

核酸检测：DNA与 microRNA分析方法

HESUAN JIANCE: DNA YU
microRNA FENXI FANGFA

鞠焜先 董海峰 张学记◎ 著



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

核酸检测：DNA与 microRNA分析方法

HESUAN JIANCE: DNA YU
microRNA FENXI FANGFA



鞠焜先 董海峰 张学记◎ 著



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

图书在版编目 (CIP) 数据

核酸检测: DNA 与 microRNA 分析方法/鞠焜先, 董海峰, 张学记著. —北京: 知识产权出版社, 2015.12

ISBN 978-7-5130-3512-5

I. ①核… II. ①鞠… ②董… ③张… III. ①脱氧核糖核酸—检测—研究
②核糖核酸—检测—研究 IV. ①Q523②Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 144285 号

内容提要

本书以新型核酸检测方法为主线, 分析了近年来 DNA 生物传感及 miRNA 分析检测的现状。以生物传感信号进行分类, 介绍电化学、电化学发光、荧光光谱学、化学发光成像及激光共聚焦细胞成像等手段在胞外的 DNA、miRNA 检测, 到细胞内 miRNA 检测及调控等方面的应用。重点分析了纳米技术、化学生物学技术及信号放大策略在核酸生物传感中的应用。总结了 DNA 和 miRNA 分析检测的发展趋势及面临的问题。

责任编辑: 张 琰

核酸检测: DNA 与 microRNA 分析方法

鞠焜先 董海峰 张学记 著

出版发行: 知识产权出版社 有限责任公司 网 址: <http://www.ipph.cn>

电 话: 010-82004826

<http://www.laichushu.com>

社 址: 北京市海淀区马甸南村 1 号

邮 编: 100088

责编电话: 010-82000860 转 8540

责编邮箱: riantjade@sina.com

发行电话: 010-82000860 转 8101/8102

发行传真: 010-82000893/82003279

印 刷: 北京嘉恒彩色印刷有限责任公司

经 销: 各大网上书店、新华书店及相关专业书店

开 本: 720mm×1000mm 1/16

印 张: 14

版 次: 2015 年 12 月第 1 版

印 次: 2015 年 12 月第 1 次印刷

字 数: 242 千字

定 价: 45.00 元

ISBN 978-7-5130-3512-5

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题, 本社负责调换。

前 言

随着人类基因组计划的完成、功能基因研究的深入,基因诊断已成为分子生物学和生物医学的重要研究领域。核酸主要分为脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。脱氧核糖核酸作为一种遗传微粒,包含几乎所有蛋白质和RNA分子的遗传信息,可组成遗传指令,以引导生物发育与生命机能运作。一切生命体,如细胞、生命组织、细菌、病毒和病菌等均具有独特的核酸序列,核酸碱基的突变和蛋白质浓度异常表达是疾病发生的重要因素。这些特定序列的检测在基因分析、疾病诊断、食品污染、法医鉴定和环境监测等领域起着重要作用。DNA生物传感器作为一种利用核酸碱基配对原则进行识别,能实现基因片段持续、快速、灵敏和选择性检测的新方法,近年来发展非常迅速。

miRNA(microRNA)是一类18~25个碱基的内源性非编码单链小分子RNA,它作为一种调控因子,在很多生物过程及疾病中起着重要的调控作用。在人类基因组中,目前已发现超过2500种miRNA(miRBase 20: <http://www.mirbase.org/>)。miRNA在生物发育、脂肪代谢、细胞分化和凋亡等生命过程中发挥着巨大作用。Friedman等预言miRNA可能参与调控大于60%的人类编码基因的蛋白表达。miRNA的表达水平与人类的很多复杂的疾病,尤其是癌症,密切相关。但由于miRNA序列短,同家族miRNA之间有很强的序列相似性,细胞内表达丰度低及容易降解等特点,miRNA检测在灵敏度、特异性等方面面临重大的挑战。发展良好的miRNA分析检测技术对了解miRNA的生物功能,利用miRNA进行疾病诊断、基因药物开发及治疗等尤为关键。

核酸检测所涉及的面很广,发展非常迅速,要覆盖此领域所有内容不易。本书以南京大学生命分析化学国家重点实验室鞠熷先教授课题组近年来在新型核酸检测领域所做的一系列创新性的工作为基础,围绕董海峰教授全国优博提名论文“DNA检测与细胞内miRNA分析新方法研究”及其在北京科技大学张学记教授课题组做博士后期间的研究为主线展开,以点带面,分析了近年来DNA生物传

