

УДК 543.94

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ микроРНК

### Обзор

© 2022 О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров\*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: sakharovivan@gmail.com

Поступила в редакцию 21.01.2022

После доработки 21.03.2022

Принята к публикации 21.03.2022

В настоящем обзоре рассмотрены современные методы количественного и полуколичественного определения микроРНК – малых некодирующих РНК, влияющих на такие биологические процессы, как развитие, дифференциация, метаболизм и формирование иммунологического ответа и рассматриваемых в качестве перспективных биомаркёров в диагностике ряда заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биоанализ, микроРНК, нуклеиновые кислоты, амплификация, полимеразы.

**DOI:** 10.31857/S0320972522040029, **EDN:** AQFBVE

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время неуклонно возрастает необходимость в методах анализа нуклеиновых кислот [1]. Среди аналитов этой группы все более пристальное внимание обращают на себя микроРНК (миРНК), концентрация которых в биологических материалах человека при широком спектре заболеваний отличается от концен-

трации тех же миРНК у здоровых людей [2]. Известно, что концентрация миРНК в биологических образцах крайне низка, а число миРНК, чьи последовательности имеют между собою высокую гомологию, велико. Все это приводит к необходимости разработки высокочувствительных и высокоселективных методов определения миРНК [3].

В настоящем обзоре будут рассмотрены методы количественного и полуколичественного определения миРНК, среди которых будут описаны как традиционные методы, такие как нозерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и микрочипы, так и новые, разрабатываемые в последние годы методы определения с улучшенными аналитическими параметрами.

### ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ микроРНК

МиРНК представляют собой класс малых некодирующих РНК, обнаруженных в широком спектре растений, вирусов и млекопитающих [1]. Гены миРНК обычно располагаются в кластерах, которые транскрибируются как полицистроны. Кроме того, они могут быть локализованы между другими генами (межгенные) или в интронах, кодирующих мРНК (миРтронны). Первичные транскрипты миРНК, известные как при-миРНК (в основном длиной 100–1000 н.), транскрибируются РНК-полимеразами II и III в ядре клетки. Впоследствии при-

Принятые сокращения: МИА – методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот; миРНК – микроРНК; СЕАМ – циклический ферментативный метод амплификации (Cycle Enzymatic Amplification Method); СНА – метод каталитической сборки шпильки (Catalytic Hairpin Assembly); сгРНК – «направляющая» РНК; Crispr/Cas – метод коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, с ассоциированным белком (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR associated protein); ЕХРАР – экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Exponential amplification reaction); НСР – реакция цепной гибридизации (Hybridization Chain Reaction); НРСА – разветвлённый метод катящегося кольца (Hyperbranched Rolling Circle Amplification); ICSDP – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular-Strand-Displacement Polymerization); LAMP – петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal Amplification); NB – нозерн-блоттинг (Northern Blotting); PCR – полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction); RCA – метод катящегося кольца (Rolling Circle Amplification); RT-PCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (Reverse Transcriptase PCR); RT-qPCR – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (quantitative RT-PCR); SEXPAR – симметричная экспоненциальная реакция амплификации нуклеиновых кислот (Symmetrical Exponential Amplification Reaction).

\* Адресат для корреспонденции.

миРНК расщепляются РНКазой III Drosha с образованием предшественников миРНК (70–100 н.) шпилечной структуры (пре-миРНК) [4]. В настоящее время описано более 38 000 пре-миРНК из 271 организма [5]. Экспортин-5 обеспечивает транспорт пре-миРНК из ядра в цитоплазму, где под действием фермента Dicer из пре-миРНК формируются короткие зрелые миРНК. Длина зрелых миРНК составляет примерно 18–24 н. В настоящее время около 49 000 последовательностей миРНК представлены в реестре миРНК (miRBase), в том числе 2600 миРНК человека [6].

Из одной молекулы пре-миРНК могут быть получены несколько различных миРНК, при этом часть миРНК генерируются из 3'-последовательностей пре-миРНК, другие – из 5'-последовательностей [7]. Исследования секвенирования показали, что в биологических образцах зрелые миРНК представляют собой не молекулу со строго определённой последовательностью нуклеотидов, а набор гомологичных молекул различной длины. Причинами этого являются гетерогенность процессинга предшественника нуклеазами, а также посттранскрипционные модификации 3'- или 5'-концов полноразмерных миРНК. Показано, что такая модификация может оказывать влияние на стабильность и активность миРНК [8].

Уровень экспрессии зрелых миРНК представляет наибольший интерес для исследователей, изучающих их биологические функции. Первая публикация с описанием миРНК появилась в 1993 г. [9], однако по прошествии уже более 25 лет интерес к изучению роли миРНК в регуляции генов и функционировании клеточных процессов не только не угасает, а лишь постоянно возрастает. Зрелые миРНК могут регулировать экспрессию генов после их включения в активный РНК-индуцированный комплекс сайленсинга, где они взаимодействуют со специфическими сайтами матричной РНК, вызывая репрессию трансляции, а иногда и деградацию целевой мРНК [10].

Как было оценено, среднее количество копий отдельных видов миРНК на клетку равно 500, и их экспрессия может превышать среднюю экспрессию мРНК. Однако содержание различных миРНК в клетках сильно различается, и такое различие в концентрации может составлять более четырёх порядков. Так, миРНК-1 присутствует в скелетных мышцах в количестве, превышающем 80 000 копий на клетку, тогда как в одной клетке мозга находится лишь 1 копия миРНК-381 [11].

Исследования, проведённые на лабораторных организмах, показали, что миРНК участву-

ют в регуляции таких важных биологических процессов, как развитие, дифференциация, метаболизм и формирование иммунологического ответа [12–13]. Проведённые исследования позволили установить взаимосвязь между изменениями в уровне экспрессии миРНК и развитием онкологических заболеваний человека [14]. При этом было найдено, что уровень экспрессии некоторых миРНК в образцах злокачественных тканей был повышен, в то время как для других миРНК зарегистрировано подавление их экспрессии. Результирующий эффект зависел от типа и стадии заболевания. Изменение концентрации миРНК отмечено и в процессе лечения заболеваний. Показано, что уровни экспрессии миРНК влияют на скорость роста опухоли и помогают выбрать эффективную стратегию терапевтического лечения пациентов [15].

Кроме онкологических заболеваний высокая роль экспрессии миРНК была также отмечена при аутоиммунных [16], неврологических [17] и сердечно-сосудистых заболеваниях [18]. По этой причине в последние годы значительные усилия исследователей были направлены на разработку новых высокочувствительных и специфичных методов анализа экспрессии миРНК.

## МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ микроРНК

**Нозерн-блоттинг** (Northern blotting, NB) является хорошо стандартизированным методом детекции миРНК. В этом методе анализируемый образец миРНК подвергается электрофоретическому разделению с последующим его переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Детекция миРНК осуществляется после её реакции с комплементарными радио-/флуоресцентно-мечеными зондами [19]. NB, с помощью которого идентифицировались самые первые миРНК, применяется для профилирования экспрессии миРНК [9, 20]. К сожалению, данный метод имеет низкую чувствительность и времязатратен.

Этот факт стимулировал исследования по усовершенствованию NB [21–23]. Для этого было предложено использовать олигонуклеотидные зонды с применением запертых нуклеиновых кислот (LNA) [22], а также заменить УФ-фиксацию зондов на нитроцеллюлозной мембране на их химическую иммобилизацию с помощью 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)-карбодиимида [23]. Более того, использовалась хемилюминесцентная детекция продуктов гибридизации с применением щелочной фосфатазы вместо детекции радиоизотопа  $P^{32}$  [24].

Kim et al. [25] объединили в одной методике все вышеобозначенные подходы, что позволило им с помощью NB проводить определение миРНК с пределом обнаружения 1 пМ, т.е. понизить предел обнаружения на 3 порядка. Кроме того, эти изменения позволили сократить время анализа NB.

Несмотря на сделанные улучшения, в сравнении с другими методами NB остаётся методом с низкой чувствительностью (в нано/пиколярном диапазоне) [26]. Кроме того, к недостаткам NB также следует отнести сложность его исполнения, низкую производительность и требование значительного количества исходного образца (5–50 мкг РНК) [25].

**Микрочипы.** Технология микрочипов основывается на регистрации взаимодействия анализируемых миРНК со специфичными зондами, зонально иммобилизованными на чипе. С использованием такой технологии, позволяющей в одном образце одновременно проводить детекцию большого числа различных аналитов, были определены миРНК в биологических жидкостях (цельной крови, плазме, сыворотке, моче и слезах), гомогенатах ткани и экзосомах, а также проведена оценка изменения уровня их экспрессии на разных стадиях развития онкологических заболеваний различного типа [27–29]. Следует отметить, что метод является полуколичественным и применим лишь для регистрации изменений в уровне экспрессии миРНК. Методы на основе микрочипов характеризуются узкими рабочими диапазонами по сравнению с другими методами, в связи с чем существенные отклонения в уровне экспрессии при исследовании данным методом могут оставаться незарегистрированными [30]. Кроме того, в классических вариантах метод характеризуется низкой чувствительностью и специфичностью.

При использовании микрочипов осуществляется ферментативное удлинение последовательности выделенных миРНК, за счёт чего они приобретают способность прочно взаимодействовать с комплементарным ДНК линкером, иммобилизованным на чипе [2]. Методы такого типа характеризуются пределом обнаружения в нано/пиколярном диапазоне, и для проведения такого анализа требуется от десятков до сотен нг РНК. Дополнительное затруднение связано с различной специфичностью полиаденилаз к различным анализируемым миРНК, что понижает точность такого мультиплексного анализа [30].

