方法

虽然Northern blotting法是目前常用的经典检测技术,但操作步骤繁琐、不适用于高通量分析。微阵列芯片技术(Microarray)能够同时测定多个样本,可以实现miRNA的高通量分析^[11-14],即在一块芯片上同时固定多个与miRNA序列互补的探针,然后加入经过标记的样本RNA,杂交后进行信号检测。为了提高杂交特异性,有报道采用LNA修饰探针固定在芯片上^[14]。但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,使得测定结果准确度低、重复性差^[26]。此外,芯片上探针与待测样本的杂交效率也不高。基于微球杂交的流式细胞检测方法(Bead-based hybridization technology)克服了微阵列芯片的不足^[27]。该法的检测原理与微阵列芯片基本相同,不同之处在于每个微球相当于传统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,其表面固定的探针类似于液相探针,更有利于捕获待测靶miRNA序列,并且能够最大程度地避免固态芯片中的交叉反应。然而为了知道微球表面的探针类型,必须对微球进行预先编码和杂交后解码,因此需要采用由特殊材料制作的编码微球,并由特殊的流式细胞仪进行微球解码及信号检测。所以该法的检测成本较高,难以在普通实验室推广应用。

1.3 基于纳米金标记技术的检测方法

近年来,将纳米金标记技术应用于生物技术领

域的研究方兴未艾。有报道通过结合表面等离子体共振成像(SPRI)技术和表面聚合反应,成功地将纳米金标记技术应用于miRNA的定量检测^[28]。该法的基本原理如图2所示,首先在芯片上固定miRNA特异的单链LNA捕获探针,再将RNA样品与芯片进行杂交反应,然后在poly(A)聚合酶的作用下给miRNA加上一段poly(A)尾巴,接着用标记了纳米金的核酸探针(由30个碱基T组成)与miRNA加上的poly(A)尾巴杂交,最后通过SPRI技术检测。通常一条poly(A)尾巴序列可以与几条纳米金标记探针杂交,显著提高了SPRI技术的检测灵敏度,使其适用于微量miRNA的定量分析。

为了进一步提高检测灵敏度, Yang等^[29]建立了应用纳米金银染增强技术定量检测miRNA的方法。该法的基本原理如图3所示,首先设计一条纳米金标记的信号探针和一条生物素标记的捕获探针,由于这两种探针中均含有与待测miRNA序列互补的序列,因此当待测样本中存在靶miRNA时,两种探针同时与miRNA杂交,然后将杂交产物转移到链亲和素修饰的微孔板上,通过链亲和素-生物素作用捕获靶miRNA,最后采用纳米金催化的银染信号增强技术检测信号,根据其吸光度值进行miRNA的定量。由于基于银染增强的纳米金探针定量检测法灵敏度高、且无需放射性标记和荧光标记,故给miRNA的研究开辟了一条崭新途径。

1.4 基于桥连同位素标记技术的检测方法

Maroney等^[30,31]设计了一种比较简单的桥连法对miRNA进行定量检测。该方法需先设计一段

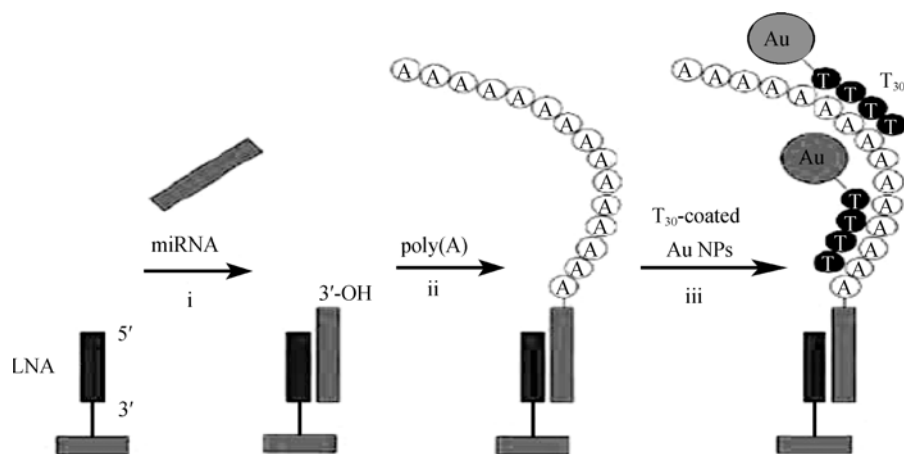


图2 纳米金标记技术结合poly(A)聚合反应和表面等离子体共振成像技术检测miRNA的原理图^[28]

