

# EBIOTECH

microRNA研究手册

特刊

2010年4月7日

全文下载

## [microRNA的提取]

如何提取小小的miRNA?

miRNA专家谈之一：如何高效地提取和克隆?

## [microRNA的定量和检测]

聚焦7款热门miRNA表达谱芯片

miRNA专家谈之二：如何绘制表达谱并验证?

miRNA分析中的qRT-PCR疑难解答

## [microRNA的功能分析]

miRNA的功能分析策略

miRNA海绵—长效抑制miRNA

miRNA专家谈之三：如何上调或下调miRNA?

## [相关产品]

ABI：少量RNA也能进行高通量的miRNA表达图谱分析

TaqMan低密度miRNA芯片新升级

TaqMan Pri-miRNA Assays：检测MicroRNA表达的起源

联川生物：miRNA表达谱分析的一站式解决方案

Exiqon推出全新的miRNA分析平台

Febit新型微流体miRNA表达谱芯片

Signosis miRNA检测芯片 简单又高效

联川生物隆重推介Seq-Array服务

# 如何提取小小的 miRNA?

近年来，microRNA (miRNA) 成了生命科学和医学研究中的明星。这种 22 个核苷酸的小分子在基因表达调控中起着至关重要的作用，它似乎掌控着多把开启科学之门的钥匙，例如发育、分化和凋亡。而它又与多种癌症和疾病息息相关。正因为它是如此重要，大家都迫不及待地想把它看清楚。miRNA 相关的技术和工具也越来越多，生物通就先来谈谈其中最基本的工具——miRNA 的提取。

无论是芯片分析，还是 miRNA 的克隆，miRNA 的提取都是最基础的步骤。以往传统的 RNA 提取试剂盒都是为了回收 mRNA 而设计的，往往会弃去较小的 RNA 分子以提高 mRNA 得率，而这些步骤会导致 miRNA 的损失。多数 RNA 纯化试剂盒采用标准的玻璃纤维滤膜或者硅胶滤膜，不能有效地回收小分子 RNA。不过，为了顺应市场的需求，各大公司纷纷推出 miRNA 提取产品。

不同的样本有不同的试剂盒相对应。细胞、组织这种最常见的样本当然有多种试剂盒可用，不过血液、FFPE 样本也不用担心。生物通来为你一一介绍。

Ambion 的 mirVana miRNA Isolation Kit 是最早上市的 miRNA 提取试剂盒，也是应用最广的，查阅 miRNA 的相关文献，很多都用了 Ambion 的这个 kit。它采用改良的玻璃纤维滤膜方法来快速回收细胞或者组织样本中全部 RNA，包括 miRNA。样品量为  $10^2$ - $10^7$  个细胞，或者 0.5-250mg 组织。首先用变性裂解液裂解样品，让 RNase 失活，使 RNA 稳定。裂解液随后用酸-酚：氯仿来萃取，去除大部分细胞成分，留下半纯的 RNA 样品。然后再通过玻璃纤维滤膜来进行纯化，不过在最后一步之前，你要做一个选择，是纯化总 RNA 呢，还是只纯化小分子 RNA。如果你想要用芯片做 miRNA 表达图谱研究，我们还是建议你先纯化总 RNA，再用胶纯化富集 miRNA，这样做似乎麻烦了一些，但它能准确

地定量 RNA，并评估它的质量，来确认是否能用于芯片分析。纯化总 RNA 的步骤就与一般的 RNA 纯化类似。而纯化小分子 RNA 则多了一步：先用 25% 的乙醇将大的 RNA 固定住，小分子 RNA 以滤出液形式收集，然后将乙醇浓度提高到 55%，把小分子 RNA 固定住，最后是洗涤和洗脱，就可以富集 200nt 以内的 RNA 片段。它的价格是 3630 元，能纯化约 40 次，单次价格在 90 元。

核酸提取一贯是 QIAGEN 公司的绝活，对于 miRNA 这样的小分子，QIAGEN 自有妙招。它推出了 miRNeasy Mini Kit，能从多种动物组织和细胞中纯化 miRNA 和总 RNA。这个 kit 也是结合了基于酚/胍的样品裂解和经典的硅胶膜离心柱，配上优化好的各种 buffer，只要 RNA 大于 18nt，就能照单全收。最大样品体积为  $10^7$  个细胞，或 50mg 组织（脂肪组织可以达 100mg）。这个 kit 的价格就相对更平易近人了，50 次的目录价为 3130 元，每一次只需要 62.6 元，要是碰上打折促销，那就更美了。不过如果你只想要 miRNA，还需要另一个 RNeasy MinElute Cleanup Kit 来协助。miRNeasy Mini Kit 适于样品不太多的情况下分析，如果你做高通量分析，则 miRNeasy 96 Kit 更合适。

分子生物学的老大哥 Invitrogen 公司自然也不甘落后，在 miRNA 方面推出了一系列产品。除了大家熟悉的 Ncode miRNA 芯片外，还有 PureLink miRNA Isolation Kit。这个试剂盒的原理与 Ambion

的有些类似，都是样品裂解后，在低乙醇浓度下将小分子RNA洗脱，然后将乙醇浓度提高，小分子RNA固定在硅胶膜上。不过它的样品量比较小，细胞不得超过  $10^6$  个，组织最多 5mg，这样看来价格就有些小贵了，2592 元/ 25 次。如果你想要的是包含miRNA的总RNA，来方便评估RNA的质量，还是用最经典的TRIzol吧。它可以抽提所有RNA，价格也相当实惠，1050 元/ 100ml，真可谓物美价廉，难怪很多文献中还是提到了它。

以化学品起家的 Sigma-Aldrich 这几年也开始在分子生物学上发力了，去年底推出了 mirPremier microRNA Isolation Kit，它是采用一种新颖的方法来提取小分子 RNA 的，不需要用酚和氯仿，更加安全，而且速度很快，只需要 30 分钟，就能得到多达 20ng 的小分子 RNA，用于 RT-PCR 或 Northern blot。哺乳动物细胞、动物组织、植物组织和微生物培养物都可以用这个 kit 来提取 miRNA，价格也相对便宜，50 次的只需要 3024.45 元。当然，它也可以用来提取总 RNA。

上面说的这些试剂盒都是适用于普通的细胞或组织，如果你的样品是甲醛固定石蜡包埋（FFPE）的组织呢，也不用发愁，还是可以有很多的选择的。

Roche 的 High Pure miRNA Isolation Kit 就是一个多面手，它不仅能从细胞、动植物组织中提取 miRNA，还能从 FFPE 样品中提取。它适用的 FFPE 样品大小为 5-10um (1cm×1cm)，先用二甲苯脱蜡，乙醇洗涤之后再用裂解液、SDS 和蛋白酶 K 处理，后面的流程就与普通的组织一样了。除去脱蜡和蛋白酶 K 这些比较繁琐耗时的步骤之外，其他步骤只需要 30 分钟，不过提取效率可是与蛋白酶 K 的消化步骤密不可分哦，千万不要急于求成，草草消化了是。此 kit 的价格为 3982 元（50 次），单次售价 79.64 元。考虑到它的应用范围更广，内含的试剂也多了两种，应该还算合理吧。

QIAGEN 的 miRNeasy 提取试剂盒也有 FFPE 的版本。miRNeasy FFPE Kit 用了一个全新的方法来去除 RNA 与甲醛的交联，使下游应用中 RNA 的表现更好。另外，它还引进了独特的 gDNA 去除柱，无需 DNase 消化即可去除基因组 DNA 的污染。价格嘛，当然比 miRNeasy Mini Kit 贵一些，3650 元/ 50 次。Ambion 也新推出了专利的 RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit，专门是为提取 FFPE 样品中的 DNA 和 RNA 而设计的，提取的核酸中包括了样品中全部的 miRNA，配合 flashPAGE Fractionator 系统和 mirVana miRNA Array 可用于 miRNA 表达图谱分析。RecoverAll 这个试剂盒本来的价格挺贵，40 次价格为 3927 元，但现在正好赶上 ABI 和吉泰联手搞促销，买一送一，那就非常划算了。

假如你的样品是血液，上面这些试剂盒似乎都不太合适，没关系，下面将有三个候选 kit 闪亮登场。第一位大家都不陌生了，就是 TRIzol LS (invitrogen)。它可谓是 TRIzol 的同胞兄弟了，其实大家本质都是一样的，唯一不同的只是其中成分的浓度，TRIzol LS 更浓一些，所以更适用于液体样品。TRIzol LS 可以取代 TRIzol 用于固体样品，不过一定要稀释。反之，TRIzol 则不能替代 TRIzol LS，那只会导致产率下降。

第二位则是 Ambion 公司选送的 LeukoLOCK Total RNA Isolation System。它是专为人血优化设计的，采用了创新的过滤柱来分离白细胞，可免去离心之苦，一次可处理 9-10ml 血液。然后再加入其中的 RNAlater，能保护分离的白细胞 RNA 不被降解，室温时可以放置三天，低温下则可以保存几个月。之后你可以通过内含的磁珠来提取 RNA，不过如果你要做 miRNA 分析，Ambion 还提供了一个替代方法，将 LeukoLOCK 分离柱与 TRI Reagent 结合使用，就能得到包含小分子 RNA 的

总 RNA，而且 RNA 的质量和纯度保持不变，产量则显著提高了~50%-100%。

最后一个还是 Ambion 公司的，谁叫人家是 RNA Company 呢，RNA 方面本来就是它的强项。RiboPure-Blood Kit 适于加了抗凝血剂的全血，不超过 0.5ml。对于 miRNA 分析的使用者来说，提取步骤和标准的 protocol 有一点区别，Ambion 稍稍做了改动，以便更好地提取小分子 RNA。不过这个 kit 也是针对人血的，如果你的样品是小鼠或大鼠，你可以选 Mouse RiboPure-Blood RNA Isolation Kit。它们都含有 RNAlater 稳定剂。

有时只是分析 miRNA 的表达谱还不够，你还想了解 miRNA、mRNA 和蛋白水平的关联性，可是，样品本来就少，怎么办呢？现在不用一分为二了，有一个 2 合 1 的试剂盒，mirVana PARIS Kit，不要误解了，这个 PARIS 跟巴黎可没什么关系，它代表 Protein And RNA Isolation System。它能同时提取样品中的天然蛋白和所有的 RNA，包括小分子 RNA，如 miRNA、snRNA 和 snoRNA。这个 kit 用了一种特殊的细胞裂解 buffer，裂解之后蛋白保持完整，能直接用于双向电泳、Western Blot 或酶分析。而剩余的裂解液就继续用于提取 RNA，得到的 RNA 可用于 RT-PCR、杂交或芯片

分析。一次实验就得到了所有想要的组分，真是两全其美。

提取完 RNA 之后，当然还要看看 RNA 的量有多少，纯度如何。测 OD260、280 是最常用的方法，不过准确性不太高。文献中最常用的还是 Agilent 2100 Bioanalyzer。微量、快速和自动化是 2100 生物分析仪最主要的特点。核酸样品只需要 1ul，蛋白质和细胞样品也只需要 4ul 和 10ul，节省了宝贵的样品；5 分钟内可完成样品上样，30 分钟完成整个芯片的样品分离和数据分析，快速简便；自动化分析，只需手工上样，无需更多操作。不过最吸引用户的还是 RIN — RNA Integrity number，这是安捷伦特有的专利保护 RNA 完整性指数，全面考虑各种 RNA 的因素，经专利函数计算而得。全球 82% 的芯片领域用户将其作为 RNA 质控标准，可以说是全球公认的 RNA 质控金标准，难怪这么多人信任它。

miRNA 提取试剂盒这个看似简单的东西，其中也有不少讲究。希望这篇文章能帮你选择到最适合的产品。更多 miRNA 相关的文章，敬请期待！

（生物通 余亮）

[有免费的高效RNA提取试剂派哦，数量有限，先到先得！](#)

# miRNA 专家谈之一：如何高效地提取和克隆？

生物通编者按：尽管第一个 microRNA 是在 1993 年发现的，但直到最近几年，人们才开始了解这种小 RNA 分子的大作用。miRNA 通过与转录本的相互作用，关闭或抑制基因的表达。最近的研究表明它们影响了约三成的基因。miRNA 在多个组织中差异表达，这就让表达图谱分析成为研究的重点。同时，miRNA 的过表达和抑制也是近年来常用的研究方法。

然而，miRNA 很小，这就增添了研究的难度。如何从细胞中提取和纯化 miRNA？如何上调或下调特定的 miRNA？如何验证结果？全靠自己摸索，体会是很深，但时间也花不少。生物通收集了来自顶尖研究院的专家的实际操作经验，这将让你少走弯路。

## Q1：你如何从细胞中高效分离并纯化miRNA？

**Galina Gabriely (哈佛大学)**

对于 miRNA 的分离，我们一般采用 TRIzol 试剂，它通常用于总 RNA 的分离。这种方法足以从培养的细胞系中纯化 miRNA。不过，如果是从少量或质量差的组织样品中分离 miRNA，我们则使用 Ambion 的 [mirVana miRNA Isolation Kit](#)。有了这个试剂盒，可通过总 RNA 提取或小 RNA /miRNA 富集的步骤分离 miRNA。

**Peng Jin (埃默里大学)**

我们一般采用 TRIzol 从细胞中分离 RNA。对于从组织或细胞中回收小 RNA，TRIzol 非常有效。

**Winston Kuo (哈佛大学)**

总的来说，我们实验室采用几种方法，这取决于图谱分析所使用的方法。TRIzol 和 Ambion 的 mirVana miRNA 分离试剂盒都很有效。其他方法也很管用。对于某些技术，不需要分离或纯化；只需要直接加入裂解液。RNA 样品制备的关键问题

是有效沉淀小 RNA 组分。传统的使用 70% 乙醇洗涤的方法不能有效沉淀 miRNA。将乙醇浓度增加到 80% 以上，就能解决这个问题。

**Joshua Mendell (约翰霍普金斯大学)**

对于细胞和组织的表达分析，直接的总 RNA 分离方法就很好。我们一般使用 TRIzol。根据我们的经验，不需要更复杂的过柱方法或进一步纯化小 RNA。而且，在测定这些样品中的 miRNA 时，DNA 污染似乎不是个问题。如果我们希望特定研究细胞中的小 RNA 群体，比如对小 RNA 文库进行测序，我们会对 TRIzol 提取出的总 RNA 进行胶纯化。[免费索取 TRIzol 的资料](#)

