

利用滚环扩增鉴别同源家族 miRNAs

赵斌*, 张新安

(沈阳体育学院运动人体科学学院生理生化教研室, 沈阳 110102)

摘要 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是一种基于病毒DNA复制而发明的新技术。近年来,RCA技术已经被广泛应用于微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)的检测。在miRNA检测研究领域,鉴别高度同源的家族miRNAs成为该研究领域的瓶颈。本研究引入新型的RCA技术来增加鉴别的灵敏度和特异性,进一步提高家族miRNA鉴别的灵敏度,滚环扩增的程度用相对荧光强度来表示。研究结果显示,T4 RNA连接酶2可在RCA的环化过程中实现最大的环化效率,从而提高RCA的检测特异性。本文利用优化的RCA技术,实现对let 7高度同源的家族miRNAs高灵敏度的鉴别,灵敏度可达5 fmol。let 7a的滚环探针对于Let 7a这一miRNA扩增后的相对荧光强度为1 550,而对其他的家族miRNA相对荧光强度仅为260。其他的家族miRNA探针在鉴别时相对荧光强度也显示了较大的差异。而依靠传统的RT-qPCR方法的鉴别灵敏度是4 pmol,与本研究相比,灵敏度低了近1 000倍。本研究的结果表明,利用RCA技术鉴别高度同源性miRNAs是高效灵敏的,此前未见相关研究的报道。RCA技术可能被应用于miRNA高灵敏度检测和鉴别的相关研究中。

关键词 滚环扩增;高灵敏度;微小RNA检测

中图分类号 Q52

A New Technique to Discriminate Homologous microRNAs Based on Rolling Circle Amplification

ZHAO Bin*, ZHANG Xin-An

(Department of Physiology and Biochemistry, School of Human Movement Sciences, Shenyang Sport University, Shenyang 110102, China)

Abstract Rolling circle amplification (RCA) is a newly invented technology based on the virus DNA reproduction. Recent years, it was widely used in the field of miRNA detection. Discrimination of highly homologous miRNAs is a choke point during the research of miRNA. We creatively imported the molecular beacon as a model to optimize the RCA process to increase the specificity and sensitivity of miRNA discrimination. Relative fluorescence intensity (RFI) was monitored as the fluorescence changes in RCA process. Results showed that T4 RNA ligase 2 could access the highest efficiency of circularization during the RCA process which promoted RCA at high specificity. By using RCA technology, members of highly homologous miRNAs Let 7 could be discriminated at the amount of 5 fmol. The RFI of Let 7a is about 1 550, whereas RFI of other family member is about 260. Discriminating data of other Let 7 miRNA members also showed significant differences. This sensitivity of discriminating miRNAs could not be achieved by traditional RT-qPCR method, which discriminating sensitivity is 4 pmol. Optimal RCA technology used in this study in discriminating highly homologous family miRNAs has

收稿日期:2019-07-25;修回日期:2019-10-21;接受日期:2019-11-12

国家自然科学基金(No. 81572243)资助

*通讯作者 Tel: 024-89166552; E-mail: zhaubin@hotmail.com

Received: July 25, 2019; Revised: October 21, 2019; Accepted: November 12, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81572243)

* Corresponding author Tel: 024-89166552; E-mail: zhaubin@hotmail.com

not been reported before. Results and conclusions obtained in the study can promote the applications of RCA in the field of high-sensitivity detection of miRNAs.

Key words rolling circle amplification(RCA); highly sensitive; miRNAs detection

生命科学的研究,从基因组学、一般基因序列变异、或单核苷酸多行性蛋白质组学到肿瘤标记物和激素等方面,都需要一种敏感、特异和准确地定性或定量方法。因此,生命科学家一直在研究或挖掘新颖的、强有力的方法,以便更好地满足生命科学研究的需要。滚环 DNA 扩增或滚环复制(rolling circle replication, RCR)可能是达到这一目标的方法之一^[1],因为滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)最大特点在于其可实现等温扩增。但是,目前 RCA 检测当中还存在许多弊端,例如环化效率低、依赖于 PCR 仪和费时等,这些缺点严重阻碍 RCA 在临床、军事和大型疫病等当中的应用。

miRNA 是一种存在于植物、动物和一些病毒中的 18~25 个核苷酸长度的非编码 RNA,与基因表达过程中的转录和转录后调控相关^[2]。它们产生于发夹和终端环状区域的转录后的酶切^[3]。miRNAs 广泛存在于植物和动物中,与细胞增殖、细胞凋亡、脂肪代谢和神经细胞的分化高度相关^[4,5]。人类被发现的第 1 个与 miRNA 低表达相关的疾病是慢性淋巴细胞性白血病^[6]。miRNA 表达水平改变与许多人类的疾病相关联,例如肌肉疾病、异常炎症反应、阿尔茨海默氏症和帕金森氏症^[7,8]。近年的研究发现,许多 miRNAs 也与一些癌症相关,例如肺癌和乳腺癌^[9,10]。近期的研究揭示,miR-17~19 簇的缺失能够导致骨骼和生长缺陷^[11]。在 miRNA 研究领域中已经确立,许多 miRNAs 来自同种子(通常定义为从成熟 miRNA 的 5'端 2~8 位)的家族。此外,miRNA 可作为在体液内非侵入性新颖的生物标记物进行早期癌症筛查^[12]。

