

· 前沿与进展 ·

ADVANCES IN
PHARMACEUTICAL SCIENCES

mRNA 检测技术研究进展

高芙涵, 宋贞, 王怀松*, 丁娅**

(中国药科大学药学院药物分析系, 江苏 南京 210009)

[摘要] mRNA 是直接指导蛋白质生物合成的模板, 参与基因表达中的信息传递过程。许多研究发现, mRNA 可作为肿瘤标志物和癌症治疗的新靶点。因此, 开发简单快速、高特异性、高灵敏度的 mRNA 检测方法对癌症早期诊断和生物医学研究具有重要的意义。综述了 mRNA 的检测技术的原理和研究进展, 并对 mRNA 检测技术面临的挑战和发展趋势进行了展望。

[关键词] mRNA; 体外分析; 生物标记物; 成像技术

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2022) 11-0848-10

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2022.11.006

Research Progress in mRNA Detection Techniques

GAO Fuhan, SONG Zhen, WANG Huaisong, DING Ya

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] mRNA is a type of template that directly guides protein biosynthesis and is involved in the process of information transmission in gene expression. Many studies have found that mRNA can be used as tumor markers and new targets for cancer therapy. Therefore, it is of great significance to develop simple, rapid, highly specific and sensitive mRNA detection methods for early cancer diagnosis and biomedical research. In this article, the principle and research progress of mRNA detection techniques were reviewed, and the challenges and development trends of mRNA detection techniques were prospected.

[Key words] mRNA; *in vitro* analysis; biomarker; imaging technique

mRNA 是一类携带遗传信息且能指导蛋白质合成的单链核糖核酸, 满足合成各种蛋白质的所有遗传信息的要求。自 1989 年起, 以 mRNA 作为新型治疗药物的概念兴起, 由 mRNA 编码出的抗原决定簇不仅数量众多且类型丰富^[1-3]。与 DNA 药物相比, mRNA 药物不会插入基因组之中^[2-8], 可通过正常

代谢途径分解, 安全性更高^[5-6]; mRNA 药物无需进入细胞核便可发挥其功能, 既可以通过体外转录, 也能够患者在体内合成所需的治疗性蛋白质, 设计和起效更加灵活快速, 为个性化治疗开辟了新的道路; mRNA 疫苗编码的蛋白可通过激活免疫细胞触发机体免疫反应, 可用于癌症免疫治疗、传染病疫苗或蛋白质替代等生物医学和临床医学领域^[7]。目前, 针对晚期黑色素瘤的 mRNA 疫苗 I 期临床试验已经完成^[8]。此外, 新冠肺炎 mRNA 疫苗的开发与研究也成为近期研究的热点^[2]。

除了作为疫苗抗原的表达模板外, mRNA 药物还具有多种功能。首先, mRNA 可以作为癌症治疗的生物标志物^[9]。mRNA 直接或间接地影响体内细胞变化, 发生相应的基因表达, 反映组织的病理状态。

接受日期: 2022-10-11

项目资助: 国家自然科学基金项目 (No. 31870946, No. 32271453); 中国药科大学双一流前瞻项目 (No. CPU2022QZ12)

*** 通信作者:** 王怀松, 副教授;

研究方向: 疾病标志物光学传感、生物成像和肿瘤早期诊断;

E-mail: wanghuaisong@cpu.edu.cn

**** 通信作者:** 丁娅, 教授;

研究方向: 药物分析新材料和新技术;

E-mail: dingya@cpu.edu.cn

因此通过检测细胞内 mRNA 的变化, 可以为早期疾病的检测提供线索和生理依据。其次, mRNA 动态检测可作为组织检测的有效补充, 且在无症状人群中的检测效率较高, 可以对多种疾病进行诊断和评估, 有潜力替代直接的组织取样检测^[9-10]。

在上述 mRNA 药物研究过程中, 对体内外 mRNA 水平的准确检测能反映基因的表达情况, 时

刻监测 mRNA 药物的疗效和毒性。因此快速、灵敏、特异性强的 mRNA 检测方法非常重要。常见的 mRNA 检测方法有: 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、恒温扩增技术、细胞成像技术等 (见图 1)。本文根据近期发表的主要相关文献, 总结了 mRNA 检测方法, 并评价了各类方法的优缺点。



LAMP: 环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification); HCR: 杂交链式反应 (hybridization chain reaction); RCA: 滚环扩增 (rolling cycle amplification)

图 1 mRNA 的主要检测技术

Figure 1 The main mRNA detection techniques

1 mRNA 定量检测方法

1.1 逆转录聚合酶链式反应

在 mRNA 的检测中, 最常用的是 RT-PCR 技术, 其操作简单、成本低廉、可快速、有选择性地扩增核酸, 是微量 DNA 或 mRNA 的高效检测方法, 已广泛应用于生物技术、微生物和疾病诊断等领域^[11-12]。RT-PCR 的检测原理是以 mRNA 为起始原料, 采用逆转录引物与 mRNA 进行互补杂交, 在逆转录酶的作用下生成总的 cDNA 文库。随后, 利用热稳定 DNA 聚合酶以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增 (见图 2)。在 PCR 扩增过程中, 加入 TaqMan 探针或荧光染料, 可以对产生的荧光信号强度进行实时定量检测, 结合计算机软件进行分析, 能够计算待测样品的初始浓度^[11-13]。例如, 在新冠病毒的检测中, 利用 RT-PCR 技术, 将病毒的 mRNA 进行逆转录得到 cDNA 模板, 然后通过荧光定量 PCR 仪检测出荧光强度到达预先设定阈值所经历的循环数 (Ct 值), 从而反映病毒核酸浓度^[12]。

