

doi:10.3788/gzxb20174603.0312001

MicroRNA 快速检测系统的设计

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

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

(2 中国科学技术大学, 合肥 230026)

(3 中国医科大学, 沈阳 110001)

摘 要: 为了实现 MicroRNA 的快速检测, 设计了一种便携式 MicroRNA 快速检测仪. 基于等温滚环扩增技术, 采用光电检测方法, 检测标志物受激发出的荧光光强, 建立特征荧光分析检测系统. 通过改变激发光强度、MicroRNA 试剂浓度等参量, 验证了该仪器可测量的 MicroRNA 的浓度范围为 0.01~0.1 μmol , 可检测出的最低检出限为 7 个拷贝数, MicroRNA 浓度与荧光信号强度之间为线性关系 ($R^2=0.9991$).

关键词: 生物医学工程; 医用光学仪器; 核酸检测; 荧光; 弱光探测; MicroRNA; 滚环扩增

中图分类号: O059; Q6

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2017)03-0312001-6

Design of a Rapid MicroRNA Detection System

WANG Yan-fei^{1,2}, YU Dong-sheng¹, CHEN Hai-yan¹, ZHANG Zhan-ying¹, FANG Wei-kai¹,
LU Ze-yuan¹, LI Yan-lei¹, JI Yu-feng¹, GUAN Yi-fu^{1,3}, XU Chi-dong¹, JIANG Hai-he¹

(1 Center of Medical Physics and Technology, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

(2 University of Science and Technology China, Hefei 230026, China)

(3 China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Using Opto-electronic detection technology, marking miRNA and isothermal rolling circle amplification and detecting markers which excite fluorescence intensity, we have designed a new portable device for the rapid detection of miRNA, the recognition system of characteristic fluorescence analysis was established eventually. we have got the point that there is the linear relationship ($R^2 = 0.9991$) between miRNA concentration and fluorescence intensity at the time that the miRNA concentration range the instrument can measure is in the range of 0.01~0.1 μmol by changing the excitation light intensity, miRNA reagent concentration and other parameters, meanwhile, we also know that it is 7 copies that the lowest values the instrument can measure in theory.

Key words: Biomedical engineering; Medical optics instrumentation; Nucleic acid detection; Fluorescence; Light detection; MicroRNA; Rolling circle amplification

OCIS Codes: 120.3890; 120.1880; 220.4830; 170.1470; 040.378

0 引言

MicroRNA 是一类内生的、长度约为 20~24 个核苷酸的单链 RNA. MicroRNA 参与了细胞分化、增殖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]. 由于成熟的 MicroRNA

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81371896)和安徽省自然科学基金(No. 1508085SMC214)资助

第一作者: 王燕飞(1984-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为光电检测技术. Email: yfw@mail.ustc.edu.cn

导 师: 江海河(1961-), 男, 研究员, 硕士, 主要研究方向为激光技术与光机电一体化应用等. Email: hjjiang@aiofm.ac.cn

通讯作者: 徐赤东(1978-), 男, 副研究员, 硕士, 主要研究方向为激光雷达系统及应用等. Email: xcd@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2016-09-30; 录用日期: 2016-12-08

<http://www.photon.ac.cn>

长度较短,加之其具有序列同源性,特异性检测相差只有一个碱基的不同 MicroRNA 具有较大的挑战性^[4].

目前检测 MicroRNA 的方法主要是实时荧光定量 PCR(RT-PCR)^[5]和生物芯片技术^[6].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,而且检测过程操作复杂,检测时间长,需要由经过专业培训的相关人员才能进行,难以在一般条件的机构开展.近年来,等温滚环扩增(Rolling Cycle Amplification, RCA)技术凭借其高特异性、高灵敏度和易操作性逐渐引起了研究人员的广泛关注,并被越来越多地应用于基础研究和实际检测中.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 MicroRNA^[7]的变化,从而为疾病的风险预警和监测提供辅助诊断方法,可用于床边检测^[8,9]与家庭检测.

