

基于银染增强的纳米金探针定量检测 microRNA*

何文蕾 杨文杰 李媛媛 徐顺清**

(华中科技大学同济医学院环境与健康教育部重点实验室, 环境医学研究所, 武汉 430030)

摘要 MicroRNA 是一类存在于动植物体内的重要的、序列高度同源的基因表达转录后调节因子, 近来对 microRNA 不同表达模式和调节作用的研究要求能够快速、灵敏、特异地检测痕量 microRNA 的方法. 利用纳米金银染增强技术建立了一种简单快速的 microRNA 定量方法, 以纳米金标记的寡核苷酸分子作为信号探针, 以生物素标记寡核苷酸分子作为捕获探针, 经链霉亲和素-生物素作用将靶序列捕获在固相载体酶标孔上, 继而通过纳米金催化的银染增强放大效应产生高灵敏的识别信号, 记录其吸光度值从而实现 microRNA 分子的定量. 用该方法检测小鼠肝脏、脑组织中 miR-122a 和 miR-128 各自的含量及合成 miR-122a, 结果表明其在良好的线性范围(10 pmol/L~10 fmol/L)内最低检测限为 10 fmol/L, 能够特异地区别单核苷酸错配的靶 microRNA.

关键词 microRNA, 纳米金, 银染增强, 定量

学科分类号 Q52

成熟 microRNA(miRNAs)是一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性、小非编码 RNA, 其广泛存在于真核生物中^[1]. miRNAs 因其强大的基因表达调控作用而备受关注, 现已证实 miRNAs 能够促进靶 mRNA 的降解和通过与靶 mRNA 形成复合二聚体抑制相应蛋白质的翻译. 近年研究发现, miRNAs 在动植物生长发育、细胞代谢、分化、凋亡和肿瘤发生等一系列细胞生物学行为中发挥着重要的调节作用^[2~5]. 大量证据表明, miRNAs 在人类正常细胞的恶变过程中起着举足轻重的作用, 是基因表达级联反应的触发器, 引导转录后基因沉默(PTGS)调节肿瘤发生^[6]. 为了更深入地研究 miRNAs 的功能, 我们需要能够快速、灵敏、特异地检测出 miRNAs 在不同组织、不同器官、不同发育阶段的表达状况. 最重要的是, 现已认为 miRNAs 表达水平的改变与多种疾病相关, 如帕金森综合症、神经退行性病变^[7]、精神分裂症^[8]和肿瘤发生^[9], 其意味着 miRNAs 将有巨大的潜力成为诊断标志物和癌症治疗的靶向.

因为 miRNAs 在不同物种和组织中表达水平差异很大, 所以要求能准确定量相应组织器官中 miRNAs 的方法, 同时 miRNAs 序列很短且序列同

源, 给发展超灵敏度的检测方法提出了挑战. Northern blot 是国际上公认的 miRNAs 检测的“金标准”方法, 也发展了很多衍生方法, 但是用这类方法检测必须事先准备大量的总 RNA 样本, 且过程冗长, 技术相对复杂, 对检测人员专业程度要求相对较高, 所以可能限制其应用. 基于此, 发展研究了许多不同的检测方法, 如 cDNA 阵列^[10~12], 信号扩增核酶^[13], 修饰侵入阵列^[14,15]. 一些基于实时 PCR 的衍生方法与此同时也建立起来, 以改进 miRNAs 检测的灵敏度, 如引物延伸^[15]、茎环 RT-PCR^[16]、多通路 RT-PCR^[17]等. 但是这些方法的一个共同特征是它们都要求高级的信号检测系统, 在普通实验室不易开展, 且其特异性水平并不是每次都那么理想. 最近发展了一种新奇的检测方法叫基于闭锁探针的滚环扩增, 其不需要特殊仪器, 且能从纳克级的总组织 RNA 中定量靶 miRNAs, 但

* 国家自然科学基金资助项目(20677018).