尽管 RT-PCR 具有较高的灵敏度和特异性, 但其逆转录以及 PCR 时间较长。此外, 由于扩增

过程中引物对单碱基的区分能力不足, 不能有效分辨 mRNA 序列中的单碱基变异, 容易出现假阳性^[12-14]。

Zogchel 等^[14]将 RT-PCR 技术进行改进, 研究出一种多重实时荧光定量 PCR (RT-qPCR), 用于检测神经细胞瘤中的 mRNA。课题组使用同一内标 RNA 结合特异性引物对多种 mRNA 进行定量检测。利用这种改进的 RT-qPCR 技术可以同时检测 7 种不同的 mRNA, 从而减少样品的用量, 克服肿瘤的异质性, 提高检测的灵敏度, 在节省资源和时间的同时也有助于引入临床实践。

1.2 基于恒温扩增的检测

恒温扩增检测技术不需要快速频繁的温度变化, 具有高特异性、高灵敏度、对仪器的要求较低等特点。目前常见的基于恒温扩增的 mRNA 检测方法有 LAMP、HCR、RCA 和恒温指数扩增反应等。

LAMP 相较于 PCR 具有更高的扩增速率, 可在恒温下进行, 不需要热循环仪。LAMP 反应可分为 2 个阶段: 非循环扩增和循环扩增。其原理较为复杂, 基于靶基因的 3' 和 5' 端设计了 3 对特异性

引物, 包括一对外引物 (上游外引物 F3 和下游外引物 B3)、一对环状引物 (上游环引物和下游环引物) 和一对内引物 (上游内引物 FIP 和下游内引物 BIP), 3 种特异性引物在具有高度链置换活性的 DNA (BstDNA) 聚合酶的作用下, 合成 DNA 并不断自我循环^[15]。在 mRNA 的检测中, 使用逆转录酶合成与靶 mRNA 互补的 cDNA, 并通过自退火在

其两端形成哑铃结构。非循环扩增阶段, 哑铃状的茎环结构作为模板, 以 F3 和 B3 为引物进行延伸扩增, 形成单茎环结构。在 BstDNA 聚合酶的作用下, 单茎环结构与内引物结合转换成具有茎环结构的 DNA, 从而启动 LAMP 反应的第 2 阶段——循环扩增阶段。循环扩增阶段由环引物引导, 经过多次循环扩增最终形成长度不一的茎环状 DNA^[16-17]。

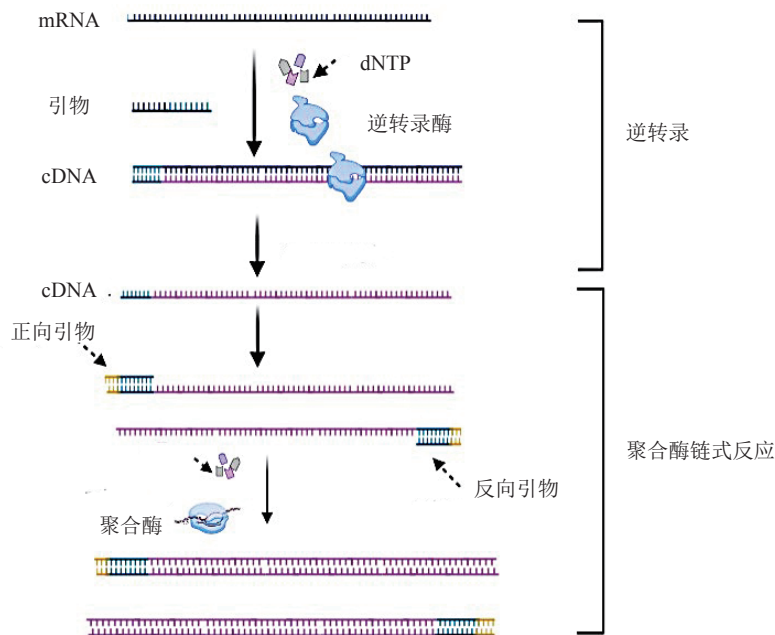


图 2 RT-PCR 扩增 mRNA 的示意图

Figure 2 Schematic diagram of mRNA amplification by RT-PCR

LAMP 技术反应时间短, 操作简单, Meng 等^[15]开发了一种新的单细胞逆转录环介导等温扩增 (single-cell reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification, scRT-LAMP) 的工作流程 (见图 3), 将 LAMP 技术和微流体系统相结合, 确保反应物的精准添加, 在 1 h 内可以检测到数百至数千个单细胞中的靶 mRNA。

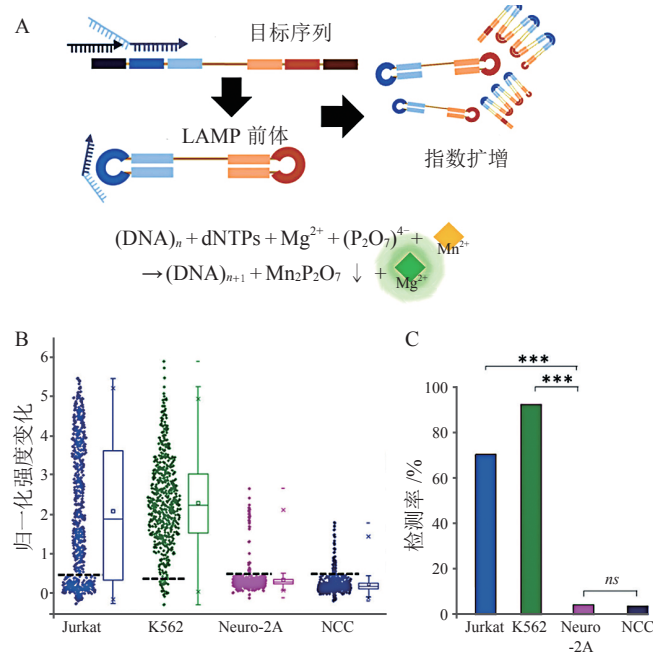
HCR 是一种基于自组装的核酸扩增方法, 不需要酶的参与, 可在温和的条件下进行快速的扩增和检测^[18-20]。其原理如下: 根据靶标 mRNA 设计 2 个自催化的 DNA 发夹探针 H1 和 H2。H1 和 H2 发夹结构中的黏性末端分别与对方的环互补, 并且两者的茎序列一致。由于茎的结构较长, 在没有靶标 mRNA 时, 发夹结构中黏性末端的序列较短, 不足以打开发夹; 而在靶 mRNA 存在的条件下, mRNA

