

基于RT-qPCR技术的microRNA表达水平检测方法

刘涛*

(南开大学附属第一中心医院国家卫生健康委员会危重病急救医学重点实验室, 天津 300192)

摘要: 微RNA(microRNA, miRNA)是一类细胞内源性的小分子非编码RNA, 在多种生理和病理过程中发挥基因调控作用。MiRNA的表达水平定量分析是其功能研究中的重要过程, 但miRNA的成熟体序列较短, 因而其逆转录-定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)需采取与长链基因不同的特殊策略。现有miRNA的RT-qPCR方法可分为4种类型, 包括茎环引物法、加尾法、直接逆转录法和其他方法。在PCR过程中对荧光信号的监测主要有探针法和染料法两种方式。本文对miRNA的RT-qPCR各种方法及其主要原理进行综述。

关键词: 微RNA; 逆转录-定量PCR; 实时定量PCR

Research progress of microRNA expression level detection methods based on RT-qPCR

LIU Tao*

(National Health Commission's Key Laboratory of Critical Care Medicine, Tianjin First Central Hospital Affiliated to Nankai University, Tianjin 300192, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous small non-coding RNAs that mediate regulation of gene expression in several physiological and pathological processes. Quantitative analysis of miRNA expression level is a key procedure in miRNA functional study. Due to the short length of miRNAs, special strategies as distinguished from those used for long-chain genes should be introduced in miRNA reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis. Four strategies are currently used in miRNA RT-qPCR including stem-loop primer based method, end-tailing based method, direct reverse transcription method, and other methods. Monitoring of fluorescent signal during PCR includes probe based and nucleic acid dye based methods. In this review, we summarize the strategies of miRNA RT-qPCR and the principle.

Key Words: microRNA; reverse transcription quantitative PCR; real-time PCR

微RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的短链非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA), 其经典作用模式是通过与mRNA分子的3'非翻译区或其他ncRNA的特定位点以不完全互补配对的方式结合, 抑制靶RNA的翻译或使其稳定性降低而易于

降解, 从而在转录后水平调控基因的表达^[1]。MiRNA具有多个家族成员, 对基因表达的调节具有广泛性, 因而参与分化、生长发育、代谢、细胞间信息传递等多种生理过程, 以及肿瘤、代谢性疾病、病毒与宿主相互作用等病理过程的调

收稿日期: 2021-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81402322); 南开大学附属第一中心医院科技基金春苗项目(2020CM01)

*通信作者: E-mail: liutao@nankai.edu.cn

控^[2,3]。对细胞、组织和体液中的miRNA表达水平进行定量分析,是miRNA研究过程中的重要环节。常用的miRNA定量分析方法包括微阵列、高通量测序、Northern印迹、逆转录-定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)等。MiRNA微阵列的优势在于高通量,即一次实验可检测大量的miRNA。但其缺点在于敏感性较低,且动态范围窄。高通量测序技术能够发现新的miRNA分子,但操作过程和数据分析均较为复杂,且花费较高。Northern印迹技术的优势是能够判定待测miRNA的相对分子质量,但对miRNA定量的敏感性和特异性均较低,且同样存在操作复杂的缺点。RT-qPCR的操作较为简单,且检测的动态范围广、敏感性高,因此是miRNA定量检测常用的方法。在实践中,应综合考虑实验目的、精度要求、待测样品中miRNA的含量等因素,选择最合适的方法^[4]。

