

文章编号 1004-924X(2018)03-0541-07

便携式 MicroRNA 快速检测系统

王燕飞^{1,2,3}, 余东升^{1,3}, 陈海燕^{1,3}, 张战盈^{1,2,3}, 方蔚恺^{1,3}, 杨 喆^{1,3},
陆泽椽^{1,3}, 李艳蕾^{1,3}, 纪玉峰^{1,3}, 关一夫^{1,4}, 徐赤东^{1,3*}, 江海河^{1,2,3*}

(1. 中国科学院 合肥物质科学研究院 医学物理与技术中心, 安徽 合肥 230031;

2. 中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

3. 医学物理与技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031;

4. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: MicroRNA(miRNA)与疾病的发生和发展密切相关,可作为疾病诊断标志物。常规检测 miRNA 的方法耗时较长且操作复杂,本文设计了一种便携式 miRNA 快速检测系统。该系统采用光电检测技术检测滚环扩增后的标志物 miRNA 受激发出的荧光强度,对采集到的荧光数据进行分析,得出 miRNA 的变化情况。实验得出便携式 miRNA 快速检测系统在试剂浓度为 0.1~1 μmol 时,荧光强度线性偏倚不超过 $\pm 5\%$,系统重复性大于 95%。通过对冠心病检测标志物 miR-499 进行滚环扩增实验,结果表明设计的便携式 miRNA 快速检测系统能够快速有效地检测 miRNA。

关键词: 光电检测; 荧光检测; 弱光探测; miRNA; 滚环扩增

中图分类号: X835

文献标识码: A

doi: 10.3788/OPE.20182603.0541

Portable rapid microRNA detection system

WANG Yan-fei^{1,2,3}, YU Dong-sheng^{1,3}, CHEN Hai-yan^{1,3}, ZHANG Zhan-ying^{1,2,3},

FANG Wei-kai^{1,3}, YANG Zhe^{1,3}, LU Ze-yuan^{1,3}, LI Yan-lei^{1,3},

JI Yu-feng^{1,3}, GUAN Yi-fu^{1,4}, XU Chi-dong^{1,3*}, JIANG Hai-he^{1,2,3*}

(1. *Center of Medical Physics and Technology, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;*

2. *University of Science and Technology China, Hefei 230026, China;*

3. *Anhui Province Key Laboratory of Medical Physics and Technology, Hefei 230031, China;*

4. *China Medical University, Shenyang 110001, China)*

* *Corresponding author, E-mail: xcd@aiofm.ac.cn; hjiang@aiofm.ac.cn*

Abstract: MicroRNA (miRNA) is closely related to the occurrence and development of certain diseases and can be used as a diagnostic marker. Conventional methods for the detection of miRNA are time-consuming and complex. Herein, a portable rapid miRNA detection system was designed. This system records the fluorescence intensity of the marker that is amplified via rolling circle amplification using a photoelectric detection technique, and analyzes the fluorescence data to obtain the changes in miRNA. Through our experiments, we observed that for reagent concentrations in the range

收稿日期: 2017-07-10; 修订日期: 2017-09-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81371896)

0.1—1 μmol , the linearity of the fluorescence intensity detected by the miRNA fluorescence detection equipment was less than $\pm 5\%$, and the repeatability was $\geq 95\%$. Our roll amplification experiment involving the coronary heart disease diagnostic marker, miR-499, confirmed that the portable rapid miRNA detection system can detect miRNA quickly and effectively.

Key words: photoelectric detection; fluorescence detection; light detection; miRNA; rolling circle amplification