** 通讯联系人.

Tel: 027-83693417, E-mail: shunqing@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-31, 接受日期: 2008-06-03

是, 该方法需要放射性同位素标记且不能定量植物 RNA. 在此, 我们建立了一种以核酸碱基配对识别互补结合为基础, 经银染增强的纳米金标记探针的 miRNAs 检测方法, 该方法简单易行, 无需放射性标记、荧光等昂贵设备就可获得高灵敏度, 高特异度的检测信号, 为 miRNAs 的研究开辟了新途径.

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

15 nm 纳米金(Sino-American Biotechnology Co (SABC)); MicroRNA122a(miR-122a), 巯基修饰探针和生物素修饰探针 (Invitrogen Biotechnical, Shanghai); 链霉亲和素 (Aode Biotechnology Company); 酶标板 (Corning Star) (Genetimes Technology, Inc.); 硝酸银, 氢醌, 柠檬酸, 柠檬酸三钠(上海生工生物工程有限公司); TRIzol 试剂 (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA.); 焦碳酸二乙酯 (DEPC), 氯仿, 异丙醇, 75%乙醇(DEPC H₂O 配制)(天津科密欧化学试剂有限公司).

miR-122a: 5' UGGAGUGUGACAAUGGUGUU-UGU 3', miR-128: 5' UCACAGUGAACCGGUCU-CUUUU 3'. Seq1: 5' bio-A₁₀ACAAACACCAT 3' (miR-122a 的捕获探针), Seq2: 5' TGTCACACTCCA-(CH₂)₆-SH3' (miR-122a 的信号探针), Seq3: 5' bio-A₁₀ACAATCACCAT 3' (miR-122a 的捕获探针(单碱基错配)), Seq4: 5' TGTCTCACTCCA-(CH₂)₆-SH3' (miR-122a 的信号探针(单碱基错配)), Seq5: 5' bio-A₁₀AAAAGAGACCG 3' (miR-128 的捕获探针), Seq6: 5' GTTCACTGTGA-(CH₂)₆-SH 3' (miR-128 的信号探针). 所有的寡核苷酸溶解于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4).

1.2 总 RNA 的提取

使用 TRIzol 试剂, 遵照提取步骤从小鼠肝和脑组织提取, 用 TE 缓冲液(pH 7.4)序列稀释总 RNA 浓度为 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L 和 1 mg/L 以备用.

1.3 纳米金探针银染增强检测 miRNA

1.3.1 纳米金标记核酸探针的制备. a. 纳米金溶液 500 μ l, 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 20 min, 弃上清; b. 加巯基标记序列(Seq2)100 μ mol/L, 3 μ l 和 47 μ l TE 缓冲液, 混匀成 50 μ l 体系. 4 $^{\circ}$ C, 12 h; c. 加等体积 (50 μ l) 0.2 mol/L NaCl, 20 mmol/L PB (20 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 缓冲液, pH 7.0), 使

其终浓度为 0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L PB, 迅速混匀, 4 $^{\circ}$ C, 24 h; d. 取上清, 4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加 100 μ l 超纯水重悬后再次离心, 弃上清, 以去除多余的未标记上的单链寡核苷酸; e. 加 100 μ l 0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L PB (pH7.0)混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 储存备用.

1.3.2 酶标板包被亲和素. a. 链霉亲和素用碳酸盐包被液按 1:100 稀释, 每孔包被 100 μ l, 潮湿环境下 4 $^{\circ}$ C 过夜(碳酸盐包被液 Na₂CO₃, 0.16 g, NaHCO₃ 0.29 g, 100 ml H₂O, pH 9.6); b. 1 $\times$ PBS (pH 7.4, 加 0.05% Tween 20), 洗涤 3 次, 拍干.

1.3.3 杂交. 杂交缓冲液终浓度 0.3 mol/L NaCl, 0.01% SDS, 10 mmol/L PB(pH7.0), 靶 miRNAs 浓度低的情况下可适当增加 NaCl 浓度. a. 杂交缓冲液 20 μ l, 生物素标记 DNA (Seq1)10 nmol/L, 10 μ l, 不同浓度的靶核苷酸 miR-122a 各 10 μ l, 混匀, 25 $^{\circ}$ C, 10 min; b. 加纳米金标记 DNA 5 μ l, 混匀, 25 $^{\circ}$ C, 10 min; c. 将该 45 μ l 体系杂交产物转移到各酶标板孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 倾倒在干净; d. 1 $\times$ PBS 洗涤 1 次, 拍干, 2 $\times$ PBN(0.3 mol/L NaNO₃ 和 10 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 缓冲液, pH 7.0)洗涤 2 次, 拍干.