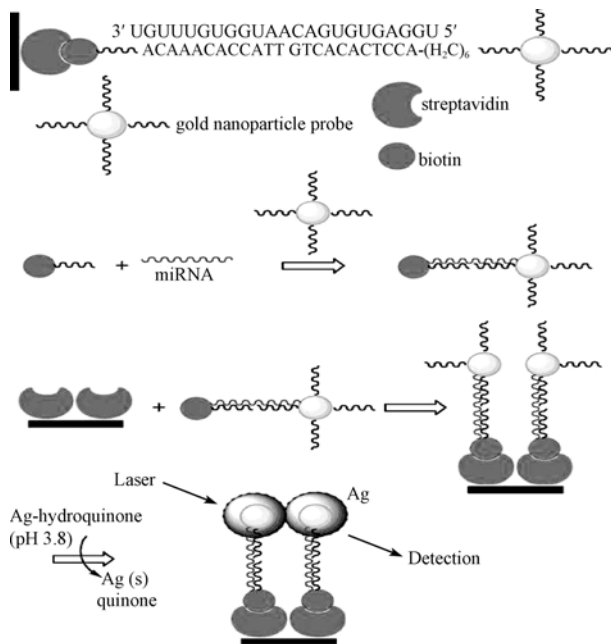


图 3 纳米金标记技术结合银染信号增强技术检测 miRNA 的原理图^[29]

miRNA 特异的寡聚核苷酸(桥接片段), 此片段的 3' 端与靶 miRNA 序列互补, 5' 端为外延片段(14 nt)。另外设计一段 5' 端标记³²P 并与上述桥接片段的外延片段互补的寡聚核苷酸(连接片段)。复性时, 靶 miRNA 和连接片段同时与桥接片段杂交, 产生杂化双链, 其中一条链在 miRNA 与连接片段的交界处含有缺口, 用 T4 DNA 连接酶将此缺口连上, 即对 miRNA 进行了³²P 标记。用磷酸酶去除游离连接片段的³²P 标记后, 进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离³²P 标记的 miRNA 和残留的连接片段, 通过检测放射信号的强度即可对靶 miRNA 进行定量。桥连法比 Northern

blotting 法和 RPA 法简便、快速, 也更灵敏。

1.5 基于荧光标记技术和单分子检测技术的检测方法

Neely 等^[32]设计了一种应用激光诱导荧光(LIF)和荧光相关光谱技术的单分子检测法对经荧光标记的 miRNA 分子进行定量检测。其原理如图 4 所示, 首先, 在溶液中使 miRNA 与两种带有不同荧光标记的 LNA 修饰探针杂交, 使靶 miRNA 同时标记上两种不同颜色的荧光分子。为了消除杂信号, 在杂交后的溶液中加入带有荧光淬灭基团的探针捕获未杂交的游离荧光探针。最后将荧光标记的 miRNA 通过单分子检测器, 通过读取有效的荧光信号来定量 miRNA。该方法首次将单分子检测技术应用于 miRNA 的定量检测, 简单快速, 无需连接、扩增或洗涤等步骤, 避免了人为操作带来的偏差, 结果重复性好, 可平行检测大量样本, 但方法的特异性还有待考察。

2 基于扩增反应的检测方法

基于探针杂交技术的 miRNA 检测方法灵敏度低, 应用范围受到限制, 如能采用现有的 DNA 扩增技术, 则可以极大地提高 miRNA 的检测灵敏度。但与 mRNA 不同, 成熟 miRNA 分子很短(18~25 nt)、且没有 poly(A)尾巴, 无法按常规方法设计随机引物进行反转录和 PCR 扩增。在科学家的不懈努力下, 近

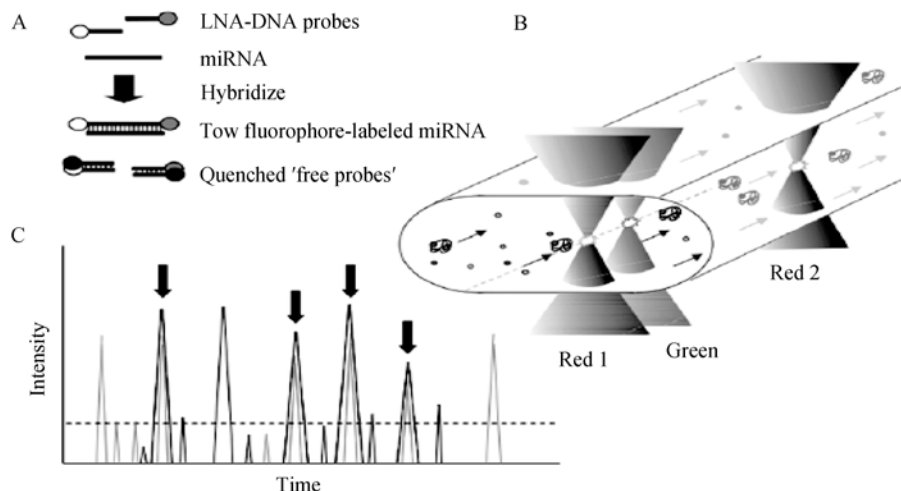


图 4 单分子技术检测miRNA的原理图^[32]