与 H1 的 1-2 部分结合, 打开 H1 的发夹结构, H1 结构暴露出 3-2' 部分与 H2 的 3'-2' 部分结合, 使 H2 的发夹结构打开。H2 发夹结构打开暴露出 1'-2' 部分, 与 mRNA 的序列相同, 从而不断地与 H1、H2 结合形成一条长缺口的双链 DNA (见图 4)^[19]。通过设计具有不同荧光标记的正交发夹放大器, 可同时检测不同的 mRNA^[20]。HCR 相较于其他几种恒温扩增反应而言更为简单和快速, 不需要逆转录酶的参与, 降低了实验成本。

RCA 广泛地应用于 DNA、RNA 与蛋白质的检测。该技术可实现局部等温扩增, 能够原位检测靶分子, 提供靶分子定位的相关信息, 具有细胞水平原位检测 mRNA 的优势, 可作为单分子荧光原位杂交的替代检测技术^[21]。其原理为: 以环状 DNA 作为聚合模板, 设计与之互补的短 DNA 或 RNA 引物,

将引物与环形模板探针杂交, 在无 5'→3' 端外切酶活性的聚合酶的作用下扩增延伸。由于使用的是此种聚合酶, 引物会沿着环形模板一直延伸, 而先前

生成的序列会被替换下来, 最终生成一条长的重复序列 (见图 5) [21-23]。



A: RT-LAMP 反应原理; B: 用 Jurkat 细胞、K562 细胞、Neuro-2A 细胞和无细胞对照 (NCC) 获得的 scRT-LAMP 结果的箱线图, 每个点代表每个单个细胞的 LAMP 信号倍数变化, 因此代表每个细胞的羟甲基胆素合酶 mRNA 的相对表达水平; C: scRT-LAMP 实验 4 种细胞中羟甲基胆素合酶 mRNA 的检测率

图 3 RT-LAMP 的反应原理及不同细胞中羟甲基胆素合酶 mRNA 的检测 [15]

Figure 3 The reaction principle of RT-LAMP and the detection of hydroxymethylcholine synthase mRNA in different cells

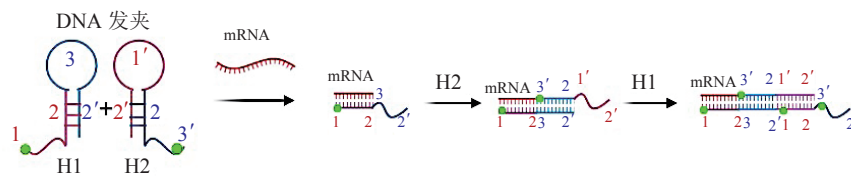


图 4 杂交链式反应检测 mRNA 的原理 [19]

Figure 4 Principle of hybridization chain reaction for mRNA detection

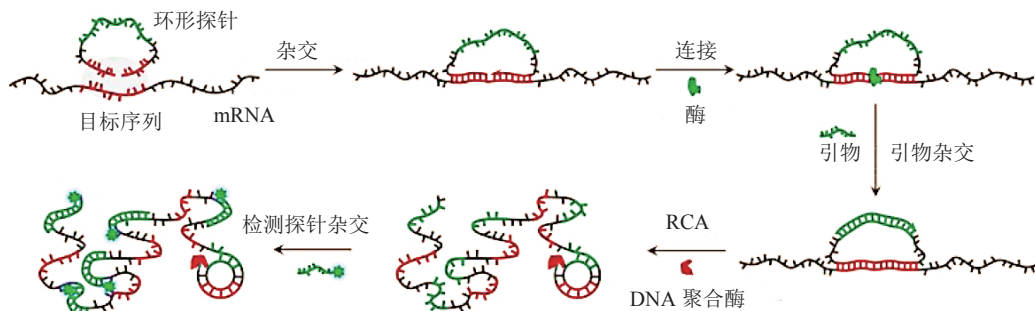


图 5 RCA 检测 mRNA 的原理图 [21]

Figure 5 Principle of RCA for mRNA detection

然而, RCA 的特异性和检测效率并不理想。为此, 研究人员将 RCA 与纳米材料进行结合来提高反应的灵敏度。Liu 等^[24] 引入苯胺修饰的金纳米颗粒 (Au-TPP) 和“C”形靶向特异性寡核苷酸探针, 由于 Au-TPP 的光热效应, 当探针、功能化的金纳米粒子与相同的靶 mRNA 结合时会启动光热介导的 RCA, 形成环状结构并进行滚环扩增, 从而可以获得更可靠、更具体的 mRNA 表达信息, 并且此过程无需逆转录酶, 提高了 RCA 的特异性, 可以更容易应用到常规的病理诊断中。

1.3 Northern 印迹杂交

Northern 印迹杂交是在 Southern 印迹杂交的基础上建立的, 其特点是简单易行, 不需要复杂的仪器设备。该方法通过放射性的 P³² 标记的 RNA 与寡核苷酸探针杂交, 检测固定在尼龙膜上的 RNA 分子,

也可用来检测参与真核细胞基因转录的 RNA 的数量和大小。根据 RNA 样本的大小, 将总 RNA 经过变性凝胶电泳进行分离, 分离后通过毛细管转移技术、真空印迹技术、TurboBlotter 系统的重力转移技术、电印迹技术等将其转移到尼龙膜、硝酸纤维素薄膜或聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。再经紫外照射, 将分离的 RNA 固定到膜上, 然后用预杂交液将滤膜上的非特异核酸结合位点阻塞, 最后利用 DNA 探针进行选择性的杂交并利用化学发光技术定量检测 (见图 6)^[25]。Northern 印迹杂交与其他方法相比, 缺乏扩增步骤, 是一种半定量的检测方法, 在检测操作过程中需要注意酶污染和 mRNA 的降解问题, 而且灵敏度有限, 操作较为繁琐, 费时费力。