感及 miRNA 分析检测的现状；以生物传感信号进行分类，介绍电化学、电化学发光、荧光光谱学、化学发光成像及激光共聚焦细胞成像等技术在胞外 DNA、miRNA 检测，到细胞内 miRNA 检测及调控等方面的应用；重点分析了纳米技术、化学生物学技术及信号放大策略在核酸生物传感中的应用；总结了 DNA 和 miRNA 分析检测的发展趋势及面临的问题。

参与本书所涉及科研工作的还有南京大学生命分析化学国家重点实验室雷建平教授，鞠焄先课题组的部分研究生，如叶永康、赵洪桃、高丰雷、纪含旭、邓盛元、高文超、朱珠、程艳、刘琳，以及北京科技大学北京市生物工程与传感技术重点实验室的部分专家，在此对他们的贡献表示感谢。在本书出版之际，我们要感谢国家自然科学基金委员会对相关研究工作给予的资助，感谢知识产权出版社的支持。

由于水平有限，经验不足，且该领域发展迅速，不妥之处在所难免，恳请读者批评指正，不胜感激。

鞠焄先 董海峰 张学记

目 录

第 1 章 绪 论	1
1.1 DNA 生物传感	1
1.2 miRNA 分析	8
1.3 DNA 和 miRNA 分析方法的发展趋势	13
第 2 章 核酸检测中的纳米探针与信号放大技术	18
2.1 纳米探针	18
2.2 核酸放大技术	25
第 3 章 DNA 电化学生物传感器	34
3.1 多壁碳纳米管丝网印刷电极上的单链 DNA 检测	34
3.2 基于长程电子传递的 DNA 直接电化学检测	39
第 4 章 杂交指示剂作为识别元件的电化学 DNA 传感器	43
4.1 $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$ 为电活性指示剂的 HBV DNA 传感器	43
4.2 耐尔蓝为电活性指示剂的 DNA 杂交传感	47
4.3 以二茂铁标记的 HBV DNA 杂交传感器	55
第 5 章 纳米探针用于 DNA 电化学检测	64
5.1 基于链酶亲和素功能化碳纳米管的超灵敏 DNA 电化学传感器	64
5.2 石墨烯/DNA/纳米金杂化材料和多酶微球用于 DNA 电化学 传感	70
5.3 量子点标记微球的组装及其超灵敏 DNA 电化学传感	74
5.4 电致化学发光分析法检测 DNA	80

第 6 章	核酸放大技术在 DNA 电化学传感器中的应用	91
6.1	基于限制性内切酶的竞争型 DNA 电化学传感	91
6.3	基于目标增强放大与滚环扩增的超灵敏核酸检测方法	104
6.4	表面链替代聚合的 DNA 电化学传感	110
第 7 章	DNA 荧光传感器	118
7.1	量子点修饰硅纳米球与等温放大结合的超灵敏 DNA 荧光检测	118
7.2	基于弓形结构 DNA 循环与内切酶信号放大 DNA 的荧光检测	123
7.3	Lambda 外切酶循环放大 DNA 灵敏均相荧光检测	128
7.4	基于量子点与氧化石墨烯能量转移的 DNA 检测	132
第 8 章	DNA 表面增强拉曼与可视化检测	144
8.1	基于可控生长银纳米颗粒的表面增强拉曼 DNA 检测	144
8.2	循环链替代和银增强信号放大 DNA 拉曼传感	150
8.3	纳米金催化银沉积放大 DNA 可视化分析	156
8.4	链接反应与滚环放大结合的 DNA 化学发光成像检测	163
第 9 章	microRNA 分析方法	171
9.1	量子点和金纳米簇能量转移 miRNA 电致化学发光检测	171
9.2	氧化石墨烯荧光猝灭与等温链替代反应用于多元 miRNA 检测	178
9.3	功能化银纳米簇电化学探针用于 miRNA 检测	185
9.4	分子信标与靶标信号放大结合的超灵敏 miRNA 检测	189
第 10 章	细胞内 miRNA 调控及检测	199
10.1	聚乙烯亚胺-石墨带纳米载体用于细胞内 miRNA 识别	199
10.2	靶向 SnO ₂ 纳米探针用于细胞 miRNA 抑制与定量检测	206

第1章 绪 论

核酸分析主要包括 DNA 和 RNA 分析。随着人类基因组计划的完成和功能基因研究的深入,基因诊断已成为分子生物学和生物医学的重要研究领域。由于特定系列基因的检测在临床诊断、基因分析、环境监测、食品污染、法医等领域发挥着重要的作用,DNA 生物传感器作为一种利用核酸碱基配对原则进行识别的新方法,能对特定系列的基因片段实现持续、快速、灵敏和选择性检测,近年来发展非常迅速。在基因调控及治疗方面,小分子 RNA 的研究也成为热点。miRNA (microRNA) 作为一种内源性小分子 RNA,是一种重要的细胞调控分子,广泛存在于人体和几乎所有模式生物的细胞中,在细胞的增殖、发育、生长分化、凋亡、代谢及癌变等一系列生命过程中起着重要的调控作用。miRNA 的分析检测是其生物功能研究、疾病诊断及相关基因药物开发的关键技术,在近年来也取得了长足的发展。