1 引言

MicroRNA(miRNA)是一类内生的单链 RNA,其长度约为 20~24 个核苷酸。miRNA 参与了细胞生长、发育、分化与死亡等一系列复杂的生物学行为,与生命过程中疾病的发生和发展密切相关^[1-3]。由于成熟 miRNA 的长度较短,加之其具有序列同源性,相差只有一个碱基的不同 miRNA 检测具有较大的挑战性^[4]。目前,miRNA 的检测方法主要有实时荧光定量 PCR(RT-PCR)^[5]、Northern 印迹分析^[6]和微阵列芯片^[7]。但是,这样的检测不仅需要价格昂贵的仪器设备和严格的实验室条件,检测过程操作复杂、检测时间长、费用高,而且需要经过专业培训的相关人员,难以在一般条件的机构开展。POCT(Point-of-care testing)^[8-9]操作简单、便携,能对样品进行实时现场分析,在临床应用和个体医疗方面有很大的应用前景。近年来,等温滚环扩增(Rolling Cycle Amplification, RCA)^[10]技术凭借其高特异性、高灵敏度和易操作性引起了研究人员的广泛关注,并被越来越多的应用于基础研究和实际检测中。研究发现通过生物工程的滚环扩增方法,结合高灵敏度弱光检测可获取低丰度 miRNA^[11]的变化。但是,用 POCT 方式快速检测 miRNA 目前存在很多问题。本文基于 RCA,采用光电检测法检测特异性标志物受激发出的荧光强度,通过对光电检测系统开展小型化设计,提高探测灵敏度以及优化滚环扩增反应条件等措施,快速得出 miRNA 变化,实现 miRNA 快速检测,为 POCT 检测提供了一种有效的检测设备。

2 miRNA 快速检测原理

SYBR Green II 是花萼素类核酸染料,带正电荷,RNA 链(磷酸基团)带负电荷,因此 SYBR Green II 染料会和 RNA 以非共价键的方式结

合,嵌入 RNA 的核酸链螺旋结构的小沟中,此时在激发光激发下会产生荧光。在室温下,使用 SYBR Green II 染料标记与 miRNA 核苷酸互补的寡聚核苷酸,针对目标 miRNA 进行滚环扩增,荧光染料在游离情况下处于淬灭状态,不发光,但当它结合到目标 miRNA 核苷酸链后在受到激发时会发出荧光,即只有与荧光染料结合的 miRNA 扩增产物才可激发出荧光。RCA 产物量与荧光强度在一定扩增范围内成正比。因此,检测荧光强度可以得出 RCA 产物量。而荧光强度与该溶液吸收光能的程度及溶液中荧光物质的荧光量子产率 Φ_F 有关。当溶液浓度较低时,溶液发出的荧光强度 $I_F \approx \Phi_F \cdot A I_0 a c L = K I_0 c$ ^[12],式中 I_0 为入射光强度, A 为吸光截面积, a 为吸收系数, L 为样品池的厚度, c 为荧光物质的浓度, K 为常数。即当荧光物质浓度较低时,荧光强度 I_F 与激发光强度 I_0 和溶液的浓度 c 之积成正比。因此,通过检测标志物激发出的荧光光强,对采集到的荧光信号强度进行分析,可以判断出此时的核酸浓度。

3 miRNA 快速检测系统设计

miRNA 快速检测系统的检测对象为低丰度的 miRNA,利用 RCA 和荧光染色法将初始微量的 miRNA 信号通过滚环扩增放大,并通过微弱光检测技术从强激发光背景中采集微弱的荧光信号。图 1 是 miRNA 快速检测系统框图。电源及控制系统控制光源,光源发出的光通过激发光光束整形后照射样品池中的待测样品,待测样品中经过 RCA 后的 miRNA 因携带荧光片段,在受到激发后产生荧光,荧光通过荧光探测系统后经信号处理系统处理后返回控制系统,最后在显示板上显示结果。