**Silvia Monticelli (瑞士生物医学研究所)**

如果你的细胞或组织量没有限制，常规的 TRIzol 提取就已足够，质量和重复性都很好。我们一般将这种方法提取的 RNA 用于 Northern blot 和定量 PCR，以检测 miRNA，结果的重复性很高。如果你的起始材料有限，就有点棘手。你仍可以用 TRIzol，但是需要改进 RNA 沉淀步骤。我们发现加入一些糖原，结果不错。另外，你也可以用 Ambion 的 mirVana 离心柱试剂盒来富集小 RNA 组分。

## Q2：你如何有效克隆miRNA？

**Peng Jin (埃默里大学)**

它取决于克隆 miRNA 的目的。如果是 miRNA 发现或高通量测序，我们会使用 5'和 3'接头连接，来产生小 RNA 库。如果是已知的 miRNA，我们想了解它的表达，一般会用 PCR 扩增包含目的 miRNA 的 DNA 片段，然后在适当的载体上验证它的表达。

#### **Winston Kuo (哈佛大学)**

在克隆 miRNA 时，有几个问题。如果你想克隆 miRNA 周围的一大段基因组背景（如上游启动子/增强子区域），以了解内源转录调控和加工，可使用标准的 PCR 方法来生成带有酶切位点的 miRNA 片段，再克隆到载体上。如果你只是想克隆 miRNA 的编码序列，没有或很少侧翼序列，可以采用与 shRNA 相同的步骤。你只需要合成编码

miRNA 的 oligo，上面含有适当的垂悬，退火之后与线性化的载体连接。当实验需要过表达，而不涉及内源转录/加工时，就常常采用这种策略。

#### **Joshua Mendell (约翰霍普金斯大学)**

为了从基因组 DNA 上克隆 miRNA 编码序列，我们通过 PCR 扩增 pre-miRNA 发夹结构及 100 bp 的 5'和 3'侧翼序列。这些片段能直接克隆到任何表达载体（有 RNA 聚合酶 II 启动子）上，并实现可靠的表达。

如果想直接克隆成熟的 miRNA（比如说鉴定新的 miRNA），首先通过胶纯化从总 RNA 中纯化出小 RNA。然后与接头连接，PCR 扩增后直接用新一代测序技术（454、Illumina、SOLiD）来测序。

# 聚焦 7 款热门 miRNA 表达谱芯片

近几年，microRNA (miRNA) 的光芒已经盖过 siRNA、mRNA，成为分子生物学中最闪耀的明星。细胞的发育、分化、增殖、凋亡，每个过程都有 miRNA 的调控，自然，它也与癌症发育息息相关。在许多人类肿瘤病例中，都发现 miRNA 表达异常，要么是成熟的 miRNA，要么是前体 miRNA，抑或二者皆有。miRNA 也“戏路颇广”，既饰演正面人物-肿瘤抑制基因，有时也会扮演大反派-癌基因。

如此有潜质的生物标志物，研究人员自然不会视而不见。于是，miRNA 表达谱分析成为 miRNA 研究中必不可少的一环。对于这种高通量的表达谱分析，芯片当然是首选。芯片采用大规模微阵列技术，一张芯片上包含成千上万个探针，大大提高了筛选的速度和通量。研究人员一般使用商业化的芯片，也有一些实验室使用定制的芯片。当然，还有一些公司还提供全套服务。2005 年，Invitrogen、Exiqon、LC Sciences 等陆续推出 miRNA 芯片技术服务。对于这个变化极快的新领域而言，service 是再合适不过了，因为可供参考的文献也不多，面对大量的数据，你可能一筹莫展。而服务公司经过多年的数据统计，发展了一套完善的数据分析系统，能够为客户快速锁定研究目标。

很多公司都推出了 miRNA 表达谱芯片，比如 LC Sciences、Exiqon、Invitrogen、febit 等等。各家公司的芯片有不少差异，比如芯片本身，探针、底物、样品量等。有些厂家能够在芯片上快速加入新发布的序列或客户要求的序列。还有的芯片能处理多个样品类型比如 FFPE 组织，这对临床应用很关键。当然，利用芯片来研究 miRNA 也有一些缺点，比如耗时较长，特异性问题和交叉杂交的风险，因为成熟的 miRNA 序列都很相似。

生物通这就带大家来看看各大公司的 miRNA 芯片，了解一下它们各有什么特点，或者出了什么新产品。

## 微流体芯片

miRNA 研究领域发展之快，可用日新月异来形容。miRBase 数据库也是一而再，再而三地升

级，让各大公司奋力追赶。在 2009 年 9 月 miRBase 升级到 14.0 版的消息甫一发布，LC Sciences 和 febit 就立马宣布其芯片升级。这是因为 LC Sciences 和 febit 都使用了微流体芯片，这让他们能够快速更新。

LC Sciences(中国子公司为联川生物)采用[微流体 uParaflo® 芯片](#)，再结合光敏酸化学技术和数字光控技术，保证了芯片体系的灵活性、高保真性（最长合成碱基可以到 100nt）以及杂交体系的稳定性。微流体芯片是由数以千计的三维小室组成的闭合系统，隔绝了与空气接触的机会，不存在荧光染料的氧化和衰退问题；微流体技术还使得阵列上的样品溶液分布均一，同时促进了杂交反应，提高了洗脱过程的严谨性，因此 LC Sciences 的芯片可以实时监控扫描，针对每次非特异性杂交的洗脱过程进行实时监控，确保最后特异性杂交信号值的采集。同时，它引入了光敏酸 (PGA) 去保护法来进行探针分子常规单体的合成，而这一点在进行 miRNA 芯片合成时显现得尤为重要，由于成熟 miRNA 很短小，因此在进行探针原位合成时，需要进行碱基的修饰来提高杂交探针的检测灵敏度、特异性、均一化。

值得一提的是，LC Sciences 芯片的探针经过特别合成，Tm 值均一，提高杂交了的检测性和特异性。检测探针由目的序列的互补碱基和一个非核苷酸分子的伸展臂组成，伸展臂减少了空间位阻影响，提高了探针和目的片段的结合能力。

由于采用了微流体技术，LC Sciences 的 miRNA 芯片除了实时更新外，还可以灵活定制，

比如目前很多新发现的 miRNA 都可以加入它的芯片平台，进行表达谱分析实验。另据 LC Sciences 的商业发展总监介绍，该公司正在研发 miRNA 与 mRNA 共表达芯片，预计在今年上半年上市，届时科研人员将可以在同一时期、同一反应、同一芯片平台上研究两者的表达关系。

德国 Febit 公司也是与时俱进的先进分子，它与吉奥生物联合推出了与 Sanger miRBase 14.0 同步的 miRNA 表达谱芯片。芯片采用独特的 Geniom 微流体技术，即时酶标方法，以及全自动化的芯片处理，以极少量样本实现高灵敏度、高重现性的精确检测。芯片上有 8 个分开的微通道，每个含 15,624 阵点。此外，该芯片还采用了一种独特的微阵列方法，叫作微流引物延伸检测 (Microfluidic Primer Extension Assay, MPEA)，这种检测方法以 Febit Geniom® 微阵技术的使用为基础，miRNA 在杂交前无需标记。接着，DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段直接加入微量流动芯片的通道中，相应的 miRNA 得以特异延伸。此方法将杂交检测的特异性与酶延伸的高辨别能力相结合，相对于现有的其它微阵列方法，显示出不少优势。由于 miRNA 不需经过富集、PCR 扩增或标记等预处理而直接导入，这样就确保避免了实验误差的产生。

### 著名的 LNA 技术

microRNA 杂交的最大挑战是这些小 RNA 的大范围的退火温度。很难定义合适的杂交条件使得所有的 miRNA 都能特异而灵敏地检测。丹麦的 Exiqon 公司凭借其 LNA (Locked Nucleic Acid, 锁核酸) 技术，深受研究人员的青睐。DNA 探针和 miRNA 之间的键是不稳定的，因为 DNA 单体可在 N 构象和 S 构象之间来回移动。LNA 是 DNA 类似物，其亚甲基桥用于锁定糖环，让单体保持在 N 位置。在高温下，LNA/RNA 双链比 DNA/RNA 双链稳定。这增加了在微阵列筛选中的灵敏性和特异性，并减小了杂交误差。

Exiqon 的 [miRCURT 芯片](#) 的 LNA 探针与普通 DNA 捕获探针相比，可提升熔解温度，使得芯片上的所有探针 Tm 值均一化，所有 miRNA 杂交温度一

致，保证对所有靶点具有相同的亲和活性。杂交温度高 (60 度) 避免非特异结合，标记无序列偏向性，效率高，无需富集 miRNA，因而在灵敏度方面，LNA 芯片可以检测常规 DNA 探针无法检测到的极其微量的 miRNA。这意味着 Exiqon 的芯片是目前市场上最灵敏的，90% 的探针能够检测浓度在 10 attomolar 以下的 miRNA，只需 30 ng 总 RNA，就能进行图谱分析。此外，Tm 标准化的探针与优化的杂交条件相结合，可区分单碱基差异的 miRNA。

国内的康成生物是 Exiqon miRNA 芯片的独家代理商，不仅提供相关产品，而且技术人员还可以帮助完成实验操作和数据分析，只要提供给他们完好的组织或细胞样本，就可以拿到完整的实验报告。

### 一站式解决方案

Life Technologies 的侧重点则是提供 miRNA 分析的完整流程，从总 RNA 的抽提，到芯片分析，及 NCode Profiler 软件的免费数据分析，再到定量 RT-PCR 试剂盒的数据验证。

众所周知 TRIzol 是分离总 RNA 的王牌之选，同样在 miRNA 的分离上，TRIzol 也很有效。很多研究人员在实际分离 miRNA 时，都采用了 TRIzol，而不是专门的 miRNA 抽提试剂盒。他们认为，如果细胞或组织的起始量没有限制，常规的 TRIzol 提取就已足够，质量和重复性都很好。如果样品有限或质量较差，则可以使用 Ambion 的 mirVana miRNA 分离试剂盒。

Invitrogen 有两种预制的 miRNA 芯片，一种是针对人，另一种是多个物种的。[NCode Human miRNA 芯片 V3](#) 印制在 Corning 环氧化物包被的玻璃片上，点有优化的探针序列，能靶定 10.0 版 miRBase 数据库中所有已知的人 miRNA，以及 373 个假定的人 miRNA。NCode™ Multi-Species miRNA 芯片 V2 则靶定了 9.0 版 miRBase 数据库中人、小鼠、大鼠、果蝇、线虫和斑马鱼的所有成熟 miRNA。NCode 芯片早在 2005 年推出，当时可谓是引领潮流，不过现在看来有些落后了，至少从内容上看是如此，有待更新哈。

不过，Life Technologies 还有另一套秘密武器：TaqMan miRNA assay 和 TaqMan miRNA array，后者也适合高通量分析。对于小规模图谱分析，研究人员十有八九是采用 TaqMan miRNA assay，因其灵敏度和特异性俱佳，在 miRNA 数量不多时绝对是首选。其设计的巧妙创新之处在于 Megaplex 反转录中的引物并非随机引物，而是靶特异的茎环结构的反转录引物。这个创新设计解决了 miRNA 定量中的基本问题：成熟 miRNA 的短序列 (~22nt) 不允许在反转录反应中使用传统的随机引物。茎环结构提供了仅针对成熟 miRNA 模板的特异性，并形成引物/成熟 miRNA 嵌合体从 miRNA 的 3'端开始延伸。产生的较长反转录扩增产物能作为模板，用于标准的实时定量 PCR 分析。这样，miRNA 就可以被扩增了。

因为有了扩增，TaqMan MicroRNA Assay 就显得更加灵敏。研究人员只需要极少量的总 RNA 样品即可。DNA 预扩增步骤的引进更显著降低了起始 RNA 样品量。即使 1ng 的总 RNA，也能产生综合的表达图谱。

**TaqMan MicroRNA Array** 则是将 TaqMan MicroRNA Assay 的所有优势集合并预装成便利的微流体芯片形式，特别适合人、大鼠和小鼠的图谱分析。它的原理其实很简单，就是 384 个定量 PCR 反应集中在一块微流量板上进行。每个阵列的内容与各自的 Megaplex Primer Pools 匹配，包含最多 381 个独特的 TaqMan MicroRNA Assays，有效缩短了准备时间，并减少实验的不确定性。用 Megaplex RT Primers 反转录 miRNA 靶点及用 Megaplex PreAmp Primers 预扩增之后，TaqMan Universal PCR Master Mix 可与每个反应简单混合，并移至 TaqMan Array 的八个上样口中之一，一个工作日内就能产生覆盖 Sanger miRBase 的综合数据集。你只需一台 7900 定量 PCR 仪和 TLDA block 就能完成实验。如果没有这些仪器，也可以将整个分析外包给上海生物芯片中心。

### 更多选择

你也许猜不到，美天旎也推出了一款 miRNA 芯片，叫 **miRXplore 芯片**。别惊讶，美天旎除了金

标准的 MACS 技术，也有着 10 年的芯片开发经验呢。此款 miRXplore 芯片是与洛克菲勒大学的顶尖科学家共同设计和验证的，包含了 13.0 版 miRBase 中所有人、小鼠、大鼠和病毒 miRNA，并有 72 个对照，包括阳性、阴性对照和杂交对照等。为了让这些小 RNA 的退火温度一致，美天旎使用了专利的、优化的缓冲液，可以在不同的 AT 和 GC 碱基对之间降低退火温度，这样就可以在同一时间灵敏和特异地检测 miRNA。