本文基于等温滚环扩增技术,设计了一种 MicroRNA 快速检测仪,采用光电检测的方法,检测标志物受激发出的荧光强度,对采集到的荧光数据进行分析,得出 MicroRNA 变化情况,以实现 MicroRNA 的快速有效检测.

1 检测原理

RCA 具有极强的扩增能力,线性 RCA 的扩增效率可达 10^5 倍,而超分支滚环扩增(Hyper-branched Rolling Cycle Amplification, HRCRA)的扩增效率可达到 10^9 倍^[10].在室温下,使用 SYBR Green II 染料标记与 MicroRNA 核苷酸互补的寡聚核苷酸,针对目标 MicroRNA 进行滚环扩增,在一定扩增范围内,扩增产物量与荧光强度成正比.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 MicroRNA 核苷酸链后在受到激发时会发出荧光,即只有经过荧光染料结合的 MicroRNA 的扩增产物才可激发出荧光.荧光是可发光物质分子吸收能量后从电子第一激发态最低振动能级回到它的电子基态时所发射的光,它的产生及强度的强弱与分子结构等参量紧密相关.溶液的荧光强度与该溶液的吸收激发光的强度以及荧光物质的荧光效率^[11]有关,即

$$I_F = \Phi_F I_a = \Phi_F I_0 (1 - e^{-\epsilon c L}) \quad (1)$$

式中 I_F 为荧光强度, Φ_F 为荧光效率, I_0 为激发光光强, I_a 为吸收光光强, ϵ 为摩尔吸收系数, L 为样品光程差, c 为物质浓度.若 Φ_F 、 I_0 保持不变时,将式(1)按泰勒级数展开为

$$I_F = \Phi_F I_0 [\epsilon c L - (\epsilon c L)^2 / 2! + (\epsilon c L)^3 / 3! - \dots] = \Phi_F \epsilon c L I_0 - \Phi_F (\epsilon c L)^2 I_0 / 2 + \Phi_F (\epsilon c L)^3 I_0 / 6 - \dots \quad (2)$$

对于较低浓度的溶液,式(2)第二项以后的高阶项可忽略,若 Φ_F 、 I_0 、 ϵ 、 L 固定不变时,荧光强度 I_F 与溶液的浓度 c 近似成正比,可简化为

$$I_F \approx \Phi_F I_0 \epsilon c L = Kc \quad (3)$$

式(3)表明荧光强度与荧光物质的浓度呈线性关系.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,可以判断出此时核酸浓度,并分析出 MicroRNA 的初始浓度.

2 检测系统设计

根据 MicroRNA 快速检测仪原理, MicroRNA 检测实际上分为两个过程,第一步是基于滚环扩增将原始的 MicroRNA 从生物角度将信息放大;第二步通过高灵敏的光学激发检测装置实现扩增后信号检测. MicroRNA 快速检测仪就是针对扩增后 MicroRNA 的主动光学检测设备.

2.1 系统设计

图 1 是 MicroRNA 快速检测仪系统框图.光源发出的光通过激发光光束整形后照射待测样品,待测样品中经过滚环扩增后的 MicroRNA 因携带荧光片段,在受到激发后产生荧光,荧光通过后继光路后经信号探测与处理变成电信号进行数据处理,最后通过数据采集系统在显示面板上显示结果.

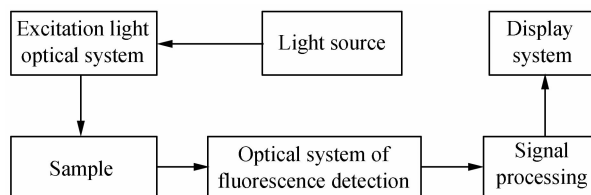


图 1 MicroRNA 快速检测仪系统框图

Fig. 1 The Block diagram of the rapid MicroRNA detection system

图 2 是系统检测光学原理图. 光学系统设计重点在于解决极弱光探测、背景光的压缩抑制、以及杂波滤除等问题, 主要考虑激发光功率、输出荧光强度等参量.

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. 背景光对仪器噪音、信号基线及光谱的稳定性均有影响, 所以必须对背景光进行压缩抑制^[12]. 荧光检测系统为提高荧光^[13]收集效率, 降低背景噪声等影响采用共焦检测系统. 同时, 为降低外界杂散光的干扰, 提高信噪比, 需要在检测光路中加入合适的滤光片, 以滤除杂散光提高信噪比.