Let 7 家族 miRNAs 是最早发现的 2 种 miRNA 之一,在非小细胞肺癌中低表达,与带有淋巴结转移或高增殖的乳腺癌患者有关^[13]。这一研究揭示了

let 7 家族 miRNAs 在肿瘤组织中具有抑制剂的作用。近年来,miRNA 的研究手段层出不穷,为更好的研究 miRNA 作用提供了技术支持。例如 Northern 印迹^[14]和引物扩增^[15]等。miRNAs 也可以用实时定量 PCR(RT-PCR)定量。另一种用于检测 miRNAs 的新技术是基于寡核苷酸的微阵列技术,然而,这种技术的灵敏度和特异性相对较低。与微阵列技术相比,实时定量 PCR 技术具有高精度、高灵敏度和特异性的特点。但是,实时定量 PCR 技术也存在一些缺点,例如费时(需逆转录)、费用较高、依赖于特定的仪器而且结果分析过程复杂^[16]。因此,亟待开发一种高灵敏度、高特异性、省时、费用低、不依赖于环境和仪器的技术来定量检测 miRNAs。

在本研究中,我们优化了经典的滚环扩增(RCA)技术来定量区分家族 miRNAs。RCA 是一种在室温或体温条件下扩增核苷酸的方法(见 Fig.1)。RCA 方法对仪器和环境的依赖性很低^[17],这一优点可能使 RCA 技术在应用的便携性和环境依赖性方面具有更大的优势。RCA 通常要求环形模板,以及与环形模板互补的引物都是 DNA 序列^[18]。环形模板的环化过程是 RCA 的关键步骤,环化效率的高低决定第 2 步扩增效率的高低。以往的研究^[19]显示,应用待环化的 DNA 序列与 miRNA 的结合效率较低,虽然能实现 miRNA 的微量检测,但是需要高浓度的环化底物。本文的研究采用分子信标(molecular beacon, MB)模型,优化待环化序列为 DNA 与 RNA 的混合链。即模型的缺口处的部分碱基用 RNA 碱基来取代,来优化 RCA 的环化步骤,使得 miRNA 在与分子信标实现最高效率的结合,显著节省环化底物,从而实现应用 RCA 高效检测和鉴别 miRNAs。同时,本研究不仅实现 miRNA 的高效检测,也实现了同源家族序列高度相关的家族 miRNA 的鉴别。与经典的实时定量 PCR

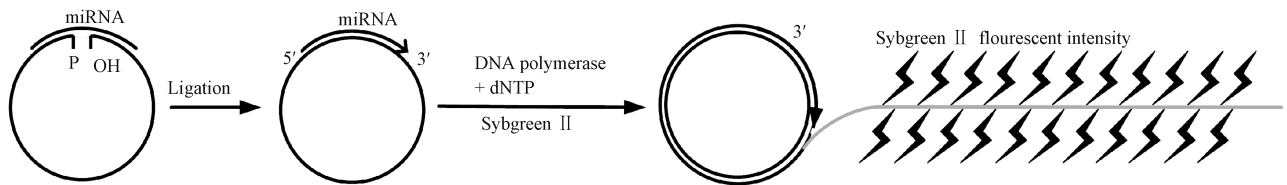


Fig.1 The RCA system which is the mimic of the situation of nick forming by the circle padlock in RCA Step 1: The miRNA was matched with the circle padlock, and therefore the gap was ligated by RNA ligase. Step 2: The RCA was continued while the polymerase was added, accompanying the florescent intensity increased

相比,RCA 检测 miRNA 避免逆转录的过程,可以显著节省时间与财力。

1 材料与方法

1.1 材料

Table 1 Oligonucleotide probes used to identify different members of Let 7 family

Probes	Sequence direction is from 5'-3'
Probe 7a	CTACTACCTCATCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTAACTATACAAC
Let 7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
Probe 7b	CTACTACCTCATCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTAACCACACAAC
Let 7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
Probe 7c	CTACTACCTCATCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTAACCATACAAC
Let 7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
Probe 7 d	TACTACCTCTTCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTACTATGCAACC
Let 7 d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Probe 7e	TCCTACCTCATCTTGTTTCCTTTCCTTGAAACTTCTTCCTACTATACAACC
Let 7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU

1.1.2 试剂 Tris-HCl 为华美生物工程公司产品; NaCl,硼酸为北京化工厂生产;Tris, EDTA 购自辽宁永强医药器械化玻有限公司;所有实验用水均为去离子水 TE 缓冲液、KCl 溶液、CaCl₂ 溶液、TB 缓冲液、Stains-all 染色剂等。T4 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶 1、T4 RNA 连接酶 2、phi29 DNA 聚合酶、Sybgreen II 购自 NEB 公司,dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司。SYBR® PrimeScript™ miRNA RT-PCR Kit 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 主要仪器 Infinit M200 多功能酶标仪(帝肯,奥地利);7500 Real-Time PCR System (ABI 公司);各式离心机等。

1.2 滚环扩增检测

let 7 家族 miRNAs 滚环扩增是新近发展的一种恒温核酸扩增方法。以环状 DNA 为模板,通过 1 个短的 DNA 引物(与部分环状模板互补),在酶催化下将 dNTPs 转变成单链 DNA,此单链 DNA 包含成百上千个重复的模板互补片段。本研究所使用的待环化核酸片段,是经前期的 MB 优化的片段(见 Table 1)。

1.3 环化

在 200 μL 的 PCR 管中加入 8 μL 连接酶的缓冲液,分别加入 0.5 μL、1 μmol/L 待连接的环状探针(Probe 7a-7e)和目标引物(let 7a-7e)(见 Fig.2)。孵育 10 min,加入 T4 连接酶(T4 DNA 连接酶或 T4 RNA 连接酶 1 或 T4 RNA 连接酶 2)孵育 30 min。

1.4 滚环扩增

1.1.1 寡核酸序列 本文所用核苷酸片段均由宝生物工程(大连)有限公司合成,普通核苷酸纯度为 HPLC 纯化级,纯化的核苷酸片段用 TE 缓冲液(pH 7.4)稀释至 100 μmol/L,均分后,置于-20 ℃冰箱中保存,PCR 所需要的产品放置于-80 ℃

在酶标仪的微孔板中,加入 72 μL 超纯水、10 μL 连接缓冲液(10 倍浓度)、5 μL dNTP 原液、1 μL 上述连接产物和 1 μL sybgreen II 染料,孵育 10 min。荧光值稳定后,加入 1 μL phi29 DNA 聚合酶孵育 30 min。用酶标仪实时监测滚环扩增过程中荧光强度的变化。设置每个循环 30 s,共 60 个循环。

1.5 实时定量 PCR 检测 miRNAs

应用 ABI 公司的 7500 实时定量 PCR 系统,采用 SYBR® PrimeScript™ miRNA RT-qPCR 试剂盒对待检测的 miRNAs 序列分别进行逆转录,然后利用 let 7a 的上游引物对 let 7a、let 7b、let 7c、let 7 d、let 7e 进行实时定量 PCR。选用不同 miRNA 检测量([m])进行检测。根据结果计算其各自的 Ct 值,以 Ct 值为纵坐标、-lg[m] 为横坐标作图,计算检测灵敏度等参数。

1.6 统计学方法

相对荧光强度 ΔFI 用下面的公式计算: ΔFI = (Fi-F_i), F_i 是连接酶加入反应体系时所记录的荧光强度,Fi 是加入聚合酶后发生滚环值。并利用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,相对荧光强度与完全互补配对时进扩增过程中随时间变化的荧光强度。

本研究对环化探针和家族 miRNA 互补配对后,进行滚环复制的相对荧光强度进行了统计和分析。每组实验数据均为至少 3 次实验数据的均行滚环扩增的相对荧光强度进行独立样本 T 检验。P>0.05 表示不存在显著性差异,P<0.05 表示存在显著性差异,P<0.01 表示存在极显著性差异。

