

• 综 述 •

microRNA 检测方法的优缺点评价*

祁 双¹综述,韩崇旭^{2△}审校

(1. 扬州大学医学院,江苏扬州 225001;2. 苏北人民医院,江苏扬州 225001)

关键词: microRNA; 优缺点评价; 传统方法; 新方法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 01. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)01-0085-04

microRNA 是由 Lee 等^[1]在 1993 年首次报道存在的,他们对线虫体进行了全基因组扫描研究,以此来寻找对秀丽隐杆线虫的幼虫起重要作用的基因。最后发现线虫的发育出现障碍是由于一种被命名为 lin-4 的基因发生了变异。但是这项发现在当时并没有被人们引起足够的重视。直到 2000 年,Reinhart 等^[2]在线虫研究中报道了第二种被发现的 microRNA 分子 let-7 microRNA,这才引起了人们的密切关注。此后,上万种不同的 microRNA 分子在植物、动物和病毒中被发现,其中在人类细胞中也发现了 2 000 多种,所占人类基因组的比重是 1%,调控着体内 30% 的基因表达。

近几年, microRNA 已成为许多生物化学研究者密切关注的研究热点之一。microRNA 是一类长度约 22 nt 的内源性非编码高度保守的小分子 RNA,通过碱基互补配对,广泛地负调控靶基因的表达。目前认为, microRNA 多以识别靶 microRNA 序列的 3'-UTR 并与之互补配对的方式,抑制其翻译过程,从而调控基因表达,也有一些学者发现 microRNA 可以识别 microRNA 的 5'-UTR,并激活 microRNA 的翻译。microRNA 是抑制或是切割 microRNA 取决于 microRNA 与靶序列互补配对的程度,互补配对高的可能进行切割,反之,配对低的只是抑制,从而降低靶基因的蛋白水平。

microRNA 的表达与许多疾病的发展密切相关,已经被视为临床上重要的生物标志物。由于 microRNA 序列短,片段小,一般只含有二十几个碱基,同族之间序列同源性高,差别小,而且在细胞中的表达水平较低再加上缺少多聚腺苷酸的尾巴,定量检测存在着一定的困难^[3]。科学家们鉴于 microRNA 与疾病之间的密切相关性,殚精竭虑,研究出了许多检测 microRNA 的方法。本文主要对其检测的传统方法和新方法做了系统的总结和评价。

1 microRNA 检测的传统方法

1.1 Northern blotting Northern blotting 法俗称 RNA 印记法。它是一种经典的基于固相杂交的技术,通常被用来验证和量化 microRNA 的数量分析研究^[4]。它的基本原理是将结合在硝酸纤维素膜上的目标 microRNA 和被标记的寡核苷酸探针进行互补杂交,经洗膜显影后对条带进行分析^[5]。Harcourt 等^[6]首先发现了 lin-4 和 let-7 两大家族 microRNA,应用 Northern 印迹技术分析研究了线虫 microRNA 在不同器官中的表达情况。

虽然该法是检测的标准方法,但是操作步骤繁琐,不适合于高通量分析。并且需要相对大量的样本(10~30 μg)提取总 RNA,实验中放射性探针标签会带来健康和环境安全问题,专用设施也会存在一些特殊的要求。此外,该方法还存在效率

低,耗时耗力以及因为检测限为纳摩尔级别所造成的灵敏度低下等缺点。针对这些缺点,学者们在此方法上进行一些技术的改良。

1.1.1 使用锁核酸(LAN)修饰的寡核苷酸探针 LAN 是一种寡核苷酸衍生物即双环的 RNA 类似物,在结构上与 RNA 具有相同的磷酸盐骨架,对 RNA 具有强大的识别能力和亲和力,可以渗入到 DNA 的任何位置。LAN 也可以增加探针的溶解温度,加强试验物质的稳定性,使检测灵敏度提高 10 倍左右^[7]。

1.1.2 使用可溶性的碳二亚胺(EDC) EDC 是一种常用的失水剂,用来活化核酸的交联。在 RNA 印记法中使用 EDC 可以提高 microRNA 与膜的结合效率,实现 microRNA 和尼龙膜(杂交载体中的膜)的高效联合,提高灵敏度^[8]。