为实现 miRNA 快速检测系统的整体功能,将 miRNA 快速检测系统分为光学发射及接收单

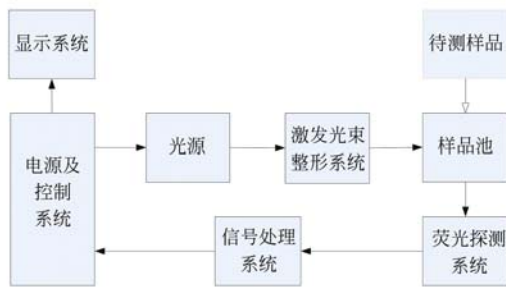


图1 miRNA快速检测系统框图

Fig. 1 Block diagram of rapid miRNA detection system

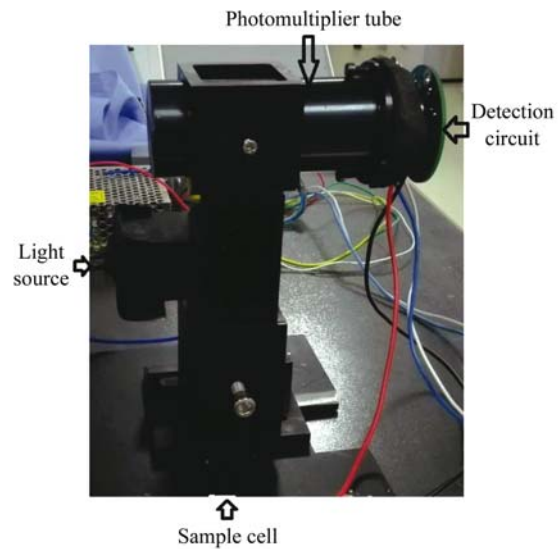
元、电学检测单元、信号处理及显示单元,并进行一体化结构设计。

光学发射及接收单元针对 SYBR Green II 染料特性,选择激发光峰值波长为 480 nm 的大功率 LED 光源。此时,SYBR Green II 染料激发出的荧光峰值波长为 520 nm。由于 LED 光源光谱范围较宽,采用窄带滤光片滤除光源中可能存在的与荧光波长相同的光噪声,降低激发光信号对荧光信号采集的干扰。同时,针对探测信号为微弱光信号,系统采用光电倍增管采集信号。为了提高荧光收集效率和降低背景噪声等影响,系统采用共焦检测结构。在共焦检测结构中,光源和探测器共处一焦平面,光源发出的光被会聚透镜组会聚到待测样品上,待测样品激发出的荧光通过透镜组反向会聚到探测器,因此,探测器能最大程度地采集到待测样品激发出的荧光。同时,由于光传输方向与探测器采集光方向相反,激发光产生的噪声较小,且其通过样品池反射的光中能被探测器采集的光非常微弱,再在接收单元中设置相应的窄带滤波片,可以达到降低激发光噪声,提高信噪比^[13],实现微弱荧光检测的目的。

电学检测单元设计包括信号采集、滤波、放大、信号处理等过程,会带来影响结果的噪声信号。通过优化工艺,合理的 PCB 板布局连线以及屏蔽等措施,可以减少电学检测单元对荧光信号的影响。

由于噪声信号不可避免,荧光信号的测量结果为一系列带毛刺的波形,因此,信号处理及显示单元设计时采用最小二乘法拟合曲线,将信号的最佳值优化显示出来。

一体化结构设计包括光机设计及样品池设计,样品池设计需要兼顾光学检测的精确度与生

图2 便携式 miRNA 快速检测系统实物图
Fig. 2 Portable rapid miRNA detection instrument

物实验的重复性和有效性。同时,为提高信噪比,减少杂散光干扰,所有光学系统均做发黑处理。

图2所示为便携式 miRNA 快速检测系统实物图,根据 miRNA 快速检测系统原理,miRNA 检测利用 RCA 将初始的 miRNA 信息从生物学上进行信号放大,通过高灵敏的光学激发检测装置^[14]实现生物学放大后的微弱荧光信号检测,能够达到快速、高效检测 miRNA 的目的。

系统的工作需要 RCA 与光学激发检测装置共同完成,工作流程如图3所示。系统开机后,将处理好的待测样品放入检测系统的样品池中,系统进入初始化状态,在完成自检程序后等待工作指令;在完成系统参数设置后,系统收到工作指令,系统工作并开始计时;计时结束后,检测结果显示在显示屏上。系统返回初始状态或等待下一个工作指令。

4 实验

为了得到 miRNA 快速检测系统的性能指标等参数,设计相应实验分析 miRNA 快速检测系统的线性度、稳定性、灵敏度^[15]等。

4.1 线性度实验

将标准荧光试剂按 0.1, 0.2, 0.3, ..., 1.4, 1.5 μmol , 记录下浓度每间隔 0.1 μmol 的试剂,通过便携式 miRNA 快速检测系统检测试剂测得荧