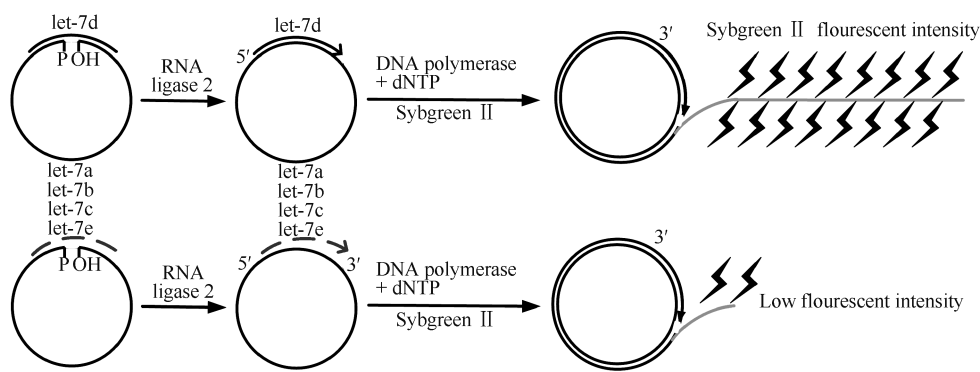


Fig.2 Schematic diagram of the RCA for Let 7 d When the probe 7 d was mixed with Let 7 d, they were matched well and the fluorescent intensity was increased a lot. By contrast, when the probe 7 d was mixed with other Let 7 family members, they were not matched well and lower fluorescent intensities were monitored

2 结果

2.1 RCA 方法实现鉴别家族 miRNA

2.1.1 Let 7a 的鉴别 选择的环状探针 (Probe 7a) 是与 let 7a 序列完全互补配对的 DNA 序列,利用 RCA 的方法对 let 7a 进行鉴别,考察 let 7a 与环状探针互补配对后环化、滚环扩增的相对荧光强度的变化,以及 let 7b、let 7c、let 7 d、let 7e 与环状探针 (Probe 7a) 互补配对后环化、滚环扩增的相对荧光强度的变化。

如 Fig.3 所示,环状探针与 let 7a 完全互补配对时,let 7a 环化、滚环扩增后相对荧光强度逐渐增加至 1 550,而其他 4 种 miRNAs (let 7b-7e) 与环状探针不是完全互补配对,滚环扩增后相对荧光强度最多只增加 260 (let 7e),最少的只增加 35;当与之前同样量的环状探针和所有等量的 let 7 家族 miRNAs (mixture 2) 混合时,进一步进行环化和滚环扩增。结果表明,let 7 家族 miRNAs 混合物进行滚环扩增相对荧光强度增加的值为 1 400,与 let 7a 单独进行滚环扩增增加的值相当 (90%);当与之前同样量的环状探针和除 let 7a 外的其它 miRNAs (mixture 1) 混合时,进行环化和滚环扩增后相对荧光强度增加 450,仅为 let 7a 单独进行滚环扩增所增加值的 29%。

2.1.2 let 7b、let 7c、let 7 d、let 7e 的鉴别 选择 Table 1 中分别与 let 7b~7e 序列完全互补配对的环状探针 (probe 7b-probe 7e),利用 RCA 技术对 let 7b-7e 进行鉴别。考察 let 7b-7e 与环状探针 (probe 7b-probe 7e) 互补配对后环化、滚环扩增的相对荧光强度的变化,以及其他 4 种与环状探针 (probe 7b-probe 7e) 错配后环化和滚环扩增。

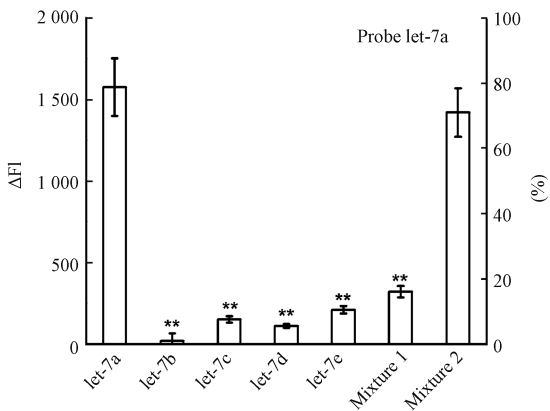


Fig.3 Histograms showing the detection specificity of the designed probe 7a to identify the correct Let-7a Mixture 1 contains all other four Let-7 members except the intended target Let-7 species, whereas mixture 2 contains all five Let-7 family members. ** represents $P < 0.01$, which has extremely significant difference compared with Let-7a

如 Fig.4A 所示,环状探针与 let 7b 互补配对时,let 7b 环化和滚环扩增后,相对荧光强度逐渐增加至 2 245,而其他 4 种 miRNAs (let 7a, let 7c-7e) 并未与环状探针 probe 7b 完全互补配对,滚环扩增后相对荧光强度最多只增加至 150 (let 7c),最少的仅增加 55;当与之前同样量的环状探针和所有 let 7 家族 miRNAs (mixture 2) 混合时,进一步实现环化和滚环扩增。结果表明,let 7 家族 miRNAs 混合物进行滚环扩增相对荧光强度增加的值为 1 987,与 let 7b 单独进行滚环扩增增加的值相当 (89%);当与之前同样量的环状探针和除 let 7b 外的其他 miRNAs (mixture 1) 混合时,进一步进行环化和滚环扩增。结果表明,mixture 1 与 probe 4b 进行环化和滚环扩增后,相对荧光强度增加的值为 260,仅为 let 7b 单独进行滚环扩增增加值的 12%。