那么如何保证芯片检测的特异性呢？美天旎利用人工错配的 miRNA 来进行实验。他们将人工错配的 miRNA 加到肝癌细胞、恶性胶质瘤细胞、海马细胞和 CD4+ T 细胞的总 RNA 中，以展示一个或两个错配探针的相对信号强度。结果显示即使在单碱基错配的情况下，交叉杂交信号仍低于 10%。因此，miRXplore 能够可靠地区别序列相似度高的 miRNA 家族成员。同时，美天旎也提供 miRXplore 芯片的技术服务。

另外一些公司也获得了 Exiqon LNA 技术的授权许可，Luminex 就是其中之一。它在第一款 FlexmiR 产品中使用了 LNA，但是它最近改换了一种新方法，不再依赖 LNA。这个第 2 版的 **FlexmiR Assay** 凭借 xMAP 技术的强大优势，能够在单个孔中分析 50 个不同的 miRNA，而无需样品标记或扩增。微小的聚苯乙烯珠上带有生物素化的捕获探针。在 miRNA 捕获之后，酶去除掉未结合的生物素，并切开所有错配。即使有一个碱基的错配，也看不到信号。整个操作过程从开始到结束只需 4-5 小时，手工操作时间只有 30 分钟。

Luminex 技术的多重分析能力，对于那些只研究特定 miRNA，且一次需分析多个样品的研究人员来说很有用。另外，据 Luminex 的研发人员介绍，Luminex 的产品对植物研究也特别棒，这对我们很多植物研究所而言真是福音。

从芯片上获得有意义的数据并不意味着大功告成，数据的验证也是相当关键的。如何验证数据？是采用 qPCR 还是 Northern blot？详见生物通近期发布的 miRNA 专家谈系列之一二三。专家亲身体验，不可错过。（生物通 余亮）

# miRNA 专家谈之二：如何绘制表达谱并验证？

**生物通**编者按：尽管第一个microRNA是在 1993 年发现的，但直到最近几年，人们才开始了解这种小RNA分子的大作用。miRNA通过与转录本的相互作用，关闭或抑制基因的表达。最近的研究表明它们影响了约三成的基因。miRNA在多个组织中差异表达，这就让表达图谱分析成为研究的重点。同时，miRNA的过表达和抑制也是近年来常用的研究方法。

然而，miRNA很小，这就增添了研究的难度。如何绘制灵敏而特异的表达谱？如何上调或下调特定的miRNA？如何验证结果？全靠自己摸索，体会是很深，但时间也花不少。**生物通**收集了来自顶尖研究院的专家的实际操作经验，这将让你少走弯路。

**Q1：你使用什么方法来确保灵敏而特异的miRNA表达谱？为什么？**

**Galina Gabriely (哈佛大学)**

我们通常利用多重定量 PCR 来对少量的人miRNA 进行小规模图谱分析。这种方法的灵敏度和特异性比芯片更好，因此在待分析 miRNA 数量不多时是首选。多重定量 PCR 图谱分析的准确性可用更加灵敏的单重分析来验证。

**Peng Jin (埃默里大学)**

我们一般采用 miRNA TaqMan 分析来确定特定 miRNA 的表达。我们尝试了多种方法，发现 TaqMan 的灵敏度和特异性更好。当然，在小 RNA 的数字表达谱上，我们也使用高通量测序，它与 TaqMan 分析有着很好的相关性。

**Winston Kuo (哈佛大学)**

我们已经使用过多种 miRNA 图谱分析技术，包括 Exiqon、Febit、High Throughput Genomics、Invitrogen 和 Luminex。Exiqon 的 microRNA 芯片

平台含有 LNA 寡核苷酸捕获探针。LNA 是核苷衍生物，它提高了双链分子的解链温度。这大大改善了双链分子的热稳定性和特异性。LNA 核苷的掺入还能实现捕获探针的 Tm 均一化。这对芯片的性能非常重要，因为 miRNA 很短，Tm 差异大。Luminex 的 FlexmiR microRNA panel 结合了 Exiqon 的 LNA 探针来实现高特异性。HTG 则采用了互补的核酸酶保护探针与样品中的 miRNA 杂交，然后进行 S1 核酸酶反应来破坏错配的探针，非常灵敏。

**Joshua Mendell (约翰霍普金斯大学)**

在我们实验室，我们正在采用定制的芯片，主要因为它经济且易用。对于更高的灵敏度，也有好的选择，如 Exiqon 和 Agilent 的芯片及 Applied Biosystems 的 TaqMan array。

**Silvia Monticelli (瑞士生物医学研究所)**

在多年的 northern 杂交和点杂交后，我们越来越多地使用 Applied Biosystems 的 miRNA TaqMan 分析，它非常特异和灵敏，而且数据总是与 northern blot 很好地关联。

**Q2：你如何验证表达结果？**

**Galina Gabriely (哈佛大学)**

我们使用 [TaqMan microRNA assay](#) 的定量 RT-PCR，并用其它稳定表达的miRNA来标准化数

据。你也可以使用snoRNA来标准化。不管怎样，我们一般使用两个或三个不同分子来标准化，以确保可靠地预计miRNA的量。同时，为了确保结果可重复，我们会重复实验。

### **Peng Jin (埃默里大学)**

通过早期不同分析形式的比较，我们发现miRNA TaqMan 分析是非常可靠的。对于高丰度的miRNA，我们也用传统的 northern blot 来验证表达数据。

### **Winston Kuo (哈佛大学)**

我们利用三种互补的策略验证表达结果：

1. qPCR：我们使用过两种方法，miScript SYBR Green System (Qiagen) 和 TaqMan miRNA assays (ABI)。我们倾向于前者，因为它含有 poly-A 加尾方法，回避了内源 3'端 miRNA 序列多样性的问题。这种多样性是 TaqMan 茎环结构反转录引物策略的问题。从技术的角度，单个 oligo dT 的反转录反应 (Qiagen) 在费用、移液操作和可变性方面优于茎环结构的反转录。我们在 384 孔板上开展 qPCR 分析，每个处理组有四个样品和三次实验重复 (总共 12 个孔)，以获得可靠、重复性好的结果。同时还包括无模板、无引物的对照。

2. Northern blotting：我们使用放射性标记的 LNA 寡核苷酸作为探针，进行 miRNA 的 northern blot。许多 miRNA 在功能相关家族中发现，这些家族成员的种子序列为 100%同源，只有 3'端变化。因此，在使用 qPCR 或 northern 时，你必须验证分析只检测目的 miRNA，而不是其它成员。我们在玉米 (Zea) RNA 载体背景中加入合成的成熟 miRNA (IDT) 来验证。

就 northern 来说，每个 miRNA 家族成员的合成 miRNA 在含有 8M 尿素的 15% PAGE 胶上进行。优化杂交温度，让 LNA 探针只与目的 miRNA 结合，而不与其它成员结合。一旦利用加标策略建立了适当的 northern 杂交条件，就能应用于实验样品。

3. 原位杂交：我们也利用 Exiqon 的 DIG 标记的 miRCURY LNA microRNA 检测探针，来确认我们的 miRNA 表达结果和组织特异性。

### **Joshua Mendell (约翰霍普金斯大学)**

无论使用哪个平台，小心验证所有的芯片结果是很重要的。我们一般使用 northern blotting (当我们有较多 RNA 时)，或者实时定量 PCR (当 RNA 比较珍贵时)。我们发现只有操作正确，两种方法都能产生高质量的表达数据。Northern blotting 比较便宜，但需要很多 RNA，而定量 PCR 更灵敏，也更贵。

# miRNA 分析中的 qRT-PCR 疑难解答

## (上)

实践出真知。我们的实验中往往会遇到一些很细节的问题，但在普通的教科书上又找不到现成的答案。怎么办？寻找身边的实验达人。可是在 miRNA 这个相对较新的领域，达人还不太多。生物通就帮大家找了一班实验达人，就 miRNA 分析中的 qRT-PCR 检测的 6 个热门问题，谈谈自己的经验。希望大家可以从中受到一点启发。

**Q1:** 如何为 miRNA 设计引物？利用茎环结构还是引物延伸？

**Q2:** 如何确定 Ct 值？理想的 Ct 值是多少？

**Q3:** 如何检测 miRNA？使用 SYBR green 吗？

**Q4:** 你如何确定检测效率？怎样称之为好的效率？

**Q5:** 如何区分前体和成熟的 miRNA？

**Q6:** 还需要其他的定量分析来进行补充吗？

**Q1:** 如何为 miRNA 设计引物？利用茎环结构还是引物延伸？

John Rasko & Stephane Flamant 美国 centenary 大学的基因和干细胞治疗计划

我们的方法是基于经典的小分子 RNA 克隆。从总 RNA 入手，在 microRNA 的 3'端加上一个接头。然后利用接头特异的引物来进行反转录（引物延伸法）。接着还是利用同样的引物，连同 5'microRNA 特异的引物，来进行定量 PCR 反应。由于 microRNA 的确很小，引物的选择余地也不大。我们通常设计的引物覆盖最初 15-17 个核苷酸，留下最后 6 个核苷酸用于测序验证。

Thomas Schmittgen 俄亥俄州立大学副教授

我们只利用 ABI 的 TagMan assay(茎环结构)来检测成熟的 microRNA。这些 assays 是预先设计并验证过的。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas 耶鲁大学医学院

我们应用的是 TaqMan assays。由于 microRNA 很短，采取茎环结构的引物会更好。

M.azim Surani & Fuchou Tang 剑桥大学 Gurdon Institute

我们也是应用茎环结构的引物来定量 microRNA。对于每一个 microRNA，我们设计了三条引物：一条反向引物用于反转录，一条正向引物，还有一条通用的反向引物，同时用于 pre-PCR 扩增步骤和实时定量 PCR 步骤。特异的反向引物约 42-44 个核苷酸，其 5'端的 36 个核苷酸序列是固定的，形成一个 8 核苷酸环和 20 核苷酸茎的结构，其 3'端的 6-8 个核苷酸就与 microRNA 互补。正向引物长约 25-32 个核苷酸，在 3'端有 11-18 个核苷酸与相应的 microRNA 互补，而剩余 14 个核苷酸的 Tm 值高于 65 摄氏度。通用的反向引物为 23nt，其中 18 个核苷酸对应特异反向引物的茎环结构部分，而 5'端的 5 个核苷酸的 Tm 值高于 65 摄氏度。

Wei Yan 美国内华达州大学医学院

我们的 microRNA PCR 方法是将小分子 RNA 的 cDNA (srcDNA) 作为模板。srcDNA 由 microRNA 聚腺苷酸后, 用 RTQ 引物反转录产生。RTQ 引物在 5'端包含一个 100bp 的接头序列, 然后是 25 oligo dT, 以及两个简并核苷酸 V (A、G 或 C) 和 N (A、G、C 和 T)。特定 microRNA 产生的 srcDNA 水平可由 PCR 进行分析, 用 microRNA 特定的引物作为正向引物, 对应 srcDNA 3'端接头序列的通用引物作为反向引物。整个 microRNA 序列除了最后的 2 个核苷酸都可以用作正向引物, 而反向引物可以根据 Tm 值和 GC 含量从接头序列中选择。

## Q2: 如何确定 Ct 值? 理想的 Ct 值是多少?

John Rasko & Stephane Flamant

循环阈值是由扩增指数期的中部来决定的, 大约是在 25-35 个循环之间, 取决于样品和目的 microRNA。每一个反应进行三次, 同时还有一个阴性的反转录对照。对于每一个检测的样品, 我们都用广泛表达的 microRNA, 如 let-7a 或 miR-21, 作为阳性内参。

Thomas Schmittgen

我们应用的是 ABI 7900 定量 PCR 仪。通常我们利用软件的默认参数来计算 Ct 值。对于成熟的 microRNA 来说, Ct 值在 20 多是正常的 (一般在 25 到 30 之间)。许多人认为 Ct 值高于 35 就代表背景或干扰。我们使用 TaqMan 探针, 它背景很低, 因此我们能检测到低水平的 microRNA。另一个方法是将实时定量 PCR 的数据表示为“每个细胞中 microRNA 的拷贝数”。这在 2005 年《Nucleic Acids Research》杂志上 Caifu Chen 的文章中描述过。其中有一些假设, 不过它对细胞中 microRNA 的拷贝数进行了很好的评估。它还有助于了解背景问题。一般说来, 每个细胞中 microRNA 的拷贝数为 10 或以下就可以认为是背景。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

我们通常让 ABI TaqMan 程序来选择循环阈值。如果我们需要手工设定, 我想需要依赖阳性和阴性对照。

M.azim Surani & Fuchou Tang

我们通常将表达谱研究中的检测阈值设为恒定的 0.2。对于 pre-PCR 18 个循环扩增的 cDNA 样品来说, 理想的 Ct 值在 10-28 之间。如果 Ct 值大于 32, 表示 cDNA 模板的拷贝数很低。一般说来, Ct 值大于 28 时标准偏差相对很大。

Wei Yan

我们利用 SYBR green 和 ABI 的 7300 定量 PCR 仪进行 microRNA 定量分析。Ct 值是指荧光信号到达阈值水平时的循环数。将阈值水平设定为 0.1-0.3 时, 每个 microRNA 样品的 Ct 值可以自动计算。所有的 Ct 值都取决于目标 microRNA 的丰度。例如, 当使用 25ng srcDNA 时, let-7 的平均 Ct 值介于 17-20 之间。

## Q3: 如何检测 miRNA? 使用 SYBR green 吗?

John Rasko & Stephane Flamant

我们是通过 TaqMan 探针来检测 microRNA 的。

Thomas Schmittgen

我们利用 TaqMan 探针来检测成熟的 microRNA。对于 microRNA 前体, 我们用 SYBR green 或 TaqMan 探针。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

我们用的是 ABI 的 TaqMan 探针, 因为它比 SYBR green 特异性更好。但是也要贵一些。

M.azim Surani & Fuchou Tang

我们用 TaqMan 探针来检测 microRNA 的表达。对于多重 microRNA 分析来说，使用 SYBR green 降低特异性，并降低了检测的灵敏度，因为在 pre-PCR 扩增反应中，可能出现引物二聚体。

Wei Yan

(下)

续上篇: [专家指南: miRNA分析中的qRT-PCR 疑难解答 \(上\)](#)

**Q4: 你如何确定检测效率? 怎样称之为好的效率?**

John Rasko & Stephane Flamant

为了确定这个实验方案，我们使用了 10 倍连续稀释的 let-7f 合成寡核苷酸。当起始物质低至 70 飞克时，let-7f 都可以检测到。

Thomas Schmittgen

谈到效率，这可是一个棘手的问题，尤其是对几百个不同的 microRNA 进行图谱分析时。由于 ABI 的不同 TaqMan assays 中引物及长度都是相似的，那么效率也或多或少相同。估计效率的简便方法就是比较 PCR 曲线的形状。相似的形状意味着相似的 PCR 效率。如果真正计算 PCR 效率，就要扩增 10 倍连续稀释的 cDNA。然后就 Ct 值对稀释对数做图。效率等于  $10^{-1/\text{斜率}}$ 。效率在 1.85-2.05 这个范围都是可以接受的。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

我们通过连续稀释 microRNA 标准来确定 PCR 反应的效率。每 3.3 个循环阈值表现为 10 倍扩增，那么效率就达到了 100%。如果一个对数扩

对于定量 PCR 分析，我们利用 SYBR green 方法，因为它便宜一些，而且准确度和重复性与探针方法差不多。

待续.....