年来发展了多种扩增 miRNA 的方法, 如 PCR 扩增法、滚环扩增法(RCA)、引物入侵法(Invader)和克隆法等(图 5)。对 miRNA 扩增产物的检测方法与常规 mRNA 扩增产物的检测方法基本一致, 主要有 SYBR Green (SG)荧光染料法、TaqMan 探针法等(图 5)。其中应用最广泛的是实时荧光定量 PCR 法(Real-time qPCR)。

2.1 定量 PCR 法(qPCR)

采用qPCR技术对miRNA进行定量检测的方法主要有三种, 第一种方法是在常规引物延伸技术(PE)的基础上建立的引物延伸定量PCR法(PE-qPCR)(图 6A)^[19]。即先通过一个加尾的miRNA特异性引物(GSP)将miRNA反转录成加尾cDNA, 然后利用一个 LNA 修饰的miRNA特异性反向引物(RP)和一个与加尾序列一致的通用引物(UP)进行PCR扩增; 第二种方法是先用poly(A)聚合酶(PAP)处理总RNA(图 6B)^[18], 使miRNA的 3'端加上一段poly(A)尾巴, 然后用 5'端含有接头序列的poly(T)引物进行反转录, 使第一链cDNA加上一段接头, 为随后的PCR扩增提供反向通用引物序列, 再利用一条与

miRNA序列特异的正向引物就可实现PCR扩增; 第三种方法是利用茎-环状引物反转录miRNA, 称为 stem-loop RT-qPCR检测法(图 6C)^[33], 茎-环状反转录引物中除含有一段与miRNA互补的特异性序列外, 还含有一段较长的共有序列, 与靶miRNA退火反转录后, 能得到一个较长的反转录扩增子(cDNA), 共有序列提供了一个通用引物结合位点, 然后通过一个与miRNA序列特异的引物和一个通用引物进行PCR扩增。据报道^[33], 第三种方法的特异性较高, 可精确区分同一家族中序列高度同源的miRNA, 能检测只有一个碱基差别的不同miRNA的表达水平; 该法的灵敏度也很高, 样品消耗量少, 能检测出低丰度靶miRNA, 定量线性范围宽。

以上qPCR法采用的信号检测模式主要有两种: SG荧光染料渗入法和TaqMan探针法。前者成本低, 但特异性差; 后者特异性好, 但每种miRNA都需要设计一个对应的TaqMan探针, 成本相对较高。最近发展了一种基于通用探针库(Universal probe library, UPL)^[34]的miRNA检测法^[35], 研究者通过在茎-环状反转录引物中引入一段与UPL探针反向互补的序列, 降低了检测成本。

