

MicroRNA 检测方法的研究进展

任禹珂, 王超, 屈哲, 霍桂桃, 张頔, 杨艳伟, 王雪, 李波*, 林志*

中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心 药物非临床研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: MicroRNAs (miRNAs) 是一类内源性的小分子单链非编码RNA, 通过调节基因的表达在许多生命活动中起重要作用。在一些疾病(如癌症和自身免疫性疾病)发生时, miRNAs的表达谱可能发生改变, 所以在药物的安全性评价中, 其有望成为诊断或预后生物标志物。因此, 准确测定miRNA的表达对于其应用十分重要。对传统的RNA印记(Northern blotting)、微阵列(microarray)和实时定量PCR(qRT-PCR)以及一些新的miRNAs检测方法(如基于纳米材料的miRNAs检测、核酸扩增等技术)进行概述, 并阐述了这些方法的优缺点。

关键词: MicroRNA; RNA印记; 微阵列; 实时定量PCR; 核酸扩增技术

中图分类号: R915 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)08-1793-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.034

Research advances in detection of MicroRNA

REN Yuke, WANG Chao, QU Zhe, HUO Guitao, ZHANG Di, YANG Yanwei, WANG Xue, LI Bo, LIN Zhi

National Institutes for Food and Drug Control National Center for Safety Evaluation of Drugs, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a family of endogenous, small, single-stranded non-coding RNAs. Studies have shown that miRNAs play an important role in many life activities by regulating gene expression. In addition, the expression profile of miRNAs may change when some diseases (such as cancer and autoimmune diseases) occur, miRNAs are expected to become diagnostic or prognostic biomarkers in safety evaluation of drugs. Therefore, accurate detection of miRNA expression is very important for its application. The traditional methods of Northern blotting, microarray, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and some new methods of miRNAs detection, such as nanomaterial based miRNAs detection and nucleic acid amplification, are reviewed, and the advantages and disadvantages of these methods are described.

Key words: MicroRNA; Northern blotting; microarray; qRT-PCR; nucleic acid amplification technology

MicroRNAs (miRNAs) 是一类内源性单链非编码RNA, 长度为18~22个核苷酸, 广泛存在于动物、植物和一些病毒等真核生物中, 可以在mRNA水平对基因表达进行负调控^[1]。1993年, 研究人员在线虫中发现了第一个miRNA——lin4, 目前miRBase中已经对2 675个miRNAs进行了注释^[2]。大多数成熟的miRNA序列位于非编码RNA的内含子或外显子以及pre-mRNA的内含子中^[3]。

由于miRNAs在调节基因表达中有重要作用, 所以异常的miRNAs表达可以作为多种疾病的生物标志物, 如神经退行性疾病、糖尿病、心血管疾病,

甚至是免疫性疾病。miRNAs在癌症中的作用引起了研究者广泛关注, 并且被证明可以作为癌症诊断、转移、化疗耐药和预后的生物标志物^[4]。随着生物技术药物的广泛开发和使用, 一些药物由于其免疫原性带来了一系列不可预测的免疫毒性, 人用药品技术要求国际协调理事会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)针对临床前药物的免疫毒性评价制定了相应的指导原则, 但不涵盖药物诱导的自身免疫毒性。因此, 在药物临床前安全性评价中, 药源性自身免疫毒性生物标志物的

收稿日期: 2020-12-11

基金项目: “十三五”国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017-001)

第一作者: 任禹珂, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: 15670988944 E-mail: 15670988944@163.com

*共同通信作者: 李波, 男, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)53851706 E-mail: libo@nifdc.org.cn

林志, 女, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)67872233 E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

研究成为关注的重点。近年来,越来越多的研究证明 miRNA 异常表达与药物诱导的自身免疫密切相关^[5],有望成为药物临床前安全性评价中药源性自身免疫毒性的生物标志物或自身免疫性疾病的治疗靶点。考虑到 miRNAs 在基因调控和生物功能以及疾病中的重要作用,对 miRNAs 进行特异性和灵敏性的检测越来越重要。然而,由于成熟的 miRNAs 片段小,没有 poly(A)尾,同一家族的 miRNAs 通常只有 1 个碱基不同;除此之外,每个细胞中拷贝数具有极大的变异性等这些特征都是对 miRNAs 进行特异性检测时所面临的挑战^[6]。