Альтернативный вариант конструирования микрочипов основан на постгибризационном введении аналитической метки в образуемый дуплекс аналита и зонда. В этом случае T4-лига-

за формирует новую ковалентную связь между сближенными друг с другом концами иммобилизованного на чипе зонда и детектирующего зонда с флуоресцентной меткой. Сближение указанных последовательностей происходит при формировании специфического сэндвич-комплекса с участием миРНК. Такой метод показал высокую чувствительность с пределом обнаружения миРНК-143, равным 30 фМ [31].

Для повышения селективности метода в отношении пре- и при-миРНК используются иммобилизованные зонды шпильчатой структуры [32]. Следует отметить, что селективность относительно прекурсов миРНК может быть значимой лишь при прямом проведении определения миРНК в образцах. Выделение же на предварительном этапе анализа фракции коротких РНК из исследуемых образцов позволяет избежать влияния пре- и при-миРНК на получаемые результаты.

Чувствительность микрочипов для детекции миРНК повышается при использовании в качестве захватывающих зондов LNA-олигонуклеотидов [33]. Чувствительность анализа также может быть повышена добавлением в схему анализа стадии амплификации, например полимеразной цепной реакции [30].

Модификация конструкции микрочипов дополнительно повышает стоимость и без того дорогостоящего метода анализа. Хотя такой подход приводит к улучшению чувствительности и специфичности анализа, все же проблема узких рабочих диапазонов микрочипов остаётся пока неразрешённой. Несмотря на указанные недостатки, микрочипы остаются очень востребованными при проведении профилирования миРНК, так как позволяют проводить одновременно скрининг большого числа разных миРНК [34].

Кроме указанных выше гибридных методов, в литературе описаны также и другие безамплификационные методы анализа миРНК [35–40]. В первую очередь здесь следует упомянуть многочисленные разработки электрохимических биосенсоров. В таких сенсорах детекция комплексов анализируемой миРНК с комплементарным ей зондом может проводиться как с использованием зондов с ковалентно связанными электроактивными метками, так и зондов, меченных ферментами или интеркалирующими метками. Большинство электрохимических биосенсоров без проведения амплификации сигнала демонстрируют пределы обнаружения миРНК в нано/пиколярном диапазоне и выше [35–37].

Описаны также оптические безамплификационные биосенсоры. Среди них благодаря

простоте и скорости проведения вызывают интерес гомогенные методы с применением пероксидаза-подобных ДНКзимов [38]. Наибольшая чувствительность безамплификационных биосенсоров обнаружена при использовании детектирующей системы на основе поверхностного плазмонного резонанса. Пределы обнаружения таких биосенсоров достигают пикомолярных значений [39]. Более того, в некоторых случаях удалось развить методы анализа с пределами обнаружения в фемто- и субфемтомолярных диапазонах [40]. К недостаткам такого метода следует отнести его высокую стоимость, а также сложность приготовления сенсорной подложки.

Как указано выше, концентрация миРНК в биологических объектах достаточно низкая, поэтому невысокая чувствительность безамплификационных методов затрудняет их применение для определения миРНК в реальных образцах. В тех же случаях, когда удаётся получить высокую чувствительность, протоколы таких методов становятся чрезвычайно сложными, что, в свою очередь, приводит к резкому повышению стоимости анализа. В связи с этим в большинстве случаев гибридные методы определения миРНК дополняются методами амплификации нуклеиновых кислот.

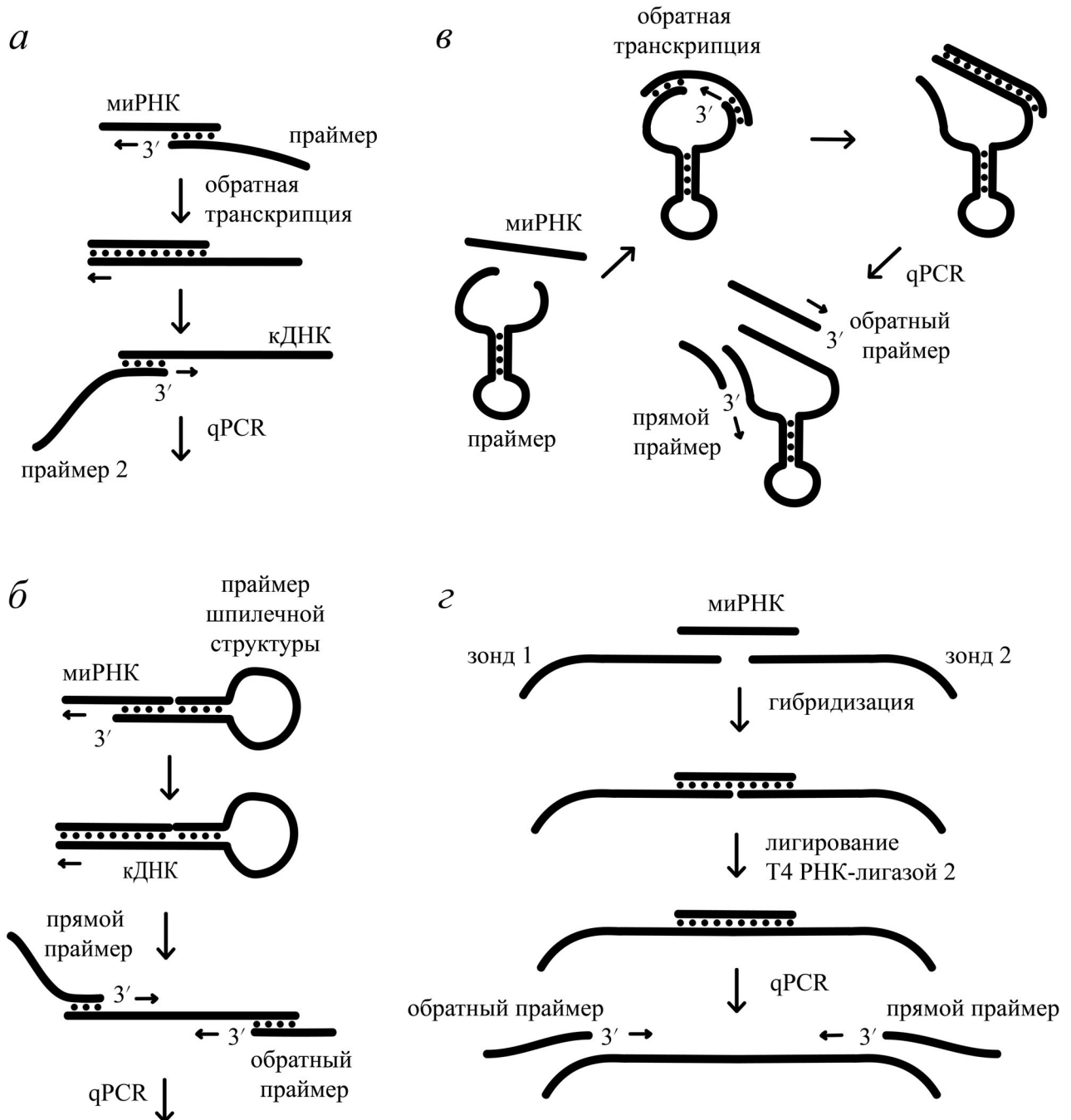
### АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА микроРНК

**Полимеразная цепная реакция.** На настоящий момент наиболее популярным методом амплификации нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR), которая в случае миРНК дополняется реакцией обратной транскрипции (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) [1]. Для количественного определения миРНК нашёл широкое применение PCR в реальном времени (quantitative PCR, qPCR). Малый размер молекул миРНК существенно усложняет их определение методом RT-qPCR, так как требуются праймеры меньшего, чем миРНК, размера. Это существенно уменьшает температуру плавления образующихся дуплексов и оказывает серьёзное влияние на эффективность и специфичность метода. Для решения этой задачи применяется стратегия превращения миРНК в более длинную одноцепочечную ДНК, которая далее используется для проведения qPCR. Для этого последовательность анализируемой миРНК комплементарно взаимодействует с удлинённым с 5'-конца праймером, после чего осуществляется элонгация последнего. В дальнейшем

полученный продукт подвергается qPCR (рис. 1), при этом используемый праймер может иметь как линейную (рис. 1, а), так и шпильчатую структуру (рис. 1, б), в которой свободный «хвост» комплементарен анализируемой миРНК. Ранее в группе Guegler проводилось сравнительное исследование qPCR с использованием указанных типов праймеров [41]. Полученные результаты показали, что при применении праймера шпильчатой структуры эффективность амплификации более чем в 100 раз выше (в сравнении с линейным аналогом). Следует также отметить, что использование шпильчатого праймера повысило способность метода различать зрелые миРНК от их прекурсоров. Повышение эффективности амплификации при использовании шпильчатого праймера может быть связано с увеличением термостабильности его комплекса с миРНК благодаря стэкинг-взаимодействиям нуклеотидов в стебле шпильки, тогда как специфичность метода, по видимому, увеличивается за счёт нахождения большей части некомплементарного миРНК фрагмента праймера не в свободном, а в связанном состоянии. Метод с применением такого праймера получил название «стебель-петлевая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией» (stem-loop RT-qPCR) и успешно применяется для оценки уровней экспрессии опухолевых миРНК в образцах биоптатов [42], экзосом [43], сыворотки крови [44] и мочи [45].

Для повышения специфичности определения миРНК был разработан метод, названный двуххвостовой PCR (2-tailed RT-qPCR) [46]. В данном подходе используется праймер шпильчатой структуры, хвосты которого комплементарны двум концевым последовательностям анализируемой миРНК (рис. 1, в). Благодаря образованию такого комплекса становится возможным различать изомеры (термин введён для миРНК, чьи последовательности различаются между собой только на один нуклеотид в крайних положениях молекулы). Данный метод способен детектировать миРНК с концентрацией до 2 аМ и рабочим диапазоном в 7 порядков. С его применением был исследован уровень экспрессии трёх миРНК (миРНК let-7a, миРНК-21 и миРНК-193a) в ткани мозжечка мыши. Полученные результаты совпали с результатами анализа, проведённого с применением коммерческого набора TaqMan.