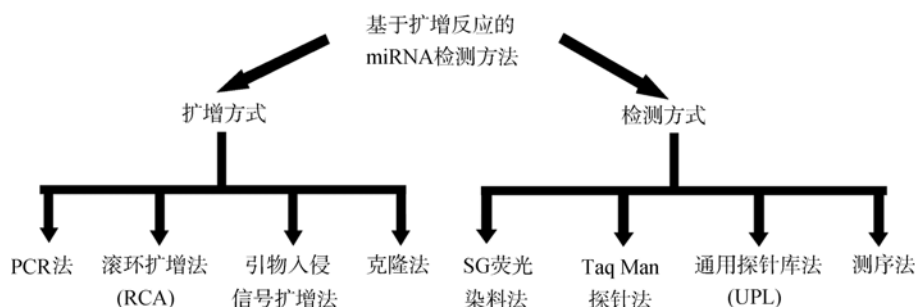


图 5 miRNA 扩增与检测技术

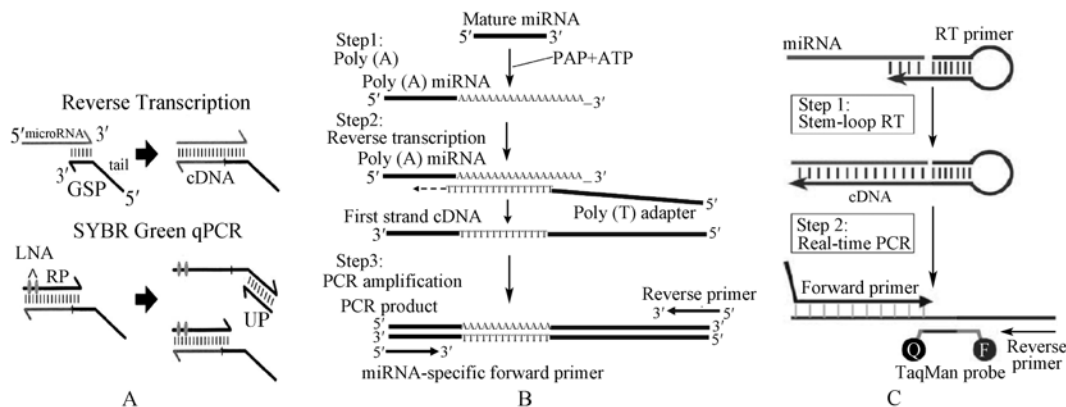


图 6 3种实时荧光定量PCR检测miRNA的原理图

A: 引物延伸法^[19]; B: poly(A)聚合酶加尾法^[18]; C: 茎-环状引物反转录法^[33]。

为了进一步提高检测通量和检测灵敏度, Tang 等^[36, 37]在stem-loop RT-PCR的基础上又成功建立了多重stem-loop RT-qPCR法, 并通过增加一步预扩增反应来提高检测灵敏度, 成功测定了单细胞水平(0.015 ng总RNA)的miRNA。随后, Lao等^[38]通过在反转录引物和PCR正向引物中引入miRNA特异的编码序列, 使反应的特异性得到进一步提高。这种单细胞水平的检测方法对于研究miRNA在那些数量有限的细胞群体(如原始生殖细胞^[39]等)中的作用有重要意义, 也为研究miRNA的相关功能提供了一个高效灵敏的检测工具。

2.2 滚环扩增法(RCA)

滚环扩增法(RCA)是一种独立于PCR扩增法的恒温扩增技术, 无需使用特殊的仪器装置, 目前已广泛用于DNA扩增中。与PCR不同, RCA仅需要一个环状DNA和与环互补的引物。为了形成环, 首先设计一个闭锁探针(Padlock探针), 使其两末端序列与靶miRNA中的两段相邻序列互补。当padlock探针与靶miRNA杂交时, DNA连接酶将padlock探针的3'和5'末端连接成环, 其中miRNA模板随后用作RCA的引物, 这样就实现了对目标序列的线性扩增^[40]。该法可以定量分析几纳克总RNA中的miRNA, 简单快捷, 滚环复制产物包括重复的miRNA序列, 可通过miRNA特异的寡聚核苷酸阵列检测, 因此将来能进一步发展成在同一反应中联合多个miRNA特异性Padlock探针的高通量芯片分析法。Cheng 等^[41]最近在RCA法的基础上发展了分支滚环扩增法(Branched rolling-circle amplification, BRCA)检测miRNA, 使灵敏度和特异性都得到显著提高, 可在短时间(30~60 min)内将只有几个拷贝的靶核酸扩增到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝。由于该法的高扩增效率, 可以通过扩增反应的副产物(焦磷酸盐)与镁离子形成的白色沉淀, 来初步判断样本中是否存在靶miRNA。

2.3 引物入侵法(Invader)

以上介绍的PCR和RCA法均是对miRNA模板的扩增, 所以容易造成污染。Allawi等^[42]将一种基于信号扩增的引物入侵技术成功地应用于miRNA的检测。其基本原理如图7所示, 首先针对靶miRNA, 设计一条3'端含茎-环结构、5'端含flap序列、中间为

miRNA特异性序列的检测探针; 再设计一条5'端含茎-环结构、3'端含miRNA特异性序列的入侵探针。如果检测探针和入侵探针中的miRNA特异性序列均与靶标序列互补, 则出现两条探针与同一模板互补的三级结构, 此时一种特殊的内切酶就能识别这种三级结构并在重叠处切断检测探针, 释放出的游离flap序列又可以作为入侵探针参加下一轮用于信号检测的入侵反应。如图7所示, 在第二个入侵反应中, 将检测探针设计为FRET探针, 即5'端含有荧光标记基团, 中间位置含有淬灭基团, 当第一入侵反应释放出flap时, FRET探针的5'端被切除, 荧光标记基团就与其共存的淬灭基团分离, 从而发出荧光信号, 以此实现miRNA的定量检测。为了降低背景, 采用捕获探针与第一入侵反应中未被切除的检测探针杂交。引物入侵技术的优点在于不是直接扩增样本, 而是对信号进行扩增, 避免了扩增产物造成的模板污染。通过两步入侵反应, 其扩增效率可与PCR技术媲美。虽然FRET探针合成费用较高, 但由于是通用检测探针, 适用于所有miRNA的检测。

