

无标记 microRNA 芯片分析方法的建立与优化*

段德民¹⁾ 惠利省²⁾ 李丽诗²⁾ 阎锡蕴^{1)**} 李 炯^{2)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²⁾中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 苏州 215123)

摘要 MicroRNAs(miRNAs)是生物体内源的一类非编码小分子 RNA, 它与癌症的发生息息相关, 是一个有潜质的生物标志物, 细胞的发育、分化、增殖、凋亡都与 miRNAs 调控有关. miRNAs 研究中关键环节是其表达谱的分析, 用芯片分析 miRNAs 表达谱, 通常要在杂交前对样品进行分离、标记、纯化, 这是整个检测过程中最耗时耗力、费用昂贵的一个步骤, 且在此过程中由于酶的使用及步骤的增加还可能改变样品中目标序列的初始比例, 影响实验结果的可靠性. 为解决这些问题, 作者建立了一种新型的“无标记 microRNA 芯片分析”方法, 该技术基于堆积杂交(stacking hybridization)原理, 引入一段预先标记荧光的通用标签序列(universal tag, UT), 因而被命名为 SHUT 检测方法. 本文主要对 SHUT assay 的整个实验过程进行了系统优化, 并对其灵敏度和特异性等相关指标进行了评价. 实验结果表明: 该新型芯片技术检测灵敏度可达 2 fmol/L, 不但可以区分只有 1 个碱基差异的 miRNAs 家族成员, 还可以有效排除非活性 pri-miRNA 与 pre-miRNA 前体的交叉杂交信号, 而且 100 ng 的总 RNA 即可用于检测分析; 该新型芯片技术对于 miRNAs 及其他短链核酸分子的检测分析是一个理想快速的检测平台.

关键词 堆积杂交, 通用标签, microRNAs 芯片, 表达谱

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00478

MicroRNAs(miRNAs)是真核生物体内源性的一类非编码单链小 RNA 分子, 一般由 19~25 个核苷酸组成, 它们广泛存在于动物、植物、病毒以及其他物种^[1-4]. 其本身不具开放阅读框(open reading frame, ORF), 而是通过非完全互补的方式结合到靶标 mRNAs 分子的 3'端非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)上, 从而在转录后水平对基因表达进行调控^[5-6]. 研究发现, miRNAs 与细胞的发育、分化、增殖、凋亡等多种人类疾病的发生、发展密切相关, 这包括癌症、病毒性疾病、心血管疾病、代谢障碍性疾病等^[7-10]. 基因芯片技术是 miRNAs 表达谱分析的一项关键技术, 2003 年, Krichevsky 等^[11]首次利用基因芯片研究了脑发育过程中 miRNAs 的表达情况, 发现 9 个 miRNAs 在脑发育过程中具有明显的表达差异, 这开创了芯片技术用于 miRNAs 高通量研究的历史. 用微阵列芯片分析 miRNAs 表达谱, 通常都要在杂交前对样品进行分离、标记、纯化, 这是整个检测过程中最耗时耗力、费用昂贵的一个步骤, 在此过程中由于酶的使

用及步骤的增加还可能改变样品中目标序列的初始比例, 影响实验结果的可靠性. 为解决这些问题, 作者建立了一种新型的“无标记 microRNA 芯片分析”方法——基于堆积杂交的通用标签检测方法(stacking-hybridized universal tag assay, SHUT assay)用于 miRNAs 表达谱分析, 初步结果已于 2011 年 10 月发表于国际期刊 *Nucleic Acids Research* 上^[12].

本文主要对 SHUT assay 的整个实验过程, 包括玻片修饰、点样缓冲液、杂交时间等进行了系统优化, 期望尽快将这种新型的检测技术发展为我国自主知识产权的 miRNAs 芯片技术平台. 实验中对

* 国家自然科学基金(31270908), 中国博士后科学基金(2012M510049, 20110491461), 中国科学院王宽诚博士后工作奖励基金, 江苏省自然科学基金(BK2011361)和江苏省博士后科学基金(1101052C)资助项目.

** 通讯联系人.

阎锡蕴. Tel: 010-64888583, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn

李 炯. Tel: 0512-62872598, E-mail: jli2006@sinano.ac.cn

收稿日期: 2012-09-26, 接受日期: 2012-10-24

其灵敏度和特异性等相关指标进行了评价, 结果表明, 该新型芯片技术检测灵敏度可以达到 2 fmol/L, 并且具有很好的选择性, 可以区分只有 1 个碱基差异的 miRNAs 家族成员, 尤其是可以有效排除非活性 pri-miRNA 与 pre-miRNA 前体的交叉杂交信号, 100 ng 的细胞或组织总 RNA 即可以给出可靠的 miRNAs 表达谱实验结果. 因此, SHUT assay 对于 miRNAs 及其他短链核酸分子的检测, 是一个理想快速的分析方法.

1 材料与方法

1.1 材料

丙酮、无水乙醇、氯化钠、柠檬酸三钠、十二烷基硫酸钠(SDS)等化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 氨基硅烷购自南京曙光化工有限公司; 戊二醛、二甲基亚砜(DMSO)购自 Alfa Aesar 公司; 甜菜碱购自 Sigma 公司; DNA 核酸序列均为 Bioneer 公司(韩国)合成及纯化; RNA 核酸序列均为吉玛公司(上海)合成及纯化. 仪器主要有: Harrick 等离子清洗机(PDC-32G, 燕京电子有限公司); 接触角测量仪(OCA 20, DataPhysics, Germany). Agilent 杂交盒(Agilent p/n G2534A); 杂交炉(Agilent 2545A, USA); 晶芯® PersonalArrayer™ 16 个人点样仪、晶芯® LuxScan™ 10K-A 微阵列芯片扫描仪(博奥生物公司).