Известно, что методы, использующие в своих схемах обратную транскриптазу, активность которой довольно чувствительна к компонентам реакционной среды, часто имеют пониженную точность [47]. Этот негативный факт привёл к



**Рис. 1.** Схемы модификаций полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR) для определения миРНК: *а* – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией и использованием линейного праймера (RT-qPCR); *б* – стебель-петлевая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (stem-loop RT-qPCR); *в* – двухвостовая полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (2-tailed RT-qPCR); *г* – лигирующая полимеразная цепная реакция в реальном времени (ligation qPCR)

конструированию метода анализа, получившего в литературе название «лигирующая PCR в реальном времени» (ligation qPCR), в котором отсутствует этап обратной транскрипции миРНК. В данном методе концевые последовательности двух зондов в присутствии анализируемой

миРНК лигируются T4 РНК-лигазой 2, и полученная в результате этого ДНК амплифицируется в qPCR (рис. 1, г). Основываясь на данной схеме анализа, был разработан флуоресцентный метод определения миРНК let-7a [48]. Предел обнаружения и линейный диапазон составили

0,2 фМ и 0,2 фМ–2 нМ соответственно. Кросс-реактивность метода в отношении миРНК let-7c и миРНК let-7a-3 составила 22 и 0,17% соответственно. Когда же в этом методе для измерения флуоресценции использовалась технология цифровой детекции сигнала, предел обнаружения миРНК let-7a и его линейный диапазон составили 20 аМ и 20 аМ–200 фМ, т.е. все величины сместились в область более низких концентраций [49]. Более того, одновременно повысилась и точность определения аналита. Следует отметить, что PCR с цифровой детекцией сигнала становится все более популярной в исследованиях миРНК [50, 51].

**Секвенирование следующего поколения** (next-generation sequencing, NGS). В настоящее время данный метод активно применяется в анализе миРНК. На первом этапе NGS к анализируемым молекулам миРНК присоединяют с обоих концов дополнительные олигонуклеотидные последовательности, после чего проводится RT-PCR. Продукты амплификации секвенируются, что позволяет определить как последовательность миРНК, так и их концентрацию в образце. В отличие от других методов, NGS может использоваться для определения как известных, так и неизвестных миРНК, в связи с чем в настоящее время этот метод широко используется для создания библиотек миРНК, присутствующих в разных организмах [52]. Вместе с тем проведение метода и обработка полученных данных требует значительного времени, дорогостоящего оборудования, а также высококвалифицированных специалистов [53]. По этой причине метод не целесообразно использовать для количественного определения известных миРНК.

Среди методов определения миРНК RT-qPCR считается «золотым стандартом», в связи с чем он часто используется для подтверждения данных, полученных другими методами [54]. Однако при этом важно учитывать, что на регистрацию аналитического сигнала в RT-qPCR может оказывать влияние неспецифичная гибридизация праймеров, образование неспецифических продуктов, как результат катализа полимеразы, и ингибирование Taq-полимеразы компонентами анализируемой пробы, что в конечном счёте может привести к ложноположительным и ложноотрицательным сигналам [55–57]. Помимо вышеобозначенного, за счёт необходимости проведения циклического изменения температуры, данный метод анализа требует дорогостоящего оборудования. В связи с этим в последние годы активно развиваются методы детекции миРНК с применением методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот (МИА).

### МЕТОДЫ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ, ПРИВОДЯЩИЕ К ПОВЫШЕНИЮ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ЗА СЧЁТ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АНАЛИТА

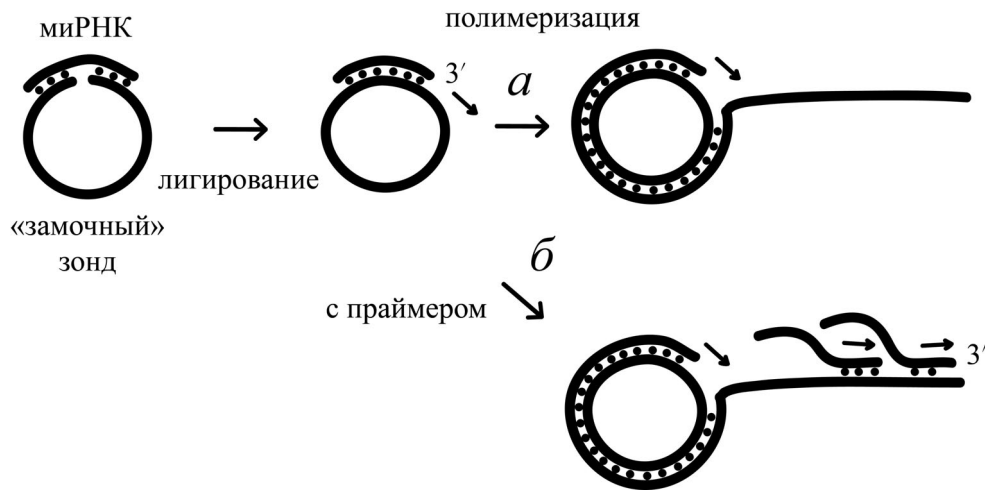
Все известные МИА можно разделить на: (а) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт повышения концентрации аналита, и (б) методы амплификации, приводящие к повышению аналитического сигнала за счёт многократного реагирования одних и тех же молекул аналита [1].

**Метод амплификации катящегося кольца** (Rolling-Circle-Amplification, RCA) является одним из наиболее часто применяемых в анализе миРНК МИА первой группы. Этот метод основывается на использовании «замочного» зонда, линейного ДНК-олигонуклеотида, концы которого смыкаются при комплементарном взаимодействии с анализируемой миРНК (рис. 2, а). Формирование такого комплекса позволяет ферментативно лигировать концы зонда. Впоследствии с использованием кольцевого зонда осуществляется элонгация миРНК ДНК-полимеразой, обладающей способностью к замещению цепи. Обычно в RCA используются phi 29 или Bst-полимеразы. В результате проведения амплификации осуществляется синтез одноцепочечной ДНК-последовательности с образованием множества копий компонента зонда в виде конкатемеров. Обычно RCA проводится при температуре 30–37 °С [58–61].

В работе Kumara et al. [61] описан метод определения миРНК-24 с использованием RCA. В этом методе на стадии элонгации к последовательности миРНК добавлялся, кроме традиционной смеси dNTP, меченный нафталинидом dUNTP, что приводило к синтезу флуоресцирующего продукта. Предел обнаружения такого флуоресцентного метода составил 3,6 фМ миРНК.

Известны также другие варианты RCA. Так, кроме кольцевого зонда, описано применение и гантелеобразного зонда шпильчатой структуры [62]. В последнем случае за счёт наличия шпильки в структуре зонда увеличивается специфичность амплификации и соответственно определения миРНК. В другом варианте RCA Li et al. [63] предложили «замочные» зонды с однонуклеотидными заменами в комплементарном аналиту фрагменте. В этом случае повышалась специфичность определения миРНК-let-7a по отношению к близкородственным миРНК.

В отличие от указанных выше, в некоторых работах высокомолекулярный продукт амплификации RCA подвергали ферментативной



**Рис. 2.** Схемы методов амплификации катящегося кольца (RCA, *а*) и гиперразветвлённой амплификации катящегося кольца (HRCA, *б*) при определении миРНК

рестрикции. На данном принципе Liu et al. [64] сконструировали метод RCA с экспоненциальной амплификацией, где фрагмент зонда, комплементарный анализируемой миРНК, обособлен сайтами рестрикции. Это приводило к тому, что синтезированный конкатемер после его комплементарного комплексообразования с исходным «замочным» зондом подвергался специфическому расщеплению рестриктазой, образуя большое число молекул ДНК-олигонуклеотида, последовательность которого аналогична последовательности анализируемой миРНК. Вследствие этого такие молекулы синтезированного олигонуклеотида инициировали RCA, так как, по сути, они являются дополнительными праймерами. В данном исследовании рабочий диапазон при определении миРНК флуоресцентным методом составил 30 аМ–30 фМ. Метод был применён для количественной оценки содержания миРНК *let-7a* в клетках A549 (карцинома лёгких человека).

Высокочувствительные методы определения миРНК также могут быть сконструированы сочетанием RCA с микрофлюидным электрофорезом. Chen et al. [65] сконструировали микрофлюидный чип для определения миРНК-21, чувствительность которого позволила количественно оценить содержание этой миРНК, используя как образец всего лишь 20 клеток. С помощью данного метода найдено, что концентрация миРНК-21 в клетках линий HepG2 и HL-7702 равна 49,8 и 11,4 пМ соответственно.

Более распространённая модификация RCA, позволяющая осуществлять экспоненциальную амплификацию, основывается на использовании дополнительных праймеров, комплементарных высокомолекулярному продукту RCA.

Данная модификация получила название «гиперразветвлённая RCA» (Hyperbranched RCA, HRCA) (рис. 2, *б*). При определении миРНК-21 с помощью HRCA был достигнут предел обнаружения, равный 10 аМ. Рабочий диапазон данного метода не был широк (до 100 фМ), однако при этом величина сигнала в пределах рабочего диапазона повышалась более чем в 90 раз [66]. Последний факт указывает на высокое значение коэффициента чувствительности, определяемого как значение первой производной градуировочной функции при определённой концентрации аналита, что позволило оценить концентрацию аналита с высокой точностью [67]. Разработанный метод применялся для анализа уровня экспрессии миРНК-21 в ткани печени пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Таким образом, методы, основанные на экспоненциальных модификациях RCA, обладают экстремально высокой чувствительностью.