[有免费的高效RNA提取试剂派哦，数量有限，先到先得！](#)

增需要 3.3 个 Ct 以上，那么效率就低一些。好的效率应该是在 90%或以上。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

对于反转录反应来说，只有 6-8nt 的引物与 microRNA 的 3'端配对，其检测效率差异很大。为了定量确定每个细胞中 microRNA 的绝对拷贝数，我们通过连续稀释的模板绘制标准曲线。虽然绝对的检测效率差异很大，但不同 microRNA 标准曲线的斜率还是相似的。因此，图谱研究的相对定量也是准确的，因为它是基于  $\Delta Ct$  值的。

Wei Yan

我们是通过

[www.stratagene.com/techttoolbox/calc/qpcr\\_slope\\_eff.aspx](http://www.stratagene.com/techttoolbox/calc/qpcr_slope_eff.aspx) (Stratagene) 上的效率计算器将 qPCR 标准曲线的斜率转化成效率。好的效率介于 90~110%之间，对应的斜率是 -3.1~-3.6。

**Q5: 如何区分前体和成熟的 miRNA?**

John Rasko & Stephane Flamant

在 microRNA 分析之前，我们首先通过经典的 RT-PCR 来分析，用同样的 5' microRNA 特异引物和 3' 接头特异引物来扩增，然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。只有那些能扩增出预期大小如 95bp 左右的引物才用于 qPCR。如果 PCR 产物大于理论值，我们会优化 PCR 条件或设计新的 5'引物。

Thomas Schmittgen

在2004年,我们发表了第一个定量 microRNA 的 PCR 方法。那个方法适用于定量 microRNA 前体。我们原本认为在某个特定的细胞或组织中,前体与成熟 microRNA 的量接近。在一些情况下是这样,但随着我们进行了更多的图谱分析,我们发现很多时候存在相当多的前体,却没有成熟的 microRNA。于是我们使用自己的 PCR 分析来检测前体,用 ABI 的 TaqMan assay 来检测成熟的 microRNA。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

利用 TaqMan 实时分析,你应当设计两套不同的引物组和探针来检测前体和成熟 microRNA。对于成熟的 microRNA,你可以使用茎环结构的引物,对于前体,我想可以使用常规的引物,因为序列很长。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

我们利用茎环结构的引物来进行 microRNA 定量,它只针对成熟的 microRNA。它不能转录前体 microRNA,因此 pri-microRNA 和 pre-microRNA 不会转变成 cDNA,也就不会干扰成熟 microRNA 的定量。

Wei Yan

在 qPCR 之后,所有的 PCR 产物都去跑一个 2%的琼脂糖胶,看看是否是单一条带,大小是否正确。成熟 microRNA 与前体 microRNA 的大小不同,在凝胶中会明显分开。包含 microRNA 的 PCR 产物大约为 120bp,而包含 pre-microRNA 的产物则在 170bp 左右。不过,我们的 PCR 方法优先扩增成熟的 microRNA。我们利用它分析了 140 多个 microRNA 的表达图谱,从没检测到 pre-microRNA。

**Q6: 还需要其他的定量分析来进行补充吗?**

John Rasko & Stephane Flamant

实际上我们的定量分析是作为普通 RT-PCR 的补充来获得定量数据,也可以进行半定量 PCR。我们还做 microRNA 芯片实验,另外,我们用实时定量 PCR 来验证候选的 microRNA。

Thomas Schmittgen

偶尔会做 northern blot。我们会用 northern blot 来帮助确认前体 microRNA 是否存在于反应中。因为 northern blot 能很好地区分 pri-microRNA 和 pre-microRNA,因此很有用。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

如果我有足够的样品,而 microRNA 的水平足够高,我想我会做 northern 来检测。用 northern 来检测 microRNA 也是一个金标准。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

我们通常会用基于实时定量 PCR 的 microRNA 图谱分析来核对样品中已知 microRNA 的表达,以及发现分化表达的候选 microRNA。然后再做单个的定量 PCR,用茎环结构的引物来检查一系列样品中的候选 microRNA 表达,以确认它们的生物相关性。

Wei Yan

如果是第一次做定量 PCR 或半定量 PCR 的话,就需要另一种定量分析如 northern blot 或 RNA 保护分析来证明 qPCR 的结果。至少要做 3 个样品,来看看定量结果能不能用另一种方法重现。

(生物通 余亮)

# miRNA 的功能分析策略

lin-4, 第一个已知的 miRNA, 在 1993 年被发现。自此, miRNA 的研究就一发不可收拾。线虫、果蝇等模式生物的研究鉴定出 miRNA 的许多重要功能, 包括发育期间细胞增殖和死亡的协调, 抗逆性, 脂肪代谢等等。相对于这些低等的模式生物, 哺乳动物的 miRNA 功能研究可就复杂得多。

在开始的几年, 科学家们的首要目标是利用克隆、生物信息学和基因表达等方法编纂出完整的 miRNA 目录和它的表达方式。随着这个目标日益接近, 研究重心又转移至 miRNA 功能的阐释。针对这一目标, 涌现出多种技术, 有报告基因分析、原位杂交、过表达和沉默、生物信息学预测算法等, 它们都有助于 miRNA 功能的推断。

## 分析 miRNA 的表达

在鉴定新的 miRNA 时, 通常采用三种方法: 正向遗传学、定向克隆和生物信息学分析。正向遗传学主要运用于果蝇和线虫中, 它通过一个突变表型来了解 miRNA 的功能。第一个 miRNA 基因 lin-4 就是这么鉴定出的。然而, 正向遗传学这么多年来也就鉴定出寥寥几个 miRNA。这是因为 miRNA 很小, 只要突变不影响种子序列, 它们就有潜力耐受, 因此很难击中。另外, 由于冗余, 表型筛选不能识别很多 miRNA 突变体。因此正向遗传学不可能成为鉴定 miRNA 的主力军。

之后, 定向克隆技术的出现, 让多种细胞系和组织中的 miRNA 大规模鉴定得以实现, 包括人、小鼠和斑马鱼等。miRNA 的克隆流程大致如下: 在变性的聚丙烯酰胺凝胶上分离 RNA 样品, 并回收大小在 18-25 nt 的片段。接着, 给 RNA 加上 5' 和 3' 接头, 并进行 RT-PCR, 然后将片段克隆到载体上, 构建出 cDNA 文库。对单个克隆进行测序和分析, 以确定小 RNA。目前测序技术的蓬勃发展也大大促进了这种方法。然而对于某些只在特定细

胞类型中表达, 或以低水平表达的 miRNA 来说, 鉴定起来还是有难度的。另外, 介于物理性质或转录后修饰, 某些 miRNA 可能难以克隆, 这也是一个棘手的问题。

同时, 科学家们也开发出多种算法, 来预测 miRNA。所有方法都利用了二级结构信息, 因为发夹结构的存在是 miRNA 的主要特征。其中许多方法还依靠序列的保守性来区分 miRNA 候选物和无关系的基因组发夹。另一些方法则评估发夹结构的热力学稳定性, 与已知 miRNA 的序列和结构相似度。另一种高效的方法是探索已知 miRNA 周围的基因组序列, 因为许多 miRNA 都是成簇排布。人和小鼠的许多 miRNA 就是通过这种方式鉴定出的。当然, 计算机预测出来的候选 miRNA 还需要实验的验证。

有时, 我们并不需要全盘了解所有 miRNA, 而只是想了解发育或分化的不同阶段、某种疾病状态下特异表达的 miRNA。这时, 芯片就成为一种强大的工具, 能监测组织特异的 miRNA 表达, 帮您挑出关键的 miRNA。目前市场上多个 miRNA 芯片包括了最新的 Sanger miRBase 数据库 14.0 版的内容, 让您能紧跟形势。尽管最初 miRNA 芯片的交叉杂交和特异性为人诟病, 但经过改进, 很多已经能够分辨出单个碱基的差异。有了它, 人们绘制出细胞分化期间的 miRNA 表达谱; 有了它, 人们了解到疾病状态下异常的 miRNA 表达模式。ABI 公司还开发出一种类似芯片的 TaqMan miRNA

Array，在一张微流体卡片上集合了数百个 TaqMan miRNA Assay，尽管通量不如芯片高，但发挥了 TaqMan 分析的优势——高灵敏度、高特异性和宽动态范围。

### 鉴定 miRNA 的功能

miRNA 的功能研究与基因相似，过表达和沉默是两种有力的方法。miRNA 的诱导表达常常是许多研究的第一步。将 miRNA 模拟物（多个公司有售）转染到细胞中，就能实现 miRNA 的瞬时过表达。但长期研究就要依赖质粒了。这些重组质粒能源源不断地产生有功能的 miRNA，设计起来也很简单。利用常见的蛋白表达载体，将 miRNA 序列克隆上去，在 Dicer 酶的切割下，就能产生成熟的 miRNA。一些研究小组还将这些质粒引入腺病毒或慢病毒系统，以克服原代细胞或干细胞的转染效率低，或将 miRNA 导入小鼠体内。不过，仅有 miRNA 过表达的结论往往不让人信服，我们还需要功能丧失（loss-of-function）实验来证实。

对于小鼠中的 miRNA 研究，科学家们开发出一些遗传方法，来产生功能丧失的突变。目前主要有三种：(1) Dicer 酶的突变，让所有成熟的 miRNA 都缺失；(2) 小鼠中 miRNA 基因的敲除；(3) miRNA 靶位点的突变。不过，miRNA 的高度冗余让这种功能丧失研究面临不小的挑战。而且，许多

miRNA 是成簇排列的，一个 miRNA 的缺失或干扰可能会影响多顺反子转录本的正确折叠和加工，从而影响相邻 miRNA 的表达。近年来使用较多的是反义靶定的非遗传学方法。多个公司提供 miRNA 抑制剂。这些 2'-O-甲基修饰的寡核苷酸不可逆地抑制了 miRNA 的功能。

上述方法提供了 miRNA 体外和体内功能研究的框架。在发育或分化的不同阶段以及疾病模型中，利用 miRNA 特异的芯片能绘制出细胞和组织的 miRNA 表达谱，这能够揭示出参与了这些进程的特定 miRNA。miRNA 的过表达和沉默，则是一种有力的方法来研究 miRNA 的功能。这些研究应当在细胞内或体内进行，并与表型和基因表达分析相结合。

与转录因子类似，miRNA 也是一大类基因调控分子。它们独特的作用方式需要新的分析策略。系统鉴定 miRNA 以及研究特定 miRNA 过表达或沉默的生物影响的技术已经有了，但是还需要了解影响 miRNA 功能的信号通路，以及影响 miRNA 表达的环境因素或遗传因素。一旦获得这些信息，研究人员才有可能设计出新的治疗策略，来治疗遗传和获得性疾病。（生物通 薄荷）

[免费索取安捷伦Stratagene超快速定量PCR试剂盒试用装！](#)

# miRNA 海绵—长效抑制 miRNA

随着研究的深入, 已知 miRNA 的数量与日俱增, 目前 Sanger miRBase 数据库中收录的人 miRNA 已达 721 条。不过, 大部分 miRNA 的功能仍是未知数。在基因功能研究中, 最有效的方法是阻止特定基因的功能, 然后了解其后果。miRNA 同样如此。

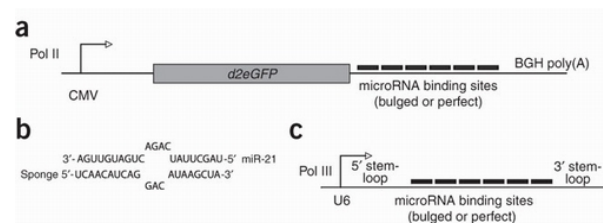
然而, 相比之下, miRNA 的功能研究要困难得多。为什么? 首先, miRNA 没有蛋白产物, 这使得研究复杂化。其次, miRNA 的生物发生有多个步骤。最初的转录本为 pri-miRNA, 它在细胞核中加工形成前体 pre-miRNA。这个茎环结构的 RNA 输出到细胞质, 被 Dicer 酶进一步加工, 最终形成了成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 没有 poly(A) 尾巴, 因而检测起来要颇费一番心思。

除了检测, miRNA 的功能丧失 (loss-of-function) 研究也是难题。标准的 RNAi 技术行不通。成熟的 miRNA 与 siRNA 不相容, 因为它们两者都能进入 RISC 复合物; pre-miRNA 是茎环结构的, siRNA 无从下手; pri-miRNA 貌似是 siRNA 最容易靶定的, 但一个是细胞核, 一个在细胞质, 好似牛郎织女, 无法见面。

当然, 科学家们也不是束手无策。miRNA 不是能与互补的 mRNA 结合吗? 他们就开发出与 miRNA 互补的寡核苷酸, 作为 mRNA 结合的竞争性抑制剂。这些抑制剂实现了短期分析, 在细胞培养物以及某些动物实验中都获得了成功。但是, 如何实现 miRNA 的长期抑制?

