

韦荣昌,赵 欢,马小军,等. microRNA 检测方法的研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):17-19.

microRNA 检测方法的研究进展

韦荣昌^{1,2}, 赵 欢², 马小军^{1,2,3}, 唐 其¹, 韦树根^{1,2}, 覃喜军², 涂冬萍²

(1. 广西药用植物园,广西南宁 530023; 2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193;

3. 中国医学科学院药用植物研究所云南分所,云南景洪 666100)

摘要:microRNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸(nt)的内源性非编码小分子单链 RNA,通过下调蛋白编码基因的表达,对不同的生理和病理过程起重要的调控作用。准确而灵敏地检测组织或细胞中 miRNA 的表达水平,可为研究其功能鉴定和作用机制提供帮助。本文就近年来有关 miRNA 检测方法的研究进展作一综述。

关键词:microRNA;检测方法;研究进展

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0017-03

microRNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸(nt)的内源性非编码小分子单链 RNA,普遍存在于各种动植物中,由长约 70 nt 的具有茎环结构的 pre-miRNA(precursor microRNA)剪切而来,在进化上具有高度的保守性、时序性和组织特异性。miRNA 通过与靶基因 mRNA 3' 非翻译区(3'UTR)相互作用在转录后水平上调控 mRNA 的翻译,进而广泛作用于发育、细胞分化、细胞凋亡、脂类代谢和激素分泌等多种生理过程^[1]以及炎症、肿瘤、白血病、糖尿病等多种病理过程。然而,由于研究方法的单一或缺乏,绝大多数 miRNA 的功能和作用机制尚不清楚,因此,有效而且适用的试验技术和生物信息学方法,对研究 miRNA 的功能及其参与的生物学过程具有十分重要的意义。

1 miRNA 检测的试验技术

1.1 miRNA 克隆

迄今为止,cDNA 克隆仍不失为一种寻找新 miRNA 的有效手段,大部分已知靶基因的 miRNA 都是通过直接克隆发现和鉴定的^[2-5]。小 RNA 的克隆首先利用 PAGE 分离目的组织或细胞中约 22 nt 的 RNA,并连接到 5'和 3'的适配子上,逆转录并通过 PCR 扩增获得 miRNA 的 cDNA 文库,然后对这些扩增产物进行克隆、测序,并与基因组数据库 BLAST 比对,排除非 miRNA 后,最后通过 PAGE/Northern blotting 予以验证^[6-7]。

直接克隆对于生物体内常表达和高丰度的基因来说,可以获得完整的 miRNA 序列。然而对于一些在生物体内浓度很低(表达量低、表达产物极不稳定或前体到成熟的加工效率低等原因引起),或者只在生物体的特定组织器官及时期中表达的 miRNA,直接克隆则无能为力。此外,miRNA 特有的物理结构也给直接克隆、测序等带来困难。

1.2 PAGE/Northern blotting

PAGE/Northern blotting 是目前检测 miRNA 表达最主要的方法^[8],所有克隆和生物信息学分析得到的 miRNA 都必须经过 PAGE/Northern blotting 来验证和确认。Northern 杂交通常采用同位素(如 γ -³²P-dATP)、荧光(如 Cy3、Cy5)或纳米金标记反义寡核苷酸 5'末端作为探针,这个过程简便快速。这种方法的缺点是样品的需求量大,灵敏度低且不能进行高通量的检测。目前,用锁定的核苷酸探针(LNA)来取代传统 DNA 探针的技术^[9-10]显著改善了 Northern 杂交的检测灵敏度和特异性。LNA 是一种寡核苷酸衍生物,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^[11-13]。

1.3 微阵列芯片

微阵列芯片(microarray)能够在短时间内同时测定多个样本,实现所有已知 miRNA 表达谱的高通量分析^[7,14]。该方法即在一块芯片上同时固定多个与 miRNA 序列互补的探针,加入经过标记的样本 RNA 并杂交,最后进行信号检测。但微阵列芯片仍避免不了假阳性问题,杂交后的处理步骤中,洗涤条件不同对检测结果有很大的影响,故所得信息需要经过 PAGE/Northern blotting、real-time PCR 等技术加以确认方可^[15]。