MiRNA主要通过成熟体发挥生物学功能,因此本文所指miRNA的RT-qPCR检测主要针对其成熟体的水平。应用RT-qPCR技术检测miRNA成熟体存在以下技术难点:(1) miRNA成熟体长度很短,多为18~26核苷酸(nucleotide, nt),无法使用常规的RT-qPCR方法,必须应用特殊的策略;(2) miRNA成熟体序列的GC含量变化范围很大,为33%~89%,使其熔解温度(melting temperature, Tm)值的变化较大;(3) miRNA成熟体只占细胞内总RNA的极小比例,为扩增的敏感性提出较高的要求;(4) miRNA成熟体序列也在其初始转录体(pri-miRNA)和前体(pre-miRNA)中出现,这就要求对miRNA成熟体的扩增具有较高的特异性,避免同时扩增其非成熟体;(5) miRNA数量多,且存在多个“家族”,家族成员之间的序列同源性很高,可能仅相差1 nt^[5],这就要求RT-qPCR实验对miRNA家族各成员具有良好的分辨率。针对以上技术难点,研究者开发了多种不同的miRNA RT-qPCR方法。虽然方法各不相同,但共同思路都是在逆转录阶段或预扩增阶段生成比miRNA长度明显延长的互补DNA(complementary DNA, cDNA),以满足上、下游引物、荧光探针等与cDNA互补结合的需求,保证后续的定量PCR过

程。为保持一致,本文一律将miRNA序列视为正向序列,所扩增的产物包含miRNA相同碱基序列者为正向引物。

1 MiRNA成熟体的RT-qPCR方法

对miRNA进行RT-qPCR检测的策略大致分为茎环引物法和加尾法^[4],直接逆转录法也有部分应用。此外还包括其他一些特殊的方法。

1.1 茎环引物法

该方法首先由Chen等^[6]于2005年提出。逆转录引物是一个具有茎环二级结构的寡核苷酸,其3'末端突出的约6 nt与待测miRNA的3'端互补配对结合,且茎环结构形成的空间位阻可减少非特异性的结合。MiRNA被此结构捕获后,在逆转录酶的催化下,以miRNA为模板合成cDNA。在PCR阶段,应用特异性的正向引物和通用性的反向引物进行扩增,并应用特异性的TaqMan探针进行产物含量监测(图1)。该方法在后续的研究中得到改进,发现将TaqMan探针改为通用序列,能够在不影响PCR扩增特异性的同时降低探针合成的成本^[7]。如果将逆转录引物与miRNA结合的互补序列延长至11 nt,并使用染料法进行定量PCR检测,能够明显提高检测效能,使含量较低的miRNA达到阈值的循环数降低^[8]。对于含量较低的miRNA或体积较小的组织,需提高miRNA的检测敏感性,可

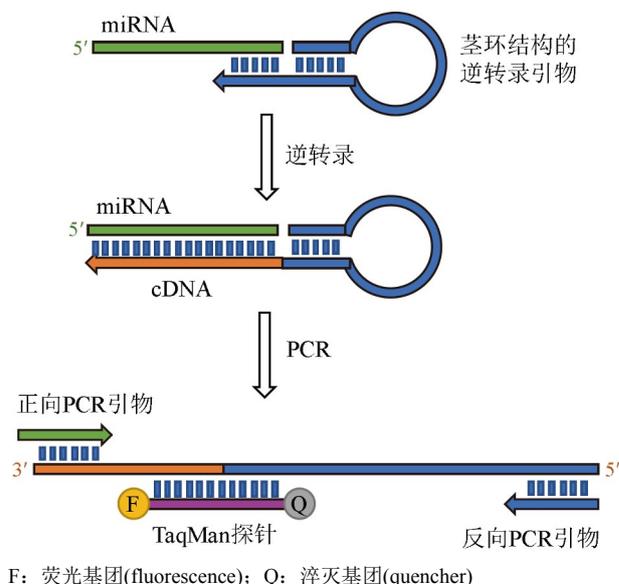


图1 茎环引物法的基本原理^[6]

在定量PCR之前进行预扩增,且通过在正向引物的5'末端增加额外序列来延长模板的长度^[9]。

对于一些同源性非常高,甚至仅1 nt差异的miRNA家族(如let-7家族),在RT-qPCR中进行有效分辨和特异性扩增是一个技术难点。将茎环结构逆转录引物的非miRNA互补区设计为几种不同的序列,从而使PCR中的反向引物由完全通用改为相对特异的序列,能够有效解决这一问题^[10]。