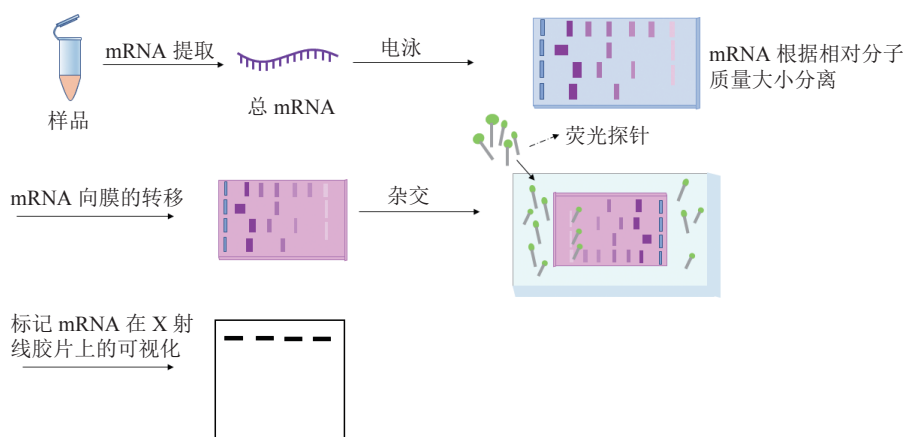


图 6 Northern 印迹杂交检测 mRNA 的原理

Figure 6 Principle of Northern blot hybridization for mRNA detection

1.4 纳米通道传感检测

基于纳米通道的新型生物传感器平台具有高度的特异性和灵敏度。阵列纳米通道结构的多孔阳极氧化铝膜具有良好的稳定性, 常用于构建纳米通道生物传感器。通过将多孔阳极氧化铝膜与电化学方法相结合, 可建立纳米流体平台, 用于 DNA 和胰岛素的无标记检测, 相比于单个纳米通道灵敏度可提高多个数量级。Zhao 等^[26] 通过纳米通道-离子通道杂交体固定探针识别靶 miRNA。该工作将探针 (ssDNA) 通过化学偶联的方法固定在离子通道的外表面, 再与多孔阳极氧化铝膜表面修饰的 3-氨丙

基三甲氧基硅烷 (APTMS) 进行化学偶联。当靶标 miRNA 存在时, 探针能特异性识别靶标, 与其杂交形成双链。随后, 纳米通道-离子通道杂交体的质量传输性质会随着外表面的电荷密度及有效离子通道尺寸的变化而发生相应的变化, 可通过化学电池实时检测 (见图 7)。

2 mRNA 细胞成像技术

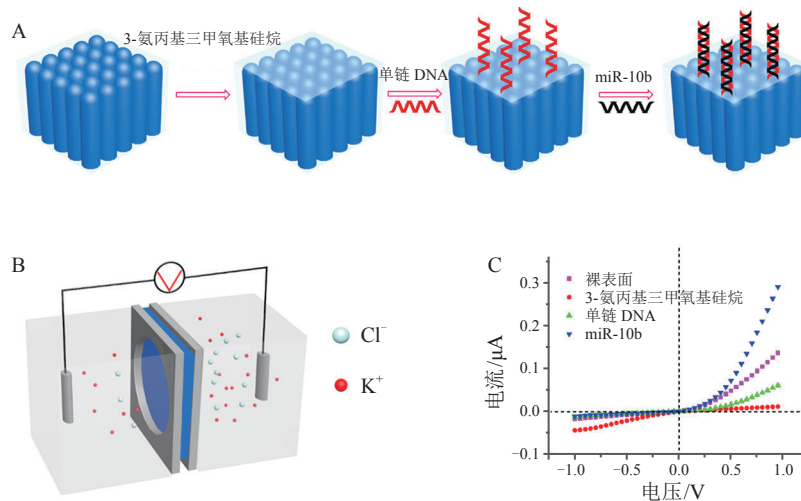
2.1 纳米探针

纳米探针和成像技术的发展为动态观察 mRNA 活性奠定了基础, 可用于准确描述基因调控机制,

高分辨追踪单个 mRNA 并呈现 mRNA 的动态调控过程, 更好地探索活细胞 mRNA 动态特征及其对翻译过程所产生的影响。

纳米探针作为细胞内成像的一种有力工具, 包括金纳米簇、银纳米簇 (AgNC)、量子点、金纳米颗粒 (AuNP) 等。其中, AuNP 具有各向异性 and 表面等离子共振光学特性, 吸收高、散射面积大,

并且具有良好的生物相容性和化学稳定性, 被广泛地应用于生物成像领域。例如, AuNP 可被一层致密的高度定向的核酸功能化, 与被标记的寡核苷酸链杂交形成纳米耀斑。当荧光基团靠近 AuNP 表面时荧光被淬灭, 不需要转染剂的参与即可被摄取入胞, 可用于检测细胞内的 mRNA。



A: 基于纳米通道-离子通道杂合体表面修饰的 miRNA 检测原理; B: 化学电池示意图; C: 不同条件下纳米通道-离子通道杂合体的伏安特性

图 7 纳米通道-离子通道杂合体的表面修饰及修饰产物在 miRNA 检测中的应用^[26]

Figure 7 Surface modification of nanochannel-ion channel hybrids and application of the modified product in miRNA detection

Lin 等^[27]设计了一个由 AuNP 和光响应 DNA 发夹探针组成的新型纳米耀斑。在没有紫外线照射的情况下, DNA 发夹可以保持不被唤醒并且对靶探针无反应; 在紫外线照射激活后, 发夹结构被破坏并暴露出充当调节链置换反应立足点的黏性末端, 使耀斑从 AuNP 表面释放, 引起荧光信号增加。这种光活化的纳米耀斑具有高度的时间可控性, 可以在单细胞水平上检测到 mRNA。并且, 这种方法也可以感知癌细胞中 mRNA 表达水平的变化。