1.4 实时定量 PCR

所谓实时定量 PCR(real-time PCR),是指在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量及定性分析的方法^[16]。与杂交方法相比,实时定量 PCR 可以高度灵敏地检测出低丰度表达的靶分子,并适用于高通量筛选^[17-18]。应用实时定量 PCR,既可定量检测 miRNA 前体又可检测成熟 miRNA 的表达水平,此外还经常用于验证预测的 miRNA,这对研究 miRNA 的表达调控具有重要的意义。根据生物体发育过程中不同阶段 miRNA 的表达差异可以准确地观察存在于 miRNA 基因转录水平或 Drosha 和 Dicer 作用过程的调控,从而可以更加深入地了解 miRNA 的起源和发生。由于实时定量 PCR 的高度敏感性(可检测出低至 100 ng 的样品),Tang 等利用该技术对单个人胚胎干细胞中 220 个 miRNA 的表达

收稿日期:2013-02-24

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAI01B03)。

作者简介:韦荣昌(1983—),男,广西梧州市,博士研究生,研究实习员,主要从事生药学研究。E-mail:wrc830612@163.com。

通信作者:马小军,博士,研究员,主要从事生药学研究。E-mail:xjma@public.bta.net.cn。

谱进行了考察^[19]。实时定量 PCR 的方法现已成为 miRNA 的定量检测的主要工具,一方面它与其他分子生物学技术相结合使定量极微量的 miRNA 基因表达成为可能;另一方面荧光标记核酸化学技术和寡核苷酸探针杂交技术的发展,使定量 PCR 技术有一个足够的基础为广大临床诊断实验室所接受,将有助于 miRNA 应用于临床诊断和治疗。

1.5 利用各种酶活性检测 miRNA

利用酶的不同功能巧妙地使其参与到检测过程中,可达到对 miRNA 的定量检测。目前,已有研究利用裂解酶^[20]、核酶^[21]、phi29DNA 聚合酶^[22-23]、T₄ DNA 连接酶^[24] 进行 miRNA 的检测。其中,裂解酶法是将与被检测目标结合的 DNA 序列改进行发卡结构,以防止 miRNA 前体等的干扰,增强检测特异性,2 个发卡结构末端序列与 RNA 杂交配对,其中 1 个发卡结构的突出序列在酶的工作切口处用 FAM 荧光染料修饰,而在不远处修饰淬灭染料,当发卡尾部序列与 RNA 完全匹配时,裂解酶就会切掉重叠部分,FAM 与淬灭染料分离并释放荧光,从而进行 miRNA 的定量检测。该法操作简便,对试验设备要求低,灵敏度高达 10⁴ 个 miRNA,可以通过退火温度控制杂交来提高检测的特异性^[25]。

1.6 新一代高通量测序

随着分子生物学技术的进步,454、MPSS 和 Solexa 等高通量测序技术的应用为各物种的 miRNA 鉴定与定量分析提供了良好的研究平台。高通量测序在检测 miRNA 方面具备很多优势,其中 Solexa 测序技术可同时检测上亿个核苷酸片段,且测定成本仅为常规毛细管电泳测序技术的 1% 左右,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、低成本的测序技术。在检测 miRNA 时,先将 miRNA 反转录生成 cDNA,再将 cDNA 连接到带有大量固定接头的 flow cell 上,然后使用桥式扩增得到大量的簇群,最后进行测序,一次试验可以读取长度为 17 ~ 35 nt 的 40 万 ~ 400 万条序列,因此可直接获得所有 miRNA 的序列信息。根据目标 miRNA 的出现频率可方便地计算其相对丰度^[26-27],实现 miRNA 的鉴定和定量分析的目的。Solexa 测序技术可以发掘、鉴定并定量出所有物种全基因组水平的 miRNA 图谱,是解密 miRNA 图谱的好方法。例如,有研究者应用 Solexa 测序技术分析了人胚胎干细胞分化前后的 miRNA 表达谱^[28]。2011 年,唐其等首次利用第二代高通量 Solexa 测序技术对罗汉果果实的转录组及授粉后 3、50、70 d 的表达谱进行高通量测序,获得了 43 891 条 Unigenes,其中与罗汉果次生代谢相关的 Unigenes 有 739 条,涉及萜类骨架合成的 Unigenes 有 60 条;利用转录组数据发现了罗汉果甜苷 V 生物合成通路中所有的基因,涉及到 20 种罗汉果苷骨架合成基因和 2 类结构修饰基因(细胞色素 P450 基因和糖基转移酶基因);此外,还得到了 80 条 P450 基因、72 条糖基转移酶基因和 90 条葡萄糖基转移酶基因的 Unigenes;结合表达谱筛选,获得了 6 条可能与罗汉果甜苷 V 合成相关的候选 UDPG 基因^[29]。转录组和表达谱的破解为罗汉果功能基因组以及甜苷 V 生物合成分子机理研究打下了坚实的基础。