2007 年, 麻省理工大学的 Phillip Sharp 及他的同事利用相似的原理, 开发出一种长期抑制 miRNA 基因的高效方法<sup>1</sup>。他们称之为 miRNA 海绵 (miRNA sponge), 意思是吸满了 miRNA, 这样它就无法与天然靶点结合。miRNA 海绵是一条 mRNA, 其 3' 非翻译区 (UTR) 包含若干个 miRNA

靶定位点 (如下图)。更重要的是, 这些靶定位点在 RISC 切割位点有一些错配。这样, 抑制剂 mRNA 就不会被降解, 而与 RISC 稳定结合, 让它远离天然的 mRNA 靶点。



(图片来自 Nature Methods)

经研究证实, 这些 miRNA 海绵是高效的 miRNA 抑制剂, 其效力与反义寡核苷酸相当。由于 miRNA 与靶点的相互作用是依赖种子区域 (seed region, miRNA 的第 2-8 位), 这样 miRNA 海绵对家族中亲缘关系接近的所有 miRNA 都有效, 即特异性不高, 这也有利有弊。制备某个家族缺陷的转基因小鼠变得相当容易。但如果你想要了解某个 miRNA 的特定功能, 那就得将与之接近的 miRNA 全部去除。

miRNA 海绵的应用潜力无穷。它可用于靶点预测的验证, 也能分析 miRNA 的功能丧失表型。由于 miRNA 海绵是由表达质粒编码的, 那么它也很容易推广到其它形式, 譬如慢病毒、腺病毒或转基因, 适合各种不同的细胞类型。Sharp 还在研究中证实, 在 UTR 上多加几个 miRNA 结合位点, 能增加反义序列的量, 从而提高海绵的效力。从原理上来说, miRNA 海绵的 CMV 启动子也可以换成

其它组织特异的启动子，让它们在果蝇、植物等模式生物中起作用。

目前多个顶尖研究机构，例如约翰霍普金斯大学，埃默里大学的研究人员都纷纷使用miRNA海绵进行功能研究，详见《[miRNA专家谈之三：如何上调或下调miRNA?](#)》。同时，miRNA海绵的改造也在不断进行中。

美国哈佛医学院的 Carlos Loya 及其同事开发出果蝇 miRNA 海绵 (miR-SP)，在精确的时空分辨率下解析每个 miRNA 的功能<sup>2</sup>。他们利用的是基于外源 DNA 重组酶 Cre 或转录因子 Gal4 的表达系统，将修饰的 miRNA 互补寡核苷酸置于上游激活序列 (UASs) 的下游，实现了体内组织特异的 miRNA 海绵表达。miR-SP 能鉴定组织特异性的 miRNA 功能丧失表型，确定效应器的空间调节，并了解 miRNA 与其他基因之间的相互作用。

研究人员发现这种构建体与 Gal4 的组合能表达出足够的 miRNA 沉默物，在完整的果蝇中实现

miRNA 的时空抑制。利用 miR-SP 系统，他们鉴定出保守的 miRNA miR-8 在神经肌肉结点形成上的重要作用。这项研究充分体现了 miRNA 海绵作为一种手段，在探索体内 miRNA 功能上的潜力。它还有望去除 miRNA 家族中种子序列相似的多个成员。

毫无疑问，miRNA 海绵将会越来越红。（生物通 余亮）

参考文献：

1. Margaret S Ebert, et al. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods* 4, 721 - 726 (2007)
2. Carlos M Loya, et al. Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms. *Nature Methods* 6, 897 - 903 (2009)

# miRNA 专家谈之三：如何上调或下调 miRNA？

生物通编者按：尽管第一个 microRNA 是在 1993 年发现的，但直到最近几年，人们才开始了解这种小 RNA 分子的大作用。miRNA 通过与转录本的相互作用，关闭或抑制基因的表达。最近的研究表明它们影响了约三成的基因。miRNA 在多个组织中差异表达，这就让表达图谱分析成为研究的重点。同时，miRNA 的过表达和抑制也是近年来常用的研究方法。

然而，miRNA 很小，这就增添了研究的难度。如何从细胞中提取和纯化 miRNA？如何上调或下调特定的 miRNA？如何验证结果？全靠自己摸索，体会是很深，但时间也花不少。生物通收集了来自顶尖研究院的专家的实际操作经验，这将让你少走弯路。

**Q1：您使用什么方法来上调或下调特定的 miRNA？为什么？**

**Galina Gabriely（哈佛大学）**

对于 miRNA 的下调，我们使用修饰的反义寡核苷酸，因为它们能产生最特异的抑制。此外，我们也使用 LNA 修饰的 oligo。这些 oligo 与 miRNA 的高亲和力结合，提供了强的抑制，不过它们偶尔会有脱靶效应。对于上调，我们使用 Ambion 的合成 miRNA 模拟物。

**Peng Jin（埃默里大学）**

我们使用 RNA oligo 和载体的方法。对于 RNA oligo 方法，我们采用类似 siRNA 双链的 miRNA，及 anti-miRNA 来增加或阻断特定 miRNA 的活性。这种方法便于操控细胞培养中特定 miRNA 的活性。

载体方法有着长期改变的优势，能够追踪个别细胞。我们利用人工的 shRNA 质粒或 Pol II 表达载体，来过表达特定的 miRNA。对于 miRNA 的下调，我们要么表达一个 shRNA，它能产生与 miRNA

前体的茎环结构互补的 siRNA，要么使用 miRNA 海绵（miRNA sponge），它能在特定 miRNA 的多个目标位点表达报告基因。

**Winston Kuo（哈佛大学）**

目前有两种通用策略：**1) 基于载体或病毒的 miRNA 或 miRNA 反义链序列的过表达；2) 外源 miRNA 双链或反义抑制剂的转染。**方法的选择取决于实验的设计。

一般说来，我们倾向于外源试剂的转染。载体/病毒的策略还依赖 Drosha/Dicer 酶对转录本的顺序加工，且必须通过 Exportin 5 从核中输出。在人类癌细胞系中曾报道过 Drosha 和 Dicer 水平的 miRNA 加工缺陷。此外，Exportin 5 也被认为是细胞和小鼠模型中 miRNA 生物发生途径的瓶颈。外源过表达可饱和 Exportin 5，从而胜过内源小 RNA 序列。极端的情况下会引起细胞或动物死亡。外源双链转染后，直接进入 RISC 复合物中，因而绕过了这些陷阱。

当然，在需要持久的功能获得或功能丧失时，还需要载体或病毒的稳定表达。稳定的细胞系必须小心地建立，采用病毒滴度测定来避免上述问题。

**Joshua Mendell（约翰霍普金斯大学）**

对于 miRNA 的上调，我们常常构建表达载体。制备起来非常简单。我们只是扩增 miRNA 发夹结构及一些侧翼序列，并直接克隆 PCR 产物。有时

候，我们也用合成的 miRNA 模拟物来瞬时转染细胞，以过表达 miRNA。

为了抑制 miRNA，我们一般使用市场上的反义寡核苷酸。我们使用 Dharmacon 和 Exiqon 的抑制剂都获得了成功。这些试剂的局限在于它们只能瞬时作用。为了实现稳定抑制，我们开始用所谓的 miRNA 海绵。它们实际上是有着多个 miRNA 结合位点的捕获转录本，能隔离细胞中有活性的 miRNA。

[索取Dharmacon miRNA模拟物/抑制剂的最新资料!](#)

#### **Silvia Monticelli (瑞士生物医学研究所)**

我们主要使用慢病毒或反转录病毒系统，因为我们主要研究原代细胞，而且需要长时间的持续表达。取决于细胞类型，我们也使用 lipofectamine 或 Amaxa 来瞬时转染。对于下调，我们正使用 miRNA 海绵。对于短期研究，miRNA 抑制剂的瞬时转染效果也很好。

#### **Q2: 如何验证 miRNA 上调或下调的结果?**

#### **Galina Gabriely (哈佛大学)**

为了评估处理后 miRNA 的活性，我们测定了与 miRNA 结合位点融合的萤光素酶的表达。不过，评估 miRNA 活性的最佳方法是评估它的天然靶点的表达（如果 miRNA 靶点已知）。这可以通过 western blot 分析来进行。miRNA 表达的调节可用 northern blot 分析来评估 miRNA 的表达水平。在某些情况下，定量 RT-PCR 也能给出 miRNA 表达的可靠结果，但 miRNA 调节所使用的寡核苷酸会在 PCR 反应中干扰引物，从而影响真实的表达数据。

#### **Winston Kuo (哈佛大学)**

我们使用几种策略，包括 miRNA qPCR，miRNA northern blot，萤光素酶报告分析，mRNA 靶点的 qPCR，以及蛋白靶点的 western blot。在上面我已经讨论了 miRNA qPCR 和 northern blotting。这些能够直接检测 miRNA 过表达或下调。萤光素酶报告分析包括 3'-UTR 序列克隆在萤光素酶编码序列的下游。这些 3'-UTR 包含了人工的 miRNA 同源位点或已验证 mRNA 靶点的内源序列。后一个策略中的关键对照是生成假定同源位点上种子序列的点突变。这些点突变将使 miRNA 不能调节萤光素酶的表达。

#### **Joshua Mendell (约翰霍普金斯大学)**

为了验证 miRNA 上调，我们还是使用 northern blotting 或实时定量 PCR 来测定 miRNA 的丰度。测定 miRNA 的抑制就没那么简单。反义 oligo 确实降低了 miRNA 的丰度。因此，你也可以用同样的方法来监控 miRNA 抑制。不过，体内 miRNA 的隔离不会总是让 miRNA 丰度下降。另一个方法是用报告基因重组子来监控 miRNA 的抑制。miRNA 会抑制报告基因的表达，除非它的活性受阻。当然，这种报告基因的使用一般受限于细胞培养环境。

#### **Silvia Monticelli (瑞士生物医学研究所)**

这些实验中的关键一步是：通过转染或转导细胞，你有效地改变了它们，因此你的确需要很多对照，来确认你所看到的结果是来自 miRNA 的表达或下调。这对 miRNA 尤其重要，因为在很多情况下，你并不期待一个强的表型，但是你在寻找微调基因表达的温和效果。我想你至少需要目的 miRNA 之外的 miRNA 和种子区域的突变体。我还推荐使用不同方法来设法获得相同的结果。

相关阅读：

[miRNA海绵—长效抑制miRNA](#)

# ABI: 少量 RNA 也能进行高通量的 miRNA 表达图谱分析

(生物通专稿) microRNA (miRNA) 是一类天然存在的非编码 RNA, 在基因调控中扮演着重要角色。它们是高度保守的单链 RNA (~22 个核苷酸), 从更长的发夹结构前体转录本中剪切而来。到目前为止已经报道了 800 多个人类 miRNA, 还有更多的在等待实验的验证。一系列研究表明 miRNA 参与了许多细胞内的过程, 包括发育、分化、增殖、凋亡等, 那么它们自然也与癌症发育息息相关。

为了鉴定分化表达的 miRNA, 许多研究都以整体的 miRNA 表达图谱作为起始。目前进行 miRNA 图谱分析的主要方法之一是利用 miRNA 芯片, 一次实验即可在整体全局角度上同时检测多个 miRNA 的表达情况和相互关系。

可是, 事情并非如此简单。miRNA 研在生理功能上如此重要, 在过去却一直不为人知的原因, 很大程度是由于其分子小, 风度低, 不稳定, 种类多, 同源程度高, 等等。仅仅 22nt 左右大小的单链 RNA 分子, 极低的丰度, 纯化难度可想而知, 特别是在样品量有限的情况下。由于分子小而难以扩增, 更增加了微量样品的分析困难, 特别是高通量对大量样品进行分析----几乎成为 Mission Impossible----不可能完成的任务。

锁定 miRNA 目标的定量分析也好, miRNA 芯片也好, 对样品量有一定的要求----以芯片为例, 通常需要 1 微克以上的 RNA, 有的甚至需要 10 微克。而对于只有几个-到数百个细胞的样品来说, 无法扩增的情况下芯片就有些束手无策了。

在此, 生物通介绍一种 miRNA 图谱分析的新方法, 既能准确定量 miRNA, 样品量又无需那么多。ABI 的 TaqMan MicroRNA Arrays 和我们常规说的芯片其实不同, 这种芯片更像是 TaqMan MicroRNA Assay 的芯片集成形式----通过对分析方法的创新改造, 将 TaqMan 分析和实时定量 PCR 的特异性、灵敏度和重复性金标准引入到 miRNA 的检测和定量中。

我们首先来看看 TaqMan MicroRNA Assay----其实就是 RT-qPCR----它利用反转录和定量 PCR 来定量 miRNA 的表达。可是, 要知道, 仅仅 22nt 的 RNA 短序列模板可不是一般的反转录可以做到的, 其设计的巧妙创新之处在于 Megaplex 反转录中的引物并非随机引物, 而是靶特异的茎环结构的反转录引物。这个创新设计解决了 miRNA 定量中的基本问题: 成熟 miRNA 的短序列 (~22nt) 不允许在反转录反应中使用传统的随机引物。茎环结构提供了仅针对成熟 miRNA 模板的特异性, 并形成引物/成熟 miRNA 嵌合体从 miRNA 的 3'端开始延伸。产生的较长反转录扩增产物能作为模板, 用于标准的实时定量 PCR 分析。就这样, miRNA 就可以被扩增了----一旦扩增问题解决, 样品量小, 低丰度等等问题自然也迎刃而解, miRNA 的定量检测和图谱分析也就有迈出了关键的第一步。

道理虽简单, 但这也不是你能自己合成的引物。所以只能去 ABI 购买。Megaplex Primer Pools 提供了 Sanger MiRBase v10 的综合覆盖度, 覆盖人、小鼠或大鼠的 667、518 或 303 个 miRNA。能满足已知 miRNA 图谱分析的需求。如果你的研究目标恰在其中, 那么恭喜, 后面的工作就相当顺理成章了。

因为有了扩增, TaqMan MicroRNA Assay 就显得更加灵敏。研究人员只需要极少量的总 RNA 样品即可。DNA 预扩增步骤的引进更显著降低了起始 RNA 样品量。即使 1ng 的总 RNA, 也能产生综合的表达图谱 (Reference 1)。这样 1 个细胞也