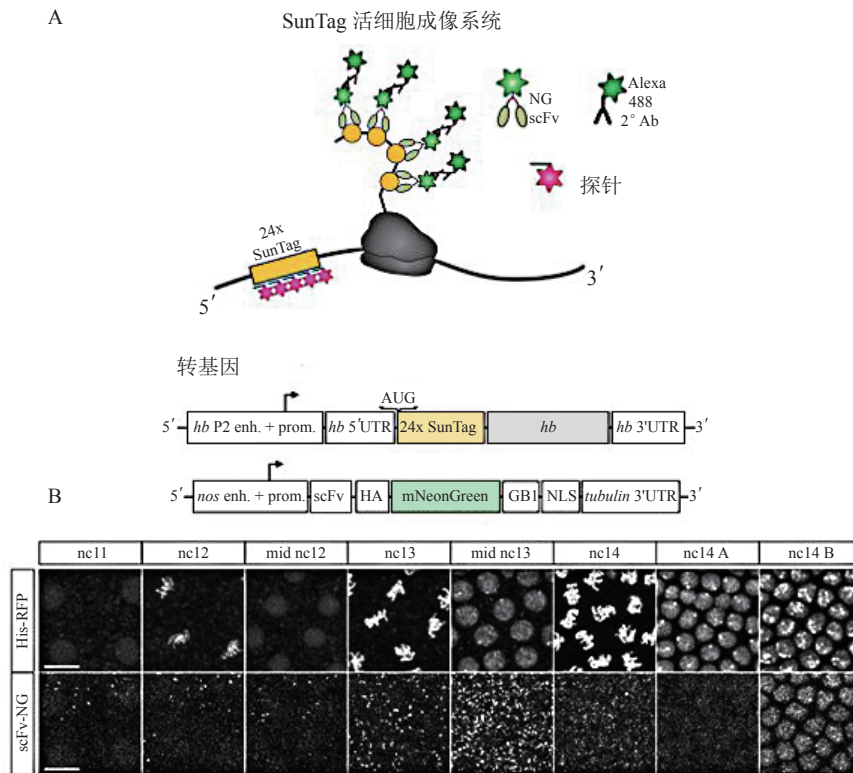
此外, 基于 AgNC 斯托克斯位移大、生物相容性好、粒径小、易于和生物分子偶联的特性, Tang 等^[28]建立了一种无酶且无标记的基于 DNA 发夹和 AgNC 组装的荧光检测方法。研究人员使用了 2 个发夹探针, 尾部分别包含 DNA 稳定的银纳米簇捕获序列和富鸟嘌呤序列。当靶 mRNA 存在时, 发夹探针会触发催化发夹组装 (catalytic hairpin

assembly, CHA) 循环反应, 并捕获生成的暗色组装产物。AgNC 与富含鸟嘌呤的序列紧密连接后, 暗色组装物转变为明亮的红色荧光, 从而点亮 CHA 组装物。这种新型的荧光金属纳米材料具有广泛的应用潜力, 且催化发夹的组装物不使用外源酶, 操作经济、简单、灵敏度高, 具有良好的选择性。

2.2 SunTag 系统

SunTag 系统是一种在活细胞中进行的单分子成像技术, 用于单个 mRNA 分子实时动态翻译过程的成像^[29-30]。其原理为将含有 dCas9 蛋白片段的靶向基因与串联重复的绿色荧光蛋白基因融合表达, 以提高荧光信号强度。通过识别包含 Vp64 的多肽和超折叠 GFP 蛋白的单抗片段 scFV, 以实现单个 mRNA 进行荧光标记。Vinter 等^[30]采用 SunTag 系统, 研究了果蝇胚胎 mRNA 在固定胚胎和活体胚胎中的翻译动态, 揭示了果蝇胚胎 mRNA 翻译在早期胚胎

中的时间规律 (见图 8)。基于抗体的 SunTag 系统具有非常高的亲和力和识别短肽的能力, 但抗体在细胞质中的表达能力不强, 且成像技术还需要不断改进。



A: SunTag 法检测果蝇胚胎 mRNA 翻译示意图; B: 使用 SunTag 系统的实时成像揭示 SunTag mRNA 的全局翻译动态。nc11、nc12、mid nc12、nc13、mid nc13、nc14、nc14A、nc14B 表示果蝇胚胎的不同时期, scFv-NG 与 His-RFP 分别代表用绿色荧光蛋白融合的单链抗体和红色荧光载体质粒进行细胞标记。

图 8 SunTag 法在果蝇胚胎 mRNA 检测中的应用^[30]