学界为研究 miRNAs 的检测方法付出了巨大努力,目前已经有很多方法可以用来检测 miRNAs,并且这些方法不断改进,推动了 miRNAs 的深入研究。本文将从传统的检测方法和新的检测技术 2 个方面进行综述,并讨论这些方法的优势和限制性。

1 传统的检测方法

在传统的 miRNAs 检测方法中,RNA 印迹(Northern blotting)是分析 miRNAs 表达最早的尝试方法,这种基于探针杂交技术的方法特异性和灵敏度不高、耗时,且需要大量的 RNA 样本。目前,研究者对这种方法进行了改进,大大提高了其特异性和灵敏度。实时定量 PCR (quantitative real time-PCR, qRT-PCR)因为较好的灵敏度和特异性,并且可以获取特定组织或患者来源样本的全 miRNAs 表达谱,被认为是 miRNAs 检测的金标准,经常被用来验证全基因组筛选方法的结果,以及筛选临床相关的 miRNAs 亚群^[7]。然而,由于成熟的 miRNAs 序列短,无法像 mRNA 那样按常规方法设计引物进行逆转录和扩增,所以,科研工作者对传统的 qRT-PCR 方法进行了改进,目前主要有加尾法和茎环法 2 种方法。除此之外,微阵列(microarray)也是一种经典方法,可以对 miRNAs 进行快速、高通量检测,但由于 miRNAs 一些自身的特性,这种方法的灵敏度和特异性也受到了限制,而在此基础上发展的微球杂交技术、各种核苷酸类似物可以克服这些缺点。

1.1 RNA 印迹

RNA 印迹是一种经典的基于探针杂交技术的 miRNAs 检测方法,不仅可以用来检测成熟的 miRNAs,也可以检测其前体。RNA 印迹是一种分子杂交和凝胶电泳结合的方法。首先, RNA 样本被核酸内切酶消化,进行琼脂糖凝胶或脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离变性后,转移至硝化纤维素膜或尼龙膜上,然后使 miRNAs 与同位素等标记的探针(通常

是 ³²P 标记的 DNA 探针)杂交,洗去多余的探针后成像分析^[8]。还可以先将探针固定在载体膜上,然后与经过标记的 miRNAs 杂交后进行信号检测。RNA 印迹法不需要扩增,在检测过程中序列中的碱基不发生改变,也不被修饰,所以其结果比较可靠。但是,和其他检测方法相比,RNA 印迹法有很多缺点,如灵敏度低(检测限为 nmol/L~pmol/L)、低通量、检测需要大量的 RNA 样本、只能对 miRNAs 进行半定量,并且实验过程中 RNA 易降解。

为了克服经典的 RNA 印迹法的缺点,科研工作者进行了各种改进,如探针标记检测、探针设计和 RNA 与膜的交联方法。Válóczi 等^[9]使用类寡核苷酸衍生物锁核酸(locked nucleic acid, LNA)探针代替传统的 DNA 探针,使 RNA 印迹法的灵敏度提高了约 10 倍,并且特异性得到了显著改善。由于 miRNA 的相对分子质量小,而传统的 RNA 与膜交联的紫外(UV)法适用于长度大于 70 nt 的 RNA,所以这种交联方法并不适用于 miRNAs, Pall 等^[10]使用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二酰亚胺(EDC)将 RNA 交联到合适的膜上,这种交联方法使检测灵敏度比 UV 交联法提高了 30 倍。