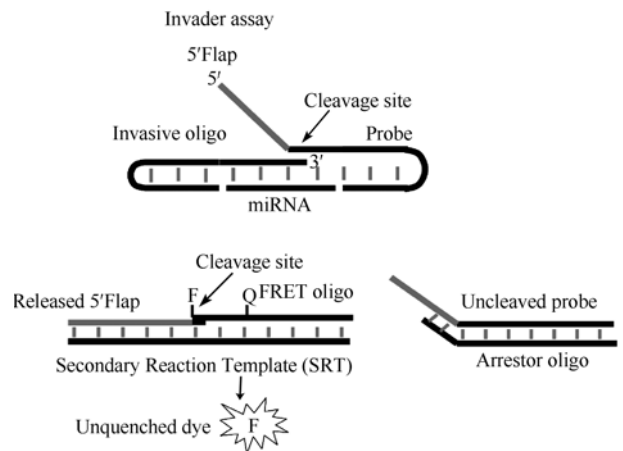


图7 引物入侵技术检测miRNA的原理图^[42]

2.4 测序法

以上介绍的miRNA检测方法均是测定已知序列的miRNA, 无法对未知序列的miRNA定量检测。克隆和测序技术适用于分析所有miRNA的表达水平, 但必须在测序前对待测样本进行细菌克隆, 然后对每一个克隆进行测序, 最后根据克隆序列出现的丰度进行定量分析。测序前所用细菌克隆技术主要包括常用的直接克隆法^[43]、改进的扩增克隆法^[44]和标

签序列克隆法^[45-47]等。但基于克隆扩增的测序法(通常是Sanger测序法)效率很低,若对100万个细菌克隆子测序则需要花费很长的时间,并要投入巨大的人力和财力。随着新一代测序技术的发展,这一问题得到解决。

2.4.1 克隆测序法

大部分已知的miRNA都是通过cDNA克隆测序发现和鉴定的。该法需要先构建miRNA的cDNA文库,再进行PCR扩增,扩增产物随后克隆到表达载体上测序,需要的初始样本量较大(几百微克RNA)^[48]。Takada等^[44]建立了一种改进的扩增克隆法(miRNA amplification profiling, mRAP),极大提高了直接克隆法的灵敏度。mRAP法先在miRNA的3'端连上接头,然后用与接头互补的反转录引物反转录。因为特定的反转录酶具有末端脱氧核苷酸转移酶活性,一些核苷酸(主要是脱氧胞苷酸dC)会连接到反转录出的cDNA链的3'末端。当5'端接头与cDNA链的poly(C)粘性末端退火后,加入一对共用引物即可实现对cDNA的PCR扩增。由于mRAP高度灵敏,可以直接用克隆和测序技术检测少量组织中miRNA的表达量。但常规克隆测序法每次只能检测大约5个miRNA,检测效率低,为此Cummins等^[45]在基因表达系列分析(SAGE)技术的基础上发展了检测效率较高的miRAGE(miRNA SAGE)克隆法,即标签序列克隆法。该法先要给miRNA分子连上专门的接头,以便于用生物素标记的引物进行反转录,接头经过酶切后用链亲和素包被的磁性微球移除,然后按照优化了的SAGE法进行释放标签的串联、克隆和测序^[45]。miRAGE法的优点在于能生成大的串联子,通过单个测序反应即可检测多达35个miRNA,检测效率明显提高。

2.4.2 新一代大规模测序技术

虽然miRAGE法可以同时检测多个miRNA,但若要对某一组织中所有miRNA(通常有几百种)进行定性和定量检测,传统的克隆测序法仍然费时费力。新一代高通量测序平台为发现和定量miRNA提供了一种有力的工具^[49],目前大规模测序技术,如454焦磷酸测序技术^[50-52]、Solexa合成测序技术^[53-55]和SOLiD连接测序技术^[56, 57]等,已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。与传统的克隆测序法相比,大规模测序法不需要在测序前进行克隆,但需要对所有模板同时进行类似克隆的PCR扩增。目前主要采用的扩增方式有两种:微乳液PCR(emulsion PCR, emPCR)和固相桥式PCR。emPCR是先将含有模板分子、表面固定一种PCR引物的微球、PCR扩增试剂、表面活性剂和硅油制成油包水的微乳液,形成数以百万计的油包水微囊,并使每个微囊最多含有一个靶标分子和微球。每个微囊相当于一个独立的“PCR反应管”,因此一次emPCR可以同时为数百万个PCR反应,每个微囊中的emPCR产物覆盖在微球表面,并且均来自于单个模板分子,与细菌克隆相似,故又称为克隆PCR或数字化PCR,454测序技术和SOLiD测序技术均采用emPCR制备测序模板。固相桥式扩增法是在固相表面上进行大规模并行PCR,即先在玻璃固相表面(测序通道上)随机固定引物,再加入末端带接头的待测单链DNA片段模板,由于末端接头序列与固定的引物序列互补,模板即被捕获到固相表面,随后加入dNTP和DNA聚合酶,固定引物发生延伸反应,高温退火后延伸产物的末端序列与相邻固相表面锚定的引物互补,形成桥式结构,并进行延伸反应,同时释放出互补的单链,通过不断循环,将会在固相表面获得上百万条成簇分布的待测DNA片段,此过程即为固相桥式PCR扩增,Solexa测序技术采用固相桥式PCR扩增制备测序模板。