能进行分析，对临床样品而言绝对是个利好消息。而传统的方法至少需要几百纳克总 RNA。

对于这种创新的扩增方法，实验表明是可靠的。TaqMan Assay 的线性动态范围也很广，你可以得到多达 7 个对数级的线性动态范围。从几个拷贝到几百万个拷贝的 microRNA 靶点都可以在同一实验中准确定量。鉴于 miRNA 的浓度在不同的细胞、组织类型和疾病状态时差异很大，这可是一个相当关键的因素。

作为 PCR 和荧光定量探针 TaqMan-MGB 技术的权威品牌之一（Roche 公司为 TaqMan 专利持有人），ABI 开发的 TaqMan-MGB 产品一直被视为金标准，因此不难想象，ABI 的此类产品都会不由自主的向金标准靠拢。需时三个小时得到结果。整体的 miRNA 图谱可以在 5 小时内产生，不需要几天。

有了前面的铺垫，生物通在这里进一步介绍 TaqMan Assay 的芯片形式-TaqMan MicroRNA Arrays。它将 TaqMan MicroRNA Assays 的所有优势集合并预装成便利的微流体芯片形式，特别适合人、大鼠和小鼠的图谱分析。它的原理其实很简单，就是 384 个定量 PCR 反应在一块微流量板上进行。每个阵列的内容与各自的 Magaplex Primer Pools 匹配，包含最多 381 个独特的 TaqMan MicroRNA Assays，有效缩短了准备时间，并减少实验的不确定性。用 Megaplex RT Primers 反转录 miRNA 靶点及用 Megaplex PreAmp Primers 预扩增之后，TaqMan Universal PCR Master Mix 可与每个反应简单混合，并移至 TaqMan Array 的八个上样口中之一，一个工作日内就能产生覆盖 Sanger miRBase 的综合数据集。每个物种有一套两个 TaqMan MicroRNA Arrays。

不过要完成这个实验，7900 定量 PCR 仪是必不可少的，而且还需要 TLDA block 才能完成。如果你附近找不到这台仪器，那你可以考虑外包。上海生物芯片中心就提供相关的服务。你只需提供

RNA 样品、TaqMan microRNA array，交给生物芯片公司就可以了。

目前已有多名用户享受到了 TaqMan MicroRNA Assay 的优势，并验证了其有效性，文章发表在《Nature》、《Cell》、《Cancer Research》等杂志上。Lee 等利用 TaqMan MicroRNA assay 和 7900HT 定量 PCR 仪，对 10 种早期扩散性的鳞状细胞癌和 10 种正常的鳞状上皮标本的 miRNA 表达进行了图谱分析，发现了 70 种 miRNAe 表达存在显著差异，其中 68 种上调，2 种下调（2）。Si 等利用 TaqMan miRNA array 对正常的乳腺组织和乳腺癌组织进行了 miRNA 的表达图谱分析。通过对 5 对配对样本的比较，他们 miR-21 在癌组织中的表达水平远远高于正常组织（3）。Resnick 等则利用了 TaqMan Array 比较了 9 个卵巢癌标本和 4 个正常标本的 miRNA 表达差异，发现 8 个 miRNA 表达差异显著，其中 5 个上调，3 个下调（4）。

#### 参考文献：

1. Meadagh P, Feys T, Bernard N, et al. (2008) High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res.* 1-8 doi:10.1093/nar/gkn725
2. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, et al. (2008). Altered MicroRNA Expression in Cervical Carcinomas. *Clin Cancer Res* 14(9): 2535-2542.
3. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26: 2799-2803.
4. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. (2008). The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic Oncology* Available online.

（生物通 余亮）

# TaqMan 低密度 miRNA 芯片新升级

MicroRNA (miRNA) 是一类天然存在的非编码 RNA，在基因调控中起了关键作用。这些转录本是高度保守的单链 RNA (~22 个核苷酸)，从更长的发夹结构前体转录本中切割而来。MicroRNA 通过 RNA 干扰机制发挥调控作用，它们切割或更常见的是抑制 mRNA 靶点的翻译，经预测，它们调控了至少三分之一的人类基因。

研究表明，这种新发现的转录后基因调控形式在多个基本细胞进程中扮演了重要角色，包括细胞增殖、分化和死亡。因此，miRNA 可能直接参与了人类疾病如癌症的发展，代表了一项有待了解的重要调控机制。

ABI公司的TaqMan分析在研究miRNA时优势多多——高灵敏度、高特异性和宽动态范围，但就是通量低。于是，他们开发出一种低密度芯片 TaqMan miRNA Array，在一张微流体卡片上集合了数百个TaqMan miRNA Assay，请看生物通的报道《[少量RNA也能进行高通量的miRNA表达图谱分析](#)》。最近，这种芯片经过了升级，覆盖了 14.0 版的Sanger miRBase数据库。

TaqMan® Array Human MicroRNA Cards 的两张卡片套装 (卡片 A 和 B) 含有特异针对人 miRNA 的 754 个独特分析。此外，每张卡片还包含 4 个对照分析——3 个精心挑选的候选内源对照分析和 1 个阴性对照分析。卡片 A 更多关注深入鉴定的 miRNA，而卡片 B 则含有多个新发现的 miRNA 及 miR\* 序列。为了满足更多重点研究的需求，卡片 A 和 B 可单独购买并运行。

为了让流程方便简化，每个 TaqMan® Array MicroRNA Cards 与 Megaplex™ RT Primers (多达 381 个逆转录引物的预确定库) 共同使用。目前有两种 Megaplex™ RT Primers (Human Pools A 和 B)，分别与各自卡片上的分析互补。此外，如果样品量有限，或分析灵敏度极为重要时，可加入使用 Megaplex™ PreAmp Primers 的预扩增步骤。PreAmp Primers 显著增加了低表达 miRNA 的检测能力，仅使用 1ng 的总 RNA，也能产生综合的表达谱。

用 Megaplex RT Primers 反转录 miRNA 靶点及用可选的 Megaplex PreAmp Primers 预扩增之后，TaqMan Universal PCR Master Mix II 可与每个反应简单混合，并移至 TaqMan Array 的八个上样口之一，然后在 7900HT 定量 PCR 仪上运行分析。只需 5 小时，就能运行数百个 TaqMan® MicroRNA Assay，是 miRNA 图谱分析应用的理想方案。[点击索取详细资料](#)

另外，ABI 近期还推出了 TaqMan Pri-miRNA Assays 和 TaqMan Non-coding RNA Assays，生物通将陆续给大家介绍。

(生物通 余亮)

# TaqMan Pri-miRNA Assays: 检测 MicroRNA 表达的起源

## 简介

初级 microRNA (pri-miRNA) 是长链非编码 RNA 转录本, 至少有一个 (更常见的是多个) 约 65 nt 茎环结构的前体 microRNA (pre-miRNA), 这些前体 microRNA 中含有成熟的 microRNA (miRNA) 序列 (图 1)。pri-miRNA 转录本的切割最终导致具生物活性的成熟 miRNA 的释放, 最终实现对信使 RNA 靶点的降解, 或更常见的是翻译阻遏。

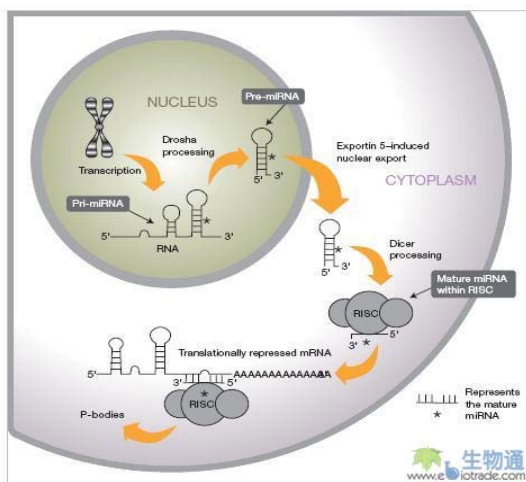


图 1. MicroRNA 的生物起源。

## 分析设计与选择

所有的 TaqMan® Pri-miRNA Assays 都是利用 Applied Biosystems 最新的 TaqMan® 分析设计算法来设计的, 此算法带来了金标准的分析性能和数据质量。由于 pri-miRNA 转录本还未详尽地定位, 所以分析在设计时很接近 Sanger miRBase 数据库中每个茎环序列, 确保对含有目的成熟 miRNA 的初级转录本进行准确测定。此方法的额外优势是, 每个公开的茎环都有一个配对的 TaqMan® Pri-miRNA Assay 和 TaqMan® MicroRNA Assay, 让 miRNA 成熟途径中任一阶段的 RNA 序列都能独立地定量。

设计过程一开始将茎环序列定位到最新版本的人、小鼠和大鼠基因组中。接下来, 在茎环结构

任一侧紧挨着的 500 个碱基对的区域都作为设计对象, 并选择出得分最高的分析 (图 2)。不定位在单个染色体坐标的分析会严重扣分, 帮助确保最终精选的分析测定了单个基因组位置的转录。

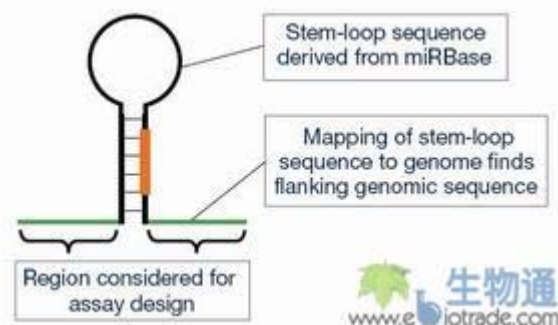


图 2. TaqMan® Pri-miRNA Assays 的设计方法。来自 Sanger miRBase 的茎环序列与基因组比对。在茎环任一侧延伸 500 个碱基对的侧翼序列作为分析设计的对象。

为了方便起见, TaqMan® Pri-miRNA Assays 和 TaqMan® MicroRNA Assays 都能用相同的在线界面来平行识别、选择和购买。利用新的比对定位浏览器可简化对两种分析类型之间的空间关系的了解 (图 3)。

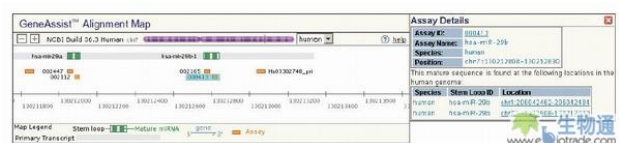


图 3. 比对定位浏览器。TaqMan® Pri-miRNA Assays 和 TaqMan® MicroRNA Assays 的位置共

同显示在茎环序列（绿色空心框）和成熟 miRNA 序列（绿色实心框）的背景下，让每个分析在初级转录本上的空间关系能很容易地理解。更多的分析细节显示在右侧。灰色区域代表了作为分析设计对象的区域。

## 应用

TaqMan® Pri-miRNA Assays 让这种新“基因”种类的转录能够轻松方便地定量，其灵敏度和特异性足够分辨多个 miRNA 位点。这对于解决下列 miRNA 表达和功能性方面的关键问题非常理想：

### • miRNA“基因”转录的调控

11%的成熟 miRNA 序列产生自多个基因组位点的转录。也就是说，成熟 miRNA 序列来自多个茎环，即多个 pri-miRNA 序列。通过利用特异针对各个 pri-miRNA 转录本的 TaqMan® Pri-miRNA Assays，能将转录改变与目的 miRNA 在成熟水平所检测到的变化直接关联。

### • miRNA 生物发生的调控

最近的观察数据表明，成熟途径的多个步骤都受到调控（Heo, 2008; Viswanathan, 2008）。在阐明这些调控事件何时是成熟 miRNA 水平所检测到变化的成因时，关键要排除初级转录本在基因水平的转录变化。TaqMan® Pri-miRNA Assays 是定量目前成熟途径中初级转录本集合的理想工具，与特异针对成熟 miRNA 的 TaqMan® MicroRNA Assays 共同使用，能够识别并鉴定出在成熟途径水平上所发生的调控事件。

### • Pri-miRNA 转录本的定位

MicroRNA 基因座一般是多顺反子的，其中同一个初级转录本中多个 miRNA 序列聚集成簇。然而，许多 pri-miRNA 转录本的一级结构还未充分鉴定。利用独特的设计方法，多个 TaqMan®

Pri-miRNA Assays 之间的关联度能够成为一种独特快速的方法，来定位 miRNA 茎环簇。

## 分析性能

TaqMan® Pri-miRNA Assays 带来了 Applied Biosystem® TaqMan® 分析所闻名的高灵敏度、极佳特异性和宽的线性动态范围。由于分析灵敏度高，TaqMan® Pri-miRNA Assays 只需要极少的样品投入：低至 1 ng 的总 RNA 已足够定量中等至高表达 miRNA 位点的表达。

与 miRNA 研究领域的顶尖研究人员合作，我们展示了分析在分辨包含密切相关的 miRNA 茎环序列的不同基因座上的能力（图 4）。这对于它们在研究基因调控这个重要方面的应用很关键。

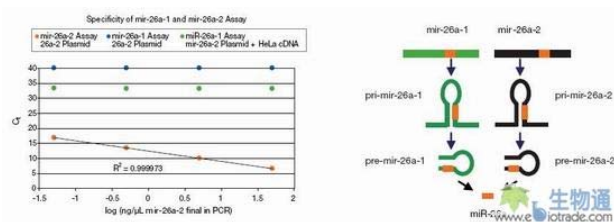


图 4. TaqMan® Pri-miRNA Assays 显示出高特异性。利用含有 pri-miRNA 茎环 mir-26a-1 或 mir-26a-2（它们共享同一个成熟 hsa-miR-26a 序列）的质粒，pri-mir-26a-2 TaqMan® Pri-miRNA Assay 只检测 hsa-mir-26a-2 质粒的特异性得到证实。（由韩国首尔国立大学的 Young-Kook-Kim 和 Narry Kim 提供。）