Выше отмечалось, что рабочий диапазон метода с применением HRCA недостаточно широк по сравнению с большинством описанных методов для миРНК. Однако этот факт ни в коем случае не следует относить к недостаткам метода. Методы анализа миРНК с широким рабочим диапазоном предпочтительно использовать при оценке их экспрессии в неописанных образцах или при количественном определении определённых миРНК, концентрация которых в норме и патологии сильно отличается. Однако если различие в концентрации миРНК в образцах здоровых людей и пациентов не велико [68–69], то предпочтительно использование методов с более узким рабочим диапазоном, но максимально возможным коэффициентом чувствительности. Таким образом, методы анализа

миРНК как с широким, так и с узким рабочими диапазонами представляют интерес для диагностической медицины.

В научной литературе отмечены и недостатки RCA, связанные с протеканием фоновой амплификации (в отсутствие аналита), что в конечном счёте ухудшает аналитические параметры метода определения миРНК. Аналогичный вопрос в равной степени относится и к другим методам амплификации. В случае методов амплификации с применением полимераз (в частности, RCA) данный процесс связывают с межмолекулярными взаимодействиями молекул зонда и их дальнейшей элонгацией, взаимодействием их с дополнительно используемыми праймерами, присутствием в анализируемых образцах дополнительных нуклеиновых кислот, а также побочными активностями используемых полимераз [70]. Для элиминирования влияния фоновых реакций на определение миРНК следует применять методы детекции, специфичные к продуктам основной (аналит-зависимой) реакции.

**Экспоненциальная реакция амплификации** (EXponential Amplification Reaction, EXPAR) является ещё одним широко используемым при определении миРНК методом из группы МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала за счёт повышения концентрации аналита. В EXPAR применяется зонд, представляющий из себя две полностью комплементарные аналиту ДНК-последовательности, связанные друг с другом одной из цепей сайта рестрикции никазы (рис. 3, а). При взаимодействии аналита с 3'- и 5'- концами зонда образуются дуплексы. Тот дуплекс, в котором аналит гибризован с 3'- концом зонда, удлиняется ДНК-полимеразой с отсутствием (3'→5')-экзонуклеазной активности (полимераза phi 29, фрагмент Кленова, полимеразы Vent и Bst). В результате этого наблюдается формирование сайта рестрикции никазы и ферментативный гидролиз комплементарной зонду последовательности, после чего образуемая последовательность аналита элонгируется вновь [71].

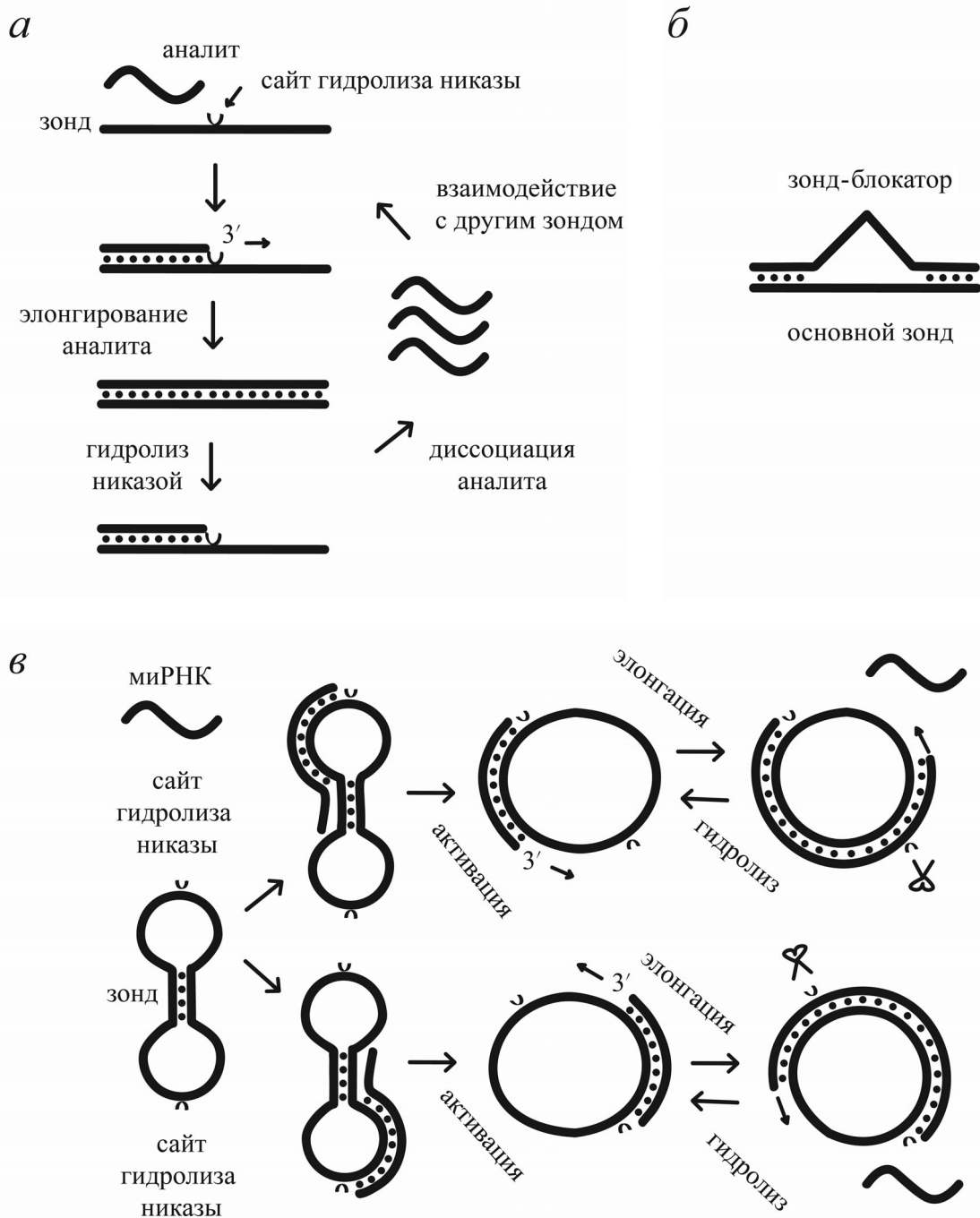
В пионерской работе по применению метода EXPAR при анализе миРНК с использованием флуоресцентной детекции предел обнаружения миРНК let-7a составил 0,1 фМ. Его рабочий диапазон покрывал 10 порядков концентрации аналита. В то же время следует отметить, что аналитический сигнал при этом изменялся лишь в 6 раз, что указывает на низкое значение коэффициента чувствительности метода. Для наиболее структурно близких аналиту миРНК let-7e и миРНК let-7f кросс-реактивность составила 17,6 и 0,6% соответственно [72].

Для повышения специфичности EXPAR были применены «арочные» зонды. Как видно на рис. 3, б, в этом методе используется комплекс основного зонда и дополнительного зонда-блокатора, при этом концы последовательности блокатора комплементарны концам основного зонда. Так как фрагмент основного зонда, вступающий в реакцию с аналитом, частично находится в дуплексе, метод характеризуется повышенной специфичностью. Данная стратегия была успешно применена Wu et al. [73] для определения миРНК-141. Кросс-реактивность миРНК-200a, наиболее структурно близкой к анализируемой миРНК-141, составила всего 3%. При флуоресцентной детекции образуемых на подложке продуктов амплификации нанокластеров серебра был получен предел обнаружения 1 фМ при довольно узком рабочем диапазоне (до 500 фМ).

Серьёзной проблемой, ограничивающей чувствительность методов с применением EXPAR, является интенсивная неспецифическая реакция, протекающая при отсутствии аналита. В случае EXPAR данная проблема усугубляется использованием зондов (превышающих как минимум в 2 раза последовательность аналита по длине) в высокой концентрации. Для уменьшения димеризации зондов и снижения эффекта побочных активностей используемых полимераз рекомендуется проводить EXPAR при повышенной температуре (55 °С) с использованием термофильных ферментов [74]. Следует заметить, что данный подход полностью указанную проблему не решает.

Интересная модификация метода, позволяющая элиминировать развитие фоновой реакции вследствие образования димеров зондов и их дальнейшей элонгации и названная «симметричная EXPAR» (Symmetric EXPAR, SEXPAR), была предложена Chen et al. [75]. Зонд в данном методе представляет из себя гантелеобразную замкнутую последовательность, содержащую два комплементарных аналиту домена. При этом часть каждого из доменов находится в стебле шпильки, а домены связаны между собой сайтом рестрикции никазы (рис. 3, в). При связывании миРНК с зондом в присутствии полимеразы осуществляется его элонгация, при этом, как только происходит формирование сайта рестрикции, элонгируемая последовательность подвергается ферментативному гидролизу и впоследствии вытесняется. Именно благодаря замкнутой геометрии зонда предотвращается протекание фоновой реакции, вызванной взаимодействием зондов. Шпильчатая структура доменов зонда, связывающих аналит, призвана повысить специфичность формирования комп-





**Рис. 3.** Схемы метода экспоненциальной реакции амплификации (EXPAR, *а*), EXPAR с «арочным» зондом (*б*) и метода симметричной экспоненциальной реакции амплификации (SEXPAR, *в*), используемых при определении миРНК