1.3.4 银增强显色. 取 12 μ l 银增强液 (0.5 g 溶于 2 ml H₂O 中), 300 μ l 氢醌 (1.7 g 氢醌溶于 30 ml H₂O 中), 100 μ l 柠檬酸盐液(2.55 g 柠檬酸 -2.35 g 柠檬酸三钠溶于 10 ml H₂O 中), 氢醌和柠檬酸盐溶液需现用现配, 确保无结晶析出且无色, 氢醌和柠檬酸混和液应在银染前 30 min 左右保持 37 $^{\circ}$ C 温育, 银染用时再加 12 μ l AgNO₃ 迅速混匀立即分加入酶标板孔内, 每孔 100 μ l, 放在可调温振荡器里充分反应. 反应出现灰度信号后置入超纯水中终止反应, 拍干. 银染增强反应最好在避光或弱光下反应, 以减少银自身成核反应^[18~20].

1.3.5 酶标仪检测 630 nm 处吸光度值. 将银染增强液终止反应后的酶标板置入酶标仪中, 在 630 nm 波长处单波长扫描, 通过酶标仪实时检测溶液的 A 值.

1.4 Stem-loop RT-PCR 方法定量 miRNAs

miR-122a 和 miR-128 的 cDNA 使用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (part:4366596; Applied Biosystem Inc.)合成, 然后使用 TaqMan miRNA Assay Kit(part:4373151; Applied Biosystem Inc.)根据生产商指南在 Applied Biosystem 7900HT 检测系统上定量 miRNAs.

2 结 果

2.1 检测原理

本研究原理如下：烷硫基修饰的 DNA 探针在一定的条件下能够吸附结合固定在纳米金颗粒的表面，形成纳米金探针。在一定的盐离子浓度和温度条件下孵育一定时间后，纳米金标记的信号探针，生物素标记的捕获探针和互补的靶 miRNAs 之间杂交形成一个一端标记纳米金颗粒，一端标记有生物

素的杂交双链。随后转移该杂交产物于链霉亲和素包被的酶标板中，37℃ 孵育 30 min 后，杂交产物通过链霉亲和素 - 生物素特异识别系统固定于酶标板上。经 PBS, PBN 溶液洗涤，去除酶标板中游离的纳米金探针，随后经银染增强显色反应放大纳米金信号。酶标仪在 630 nm 波长处记录银染增强液的 A 值，通过对靶 miRNAs 浓度和相应的 A 值的分析，绘制出 miRNAs 的浓度与银染增强液 A 值之间的剂量 - 效应关系曲线(图 1)。

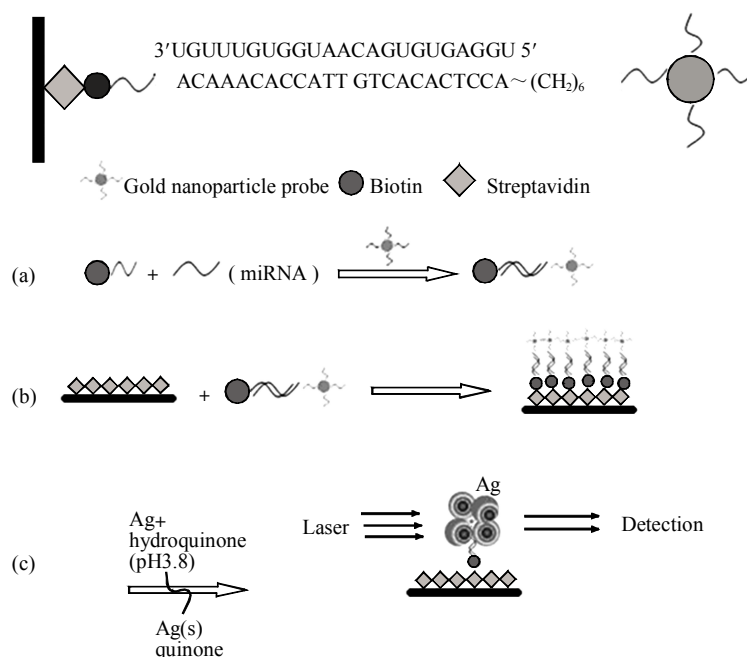


Fig. 1 Schematic drawing of quantification of miRNAs by functionalized gold nanoparticle