为了避免同位素标记对科研工作者的伤害, Huang 等^[11]和 Kim 等^[12]分别发明了生物素和地高辛(DIG)标记的探针来检测 miRNAs。同时 Kim 等^[12]报道使用 EDC 将 RNA 交联于膜上,然后再与 DIG 标记的 LNA 杂交法仅需 0.05 fmol/L RNA,且大大提高了检测的灵敏度。虽然 RNA 印迹法耗时,所需 RNA 量大,且灵敏度和特异性低,但可以检测 miRNAs 和与其序列相同的分子,如 pre-miRNAs 和成熟的 miRNAs,所以现在仍是不可替代的方法。

1.2 微阵列

微阵列芯片技术的原理与 RNA 印迹相似,也是基于目标 miRNAs 分子与其互补探针的核酸杂交。基本步骤是将已知序列的 DNA 探针固定在尼龙膜或玻璃等固体表面,然后靶 miRNAs 分子与互补的 DNA 探针杂交产生特异性信号。这种方法可以同时检测多个 RNA 样本,实现 miRNAs 的高通量检测,且检测速度较快。但是,由于 miRNAs 样本量少,序列短并且同家族的 miRNAs 序列极相似,导致此方法灵敏度和选择性低、价格高昂、探针和靶 miRNAs 杂交成双链的解链温度(T_m)较低,增加了错配的几率^[13]。为了提高微阵列的敏感性和特异性,针对探针的设计和 miRNAs 分子的标记对该方法进行了不断的改进。

由于所有的靶序列都要在同一微阵列芯片上检测,所以要求杂交条件相同,但是,因为miRNAs的 T_m 范围广,很难有适用于所有靶miRNAs的 T_m 的标准化DNA核苷酸探针。为了解决这一问题,Castoldi等^[14]使用了LNA修饰的捕获探针将 T_m 标准化,同时改善了微阵列技术的特异性以及对碱基错配的区别能力。除此之外,用2'-O-2(甲氧乙基)修饰的核酸类似物^[15],或在探针的5'端连接发卡结构^[16],都能很好地改善微阵列技术捕获探针 T_m 的标准化或杂交的特异性。Fang等^[17]报道了基于纳米金标记技术的微阵列方法,即使用标记纳米金的核酸探针与加了poly(A)尾的miRNAs杂交,然后通过表面等离子体共振成像(surface plasmon resonance imaging, SPRI)技术和表面聚合反应对miRNAs进行定量检测。

最初应用于微阵列中miRNAs标记的是放射性同位素,随后被其他方法所代替,最常用的miRNAs标记方法是酶标记miRNAs和化学标记方法。酶标记miRNA主要包括2种方法:1种是通过T4连接酶将荧光标记的核苷酸或寡核苷酸连接在miRNAs的3'-OH上^[18];另外1种方法是先用聚腺苷酸聚合酶(polyadenylate polymerase, PAP)在miRNAs的3'-OH加上poly(A)尾巴,然后具有互补poly(T)的寡核苷酸会将miRNAs的3'-OH与另一标记的寡核苷酸的5'端链接,这种方法可以避免环化,但是由于可以加上多个腺苷核糖核苷酸,所以不利于后续的杂交反应^[13]。化学标记法主要是基于烷基化的标记和基于与核酸的铂配位的化学方法^[19]。由于miRNAs标记增加了微阵列技术的复杂性,为了简化操作,使微阵列方法更可信、应用范围更广, Lee等^[20]报道了1种不需要标记miRNAs的方法——使用生物素标记的结构特异性RNA结合蛋白(PAZ-dsRBD)识别微阵列芯片捕获的靶miRNAs。

1.3 qRT-PCR

qRT-PCR一般包括2个步骤,即先将靶miRNAs逆转录为cDNA,然后cDNA作为模板进行普通的实时荧光定量PCR。qRT-PCR是miRNAs检测技术的金标准,因为其具有灵敏度高、高序列特异性等特点,所需样本量较少,且费用相对较低。但是,由于miRNAs序列很短,仅为1条引物的长度,所以常规的引物设计并不适用于miRNAs的逆转录。为了解决这个问题,研究人员建立了加尾法和茎环(stem-loop)法的miRNA检测方法。