如 Fig.4B,4C,4D 所示,利用 Table 1 中分别与

let 7c, let 7 d 和 let 7e 完全互补配对的环化探针进行实验,经环化和滚环扩增后,相对荧光强度分别逐渐增加至 2 460,1 670 和 2 200,而利用其他 4 种不与对应的 let 7 家族 miRNA 完全互补配对的环状探针进行实验时,滚环扩增后相对荧光强度分别最多只增加 360,320 和 205。

当利用与之前同样量的环状探针和所有 let 7 家族 miRNAs (mixture 2) 混合时,进一步实施环化和

滚环扩增。相对荧光强度分别增加的值为 2 256,1 450 和 1 600;当利用与之前同样量的环状探针和除完全互补配对外的其他 miRNAs (mixture 1) 混合时,进一步施行环化和滚环扩增。相对荧光强度增加的值分别为 470,550 和 865。结果表明,mixture 1 与探针进行环化和滚环扩增后,滚环扩增的荧光强增加值与完全互补配对时相比较小,分别为完全互补配对时滚环扩增荧光值的 19%,33%和 39%。

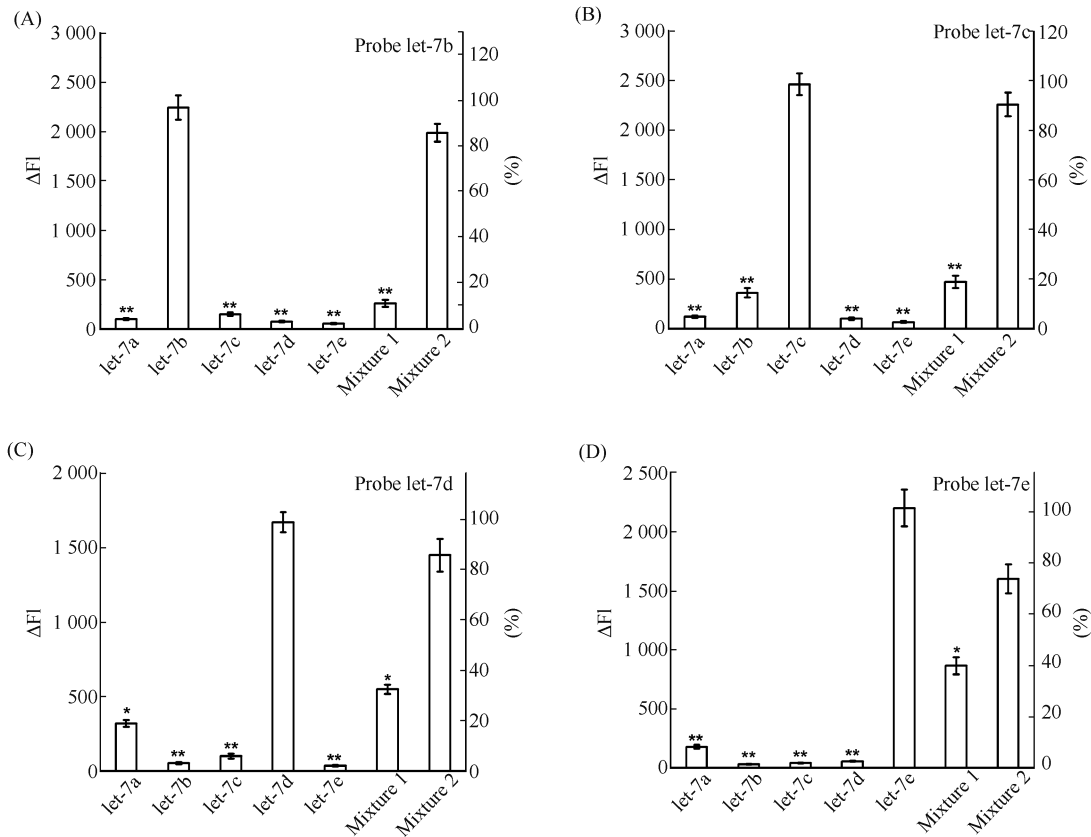


Fig.4 Histograms showing the detection specificity of the each designed probes to identify the correct Let-7 members Mixture 1 contains all other four Let-7 members except the intended target Let-7 species, whereas mixture 2 contains all five Let-7 family members. * represents $P<0.05$, which has significant difference compared with completely matched miRNA. ** represents $P<0.01$, which has extremely significant difference compared with completely matched miRNA