1.1 DNA 生物传感

1.1.1 DNA 传感器的基本原理

DNA 生物传感器是一种由生物活性材料与相应转换器构成,能测定特定序列 DNA 片段的装置。它是将一条序列已知的单链寡聚核苷酸片段探针(长度一般为18~50个碱基)通过一定的方式固定在基底表面作为识别元件,在适当的温度、pH、离子强度下,以 Watson-Crick 碱基配对原则(A-T、G-C)使该 DNA 探针与目标 DNA 发生分子杂交反应。通过转换器将杂交过程所产生的变化转换为可以观察记录的光电等信号,目标片段的量可以根据杂交前后信号的变化量进行推断,从而实现对特定序列 DNA 的识别和检测^[1]。此外,除了将探针固定在基底,也可以在溶液中通过直接观察杂交所产生信号变化实现对目标片段的检测^[2]。其原理如图 1.1 所示。

1.1.2 DNA 探针的固定

DNA 探针的固定是构建 DNA 传感器的一个基本过程,探针在表面的分布、

密度及取向对 DNA 传感器的性能影响很大，决定了 DNA 传感器的灵敏度和选择性^[3]。为了使传感器具有高的灵敏度和选择性，固定探针时应尽量减少非特异性吸附和提高探针在基底上的稳定性，并确保探针具有高的反应活性和好的取向，易于和目标分子结合。常用的探针固定方法有吸附法、共价键合法及生物素-(链霉)亲和素法。

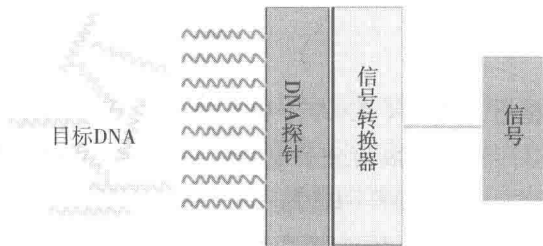


图 1.1 DNA 生物传感器检测原理

1. 吸附法

吸附法是一种最简单的固定方法，不需要对核酸探针进行任何修饰。通常是通过静电作用将带负电的探针吸附在带正电的基底上。Fang 等在玻碳电极上修饰壳聚糖，通过壳聚糖表面的正电将 DNA 吸附在玻碳电极 (GCE) 表面进行固定^[4,5]。Zhou 等将 DNA 探针通过吸附固定在带正电的聚苯乙烯磺酸 (PAH)/聚烯丙基胺盐酸 (PSS)/(PAH) 修饰膜的外层^[6]。DNA 探针也可以通过简单的物理吸附进行固定，如将丝网印刷电极放在含有 DNA 探针的溶液中过夜，冲洗未吸附的探针后，在电极表面能够吸附大量的探针，构建的电化学传感器检测限达 10^{-16} mol/L^[7]；同样地，将 DNA 探针溶液滴涂在金微电极的表面，过夜后探针可以很好地吸附在电极表面^[8]。此外，还可以通过电化学处理对 DNA 探针进行吸附固定，常见的是通过施加电位将 DNA 探针固定在碳糊或丝网印刷电极表面^[9,10]。吸附法主要的缺点是 DNA 探针固定得不够稳定，容易从电极表面脱落，探针的多位点吸附造成杂交效率比较低。

2. 共价键合法

共价键合法是将 DNA 探针一端通过共价键固定在电极的表面，可以充分利用其结构的变型性，通过调整其构像增加杂交的效率。共价固定是最常用的一种方法，根据基底不同可以采用不同的共价固定方式，如 Au—S 键、碳二亚胺 (EDC) 和 N-羟基磺酸基琥珀酰亚胺 (NHS) 催化交联法^[1] (图 1.2)、高分子聚合膜共价反应、自组装膜法等。末端修饰了硫醇基团 (—SH) 的 DNA 探针，由于巯基和金原子之间形成 Au-S 共价键，能在纳米金表面实现强烈吸附，致使