加尾法通常有2种方法:第1种是利用聚腺苷

酸聚合酶(polyadenylate polymerase, PAP)在miRNAs分子的3'端加上poly(A)尾巴,然后再用5'端为poly(T)的通用逆转录引物进行逆转录。PAP可以延伸所有的miRNAs,包括pri/pre-miRNAs,所以特异性较差;第2种方法是利用T4连接酶在样本中所有的miRNAs末端加共有序列,然后使用通用引物进行逆转录。茎环法利用茎-环状探针引物与成熟的miRNAs 3'端结合,逆转录为互补的cDNA,然后进行扩增,这种方法特异性高,可以识别序列高度相似的同一家族的miRNAs^[13]。cDNA合成后,接着进行qPCR,通常采用的信号检测荧光系统主要有SYBR Green 荧光染料法和TaqMan 探针法。当SYBR Green 染料插入PCR的产物——双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)时,荧光增强800~1 000倍。然而,因为SYBR Green与所有的dsDNA都结合,所以这种方法最大的缺点就是不能识别非特异性产物,与引物二聚体或DNA污染引起的非特异性产物反应产生假阳性信号,影响qPCR结果的准确性^[21]。TaqMan探针是1种5'末端标记报告基团,3'末端标记荧光淬灭基团的寡核苷酸探针,其结合位点在2个引物之间。此方法中,引物二聚体或其他非特异性扩增产物将不会产生任何荧光信号,比SYBR Green方法具有更高的特异性和可重复性,并且有很高的灵敏度,但是需要针对每个miRNAs设计探针^[22]。由此可见,SYBR Green染料法成本低,但特异性差;而TaqMan探针法特异性和灵敏度高,但成本也相对较高。目前,使用茎-环逆转录引物逆转录后再通过TaqMan探针进行qPCR通常被认为是miRNAs检测的“金标准”。

虽然qRT-PCR相对于RNA印迹和微阵列法其灵敏度和特异性都有很大的优势,但是在实验过程中可能出现假阳性结果,并且引物设计也是一大挑战,这些缺点限制了其应用。但是,作为miRNAs检测最常用的方法,科研工作者也在不断地对这种方法进行改进。Mouritzen等^[23]通过在茎-环状反转录引物中引入1段与通用探针库(Universal probe library, UPL)探针反向互补的序列,降低了检测成本。Tang等^[24]在Stem-lop qRT-PCR的基础上建立了多重Stem-lop qRT-PCR法,实现了更高通量和灵敏度的检测。

从数字PCR(digital PCR, dPCR)发展而来的微滴式数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)与传统的qPCR相比,在检测cDNA时更加灵敏,且准确度更高。1992年,有人提出了1种利用有限稀释、PCR

和泊松分布原理对样本中初始靶标分子总数进行定量的方法,将样本进行梯度稀释,使每个孔中只包含至多1个待检测核酸靶分子,经PCR扩增后的荧光信号确定起始分子的数量,以终点信号的“有或无”作为定量方法,这是“数字PCR”的雏形;1999年,Vogelstein团队使用1种基于微孔板的技术,将样品进行极限稀释来检测罕见的序列,从而提出了dPCR的概念^[25]。利用油包水微滴生成技术开发的ddPCR是最早的相对成熟的dPCR技术,在传统的扩增前对含有核酸的样品进行微滴化处理,每个微滴中不含或包含1个至数个待检测的核酸靶分子,经PCR扩增后逐个检测微滴的荧光信号:1表示有荧光信号,0表示没有荧光信号,然后再根据泊松分布原理和阳性微滴的数量和比例计算核酸分子的起始拷贝数或浓度^[26]。ddPCR是1种绝对定量的方法,由于对核酸体系进行了微滴化处理,且不依赖标准曲线以及阈值和内参基因,所以灵敏度和精确度得到了极大改善;除此之外,由于微滴化将PCR抑制剂进行了稀释,所以无需考虑PCR扩增效率的影响。利用ddPCR建立了1种可以检测极低丰度miRNAs的方法,在这种方法中,探针A和B分别与靶miRNAs的3'和5'端互补杂交后在T4 RNA连接酶2的催化下连接,随后连接产物和PCR反应体系被微滴化成油包水液滴,最后经PCR扩增并检测荧光信号^[27]。利用这种方法可以对单细胞中的miRNAs进行定量,甚至可以区分仅有1个碱基差异的let-7家族中的miRNAs。