Firstly, biotinylated probe(capture probe) and gold nanoparticle probe were hybridized to the target RNA successively(a), then the hybridization products were immobilized onto the surface of streptavidin-coated microplate(b), after a sufficient rinse of the microplate, gray scale of silver reduction catalyzed by gold nanoparticle was recorded with colorimetric absorbance by a microplate reader(c).

2.2 检测小鼠肝脏和脑组织中 miR-122a 和 miR-128

miR-122a 和 miR-128 在小鼠不同组织的表达情况很多文献已报道，我们分别检测了从小鼠肝脏和脑组织抽提的总 RNA 中 miR-122a 和 miR-128 各自的含量，每个浓度的样本设置 3 个平行孔且每个样本浓度检测 3 次，以 TE 缓冲液为阴性对照，结果表明，miR-122a 仅仅只在小鼠肝脏表达而 miR-128 也仅仅在脑总 RNA 中检测出来，这与文献报道结果一致。另外，仅需要 2 ng 的组织总 RNA 就可对靶 miRNAs 进行检测(图 2)。

2.3 检测合成 miRNAs

将合成 miRNAs 序列稀释成不同的浓度(从 1 nmol/L 到 1 fmol/L)，用前述方法进行检测。如图 3 结果表明：检测 miR-122a 的最低检测限是 10 fmol/L，在靶核酸浓度范围(10 pmol/L ~ 10 fmol/L)内，靶 miRNAs 的浓度对数值与 A 值之间具有很好的线性关系，经线性回归分析得出 $r^2=0.9906$ 。以靶 miRNAs 浓度(mol/L)的对数值作为自变量， A 值作为因变量，用直线回归方法对以上浓度 - 效应关系曲线拟合方程得： $y=0.0619x+0.9092$ ， y ：溶液的 A 值， x ：目的序列浓度的对数值。

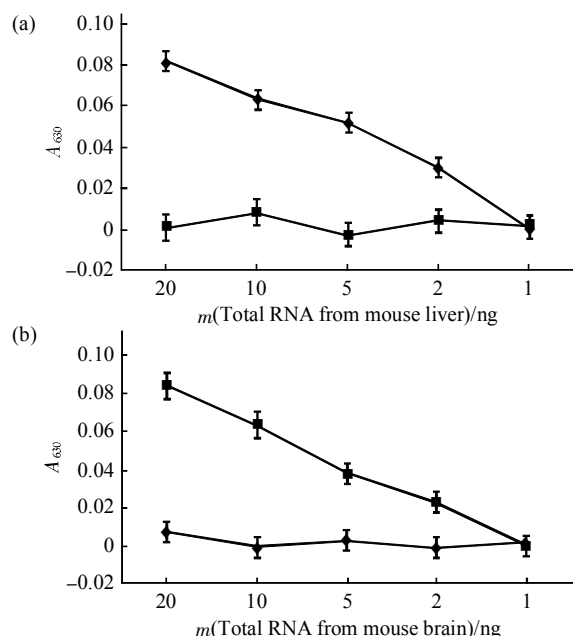


Fig. 2 Detection of miR-122a and miR-128 in total RNA extracted from mouse liver and brain tissue

The absorbance of miRNAs is the result that the primary absorbance at 630 nm subtract the mean that of control. The error bars mean $\pm$ standard deviation. (a) Only miR-122a was detectable in mouse liver and 2 ng total RNA is enough for detection. (b) Only miR-128 was detectable in mouse brain, the detection limit for total RNA is 2 ng. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: miR-122a; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: miR-128.