探针键合到金的表面。基于这个原则,发展了一系列的 DNA 生物传感器^[11-13],如将 DNA 探针固定在微金电极上^[11]、在纳米金表面^[12]等。Mirkin 课题组将巯基 DNA 修饰在纳米金表面,进行了一系列的开创性工作,发展了纳米金比色法^[13]、生物条形码法等^[14]。EDC/NHS 法也是一种常见的交联方法,Wang 等在金电极表面修饰上羧酸化的单层的碳纳米管,在 EDC 存在的条件下,将 5' 胺基化的 DNA 探针固定在电极表面^[15];同样地,在 EDC/NHS 存在的条件下将 DNA 探针共价键合在 4-胺基苯甲酸修饰的电极表面^[16]。此外还有高分子聚合膜共价反应,如将吡咯和单链低聚核苷酸一起在铂电极上进行电化学共聚,DNA 探针与高分子膜形成共价键而固定在电极表面^[17]。总之,共价键合减少了非特异性吸附,探针在结构上具有更多的柔韧性,有利于提高杂交效率。

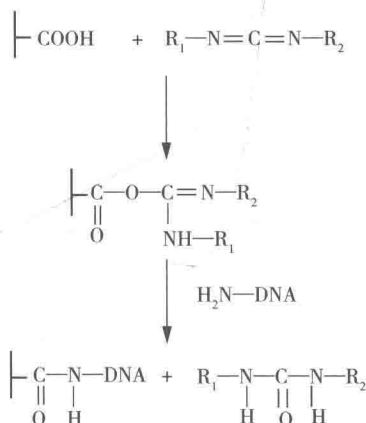


图 1.2 基于 EDC 交联反应的 DNA 探针固定

3. 生物素-(链霉)亲和素法

生物素是一类小分子,与(链霉)亲和素有很高的亲和力($K_a=1 \times 10^{15}$), (链霉)亲和素上有 4 个相同的位点能够与生物素进行结合。链霉亲和素、亲和素的等电点分别为 5 和 10.5,在进行共价结合的时候,前者能够更好地减少非特异性吸附。在 DNA 探针的固定中,生物素-(链霉)亲和素配位作用被广泛地使用^[18,19]。Pantano 等将生物素固定在电极表面,结合亲和素后再与修饰了生物素的 DNA 探针结合,利用这种“三明治”结构固定 DNA 探针^[20],如图 1.3 所示。Fan 等将两端分别标记了生物素和地高辛的分子信标,通过生物素-亲和素作用固定在亲和素修饰的电极表面,构建了一个基于酶标记和位阻效应的 DNA 电化学传感器,对目标 DNA 片段实现了高特异性、飞摩尔数量级的检测^[21]。

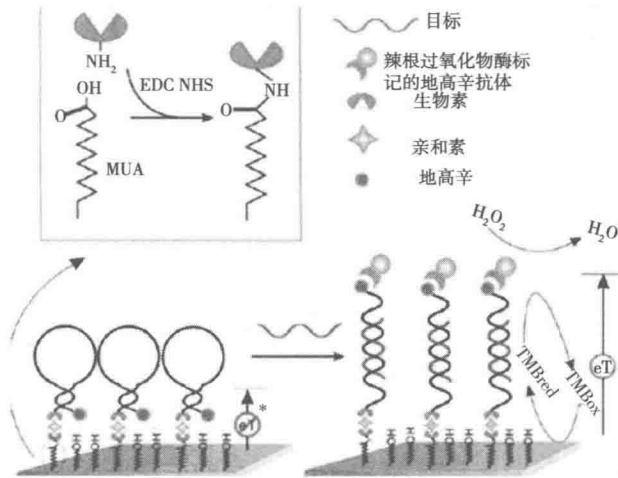


图 1.3 基于构象变化 DNA 电化学传感器

TMB_{ox}: 四甲基联苯胺氧化态; TMB_{red}: 四甲基联苯胺还原态。* 表明电子转移被阻断

1.1.3 DNA 生物传感器的分类

根据换能器（检测信号）的不同，DNA 传感器主要分为三类：DNA 电化学生物传感器、DNA 光学生物传感器及 DNA 质量灵敏型生物传感器。

1. DNA 电化学生物传感器

DNA 电化学生物传感器是根据电极上的探针与溶液中的互补片段杂交引起的电流、电压、电阻或电导等电信号的变化而进行设计，检测电信号变化从而对样本中 DNA 的结构和含量等信息加以测定。DNA 电化学生物传感器结合了核酸识别的特异性和电化学方法的分析能力，具有灵敏度高、受环境干扰少、成本低、小尺度及低能耗等优势，很多研究者认为它是最有发展前景的一类 DNA 分析方法^[22]。