2 新的检测方法

虽然传统的miRNAs检测方法在被不断地改进,但同时科研工作者也致力于发展新的检测方法,以期在提高miRNAs检测的灵敏度、特异性的同时,具有更高的检测通量、减少样本的使用量、简化操作步骤,以及降低实验成本,以便更好地对miRNAs进行研究。

2.1 基于纳米材料的miRNAs检测

由于特有的光电特性、尺寸效应、表面效应以及化学稳定性,越来越多的纳米材料被应用于miRNAs检测研究中,例如纳米金颗粒(AuNPs)、银纳米簇(AgNCs)、磁性纳米粒子和量子点(QDs)等^[8]。在基于AuNPs的比色分析中,AuNPs在感应基板与靶捕获探针通过Au-S键结合时起重要作用,随着AuNPs的聚集,溶液从红色变为紫色,这是进行光学检测的基础^[28]。随后,Persano等^[29]基于等温切口酶扩增反应以及扩增产物与AuNPs和磁性纳

米粒子的杂交,建立了新的基于比色的miRNAs检测技术,该法可以特异性地检测生物样本中的miRNAs,并且具有更高的灵敏度。Li等^[30]报道了通过等温指数扩增反应结合AuNPs扩增的超灵敏miRNAs检测方法。

利用QDs和AgNCs突出的荧光发射特性可以更加灵敏的检测miRNAs,有人利用指数扩增反应(exponential amplification reaction, EXPAR)和滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)开发了基于量子点的miRNA检测方法^[31]。作为1种新的信号传感器,AgNCs具有高生物相容性、良好的光稳定性等特点,在接近富含鸟嘌呤的序列后,荧光可以增强500倍,这与AuNPs不同,即DNA-AgNCs可以避免AgNCs与量子点等指标之间的共价连接^[32]。虽然AuNPs和AgNCs等具有诸多优势,但其存在的细胞毒性和活细胞内的自聚集仍限制了其使用。

纳米铜粒子(copper nanoparticles, CuNPs)没有毒性,有更好的生物相容性,并且其合成快速简便,所以优于AuNPs和AgNCs。随后,Park等^[33]结合靶辅助等温指数扩增技术(target-assisted isothermal exponential amplification, TAIEA)和聚胸腺嘧啶模板荧光CuNPs为信号探针,设计了1种快速、超灵敏的miRNAs检测方法。

除了上述应用于miRNAs检测的纳米材料,目前,碳纳米材料如石墨烯和碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)在miRNAs检测中也被广泛应用,而石墨烯氧化物(graphene oxide, GO)有较好的水溶性,克服了一般元素碳溶解性较差的问题,所以有研究者考虑将GO用于miRNAs检测生物传感器的设计^[34]。除此之外,还有一些纳米颗粒复合物如TiO₂- α -Fe₂O₃异质结和NCS/Mo₂C纳米复合物也被用于miRNAs的检测^[8]。

2.2 核酸扩增技术

由于一些miRNAs在组织或细胞中的含量很低,所以需要对其进行核酸扩增以便进行后续检测。与传统的PCR法相比,基于核酸扩增技术的检测方法灵敏度更高,尤其是快速发展的等温核酸扩增技术,不需要精确的温度条件,摆脱了对精密设备的依赖,操作也更加简便。很多核酸扩增技术已经得到了应用,如滚环扩增法(rolling circle amplification, RCA)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、指数扩增(exponential amplification reaction, EXPAR)、链

替代扩增(strand displacement amplification, SDA)以及不需要酶的扩增等^[35]。同时利用SYBR Green 荧光染料和TaqMan 探针则可以对miRNAs 进行实时检测。