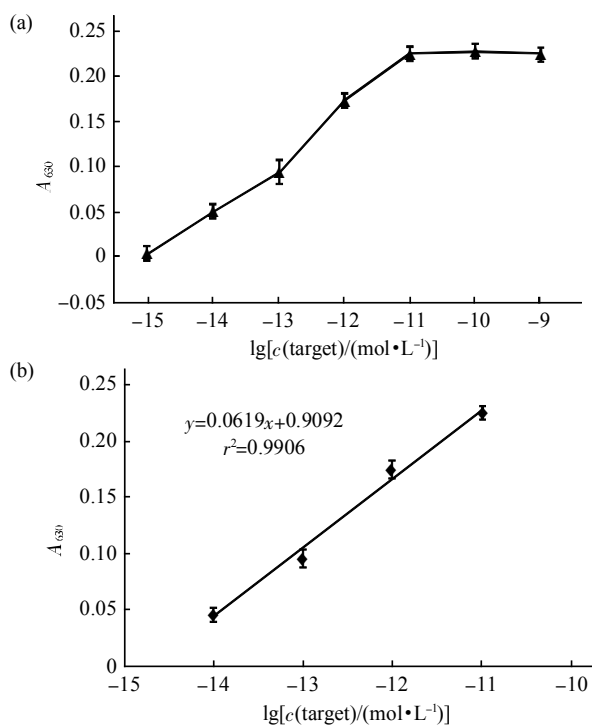


Fig. 3 Quantification of miR-122a

The absorbance of miRNAs is the result that the primary absorbance at 630 nm subtract the mean that of control. The error bars mean $\pm$ standard deviation. (a) The silver enhance time was 150 s and the concentrations of target RNA varied from 1 fmol/L to 1 nmol/L. Values represent the means of triplicate independent determinations. (b) Shows the linear range from 10 fmol/L to 10 pmol/L.

3.4 方法的特异性

为了证明本方法的特异性, 我们使用 4 种不同探针联合检测 miR-122a, 如: seq1, seq2, seq3, seq4. Seq1 是带生物素标记的捕获探针, 能和 miR-122a 互补结合, seq2 是纳米金标记的信号探针, 也能特异地和 miR-122a 互补结合, 而 seq3 和 seq4 分别是除一个核苷酸错配外的序列与 seq1 和 seq2 相同的生物素和纳米金探针. 低至 10 fmol/L 浓度水平, 用本方法能够检测出单核苷酸错配序列间的差异(图 4). 值得指出的是, 发生在纳米金探针上的错配比发生在生物素上的错配更加敏感, 目前还不能明确地解释该现象存在的原因, 还需要进一步深入研究.

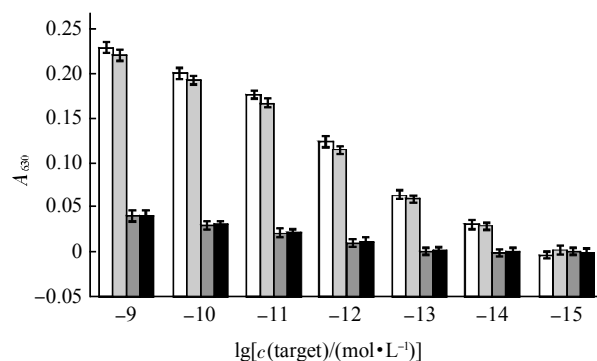


Fig. 4 Detection of miR-122a with two sets of probes

miR-122a of various concentrations ranged from 1 fmol/L to 1 nmol/L was detected with 4 sets of probes, i. e. seq1 + seq2 (both were complete complementary probes); seq2 + seq3 (seq3 labeled with biotin has one single nucleotide mismatch to miR122a); seq1 + seq4 (seq4 labeled with gold nanoparticle has one single nucleotide mismatch to miR122a); seq3 + seq4 (both have one single nucleotide mismatch to miR122a). The absorbance of miRNAs is the result that the primary absorbance at 630 nm subtract the mean that of control. The error bars mean $\pm$ standard deviation. $\square$: seq1 + seq2; $\square$: seq2 + seq3; $\blacksquare$: seq1 + seq4; $\blacksquare$: seq1 + seq4.