此外,有学者以经典的茎环引物法为基础,开发了一些新的检测策略,最具代表性的是称为“哑铃PCR”(dumbbell PCR, db-PCR)的方法。以3'-db-PCR为例,用茎环结构将miRNA捕获后,并非立即进行逆转录反应,而是先用RNA连接酶(RNA ligase)将miRNA的3'末端和茎环结构的5'端连接,形成RNA-DNA连接体。以此为模板,以一条通用引物进行逆转录反应。同理,用茎环结构将miRNA的5'端结合并捕获后,可进行5'-db-PCR反应。若针对某条miRNA同时进行5'和3'端捕获,形成的连接体结构形似哑铃,故称之为“哑铃PCR”。该方法能够有效分辨miRNA家族5'或3'端的单核苷酸差异^[11]。另一种方法是应用一个两端均为茎环、中间茎部与待测miRNA全序列互补的结构对miRNA进行捕获,而后用限制性核酸内切酶将3'端的茎环切去,并用核酸外切酶将单链末端削平。被捕获的miRNA与茎部形成双链而免于核酸外切酶的消化,进而能够参与后续的PCR反应。该方法同样具有单核苷酸分辨率,且在miRNA捕获时在两端均形成空间位阻,因而能够有效区分miRNA成熟体和成熟体位于3'末端的miRNA前体^[12]。

1.2 加尾法

该方法首先应用poly(A)聚合酶在miRNA的3'端添加多聚A尾,而后用一条5'端为已知序列、3'端为多聚T的引物与之互补结合,进行逆转录反应。PCR过程通过miRNA特异性的正向引物,和通用序列的反向引物进行,并应用SYBR Green染料进行产物含量的监测(图2)。该方法亦具有较高的敏感性,且能够分辨miRNA的单核苷酸差异^[13,14]。如果将反向引物跨多聚A/T区设计,使其3'端包含miRNA特异性序列,且正、反向引物的5'端都添加部分核苷酸以延长PCR产物的长度,则能

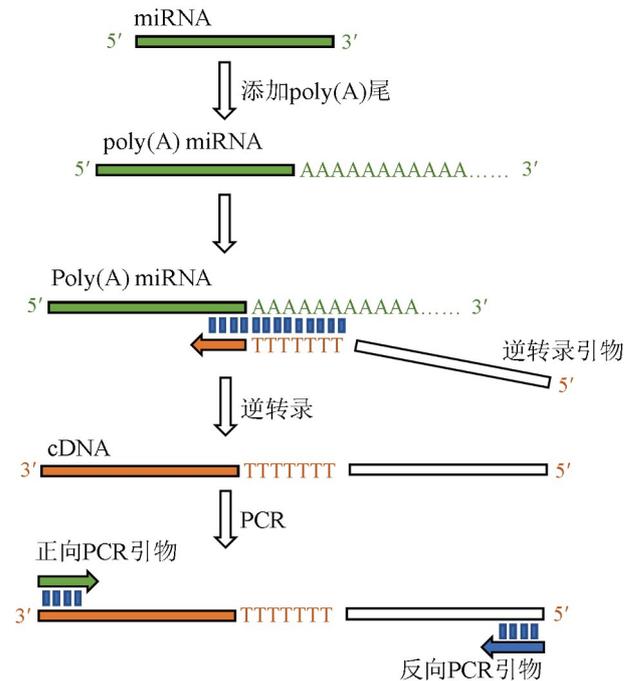


图2 加尾法的基本原理^[13]