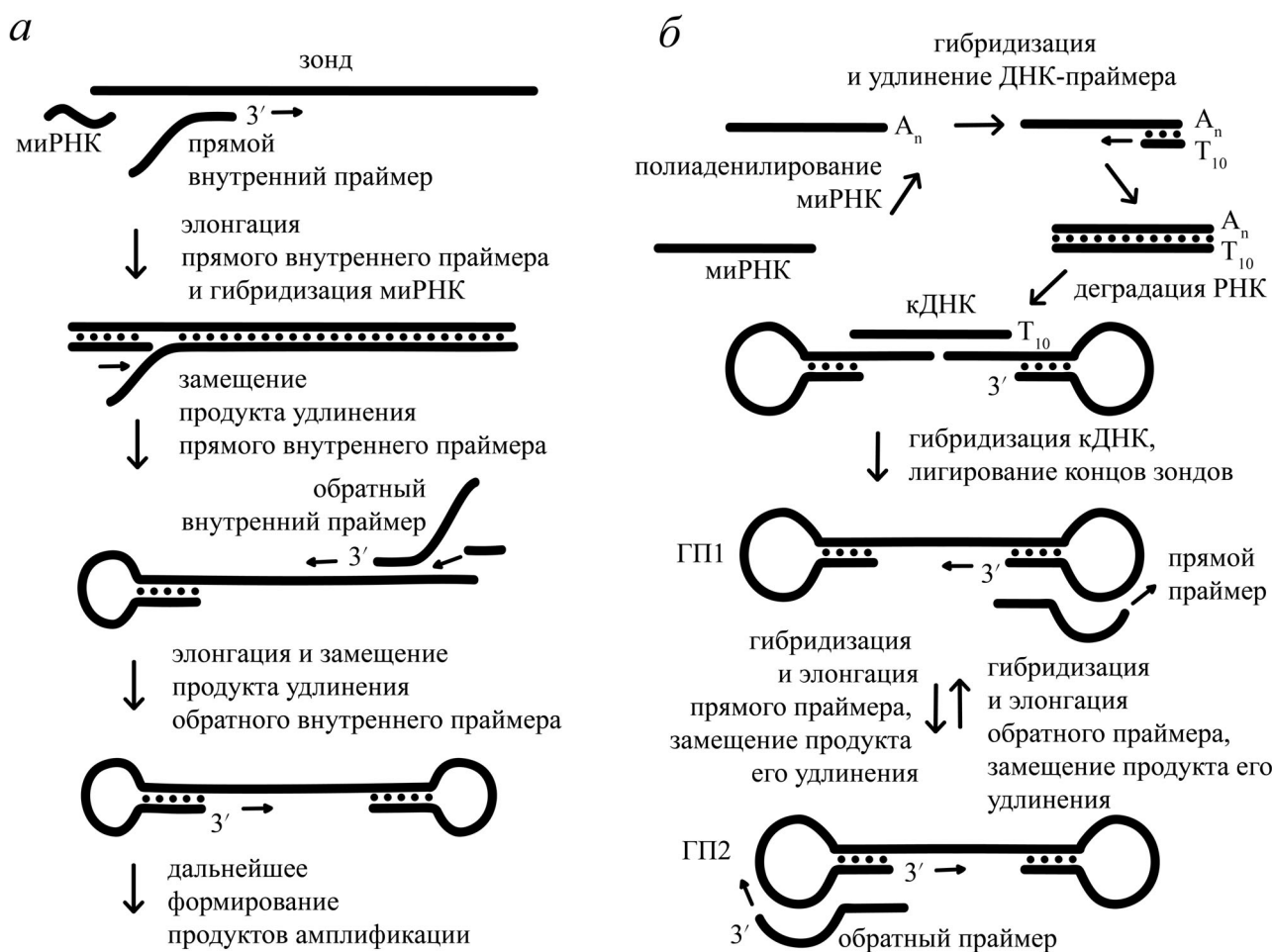
лекса миРНК–зонд. При использовании флуоресцентного метода детекции с применением SEXPAR получен экстремально низкий предел обнаружения миРНК let-7a, который составил 1 аМ. Верхний предел рабочего диапазона этого метода равен 1 нМ, т.е. рабочий концентрационный диапазон метода составил 9 порядков. Кроме того, авторами продемонстрирована

чрезвычайно низкая кросс-реактивность с миРНК let-7e (ближайшим гомологом), которая была менее чем  $10^{-3}\%$ , тогда как в случае применения классического варианта EXPAR эта величина равнялась 13,2%. Впоследствии метод был успешно применён для анализа миРНК let-7a в тканях и сыворотке крови человека, при этом показав бóльшую точность, чем RT-qPCR.

**Петлевая изотермическая амплификация** (Loop-isothermal-AMplification, LAMP) известна как один из наиболее эффективных и быстрых методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Несмотря на то что оригинальная схема LAMP разработана для амплификации высокомолекулярной ДНК, в настоящее время описаны варианты данного метода, используемые для анализа микроРНК [76]. В этом случае анализируемая микроРНК играет роль одного из праймеров. С заменой прямого внешнего праймера в классической LAMP на микроРНК и двухцепочечной ДНК-матрицы на одноцепочечную ранее разработан метод определения микроРНК паразитов *Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica* [77]. Как видно на рис. 4, а, с 3'-концевой последовательностью ДНК-зонда последовательно взаимодействуют прямой внутренний праймер и микроРНК. Bst-Полимераза элонгирует оба праймера, а так как данный фермент обла-

дает способностью к замещению цепи, одновременно происходит вытеснение первого праймера. Впоследствии на 3'-конце первичного продукта осуществляется связывание и элонгация другой пары праймеров, а именно обратных внутреннего и внешнего праймеров. Это приводит к формированию гантелеобразных структур на обоих концах образованной последовательности, после чего запускается каскад дальнейших циклов амплификации. Температура проведения амплификации – 60 °С. Детекция сигнала не специфична к последовательности аналита и проводится при помощи флуоресцентных интеркалирующих красителей.

Использование вышеизложенного метода позволило провести определение микроРНК-novel-shared-03 в диапазоне концентраций 0,1 фМ–0,1 нМ [77]. Описанный метод показал хорошую специфичность, так как гомологичные микроРНК с однонуклеотидными заменами не определялись



**Рис. 4.** Схемы метода петлевой изотермической амплификации (LAMP, а) и метода «лигирующей» петлевой изотермической амплификации (ligation LAMP, б), используемых при определении микроРНК.  $A_n$  – Полиаденилиновая последовательность,  $T_{10}$  – последовательность из десяти тиминовых нуклеотидов

даже в концентрации, равной 100 фМ. Для обнаружения инфицированных животных был успешно проведён анализ паразитических миРНК в образцах сыворотки быков.

В другом варианте LAMP, названном «лигирующей» LAMP (ligation-LAMP), предварительно полученный транскрипт миРНК взаимодействовал с хвостовыми последовательностями двух шпилечных зондов, соединяя их, что в присутствии лигазы приводило к формированию ковалентной связи между шпилечными зондами с образованием гантелеобразной последовательности (ГП1, рис. 4, б) [78]. Далее с 3'-конца ГП1 осуществлялась её элонгация полимеразой со способностью к замещению цепи и одновременное взаимодействие с прямым праймером, его элонгация и вытеснение продукта удлинения (второй гантелеобразной последовательности (ГП2)) растущей цепью ГП1. Замыкание цикла амплификации происходило благодаря удлинению 3'-конца ГП2 и её взаимодействию с обратным праймером, в результате чего при дальнейших актах элонгации и замещения вытеснялась ГП1.

При исследовании специфичности данного метода показано, что кросс-реактивность в отношении миРНК-21 с одной нуклеотидной заменой равна 22%. Предел обнаружения миРНК-21 и рабочий диапазон составили 0,2 фМ и 1 фМ–1 нМ соответственно. Метод был успешно применён для количественного определения миРНК-21 в клетках раковых линий MCF-10A, HT 1080, HeLa и MCF-7. Относительно ранее рассмотренной модификации LAMP данный метод более сложен и требует больше времени за счёт проведения реакции обратной транскрипции.

В заключение отметим, что несмотря на эффективность и скорость амплификации LAMP, число публикаций, описывающих её применение при определении миРНК, невелико.

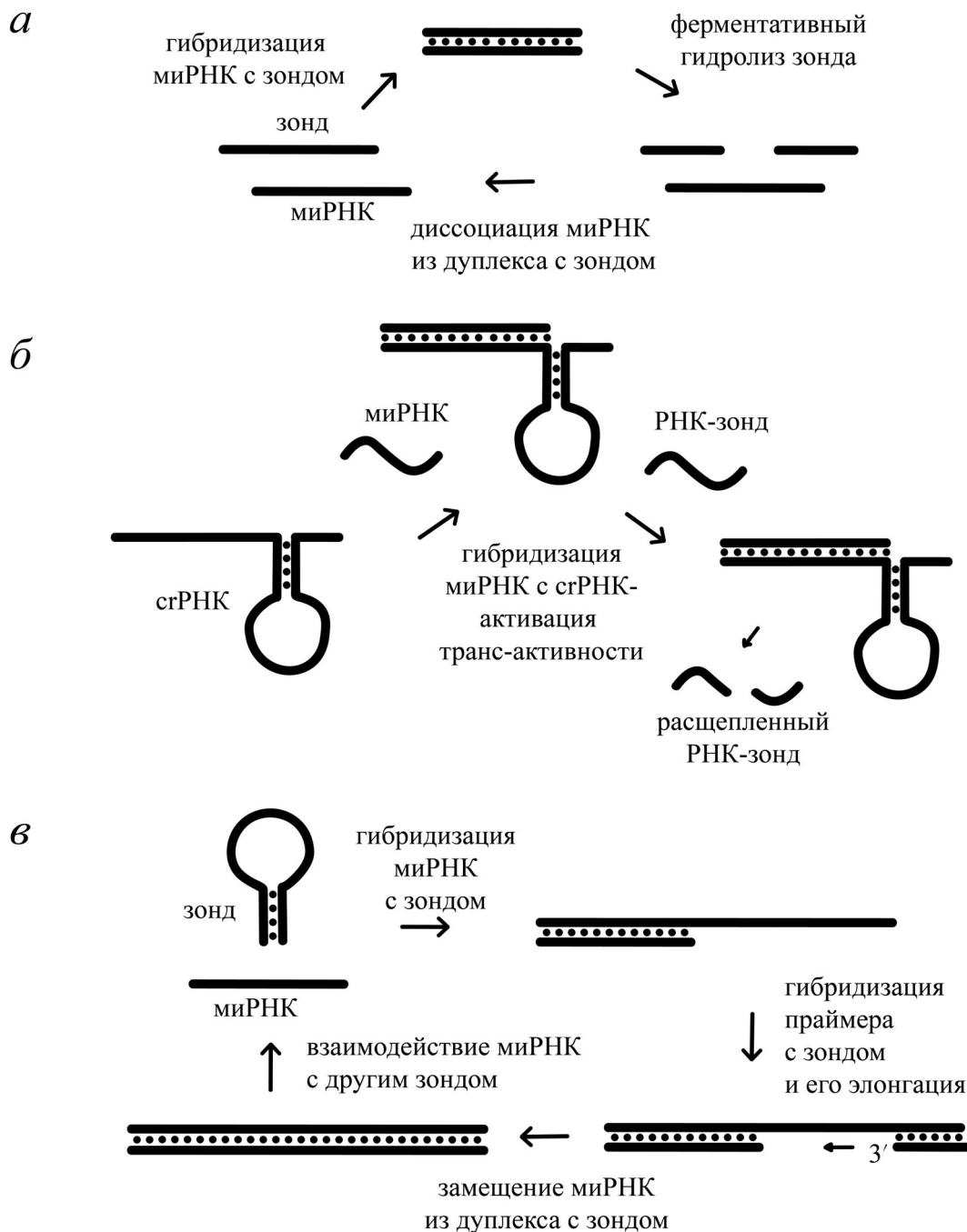
### **МИА, ПРИВОДЯЩИЕ К ПОВЫШЕНИЮ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА БЕЗ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ микроРНК**