2.2 单元设计及参量

按照功能需求, 该检测仪主要由光学检测系统单元、信号采集与处理系统单元及显示系统单元等构成. 设计时, 需要综合考虑光学、机械、电子、软件等参量, 使仪器各方面性能达到设计要求.

1) 波长选择: SYBR Green II 染料激发波长为 480 nm, 其发射波长为 520 nm, 实验光源采用激光光源, 最大功率 30 mW, 滤光片采用带通滤光片.

2) 光信号采集: 激发光经聚焦和滤光后照射待测样品, 待测样本中的 MicroRNA 经滚环扩增后, 其荧光浓度提高相应倍数, 经荧光聚光和滤光系统后由光电倍增管探测.

3) 信号采集与处理系统: 光电倍增管将光信号转换为电信号, 电信号经数据采集系统后通过数据处理^[14], 在显示面板上显示数据. 通过对光电倍增管放大电路的噪声进行估算, 以及合理的 PCB 板布局连线和屏蔽等措施控制噪声以减少噪声信号对测量结果的影响, 主要考虑输出信号强度、噪声等参量.

4) 样品池: 待测样品的反应体积可能存在较大差异, 需要保证样品池具有通用性以及便于清洗等目的, 结合生物实验特点, 设计样品池可测样品反应体积 1~100 μL .

5) 显示系统: 主要采取优化算法等措施, 简单快捷地将检测结果显示在界面上.

表 1 给出了所设计的 MicroRNA 快速检测仪的设计参量.

表 1 MicroRNA 快速检测仪设计参量
Table 1 The parameters of the rapid MicroRNA detection system

Parameter/unit	Excitation wavelength/nm	Emission wavelength/nm	Minimum detection limit/copies	Reaction volume/ μL
Value	480	520	10	1~100

2.3 关键技术

1) 微弱光信号探测: 待测信号为极微弱光, 设计时, 一方面使用光电倍增管, 提高采集光信号能力; 另一方面采用共焦检测系统, 同时采用滤光片滤除杂散光, 提高信噪比.

2) 样品池设计: 考虑实际使用, 样品池不仅需要具有通用性以及便于清洗, 还需要严格避光, 避免在光路中引入新的噪声.

3) 信号处理: 获取仪器噪声特性, 通过滤波的方法抑制噪声, 提高测量结果准确性.

3 实验

3.1 激发光与荧光强度关系

检测系统对受测物的测量能力受到激光功率、探测器以及采集电路的影响, 并最终影响系统的线性测量区间. 当激发光太弱, 激发出的荧光太弱, 探测系统将测不到信号; 而当激发光太强时, 由于探测器和采集系统电路幅值的限制, 系统会工作在非线性状态, 无法获取稳定精确的测量结果. 根据系统元件参量的整体情况, 考虑 SYBR Green II 染料荧光量子效率和光学系统的能量损失^[15]以及探测器的探测灵敏度、扩增时间等因素. 经计算后选定了激发功率分别为 0.60、0.75、0.90 和 1.00 mW, 试剂浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、