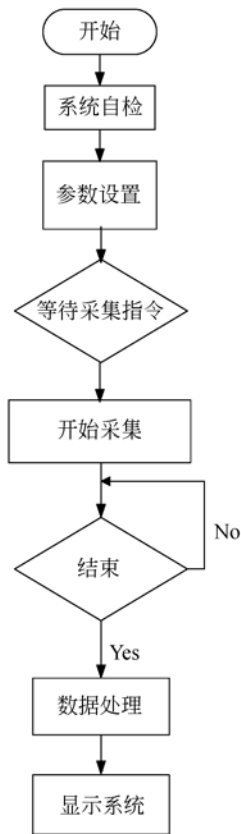


图 3 便携式 miRNA 快速检测系统的工作流程

Fig. 3 Flow chart of portable miRNA rapid detection system

光值,根据得到的实验数据拟合出实际的荧光信号强度对应荧光浓度的实际曲线,根据荧光试剂浓度绘制出荧光信号的线性拟合曲线(以下简称理论曲线),见图 4。从图 4 可以看出,实际曲线与理论曲线的斜率有一定的差异,线性偏倚为:

$$\Delta A_i = \frac{\bar{A}_i - A_{i0}}{A_{i0}} \times 100\% , \quad (1)$$

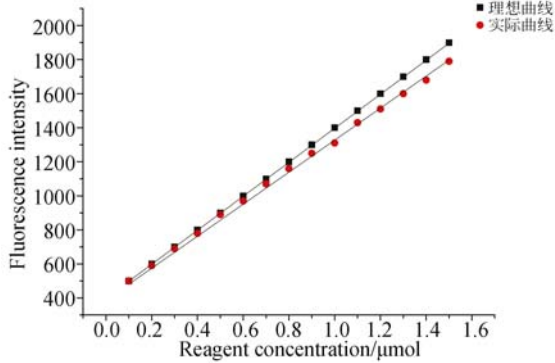


图 4 不同试剂浓度产生的荧光强度图

Fig. 4 Fluorescence intensity plot for different reagent concentrations

其中: ΔA_i 为在荧光值为 i 时的线性偏倚; \bar{A}_i 为荧光值为 i 时实际测量荧光信号的平均值; A_{i0} 为荧光值为 i 时理论荧光信号的标称值^[15]。

表 1 不同浓度试剂荧光强度线性偏倚

Tab.1 Linearization biases of fluorescence intensity for reagents with different concentrations

浓度/ μmol	0.1	0.3	0.5	0.7	1
A_{i0}	500	688	1064	1102	1346
\bar{A}_i	499	702	904	1105	1400
$\Delta A_i / \%$	0.2	1.99	3.19	3.85	4.01

由表 1 可以看出,在试剂浓度为 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol}$ 时,荧光强度的线性偏倚不超过 $\pm 5\%$ 。

4.2 稳定性实验

将试剂浓度分别为 $0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 \mu\text{mol}$ 的试剂通过便携式 miRNA 快速检测系统进行荧光强度测试,实验做 10 次,实验数据如表 2 所示。将所得检测数据按式 (2) 计算变异系数 CV 值。

$$CV = \frac{s}{x} \times 100\% . \quad (2)$$

表 2 不同浓度试剂荧光强度值

Tab.2 Fluorescence intensity of reagents with different concentrations

重复次数	0.1 μmol	0.3 μmol	0.5 μmol	0.7 μmol	1 μmol
1	499	701	902	1110	1395
2	498	700	905	1102	1395
3	501	698	907	1105	1403
4	490	703	901	1103	1401
5	496	695	902	1103	1402
6	505	709	911	1110	1403
7	502	699	904	1107	1398
8	495	705	901	1101	1399
9	500	701	899	1100	1401
10	506	709	903	1104	1402
平均值	499	702	904	1105	1400

式中: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$; x 为实际测量的荧光信号值, n 为实际测量次数; \bar{x} 为 n 次测量结果的平均值。

由以上计算公式得到数据的重复性为: $CV_1 = 4.5\%$ 、 $CV_2 = 2.9\%$ 、 $CV_3 = 1.4\%$ 、 $CV_4 = 1.2\%$ 、 $CV_5 = 0.7\%$ 。在试剂浓度为 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol}$ 时,系统重复性大于 95% 。

