

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

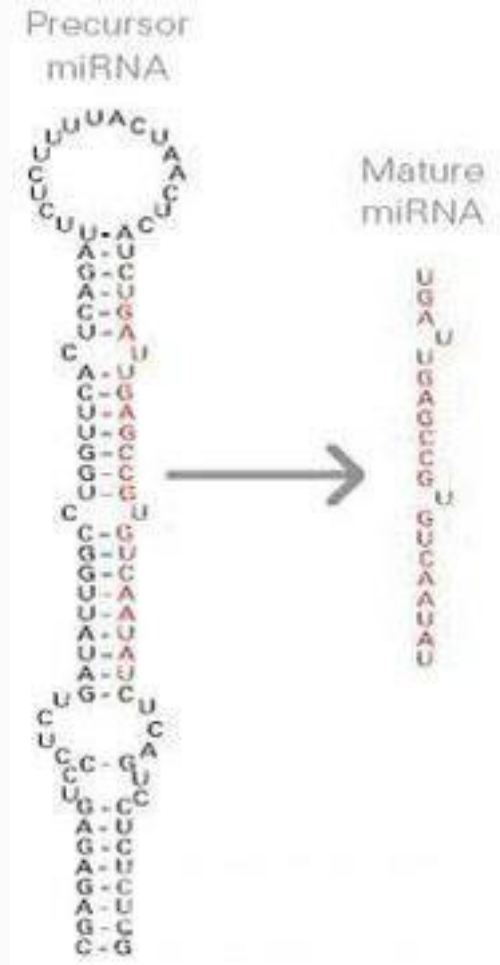
要了解 miRNA 在基因调控中扮演的角色，很关键的一个方法就是迅速、准确地定量检测 miRNA 基因的表达。因此，miRNA 表达水平的检测也成为了科学家们研究的热点。但是由于小分子 RNA 是一类很小的分子，部分小分子 RNA 表达水平可能很低，因而需要极为灵敏而定量的分析工具。常用的检测方法有：

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。



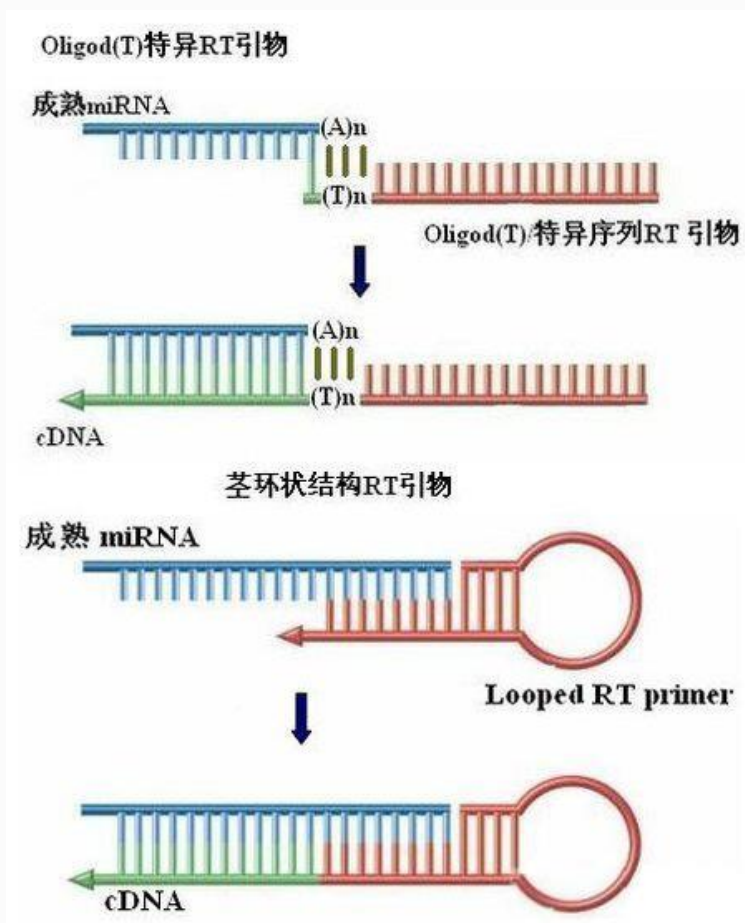
反转录引物分类以及设计原理

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。