最近,学者又对 microRNA 检测的标准方法做了一些新的改进,他们为了提高检测的敏感性,使用了化学交联 microRNA 的印迹膜和混合放大器/DNA 探针。一种核糖核酸酶保护法(RPA)也被学者用来检测 microRNA,该法比传统的 RNA 印迹法所需的样本含量明显减少,并且更加方便简单,灵敏度也得到了提高^[9]。

1.2 微阵列法 微阵列法可以同时定量检测多个样本,筛选出单个样品体积内数百靶序列,适用于 microRNA 的高通量分析。在一般情况下,微阵列法没有特别适用于 microRNA 的定量检测和决定它的拷贝数,因为它的定量通常是在受限制的线性范围内,由此绝对定量难以实现。该法的基本原理是首先从生物样品中提取 RNA 样品,然后用荧光标记所有的 microRNA,接着将用于杂交的 DNA 探针(该探针与目标 microRNA 序列互补)固定于微芯片上,将芯片与标记的 microRNA 杂交,经过适当的洗涤,通过检测荧光的强度信号和数据处理,获得不同标本中特异 microRNA 的表达谱^[10]。现已通过微阵列法在基因组范围内检测出大量的 microRNA 在不同的生理状态的表达状况。例如,在大多数的慢性 B 淋巴细胞性白血病细胞中的 microRNA-15 和 microRNA-16 表达明显降低,而 microRNA-155 和 microRNA-17-92 簇在 B 细胞淋巴瘤中表达却增加。

虽然微阵列法具有高通量的优点,但是检测范围取决于芯片上的探针信息,只能检测已知序列,缺少发现新基因的能力而且试验的重复性很差,灵敏度、特异度欠佳,再加上芯片本身的制作和检测费用高,广泛地在临床上开展存在很大的难度。

1.3 定量逆转录 PCR 法 定量逆转录 PCR 法可以用于绝对和相对 microRNA 的定量,往往被研究者视为定量 microRNA 的金标准。该法也用于 RNA 印迹法和微阵列法的进一步验

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2015CB755400)。

△ 通信作者, E-mail: hanchongxu@126.com。

证和确认^[11-12]。原理是首先利用靶 RNA 转录成其相应的 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行扩增, 最后通过扩增产物的数量来对 microRNA 进行间接的定量分析。研究者以正常和寒冷条件下诱导生长的豌豆幼苗为研究对象, 基于 microRNA 的保守性, 用已知模式生物拟南芥中与抗寒相关的 4 个 microRNAs (microR319、microR393、microR397、microR402) 设计引物, 通过定量 PCR 检测豌豆在正常和寒冷诱导下可能出现的相关 microRNAs。研究发现了 microR319、microR393、microR397、microR402 均存在于豌豆中, 并且在寒冷诱导下表达量上升^[13]。

该法主要采用 2 种信号检测模式即 SG 荧光染料法和 TagMan 探针法。SG 荧光染料法成本低但是特异性差, 而 TagMan 探针法特异性好, 但是成本高。PCR 步骤中通常使用的引物只是成熟的 microRNA 自己, 因为较短的引物通常是没有用的, 其自身低的熔炼温度会导致信号的偏差。而且在定量 RT-PCR 方法中也包含其他限制, 如昂贵的仪器、高度专业化的人才以及注意预防和规避污染等问题^[10]。再加上 microRNA 缺少多聚(A)尾, 序列短, 在样品制备过程中容易夹杂一些前体 RNA 如 pre-microRNA 或 pri-microRNA, 导致传统的 PCR 无法满足定量分析的要求^[14]。为了规避这些问题, 研究者对传统的 PCR 进行了多方面的改进。

1.3.1 多聚(A)加尾 RT-PCR 该方法添加多聚(A)尾到溶液中的靶 microRNA 的 3'端, 5'端含有相应的 RT 引物包括聚(T)的尾部, 以增加异源双链体的 Tm 和推进反转录, 从而使第一链 cDNA 加上了一段接头, 提供了反向通用引物序列, 再利用一条特异的正向引物序列来实现 PCR 的扩增^[15]。其中 microRNA 多聚(A)尾的作用是: (1)可能有助于 microRNA 从细胞核到细胞质之间的转运^[16]; (2)避免了 microRNA 在细胞中受到核酸降解, 增强它的稳定性^[17]。此法大大增加了测定的特异度和灵敏度。