4.3 滚环扩增实验

实验选择对人原代心肌细胞(Human Cardiac Myocytes, HCM)中提取的 miR-499 进行 RCA,以验证便携式 miRNA 快速检测系统对 miRNA 的真实检测效果。HCM 来源于中国科学院合肥物质科学研究院医学物理与技术中心分子病理研究室。根据 miR-499 序列: $5'$ -UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU- $3'$,设计锁式探针为: $5'$ -p-ATGTTGAGTCGTATCCAGTGCCTCCTTCTACTATGTTGATCTGTCTATTACCTTATGCTTAAGTGTACACTTATTAGCTTATCAGACTG- $3'$ (序列长 90bp),颈环探针为: $5'$ -GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACAAACAT- $3'$ (序列长 50bp),滚环扩增引物: $5'$ -TCTGTCTATTACCTTATGCT- $3'$ (序列长 21bp)。

利用探针将 miRNA 反转录为 cDNA。其中,锁式探针的 $5'$ 端 15 个碱基和 $3'$ 端 21 个碱基各自与 cDNA 序列特异性识别并结合。RCA 反应条件如表 3 所示。

使用便携式 miRNA 快速检测系统, RCA 系

表 3 滚环扩增的反应条件

Tab. 3 Reaction conditions of rolling cycle amplification

试剂	体积/ μL
连接产物	10
10 mmol/L 的 dNTPs	1
10 $\mu\text{mol/L}$ 支链引物	2
8 U/ μL 的 phi29 DNA 聚合酶	0.5
10 \times phi29 DNA 聚合酶 buffer	2
SYBR Green II(1 : 10 000)	1
dd H ₂ O	4.5

统的实际扩增图为图 5。从图 5 可以看出,在反应时间为 $50 \sim 650$ s 时,荧光信号值增长几乎为线性;在反应时间为 $650 \sim 1800$ s 时,荧光信号值逐步增长,且略有波动,其原因是随着反应进行,反应物逐步消耗,剩余反应物不能完全保证扩增效率,荧光值增长较慢;反应时间在 1800 s 之后反应物消耗殆尽,荧光值达到峰值后维持不变,反应达到平台期。

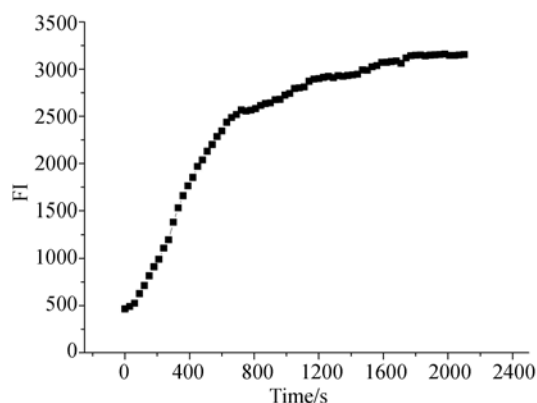


图 5 系统扩增结果

Fig. 5 Result of optical detection based on RCA

从图 5 可以看出,系统可以在较短的时间内(45 min 以内)完成扩增及检测,实现了标志物 miRNA 的快速检测。

5 结果分析

在试剂浓度为 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol}$ 时,便携式 miRNA 快速检测系统的荧光强度线性偏倚不超过 $\pm 5\%$;系统重复性大于 95% 。荧光强度与温度、光散射等多种因素有关,对系统线性度和重复性^[15]造成一定影响,可以通过优化处理测得数据来提高系统的线性度和重复性。通过对 HCM 中提取的 miR-499 进行 RCA 实验可知,便携式 miRNA 快速检测系统利用 RCA 原理和光电检测法可以在较短的时间内(45 min 以内)获得待测 miRNA 的扩增曲线。