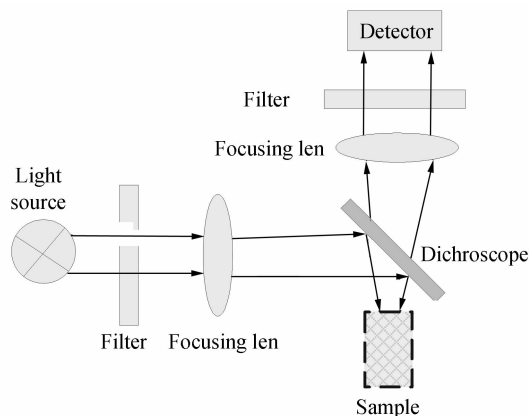


图 2 光学检测原理图

Fig. 2 The illustrative diagram of the optical detection

0.5 μmol 时探测器探测到的荧光信号的强度(以下简称为荧光信号强度)柱状图(图 3)。

由图 3 可知,当激发光为 0.60 mW 时,无荧光激发出;在激发光分别为 0.75、0.90 mW 时,荧光信号强度随着荧光物质浓度的增加而增加,且随着激发光功率的增加而增加;当激发光功率为 1.00 mW 时,荧光信号强度与激发光为 0.90 mW 时的荧光信号强度几乎无差异,可见当激发光强达到一定值后,荧光信号强度不再随着激发光的增强而增强,趋于饱和.从图 3 中还可以看出试剂浓度为 0.05 μmol 时,荧光信号强度随激发光变化明显,便于仪器识别,且此时浓度较低,便于扩增实现.因此,实验设计保持试剂浓度为 0.05 μmol 不变,改变激发光强度分别为 0.60、0.75、0.90 和 1.00 mW 时荧光信号强度.实验共做 10 次,分别记录每次的荧光信号强度.

图 4 为激发光强度分别为 0.60、0.75、0.90 和 1.00 mW,试剂浓度为 0.05 μmol 时的荧光信号强度图.由图 4 可知,当激发光强度介于 0.6 ~ 0.9 mW 之间,荧光信号强度随着激发光强度的增加而线性增加;当激发光强度为 0.75 mW 时,试剂平均信号强度为 5V.在激发光强度为 0.90 ~ 1.0 mW 之间,荧光信号强度随着激发光强度的增加不再增加,逐渐饱和;当激发光强度为 0.90 mW 时,试剂平均光强约为 9.5 V;当激发光强度为 1.0 mW 时,试剂平均信号光强约为 10 V.

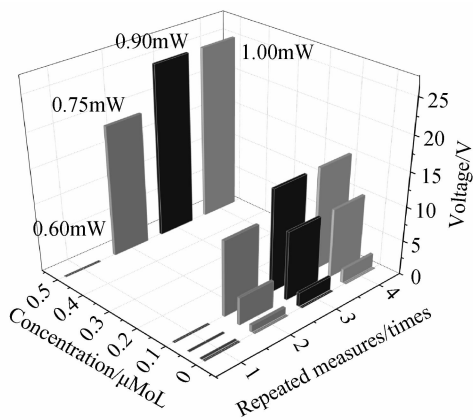


图 3 不同激发光强度和试剂浓度与产生的荧光强度的关系比较

Fig. 3 The comparison of the fluorescence intensities at different excitation intensities and reagent's concentrations

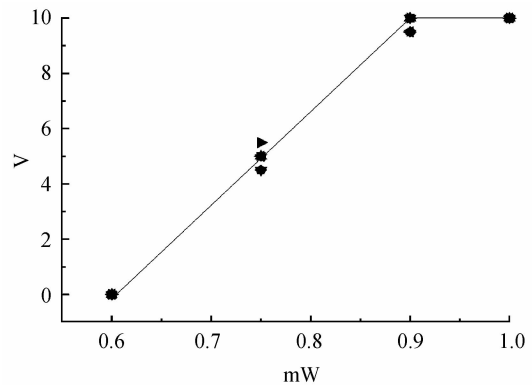


图 4 同一试剂浓度不同激发光强度产生的荧光信号强度
Fig. 4 Fluorescence intensities of different excitation intensities at the same reagent's concentration

从图 4 中还可以看出当激发光强度为 0.75 mW 时,荧光强度信号出现一定的离散性,推测其原因是滚环扩增终产物长短不一,导致荧光强度不均一.尤其扩增后期,滚环扩增终产物大量增加,会使荧光强度不均一表现的更加明显.对此影响,后期将通过软件加以修正.但实验结果显示激发光强度为 0.75 mW 时处于较为合理的能量区间.因此,选择本仪器最佳激发光强度为 0.75 mW.

3.2 浓度与荧光信号幅值关系

荧光信号强度与试剂浓度在一定范围内成正比,由此可以求出 MicroRNA 浓度.为求出荧光信号强度范围,设计实验保持激发光强度为 0.75 mW 不变,测试试剂浓度分别为 0.01、0.025、0.05、0.075、0.1 μmol ,体积 20 μL ^[16] 不变时荧光信号强度以及作为对照组的去离子水的荧光信号强度,实验共做 10 次,分别记录每次的荧光信号强度.