Figure 8 Application of SunTag method in detection of mRNA in drosophila embryos

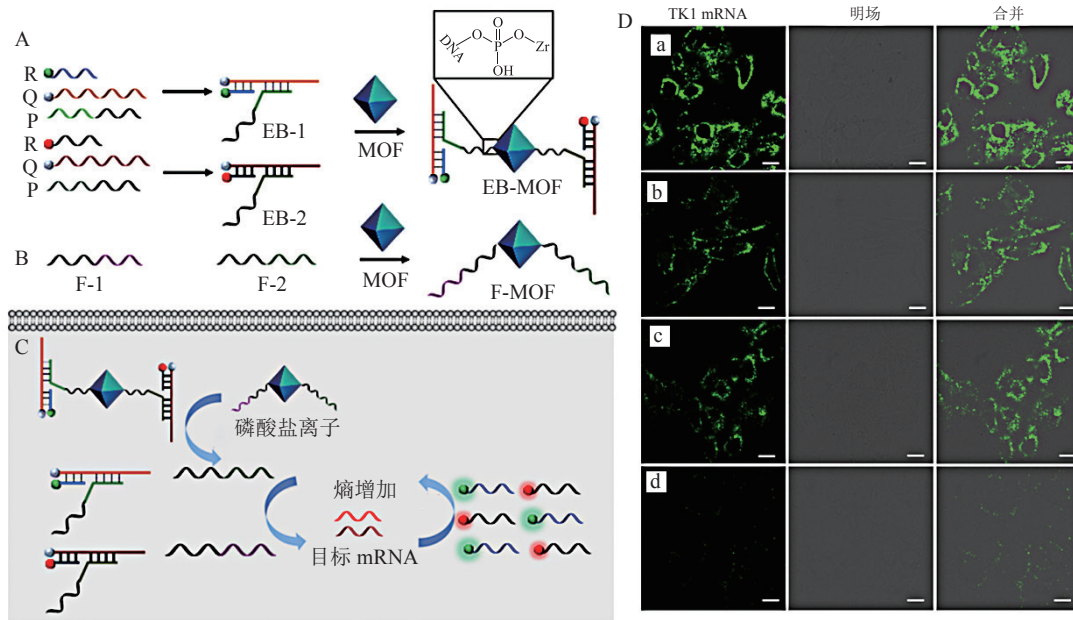
2.3 原位杂交技术

DNA 放大器是一种可响应分子或环境信号执行相应功能的 DNA 组装体, 其生物相容性良好、细胞摄取量高且具有信号放大的能力。因而, 该类成像技术可用来检测低丰度的生物标志物 (如 mRNA)^[31-33]。

Meng 等^[33]将金属有机框架 (metal-organic framework, MOF) 与熵驱动 DNA 放大器结合, 形成一种纳米传感器, 可响应细胞中的磷酸并释放出 DNA 放大器。如图 9 所示, 5' 端携带荧光基团的 R 链与 3' 端被淬灭剂修饰的 Q 链以及用以连接 MOF 结构的 P 链组合成 EB 结构。在该系统中 DNA 分子与 MOF 结构以共价键相连接, 在靶 mRNA 存在时, 能够通过响应细胞内无机磷酸盐释放 DNA 链, 触发链置换反应, 从而产生一种强烈

的荧光。该方法提高了检测的灵敏度和特异性, 可同时检测 1 个以上的 mRNA 目标, 适用于早期癌症检测和生物过程的基因成像^[33]。

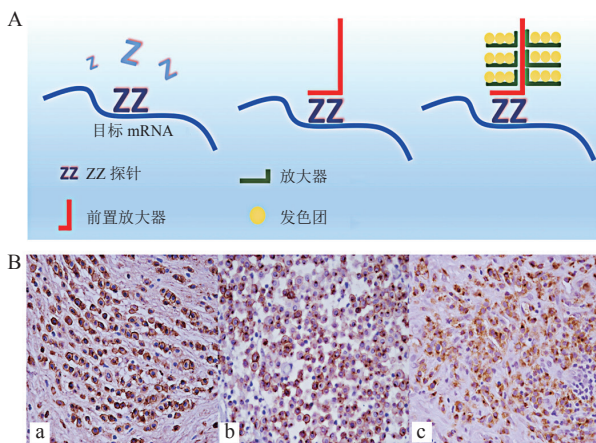
RNAscope 是一项用于检测细胞中 mRNA 的原位杂交技术。该方法允许在各种样品类型中可视化观察单一细胞中的单个 mRNA。在肿瘤细胞中 mRNA 转录效率较低且非功能性的 RNA 转录物会影响检测的结果。RNAscope 技术能够放大特异性信号而不放大噪音信号。其原理如图 10 所示, 基于碱基互补配对原则, 利用一个 Z 型探针结合目标 RNA 序列, 2 个相邻的探针上的特异性酶与前置放大器及显色剂结合, 从而原位显示 mRNA 的表达部位和相对丰度。同时, 结合非特异性位点的单个探针不会产生完整的信号, 且会在杂交过程中被洗脱, 从而保证了高度的特异性^[34]。



A: EB-MOF 的组装; B: F-MOF 的形成; C: 活细胞 mRNA 多重成像中的 DNA 放大器-MOF; D: 经过不同处理的活 HepG2 细胞中胸苷激酶 1 (TK1) mRNA 检测荧光图像, 其中 a 为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 放大器-MOF; b 为三苯氧胺 + $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 放大器-MOF; c 为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 非放大型 DNA 分子信标-MOF; d 为三苯氧胺 + $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 非放大型 DNA 分子信标-MOF。明场: 显微镜下空白细胞图像; 合并: 将明场和荧光成像叠加。

图 9 DNA-MOF 扩增器的组装及其在 mRNA 检测中的应用^[33]

Figure 9 Assembly of DNA-MOF amplifier and its application in mRNA detection



A: RNAscope 对 mRNA 的分析过程; B: KIT 免疫组织蛋白在细胞中 3 种定位方式的染色结果, 其中 a 为 KIT 蛋白分散在细胞膜上, b 为 KIT 蛋白进入细胞后分散在细胞核旁, c 为 KIT 蛋白均匀分散在细胞质中。

图 10 RNAscope 在肿瘤细胞 mRNA 检测中的应用^[34]

Figure 10 Application of RNAscope in detection of mRNA in tumor cells

单个 RNA 分子荧光原位杂交 (single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization, smFISH) 是单细胞 mRNA 空间定位的强有力的工具。其精确

测量基因表达的能力可以用来研究基因调控在各种生理过程中的作用, 例如细胞迁移和极化。smFISH 利用多个荧光标记的 DNA 探针, 同时杂交到长的靶向 mRNA 片段上, 可获得增强的荧光信号。Wadsworth 等^[35]介绍了一种新的单探针荧光原位杂交法, 将单个酵母细胞中的 mRNA 与 Cy5 或 Cy3 染料标记的单个探针进行杂交, 使用甲醇固定细胞后, 以倾斜的激光进行照射来增加从单个探针捕获荧光所需的信噪比, 从而检测单一细胞中的单个 mRNA 分子, 这种方法显著提高了探针的特异性和检测信号强度。