1.2 方法

1.2.1 醛基玻片的制备. 取 Corning 载玻片(75 mm×25 mm)若干张, 丙酮、乙醇、异丙醇依次充分荡洗, 等离子体清洗使羟基暴露. 之后采用 3%氨基硅烷溶液处理 15min 以使玻片衍生出氨基基团, 最后用 2.5%戊二醛溶液处理玻片以衍生出醛基基团. 玻片清洗及化学基团修饰的优劣程度, 通过测量表面接触角(contact angle, CA)来评价. 分别对清洗后、氨基硅烷处理后、醛基修饰后玻片各 2 片的接触角进行测定, 每片上测 3 个点, 滴液量为 3 μ l. 醛基化玻片制备好后密封, 放于 4℃ 备用.

1.2.2 微阵列制备及对点样液的优化. 首先将合成好的探针(5'端氨基修饰)溶解于点样液中, 配制成 20 μ mol/L 的工作液, 然后用点样仪将探针点制到醛基玻片上. 仪器工作温度为 24℃~26℃, 湿度为 50%~55%, 每张玻片上点制 8 个独立的微阵列, 每种探针 6 个重复点, 样点间距为 350 μ m. 在此过程中, 选取碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液为点样缓冲液, 着重考察点样液中甜菜碱、DMSO 对点

样的影响, 选择最优点样液配方.

1.2.3 杂交实验. 事先配制 20×SSC 溶液(3 mol/L NaCl+0.3 mol/L 柠檬酸三钠), 将提取的组织、细胞的总 RNA 或者合成的 miRNAs 按照需要的浓度稀释于杂交液(5×SSC, 0.2% SDS, 0.1 g/L 长度为 25 碱基长的随机 DNA 核酸序列)中, 同时加入终浓度为 200 nmol/L Cy3 荧光标记的通用标签(UT)序列. 取 45 μ l 杂交混合液与制备好的微阵列芯片杂交(杂交炉中, 15 r/min 转速, 除非特别说明, 杂交时间一般为 20 h, 杂交温度一般为 42℃). 反应结束后, 将微阵列芯片于 5×SSC+0.1% SDS 的溶液中漂洗 3 min, 再用 0.2×SSC 的溶液漂洗 2 次, 每次 3 min, 随后, 将微阵列芯片甩干以备扫描.

1.2.4 杂交时间的优化. 首先合成了靶标 miR-195 和对应的探针(P-miR-195)以及一条阴性探针(P-neg), 加入 Cy3 标记的通用标签序列(UT-8), 分别杂交 2、4、8、12、24 h 后分析其杂交信号的强弱. 用于优化杂交时间的探针、靶标和通用标签序列见表 1.

1.2.5 新型芯片技术平台 SHUT assay 的灵敏度. 首先配制 10 倍梯度稀释浓度(200 pmol/L~2 fmol/L)的 miR-195 靶标杂交溶液, 然后将其与包含 P-miR-195 的探针阵列杂交, 对获得的信号数据进行分析.

1.2.6 新型芯片技术平台 SHUT assay 的特异性. miRNAs 检测平台的特异性一般选用 let-7 家族来进行检验, 实验中选取 let-7 家族的 4 个成员即 let-7a、let-7b、let-7d、let-7f 对新型芯片检测方法进行评价. 合成的这 4 种 miRNAs 对应的探针及 miRNA(let-7f)靶标序列详见表 1.

1.2.7 新型芯片技术平台 SHUT assay 对前体 miRNA 的特异性区分. miRNA 前体(pre-miRNA)以及 miRNA 的原初转录体(pri-miRNA)与成熟体 miRNA 在生物样品中共存, 它们的存在往往会干扰对成熟体 miRNA 含量的准确检测, 而新型 SHUT assay 芯片技术平台则可以有效排除长链 RNA 分子的杂交, 只与成熟体 miRNA 杂交. 实验中选取了 miR-21 作为检测对象, 合成 miR-21 对应的探针 P-miR-21、miR-21 及 L-miR-21(包含了成熟 miR-21 的全长序列, 代表 pre- 前体或 pri- 原初转录体), 序列详见表 1. 分别将 miR-21、L-miR-21 与包含 P-miR-21 的探针阵列杂交, 分析并评价 SHUT assay 对前体 miRNA 的区分.

1.2.8 细胞 miRNAs 表达谱分析. 为验证新型

miRNAs 芯片技术平台的实用性, 实验中使用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取 HeLa 细胞、A549 细胞的总 RNA(按说明书进行), 提取的总 RNA 采用紫外分光光度计定量, 之后分别取 5 μ g、1 μ g、

100 ng 的细胞总 RNA 与制备好的探针微阵列进行杂交, 最后对杂交信号进行分析. 探针、靶标和通用标签序列见表 1.

Table 1 Sequences of Probes, Targets and UT

Probe name		Sequence(5'~3')	bp
P-let-7a		NH ₂ -AAAAAAAAAAAACTATACAACCTACTACCTCATGCGACCT	40
P-let-7b		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACCACACAACCTACTACCTCATGCGACCT	40
P-let-7d		NH ₂ -AAAAAAAAAAAACTATGCAACCTACTACCTCTTTCGACCT	40
P-let-7f		NH ₂ -AAAAAAAAAAAACTATACAATCTACTACCTCATGCGACCT	40
P-miR-1		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAATACATACTTCTTTACATTCCATGCGACCT	40
P-miR-7		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAACAAATCACTAGTCTTCCATGCGACCT	41
P-miR-16		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACGCAATATTTACGTGCTGCTATGCGACCT	40
P-miR-21		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAATCAACATCAGTCTGATAAGCTATGCGACCT	40
P-miR-23a		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAAGAAATCCCTGGCAATGTGATTGCGACCT	39
P-miR-29b		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACTGATTTCAAATGGTGTATGCGACCT	41
P-miR-30c		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAAGCTGAGAGTGTAGGATGTTTACATGCGACCT	41
P-miR-122		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAACACCATTGTCACACTCCATGCGACCT	40
P-miR-126		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACGCAATATTTACTCACGGTACGATGCGACCT	40
P-miR-128		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAAGAGACCGGTTCACTGTGATGCGACCT	39
P-miR-133a		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAGCTGGTTGAAGGGACCAAATGCGACCT	40
P-miR-133b		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAATAGCTGGTTGAAGGGACCAAATGCGACCT	40
P-miR-141		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACCATCTTTACCAGACAGTGTATGCGACCT	40
P-miR-195		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAAGCCAATATTTCTGTGCTGCTATGCGACCT	39
P-miR-200c		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAATCCATCATTACCCGGCAGTATTATGCGACCT	41
P-miR-205		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAGACTCCGGTGAATGAAGGATGCGACCT	40
P-miR-208a		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATTGCGACCT	40
P-miR-208b		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACAACCTTTTGTTCGTCTTATTGCGACCT	40
P-miR-429		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACGGTTTTACCAGACAGTATTATGCGACCT	40
P-pos		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAACCATAGTGCGGGTAGGTATGCGACCT	37
P-neg		NH ₂ -AAAAAAAAAAAAAGCTCCTGCTGAGAATAGCCATTGCGACCT	39
Target	miR-195	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC	21
	let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	22
	let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	22
	miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
	L-miR-21	UGUCGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUG	35
	pos	UACCUACCCGCACUAUGGU	19
Universal Tag	UT-8	Cy3-AGGTCGCA	8