6 结 论

本文设计了一种便携式 miRNA 快速检测系

统,通过光电检测法结合 RCA 技术有效地实现了室温下 miRNA 的快速检测。实验结果证明,所设计的便携式 miRNA 快速检测系统能够快速获得 RCA 后样本中的 miRNA 扩增曲线。通过设置标准样本对扩增曲线进行分析,可以得出待测样本中 miRNA 的初始浓度信息。结合相应试剂盒的研发和特异性 miRNA 数据库的建设,

便携式 miRNA 快速检测系统可应用于特异性 miRNA 的现场快速检测,对疾病(如冠心病、肿瘤等)的超早期筛查与预警具有重要的意义。便携式 miRNA 快速检测系统具有扩增效率高、体积小、操作简便等优点,并且作为一种 POCT 产品,适用于家庭或中小型社区医院等场所,具有较强的应用前景。

参考文献:

- [1] CHEN CH ZH, LI L, LODISH H F, *et al.*. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. *Science*, 2004, 303(5654): 83-86.
- [2] OLSON P, LU J, ZHANG H, *et al.*. MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(18): 2152-2165.
- [3] KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miR-Base: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(D1): D152-D157.
- [4] WANG F, SUN Y, RUAN J SH, *et al.*. Using small RNA deep sequencing data to detect human viruses[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 2596782.
- [5] CHEN C F, RIDZON D A, BROOMER A J, *et al.*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(20): e179.
- [6] TORRES A G, FABANI M M, VIGORITO E, *et al.*. MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection [J]. *RNA*, 2011, 17(5): 933-943.
- [7] YAN N H, LU Y L, SUN H Q, *et al.*. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues[J]. *Reproduction*, 2007, 134(1): 73-79.
- [8] GILAD S, MEIRI E, YOGEV Y, *et al.*. Serum microRNAs are promising novel biomarkers [J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3148.
- [9] HANSON E K, LUBENOW H, BALLANTYNE J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 387(2): 303-314.
- [10] ZHAO G J, HU T Y, Li J, *et al.*. A novel strategy to analyze L-tryptophan through allosteric Trp repressor based on rolling circle amplification[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 71: 103-107.
- [11] ZHAO B, SONG J R, GUAN Y F. Discriminative identification of miRNA let-7 family members with high specificity and sensitivity using rolling circle amplification[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(2): 130-136.
- [12] 许金钧,王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 11-13.
- [13] XU J G, WANG Z B. *Fluorescence Analysis Method* [M]. 3rd ed.. Beijing: Science Press, 2006: 11-13. (in Chinese)
- [14] 韩昌元. 光电成像系统的性能优化[J]. *光学精密工程*, 2015, 23(1): 1-9.
- [15] HAN CH Y. Performance optimization of electro-optical imaging systems[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(1): 1-9. (in Chinese)
- [16] 吴太虎,毛佳文,陈锋,等. 痕量微生物快速检测系统[J]. *光学精密工程*, 2015, 23(11): 3061-3068.
- [17] WU T H, MAO J W, CHEN F, *et al.*. Rapid trace microbia detection system[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(11): 3061-3068. (in Chinese)
- [18] LUO W, ZENG X H, LI M, *et al.*. A quantum dot fluorescence sensor system design for Hg²⁺ trace detection[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2015, 35(11): 3236-3240.
- [19] 梁斌明,胡艾青,蒋强,等. 光子晶体负折射效应在糖溶液浓度检测中的应用[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(4): 877-883.

LIANG B M, HU A Q, JIANG Q, *et al.*. Application of photonic crystal negative refraction effect to

sugar solution concentration detection[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(4): 877-883. (in Chinese)

作者简介:



王燕飞(1984—),男,安徽肥东人,博士研究生,2006年于合肥工业大学获得学士学位,主要从事光电检测方面的研究。E-mail: yfw@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:



徐赤东(1978—),男,安徽桐城人,副研究员,2007年于西安电子科技大学获得硕士学位,主要研究方向为微脉冲激光雷达系统研制和激光雷达在大气探测中的应用。E-mail: xcd@aiofm.ac.cn

导师简介:



江海河(1961—),男,安徽桐城人,研究员,中国科学技术大学双聘教授,博士生导师,1991年于中科院安徽光机所获得硕士学位,主要研究方向为激光技术与光机电一体化应用技术。E-mail: hjiang@aiofm.ac.cn