在新冠病毒的检测中, 原位杂交技术也提供了一种快速检测的思路。Wang 等^[36]基于杂交捕获荧光免疫测定 (hybrid capture fluorescence immunoassay, HC-FIA) 技术, 将杂交和免疫荧光分析结合, 开发出了一种新型无需扩增的 SARS-CoV-2 核酸检测平台, 能够在 1 h 内完成对 SARS-CoV-2 的检测。首先, 在反应管中, 优化的 DNA 探针与 SARS-CoV-2 病毒基因组保守的开放阅读框 1ab (ORF1ab)、包

膜蛋白(E)和核衣壳(N)区域结合,形成DNA-RNA复合物,进而被荧光纳米颗粒标记的S9.6抗体捕获;然后,在免疫荧光分析阶段,将S9.6抗体以及抗兔IgG抗体分别喷涂在试纸条的测试线(T)和对照线(C)上,将反应液滴在样品垫上,在毛细管张力的作用下,复合物到达T区,被S9.6抗体捕获,逐渐产生荧光信号。在C区,荧光纳米粒子(fluorescent nanoparticles, FNP)标记的兔IgG被抗兔IgG捕获,也产生荧光;最后,使用荧光阅读器读取T/C荧光值来进行定量分析。相比当前常用的qPCR技术,这种新型技术的检测限能达到每毫升500拷贝,且已被开发成用于诊断SARS-CoV-2的检测试剂盒。

3 结语与展望

mRNA在基因调控和遗传信息的表达方面起着重要的作用。一方面,基于中心法则,mRNA将细胞核内DNA的遗传信息按照碱基互补配对原则抄录并传送到细胞质的核糖体中,是蛋白质合成的模板,决定着蛋白质合成的氨基酸排列顺序。另一方面,mRNA是细胞动态遗传表达变化的理想指标,可作为生物标志物应用于疾病的诊断、检测和治疗。因此研究mRNA生物标志物检测方法具有重大意义。

本文对常见的几种mRNA的分析方法进行了综述,主要包括各种核酸扩增技术、mRNA成像技术、印迹杂交技术和原位杂交成像技术等。核酸扩增技术如RT-PCR、RCA等线性范围宽,灵敏度极高,为RNA生物标志物的简便、高灵敏度体外检测提供了新的平台;基因测序等高通量的分析方法适合于大量样本的快速检测,但同时也会提高实验的成本;mRNA分子成像技术主要指荧光成像,步骤简单、快速且不需要昂贵的仪器,能够实时高分辨地追踪mRNA的动态过程。

尽管目前已开发出很多mRNA的检测方法,但是针对提高检测方法的适用性、特异性以及灵敏度等问题还有待进一步探索。1)虽然核酸扩增技术灵敏度高,但其特异性还有待进一步提高。而且,核酸扩增技术对引物的设计要求较高,引物二聚体等因素会对检测结果造成影响。2)mRNA具有不稳定性、易降解,在检测过程中需要严格控制温度和pH条件并保持无核酸酶的环境。3)常见的mRNA检测方法大多需要专业的设备仪器,因此低成本的即时化检测试剂盒和设备开发还面临挑战。4)应更加关注mRNA的动力学特征以及翻译模板与翻译产物之间相互联系的机制,深入探究活细胞mRNA的动态特征及其对翻译的影响。

【参考文献】

- [1] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead K A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 817-838.
- [2] Kwon S, Kwon M, Im S, et al. mRNA vaccines: the most recent clinical applications of synthetic mRNA[J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45: 245-262.
- [3] Xu S, Yang K, Li R, et al. mRNA vaccine Era-mechanisms, drug platform and clinical prospection[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6582. DOI: 10.3390/ijms21186582.
- [4] Servick K. mRNA's next challenge: will it work as a drug?[J]. *Science*, 2020, 370(6523): 1388-1389.
- [5] Weng Y H, Li C H, Yang T R, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape[J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
- [6] Oguz F, Atmaca H. mRNA as a therapeutics: understanding mRNA vaccines[J]. *Adv Pharm Bull*, 2022, 12(2): 274-282.
- [7] 张扬帆. mRNA 药物研究进展 [J]. *健康管理*, 2020(5): 278-279.
- [8] Duelsen M V, Rentmeister A. mRNA therapies: new hope in the fight against melanoma[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(17): 1650-1655.
- [9] 张江艳, 严景丽, 成永强. RNA 生物标志物体外检测方法研究进展 [J]. *中国科学: 化学*, 2021, 51(9): 1191-1205.
- [10] Man L A, Jib C, Xiang Z A, et al. Simultaneous detection of tumor-related mRNA and miRNA in cancer cells with magnetic SERS nanotags[J]. *Talanta*, 2021, 232: 122432. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122432.
- [11] Donovan N J, Chambers G A, Cao M. Detection of viroids by RT-PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2316: 143-151.
- [12] Teymouri M, Mollazadeh S, Mortazavi H, et al. Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19[J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 221(4): 153443. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153443.
- [13] Burchill S A, Perebolte L, Johnston C, et al. Comparison of the RNA-amplification based methods RT-PCR and NASBA for the detection of circulating tumour cells[J]. *BJC*, 2002, 86(1): 102-109.
- [14] Zogchel L, Zappeij-Kannegieter L, Javadi A, et al. Specific and sensitive detection of neuroblastoma mRNA markers by multiplex RT-qPCR[J]. *Cancers*, 2021, 13(1): 150. DOI: 10.3390/cancers13010150.
- [15] Meng T C, Kurabayashi K, Dawen C. Single-cell RT-LAMP mRNA