有文献对454焦磷酸测序技术、Solexa合成测序技术和SOLiD连接测序技术等进行了专门介绍^[56],这些测序技术定性、定量检测miRNA的原理是基于所测目标miRNA的标签序列和出现频率,可以用于发现新的miRNA及检测已知miRNA长度和序列的微小改变。其中454测序技术是最早被商品化的大规模测序技术,测序成本不到传统毛细管测序法的1/10,一次测序可读取200~300 nt长度的序列,是目前应用最多的一种并行式测序技术。测定miRNA时,先分离小RNA,然后构建cDNA文库,最后再测序。到目前为止,454测序技术已经被广泛用于小RNA的研究中,如用于研究Marek's病相关miRNA^[50]、乳腺癌相关miRNA^[58]等。

SOLiD测序技术是在emPCR完成之后,变性模板,富集带有延伸模板的微球,经修饰后与玻片共价结合。SOLiD的独特之处在于以四色荧光染料分

别标记由双核苷酸编码的 16 种寡聚核苷酸片段, 然后以标记的寡聚核苷酸进行连续的连接反应, 是唯一的一种不采用传统聚合酶进行测序的技术。SOLiD 系统最大的优点就是每张玻片能容纳更高密度的微球, 可对单拷贝 DNA 片段进行大规模扩增和高通量并行测序, 一次运行可以获得 20 Gb 的测序数据(单点测序长度为 30 至 35 nt)。在 miRNA 测定中, 开发了专门的基于 SOLiD 检测平台的小 RNA 表达分析检测试剂盒, 用于高通量筛选和发现新的小 RNA。SOLiD 比 454 技术具有更高的覆盖率, 并且测定准确度达到 99.99% 以上, 是所有测序技术中最为准确的一种, 相信未来在 miRNA 测定中的应用将会比 454 测序平台更为广泛。

Solexa 测序技术可同时检测上亿个核苷酸片段, 测定成本很低, 约为常规毛细管电泳测序技术的 1%, 可快速测定全基因组序列, 是下一代测序技术中高质量、高通量、低成本的测序法。在检测 miRNA 时, 先将 miRNA 反转录生成 cDNA, 再将 cDNA 结合到表面带有大量固定接头的 flow cell 上, 并在固相表面进行桥式扩增反应, 最后进行测序, 一次可以读取长度为 32~40 nt 的数千万个片段, 因此可直接获得

所有 miRNA 的序列信息。根据所测目标 miRNA 的出现频率可方便地计算其相对丰度^[59], 实现 miRNA 的鉴定与定量分析的目的。Solexa 测序技术可以用于发掘、鉴定并定量出所有物种全基因组水平的 miRNA 图谱, 是解密 miRNA 图谱的较好方法, 例如, 有研究者应用 Solexa 测序技术分析人胚胎干细胞分化前后的 miRNA 表达谱^[60]。

虽然下一代测序技术可以高通量分析微量样品中的已知和未知的 miRNA, 但因为需要特殊的仪器设备, 尚未得到广泛地应用。

3 结 语

由于 miRNA 的检测对疾病的分子诊断和新型生物医药制剂的研发具有重要意义, miRNA 的研究方法正在不断发展, 检测 miRNA 在不同组织、不同时期、不同疾病状态下表达水平的报道日渐增多。从这些报道来看, miRNA 定量检测方法的建立和发展主要集中在综合利用各种探针设计和标记技术, 结合微阵列芯片、高通量测序、实时荧光定量 PCR 等技术来提高检测通量、灵敏度和特异性。各种 miRNA 检测方法的特点和灵敏度如表 1 所示。