2.5 茎环 RT-PCR 法检测 miRNAs

我们以 ABI 公司的茎环 RT-PCR 法作为一个独立的实验来检测同一个样本 miRNAs, 和我们的方法进行比较. 将小鼠肝脏总 RNA 从 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 序列稀释到 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 检测 miR-122a, 同样每个相同的样本重复 3 次, 设置 3 个平行孔, 结果如图 5 所示, 以 630 nm 处纳米金方法的吸光度为 x 轴, 以茎环 RT-PCR 方法的 Ct 值为 y 轴, 做相关分析, 两种方法间可以观察到可接受的线性相关关系($r^2 = 0.9249$).

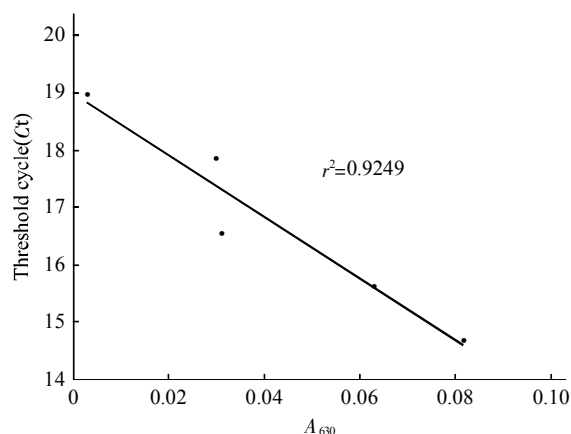


Fig. 5 Comparison of nanoparticle probes to TaqMan miRNA assays

Total RNAs over 6 orders of magnitude from mouse liver were used.

2.6 银染增强的时间效应

在 miRNAs 的检测过程中, 我们观察到, 随着反应时间的推进, 银染增强液的颜色由无色开始不断地加深(图 6)。在这个过程中, 纳米金颗粒起到了很重要的催化作用。靶核酸的浓度越高, 相应的纳米金颗粒的量也就越多。在相同的反应时间点, 银染增强液颜色变化得更加明显, 而在阴性对照中, 即没有纳米金颗粒的反应孔中, 银染增强液的颜色无明显变化。

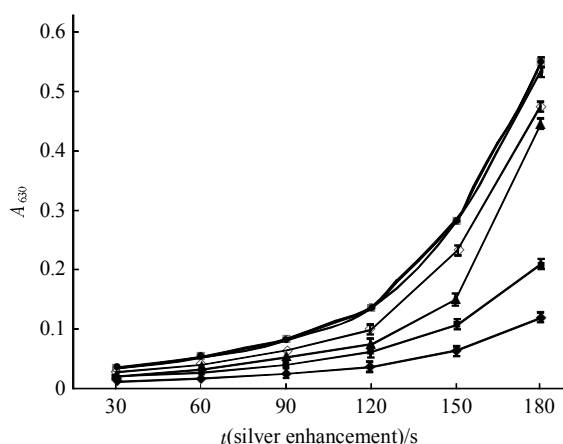


Fig. 6 Detection of miR-122a with two sets of probes

miR-122a of various concentrations ranged from 1 fmol/L to 1 nmol/L was detected with 4 sets of probes, i. e. seq1+seq2 (both were complete complementary probes); seq2+seq3 (seq3 labeled with biotin has one single nucleotide mismatch to miR122a); seq1+seq4 (seq4 labeled with gold nanoparticle has one single nucleotide mismatch to miR122a); seq3+seq4 (both have one single nucleotide mismatch to miR122a). The absorbance of miRNAs is the result that the primary absorbance at 630 nm subtract the mean that of control. The error bars mean $\pm$ standard deviation. $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: 1 fmol/L; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: 10 fmol/L; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: 100 fmol/L; $\diamond$ — $\diamond$: 1 pmol/L; $\circ$ — $\circ$: 10 pmol/L; $\square$ — $\square$: 100 pmol/L; $\bullet$ — $\bullet$: 1 nmol/L;