## 流程

TaqMan® Pri-miRNA Assays 采用了与所有 Applied Biosystems® TaqMan® Gene Expression Assays 相同的简单方便流程。无论是两步法实时定量 PCR (RT-qPCR) 步骤的可靠性，一步法 RT-qPCR 步骤的便利性，还是快速循环的速度，Applied Biosystems 都提供了经过验证的试剂盒，支持这些不同的分析流程。在定量前必须确保样品是不含 DNA 的，这一点很重要，因此分析

经过了额外的验证，利用 Ambion® TURBO DNA-free™ Kit 来进行样品的预先纯化。

介于 TaqMan® Gene Expression Assays 和 TaqMan® Pri-miRNA Assays 共享相同的设计方法和实验流程，同样多种选择的 TaqMan® Gene Expression Assays 的内源对照分析也推荐与 TaqMan® Pri-miRNA Assays 共同使用。

• 高度特异——单个基因组位点的定量  
microRNA 转录

• 快速、简单，可扩展——两步法 RT-qPCR  
提供了高质量的结果

• 新视角——在基因水平测定 microRNA 的表达

[索取更多技术资料!](#)

# 联川生物：miRNA 表达谱分析 的一站式解决方案

对于 microRNA 研究者来说，microRNA 微阵列是一个非常强大的工具，能在一次实验中检测物种已知的 microRNA。成功的 microRNA 微阵列检测系统应该包括：优质的芯片，完善的样品准备、标记和检测体系，并克服 miRNA 低丰度、短序列、难富集三大特点。

美国 LC Sciences 公司是一家专业提供基因组及蛋白质组产品与服务的生物技术公司，提供全方位的 DNA、RNA 及多肽微阵列服务，可用于核酸/蛋白表达谱与功能分析，生物标记发现和新药筛选。LC Sciences 在中国成立了分公司—联川生物，为您提供从 RNA 到 microRNA 微阵列完整数据分析的全方位服务。

## 样品处理

你只需提供 10 ug 的总 RNA 样品。联川生物的研究人员会通过 Bioanalyser 电泳和 Nanodrop 测定 OD 值，严格地控制总 RNA 样品质量。只有通过质量控制的总 RNA 样品才进一步分离小 RNA，并采用单色或双色荧光标记进行芯片杂交实验。

## 优质特异的芯片

MicroRNA 检测分析采用专利的  $\mu$ ParaFlo™ 微流体芯片杂交平台，保证了杂交检测的灵敏度和特异性。

- 低系统噪音——微阵列芯片采用原位合成技术精确控制探针浓度，在最低的背景噪声下优化得到最高的检测信号。

- 检测范围——动态范围可达 3.5 logs，最低检测极限约 100 attomole

- 特异性—— $\mu$ ParaFlo™ 微流体芯片技术，保证了芯片检测的特异性。单碱基错配（1MM）

就能使杂交检测信号至少降低 30 倍以上，完全匹配与单碱基错配信号比超过 100 倍。

## 全面最新的探针

- 全面性——联川生物提供的 miRNA 微阵列涵盖了 Sanger microRNA 数据库（miRBase）中最新 12.0 版本及之前版本的所有物种的 miRNA 序列信息

- 实时更新——专利的  $\mu$ ParaFlo™ 微流体芯片技术保证了 miRNA 芯片与 Sanger miRBase 同步更新。2008 年 9 月 1 日，Sanger microRNA 序列数据库发布了史上最大规模的升级。最新版本 V12.0 报道了 8273 条成熟 microRNA 序列，相比于 11.0 版新增 2062 条 miRNA 序列信息。

- 客户定制——你可在标准 microRNA 微阵列上免费添加最多 100 条定制序列探针（长度不超过 25nt）。联川生物也提供完全定制微阵列服务，满足你进行预测序列验证、新型 small RNA 发现等研究的需求。

## 芯片扫描和数据采集

平衡视角下扫描得到微阵列图像。采集质控、背景及 microRNA 探针的数据信号强度。

## 完整的数据分析

在收到样品的 3-4 周后，联川生物将出具完整的数据分析报告。数据分析经过背景信号的减除和数据的归一化等处理。对双重样品分析时，进行 p

值计算,并根据预设的阈值得到一张显著性差异表达的 microRNA 列表。你将得到原始和处理过的扫描图像、包含序列信息的微阵列布局文件、原始杂交信号值、数据归一化处理的杂交信号值、显著差异性杂交信号数据分布图和列表、总结报告。

LC Sciences 高品质的 microRNA 微阵列检测平台,让你快速获取高质量的实验结果和完善的的分析,为实验结果的发表提供了强有力的技术支持。截至目前,LC Sciences 的客户已经在 microRNA 研究领域发表了 53 篇高水平论文,其中 4 篇发表在 Nature, 1 篇发表在 Science。

### 一站式解决方案

联川生物为了向客户提供 miRNA 表达谱分析的一站式解决方案,新推出 microRNA real-time PCR 服务。Real-time PCR 是验证微阵列表达谱数据的金标准,可以对 microRNA 表达谱进行实时定量分析。这将有助你将焦点集中在感兴趣的 miRNA(由微阵列检出)上。同时,特异的 Real-time PCR 表达谱数据将有助你深入理解这些 miRNA 的真实生物学意义。我们使用 ABI 公司特异灵敏的 TaqMan® microRNA assay 试剂盒对 microRNA 进行定量检测,并提供完整的数据分析。该实验仅对成熟 microRNA 进行检测,而不是它的前体,因而可确保获得生物学相关的结果。

现在,你只要准备好 10 ug 总 RNA 样品就行了,其他的都交给联川生物吧。

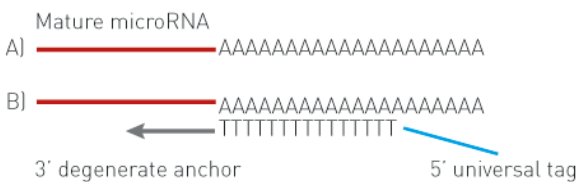
# Exiqon 推出全新的 miRNA 分析平台

以 miRNA 芯片著称的丹麦 Exiqon 公司在 2009 年 10 月 15 日推出了以实时定量 PCR 分析 microRNA 的新平台。全新的 miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR 产品线综合了 LNA™ 技术的优势和通用的反转录步骤，让 miRNA 表达谱分析更加灵敏。

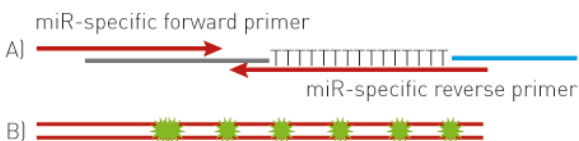
两个 PCR 扩增引物都是 miRNA 特异的，且经过 LNA™ 的优化，能够准确定量极低水平的 miRNA，灵敏度高，且背景极低。此外，这两个引物还能分辨同源性很高的 miRNA 序列，特异性更好。新版的 miRNA 表达分析使用了通用的反转录步骤，这样一次反转录反应就能充当多个 qPCR 分析的模板，不但节省了宝贵的样品，还避免了技术差异，更重要的是，省时又省力。

此分析的流程如下图所示。首先在成熟的 miRNA 模板上加上 polyA 尾巴（步骤 1A），再利用 PolyT 引物进行 cDNA 合成，PolyT 引物的 5' 端为通用标签，3' 端为简并锚（步骤 1B）。然后利用 miRNA 特异的正向和反向引物进行 cDNA 模板的扩增（步骤 2A）。最后用 SYBR Green 进行检测（步骤 2B）。

## Step 1: First-strand synthesis (RT)



## Step 2: Real-time PCR amplification



全新的 miRNA qPCR 产品线中还包括即用型的 qPCR 板，覆盖了 13.0 版 miRBase 数据库中 730 个人 miRNA。通用型 cDNA 合成反应和即用型 qPCR 板结合使用，则 miRNA 图谱分析更快速更简单。平板上预装了反应引物，你只需加入 cDNA 和 SYBR Green master mix，就可以立即开始 qPCR 扩增了。从样品到结果，只需 3 个小时。即用型 qPCR 板已经过验证，能够从来自 FFPE 切片和血清/血浆的 RNA 中获得准确的表达谱。

目前已经有一些客户使用了这个新产品。美国西雅图系统生物研究所的王凯(音译)博士谈到：“我们很高兴看到 Exiqon 进入到以 qPCR 来获得大规模 miRNA 表达谱的市场。我们发现，miRNA 即用型 PCR 板给出了灵敏而一致的结果。这个产品为整体的 miRNA 图谱分析提供了便利的极佳方案。”

伦敦国王学院精神病研究所的 Angela K. Hodges 博士在血浆样品中试用了这个新产品，她认为这些分析为今后的生物标记物探索和验证提供了准确可靠的流程。（生物通 余亮）

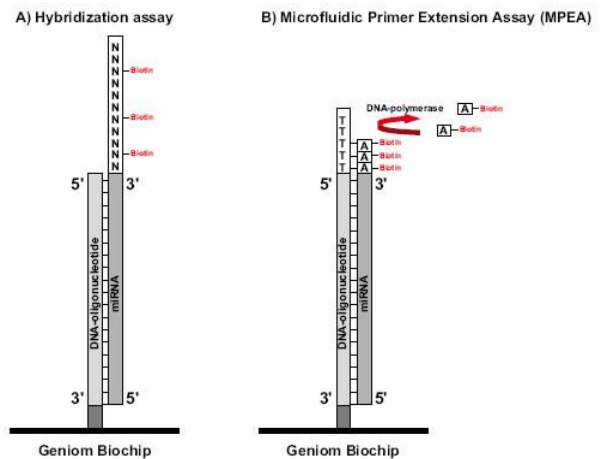
# Febit 新型微流体 miRNA 表达谱芯片

近年来，非编码小 RNA 逐渐从配角变成了主角。miRNA 这个不起眼的小分子原来是基因表达的重要调节器。它们还与多种癌症相关，也就理所当然成为药物靶点。另外一种在细菌中鉴定出的 piRNA 也是反式作用的小干扰 RNA，虽然现在研究得较少，但也是前途无量。

随着检测方法的成熟，miRNA 的数量呈爆炸式增长。在 2004 年，总共只有 719 个，但到了今年 9 月，miRBase 数据库中的 miRNA 序列信息已超过一万条。miRNA 变化如此之快，如果没有最新最全面的工具，我们如何能跟得上它的脚步？

目前市场上高通量检测 miRNA 的平台是芯片，它能同时测量成百上千个 miRNA 的表达。不过这些芯片大多需要事先标记。而德国 Febit 公司采用了另一种微阵列方法，叫作微流引物延伸检测（Microfluidic Primer Extension Assay, MPEA），这种检测方法以 Febit Geniom®微阵技术的使用为基础，miRNA 在杂交前无需标记。接着，DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段直接加入微量流动芯片的通道中，相应的 miRNA 得以特异延伸。此方法将杂交检测的特异性与酶延伸的高辨别能力相结合。

MPEA 相对于现有的其它微阵列方法，显示出不少优势。由于 miRNA 不需经过富集、PCR 扩增或标记等预处理而直接导入，这样就确保避免了实验误差的产生（见图，A 为常规杂交方法，B 为微流引物延伸）。传统的杂交检测最适合鉴别杂交靶点中心位点上的错配，相比之下，MPEA 提供了更高层次的灵敏度，由于酶催化的延伸仅在 3' 末端几乎完全配对时才会发生，因此很少会出现交叉杂交信号。



与传统的 RNA-预处理，Klenow 延伸阵列检测（RAKE）相比，MPEA 也显示出几点主要优势。RAKE 微阵列通过与其相应的寡核苷酸的 5' 末端结合于表面，而 MPEA 阵列的寡聚核苷酸捕获探针与其 3' 末端相连。MPEA 的这种结合方式不仅排除了探针的自身延长，尤其重要的是说明这种延长作用远离微通道管腔表面而没有任何位阻。由于微流体通道的使用，也大大降低了所需 RNA 样本量。MPEA 具有高度的灵敏度，无需扩增，就足以检测出来源于福尔马林固定样本，组织针孔吸取样本或激光捕获显微分离样本的纳克级的总 RNA。

最近，吉奥生物和德国 Febit 联合推出了和 Sanger miRBase 14.0 同步的 miRNA 表达谱芯片。芯片采用独特的 Geniom 微流体技术，即时酶标方法，以及全自动化的芯片处理，以极少量样本实现高灵敏度、高重现性的精确检测。微流体微点阵系统，具备灵活性以迅速地适应新的序列信息。基于最新数据资料，最佳化的捕获探针的合成，是直接生物芯片的微通道内完成的，从而保证了

芯片的生产和最新 **microRNA** 同步的独一无二优势。

**Geniom RT** 分析仪融入了自动化微阵列处理的高精度的微流体技术,使得分析真正实现了全自动化。统一的杂交环境促使了结果的高重现性以及检测的快速性。自动流程包括:自动化样本装载,动态的温度控制,低体积的主动运动杂交(20ul),自动洗涤,自动动态成象,以及数据分析。

**miRNA** 表达谱芯片与 **Sanger miRBase 14.0** 同步,所检测的 **miRNA** 数量最全。芯片具有有效和优化的探针设计。因此,任一 **miRNA** 生物标记会也不会从检测过程中漏掉。专利技术对样本量要求少,标准只需 1—2ug 总 RNA,最少需要 130ng 总 RNA。

研究人员利用这种全自动的 **miRNA** 表达谱芯片,分析了 17 个非小细胞肺癌患者的血液样品和 19 个正常对照的血液样品。他们发现,与对照相比,有 27 个 **miRNA** 在肺癌患者中显著下调。他

们还用 **qRT-PCR** 对部分 **miRNA** 进行了验证。他们认为这种方法能用于肺癌的检测。

当然, **miRNA** 芯片也可根据您的要求灵活定制,包括预期的,突变,或者特殊要求的 **miRNA** 序列。从样本到即可用于发表的数据,吉奥生物提供了一整套服务。目前, **miRNA** 芯片检测正在促销中, [点击索取详细信息](#)。

德国 **Febit Geniom** 生物芯片的特点:

- 微流生物芯片,对重复性杂交及洗涤环境有着精确的流体控制
- 封闭的间隔消除了蒸发,并提供了高温杂交环境
- 8 个分开的微通道,每个含 15,624 阵点
- 每张芯片含 124,992 阵点
- 可以平行地进行 8 个样本的杂交检测

# Signosis miRNA 检测芯片 简单又高效

几年前，若提到 microRNA (miRNA)，大家可能还是一脸茫然，但现在它们却俨然生命科学世界的明星。这些 RNA 分子虽然很小 (21-25 nt)，容易被人忽略，却在基因表达的调控中扮演了重要的角色。我们所认识的 miRNA 也越来越多。最新版 (14.0) 的 miRBase 数据库中收录的 microRNA 序列信息首次超过 10,000 条，其中人基因组中已鉴定出 721 条。成熟 miRNA 的表达是组织特异性的，miRNA 的丰度可能相差几个数量级。更重要的是，miRNA 表达的失调可能会引发癌症。因此，众多疾病研究实验室都争相绘制癌症的 miRNA 表达图谱，来了解 miRNA 的调控作用，并寻找癌症的标志物。

绘制 miRNA 图谱，芯片当然是首选。但 miRNA 在三个方面与 mRNA 不同：(1) miRNA 是相当小的分子，丰度差异较大；(2) 成熟 miRNA 与其前体 pre-miRNA 和 pri-miRNA 共存，只是长度不同；(3) 许多 miRNA 序列非常接近，如同源分子，只有一个或几个核苷酸的差异。因此，常规芯片技术不能直接分析这些分子。目前市场上已经有不少 miRNA 芯片产品，但有些较繁琐，需要预分离 microRNA，有些则缺乏分辨力，不能区分同源之间的差异。

现在，生物通带你了解一种新产品-美国 Signosis 公司的 miRNA Array。我们之所以关注它，还是源于《Science》杂志的介绍。“基于 T7-寡核苷酸连接分析的 miRNA 检测芯片，使用户用更少的花费去评估 miRNA 的表达。多种 miRNA 表达可通过一个简单的试验同时进行测定。该方法可完美地鉴别只有一个核苷酸差异的同源 miRNA，进而可区别出所有同源的 miRNA。捕获的 miRNA 再进行 T7 扩增，不会出现 PCR 方法所导入的偏差。总 RNA 可以直接使用，无需预分离 miRNA。”以上这段话译自 2008 年 5 月 9 日 (Vol 320) 的《Science》杂志。

仔细琢磨一下，发现 Signosis 的芯片设计还真是有些巧妙。它融合了引物连接分析 (oligo Ligation Assay) 和以 T7 转录为基础的线性扩增，开发出专利的 T7-OLA 技术 (图 1)。对每一个 miRNA 分子，有二条引物 (oligo) 来识别，每条引物只识别 miRNA 一半的序列。其中的一条引物中含有 Tag 序列，另外一条引物含有 T7 启动子序列。只有序列完全匹配的时候，两个引物才能和 miRNA 杂交，形成 RNA/DNA 的杂合体。即使只有一个核苷酸不匹配，都会造成杂交或者随后连接的失败。这也是 T7-OLA 技术可分辨同源 miRNA 的原因。

由于 miRNA 分子太小，这个 DNA/RNA 杂合体可能不太稳定，因此引入了叠加序列。通过引物及互补序列的延伸，杂合体分子的稳定性增加。含有生物素 (biotin, B) 的短序列互补结合到其中的一条引物上。通过结合有亲和素 (Streptavidin) 的磁珠分离出杂合体。然后，两引物在 T4 连接酶的作用下，被连接成一条 DNA 片断。随后经过线性扩增 (转录)，含有生物素的 UTP 整合到 RNA 序列中。把转录好的 RNA 序列和预先准备好的含有不同 miRNA 序列的膜，进行杂交。最后加入辣

根过氧化物酶（HRP）标记的亲合素进行反应，加入发光底物测定。

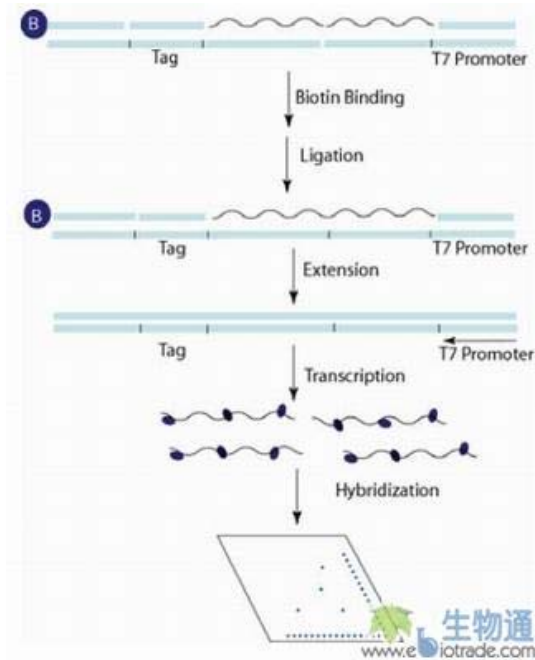


图 1. miRNA 芯片分析流程图。

虽然上面罗罗嗦嗦说了很多种 oligo，但实际操作却相当简单，只有三步：(1) 将总 RNA 或预分离的 miRNA 样品与提供的引物混合，形成 RNA/DNA 杂合体；(2) 用磁珠选出杂合体，除去游离的寡核苷酸，在 miRNA 引导下两引物连接成一个 DNA 片段；(3) 通过 T7 转录，扩增连接的 DNA 片段。之后就是杂交和检测了。目前 Signosis 公司提供多种 miRNA 芯片试剂，包括人、小鼠、大鼠、干细胞、肿瘤以及凋亡相关。人 miRNA 芯片试剂有 60-72 个点；肿瘤 miRNA 芯片试剂有 132 个点；小鼠 miRNA 芯片试剂有 119 个点；大鼠 miRNA 芯片试剂有 113 个点。据了解，更多功能方向的 miRNA 芯片以及检测更多 miRNA 的芯片正在研发中，这将促进 miRNA 芯片在探索 miRNA 差异表达方面的应用。

[点击索取miRNA芯片的详细资料与报价！](#)

近几年，研究人员大量绘制与癌症发生相关的 miRNA 表达图谱，希望从中找到诊断及治疗的线索。美国 Wistar 研究所的研究人员就鉴定出两种

能够促进肿瘤扩散或转移的 miRNA 分子。其中一个 miRNA 分子还可能为乳腺癌转移的早期预防提供信息，并且有助于这种癌症的治疗。miRNA 还可能是白血病的治疗靶标。另外，治疗丙型肝炎的首个 miRNA 药物也已进入临床。如果你也在从事此类研究，相信 miRNA 表达图谱能帮你不少忙。

array 分析是一种多重的分析，可以同时测定多个分子，但其结果需进一步确认，Northern blot 是确认这些发现的最常用方法。此外，并非所有人都想绘制 miRNA 的表达图谱，有时我们只对某几个特别感兴趣。这时也可以用 Northern blot。它简单易行，大部分实验室都可以操作。但 Northern 分析也有不少缺陷：很难鉴别同源 miRNA，灵敏度不高，操作繁琐。

针对这些问题，Signosis 开发出专利的 miRNA 微孔板检测试剂。在 miRNA 微孔板检测中，一个 miRNA 分子通过二个连接 oligo 分别与捕获 oligo、生物素化的检测 oligo 连接。杂交体通过与固相化的捕获 oligo 杂交固定在微孔板上，再由辣根酶标记链酶亲和素和发光底物检测，这种杂交体结构对 miRNA 分子序列非常敏感，即使一个核苷酸的差异也会阻止杂交体的形成，从而可分辨同源 miRNA。而且该方法的敏感性也比 Northern blot 高。此外，这种微孔板检测非常简便，就像 ELISA 实验一样，只需加样、孵育、洗涤，而省去了繁琐的转膜和杂交。

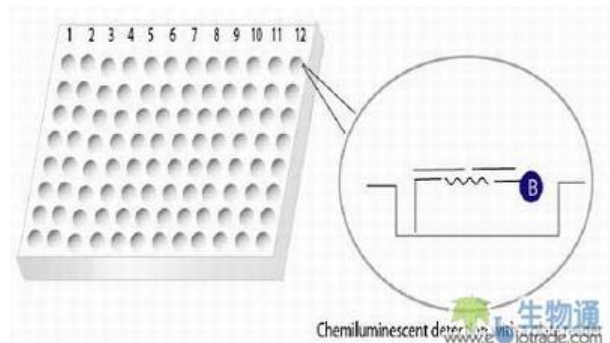


图 2. miRNA 微孔板分析示意图。

另外，Signosis公司还提供了miRNA 萤光素酶报告载体，靶基因报告载体，Northern blot分析试剂盒

(<http://www.hongxinbio.com/products.asp?id=13>) 等产品，以供全方位的miRNA研究。

#### 总结

基于 T7-OLA 专利技术的 miRNA 芯片 (<http://www.hongxinbio.com/products.asp?id=8>) 具有以下优点：

- 分辨力强---能分辨所有同源的 miRNA ，所有同源的 let7 可清楚分辨；可分辨前体 miRNA 和成熟 miRNA

- 线性扩增---捕获的 miRNAs 被 T7 转录扩增，没有 PCR 扩增引入的偏差

- 勿需预纯化---总 RNA 可以直接进行分析，勿需预分离

- 操作简单---步骤简单、流畅

miRNA微孔板检测试剂

(<http://www.hongxinbio.com/products.asp?id=93>) 具有以下优点：

- 操作简单---做 miRNA 试验就像做 ELISA 试验，无需用酶转换 miRNA 成 cDNA，检测步骤只是孵育和洗涤。

- 灵敏度高---较 miRNA Northern blot 分析敏感 1000 倍。

- 分辨力强---在分辨同源 miRNA 时，较 Northern blot 有更高的分辨力。

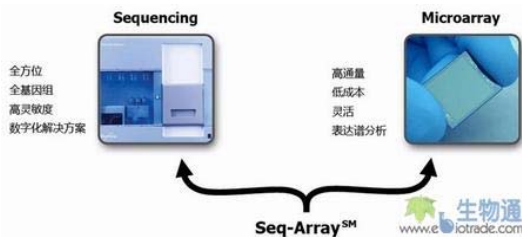
- 差别定量---二个或二个以上特定 miRNA 表达的差异可定量分析。

(生物通 薄荷)

# 联川生物隆重推介 Seq-Array 服务

深度测序技术 (Deep Sequencing) 是新近出现的一项革命性的测序技术, 具有超高数据通量, 高覆盖度的特点, 可助科研人员快速获取生物样本中从 microRNA (miRNA) 到整个基因组的全部序列信息。miRNA 是真核生物体内一类具有基因表达调控功能的非编码小 RNA。愈来愈多的实验证据表明, miRNA 几乎参与了所有的生理和病理过程, 并在其中发挥重要的调控作用。深度测序技术的出现, 使科研人员找到了一条快速高效地发现新 miRNA 的途径。然而, 由于深度测序相对较高的实验支出和低样品检测通量的限制, 科研人员通常无法采用重复测序对测序结果进行验证或是对多组生物学重复样品测序以获取 miRNA 表达差异。微阵列芯片作为一种高效的检测工具, 可以快速检测验证完整的测序信息, 并能以较低的费用对生物学重复样品进行高灵敏度高特异性的 miRNA 表达谱分析。如果能同时发挥两种技术的优势, 无疑将极大的促进 miRNA 领域的研究。

现在 LC Sciences 全球率先推出 Seq-Array 服务。Seq-Array<sup>SM</sup> 综合了最新的深度测序技术, 领先的生物信息学分析策略和创新的  $\mu$ Paraflo<sup>®</sup> 定制微阵列平台, 为您 microRNA 研究提供个性化全方位的技术服务。



Seq-Array<sup>SM</sup> 提供了一条从最初广泛探寻 miRNA 到聚焦其生物学功能的高效研究途径。

- Seq-Array<sup>SM</sup> 是深度测序和微阵列技术的完美结合, 它将二者的效能最大化, 同时克服了它们各自的局限。

- Seq-Array<sup>SM</sup> 提供了一条从最初广泛探寻 miRNA 到聚焦其生物学功能的高效研究途径。包括: 揭示调控的靶基因, 定义基因表达通路, 以及发现生物标志物。

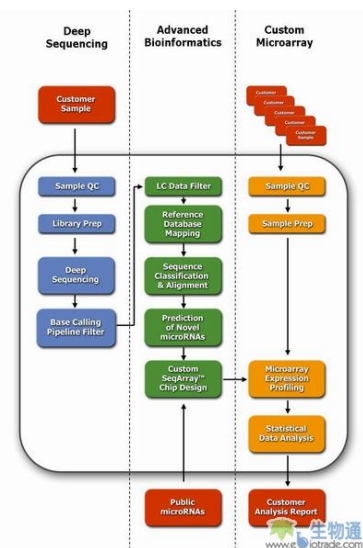
- Seq-Array 特别适合用于对大量样品进行的焦点研究。在测序获得完整的序列后, 我们可设计相应的微阵列探针序列, 并使用定制阵列进行高效的表达谱分析。

- Seq-Array 同时也适合用于发现 (测序) 和验证 (阵列) 具有临床意义的生物标志物。

## [了解Seq-Array服务的详细内容](#)

关于 LC Sciences 与联川生物

LC Sciences (美国) 是一家专业提供基因组及蛋白质组产品与服务的生物技术公司, 提供全方位的 DNA, RNA 及多肽微阵列服务, 可用于核酸/蛋白表达谱与功能分析, 生物标记发现和 新药筛选, 研发应用于诊断和生物传感的微型实验设备。



基于专利的 $\mu$ Paraflo<sup>®</sup>微流体技术, LC Sciences可提供具有高度灵活性和定制化的创新产品来满足客户快速变化的需求。联川生物作为LC Sciences

在中国成立的全资子公司, 随时为您提供最新的生物技术服务和前沿信息。

欢迎拨打免费咨询热线: 800-857-1452 或登陆[www.lc-bio.com](http://www.lc-bio.com)获取更多信息。