2.2 RCA 鉴别 let 7a 的高灵敏度

本文利用 RCA 技术鉴别家族 miRNAs 的灵敏度以 let 7a 为例。由前面的研究可知,当使用 probe 7a 鉴别 let 7a 与其它的家族 miRNAs 时,干扰最大的(相对荧光强度值仅低于 let 7a 的)是 let 7e。因此,作为灵敏度的研究,本文选择了 let 7a 和 let 7e 作为比较对象。结果如 Fig.5 所示,分别为 let 7a 和 let 7e 在滚环扩增时,含量为 50 fmol、25 fmol、10 fmol 和 5 fmol 时相对荧光强度图。当 let 7a 和 let 7e 的待检测量分别为 50 fmol、25 fmol 和 10 fmol 时,相对荧光强度曲线可以明显区分开。因此,当含量为

10 fmol 时,仍然可以将 let 7a 和 let 7e 较好的区分开;当浓度低于 5 fmol 时,两者发生滚环扩增时的曲线混淆在一起,不能区分两者的相对荧光强度。因此,使用 probe 7a 对 let 7a 和 let 7e 进行滚环扩增鉴别时,鉴别的灵敏度为 5 fmol。Fig.6 的柱状图统计更加直观的说明了这一点。

3 讨论

3.1 RCA 技术的检测应用

滚环式复制是噬菌体中常见的 DNA 复制方式。许多病毒 DNA 的复制、质粒和 F 因子在接合

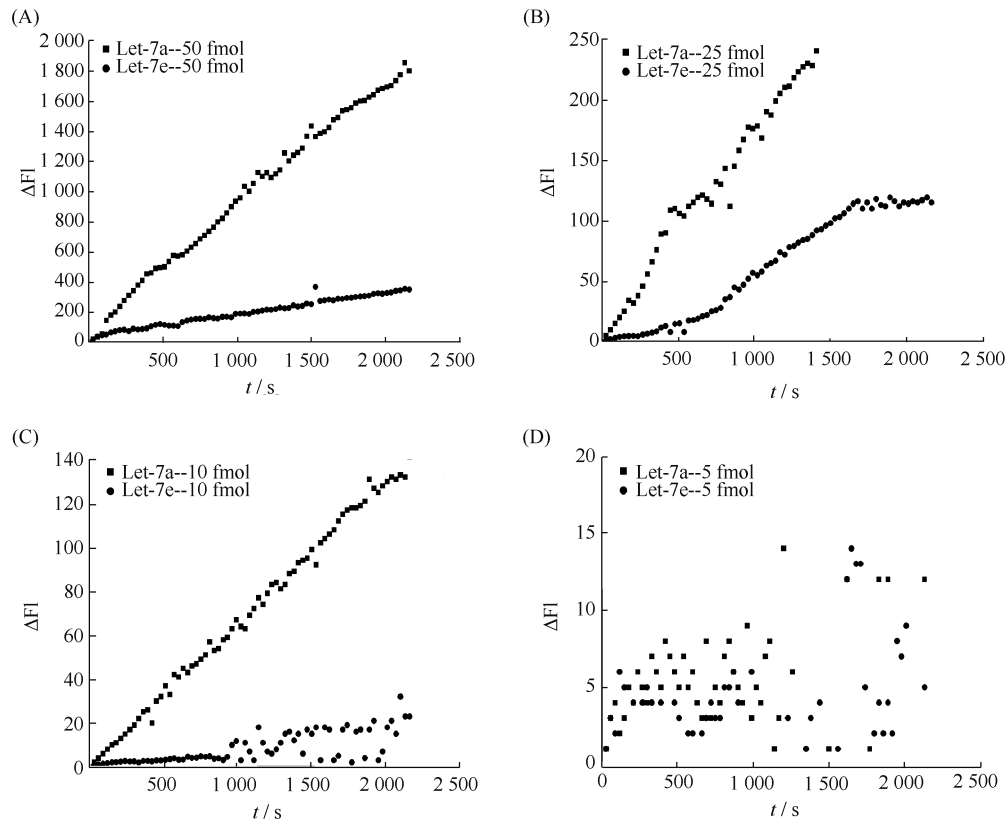


Fig.5 Fluorescence curves showing the detection sensitivity of distinguishing Let 7a and Let 7e Padlock probe was probe 7a. Fluorescence curves showing the discrimination curves of other Let-7 family members are given in Supplementary Materials. (A) 50 fmol; (B) 25 fmol; (C) 10 fmol; (D) 5 fmol