3 讨 论

过去的十几年, 人们对使用纳米材料来检测金属离子、DNA、蛋白质标志物的兴趣激增, Mirkin 等也建立了多种基于纳米材料的靶核酸检测方法^[21~24], 在灵敏度, 特异性和可操作性上体现了明显的优势, 但是, 还没有将纳米金标记探针技术应用于 miRNAs 检测的报道。本研究中, 我们建立了一种新的基于银染增强纳米金探针的 miRNAs 检测方法, 其最低检测限是 10 fmol/L 合成 miRNAs 和 2 ng 组织总 RNA, 是一种简单, 快速, 灵敏, 特异, 低成本的 miRNAs 定量分析方法。

在体内有着许多序列同源的 miRNAs, 它们高度相似可能仅仅一个碱基的差别而功能差别却很大, 所以要求 miRNAs 的定量方法特异性好, 能够准确地地区别出各条序列间的差异。使用各带有一个错配碱基的纳米金探针和生物素探针检测 miR-122a, 结果显示, 我们的方法能够区别出序列间的差异, 这对特定的 miRNAs 的表达精确定量非常重要。但是, 我们发现错配发生在生物素探针上时, 不能明显地区别出差异, 尽管现在还不能给一个明确的解释, 但是通过两条探针的特异识别仍然能保证我们方法的特异性。另外, 对每一个特定的 miRNAs, 我们建议杂交温度也随 miRNAs 序列的变化而设置一个最佳温度, 这样能提高反应的特异性。

本方法是以链霉亲和素为固相支持载体, 以生物素标记探针为固相支持末端, 纳米金探针和生物素标记探针分别杂交结合在靶 miRNAs 的两端, 此杂交复合体通过生物素和链霉亲和素的特异性结合使得纳米金信号锚定在酶标板上, 在杂交过程中生物素标记探针和纳米金探针均是过量的, 以保证不丢失信号。在研究中发现, 带负电荷的纳米金颗粒与亲和素在中性缓冲液里能够发生非特异性结合导致其检测灵敏度降低, 所以我们用链霉亲和素代替亲和素且调整 pH 值来降低背景信号。另外, 链霉亲和素-生物素系统的反应时间不宜过长, 一般在 25 min 左右, 反应时间过长, 也会产生纳米金探针和链霉亲和素间的非特异性吸附, 同时, 潮湿环境中有利于链霉亲和素-生物素间的特异识别。

银染增强显色处理是放大信号的关键一步, 反应对离子浓度、时间以及温度都非常敏感。在进行银染增强之前, 必须用 1×PBS 和 2×PBN 先洗涤, 这样可以洗涤掉游离的纳米金探针, 同时去除环境

中的其他离子(特别是氯离子, 将会和银离子反应生成氯化银沉淀). 在银染增强显色的过程中, 由于银离子容易在强光下自身成核, 因此, 银染增强显色的过程尽量避免日光直射, 最好能在暗室、弱光或者红光下进行操作. 同时, 银染增强的时间不宜过长, 显色时的环境温度宜控制在 25℃ 左右.

本研究用巯基修饰的核酸探针标记纳米金颗粒作为信号探针, 代替传统的放射性同位素和荧光标记, 纳米金颗粒作为信号锚定在酶标板上, 通过银染增强使检测信号放大, 肉眼就能初步鉴别检测结果. 本检测方法因其简单、快速、灵敏度高、特异性好和可操作性强, 仅需设计与靶 **miRNAs** 对应的互补探针就能实现靶 **miRNAs** 的检测, 另外, 对高浓度的样本来说, 只需适当地稀释样本至合适范围就可实现靶核酸的检测. 因此可望能够推广应用于各类 **miRNAs** 的检测.