够灵活调节引物的T_m值,获得更佳的扩增效率和特异性^[15]。

在一种由加尾法改进而来的方法中,所用的S-Poly(T)逆转录引物大致分为4部分,从5'端至3'端依次为逆转录引物结合区、TaqMan探针结合区、寡聚T序列区[oligo(dT)₁₁]和5~7 nt长度的与miRNA 3'端特异性结合区。以添加多聚A尾的miRNA为模板,逆转录生成cDNA后,使用特异性的正向引物和通用序列的反向引物进行PCR扩增,并用通用的TaqMan探针监测产物含量。此方法与传统的加尾法相比,能够将敏感性提高至少4倍,且特异性也很高,能够对let-7家族成员进行有效的分辨^[16]。

前述方法均为对miRNA添加多聚A尾,而另一种称为miQPCR的方法则是通过T4 RNA连接酶在miRNA的3'端添加一段27 nt、称为miLINKER的序列。以此序列为模板,通过一条25 nt的通用逆转录引物生成cDNA。在PCR阶段,应用特异性的上游引物和通用的下游引物进行扩增,通过SYBR Green染料对PCR产物进行定量。该方法能够灵活调节PCR引物的T_m值,对高度同源的miRNA家族具有良好的分辨率,且对细胞内和细胞外游离的miRNA均具有良好的检测能力^[17]。

1.3 直接逆转录法

MiRNA的RT-qPCR亦可采用直接逆转录，同时利用逆转录引物或预扩增过程对cDNA产物进行延长的方法。具体来说，首先设计逆转录引物，其5'端为已知序列，3'端与待测miRNA互补结合，通过逆转录反应生成初次延长的cDNA。而后设计一条正向引物1，其3'端与cDNA的3'端反向互补，二者互为模板进行预扩增，即所谓的重叠PCR，得到双向扩增的序列，使扩增子的长度得到进一步延长。在正式的定量PCR阶段，应用通用的正向引物2和与逆转录引物序列相同的反向引物进行扩增，并用水解探针或SYBR Green染料监测产物含量(图3)。该方法同样具有良好的敏感性和适宜的

扩增范围，但研究者并未检测其对高同源性miRNA的分辨率^[18,19]。在该方法的引物序列设计中，有学者引入了模块化的概念，使引物各部分的功能更加清晰。逆转录引物被分为三部分，由5'至3'依次为约21 nt的RT-Z、约28 nt的RT-Y和约7 nt的RT-X。其中，RT-X与miRNA的3'末端互补识别，RT-Z为反向引物结合区域，RT-Y为二者之间的间隔序列。针对不同的待测miRNA，仅需改变RT-X的序列即可。类似地，正向引物(研究者视为反向引物)也分为约6 nt的延伸序列RP-X和约15 nt的miRNA特异性序列RP-Y。该方法具有miRNA单核苷酸差异的分辨率^[20]。类似的策略也见于一种线性-茎环可变引物介导的RT-qPCR方法。与上述