表 1 几种主要的 miRNA 检测方法的特点和灵敏度

miRNA 检测技术		特点	检测灵敏度
探 针 杂 交	Northern blotting 法	miRNA 检测的金标准, 但耗时长, 样本量需求大	几十微克总 RNA
	微阵列芯片法	高通量, 但有背景和杂信号干扰, 重复性差	纳克级总 RNA
	基于微球的检测法	显著提高了微阵列芯片法检测的特异性, 但成本高	纳克级总 RNA
	桥连同位素标记法	简便灵敏, 但耗时长, 需要同位素标记	130 皮克总 RNA
	纳米金标记法	不需要同位素或荧光标记, 灵敏度高、可操作性强	飞摩尔级 miRNA
扩 增 技 术	定量 PCR 法	高精度定量与高灵敏度, 样品消耗量少	100 皮克总 RNA
	滚环扩增法	操作简便, 特异性好, 但灵敏度较低	几纳克总 RNA
	引物入侵法	简便易操作, 但需要特殊的内切酶	100 纳克总 RNA
	克隆测序法	费时费力, 但可以发现新的 miRNA	微克级总 RNA
	新一代测序技术	高通量, 结果准确度高, 可定量检测未知 miRNA, 但成本高	皮克级总 RNA

要从新技术的发展中获得帮助。近年来, 虽然某些传统检测方法, 如 Northern blotting 法等仍是研究 miRNA 的常规方法, 但随着新技术新方法的迅速发展, 科研人员在定量检测 miRNA 方面有了更多的选择, 但需要结合具体的实验目的和各种检测方法的优缺点综合考虑, 以获得最经济和最优化的实验结果。

参考文献(References):

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.[\[DOI\]](#)
- [2] Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310(5755): 1817–1821.[\[DOI\]](#)
- [3] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D140–144.[\[DOI\]](#)
- [4] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*, 2007, 6: 60.[\[DOI\]](#)
- [5] Schetter AJ, Liew SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG,

- Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 2008, 299(4): 425–436. [\[DOI\]](#)
- [6] Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(12): 699–706. [\[DOI\]](#)
- [7] Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997–1006. [\[DOI\]](#)
- [8] Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica*, 2008, 93(7): 1009–1016. [\[DOI\]](#)
- [9] Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 2007, 43(2): 140–145. [\[DOI\]](#)
- [10] Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(8): e60. [\[DOI\]](#)
- [11] Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9740–9744. [\[DOI\]](#)
- [12] Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA*, 2006, 12(5): 733–750. [\[DOI\]](#)
- [13] Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): e52. [\[DOI\]](#)
- [14] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 321–329. [\[DOI\]](#)
- [15] Ambros V, Lee RC. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *Methods Mol Biol*, 2004, 265: 131–158.
- [16] Chen PY, Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, John B, Marks DS, Gaidatzis D, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev*, 2005, 19(11): 1288–1293. [\[DOI\]](#)
- [17] Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du J, Zhu JK, Sun Q. Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome Biol*, 2007, 8 (6): R96. [\[DOI\]](#)
- [18] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519–525. [\[DOI\]](#)
- [19] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*, 2005, 11(11): 1737–1744. [\[DOI\]](#)
- [20] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 2004, 5(3): R13. [\[DOI\]](#)
- [21] Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 190–196. [\[DOI\]](#)
- [22] Kubota K, Ohashi A, Imachi H, Harada H. Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(8): 5311–5317. [\[DOI\]](#)
- [23] Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods*, 2007, 43(2): 146–152. [\[DOI\]](#)
- [24] Stenvang J, Silahtaroglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(2): 89–102. [\[DOI\]](#)
- [25] Ouellet DL, Plante I, Landry P, Barat C, Janelle ME, Flamand L, Tremblay MJ, Provost P. Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(7): 2353–2365. [\[DOI\]](#)
- [26] Hua YJ, Tu K, Tang ZY, Li YX, Xiao HS. Comparison of normalization methods with microRNA microarray. *Genomics*, 2008, 92(2): 122–128. [\[DOI\]](#)
- [27] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435(7043): 834–838. [\[DOI\]](#)
- [28] Fang S, Lee HJ, Wark AW, Corn RM. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(43): 14044–14046. [\[DOI\]](#)
- [29] Yang WJ, Li XB, Li YY, Zhao LF, He WL, Gao YQ, Wan YJ, Xia W, Chen T, Zheng H, Li M, Xu SQ. Quantification of microRNA by gold nanoparticle probes. *Anal Biochem*, 2008, 376(2): 183–188. [\[DOI\]](#)
- [30] Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW. A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation. *RNA*, 2007, 13(6): 930–936. [\[DOI\]](#)
- [31] Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW. Direct detection of small RNAs using splinted ligation. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 279–287. [\[DOI\]](#)
- [32] Neely LA, Patel S, Garver J, Gallo M, Hackett M, McLaughlin S, Nadel M, Harris J, Gullans S, Rooke J. A single-molecule method for the quantitation of microRNA