参 考 文 献

- Ambros V. **microRNAs**: tiny regulators with great potential. *Cell*, 2001, **107**(7): 823~826
- Bagnyukova T V, Pogribny I P, Chekhun V F. **MicroRNAs** in normal and cancer cells: a new class of gene expression regulators. *Exp Oncol*, 2006, **28**(4): 263~269
- Miska E A. How **microRNAs** control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, **15**(5): 563~568
- O'Driscoll L. The emerging world of **microRNAs**. *Anticancer Res*, 2006, **26**(6B): 4271~4278
- Xu P, Guo M, Hay B A. **MicroRNAs** and the regulation of cell death. *Trends Genet*, 2004, **20**(12): 617~624
- Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, *et al.* **MicroRNAs** in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci*, 2007, **120** (Pt 11): 1833~1840
- Hebert S S, De Strooper B. Molecular biology. **miRNAs** in neurodegeneration. *Science*, 2007, **317**(5842): 1179~1180
- Burmistrova O A, Goltsov A Y, Abramova L I, *et al.* **MicroRNA** in schizophrenia: genetic and expression analysis of **miR-130b** (22q11). *Biochemistry (Mosc)*, 2007, **72**(5): 578~582
- Calin G A, Croce C M. **MicroRNA** signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(11): 857~866
- Babak T, Zhang W, Morris Q, *et al.* Probing **microRNAs** with microarrays: tissue specificity and functional inference. *Rna*, 2004, **10**(11): 1813~1819
- 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
- Sun Y, Koo S, White N, *et al.* Development of a micro-array to detect human and mouse **microRNAs** and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(22): e188
- Hartig J S, Grune I, Najafi-Shoushtari S H, *et al.* Sequence-specific detection of **microRNAs** by signal-amplifying ribozymes. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(3): 722~723
- Allawi H T, Dahlberg J E, Olson S, *et al.* Quantitation of **microRNAs** using a modified Invader assay. *Rna*, 2004, **10**(7): 1153~1161
- Raymond C K, Roberts B S, Garrett-Engle P, *et al.* Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of **microRNAs** and short-interfering RNAs. *Rna*, 2005, **11**(11): 1737~1744
- Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al.* Real-time quantification of **microRNAs** by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (20): e179
- Lao K, Xu N L, Yeung V, *et al.* Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple **miRNA** species in small samples. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **343**(1): 85~89
- Wang Y F, Pang D W, Zhang Z L, *et al.* Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *J Med Virol*, 2003, **70**(2): 205~211
- Chandler J. Extra sensitivity in rapid tests with silver enhancement of gold signals. *Med Device Technol*, 2001, **12**(7): 16~18
- Gualtieri R, Andreuccetti P. Silver enhancement of colloidal gold particles in deplasticized semithin epoxy sections. *Biotech Histochem*, 1995, **70**(1): 7~11
- Fang S, Lee H J, Wark A W, *et al.* Attomole microarray detection of **microRNAs** by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc*, 2006, **128** (43): 14044~14046
- Nam J M, Stoeva S I, Mirkin C A. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(19): 5932~5933
- Sander M, Trump B F, Harris C C. The Twenty-First aspen cancer conference: mechanisms of toxicity, carcinogenesis, cancer prevention, and cancer therapy, 2006. *Mol Carcinog*, 2007, **46**(6): 415~435
- Hill H D, Mirkin C A. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nat Protoc*, 2006, **1**(1): 324~336

Quantification of MicroRNA by Gold Nanoparticle Probes Based Silver Enhancement*

HE Wen-Lei, YANG Wen-Jie, LI Yuan-Yuan, XU Shun-Qing**

(MOE Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract MicroRNAs are a class of important post-transcriptional regulators of gene expression in animals and plants. The intensive studies on differential expression and regulatory roles of microRNAs call for sensitive and specific method to detect trace amount of these small size, high sequence homological microRNAs. Here, a simple and reliable method for the quantification of microRNAs was presented. The hybridization products of target microRNAs with biotin-labeled capture probe and oligonucleotides-functioned gold nanoparticles probe were immobilized onto the surface of streptavidin-coated microplate, and the absorbance signals of gold nanoparticles were amplified by silver enhancement. Distribution of miR-122a/miR-128 in mouse brain and liver tissue were detected by this method, and then synthetic miRNA122a was quantified. Results show a lower detect limit of 10 fmol/L with a linear dynamic range from 10 pmol/L to 10 fmol/L and a high specificity to discriminate one single oligonucleotide mismatch of the target microRNAs.

Key words microRNA, gold nanoparticles, silver enhancement, quantification

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(20677018).

**Corresponding author.

Tel: 86-27-83693417, E-mail: shunqing@mails.tjmu.edu.cn

Received: March 31, 2008 Accepted: June 3, 2008