P-neg: Negative probe. Pos: Non-human miRNA were spiked-in as external control.

1.2.9 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对新型 miRNAs 芯片技术平台的验证. 一种新方法的可靠性一般都需要用已有的、成熟的实验方法来验证, 实验中选取 A549 细胞中的 7 种 miRNAs (miR-21、let-7a、let-7d、miR-7、miR-23a、

miR-29b 和 miR-126), 采用颈环引物进行反转录获得 cDNA, 然后通过 qRT-PCR 方法来验证 SHUT assay 技术平台的可靠性, 每种 miRNA 3 次重复, 选取 U6 启动子 RNA 作为内参, 引物序列详见表 2.

Table 2 Sequences of qRT-PCR primers

miRNA name	Primer name	Primer sequence (5'~3')
miR-21	miR-21-RT	GTCGGGTCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGACCCGACTCAACA
	miR-21-FO	TCGCCCCGTAGCTTATCAGACT
	miR-21-RE	AGAGCAGGGTCCGAGGT
let-7a	let-7a-RT	GTCGTATCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGATACGACAACCTAT
	let-7a-FO	GCCGCTGAGGTAGTAGGTTGTA
	let-7a-RE	AGAGCAGGGTCCGAGGT
let-7d	let-7d-RT	GTCGAATCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGATTTCGAC AACTAT
	let-7d-FO	GCCACAGAGGTAGTAGGTTGC
	let-7d-RE	AGAGCAGGGTCCGAGGT
miR-7	miR-7-RT	GTCGGGTCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGACCCGACACAACA
	miR-7-FO	GCCGCTGGAAGACTAGTGATT
	miR-7-RE	AGAGCAGGGTCCGAGGT
miR-23a	miR-23a-RT	GTCGTATCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGATACGACGGAAAT
	miR-23a-FO	GAGGTCATCACATTGCCAGG
	miR-23a-RE	AGAGCAGGGTCCGAGGT
miR-29b	miR-29b-RT	GTCGGGTCCAGAGCAGGGTCCGAGGTACACGTTTCGCTCTGGACCCGACAACACT
	miR-29b-FO	CTGCCGTAGCACCATTGTA
	miR-29b-RE	CAGAGCAGGGTCCGAGGTA
miR-126	miR-126-RT	GTCTGAAAGGTTGATCTGCTCTCTCTCTCATCCCTATCTACAACCTTTCAGACCGCATT
	miR-126-FO	ACAGTTCTCTCGTACCGTGAGTAAT
	miR-126-RE	CTCTCTCTCTCGTCTAGTTGGAAA
U6-snRNA	U6-snRNA-RT	GGAACGCTTCACGAATTTG
	U6-snRNA-FO	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
	U6-snRNA-RE	GGAACGCTTCACGAATTTG

RT: Stem loop reverse transcription RT primer. FO: MicroRNA-specific forward PCR primer. RE: Reverse PCR primer.

1.2.10 扫描及数据分析. 杂交和漂洗后的芯片采用晶芯® LuxScan™ 10K-A 微阵列芯片扫描仪进行扫描, 参数设置为 PMT 650, 532 nm 单色光扫描, 用 LuxScan 3.0 软件(北京博奥生物公司)提取原始信号, 采用 OriginPro 8.1 软件以及 R statistical computing framework 2.12(<http://www.R-project.org/>)进行数据统计分析.

2 结 果

2.1 新型芯片技术平台 SHUT assay 的设计

如图 1 所示, 探针的设计包括三部分: 5'端是一段 poly(A)序列以减少玻片对杂交的空间位阻, 接着是一段与特定 miRNA 完全互补的序列, 3'端

则是与荧光标记的通用标签(UT)完全互补的 8 碱基长的序列. 不同 miRNA 的探针, 只是中间的一段序列不同, 5'端及 3'端的序列则完全相同. 该设计中, 靶标 miRNA 和通用标签 UT 都可以和探针上对应的部分杂交, 但是在 42℃ 杂交温度下, 只有 19~25 碱基长的 miRNA 与探针杂交的双链是稳定的, 8 碱基长的通用标签 UT 与探针杂交的双链(解链温度低于 35℃)不能稳定存在; 而当 UT 邻近侧位有互补 miRNA 与探针杂交后, 由于堆积杂交作用提供的能量, 这段短的通用标签就可以稳定地被探针捕获, 使得标记和杂交同时发生, 实现一种通用标签检测多种靶标分子的目标, 这与传统的杂交方法类似, 但避免了对样品的标记.

