

# miRNA 检测

## miRNA 简介

小 RNA 是 19~28 nt 的调控 RNA 分子，主要包括微 RNA(micro RNA, miRNA)和小干涉 RNA(short interfering RNA, siRNA)两类，其中的 miRNAs 成为继 siRNAs 之后新的研究热点之一，名列 2002 年和 2003 年美国《科学》杂志评出的年度十大科学成就。

miRNAs 是长片段 RNA 序列的一部分，同 siRNAs 一样是比较短小的单链小分子 RNA，一般来源于染色体的非编码区域，由大约 70 nt 大小的可形成发夹结构的前体加工而来，它通过与其目标 mRNA 分子的 3 端非编码区域(3-untranslated region, 3 UTR)互补导致该 mRNA 分子的翻译受到抑制。

## MiRNA 检测方法

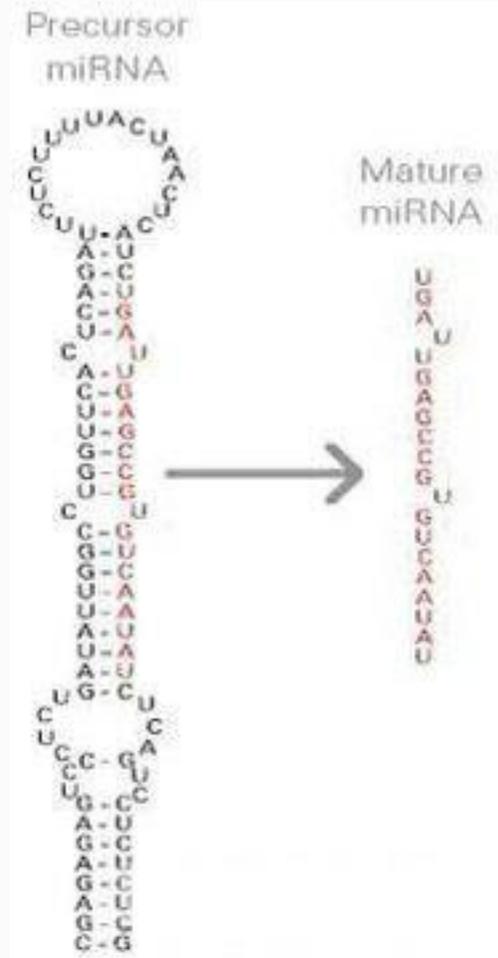
要了解 miRNA 在基因调控中扮演的角色，很关键的一个方法就是迅速、准确地定量检测 miRNA 基因的表达。因此，miRNA 表达水平的检测也成为了科学家们研究的热点。但是由于小分子 RNA 是一类很小的分子，部分小分子 RNA 表达水平可能很低，因而需要极为灵敏而定量的分析工具。常用的检测方法有：