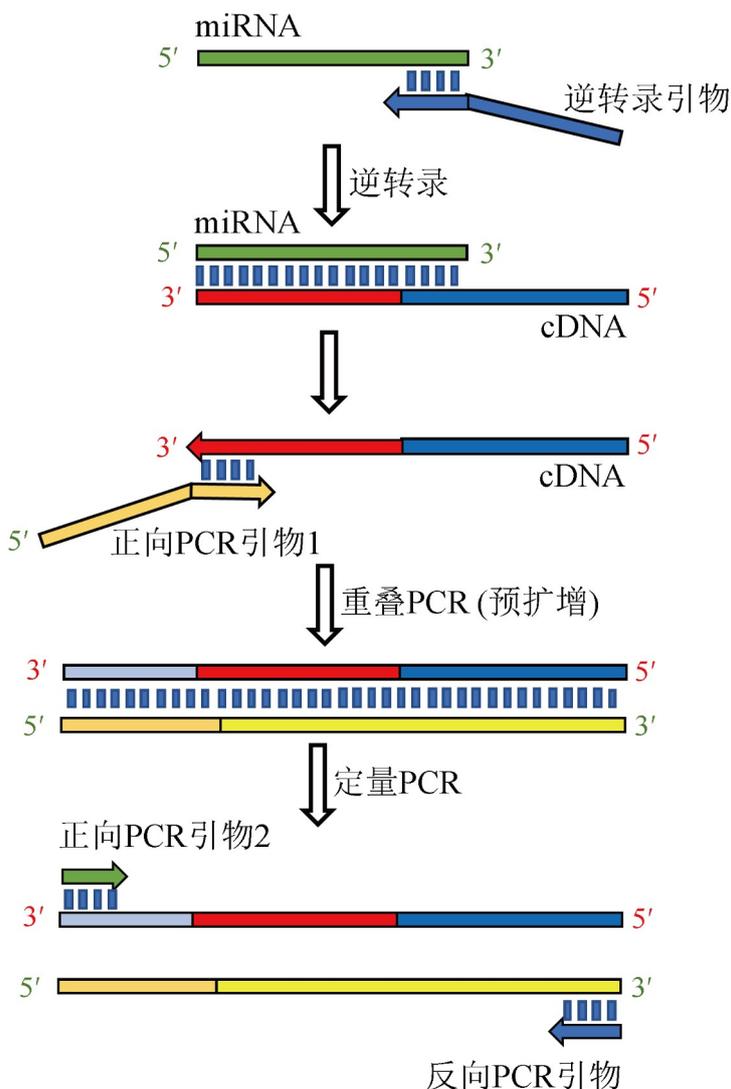


图3 直接逆转录法的基本原理^[19]

方法不同的是,该方法通过对引物进行设计,使miRNA为模板初步合成的cDNA形成一个不完整的茎环结构,再由自身为模板形成完整的茎环,以此为定量PCR反应的模板。该方法的优势在于可在单次反应中同时检测多个miRNA,提高检测的通量^[21]。

1.4 其他方法

除以上方法外,还存在一些特殊的miRNA RT-qPCR策略。一种称为miR-ID的方法,首先应用RNA连接酶将miRNA进行环化,而后用长度约10~13 nt的引物进行逆转录反应。由于模板为环状,cDNA产物包含数量不等的串联重复序列,称为反义序列单元。PCR引物根据重复的序列单元设计,且为5'重叠,即正、反向引物的5'端17~20 nt为反向互补,3'端2~4 nt为悬垂。PCR过程可产生一系列不同长度的产物,并通过SYBR Green核酸染料进行荧光监测,无需特殊修饰和标记的引物或探针,且具有很好的敏感性和特异性。串联重复序列的存在也使引物设计更加灵活^[22]。

此外,一些策略采用了具有特殊二级结构的探针对待测miRNA进行捕获,并在捕获后进行逆转录反应。一种称为螯状探针的开环DNA序列用来识别待测miRNA,其与miRNA结合的区域是跨开环位点的。由于禽髓母细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus, AMV)逆转录酶能够以单链DNA为模板、以RNA片段为引物合成DNA链,在AMV逆转录酶的催化下,miRNA的3'端将沿环状探针延伸,至miRNA的5'端时发生链置换反应。这一反应使miRNA的5'端游离作为逆转录的模板,同时开环探针的3'端与miRNA互补结合,进而逆转录生成待测miRNA特异性的序列。上述逆转录产物可作为PCR的模板,进行以TaqMan探针为信号的定量PCR分析。针对let-7家族成员的检测证实该方法分辨率良好,成员间交叉反应低于5%^[23]。另一种方法称为双尾RT-qPCR,其miRNA捕获结构两端各含有一个特别设计的“半探针”。其中,5'端的半探针与miRNA的5'端部分序列结合,其结合序列稍长,可提高捕获的特异性;3'端的半探针与miRNA的3'端部分序列结合,长度稍短,为5~6 nt,以降低PCR引物之间的序列重叠。连接半探针的部分设计为茎环结构,以减少非特异性结合。

在逆转录酶的催化下,逆转录反应由半探针的3'端起始,通过链置换反应至miRNA模板的5'端结束。如此得到的DNA产物两端均包含miRNA的相关序列,因此使用SYBR Green染料对miRNA进行定量PCR分析即能获得良好的特异性。独特的半探针设计也提高了miRNA捕获的敏感性^[24]。

2 荧光信号的监测: 探针法还是染料法?