2.2.1 滚环扩增法 在基于RCA 的miRNAs 检测中,首先要设计1个闭锁(Padlock)探针,其3'和5'端序列分别与作为连接模板的靶miRNAs 中的2段相邻的序列互补,闭锁探针与靶miRNAs 杂交后,T4 DNA 连接酶将闭锁探针两末端连接成环,随后以miRNAs 自身作为引物进行扩增,扩增产物中包含靶miRNAs 序列,然后通过荧光、电化学等技术进行信号检测^[36]。该法有很好的灵敏度和特异性,简单快捷,可以定量分析ng 级总RNA 中的miRNAs,所以很多科研团队在此基础上建立了快速灵敏的miRNAs 检测方法。Yang 等^[37]建立了1种基于金电极上多组分核酸酶介导的滚环扩增的电化学方法,Hong 等^[38]提出结合了RCA、GO 和荧光标记肽核酸(fluorescently labeled peptide nucleic acid, F-PNA)的miRNAs 定量检测方法。除此之外,在RAC 过程中使用内切核酸酶(nicking endonucleases)也提高了miRNAs 检测的敏感性和特异性。

2.2.2 等温指数扩增方法 另一种在检测miRNAs 时具有优势的等温指数扩增方法是LAMP,使用4个不同的探针同时识别6个不同的靶序列,大大增加了方法的选择性和特异性,常用于DNA 和RNA 的扩增。在这种方法中,miRNAs 作为触发器诱发引物在DNA 聚合酶和有链置换活性的Bst DNA 聚合酶的作用下进行延伸^[39]。LAMP 模板中包含4~6个可形成茎环结构的序列,进行协同杂交或多个引物同时沿着模板扩增会降低这种方法的敏感性,因此探针的设计十分困难。Sun 等^[40]提出了用1个茎环模板DNA 和茎环引物代替较长的模板,因而简化了探针的设计。LAMP 反应结束后,通常使用焦磷酸酶沉淀检测,荧光检测(SYBR Green I 染料)和凝胶电泳对扩增产物进行检测,但这些检测方法不能特异性地区分产物,所以会造成结果的假阳性,而Jiang 等^[41]通过使用一步链置换报告基因克服了这一难题。

2.2.3 其他方法 除了上述的基于RAC 和LAMP 等需要酶参与的核酸扩增技术已被广泛应用外,还有许多基于杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR),催化发夹组装(catalytic hairpin assembly, CHA)和熵驱动催化的无酶等温扩增技

术^[8]也逐渐发展起来。为了使核酸扩增技术在检测miRNAs 时更加具有优势,研究人员通常结合几种扩增技术,这些扩增技术结合的方法可以对痕量的靶分子进行扩增,以此来提高灵敏度。Tian 等^[42]通过将RCA 和LAMP 两种方法结合从而建立了1种快速和超灵敏的检测方法;SDA 和RCA 的结合,避免了使用传统的标记和酶,是1种无标记扩增技术,简化了检测程序,节约了成本^[43]。此外,核酸扩增技术也成功地与一些灵敏度差的技术(如RNA 印迹或原位杂交技术)结合,或者与纳米技术以及电化学传感器或其他生物传感器结合,优化了检测条件,降低了检测时的背景噪声。

随着miRNA 检测技术的不断发展,已经有成熟的检测技术用于疾病相关miRNA 的检测。疾病发生时,miRNA 表达谱通常会发生改变,微阵列可以比较正常和疾病组织中miRNAs 的表达水平,发现异常表达的miRNAs。Mashimo 等^[44]和Zhou 等^[45]分别将改进的RCA 技术应用于健康人肺组织RNA 中miRNA 的检测以及结肠肿瘤相关miRNA 的检测。miR-21 在急性肾损伤以及急性心肌梗死的发病机制中起重要的作用,Li 等^[46]利用分子信标作为捕获探针,同时使用镧系纳米荧光用于miR-21 的检测,提高了检测的灵敏度。