1. Northern blotting
2. 核糖核酸酶保护分析以及基于此方法的液相杂交。
3. RT-PCR 也被用来检测 miRNA 前体的表达水平，其他基于 PCR 技术检测 miRNA 的方法有

引物延伸法，就是在引物的 5 末端加一个特异标记，可以定量测定低丰度的 RNA 含量；

原位杂交技术(CISH,FISH)可以方便的检测 miRNA 的时空表达的差异。

4. 芯片(microarrays)技术[46,47]是一种较快的研究 miRNA 表达的方法。



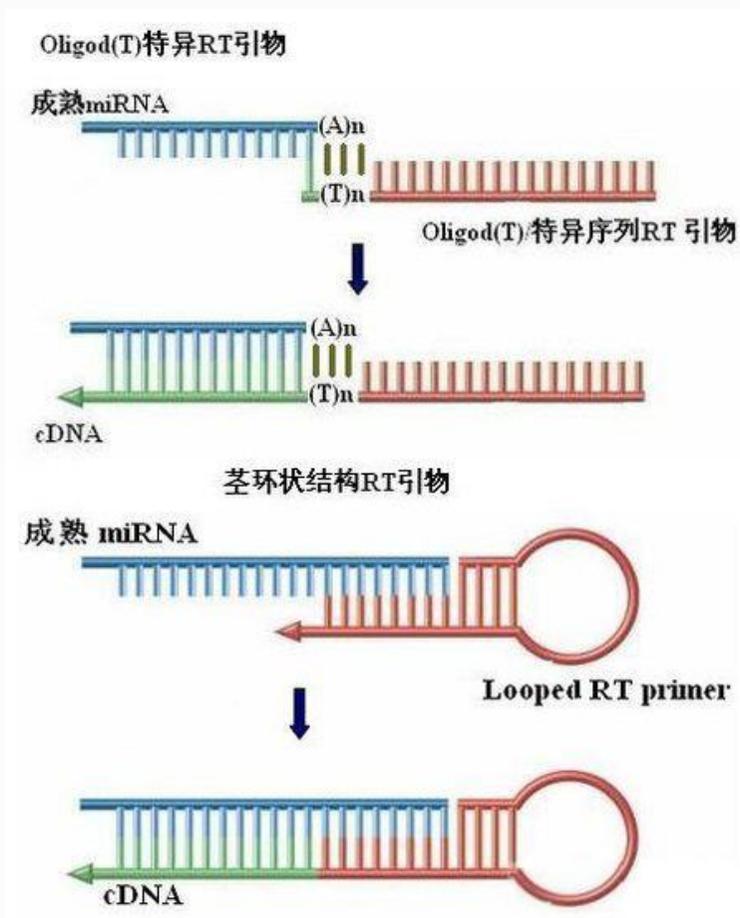
## 反转录引物分类以及设计原理

Real-time PCR 方法克服了由于 miRNA 分子太短(~22 nt)带来的定量最大难题而引入靶向特异性的反转录引物, 该 RT 引物可以与成熟 miRNA 结合, 形成反转录引物/成熟 miRNA 复合物, 并在 miRNA 的 5'末端延伸。这样就得到一个较长的反转录扩增因子, 为进一步做实时定量 PCR 提供了符合要求的模板。

RT 引物有两种类型：

### 1. Oligod(T)特异的 RT 引物

由特异序列+(T)20左右+兼并碱基 V 或 VN 组成。(所有 miRNA 可以公用一个 Oligod(T)的 RT 引物，但是 RNA 在反转录前需要进行末端 Poly(A)加尾)



### 2. 茎环状结构的 RT 引物

由可以自身呈环茎状的特异序列+6到8个 miRNA 3'端反向互补碱基组成(一条 miRNA 序列特异对应一个茎环状结构的 RT 引物)。

## 引物探针设计

由于反转录后得到的 cDNA 为(miRNA+RT 引物)复合片段。

上游引物可以在 miRNA 自身序列上找，如果 GC 含量太低，可以在上游引物 5'端加入 GCGCC 等的保护碱基；下游引物在 RT 引物的反向互补序列中找；也就是说：上游引物是每个 miRNA 所特有的，下游引物为通用引物就可以了。

荧光定量 PCR 检测方法有 SYBR Green 染料法和 TaqMan 探针法。前者需要调整引物浓度以及引物扩增效率，把引物二聚体调整到越小越好；探针法则需要设计荧光探针，这其中由于 MGB 探针需要碱基数量少和特异性好的特点而被推荐。

探针设计位置有 3 个：完全与 miRNA 序列相同、在 miRNA 与 RT 引物的交叉点、完全在 RT 引物上；这其中又有正向和反向互补两种情况。至于探针要设计在那个位置，根据自己试验情况而定，本人以为效果都差不多。

## 试验操作流程

### 1. RNA 提取

在以上两种 RT 引物中，Oligod(T)特异引物所需要的 RNA 尽量是用特殊试剂盒提取的小 RNA，而茎环状结构 RT 引物需要 RNA 正常提取就好。

另外由于所需样本不同 RNA 提取方法也不完全相同，普通组织样本和细胞推荐使用 Foregene Animal Total RNA Isolation Kit；血液和植物样本推荐使用 Foregene 专门的 RNA 提取试剂盒。

### 2. 反转录

确认用 Oligod(T)特异 RT 引物时，RNA 需要进行 3'Poly(A)加尾处理。

反转录的酶没有特殊要求，操作请按照各自反转录酶的说明书进行就好。这里特别注意的是：反转录过程中用到的 RT 引物(常规的是随机引物、Oligod(T)和特异引物)是前面提到的 Oligod(T)特异引物和茎环状结构 RT 引物，它们分别属于 Oligod(T)和特异引物范畴，在反转录中不需要另外添加其他 RT 引物。

在确定反转录温度中请特别注意您使用的是哪一种 RT 引物，而设定相应的反转录温度。

### 3. 荧光定量 PCR

优化 PCR 体系(引物浓度、Mg 浓度、dNTP 浓度、退火温度等)，正常操作。