图 5 为激发光强度为 0.75 mW,不同浓度试剂的荧光信号强度.由图 5 可知,当试剂浓度在 0.01 ~ 0.1 μmol 之间时,荧光信号强度随着试剂浓度的增加而增加,当试剂浓度为 0.01 μmol 时,荧光平均强度是 1V;当试剂浓度为 0.1 μmol 时,检测

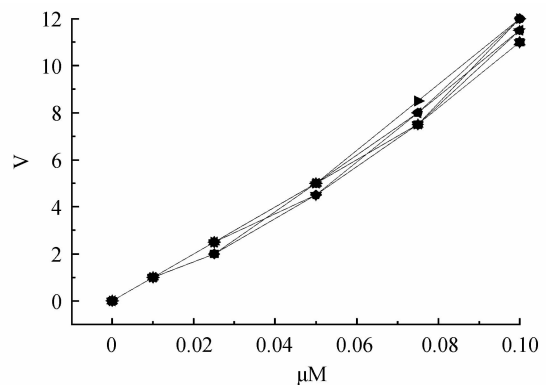


图 5 同一激发光强度、不同试剂浓度产生的荧光信号强度
Fig. 5 Fluorescence intensities of different reagents' concentrations at the same excitation intensity

出的荧光平均强度为 12 V,试剂浓度增大 10 倍,荧光信号强度增大 12 倍. 荧光信号强度与荧光物质的浓度基本呈线性关系($R^2=0.9991$),证明了荧光试剂在较低浓度下,符合式(3) $I_F \approx \Phi_F I_0 \epsilon c L = Kc$,荧光强度与荧光物质的浓度呈正比关系.

从图 5 中可以看出,随着试剂浓度增加,荧光强度有偏离中心值的趋势,其原因与图 4 中当激发光强度为 0.75 mW 时,荧光强度信号出现一定的离散性时一样,是滚环扩增终产物自身特性造成的. 对此现象,仪器最终显示结果将通过软件加以修正.

3.3 最低可测试剂体积

试剂体积(即反应体系^[17])是指引物、模板、酶等所有参与扩增反应物质的总体积. 试剂体积越小,检测的成本越小.

为求出本仪器最低可测试剂体积,采用激发光强度分别为 0.75 mW,试剂浓度为 0.01 μmol ,试剂体积分别为 5、7.5、10、15、20 μL . 实验重复 5 次,分别记录每次的荧光信号强度. 从表 2 中可以看出,试剂体积为 5 μL 时,荧光信号为 0 V;试剂体积为 7.5 μL 时,仪器可以测出荧光信号;但是此时荧光信号波动较大,试剂体积为 10 μL 时,荧光信号平均为 5.3 V;测试结果比较稳定,故本仪器最低可测试剂体积为 10 μL .

表 2 不同试剂体积荧光强度

Volume/ μL	1/V	2/V	3/V	4/V	5/V
5	0	0	0	1	0
7.5	3	1	1	1	2
10	5	5	6	5.5	5
15	9.5	9	9	10	8
20	12	11	12	12.5	12

3.4 最低测量浓度

系统检测能力反映所设计的仪器是否满足设计要求,是仪器的重要指标. 将 0.01 μmol 的试剂通过分光光度计测试核酸含量为 0.35 $\text{ng}/\mu\text{L}$,根据反应体系实际计算,按照滚环扩增方式,本仪器理论可检测出的最低检出限为 7 个拷贝,满足设计要求.

使用实时荧光定量 RCR 检测 MicroRNA,耗时久操作复杂,检测一次需要 100 min 以上,而 MicroRNA 快速检测仪仅需约 30 min,极大地缩短了检测时间,同时兼具操作简单体积小便于携带等优点,利于现场进行快速检测.