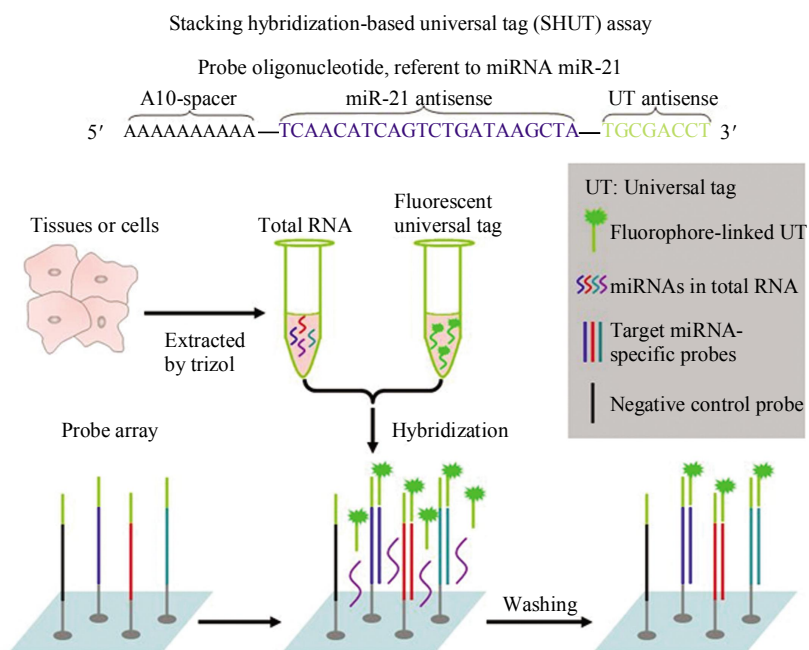


Fig. 1 Schematic diagram of the SHUT assay

The sample probe at the top of the figure illustrates the generic structure of the DNA oligonucleotides used on the microarray. The nucleotides at the 5' end of the probe comprise an A10-spacer, followed by the variable sequences targeting against specific miRNAs. The 3' end is complementary to the universal tag (UT) and shared by all capture probes.

2.2 醛基玻片的制备

通过接触角测量仪分别对清洗后、氨基硅烷处理后、醛基修饰后的玻片进行去离子水表面接触角测定(图 2, 表 3). 结果表明清洗方法、化学基团

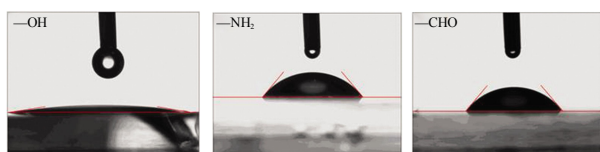


Fig. 2 Original picture of contact angles (CA) of the glass after modification

Three parts of the figure represent the contact angles of —OH, —NH₂, —CHO respectively.

Table 3 Contact angles (CA) of the glass after modification

	—OH	—NH ₂	—CHO
\bar{x}	6.50	54.28	51.53
<i>s</i>	1.18	0.53	0.87

修饰效果良好, 玻片的氨基、醛基修饰均匀, 与文献报道基本一致^[7,13].

2.3 点样液的优化

点样液中甜菜碱、DMSO 的浓度至关重要. 实验分析了 3 种点样缓冲液点样效果, 由点样后的显微镜明场图案可以看到, 对于不加甜菜碱的点样液(图 3a), 点样点很快失水干掉, 当点样量较多时尤其明显, 即使用水化恢复, 也会影响其固定效率与杂交效果, 因此甜菜碱的加入可有效防止水分挥发. 另外, 点样液中通常会加入 DMSO 以防止二级结构的生成, 但当加入 50% DMSO 以后, 会发现点样点明显地吸水膨大(图 3c), 这会造成点样区域探针浓度的下降, 更为严重的是, 点样点吸水后会造点与点之间的融合, 影响杂交结果的分析并会限制点样点的密度, 在 0.1 mol/L 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中加入 1.5 mol/L 甜菜碱和 10% DMSO 后, 点样图案均匀一致, 而且没有点样点挥发或者吸水膨大的现象(图 3b), 是理想的点制探针微阵列的点样液.

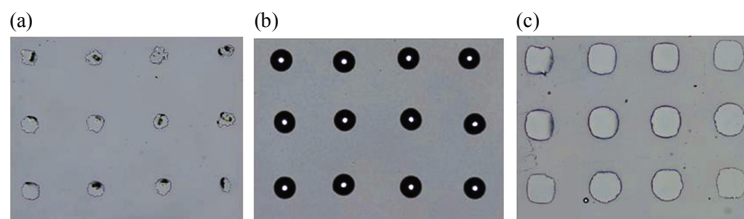


Fig. 3 Pattern of the three spotting buffer

(a) 0.1 mol/L sodium carbonate. (b) 0.1 mol/L sodium carbonate, 1.5 mol/L betaine, 10% dimethyl sulfoxide. (c) 0.1 mol/L sodium carbonate, 1.5 mol/L betaine, 50% dimethyl sulfoxide.

2.4 新型芯片技术平台 SHUT assay 的杂交时间优化

实验表明随着杂交时间的延长，杂交信号不断增高，但在 12 h 后信号值上升速度明显下降(图 4)。此前，Agilent 公司曾报道杂交一般在 40 h 才能达到饱和^[4]，考虑到杂交时间太长会增加非特异杂交信号，因而，参考国际上一些公司 miRNAs 芯片的杂交时间：Ambion 公司为 12~16 h、Agilent 公司为 20 h、EXIQON 公司为 16 h、Invitrogen 公司为 8~20 h，最终确定本实验杂交时间为 20 h。

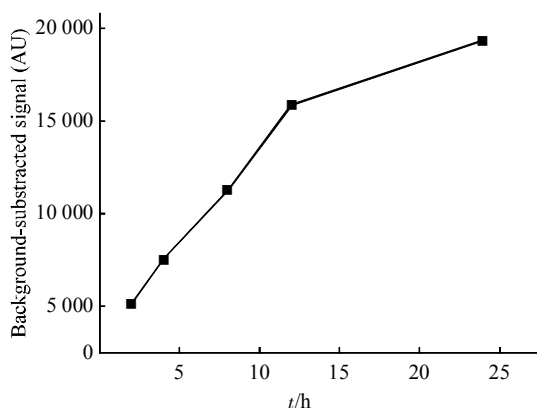


Fig. 4 Optimization of the hybridization time of the SHUT assay

Target miRNAs were assayed at hybridization time 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, and 24 h, respectively.