实时定量PCR要求通过荧光信号值,对扩增产物的数量进行实时监测。较为常用的荧光信号来源为以TaqMan探针为代表的荧光标记的水解探针和以SYBR Green染料为代表的核酸染料。TaqMan探针是与靶序列的扩增区互补结合的探针,5'端和3'端分别标记荧光基团和淬灭基团。探针完整时,荧光基团被淬灭,检测不到荧光信号。当反应体系中存在靶序列时,探针与靶序列结合,并随PCR过程被降解,荧光基团可被检测到。该方法由于探针的存在提高了扩增的特异性,但对探针设计和反应条件需进行探索和优化,且探针合成的费用较高。SYBR Green染料是一种与双链DNA发生特异性结合并发出荧光的染料,其检测方法简单、价格低廉。但其与双链DNA的结合无选择性,因此无法区分目标产物与可能的非特异性扩增,需辅以熔解曲线分析确定产物的特异性。在miRNA的RT-qPCR实验中,荧光信号的来源与PCR扩增策略之间没有必然的联系,在同一种扩增策略中,可以根据需要选择使用探针法或染料法。由于染料法具有简便、经济的特点,在miRNA的RT-qPCR实验中得到越来越多的应用^[25]。

3 总结

应用定量RT-qPCR方法检测细胞或组织中miRNA的水平是miRNA功能研究的重要内容,而miRNA成熟体序列较短的特性也决定了其定量RT-qPCR需采取特殊的策略。现有的miRNA成熟体RT-qPCR检测方法总结于表1。一种较优的方法常具备以下特点:(1)检测的动态范围广,一般能够在7~8个数量级的miRNA拷贝数范围中表现出良好的线性关系,满足大多数生物样品中miRNA定量的需求。(2)灵敏性强,能够准确检测样品中较低

表1 MiRNA成熟体的RT-qPCR方法总结

类型	主要过程	荧光监测方式	单核苷酸分辨率	检测动态范围	参考文献
茎环引物法	方法建立, 用茎环结构引物捕获miRNA并进行逆转录反应	探针法	良好	良好	[6]
	将TaqMan探针改为通用序列, 降低成本	探针法	未检测	良好	[7]
	延长miRNA与茎环的互补区	染料法	未检测	良好	[8]
	定量PCR检测前进行预扩增, 并在正向引物的5'端增加额外序列	探针法	未检测	良好	[9]
	将茎环结构的非miRNA识别区设计为几种不同的序列, 提高特异性	染料法	良好	良好	[10]
	“哑铃PCR”, 识别miRNA末端的单核苷酸差异	探针法	良好(末端)	良好	[11]
	哑铃结构捕获miRNA, 核酸酶双链保护法生成PCR的模板, 无逆转录过程	染料法	良好	良好	[12]
加尾法	方法建立, 在miRNA的3'端添加多聚A尾, 再进行逆转录反应	染料法	良好	良好	[13,14]
	引物5'端添加额外序列。反向引物延长, 跨多聚A/T区设计	染料法	良好	良好	[15]
	S-Poly(T)逆转录引物, 序列分为4个明确的功能区	探针法	良好	良好	[16]
	在miRNA的3'端连接miLINKER序列, 而非多聚A尾	染料法	良好	良好	[17]
直接逆转录法	用5'端固定、3'端与miRNA互补的引物进行逆转录, 重叠PCR预扩增后进行定量PCR	探针法、染料法	未检测	良好	[18,19]
	逆转录引物和正向PCR引物模块化设计, 各部分功能清晰	染料法	良好	良好	[20]
	线性-茎环可变逆转录引物, cDNA形成茎环结构	染料法	良好	良好	[21]
其他方法	miR-ID法, miRNA环化后逆转录, 生成串联重复序列的cDNA; 用5'重叠的PCR引物生成一系列不同长度的产物	染料法	良好	良好	[22]
	开环的螯状探针捕获miRNA, 链置换反应游离miRNA, 探针3'端结合于miRNA进行逆转录	探针法	良好	良好	[23]
	双尾RT-qPCR, 5'和3'半探针捕获miRNA, 逆转录并发生链置换反应, 延伸至miRNA的5'端	染料法	良好	良好	[24]