用于 DNA 电化学生物传感器的信号标记分子主要有酶^[23]、二茂铁^[24]、能够与 DNA 链进行结合的一些电化学活性分子^[25,26]及金属纳米颗粒^[27]等。Jin 等利用碱性磷酸酶和磁珠进行双重信号放大，构建了 DNA 电化学传感器，线性范围为 $5.0 \times 10^{-16} \sim 1.0 \times 10^{-13}$ mol/L，且具有很高的选择性^[23]。Jiang 等利用表面接触效应，构建了一个二茂铁标记的 DNA 电化学传感器，检测限为 1fmol/L，而且具有很好的选择性、稳定性和重复性^[24]。Hoechst 33258 是一种 DNA 小股沟结合物，能识别富含 A-C 的系列，常用作电化学信号分子，构建 DNA 电化学传感器^[25]。道若霉素能够特异地插入 G-C 片段中，也是一种良好的 DNA 电化学信号分子^[26]。Bakker 用 CdS 对 DNA 进行标记，用微电极对溶出的铬离子进行电势检测，

构建的传感器在没有信号放大的情况下,检测限达到飞摩尔级,而且能够区别两个碱基错配的片段^[27],如图1.4所示。

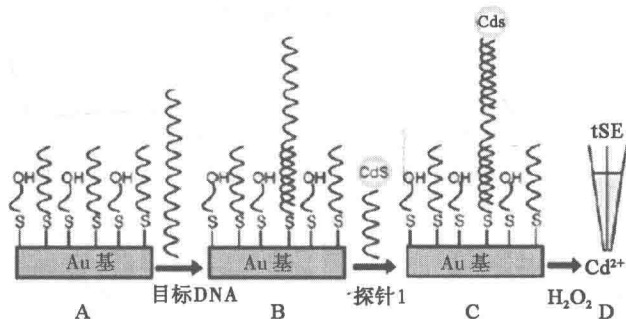


图1.4 纳米-电流型DNA杂交检测

除了加入信号分子进行标记,DNA自身的氧化还原信号和杂交引起的一些界面性质的变化,如电阻、电容等,也可以用于发展DNA电化学传感器。Palecek课题组在利用碱基自身的电化学信号构建DNA生物传感器方面做了很多开创性的工作^[28]。在4种碱基中,鸟嘌呤被认为是氧化还原活性最高的一个碱基。用次黄嘌呤代替鸟嘌呤的探针固定在电极上,结合目标片段后,就可以通过检测鸟嘌呤的信号而检测到目标片段^[29]。Piro等将DNA探针固定在苯醌分子膜修饰的电极上,通过杂交后引起的电阻变化而对DNA片段进行检测^[30]。此外,在构建DNA电化学传感器时,探针的选择及信号分子标记的位置也非常重要。Plaxco等系统地研究了探针的长度、形状及信号分子标记的位置对DNA电化学传感器性能的影响,得出了很多有指导意义的结果,如茎环结构比线性结构在区别碱基错配能力上要强;长的探针能产生强的信号,但特异性不如短的探针好等^[31]。

2. DNA光学生物传感器

化学发光(CL)和生物发光(BL)很早就被用于DNA检测,利用一些光学反应结合各种固定化技术发展了多种DNA光学生物传感器。DNA光学生物传感器采用光学换能器,可用的光学检测方式也有多种。研究报道比较多的有能量共振转移法(FRET)、比色法、表面增强拉曼光谱(SERS)型、表面等离子体共振(SPR)等。

两个距离很近($<10\text{nm}$)的荧光分子,能量供体分子的发射光谱和受体分子的吸收光谱重叠时,如果供体分子受到激发会发生一种非放射性的能量转移,荧光大大减弱或猝灭,而受体分子产生荧光。Chen等利用荧光素和石墨烯之间的FRET,构建了一个检测DNA片段的传感器。标记上荧光素的探针DNA

(ssDNA),由于石墨烯的吸附,荧光素靠近石墨烯,荧光素被激发时发生能量共振转移,荧光被猝灭;探针 DNA 识别目标片段后,形成的双链结构(dsDNA)与石墨烯结合力小,使荧光素远离石墨烯,荧光得到恢复,从而实现特定 DNA 片段的检测(图 1.5)^[32]。Knoll 等以氧化铝纳米棒为模板,在上面层层组装枝状聚合物和量子点。溶解氧化铝棒得到量子点和聚合物组装管,以组装管作为能量受体,DNA 上的荧光基团为供体,对 DNA 进行检测,检测线性范围为 100nmol/L~100fmol/L^[33]。