2.5 新型芯片技术平台 SHUT assay 的灵敏度

由于 miRNAs 在生物样本中的表达水平可以跨越 4 个数量级，而且 miRNAs 的量只占总 RNA 量

的一小部分(大约为总 RNA 的 0.01%)，因此，一个新的 miRNAs 分析平台要具有高的灵敏度和较宽的线性范围才可能准确地用于 miRNAs 表达谱的分析。我们的实验结果显示(图 5)，新型 microRNA 芯片技术可以检测出 2 fmol/L 浓度的靶标分子(按 45 μl 体系计算，相当于 0.09 amol 的靶标分子)；而且在 2 fmol/L 至 200 pmol/L 的范围内，具有较好的线性关系($r^2=0.9729$)。

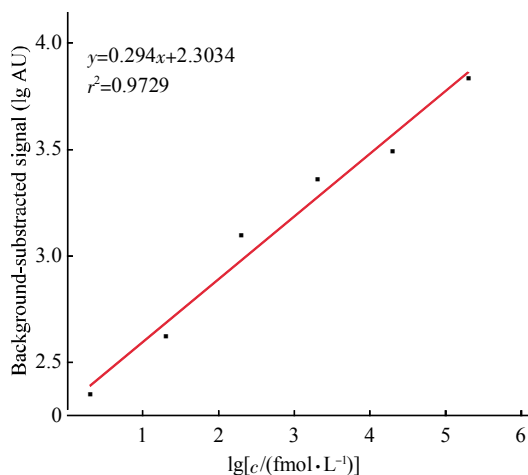


Fig. 5 Sensitivity and dynamic range of the SHUT assay

Target miRNAs were assayed at concentrations 2 fmol/L, 20 fmol/L, 200 fmol/L, 2 pmol/L, 20 pmol/L and 200 pmol/L, respectively. The corresponding COD (correlation of determination) r^2 were indicated.

2.6 新型芯片技术平台 SHUT assay 的特异性

实验中将靶标 let-7f 与包含有 let-7a、let-7b、let-7d、let-7f 的探针阵列杂交，这包括了完全互补(与 P-let-7f)、1 个碱基差别(与 P-let-7a)、3 个碱基差别(与 P-let-7b、P-let-7d)几种情况。实验结果表

明, 新型 miRNAs 芯片技术平台 SHUT assay 能够有效区分 let-7 家族的这 4 个成员, 即使对于只有一个碱基差别的 let-7f 与探针 P-let-7a, 其交叉杂交信号也只有完全互补杂交(let-7f 与探针 P-let-7f)信号的 15.9%(图 6). 另外, 从图 6 中也可以看出, let-7f 与 P-let-7b、P-let-7d 之间错配的碱基均为 3 个, 但是 let-7f 与 P-let-7d 交叉杂交的信号明显低于 let-7f 与 P-let-7b 交叉杂交的信号, 这与文献报道的结果一致. 这是因为堆积处的碱基对堆积杂交的影响最大, 如果堆积处发生碱基错配, 就会极大地影响堆积杂交的效果.

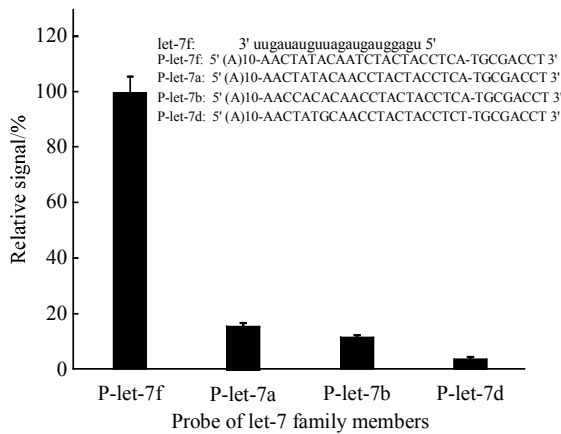


Fig. 6 Specificity of the SHUT assay

Signals were reported as the relative percentages of the P-let-7f (taken as 100%). Positions that let-7a, let-7b and let-7d have different bases to let-7f are highlighted. Error bars: SD ($n=6$).

2.7 新型芯片技术平台 SHUT assay 的特异性

实验中分别用 20、200、2 000 pmol/L 的靶标 (mature miR-21 与 L-miR-21) 与包含 P-miR-21 的探针阵列杂交, 结果发现, L-miR-21 与探针的杂交信号非常低, 而且信号强度不随靶标浓度的增大而增强. 但对于靶标 mature miR-21, 可以明显地发现其杂交信号随浓度的增加而增强, 而且明显高于 L-miR-21 与探针杂交的信号(图 7). 这说明新型 miRNAs 芯片平台可有效排除前体 miRNA 及其他长链 RNA 的交叉杂交信号, 这是由于当两条链的堆积处多出一段核酸链时, 它会明显地影响堆积杂交作用, 从而使得邻近位置的短链通用标签(UT-8)不能稳定地与互补的探针结合, 最后导致杂交信号减弱.

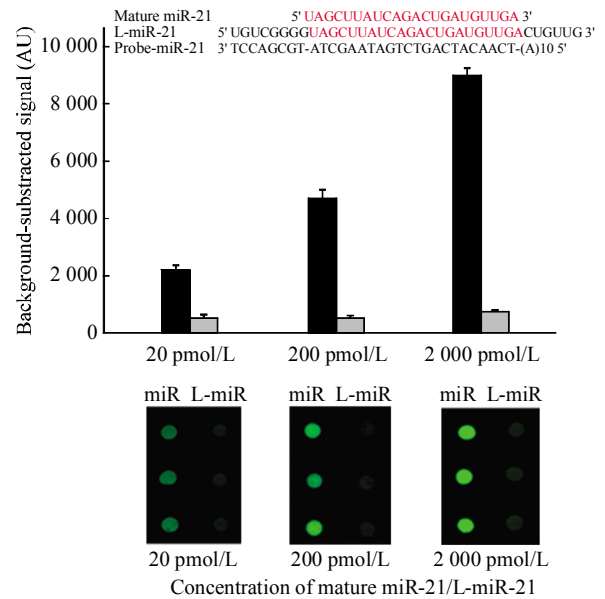


Fig. 7 Discrimination of Pre-/mature miRNA

The sequences of miR-21, L-miR-21 and probe P-miR-21 are showed in the figure. In this experiment, pre-miR-21 or pri-miR-21 was represented by L-miR-21. Target miRNAs were assayed at concentrations 20 pmol/L, 200 pmol/L and 2 000 pmol/L. Error bars: SD ($n=6$). ■: Mat; □: L.