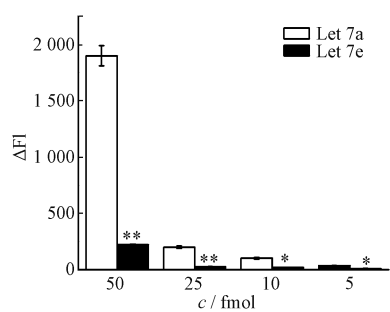


Fig.6 Detection limit to identify the correct Let-7a ability to discriminate Let-7a from Let-7e target at different amount Let-7a could be significantly discriminated with Let-7a at the concentration of 50 fmol, and the sensitive discrimination could be detected until at 5 fmol. * represents $P < 0.05$, which has significant difference compared with the equivalent amount. ** represents $P < 0.01$, which has extremely significant difference compared with the equivalent amount

(conufgation)转移时其 DNA 的复制,以及许多基因扩增时都采用这种方式。

在以这种机制进行的复制中,亲代双链 DNA 的一条链在 DNA 复制起点处被切开,其 5'端被游离。

这样,DNA 聚合酶Ⅲ便能将脱氧核糖核苷酸聚合在 3'-OH 端。当复制向前进行时,亲代 DNA 上被切断的 5'端继续游离下来,并且很快被单链结合蛋白所结合。因为 5'端从环上向下解链的同时伴有环状双链 DNA 环绕其轴不断的旋转,而且以 3'-OH 端为引物的 DNA 生长链则不断地以另一条环状 DNA 链为模板向前延伸,因而称为滚环扩增。

PCR 技术的出现为微量病原基因的检测和 SNP 的研究提供了技术平台。美国食品药品监督管理局批准了罗氏公司的 HIV、结核杆菌和沙眼衣原体定量 PCR 检测试剂盒用于临床^[20]。在 SNP 的研究中,PCR 更是一种常用手段,但是由于 PCR 技术的特异性较低和对样品纯度要求高等一系列问题,已经成为其发展的瓶颈。RCA 技术的应运而生使这些问题有了较大的改善。1997 年,Nilsson 等^[21]首先将 RCA 用于 SNP 方面的研究。研究中,利用连接反应需连接末端准确匹配的特点进行基因突变的检测^[22],这也是 RCA 最早用于研究的报道。

RCA 技术在 RNA 分子检测中的高灵敏度和特异性的优势,也常被用来研究组织细胞中 mRNA 的

丰度,以检测一些功能基因的表达活性,发现阳性结果的强弱程度能较准确反映在细胞中 mRNA 的丰度^[23]。如果将 RCA 技术与三维的 DNA 微点阵技术平台相结合,其灵敏度是传统荧光标记方法的一万多倍^[24]。显然,RCA 技术相对于 PCR 和其他杂交技术在特异性上已有很大程度的提高,加之支链放大效应,对检测灵敏度也有所改善。因此,此技术在基因检测和研究方面有极强的优势。

3.2 利用 RCA 方法鉴别 let 7 家族 miRNAs

本研究发现,滚环扩增时,环状探针存在 RNA 序列时会降低滚环扩增的效率。因此,滚环扩增技术检测 miRNA 时的环状探针需要全部是 DNA 序列,而且环化过程需要使用 RNA 连接酶 2。自从 1993 年第 1 个 miRNA 被发现以来,对 miRNA 特性探索的兴趣促进了高敏感性和特异性的 miRNA 检测技术的发展。这一发展,对 miRNA 相关疾病的识别和调控机制带来了希望。目前,对 miRNA 定量分析的方法主要是基于实时 PCR 芯片技术,它们的缺点是费时和价格昂贵。本研究所开发的基于 RCA 技术的 miRNA 检测方法,提供了一种快速、简单和便宜的 miRNA 检测技术。miRNA 分子直接用作环状探针可识别的引物,从而避免实时 PCR 过程的反转录步骤。而且,滚环扩增反应是发生在等温条件下的,不需要反复的升温 and 降温过程。等温的特性使得这一技术适应常规的临床应用,而且避免仪器的设置和仪器的控制过程。本研究开发的技术,整个检测过程不超过 1 h (PCR 需要将近 8 h)。标记物 sybgreen 的信号收集依赖于酶标仪,比起 RT-PCR 仪更便宜。本研究的检测技术可以用在 96 孔,384 孔甚至 1 536 控板上,真正实现了高通量。

本研究对 let 7 家族 miRNAs 鉴别的柱状图中,引入了 mixture 1 和 mixture 2 作为对比参照。由于临床样品是 miRNA 的混合物,人们通常不清楚混合物里面是否含有目的 miRNA,因此 mixture 2 滚环扩增的柱状图,为本文提供了一个阳性对照的值,这个阳性对照的值如果和待检测的目的 miRNA 滚环扩增的荧光值相当,就说明待检测样品中存在目的 miRNA; Mixture 1 的滚环扩增柱状图,为本文提供了一个阴性对照,当待检测样品中不存在目的 miRNA 时,其检测线很低,这样就很好地排除了目的 miRNA 存在的可能性。本研究的基于 RCA 的 miRNA 检测技术检测的灵敏度可低至 fmol 级,而且整个反应在 1 h 内即可完成。对于具有高度同源性的 let 7 家族 miRNA,其碱基序列的相似性均超过