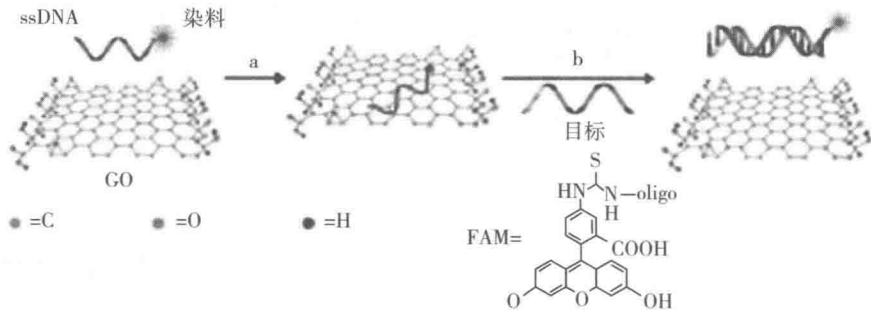


图 1.5 基于 GO 荧光猝灭 DNA 生物传感器

1998 年 Mirkin 课题组首次报道了纳米金比色法用于 DNA 的检测。他们将含有 24 个碱基的巯基 DNA 片段修饰到 13nm 的纳米金上,与目标片段杂交时,纳米金会聚集,纳米金表面的等离子共振红移使溶液由红色变为紫色。杂交的量不同,变色程度不同,具有不同的 T_m 值,能够实现对 DNA 灵敏、特异性的检测^[34]。他们进一步基于比色法发展了对不同 DNA 片段同时检测的方法,两种不同 DNA 片段分别标记上 30nm 和 50nm 的金纳米颗粒作为探针,以“三明治”结构杂交结合到基底上后,分别产生绿光和红光,从而实现在溶液中两种组分的同时检测^[35]。

所谓拉曼增强指吸附在粗糙化金属表面的化合物由于表面局域等离子激元被激发所引起的电磁增强(物理增强),以及粗糙表面上的原子簇及吸附其上的分子构成拉曼增强的活性点(化学增强),这两者的作用使被测定物的拉曼散射产生极大的增强效应,其增强因子可达 $10^3 \sim 10^7$ ^[36]。这种灵敏的检测手段也被广泛用于检测 DNA 片段。Mirkin 等在纳米金上修饰上拉曼分子和探针,当与目标片段杂交形成“三明治”结构结合到基底上后,纳米金作为活性位点进一步结合纳米银进行放大,再用拉曼进行检测。并进一步通过在基底固定不同的探针,实现多种片段同时检测,检测限达 20fmol/L(图 1.6)^[37]。Kim 等在金纳米线上修饰探针 DNA,结合目标片段,再结合一端标记金纳米颗粒、一端标记拉曼纳米分子的 DNA 探针,构

建了高通量的 DNA 传感器, 检测限为 10pmol/L ^[38]。

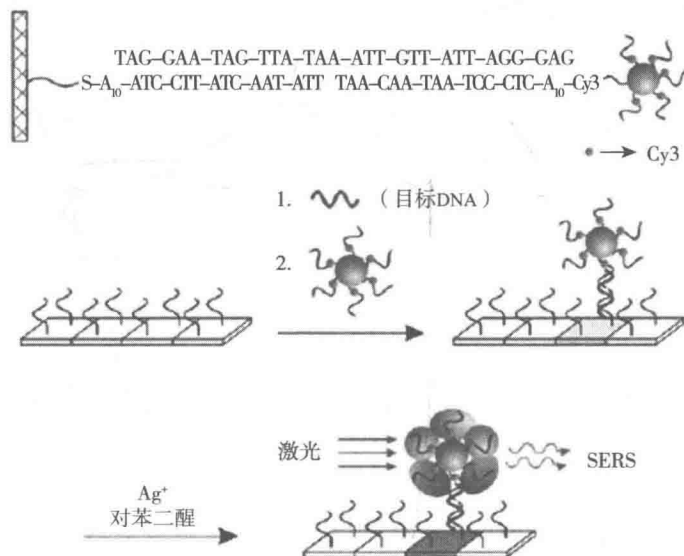


图 1.6 表面拉曼增强 DNA 传感器

SPR 传感技术是一项新兴的生物化学检测技术, 它通过检测表面等离子体的变化对界面上物质变化进行检测。与传统的生化分析方法相比, SPR 传感技术具有无须标记、实时检测、无损伤检测等优点。Keating 等在金膜表面固定 DNA 探针用于捕获目标片段, 进一步杂交结合带金纳米粒子的 DNA 探针。由于基底表面质量增加, 纳米金大的介电常数及金纳米粒子与金膜之间大的电磁耦合, 使 SPR 反射率得到极大地增强。相对于没有金标记的直接检测, 其灵敏度要高 1000 倍, 对 24 个碱基的片段检测限为 10pmol/L ^[39]。Corn 等在金膜表面固定大量的 DNA 探针, 用于识别无标记的目标 DNA 片段 (~ 18 碱基) 和核糖体 RNA (1500 碱基), 用 SPR 进行杂交检测^[40]。此外化学发光和电化学发光也经常作为一种光学手段用于 DNA 的检测。