- gene expression. *Nat Methods*, 2006, 3(1): 41–46. [\[DOI\]](#)
- [33] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179. [\[DOI\]](#)
- [34] Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen PS, Jacobsen N, Lomholt C, Pfundheller HM, Tolstrup N. ProbeLibrary: A new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nature Methods*, 2005, 2(4): 313–316. [\[DOI\]](#)
- [35] Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 2007, 3: 12. [\[DOI\]](#)
- [36] Tang F, Hajkova P, Barton SC, Lao K, Surani MA. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): e9. [\[DOI\]](#)
- [37] Tang F, Hajkova P, Barton SC, O'Carroll D, Lee C, Lao K, Surani MA. 220-plex microRNA expression profile of a single cell. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1154–1159. [\[DOI\]](#)
- [38] Lao K, Xu NL, Sun YA, Livak KJ, Straus NA. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J*, 2007, 2(1): 33–35. [\[DOI\]](#)
- [39] Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, O'Carroll D, Das PP, Tarakhovsky A, Miska EA, Surani MA. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS ONE*, 2008, 3(3): e1738. [\[DOI\]](#)
- [40] Jonstrup SP, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification. *RNA*, 2006, 12(9): 1747–1752. [\[DOI\]](#)
- [41] Cheng Y, Zhang X, Li Z, Jiao X, Wang Y, Zhang Y. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(18): 3268–3272. [\[DOI\]](#)
- [42] Allawi HT, Dahlberg JE, Olson S, Lund E, Olson M, Ma WP, Takova T, Neri BP, Lyamichev VI. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. *RNA*, 2004, 10(7): 1153–1161. [\[DOI\]](#)
- [43] Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Tuschl T. Cloning of small RNA molecules. *Curr Protoc Mol Biol*, 2005, Chapter 26 Unit 26. 4.
- [44] Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, Hatanaka H, Fujiwara S, Watanabe H, Soda M, Choi YL, Plasterk RH, Cuppen E, Mano H. Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(17): e115. [\[DOI\]](#)
- [45] Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr., Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3687–3692. [\[DOI\]](#)
- [46] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D731–735. [\[DOI\]](#)
- [47] Xue LJ, Zhang JJ, Xue HW. Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(3): 916–930. [\[DOI\]](#)
- [48] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735–739. [\[DOI\]](#)
- [49] t Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen RH, de Menezes RX, Boer JM, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(21): e141. [\[DOI\]](#)
- [50] Burnside J, Bernberg E, Anderson A, Lu C, Meyers BC, Green PJ, Jain N, Isaacs G, Morgan RW. Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *J Virol*, 2006, 80(17): 8778–8786. [\[DOI\]](#)
- [51] Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, Holoch D, Lim C, Tuschl T. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, 2008, 44(1): 3–12. [\[DOI\]](#)
- [52] Wyman SK, Parkin RK, Mitchell PS, Fritz BR, O'Brian K, Godwin AK, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Tewari M. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5311. [\[DOI\]](#)
- [53] Glazov EA, Cottee PA, Barris WC, Moore RJ, Dalrymple BP, Tizard ML. A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Res*, 2008, 18(6): 957–964. [\[DOI\]](#)
- [54] Szittyá G, Moxon S, Santos DM, Jing R, Fevereiro MP, Moulton V, Dalmay T. High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics*, 2008, 9: 593. [\[DOI\]](#)
- [55] Rathjen T, Pais H, Sweetman D, Moulton V, Munsterberg A, Dalmay T. High throughput sequencing of microRNAs in chicken somites. *FEBS Lett*, 2009, 583(9): 1422–1426. [\[DOI\]](#)
- [56] Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, 2008, 92(5): 255–264. [\[DOI\]](#)
- [57] Chellappan P, Jin H. Discovery of plant microRNAs and short-interfering RNAs by deep parallel sequencing. *Methods Mol Biol*, 2009, 495: 121–132.
- [58] Nygaard S, Jacobsen A, Lindow M, Eriksen J, Balslev E, Flyger H, Tolstrup N, Moller S, Krogh A, Litman T. Identification and analysis of miRNAs in human breast cancer and teratoma samples using deep sequencing. *BMC Med Genomics*, 2009, 2: 35.
- [59] Chen J, Lozach J, Garcia EW, Barnes B, Luo S, Mikoulitch I, Zhou L, Schroth G, Fan JB. Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(14): e87. [\[DOI\]](#)

- [60] Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*, 2008, 18(4): 610–621.[\[DOI\]](#)