**Циклический ферментативный метод амплификации** (Circle-Enzymatic-Amplification, CEAM) стал одним из первых методов изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и нашедших применение в анализе миРНК. Известно большое число публикаций с описанием методов определения миРНК, основанных на CEAM. В этом методе амплификации последовательность распознающего зонда после его комплексообразования с миРНК подвергается ферментативному расщеплению.

Для этого могут быть применены различные ферменты: дуплекс-специфическая нуклеаза [79–81], экзонуклеаза [82–89] и эндонуклеаза [90–92]. В результате гидролиза зонда происходит диссоциация модифицированного дуплекса, а освободившаяся последовательность миРНК взаимодействует со следующей молекулой зонда (рис. 5, а).

Опубликован ряд работ, описывающих методы определения миРНК на основе CEAM с использованием эндонуклеазы. В большинстве таких методов формируются олигонуклеотидные структуры Y-формы [90, 91]. В работе Miao et al. [90] на поверхности углеродного электрода через золотые наночастицы иммобилизован ДНК-олигонуклеотид, связанный с электроактивной меткой (зонд 1). При специфическом взаимодействии миРНК, зонда 1 и дополнительного зонда (зонд 2) происходило формирование Y-комплекса, причём на одной из ветвей Y-комплекса, образованной зондами 1 и 2, формируется сайт рестрикции эндонуклеазы Nb.BbvCI. После расщепления эндонуклеазой Y-комплекс распался, благодаря чему электрохимическая метка диффундировала в раствор, что приводило к понижению регистрируемого сигнала, а освободившаяся миРНК инициировала следующий цикл амплификации. Базируясь на данной схеме, при определении миРНК был достигнут низкий предел обнаружения (30 аМ) и широкий рабочий диапазон (100 аМ–1 нМ). Кросс-реактивность метода, оценённая в отношении изомеров, составила 4%. Высокая чувствительность метода позволила провести анализ миРНК-21 в образцах сыворотки пациентов с раком груди.

Гораздо реже в методе CEAM используется T7-экзонуклеаза. В этом случае после взаимодействия миРНК с распознающим зондом последовательность зонда в образовавшемся комплексе подвергается ферментативному гидролизу в (5'→3')-направлении, в результате чего миРНК высвобождается и формирует дуплекс с другой молекулой-зондом. Чувствительность таких методов сильно зависит от используемых методов детекции. Так, при использовании электрохимической детекции предел обнаружения часто лежит в фемтомолярном диапазоне [84–86]. В случае применения оптических методов детектируемость миРНК ниже; их пределы обнаружения находятся в пикомолярном диапазоне [82, 83]. Описаны единичные работы по применению в данном методе экзонуклеазы III, гидролизующей последовательность зонда в дуплексе с аналитом в (3'→5')-направлении [87–89]. Малое число таких работ может



**Рис. 5.** Схема реакций изотермической амплификации, приводящих к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита и проводимых с применением ферментов, при определении миРНК: *a* – циклический ферментативный метод амплификации (CEAM); *б* – CRISPR/Cas13a; *в* – амплификационный метод с полимеризацией и замещением (ICSDP)

быть связано с побочной активностью экзонуклеазы III, которая способна подвергать расщеплению одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, включая и миРНК.

**Системы CRISPR/Cas** в последние годы начали использовать для амплификации сигнала в аналитических методах определения нуклеино-

вых кислот [93]. В литературе описаны разные CRISPR/Cas-системы [94], однако в случае анализа миРНК применяется исключительно CRISPR/Cas13a, относящаяся к семейству систем типа IV [95]. На сегодняшний день представлено весьма ограниченное количество публикаций, описывающих методы детекции

миРНК с использованием системы CRISPR/Cas13a.

Данная система включает в себя «направляющую» РНК (сРНК) и РНК-мишень (аналит). сРНК находится в положительно заряженном канале, образуя в результате конформационных изменений при её включении в CRISPR/Cas13a. Присутствие в реакционном растворе, кроме CRISPR/Cas13a, также РНК-мишени, например миРНК, приводит к тому, что белки Cas13a приобретают способность каталитически гидролизовать РНК, т.е. проявляют активность РНКазы. Расщепление последовательности РНК-мишени происходит за пределами её комплементарности с сРНК, при этом места рестрикции детерминируются первичной и вторичной структурами РНК-мишени [95]. После активации РНК-мишенью CRISPR/Cas13a проявляет также РНКазную активность по отношению к неспецифическим одноцепочечным РНК. Такая активность CRISPR/Cas13a называется коллатеральной или *транс*-активностью. Проявление данной способности CRISPR/Cas13a легло в основу ряда методов определения миРНК.

В присутствии анализируемой миРНК благодаря её взаимодействию с сРНК и активации *транс*-активности Cas13a происходит расщепление меченых РНК-зондов, что приводит к амплификации сигнала (рис. 5, б). На основе описанного принципа разработаны флуоресцентные, колориметрические и электрохимические методы детекции миРНК [96–98].

Следует отметить, что чувствительность методов определения миРНК с помощью системы CRISPR/Cas13a невысока и находится в пиколярном интервале [99]. Другим недостатком данного подхода является необходимость проведения анализа миРНК в особо чистых помещениях, предназначенных для работы с РНК.

Недавно Sha et al. [100] описали каскадный метод с применением CRISPR/Cas для определения миРНК-17. На первом амплификационном этапе была задействована система CRISPR/Cas13a, а на втором – CRISPR/Cas14a. Анализируемая миРНК активировала проявление *транс*-активности Cas13a, которая гидролизовала связь между двумя урацилами, включёнными в петлю шпилечного ДНК-зонда. После гидролиза шпилька трансформировалась в дуплекс, одна из цепей которого вступала в реакцию замещения цепи с сРНК в составе CRISPR/Cas14a, что, в свою очередь, активировало проявление *транс*-активности Cas14a, гидролизующей линейные ДНК-зонды с флуоресцентной меткой и тушителем на концах. Предел обнаружения и рабочий диапазон определения

миРНК-17 составили 1,3 фМ и 6,2–500 фМ соответственно. Авторами отмечается, что достигнутая в методе чувствительность на 3 порядка выше, чем в случае применения одноэтапного метода с применением CRISPR/Cas13a. Кроме того, показано, что при использовании сРНК с введённым некомплементарным анализу нуклеотидом метод демонстрирует особенно высокую селективность относительно близкородственных миРНК. Разработанный каскадный CRISPR/Cas-метод был использован при определении миРНК-17 в экстрактах из сыворотки крови больных аденокарциномой груди.

Системы CRISPR/Cas также применялись в сочетании и с другими методами изотермической амплификации, такими как RCA [101] и EXPAR [102], что в конечном счёте позволило сконструировать высокочувствительные каскадные методы определения миРНК.

**Амплификационный метод с полимеризацией и замещением (Isothermal Circular Strand Displacement Polymerization, ICSDP)** является ещё одним относительно редко используемым в анализе миРНК МИА, приводящим к повышению аналитического сигнала без изменения концентрации аналита. В этом методе анализируемая миРНК специфически взаимодействует с зондом шпилечной структуры, в результате чего последний раскрывается, что приводит к высвобождению из стебля шпильки фрагмента, комплементарного праймеру (рис. 5, в). Это позволяет праймеру гибридизоваться с зондом, после чего праймер элонгируется полимеразой. Чаще других для этих целей используется фрагмент Кленова, а элонгация проводится при низких температурах. В процессе удлинения праймера одновременно происходит замещение последовательности миРНК. Высвобожденный из комплекса аналит вступает в реакцию с другой молекулой зонда. Концентрация миРНК соответствует количеству образовавшегося дуплекса, который определяется такими методами, как флуоресценция [103, 104], электрохимия [105], хемилюминесценция [106, 107]. Таким образом, в ICSDP молекула миРНК выполняет роль катализатора реакции раскрытия шпилечного зонда.