3 结语

在多种人类疾病中,miRNAs 的表达模式都发生了改变,包括心血管疾病、癌症、代谢性疾病等,miRNAs 表达的异常参与了疾病的进展。在心血管疾病中,肌细胞纤维化时,miR-21 表达上调,最终导致心肌肥大^[47],miR-143/145 家族下调导致高血压和心力衰竭^[48]。miR-155 作为致癌基因参与了癌症的发生,miR-17~92 家族在多种癌症中表达上调^[49]。由于miRNA 的表达和调控与疾病密切相关,所以miRNA 可以用来治疗疾病(miRNA mimics)或作为治疗的靶点(anti-miRs),如使用miR-34 mimics 治疗肿瘤已经进入了1期临床试验^[50]。除此之外,一些组织特异性的miRNA 可以作为药物安全性评价或临床上特定组织相关疾病的潜在诊断和预后标志物。

无论在人体正常的生长发育还是多种疾病的发生发展过程中,miRNAs 都发挥重要的调节作用,所以,对传统的miRNAs 检测方法进行改善或建立新的检测技术以便更好地研究miRNAs 就显得尤为重要。本文主要对几种传统的miRNAs 检测技术和近些年逐渐发展的一些新的技术方法进行了简要

的介绍,每种方法都有其各自的优缺点。RNA印迹、微阵列和qRT-PCR等传统的miRNAs检测方法仍然是被广泛使用的方法,尤其是qRT-PCR更被认为是miRNAs检测的“金标准”。但是,这些技术存在的缺点,如试剂盒灵敏度的差异、不可避免的假阳性结果、耗时、对仪器设备要求较高等都不能满足对miRNAs更深入的研究,也无法适应临床检测的需求。所以,针对这些缺点,研究者不断对这些传统的检测方法进行改善,并致力于研究开发新的检测方法。虽然上文中提到的基于纳米技术、核酸扩增技术等miRNAs检测方法克服了传统的检测方法的一些缺点,但是仍存在一些问题需要研究者共同解决。目前,为了平衡这些方法的优缺点,已经建立了这些方法结合的检测技术,以期更好地研究miRNA,并将其运用于医药实践中。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Saliminejad K, Khorshid H K, Fard S S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [3] Kalla R, Ventham N T, Kennedy N A, et al. MicroRNAs: new players in IBD [J]. *Gut*, 2015, 64(3): 504-517.
- [4] Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska M A. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology [J]. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(3): 273-284.
- [5] Chen J Q, Papp G, Szodoray P, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(12): 1171-1180.
- [6] Huang Y, Zou Q, Wang S P, et al. The discovery approaches and detection methods of microRNAs [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(6): 4125-4135.
- [7] Goswami R S, Waldron L, Machado J, et al. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 47.
- [8] Ye J, Xu M, Tian X, et al. Research advances in the detection of miRNA [J]. *Pharm Anal*, 2019, 9(4): 217-226.
- [9] Válóczy A, Hornyik C, Varga N, et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(22): e175.
- [10] Pall G S, Hamilton A J. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1077-1084.
- [11] Huang Q, Mao Z, Li S, et al. A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting [J]. *Rice (N Y)*, 2014, 7(1): 26.
- [12] Kim S W, Li Z, Moore P S, et al. A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(7): e98.
- [13] Dong H, Lei J, Ding L, et al. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis [J]. *Chem Rev*, 2013, 113(8): 6207-6233.
- [14] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA) [J]. *RNA*, 2006, 12(5): 913-920.
- [15] 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.
- [16] Wang H, Ach R A, Curry B. Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA [J]. *RNA*, 2007, 13(1): 151-159.
- [17] Fang S, Lee H J, Wark A W, et al. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions [J]. *Am Chem Soc*, 2006, 128(43): 14044-14046.
- [18] Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394(4): 1117-1124.
- [19] Pritchard C C, Cheng H H, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(5): 358-369.
- [20] Lee J M, Cho H, Jung Y. Fabrication of a structure-specific RNA binder for array detection of label-free microRNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(46): 8662-8665.
- [21] 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.
- [22] Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Mirab S S, et al. Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3665-3674.
- [23] Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen P S, et al. Probe Library: A new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(4): 313-316.
- [24] 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.
- [25] Perkins G, Lu H, Garlan F, et al. Droplet-based digital