2.8 新型芯片技术平台 SHUT assay 用于细胞 miRNAs 表达谱分析

将提取的 HeLa 细胞总 RNA 分别以 5 μ g、1 μ g、100 ng 的量与探针阵列杂交, 图 8a 显示了 HeLa 细胞总 RNA 杂交后的原始结果. 对其中 12 种 miRNAs 的表达谱进行柱状图(图 8b)分析发现, 随着所加细胞总 RNA 量的增加, 杂交信号也随之增强, 并且 5 μ g、1 μ g、100 ng 细胞总 RNA 的 miRNAs 表达谱具有很高的一致性. 这说明 100 ng 的总 RNA 即可以给出可靠的 miRNAs 表达谱分析结果.

2.9 qRT-PCR 方法对新型芯片技术平台 SHUT assay 结果的验证

采用 qRT-PCR 对新型芯片技术平台 SHUT assay 获得的 A549 细胞中 7 种 miRNAs 的表达情况进行验证. 分析 qRT-PCR 实验结果时, 把 U6 的表达量作为内参进行归一化处理. 同时, 为了便于分析与比较, 将 A549 细胞中 miR-21 的表达量设为标准 1, 其他 miRNAs 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[15]确定. 结果显示 qRT-PCR 方法与 SHUT 这一新型 miRNAs 芯片检测方法具有很好的一致性(图 9).

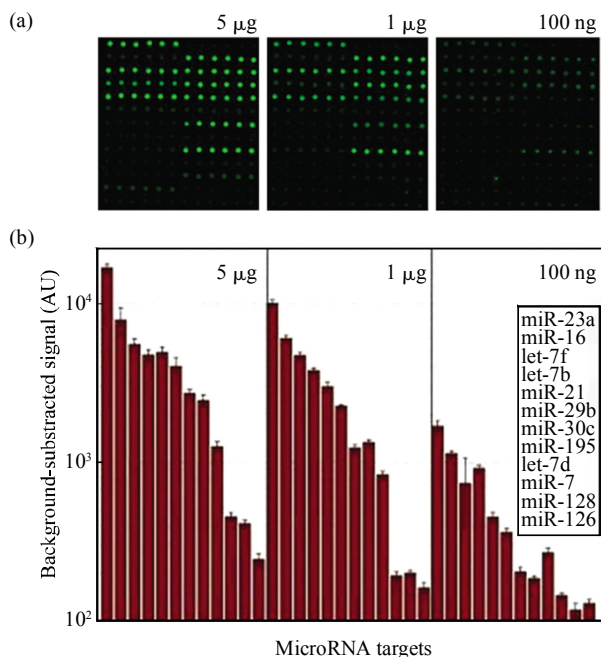


Fig. 8 MiRNAs expression profiling using different amount of total RNA from HeLa cells

SHUT assay results of 12 miRNAs using different amount(5.0, 1, 0.1 μg) of total RNA from HeLa cells as input samples. Error bars: SD (n=6).

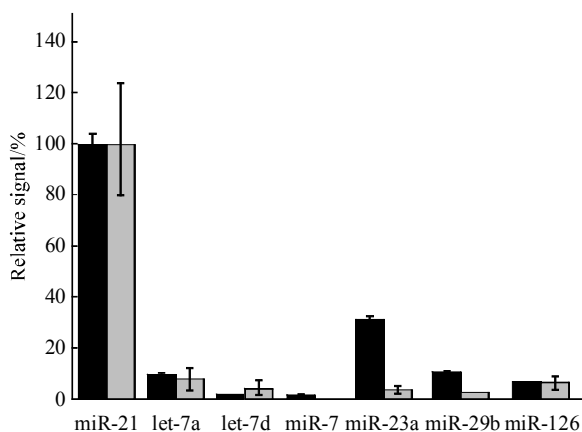


Fig. 9 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verification of the SHUT assay results

Seven miRNAs were randomly picked for comparison. Relative expression using either qRT-PCR or SHUT assay were individually plotted for each of these miRNAs, and each miRNA's expression levels in each tissue are reported as the fraction of the expression level in the tissue in which that miRNA is most abundant. Error bars: SD (n=3 for qPCR and n=6 for SHUT assay). ■: SHUT assay results; □: qRT-PCR results.