Недавно описан гетерогенный метод определения миРНК-39, в котором для амплификации сигнала применён ICSDP [107]. В этом методе использовался биотинилированный праймер, в связи с чем образованный в процессе гетерогенной амплификации продукт также содержал биотин, который впоследствии эффективно взаимодействовал с конъюгатом стрептавидина и полипероксидазы. Сигнал детектировался методом усиленной хемилюминесценции с использованием фенотиозиновых усилителей. Предел

обнаружения составил 400 фМ, при этом получено высокое значение коэффициента чувствительности метода (в пределах рабочего диапазона сигнал возрастал более чем в 500 раз). При определении миРНК-39 в образцах коротких РНК, полученных из лизатов клеточных линий, показано отсутствие матричного эффекта, что позволило использовать буферные растворы миРНК в качестве калибраторов. Так как миРНК-39 обнаруживается в нематоде *Caenorhabditis elegans* и отсутствует в организме человека, данный метод предложено использовать для оценки эффективности выделения миРНК из биоматериала человека [90, 105].

В методах определения миРНК с ICSDP используются и другие детектирующие системы. Так, в работе Wang et al. [104] шпилечный зонд был мечен флуоресцентной меткой, в то время как праймер предварительно иммобилизовался на поверхности наночастиц золота. При образовании в процессе амплификации дуплексов флуоресцентные метки сближались с поверхностью наночастиц, что приводило к тушению флуоресценции. Предел обнаружения метода, разработанного для определения миРНК-21, и его линейный диапазон составили 1,5 фМ и 10 фМ–10 нМ соответственно. Кроме того, продемонстрирована способность метода к выявлению однонуклеотидных замен. Метод был использован для определения миРНК-21 в экзосомах, секретируемых клетками HeLa.

Методы определения миРНК, основанные на ICSDP, в целом характеризуются низкими значениями предела обнаружения, а за счёт применения шпилечного зонда являются высокоспецифичными.

**Реакция цепной гибридизации.** В отличие от вышеописанных МИА для проведения реакции цепной гибридизации (hybridization chain reaction, HCR) не требуется участия какого-либо фермента. Понятно, что такие методы менее дорогостоящие и им не присущи недостатки, связанные с применением ферментов (см. выше). HCR основана на комплементарном взаимодействии двух зондов шпилечной структуры, катализируемом последовательностью олигонуклеотида, в частности миРНК (рис. 6). При взаимодействии миРНК с первым зондом происходит высвобождение домена, способного раскрыть шпилечную структуру второго. В свою очередь, при раскрытии второго зонда в нём из дуплекса освобождается фрагмент последовательности, способный раскрыть шпилечную структуру первого зонда. Таким образом, в присутствии аналита формируется цепная дуплексная структура, состоящая из используемых зондов. Правила моделирования используемых в HCR шпилек сформулированы в работе Ang и Yung [108]. Если один или оба зонда содержат в своей структуре аналитическую метку, то полимеризация зондов приводит к амплификации регистрируемого сигнала.

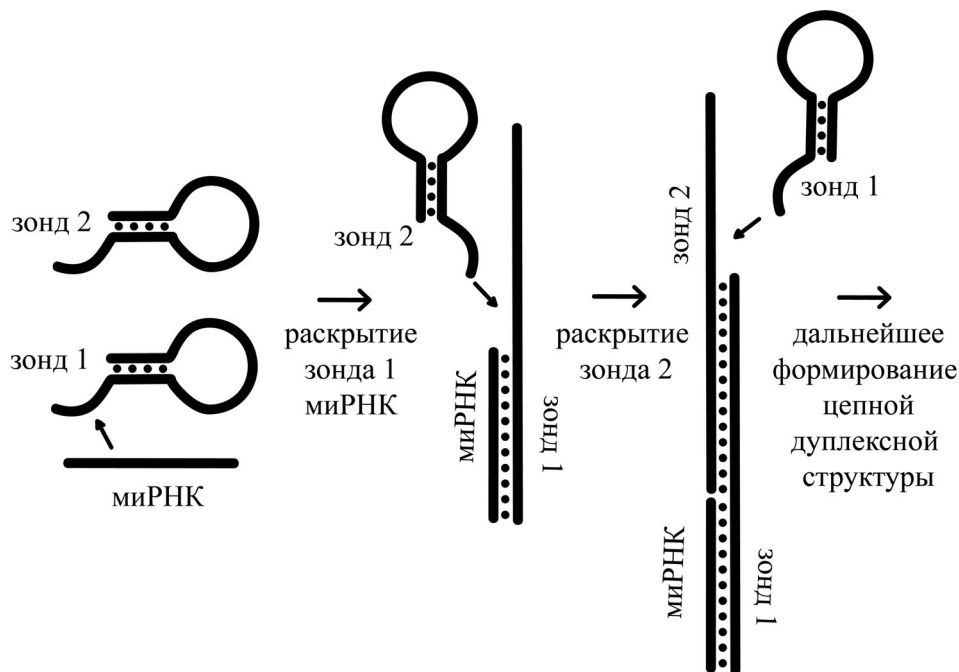


Рис. 6. Схема реакции цепной гибридизации (HCR), используемой при определении миРНК

С использованием HCR разработано большое количество методов определения миРНК, многие из которых являются высокочувствительными и способны детектировать аналиты в фемто- и аттомолярных концентрационных диапазонах [109–112]. Недавно Zhang et al. [109] использовали HCR для амплификации сигнала микрочипов. В данной работе ДНК-зонд 1 с одного из концов был связан с тетраэдрической ДНК-структурой, ковалентно иммобилизованной на поверхность чипа. При взаимодействии аналита с иммобилизованным ДНК-зондом 1 в систему вносился зонд шпилечной структуры 2, который раскрывался аналитом. Освобождённый благодаря этому домен зонда 2 служил инициатором взаимодействия пары HCR-зондов, которые полимеризовались с образованием двухцепочечной ДНК. Для данного метода наблюдался очень низкий предел обнаружения (10 аМ), при этом линейное нарастание сигнала регистрировалось вплоть до 100 фМ. Высокая специфичность данного метода позволила различить однонуклеотидные замены в структуре миРНК [109].

Как и для большинства других методов амплификации, в случае применения HCR наблюдается повышенный фоновый сигнал, обусловленный спонтанной (при отсутствии аналита) полимеризацией зондов. Недавно описан подход понижения фонового сигнала, основанный на обработке экзонуклеазой I захватывающего зонда-шпильки, предварительно иммобилизованного на поверхности электрода. В результате действия фермента удалялись шпилечные последовательности, имеющие дефекты в их вторичной структуре [113]. После такой обработки предел обнаружения миРНК-122 составил 100 аМ с рабочим диапазоном до 100 нМ. Разработанный метод показал свою эффективность при определении миРНК-122 в экзосомах раковых клеток HepG2 и SCF-7.

Для дополнительного повышения эффективности данного метода амплификации разработана разветвлённая HCR, где образуемый дуплекс содержит фрагмент одного из зондов, свободный от какого-либо взаимодействия, который, в свою очередь, является инициатором полимеризации другой пары зондов (зондов 3 и 4). В конечном счёте происходит образование разветвлённой структуры, состоящей из последовательностей четырёх зондов.

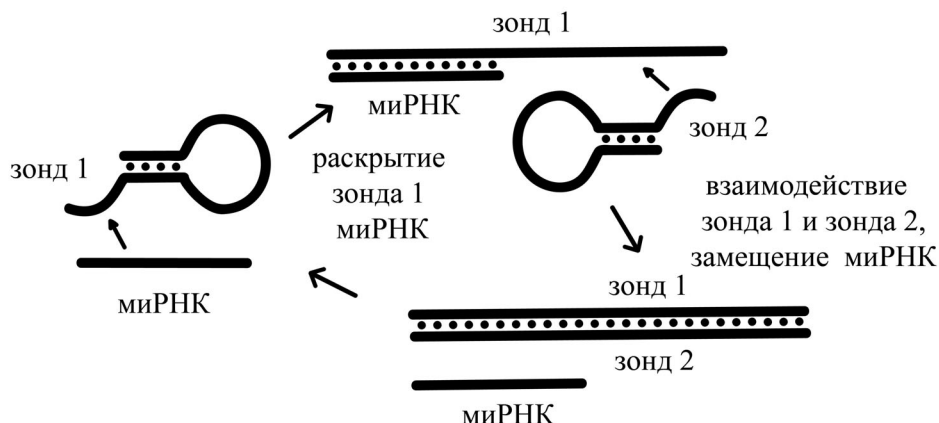
С применением разветвлённой HCR разработан ряд методов определения миРНК [114–117]. Следует отметить, что сравнение аналитических параметров методов определения миРНК, созданных на основе базовой и разветвлённой HCR, не выявило в явной форме ка-

ких-либо преимуществ одного метода амплификации перед другим. Справедливости ради остаётся отметить, что данное заключение сделано при сравнении данных, полученных в различных лабораториях при определении различных миРНК, а не на основании прямого сравнения указанных методов амплификации в одной и той же работе.

**Метод каталитической сборки шпилек.** Наряду с HCR при разработке методов определения миРНК не менее широко используется метод каталитической сборки шпилек (Catalytic Hairpin Assembly, CHA). Для проведения данной амплифицирующей реакции так же, как и в случае HCR, не требуется присутствия каких-либо ферментов. CHA основывается на аналит-зависимом взаимодействии двух комплементарных друг другу шпилечных зондов (рис. 7). Так как используемые зонды находятся в шпилечной (закрытой) форме, их спонтанная гибридизация затруднена. На первом этапе аналит гибридизуется с первым зондом (зонд 1). Появление одноцепочечного фрагмента в образованном дуплексе является иницирующим центром для взаимодействия с зондом 2. По завершении амплификационного цикла формируется комплекс зондов 1 и 2 и молекула миРНК в свободном состоянии, что позволяет ей вступать в реакцию со следующей молекулой зонда 1. Таким образом, одна молекула аналита способна катализировать образование большого числа дуплексов зондов 1 и 2.