1.3.2 引物延伸 RT-PCR 该方法包括 2 个步骤, 第一个步骤主要囊括 3 个方面: (1)将 microRNA 反转录成 cDNA; (2)引入一个“通用”的 PCR 结合位点的 DNA 分子; (3)将 cDNA 的长度延伸至可通过 qPCR 进行后续的监视。第二个步骤是将所得到的引物延伸, 然后全长 cDNA 通过一个包含 LNA, microRNA/siRNA 的特异性“反向”引物(LNA-R 引物), 一个共同的通用引物的组合所形成的实时 PCR 进行检测。简单地说就是从总 RNA 入手, 在 microRNA 的 3'端加上一个接头(帮助基因中 DNA 分子的配对), 然后利用接头特异的引物来进行反转录, 接着用同样的引物, 连同 5' microRNA 特异的引物, 来进行定量 PCR 反应。该测定法可以在高的动态范围内读出仅差异跨越 6~7 单位的 microRNA 的浓度, 而且能够鉴别 microRNA 家庭成员之间细微的序列差异。

1.3.3 茎环引物 RT-PCR(stem-loop RT-qPCR) 该法用于定量前体和成熟 microRNA。它包括 2 个步骤: RT 和实时 PCR 检测。首先, 将茎-环 RT 引物杂交到 microRNA 分子上, 然后用逆转录酶反转录。接着, 对 RT 产品均采用传统的荧光定量 PCR 量化。茎环引物与 microRNA 结合的特异性强, 通常不会发生退火^[18]。而且该检测方法能检测到低半度靶 microRNA, 对于序列同源的家族 microRNA 的检测特异性高, 不会受到基因组 DNA 污染, 定量检测的线性范围跨越 7 个数量级。该法采用尽可能少的大约 25 pg 的总 RNA 进行精确的检测, 可以实现大多数 microRNA 的量化。

虽然 stem-loop RT-qPCR 具有如此多的优势, 但是茎环形成的条件非常苛刻, 设计难度大, 而且线性引物不能很好地区

分成熟 RNA 和前体 RNA, 必须通过优化退火和逆转录步骤。

为了进一步提高检测的灵敏特异度和检测通量, 研究者们集思广益, 优化了单细胞水平的检测方法。Lao 等^[19]将 microRNA 特异的编码序列加入到 PCR 正向引物和反转录引物中, 提高了特异性。Tang 等^[20]建立多重 stem-loop RT-qPCR 法, 通过增加一步预扩增反应测定出单细胞水平(0.015 ng 总 RNA)的 microRNA。

1.3.4 荧光定量 PCR(RTFQ-PCR) RTFQ-PCR 通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 实时在线监控反应过程, 结合相应的软件对产物进行分析, 计算待测样品模板的初始浓度。RTFQ-PCR 的出现, 极大地简化了 microRNA 定量检测的过程, 真正实现了 microRNA 的绝对定量, 促使了荧光信号的累积与 PCR 产物形成的同步化。RTFQ-PCR 一般分为非特异性 RTFQ-PCR 和特异性 RTFQ-PCR, 使用非特异性 RTFQ-PCR(以 SYBR Green I 为例)检测分析时, 实验设计较为简单, 一般需要一条特异性反转录引物, 一条特异性正向 PCR 引物, 反向 PCR 引物, 即可通用于所有小 RNA 分析, 无需像 TagMan 方法那样专门设计探针。此外, 实验成本相对较低, 可通过溶解曲线分析来检测扩增反应的特异性。

研究者通过 RTFQ-PCR 检测乳腺癌及其对应的癌旁组织中 microRNA-21 的表达量, 从而可以分析其表达与肿瘤大小、临床病理分期(TNM)、组织学类型等临床病理特征的关系。

总之, 由于传统方法操作繁琐, 所需样本量大, 而且灵敏度特异度不高, 促使研究者在原有的基础上不断创新, 研究出许多新方法来满足 microRNA 的检测和临床需要。

2 microRNA 检测的新方法

2.1 滚环扩增法(RCA) RCA 分为两类, 一类为直接利用环状单链为模板的直接滚环扩增法, 另一类为要先设计一条两端序列与待检序列完全互补的锁探针的锁探针-滚环扩增法^[5]。滚环扩增法是一种无需使用特殊装置的恒温扩增技术, 可从几纳克总 RNA 中定量分析出 microRNA, 方法简便快速。但是其本身的模板合成难度非常大, 扩增时间长, 并且工具酶价格十分昂贵^[20]。