3 讨 论

最新研究表明, miRNAs 能够以非常稳定的形式存在于血浆和唾液中^[16-17]. 这暗示着 miRNAs 作为一个有潜质的生物标志物, 检测体液中的 miRNAs 可以作为重大疾病的无创性诊断工具. 而且, 有研究表明在体内沉默掉特定的 miRNAs 可以抑制肿瘤的转移^[18], 因而 miRNAs 的检测还可以被用于临床上的治疗监测. 但由于 miRNAs 自身存在的一些特点, 例如: miRNAs 是相当小的分子, 丰度差异较大; 成熟 miRNA 与其前体 pre-miRNA 和 pri-miRNA 共存, 只是长度不同; 许多 miRNAs 序列非常接近, 只有一个或几个核苷酸的差异; 与 mRNAs 相比太短, 也没有 poly (A)尾巴, 不能像 mRNAs 一样可以用荧光标记的 oligo (T)进行反转录标记, 也不适合用随机引物反转录标记等. 因此, 科学工作者发展了一系列的标记策略来克服这些困难, 主要分为化学标记方法和酶标记方法^[19]. 目前报道的 miRNAs 芯片标记方法中, 大体可分为随机引物反转录标记、RT-PCR 标记、直接酶标记和直接化学标记 4 种. 用荧光标记随机引物反转录 mRNAs, 然后与 DNA 芯片杂交是分析 mRNAs 表达谱的一种常用的标记方法, 这种方法适用于长的模板. 但用 7 碱基或 8 碱基的随机引物反转录约 22 碱基长度的 miRNAs, 可能会在反转录过程中造成 miRNAs 的丰度不能如实反映, 理论上不大适用^[20]. RT-PCR 由于需要两步连接反应和 PCR, 步骤过多可能会造成 miRNAs 丰度不能如实反映的几率加大^[21]. 对于直接的酶标记方法, T4 连接酶方法受限于 T4 连接酶稳定性低、对受体(miRNAs 3'端)核苷酸有一定选择性^[22]. 相比较而言, 基于芯片的以 miRNAs 为引物的 Klenow 酶检测方法 (RNA-primed array-based Klenow enzyme assay, RAKE)可以在芯片上进行酶反应, 而且 Klenow 酶对核苷酸没有任何选择性, 是一种很好的方法, 但是这种方法也需要杂交后的标记过程, 而且在这个反应中需要用到两种不同的酶^[23]. 直接化学标记使用 Ulysis 标记 miRNAs 中的鸟嘌呤碱基, 但对于没有鸟嘌呤的 miRNAs 则不能检测, 而且标记碱基可能会干扰碱基间配对^[24].

此外, 国际上各大知名的公司也先后推出了各具特色的 miRNAs 芯片技术服务平台, 比如 LC Sciences、Febit、Exiqon、Invitrogen、Agilent 等公司. 各家公司的芯片各有自己的特点和优势, 比如

微阵列本身、探针、底物、样品量等, 但是都没有解决 miRNAs 芯片技术中荧光标记这一难题, 而这却是整个分析过程中最耗时耗力、费用昂贵的一个步骤, 并且在标记过程中由于酶的使用及步骤的增加还可能改变样品中目标序列的初始比例, 引入实验误差, 影响结果的可靠性^[29]. 另一方面, miRNAs 芯片检测的高成本限制了其应用范围, 只有经费充足的科研机构 and 单位才能够使用, 且目前的 miRNAs 芯片技术较难实现实时更新、新发现的 miRNAs 不方便加入原有的芯片平台. 因而, 如何有效降低 miRNAs 芯片的成本成为研究的关键, 而降低成本就要解决样品 RNA 的标记问题, 最好是不用标记样品而又能达到检测目的, 并且能与现有的芯片平台兼容, 这样才能真正实现降低成本的目的.

本文将碱基堆积杂交 (base stacking hybridization, BSH) 应用于 miRNAs 芯片技术中, 引入了一段预先标记荧光的 8 碱基长的通用标签核酸序列 (universal tag, UT), 建立了一种新型的“基于堆积杂交的通用标签检测方法” (stacking-hybridized universal tag assay, SHUT assay), 并对整个实验过程进行了系统的优化, 包括玻片的化学修饰、点样液的组成和比例、杂交时间等. 该 SHUT assay 技术应用于 miRNAs 表达谱的分析, 可以免除对样品的标记过程. 碱基堆积杂交也被称为邻近的堆积杂交 (contiguous stacking hybridization, CSH), 它是指当 2 条或多条连续的寡核苷酸链与一条长的互补的单链 DNA 或 RNA 杂交后, 这些短的寡核苷酸链可以获得额外的稳定性^[26]. Mirzabekov's 等最早提出了碱基堆积杂交技术, 他们把微阵列探针固定于凝胶上, 并主要应用于杂交测序^[26-28]. 2001 年, 他们通过检测堆积杂交形成双链后溶解温度的提高, 从而来检测堆积杂交的作用^[29]. 在研究中, 他们发现碱基堆积处的 2 个碱基对于堆积作用是十分关键的, 在这个位置上一个碱基的错配或者多一个、少一个碱基都会影响到堆积作用; 他们还发现碱基堆积作用的能量或许不只依赖于作用碱基的性质, 可能还依赖于邻近甚至更长范围的序列. 美国波士顿大学 Frank-Kamenetskii 课题组通过研究含有单一切刻和缺口的 DNA 双链分子的热稳定性, 也揭示了碱基堆积作用是 DNA 双螺旋结构稳定的主要因素, 在双链结构稳定性对序列的依赖中起着重要作用^[30]. 这些文献报道为文章中所建立的 SHUT 检测方法奠定了坚实的理论基础.

本文中, 经系统优化过的新型 SHUT assay 芯片技术平台具有高度的灵敏度和特异性, 检测限可以达到 2 fmol/L 水平, 检测线性范围可跨越 5 个数量级, 可以区分只有 1 个碱基差别的 miRNAs 家族成员, 尤其是该技术平台可以有效排除非活性 pri-miRNA 与 pre-miRNA 前体的交叉杂交信号, 100 ng 的总 RNA 即可以给出可靠的 miRNAs 表达谱数据. 而且利用这一新型 miRNAs 芯片技术平台分析的组织或细胞的 miRNAs 表达谱, 与实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验结果高度一致. 该新型 SHUT 芯片检测技术免除了对样品的标记过程, 使得标记和杂交同时进行, 解决了当前 miRNAs 芯片技术中的一个关键问题. 另外, 该技术平台可以直接对总 RNA 进行检测而无需分离小 RNA、无需对样品扩增, 这些都大大简化了检测程序, 降低了劳动强度且增加了结果的可靠性. 该项技术不仅可应用于 miRNAs 的检测, 对于其他短链核酸分子的检测分析, 同样是一个理想、快速的检测平台. 更为重要的是, 该技术平台有望发展为我国具有自主知识产权的 miRNAs 表达谱分析检测平台.