4 结论

本文通过光电检测的方法结合等温滚环扩增技术从而有效地实现了在室温下对 MicroRNA 的快速检测,实验结果证明,针对 MicroRNA 快速检测仪设计的极弱光探测系统,能够快速地检测滚环扩增后的样本中的 MicroRNA 浓度. 此仪器可广泛应用于检测疾病的特异性 MicroRNA 谱,如冠心病、肿瘤等,对疾病的超早期筛查与预警具有重要的意义. 而且本方法没有实时荧光定量 PCR 中的升温 and 降温过程,具有扩增效率高、体积小、操作简便等优点. 适用于各大中小型企业及家用,具有较好的应用前景. 为床边检测与家庭检测产品的设计研发提供了技术基础.

参考文献

- [1] FRIEDMAN R C, FARH K K, BURGE C B, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Research*, 2009, **19**: 92-105.
- [2] GRIFFITHS JONES S. miRBase: microRNA sequences and annotation[M]. *Current protocols in bioinformatics*, 2010, Chapter 12:Unit 12.9 11-10.
- [3] KOZOMARA A, GRIFFITHS JONES S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**: D152-157.
- [4] CISELL K A, DEO S K. Trends in microRNA detection[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **394**: 1109-1116.
- [5] CHEN Cai-fu, DANA AR, ADAM J, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(20): e179.
- [6] YAN Nai-hong, LU Yi-lu, SUN Hua-qin, *et al.* A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues [J].

- Reproduction*, 2007, **134**(1): 73-79.
- [7] ZHAO Bin, SONG Jirui, GUAN Yi-fu. Discriminative identification of MicroRNA let-7family members with high specificity and sensitivity using rolling circle amplification[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, **47**(2): 130-136.
- [8] GILAD S, MEIRI E, YOGEV Y, *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers[J]. *PloS One*, 2008, **3**: 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] DEMIDOV V V. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity[J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2002, **2**(6): 542-548.
- [11] ZENG Hua-jin, LI Meng-ting, LI Qing, *et al.* Mechanism of interaction between Levofloxacin and pepsin by spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2016, **37**(4): 481-486.
曾华金,李梦婷,李晴,等. 光谱法结合分子模拟技术研究左氧氟沙星与胃蛋白酶的相互作用[J]. 发光学报, 2016, **37**(4): 481-486.
- [12] NIU Jin, WANG Jin-song, AN Zhi-yong, *et al.* Optical system design of the optical multi-function detector. [J]. *Acta Photonica Sinica*. 2013, **42**(12): 1507-1513.
牛津,王劲松,安志勇,等. 光电多功能检测仪光学系统设计[J]. 光子学报, 2013, **42**(12): 1507-1513.
- [13] YIN Fang-fang, ZHU Wei-ju, FANG Min, *et al.* Visual recognition for Hg²⁺ and Ag²⁺ of carbazole-thiourea schiff base fluorescence probe[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2015, **36**(10): 1137-1144.
殷芳芳,朱维菊,方敏,等. 咪唑-硫脲席夫碱荧光探针对 Hg²⁺ 和 Ag²⁺ 的可见化识别[J]. 发光学报, 2015, **36**(10): 1137-1144.
- [14] LIU Hui-fang, LI Bin, HE Qi-xin, *et al.* Development of a digital orthogonal lock-in amplifier and its application in methane detection[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2016, **45**(4): 0423004.
刘慧芳,李彬,何启欣,等. 数字正交锁相放大器的研制及其在甲烷检测中的应用[J]. 光子学报, 2016, **45**(4): 0423004.
- [15] MO Xiang-xia, WEN Zhi-yu, ZHANG Zhi-hai, *et al.* Design and experiment of digital micro-mirror spectrometer optical system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(9): 1356-1360.
莫祥霞,温志渝,张智海,等. 数字微镜近红外光谱仪光学系统设计与实验[J]. 光子学报, 2011, **40**(9): 1356-1360.
- [16] WU Hui-Chung, JEAN S, DAVID J, *et al.* DNA sequencing using rolling circle amplification and precision glass syringes in a high-throughput liquid handling system[J]. *BioTechniques*, 2003, **34**(1): 204-207.
- [17] ZHAO Guo-jie, HU Tian-yu, Li Jun, *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.