- detection by integrated droplet sorting and merging[J]. *Lab Chip*, 2019, 19(14): 2425–2434.
- [16] Kean H O, Mengying M L, Jia R M, *et al.* A sensitive and specific fluorescent RT-LAMP assay for SARS-CoV-2 detection in clinical samples[J]. *ACS Synthetic Biol*, 2022, 11(1): 448–463.
- [17] Rui M, Twa B, Yue Z, *et al.* Closed dumbbell mediated isothermal amplification of nucleic acids for DNA diagnostic assays[J]. *Talanta*, 2022, 240: 123217. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123217.
- [18] Zhang K, Fan Z Q, Huang Y, *et al.* Hybridization chain reaction circuit-based electrochemiluminescent biosensor for SARS-CoV-2 RdRp gene assay[J]. *Talanta*, 2022, 240: 123207. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123207.
- [19] Kim J, Ji S S, Bo H H, *et al.* Hydrogel-based hybridization chain reaction (HCR) for detection of urinary exosomal miRNAs as a diagnostic tool of prostate cancer[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113504. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113504.
- [20] Zhuang P, Zhang H, Welchko R M, *et al.* Combined microRNA and mRNA detection in mammalian retinas by in situ hybridization chain reaction[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 351. DOI: 10.1038/s41598-019-57194-0.
- [21] Deng R, Zhang K, Sun Y, *et al.* Highly specific imaging of mRNA in single cells by target RNA-initiated rolling circle amplification[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(5): 3668–3675.
- [22] Shi H X, Cui J J, Sulemana H, *et al.* Protein detection based on rolling circle amplification sensors[J]. *Luminescence*, 2021, 36(4): 842–848.
- [23] Jayeon S, Yong J, Soohyun K, *et al.* Palindromic hyperbranched rolling circle amplification enabling ultrasensitive microRNA detection[J]. *Chem Commun*, 2022, 58: 6518–6521.
- [24] Liu D D, Li W H, Yang M Z, *et al.* Photothermal mediated rolling circle amplification toward specific and direct in situ mRNA detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113507. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113507.
- [25] Green M R, Sambrook J. Analysis of RNA by Northern blotting[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2022, 2022(2): 67–74.
- [26] Zhao X P, Liu F F, Hu W C, *et al.* Biomimetic nanochannel-ionchannel hybrid for ultrasensitive and label-free detection of microRNA in cells[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(5): 3582–3589.
- [27] Lin M, Yi X, F Huang, *et al.* Photo-activated nanoflares for mRNA detection in single living cells [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(3): 2021–2027.
- [28] Tang J, Wang T, Li Q. Silver nanocluster-lightened catalytic hairpin assembly for enzyme-free and label-free mRNA detection[J]. *Microchem J*, 2021, 165: 106184. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106184.
- [29] 赵艳霞, 何丽娜, 崔亚宁, 等. mRNA 单分子动态成像技术研究进展 [J]. *电子显微学报*, 2019, 38(2): 201–207.
- [30] Vinter D J, Hoppe C, Minchington T G, *et al.* Dynamics of hunchback translation in real time and at single mRNA resolution in the drosophila embryo[J]. *Development*, 2021, 148(18): 196121. DOI: 10.1242/dev.196121.
- [31] Ma F, Wei S H, Zhang C Y. Construction of a robust entropy-driven DNA nanomachine for single-molecule detection of rare cancer cells[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(12): 7505–7509.
- [32] Wang S Z, Chen Y J, Wang S Y, *et al.* DNA-functionalized metal-organic framework nanoparticles for intracellular delivery of proteins[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(6): 2215–2219.
- [33] Meng H M, Shi X, Chen J, *et al.* DNA Amplifier-functionalized metal-organic frameworks for multiplexed detection and imaging of intracellular mRNA[J]. *ACS Sens*, 2020, 5(1): 103–109.
- [34] Biase D D, Prisco F, Piegari G, *et al.* RNAScope in situ hybridization as a novel technique for the assessment of c-KIT mRNA expression in canine mast cell tumor[J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 591961. DOI: 10.3389/fvets.2021.591961.
- [35] Wadsworth Gable M, Parikh Rasesh Y, Choy John S, *et al.* mRNA detection in budding yeast with single fluorophores[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(15): e141. DOI: 10.1093/nar/gkx568.
- [36] Wang D, He S, Wang X, *et al.* Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(12): 1150–1158.



【专家介绍】丁娅: 教授, 中国药科大学博士生导师。丁娅教授从南京大学化学化工学院获得分析化学博士学位后, 进入南京大学生命科学院进行生物学博士后研究, 随后以访问学者身份进入美国马萨诸塞大学—安默斯特分校化学系。从事药物分析新材料和新技术领域研究, 获得江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师和江苏省“333 高层次人才培养工程”培养对象的称号。丁娅教授作为教育部“新世纪优秀人才支持计划”课题负责人, 带领课题组成员主攻细胞膜工程化和金属药物框架的构建和分析方向, 获高等学校科学研究优秀成果奖自然科学奖一等奖。作为负责人主持国家自然科学基金项目 4 项、中国博士后基金 2 项、省部级基金项目 5 项。同时, 丁娅教授担任《中国药科大学学报》和《药学学报》编委、《Chinese Chemical Letters》通讯编委、《Nano Research》和《Journal of Pharmaceutical Analysis》青年编委、中国医药生物技术协会纳米生物技术分会常务委员、中国生物材料学会影像材料和技术分会委员、中国抗癌协会纳米肿瘤学专业委员会青年委员, 在药物材料和分析研究方面的国际著名学术期刊发表 SCI 论文 60 余篇, 授权专利 9 项。



【专家介绍】王怀松: 南开大学分析化学博士, 副教授, 硕士研究生导师。主要研究领域为新材料与新技术在药物分析和生命分析中的应用。现任职于中国药科大学药学院, 从事疾病标志物光学传感、生物成像和肿瘤早期诊断等方法研究。主持了国家自然科学基金、中国博士后基金、江苏省自然科学基金等多项课题。近几年, 在 *Anal Chem*、*ACS Nano*、*Coord Chem Rev*、*Nano Lett*、*J Chem Educ* 等国内外期刊发表了 50 余篇相关科研与教学论文, 专利授权 7 项。