含量的miRNA。(3)特异性强, 能够分辨miRNA的单个核苷酸差异, 在检测高同源性序列的miRNA时交叉反应低。由于let-7家族成员较多, 且序列最相似的成员间仅有1 nt的差异, 因此常用let-7家族成员进行特异性检测。(4)检测结果具备良好的稳定性和可重复性。(5)相关引物和探针等序列设计简单, 操作简便, 花费低。未来也将开发更多针对miRNA的RT-qPCR策略, 为miRNA的功能学研究提供更多可靠的实验方法。

参考文献

- [1] Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1): 3-11
- [2] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-3600
- [3] Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 132
- [4] Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(5): 358-369
- [5] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. MiRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database): D154-D158
- [6] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [7] Jung U, Jiang X, Kaufmann SHE, et al. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *RNA*, 2013, 19(12): 1864-1873

- [8] Tong L, Xue H, Xiong L, et al. Improved RT-PCR assay to quantitate the pri-, pre-, and mature microRNAs with higher efficiency and accuracy. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(10): 939-946
- [9] Lao K, Xu NL, Yeung V, et al. Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(1): 85-89
- [10] Wang Y, Zhou J, Chen Y, et al. Quantification of distinct let-7 microRNA family members by a modified stem-loop RT-qPCR. *Mol Med Report*, 2017, 17(3): 3690
- [11] Honda S, Kirino Y. Dumbbell-PCR: a method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(12): e77
- [12] Li X, Ni M, Zhang C, et al. A convenient system for highly specific and sensitive detection of miRNA expression. *RNA*, 2014, 20(2): 252-259
- [13] Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525
- [14] Ro S, Park C, Jin J, et al. A PCR-based method for detection and quantification of small RNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(3): 756-763
- [15] Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 70
- [16] Kang K, Zhang X, Liu H, et al. A novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48536
- [17] Benes V, Collier P, Kordes C, et al. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 11590
- [18] Zheng W, Di Y, Liu Y, et al. Development and application of a novel reverse transcription real-time PCR method for miR-499 quantification. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1566-1571
- [19] Kim KJ, Kwak J, Lee JH, et al. Real-time qRT-PCR assay for the detection of miRNAs using bi-directional extension sequences. *Anal Biochem*, 2017, 536: 32-35
- [20] Zhang W, Zhang J, Zhang Q, et al. Highly specific real-time quantification of diverse microRNAs in human samples using universal primer set frame. *Anal Biochem*, 2018, 543: 71-78
- [21] Lan L, Guo Q, Nie H, et al. Linear-hairpin variable primer RT-qPCR for microRNA. *Chem Sci*, 2019, 10(7): 2034-2043
- [22] Kumar P, Johnston BH, Kazakov SA. miR-ID: a novel, circularization-based platform for detection of microRNAs. *RNA*, 2011, 17(2): 365-380
- [23] Huang T, Yang J, Liu G, et al. Quantification of mature microRNAs using pincer probes and real-time PCR amplification. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120160
- [24] Androvic P, Valihrach L, Elling J, et al. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(15): e144
- [25] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 2003, 3(1): 18