2 miRNA 的生物信息学预测

随着各物种基因组序列及 EST 序列的获得,人们根据

miRNA 在进化过程中的保守性、其前体 pre-miRNA 具有茎环结构及其二级结构自由能最低等特征开发了一系列预测软件。其中, RNA fold 是一种预测 miRNA 二级结构的软件,通过计算 DNA/RNA 序列的最低自由能,结合二级结构图形化结果,确定该序列是否为形成 miRNA 的候选基因。Zhao 等用该方法预测了 14 个花生的新 miRNA^[30];Lai 等用 miRseeker 预测出 48 个果蝇的候选 miRNA,其中有 24 个已被试验所验证^[31];Lim 等通过 MirScan 软件,分别在人和线虫中鉴定了 38 个和 30 个新的 miRNA^[32-33];Grad 等利用 snarloop 软件已经预测了 214 个线虫的候选 miRNA^[34]。2009 年,miR-RACE 技术产生了,克服了生物信息学预测中无法确定 miRNA 两端精确序列的缺点,具有广泛的通用性。Yu 等利用该方法从 324 000 条苹果 EST 中预测了 31 个候选 miRNA,隶属于 16 个 miRNA 家族^[35]。

通过 miRNA 预测软件预测的大量候选基因中,只有少数已被试验验证,但那些没有被试验检测到表达的 miRNA,并非就一定假阳性结果,因为这些候选基因的表达模式可能尚未被人们所了解,或是现有的试验条件无法将其检测出来。

3 问题与展望

近年来,越来越多的 miRNA 被发现和鉴定,但无论在理论上还是在应用上,miRNA 的研究还仅仅是一个开端。为了有效地发现和鉴定更多的 miRNA,需要把试验技术和生物信息学方法结合起来。目前,功能注释较为完整的 mir-223 和 mir-375,都是试验技术和生物信息学方法完美结合的研究典范^[1,36]。试验技术可以提供直接而有力的证据,但在研究对象的选择上受到约束,不能很快对大量候选者进行逐个验证,而生物信息学为 miRNA 研究提供了有益的线索,可以指导试验的进行,但仍需通过试验技术加以确认^[37]。

随着新技术新方法的不断发展,人们在 miRNA 的检测方面有了更多的选择,但必须综合考虑具体的试验目的和各种方法的优缺点,以获得最佳而又最经济的试验结果^[38]。下一代高通量测序技术逐渐成为一种新的疾病诊断和新型生物医药制剂研发的工具,以调控机体生命活动的 miRNA 为靶点或以 miRNA 为治疗手段的设想,将可能成为研究热点。

参考文献:

- [1] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 226-230.
- [2] Ambros V, Lee R C. Identification of microRNAs and other tiny non-coding RNAs by cDNA cloning[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 265: 131-158.
- [3] Pfeffer S, Zavolan M, Grassl F A, et al. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. *Science*, 2004, 304(5671): 734-736.
- [4] Chen P Y, Manninga H, Slanchev K, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(11): 1288-1293.
- [5] Maniataki E, de Planell Sauer M D A, Mourelatos Z. Immunoprecipitation of microRNPs and directional cloning of microRNAs[J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 309: 283-294.
- [6] Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M. Identification of microRNAs