科学家们在 Jonstrup 等^[21]首次用 microRNA 为锁探针的连接模板从而作为引物引发滚环扩增反应, 完成 ng 级别的总 RNA 的分析基础上进行如下 4 个方面的改进: (1)使用哑铃状探针; (2)将 RCA 和切口酶信号扩增技术和 DNA 信号扩增技术结合, 提高灵敏度; (3)引入和 RCA 产物互补的第二引物进行分支滚环扩增获得大量的 dsDNA 产物, 并通过 SYBR Green I 进行检测; (4)利用 T4 连接酶 2 连接环化锁探针, 提高特异性。

2.2 基于指数扩增反应的 microRNA 检测法(EXPAR) 指数扩增反应是一种等温核酸扩增新技术, 最近已成功用于 DNA 和 microRNA 的技术检测。它需要一条特殊设计的模板和 2 种工具酶(DNA 聚合酶和切口酶)。该法能够区分仅存在单个碱基差异的 microRNA, 在摩尔水平上定量检测 microRNA。

为了进一步满足检测的需要, 科学家们提出了许多的升级方法: (1)将 EXPAR 的线状扩增模板结构改变为发卡式结构, 采用特殊设计的哑铃状模板探针^[22-23]; (2)引入 G-四链体脱氧核糖核酸酶催化信号检测技术, 提高检测限; (3)将两步 EXPAR 和单量子点纳米传感器相结合; (4)DNA-scaffolded 银纳米簇探针检测技术和靶向等温指数扩增反应(TAIEA)相偶联, 避免 microRNA 的纯化。

张春阳等^[24]申请了一个专利,他们将 EXPAR 和表面拉曼光谱(SERS)相结合共同检测 microRNA,该方法简单易行,而且检测特异度高,能同时检测多个目标 microRNA。

2.3 酶辅助 microRNA 定量检测方法(EATR) EATR 主要分为序列依赖性酶辅助 microRNA 检测法和非序列依赖性酶辅助 microRNA 检测法。前者反应温度低,工具酶便宜易得,操作简单。但是探针设计难度大,模板容易自身退火造成假阳性,或产生高背景检测信号。后者可以规避上述问题,该法主要采用双链特异性核酸酶(DSN)用于检测。由此可以建立一种基于 DSN 的信号扩增技术的多重 microRNA 定量检测法,提高检测限^[5]。

2.4 基于纳米技术的 miRNA 检测方法 最近,纳米材料已经在生物测定中备受关注,基于纳米孔的核酸分析成为了一个新兴的技术。纳米材料可作为荧光团或猝灭剂或是作为载体用于装载探针的提升以此在荧光分析中检测信号。纳米材料包括金属纳米材料、量子点(QDs)、石墨烯氧化物(GO)和硅纳米颗粒等^[4]。

纳米金标记技术是现如今研究最成熟的一个技术。纳米金具有自聚集现象,当溶液中盐浓度达到一定程度时,标记了 DNA 链的纳米金会发生自聚集现象,并伴随着颜色变化,而且易标记,化学惰性强。研究者通过纳米金技术成功从小鼠的肝脏和脑组织抽提的总 RNA 中检测出高表达的 microRNA-122a 和 microRNA-128。

基于纳米材料的检测,还衍生了其他新方法比如:(1)电纳米标签的使用;(2)钌氧化物纳米粒子是另一种纳米粒子的 microRNA 检测使用的类型,如开发出的合成纳米孔基于传感器的技术用于 microRNA 的检测;(3)银纳米粒子使用 LNA 探针组装和它们的互补 DNA 序列,并用 cy3 拉曼染料标记探针;(4)表面等离子体共振成像技术联合使用 LNA 锁探针技术。

2.5 抽象的 DNA 折纸术 DNA 折纸术的原理是使用 DNA 纳米阵列作为支架并利用生物素-链霉素和互动,发明 DNA 折纸技术检测生物分子。该方法简便快速,只需要样品完全不变的 microRNA,没有任何蛋白质或 DNA 降解酶以及任何干扰序列^[18]。研究者通过 DNA 折纸术检测 microRNA-133b,比较它在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达变化,以此为宫颈癌的筛查提供辅助诊断。

2.6 新一代测序技术 随着功能基因组时代的到来,传统的测序方法已经不能满足深度测序和重复测序等大规模基因组测序的需要,新一代的测序技术孕育而生。新一代的测序主要包括 ABI 公司的 SOLID 测序平台^[23],Illumina 公司的基因组分析仪^[13]及罗氏 454 公司的 GS FLX 测序平台。