3. DNA 质量灵敏型生物传感器

近年来, 微悬臂传感器由于具有无须标记、高精度、可靠性高、尺寸小、质量轻等优点, 作为一种非常有前景的分析手段被广泛地用于分析生物分子间作用。其基本原理是由于基底结合生物分子后, 表面质量或压力的变化会引起悬臂的偏转, 通过计算悬臂的偏转程度而对生物分子进行检测^[1]。Gimzewski 等在镀有金膜的两个微悬臂上分别固定碱基数为 12 和 16 的核酸片段, 在溶液中平衡后, 加入互补片段, 互补片段的杂交引起微悬臂的不同程度的偏转, 并根据偏转

的程度，对两种片段进行同时检测（图 1.7）^[41]。

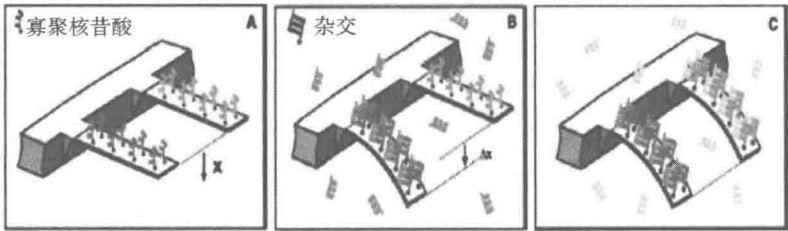


图 1.7 微悬臂 DNA 生物传感器

石英晶体微天平传感器是一种典型的质量型传感器。生物分子吸附在石英晶体电极表面会引起质量变化，这种质量变化转化为石英晶体振荡电路输出电信号的频率变化，从而进行分析检测。Yu 等在金电极上固定捕获探针 1，结合目标片段，并通过目标片段进一步结合生物素修饰的探针 2，聚合反应使探针 1、2 连接，并进一步地通过探针 2 结合链霉素和素修饰的辣根过氧化物酶，在过氧化氢存在的条件下催化二氨基联苯胺沉淀，用 QCM 检测。当目标片段存在碱基错配时，不能发生聚合反应，探针 2 结合不到电极上而不能发生后续催化沉淀反应。此方法能很好地对长度为 28 个碱基、浓度为 0.1nmol/L 的基因片段的单碱基错配进行区分^[42]。Furlong 在电极表面通过层层组装固定单层或多层的 DNA 探针，用 QCM 对杂交进行检测，开创性地提出了利用 DNA 高分子聚合膜，结合 QCM 的检测方法，用于检测特定的 DNA 片段^[43]。

1.2 miRNA 分析

1.2.1 miRNA 的概述

自 Lee 等在 1993 年首次在线虫中发现 miRNA 以来^[44]，其在生物体中所起的重要调控作用引起了广大研究者的兴趣。miRNA 是一类 18~25 个碱基的内源性非编码单链小分子 RNA，它作为一种调控因子，广泛存在于植物、病毒及哺乳动物中。miRNA 在细胞核中被复制后，以长度超过 1kb 茎环结构的前体形式存在（pri-miRNA），pri-miRNA 通过核酸内切酶的作用，剪切为长度约为 70 个碱基的短茎环结构（pre-miRNA）。pre-miRNA 通过细胞核膜上蛋白质的介导进入细胞质，在细胞质中经核酸酶进一步剪切成成熟的 miRNA（图 1.8）^[45]。miRNA 在 RNA 诱导沉默复合体（RISC）协调作用下，与信使 RNA（mRNA）3'-非编码区结合，直接降解 mRNA 而调节蛋白质的翻译，或者间接地使基因沉默而对蛋白质的翻译进行调节^[46]。

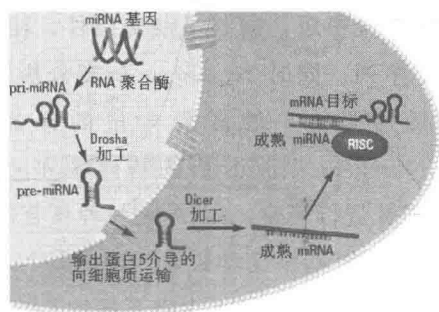


图 1.8 miRNA 生物学过程

目前已发现了 3000 多种不同的 miRNA 分子，其中人类细胞中发现了 1000 多种^[47]。收录数据库的 miRNA 的系列有 4500 多种，与人类相关的接近 500 种^[48]，这个数据还在不断变大。miRNA 在很多生物过程中扮演着重要的调控作用，如昆虫的细胞分化和凋亡^[49]、植物的发育、花期的调控^[50]、线虫的分化生长^[51]等。更为重要的是，miRNA 的表达与很多人类的重大疾病，尤其是癌症密切相关^[52]。例如，有些 miRNA 的上调和抑制与某种肿瘤的产生密切相关^[53]；有些 miRNA 本身就是致癌基因，其紊乱的表达能导致癌症的发生^[54]。因此，miRNA 可以作为一种肿瘤标记物或药物治疗的靶标，或利用其抑制蛋白质的翻译功能，直接抑制肿瘤基因的表达，用于基因治疗，在生物医学中有广阔的应用前景。