- PCR: application in cancer research [J]. *Adv Clin Chem*, 2017, 79: 43-91.
- [26] Quan P L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review [J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(4): 1271.
- [27] Cheng Y, Dong L, Zhang J, et al. Recent advances in microRNA detection [J]. *Analyst*, 2018, 143(8): 1758-1774.
- [28] Borghei Y S, Hosseini M, Ganjali M R. Oxidase-like catalytic activity of Cys-AuNCs upon visible light irradiation and its application for visual miRNA detection, *Sens [J]. Actuators B Chem*, 2018, 273: 1618-1626.
- [29] Persano S, Guevara M L, Wolfram J, et al. Label-free isothermal amplification assay for specific and highly sensitive colorimetric miRNA detection [J]. *ACS Omega*, 2016, 1(3): 448-455.
- [30] Li R D, Yin B C, Ye B C. Ultrasensitive, colorimetric detection of microRNAs based on isothermal exponential amplification reaction-assisted gold nanoparticle amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 1011-1016.
- [31] Degliangeli F, Pompa P P, Fiammengo R. Nanotechnology-based strategies for the detection and quantification of microRNA [J]. *Chemistry*, 2014, 20(31): 9476-9492.
- [32] Yeh H C, Sharma J, Werner J H, et al. A fluorescence light-up Ag nanocluster probe that discriminates single-nucleotide variants by emission color [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(28): 11550-11558.
- [33] Park K W, Batule B S, Kang K S, et al. Rapid and ultrasensitive detection of microRNA by target-assisted isothermal exponential amplification coupled with poly (thymine)-templated fluorescent copper nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2016, 27(42): 425502.
- [34] Jacobs C B, Peairs M J, Venton B J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(2): 105-127.
- [35] Gudnason H, Dufva M, Bang D D, et al. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(19): e127.
- [36] 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.
- [37] Yang J, Tang M, Diao M, et al. Electrochemical strategy for ultrasensitive detection of microRNA based on MNazyme-mediated rolling circle amplification on a gold electrode [J]. *Microchim*, 2016, 183(8): 3061-3067.
- [38] Hong C, Baek A, Hah S S, et al. Fluorometric detection of MicroRNA using isothermal gene amplification and graphene oxide [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(6): 2999-3003.
- [39] Li C, Li Z, Jia H, et al. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(9): 2595-2597.
- [40] Sun Y, Tian H, Liu C, et al. One-step detection of microRNA with high sensitivity and specificity via target-triggered loop-mediated isothermal amplification (TT-LAMP) [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(80): 11040-11043.
- [41] Jiang Y S, Bhadra S, Li B, et al. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(6): 3314-3320.
- [42] Tian W, Li P, He W, et al. Rolling circle extension-actuated loop-mediated isothermal amplification (RCA-LAMP) for ultrasensitive detection of microRNAs [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 128: 17-22.
- [43] Zheng X, Niu L, Wei D, et al. Label-free detection of microRNA based on coupling multiple isothermal amplification techniques [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35982.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Li X, Zhou S, Lu S, et al. Lanthanide metal-organic framework nanoprobe for the *in vitro* detection of cardiac disease markers [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(47): 43989-43995.
- [47] Reddy, S, Hu, D Q, Zhao M, et al. miR-21 is associated with fibrosis and right ventricular failure [J]. *Clin Investig Insight*, 2017, 2(9): 1-14.
- [48] Zhao W, Zhao S P, Zhao Y H. MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 531740-531749.
- [49] Zhu Y, Gu J, Li Y, et al. MiR-17-5p enhances pancreatic cancer proliferation by altering cell cycle profiles via disruption of RBL2/E2F4-repressing complexes [J]. *Cancer Lett*, 2018, 412: 59-68.
- [50] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222.