- of the herpesvirus family[J]. Nat Meth,2005,2(4):269-276.
- [7] Beuvink I, Kolb F A, Budach W, et al. A novel microarray approach reveals new tissue - specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs[J]. Nucleic Acids Res,2007,35(7):e52.
- [8] Sempere L F, Freemantle S, Pitha - Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain - expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation[J]. Genome Biol,2004,5(3):R13.
- [9] Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes[J]. Methods,2007,43(2):140-145.
- [10] Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes[J]. Nat Protoc,2008,3(2):190-196.
- [11] Kubota K, Ohashi A, Imachi H, et al. Improved in situ hybridization efficiency with locked - nucleic - acid - incorporated DNA probes[J]. Appl Environ Microbiol,2006,72(8):5311-5317.
- [12] Castoldi M, Benes V, Hentze M W, et al. miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid(LNA) oligonucleotide capture probes[J]. Methods,2007,43(2):146-152.
- [13] Stenvang J, Silahtaroglu A N, Lindow M, et al. The utility of LNA in microRNA - based cancer diagnostics and therapeutics[J]. Semin Cancer Biol,2008,18(2):89-102.
- [14] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. miChip: an array - based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes[J]. Nat Protoc,2008,3(2):321-329.
- [15] Liu C G, Calin G A, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome - wide microRNA profiling in human and mouse tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(26):9740-9744.
- [16] 欧阳松应, 杨冬, 欧阳红生, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学,2004,24(1):74-76.
- [17] Kersten S, Mandard S, Tan N S, et al. Characterization of the fasting - induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferators - activated receptor target gene[J]. J Biol Chem,2000,275(37):28488-28493.
- [18] Mandard S, Zandbergen F, Van Straten E, et al. The fasting - induced adipose factor/angiopoietin - like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity[J]. J Biol Chem,2006,281(2):934-944.
- [19] Tang F, Hajkova P, Barton S C, et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells[J]. Nucleic Acids Res,2006,34(2):e9.
- [20] Allawi H T, Dahlberg J E, Olson S, et al. Quantitation of microRNAs using a modified invader assay[J]. RNA,2004,10(7):1153-1611.
- [21] Hartig J S, Grune I. Sequence - specific detection of microRNAs by signal - amplifying ribozymes[J]. J Am Chem Soc,2004,126(3):722-723.
- [22] Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, et al. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection[J]. Science,1994,265(5181):2085-2088.
- [23] Cheng Y, Zang Z, Li Z, et al. Highly sensitive determination of microRNA using target - primed and branched rolling circle amplification[J]. Angew Chem Int Ed,2009,48(18):1-5.
- [24] Li J, Yao B, Huang H, et al. Real - time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem - loop probes ligation[J]. Anal Chem,2009,81(13):5446-5451.
- [25] 李娟, 王翔, 张有光. microRNA 检测方法的研究进展[J]. 合肥工业大学学报:自然科学版,2010,33(8):1234-1240.
- [26] Chen J, Lozach J, Garcia E W, et al. Highly sensitive and specific microRNA expression profiling using BeadArray technology[J]. Nucleic Acids Res,2008,36(14):e87.
- [27] 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.
- [28] Morin R D, O'Connor M D, Griffith M, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells[J]. Genome Res,2008,18(4):610-621.
- [29] Tang Q, Ma X J, Mo C M, et al. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenerii* triterpene biosynthetic genes by RNA - seq and digital gene expression analysis[J]. BMC Genomics,2011,12:343.
- [30] Zhao C Z, Xia H, Frazier T P, et al. Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. BMC Plant Biology,2010,10(1):3.
- [31] Lai E C, Tomancak P, Williams R W, et al. Computational identification of drosophila microRNA genes[J]. Genome Biol,2003,4(7):R42.
- [32] Lim L P, Lau N C, Weinstein E G, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genes Dev,2003,17(8):999-1008.
- [33] Lim L P, Glasner E, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes[J]. Science,2003,299(5612):1540.
- [34] Grad Y, Aach J, Hayes G D, et al. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs[J]. Mol Cell,2003,11(5):1253-1263.
- [35] Yu H, Song C, Jia Q, et al. Computational identification of microRNAs in apple expressed sequence tags and validation of their precise sequences by miR - RACE[J]. Physiol Plant,2010,141(1):56-70.
- [36] Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA - 223 and transcription factors NFI - A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis[J]. Cell,2005,123(5):819-831.
- [37] 王芳, 余佳, 张俊武. 小 RNA(MicroRNA) 研究方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2006,22(10):772-779.
- [38] 景花, 宋沁馨, 周国华. MicroRNA 定量检测方法的研究进展[J]. 遗传,2010,32(1):31-40.