1.2.2 miRNA 的传统检测方法

为进一步了解 miRNA 生物功能，利用 miRNA 进行疾病诊断、基因药物开发、基因治疗等，发展良好的 miRNA 分析检测技术尤为关键。但由于 miRNA 序列短、在细胞内表达丰度低、同家族 miRNA 之间序列相似性强，miRNA 的分析在灵敏度、选择性等方面对分析化学工作者提出了新的挑战^[55]。传统的 miRNA 分析检测技术主要包括 Northern 杂交分析、RT-PCR（实时荧光聚合酶链反应）、基因芯片技术及克隆技术。这些技术在应用的过程中都有其优势和不足，研究人员可以根据实验的目的选择合适的检测手段。

1. Northern 杂交分析

Northern 杂交分析是将目标片段捕获到硝化纤维膜上，再用带有放射性基团标记的探针测定，可以直接观察到不同大小的 miRNA 分子，是一种 miRNA 分析的可靠方法。其基本过程如下：聚丙烯酰胺电泳得到的 RNA 转移到硝化纤

维膜上, 进行连接固定, 目标片段与带放射性的片段杂交, 通过显色进行检测^[55]。然而由于 miRNA 片段很短, 限制了杂交条件, 使 Northern 杂交分析很难区分同源性的 miRNA 序列。同时 Northern 杂交分析的操作步骤相对烦琐、分析时间长、检测灵敏度低, 一般需要大量的样品, 且需要分离富集 (10~30 μ g)。为了提高 Northern 杂交分析的特异性和灵敏度, 可以用锁核酸 (LNA) 修饰的 miRNA 探针进行实验。LNA 是一种核苷酸类似物, 其核糖骨架上呋喃环的 2'-O 和 4'-C 被亚甲基桥化学锁定, 对 miRNA 有很高的亲和力^[56]。在 DNA 探针中引入 LNA 修饰的碱基可大大提高探针与 miRNA 的杂交亲和性及解链温度, 相对于普通的 DNA 探针, 合理设计的 LNA 修饰的寡聚核苷酸探针, 可使 Northern 杂交分析灵敏度提高至少 10 倍^[57]。Pall 等用 EDC 交联探针代替传统的紫外照射交联, 用于 Northern 杂交分析检测 miRNA, 灵敏度大大提高, 相对于传统的紫外照射交联法, 灵敏度提高 25~50 倍^[58]。

2. RT-PCR 技术

RT-PCR 需要的样品量少, 灵敏度高, 是检测 miRNA 最重要的方法, 但由于 miRNA 片段短, 将其直接转录为 cDNA 并作为 PCR 扩增的模板难以实现。一些引物设计技术的创新使 RT-PCR 被成功地应用于 miRNA 检测。Raymond 等先用一个带长尾的基因特异性片段为模板 (GSP) 将 miRNA 反转录为 cDNA, 再以 LNA 修饰的引物对此 GSP-cDNA 进行 RT-PCR, 以 SYBR Green I 为荧光染料定量分析, 可以检测到飞摩尔级别的 miRNA, 线性范围横跨 6 个数量级^[59]。Li 等设计两个茎环结构的引物, 识别 miRNA 后, 在连接酶的作用下发生连接, 生成的引物用于实时 RT-PCR 扩增。这对茎环结构的特殊的引物可以成百倍地减少非特异性结合, 检测 miRNA 时具有宽的线性范围 (0.02~0.2ng)、高的信噪比 (>500) 和强的区别单碱基错配的能力^[60]。Chen 等^[61]设计了一个茎环结构的引物, 在茎部 3' 端突出 5~8 个碱基的单链与 miRNA 序列的 3' 端互补, 杂交后以 miRNA 进行反转录。转录后以 cDNA 片段和茎环结构分别为 PCR 扩增的两条引物, 以 TaqMan 水解探针实时定量。由于茎环结构高的热力学稳定性及区别碱基错配能力, 使该 RT-PCR 方法具有很高的灵敏度和特异性, 能检测到 7 个 miRNA 分子 (图 1.9)。目前该方法已被用于发展商业化试剂盒, 用于 miRNA 的检测。