采用新一代测序对于 microRNA 进行检测主要包括 5 大步骤:(1)首先构建 DNA 的模板文库,分离纯化小 RNA,在 microRNA 的 3'端和 5'端通过 T4 连接酶连接上接头序列,之后通过 RT-PCR 得到约 70~80 bp 的 DNA 序列;(2)将单链模板文库固定在微球表面;(3)通过原位成簇,桥式 PCR,或者微乳液 PCR 对数据进行扩增;(4)采集并且记录在 PCR 循环中的光学事件;(5)通过对产生的阵列图像进行时序分析,以此获得 DNA 片段的序列。大规模的测序法不需要在测序前进行克隆,但需要同时对所有模板进行类似克隆的 PCR 扩增。目前主要包括 2 种:微乳液 PCR 和固相桥式 PCR。454 测序技术和 SOLiD 测序技术都采用微乳液 PCR 制备测序模板,而 Solexa 测序技术则采用固相桥式 PCR 进行扩增。研究者将棉花胚珠突变体与野生型棉花进行测序检测,发现大量的 microRNA 存在差异表达,其中与纤维生成有关的 microRNA 有 3 种: microR167, microR160, microR393。在动物研究领域中, Dai 等^[16]用 solexa 测序法对猪永生化血管内皮细胞进行测序,确定了 154 个猪的 microRNA 基因,发现 microRNA-206, microRNA-21 和 microRNA-378 高度表达。

新一代的测序技术的一个突出优点就是边合成边测序,它在很大程度上提高了 microRNA 被发现的几率,为 microRNA 的发生及功能机制的研究提供了大量信息。但为了弥补二代测序技术后续的组装工作困难等缺陷,第三代测序技术面临于世。第三代测序技术采用单分子测序原理,在测序成本、错配率、读取长度以及测序通量等技术指标上比二代测序技术有了更大的改进和提高。

虽然新技术自身具有巨大的优异性,更加快速简便,灵敏度特异度高,但是为了在临床上广泛地使用还有很长的一段路要走。

3 小 结

microRNA 在疾病的发生发展中具有至关重要的地位,它的检测有利于药物的研发以及疾病的分子诊断。各种 microRNA 检测方法的优缺点评价总结详见表 1。

表 1 microRNA 检测方法的优缺点评价及改进								
影响因素	检测方法							
	Northern blotting	微阵列	RT-PCR	RCA	EXPAR	EATR	纳米技术	测序技术
操作方面	过程冗长,技术复杂	高通量检测,较繁琐	耗时少,制备简单	模板合成难度大,耗时	较复杂	与是否为序列依赖性酶相关	避免扩增等步骤,操作简便	边合成边测序,耗时短
干扰因素	干扰多,任一步骤都会影响	微芯片的处理, DNA 探针的选择等	探针,引物,前体 RNA 的影响等	模板的合成,工具酶等	模板的设计,工具酶等	探针设计难度大,模板易退火	纳米材料的选择等	假阴性;软件的不足与局限;假阳性;与其他小 RNA 的相似性
特异度	较强	欠佳	一般,不是每次都理想	很强	较强	低	强	强
灵敏度	低	欠佳	较高	一般	较高	一般	高	高
成本	一般	高昂	较高,需贵重仪器等	工具酶昂贵	一般	视工具酶而定	与纳米材料有关	高昂
改进措施	使用可溶性的 EDC 等	使用 LAN 探针等	多聚(A)加尾等	使用哑铃状探针等	单量子点纳米传感器的使用	引入基于 DNS 的信号扩增技术	电纳米标签等	采用单分子测序原理

科学家们致力于研究探索更有利于检测 microRNA 的方法,但是追本溯源,任何一项新型的方法都应该考虑以下常规的限制^[10]:(1)最小的样品制备和操作要求的 microRNA;(2)直接量化,而不是定量基因;(3)信号放大首选目标放大策略;(4)高灵敏度和特异性;(5)绝对可靠的 microRNA 定量原理;(6)较低的成本要求。

总而言之,理想的 microRNA 检测技术还需要科学家们坚持不懈的努力和探索,不同检测方法各有其优缺点,新兴的技术和工具可促进 microRNA 检测的进步。本文对 microRNA 检测方法学进行评价,目的是在选择检测 microRNA 方法的过程中,要权衡利弊,综合考虑,以实现利益和效率的最大化。