70%,有的甚至达到 90%。本研究的结果显示,利用 RCA 鉴别 let 7 家族 miRNAs 时,相对荧光强度值的比值可低至 5%,显著低于已经报道的利用微阵列技术的 39%。这也说明 RCA 在鉴别高同源性的靶 miRNAs 时具有高度的特异性。

3.3 重要研究结果

3.3.1 SYBR Green II 荧光检测 基于滚环扩增反应的原理,在滚环扩增反应过程中,利用特异性的单链 DNA 检测荧光染料 SYBR Green II 进行荧光检测,实现了检测的特异性和高灵敏度,检出限为 5 fmol。

3.3.2 应用滚环扩增反应检测微小 RNA (miRNA) 使用 RNA 连接酶 2 以 miRNA 模板使环状探针特异性的连接成环,然后以环形 DNA 探针为模板,miRNA 作为引物发生滚环扩增反应,结果产生大量单链重复序列的线性 DNA 产物,应用特异性的 DNA 检测荧光染料进行定量。此方法无需转录步骤,操作简便、灵敏度高,可特异性地检测高度同源的 miRNAs。

3.3.3 利用滚环扩增方法鉴别高度同源的 miRNAs 与实时定量 PCR 方法相比,此法具有省时、节省财力、操作简便、高灵敏度、等温、不受环境和仪器限制等优点。

参考文献 (References)

- [1] Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification [J]. *Nat Genet*, 1998, **19**(3): 225-232
- [2] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, **8**(2): 93-103
- [3] Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing [J]. *Nature*, 2003, **425**(6956): 415-419
- [4] Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(1): 12-23
- [5] Hua Z, Lv Q, Ye W, *et al.* MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia [J]. *PLoS One*, 2006, **1**: e116
- [6] Mraz M, Pospisilova S. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: from causality to associations and back [J]. *Expert Rev Hematol*, 2012, **5**(6): 579-581
- [7] Williams AH, Liu N, van Rooij E, *et al.* MicroRNA control of muscle development and disease [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, **21**(3): 461-469
- [8] Keller A, Leidinger P, Lange J, *et al.* Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls [J]. *PLoS One*, 2009, **4**(10): e7440
- [9] He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, **435**(7043): 828-833
- [10] Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, *et al.* MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes [J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, **50**(3): 506-509

- [11] de Pontual L, Yao E, Callier P, *et al.* Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans [J]. *Nat Genet*, 2011, **43**(10): 1026-1030
- [12] Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, *et al.* Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer [J]. *Ann Surg*, 2010, **251**(3): 499-505
- [13] Obad S, dos Santos CO, Petri A, *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs [J]. *Nat Genet*, 2011, **43**(4): 371-378
- [14] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, **294**(5543): 853-858
- [15] Seitz H, Royo H, Bortolin ML, *et al.* A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain [J]. *Genome Res*, 2004, **14**(9): 1741-1748
- [16] Yan J, Zhang N, Qi C, *et al.* One-step real time RT-PCR for detection of microRNAs [J]. *Talanta*, 2013, **110**: 190-195
- [17] Gu H, Breaker RR. Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products [J]. *Biotechniques*, 2013, **54**(6): 337-343
- [18] Gao L, Cui J, Zhou Y, *et al.* A strategy for sequencing based on rolling-circle amplification on a microarray [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, **9**(4): 615-620
- [19] Cheng Y, Zhang X, Li Z, *et al.* Highly Sensitive Determination of microRNA using target-primed and Branched Rolling-Circle Amplification [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(18): 3268-3272
- [20] Zhang DY, Brandwein M, Hsuih TC, *et al.* Amplification of target-specific, ligation-dependent circular probe [J]. *Gene*, 1998, **211**(2): 277-285
- [21] Nilsson M, Krejci K, Koch J, *et al.* Padlock probes reveal single-nucleotide differences, parent of origin and in situ distribution of centromeric sequences in human chromosomes 13 and 21 [J]. *Nat Genet*, 1997, **16**(3): 252-255
- [22] Landegren U, Kaiser R, Sanders J, *et al.* A ligase-mediated gene detection technique [J]. *Science*, 1998, **241**(4869): 1077-1080
- [23] Nilsson M, Antson DO, Barbany G, *et al.* RNA-templated DNA ligation for transcript analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(2): 578-581
- [24] Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, *et al.* Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(18): 10113-10119