致谢 非常感谢中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所生物医学与安全部马宏伟研究员、朱毅敏研究员, 感谢他们在微阵列制备、芯片扫描方面提供的大力支持与帮助, 以及在实验过程中给予的有益讨论.

参 考 文 献

- [1] Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell*, 2004, **S116**(2): S89-S92
- [2] Ruvkun G, Wightman B, Ha I. The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs. *Cell*, 2004, **S116**(2): S93-S96
- [3] Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, *et al.* The microRNA world: small is mighty. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, **28**(10): 534-540
- [4] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, **301**(5631): 336-338
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [6] Murchison E P, Hannon G J. MiRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, **16**(3): 223-229
- [7] Xie X H, Lu J, Kulbokas E J, *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005, **434**(7031): 338-345
- [8] Du C S, Liu C, Kang J H, *et al.* MicroRNA miR-326 regulates T-H-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Immunology*, 2009, **10**(12): 1252-1254
- [9] Zhao Y, Ransom J F, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis,

- cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, **129**(2): 303–317
- [10] Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, *et al.* MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotech*, 2008, **26**(4): 462–469
- [11] Krichevsky A M, King K S, Donahue C P, *et al.* A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*, 2003, **9**(10): 1274–1281
- [12] Duan D M, Zheng K X, Shen Y, *et al.* Label-free high-throughput microRNA expression profiling from total RNA. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(22): e154
- [13] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**(1): 15–20
- [14] Yu Z R, Raabe T, Hecht N B. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biology of Reproduction*, 2005, **73**(3): 427–433
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402–408
- [16] Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(30): 10513–10518
- [17] Nikiforov A Y, Aspden L M, Seethala R R, *et al.* MicroRNA expression profiling as a tool for diagnosis of salivary duct tumors. *J Mol Diagnostics*, 2009, **11**(6): 655–656
- [18] Ma L, Reinhardt F, Pan E, *et al.* Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotech*, 2010, **28**(4): 341–347
- [19] Wark A W, Lee H J, Corn R M. Multiplexed detection methods for profiling microRNA expression in biological samples. *Angew Chem-Int Edit*, 2008, **47**(4): 644–652
- [20] Sun Y Q, Koo S, White N, *et al.* Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucl Acid Res*, 2004, **32**(22): e188
- [21] Lu J, Getz G, Miska E A, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, **435**(7043): 834–838
- [22] Thomson J M, Parker J, Perou C M, *et al.* A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nature Methods*, 2004, **1**(1): 47–53
- [23] Nelson P T, Baldwin D A, Scearce L M, *et al.* Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nature Methods*, 2004, **1**(2): 155–161
- [24] Babak T, Zhang W, Morris Q, *et al.* Probing microRNAs with microarrays: Tissue specificity and functional inference. *RNA*, 2004, **10**(11): 1813–1819
- [25] Davison T S, Johnson C D, Andruss B F. Analyzing micro-RNA expression using microarrays. *Methods Enzymol*, 2006, **411**: 14–34
- [26] Khrapko K R, Lysov Y P, Khorlyn A A, *et al.* An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *Febs Letters*, 1989, **256**(1–2): 118–122
- [27] Dubiley S, Kirillov E, Mirzabekov A. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucl Acid Res*, 1999, **27**(18): e19
- [28] Fotin A V, Drobyshev A L, Proudnikov D Y, *et al.* Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucl Acid Res*, 1998, **26**(6): 1515–1521
- [29] Vasiliskov V A, Prokopenko D V, Mirzabekov A D. Parallel multiplex thermodynamic analysis of coaxial base stacking in DNA duplexes by oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucl Acid Res*, 2011, **29**(11): 2303–2313
- [30] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006, **9**(3): 189–198

Establishment and Optimization of a Label-free microRNA Microarray Analytical Method*

DUAN De-Min¹⁾, HUI Li-Xing²⁾, LI Li-Shi²⁾, YAN Xi-Yun^{1)**}, LI Jiong^{2)**}

¹⁾ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Suzhou Institute of Nano-tech and Nano-bionics, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215123, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are a class of short, endogenous, non-coding small RNAs. The regulation function accompanies with the cell growth, differentiation, proliferation and apoptosis. The miRNAs expression is closely related with the development of cancer and has been considered as a potential biomarker. The analysis of the miRNAs expression profile is a critical part in the studying of miRNAs. Usually, miRNAs in biological samples require fraction, labeling and purification before applied to most assays. This is the most time-consuming, labor-intensive and the highest cost in the assay process. The assay results would be affected for the initial ratio of the sample target miRNAs which may have been changed due to the application of enzymes and complicated steps in this preprocess. The main purpose of this work is to develop a new microRNA microarray platform that free of the sample labeling. It is named the stacking hybridization-based universal tag (SHUT) assay for it takes advantage of stacking hybridization interaction and involves a universal tag (UT)—an 8mers oligonucleotide labeled previously. This article focuses on the optimization of the experimental procedures in the SHUT assay and the evaluation of its properties, such as the sensitivity and the specificity. The results show that the microarray has the advantage of high sensitivity, that even 2 fmol/L input miRNAs can be detected. The miRNAs microarray has perfect selectivity simultaneously. It can distinguish the target miRNAs from other family members with only one base mismatched. In particular, the pri-miRNA and pre-miRNA can be easily discriminated from mature-miRNAs, which enables as little as 100 ng total RNAs to be analyzed directly and rapidly. All these results have shown that the application of this new microarray platform approach is a rapid and ideal platform for the detection as well as analysis of miRNAs and other small nucleic acid molecules.

Key words stacking hybridization, universal tag, microRNAs microarray, expression profile

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00478

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31270908), The China Postdoctoral Science Foundation (2012M510049, 20110491461), The K.C.Wong Education Foundation, The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2011361) and The Jiangsu Postdoctoral Science Foundation (1101052C).

**Corresponding author.

YAN Xi-Yun. Tel: 86-10-64888583, E-mail: yanxy@ibp.ac.cn

LI Jiong. Tel: 86-512-62872598, E-mail: jli2006@sinano.ac.cn

Received: September 26, 2012 Accepted: October 24, 2012