参考文献

- [1] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 89 (6): 1828-1835.
- [2] Reinhart BJ,Slack FJ,Basson M,et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*,2000,403(6772):901-906.
- [3] Zhuang JY,Tang DP,Lai WQ,et al. Immobilization-Free programmable hairpin probe for ultrasensitive electronic monitoring of nucleic acid based on a biphasic reaction mode[J]. *Anal Chem*,2014,86(16):8400-8407.
- [4] La M,Liu L,Zhou BB. Nanomaterials-Based Fluorimetric Methods for MicroRNAs Detection[J]. *Materials*,2015,8 (5):2809-2829.
- [5] 祝申蓉,吴旭日,陈依军. microRNA 定量检测方法的研究进展[J]. *中国药科大学学报*,2015,46(1):40-49.
- [6] Harcourt EM,Kool ET. Amplified microRNA detection by templated chemistry[J]. *Nucl Acids Res*,2012,40(9): e65.
- [7] Zhang Y,Zhang CY. Sensitive detection of microRNA with isothermal amplification and a single-quantum-dot-based nanosensor[J]. *Anal Chem*,2012,84(1):224-231.
- [8] Dong HF,Zhang J,Ju HX,et al. Highly sensitive multiple microRNA detection based on fluorescence quenching of graphene oxide and isothermal Strand-Displacement polymerase reaction[J]. *Anal Chem*,2012,84(10):4587-4593.
- [9] Jamali AA,Pourhassan-Moghaddam M,Dolatabadi JE,et al. Nanomaterials on the road to microRNA detection with optical and electrochemical nanobiosensors [J]. *Trends Analyt Chem*,2014,55:24-42.
- [10] Degliangeli F,Pompa PP,Fiammengio R. Nanotechnology-based strategies for the detection and quantification of microRNA[J]. *Chemistry*,2014,20(31):9476-9492.
- [11] Yang L,Liu C,Ren W,et al. Graphene surface-anchored fluorescence sensor for sensitive detection of microRNA coupled with enzyme-free signal amplification of hybridization chain reaction[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012,4(12):6450-6453.
- [12] Dong H,Lei J,Ding L,et al. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(8): 6207-6233.
- [13] Bentley DR,Balasubramanian S,Swerdlow HP,et al. Accurate whole human genomes sequencing using reversible Terminator chemistry[J]. *Nature*, 2008, 456 (7218): 53-59.
- [14] Yan J,Zhang N,Cui Q,et al. One-step real time RT-PCR for detection of microRNAs[J]. *Talanta*, 2013, 110(7): 190-195.
- [15] Yang L,Liu C,Ren W,et al. Graphene surface-anchored fluorescence sensor for sensitive detection of microRNA coupled with enzyme-free signal amplification of hybridization chain reaction[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012,4(12):6450-6453.
- [16] Dai C,Zhang YM,Zhang Q,et al. A MicroRNA catalog of swine umbilical vein endothelial cells identified by deep sequencing[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10 (9):1467-1474.
- [17] Andreasen D,Fog JU,Biggs W,et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples[J]. *Methods*,2010,50(4):S6-9.
- [18] Zhu J,Feng X,Lou J,et al. Accurate quantification of microRNA via single Strand displacement reaction on DNA origami motif[J]. *PLoS One*,2013,8(8):e69856.
- [19] Lao K,Xu NL,Sun YA,et al. Real time PCR profiling of 330 human micro-RNAs[J]. *Biotechnol J*,2007,2(1):33-35.
- [20] Tang F,Hajkova P,Barton SC,et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells[J]. *Nucl Acids Res*,2006,34(2):e9.
- [21] Jonstrup SP,Koch J,Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification[J]. *RNA*,2006,12(9):1747-1752.
- [22] Wang GL,Zhang CY. Sensitive detection of microRNA with hairpin probe-based circular exponential amplification assay[J]. *Anal Chem*,2012,84(16):7037-7042.
- [23] Bi S,Cui Y,Li L. Dumbbell probe-mediated cascade isothermal amplification: A novel strategy for label-free detection of microRNAs and its application to real sample assay[J]. *Anal Chim Acta*,2013,760(760C):69-74.
- [24] 张春阳,叶丽萍,胡娟. 一种基于恒温指数扩增反应与表面增强拉曼光谱检测的 miRNA 检测方法及其应用:中国,104278088[P]. 2015-01-14.

(收稿日期:2016-07-28 修回日期:2016-10-18)