На настоящий момент среди МИА, используемых в методах анализа миРНК, CHA является наиболее популярным. В данных методах CHA успешно сочетается с различными методами детекции. Хотя для таких методов наблюдается большой разброс значений предела обнаружения (от пикомолярных до субфемтомолярных концентраций) [118–120], что требует отдельного исследования, способность с помощью данного типа изотермической амплификации конструирования ультрочувствительных методов анализа указывает на перспективность CHA. Недавно Jin и Xu [121] описали микрочип на стекле, функционирующий с применением CHA. Для данного чипа с флуоресцентной детекцией предел обнаружения миРНК-21 и миРНК-155 был одинаков и составил 1,3 фМ. Полученные значения были очень низкими по сравнению с аналогичными величинами, обычно характерными для микрочипов. Разработанный чип также был высокоспецифичен в отношении исследуемых миРНК. Следует отметить, что высокая специфичность в целом характерна для методов, основанных на CHA [119, 122–124].

а



б

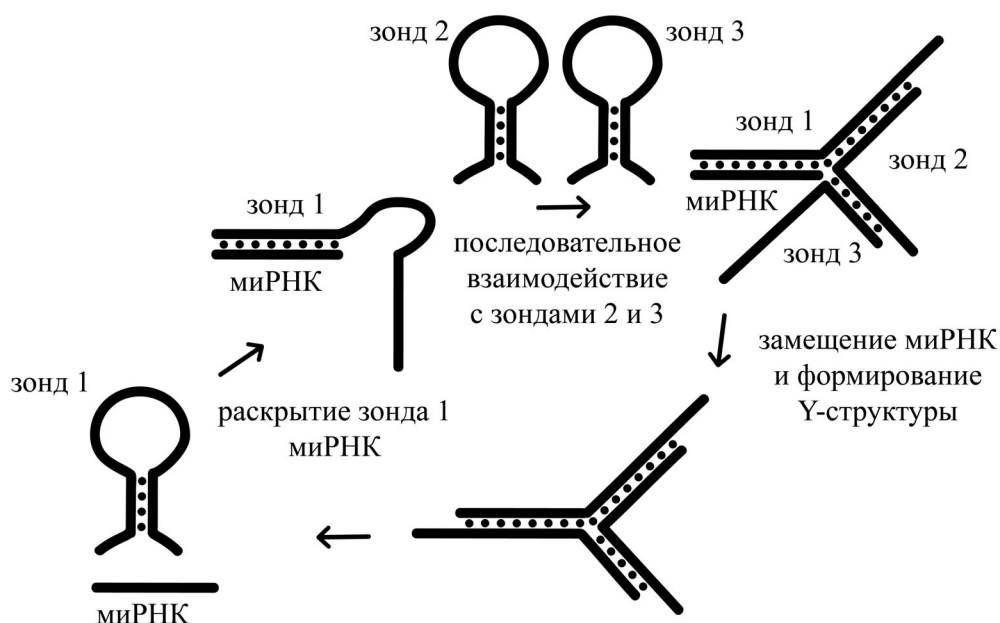


Рис. 7. Схема реакции каталитической сборки шпилек (СНА, а) и схема реакции СНА с образованием Y-структур (б), используемых при определении микроРНК

Кроме базового варианта СНА с участием двух зондов, описаны методы анализа микроРНК с применением трёх шпилечных зондов, из которых в конечном счёте образуются Y-структуры. В электрохимическом методе анализа микроРНК-181 [124] итоговые биотинилированные Y-структуры формировались вблизи поверхности электрода и впоследствии реагировали с конъюгатом стрептавидина и щелочной фосфатазы (рис. 7, а). Определение ферментативной активности фосфатазы вольтамперометрическим методом позволило получить предел обнаружения микроРНК-181, равный 7 фМ. Рабочий диапазон данного метода лежал в интервале 10 фМ–100 нМ, т.е. был достаточно широким.

С помощью разработанного метода успешно проведены определения микроРНК-181 в экзосомах сывороток крови больных с ишемической болезнью сердца и здоровых людей.

Существенным фактором, ограничивающим чувствительность методов с использованием СНА, является фоновая реакция зондов в отсутствие аналита. Для понижения степени протекания данной реакции были предложены различные стратегии. Одной из первых была предложена стратегия использования одного из зондов с одним или двумя нуклеотидами не комплементарными другому зонду. Это понизило вероятность гибридизации шпилек, находящихся в динамическом равновесии между открытой и



закрытой формами [125]. Jiang et al. [125] назвали данный метод СНА с некомплементарным противостоянием нуклеотидов (Mismatched Catalytic Hairpin Assembly, мСНА). Применение мСНА позволяет значительно понизить интенсивность фоновой реакции, однако полностью её подавить не способно.

Другой причиной, приводящей к протеканию фоновой реакции, является наличие в растворах шпилечных зондов молекул с дефектной вторичной структурой. Так как шпилечная структура зондов формируется на этапе их отжига, недавно проведено детальное исследование влияния условий отжига олигонуклеотидных зондов на интенсивность фоновой реакции в мСНА [126]. Понижение концентрации олигонуклеотидов, а также оптимизация концентрации солей (таких как NaCl и MgCl<sub>2</sub>) в буфере отжига зондов привело к снижению интенсивности фоновой реакции и позволило в 20 раз понизить предел обнаружения миРНК-141. Несмотря на достигнутые значительные успехи при решении данной задачи, на сегодняшний день окончательного решения данной проблемы пока не предложено.

Таким образом, в настоящее время с использованием разнообразных методов амплификации нуклеиновых кислот разработано большое число методов определения миРНК. Однако так как концентрация некоторых миРНК в биологических образцах крайне низкая, а в некоторых случаях при патологических состояниях она дополнительно понижается [14], требуются методы анализа с повышенной чувствительностью. Кроме того, как было уже отмечено выше, для более точной оценки концентрации миРНК требуются методы с высокими значениями коэффициента чувствительности.

**Каскадные методы амплификации.** Для улучшения данных аналитических параметров, характеризующих методы определения миРНК, могут быть использованы каскадные методы амплификации, в которых используется сочетание различных типов амплификации. В таких методах анализа миРНК запускает первый тип амплификации, а образующийся продукт является инициатором для последующей амплификации.

Используя данный подход, недавно был сконструирован метод определения миРНК let-7a, в котором последовательно использовались RCA и LAMP [127]. При детекции продукта LAMP флуоресцентным методом миРНК let-7a детектировалось вплоть до 10 аМ. Кросс-реактивность метода в отношении других миРНК семейства let-7 не превышала 19%. Описаны также высокочувствительные методы анализа

миРНК, основанные на сочетании RCA с CEAM или СНА. В одних методах CEAM [128] и СНА [129] используются на втором этапе после RCA, в других – RCA используется для повышения эффективности CEAM [130] и СНА [131]. Объединение RCA с CRISPR/Cas13a позволило разработать метод с субфемтомольными пределами обнаружения миРНК [132].

Ранее отмечалось, что при использовании EXPAR образуется большое количество неспецифических продуктов, что, в свою очередь, приводит к ложноположительным сигналам. Для устранения этого недостатка Liu et al. [133] предложили метод с каскадной амплификацией, в котором вместо неспецифической детекции продуктов с помощью интеркалирующих красителей использовался СНА, позволяющий специфически детектировать миРНК-зависимый продукт EXPAR. Предел обнаружения миРНК-21, достигнутый при помощи данного метода, составил 3 фМ.

Описано также применение каскадных бесферментных методов амплификации. Fu et al. [134] применили стратегию каскадной амплификации, основанной на сочетании СНА и HCR. В этом методе HCR-зонды содержали инвертазу как метку, что позволило регистрировать аналитический сигнал, образующийся при определении миРНК-155, с помощью мобильного глюкометра. Предел обнаружения данного метода составил 0,36 фМ. Следует отметить, что при отсутствии второй амплификации в каскаде чувствительность детекции миРНК понижалась на 3 порядка. Благодаря взаимодействию миРНК с зондом шпилечной структуры на первом этапе метод также показал высокую специфичность.

Таким образом, с использованием каскадных методов амплификации разработаны методы определения миРНК с чрезвычайно высокой чувствительностью, вплоть до аттомолярных концентраций [135–136]. В то же время следует отметить, что не во всех описанных случаях применение каскадной амплификации было успешным. Хотя на настоящий момент число публикаций, посвящённых разработке новых методов определения миРНК с применением каскадной амплификации невелико, наблюдается тенденция повышения интереса к данному подходу улучшения чувствительности анализа миРНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальный анализ литературы показывает, что с каждым годом разрабатывается всё больше

новых высокоэффективных методов определения микроРНК. Многие из них позволяют успешно оценивать уровень микроРНК-маркёров в клетках, экзосомах и биологических жидкостях, таких как сыворотка/плазма крови, моча, слезы, что является хорошим заделом для развития малоинвазивной диагностики. Полученные при этом новыми методами данные согласуются с результатами, демонстрируемыми RT-qPCR [64, 78, 124]. Разрабатываемые методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Вместе с тем пока внимание большинства исследователей акцентировано на оценках предела обнаружения, рабочего диапазона и специфичности разрабатываемых методов, оставляя за скобками такой важный аналитический параметр, как коэффициент чувствительности, часто являющийся ключевым при регистрации отклонений в уровне экспрессии микроРНК в образцах пациентов с различными патологиями. Данная проблема заслуживает более пристального рассмотрения [67].

Для повышения чувствительности анализа микроРНК используются разнообразные методы амплификации. В последние годы из-за простоты проведения большой интерес исследователей привлекают МИА. Особенно заманчиво выглядит перспектива создания методов анализа на основе бесферментных МИА, что позволит, с одной стороны, преодолеть проблему синтеза неспецифических продуктов полимеразы, а с другой стороны, понизить стоимость определения микроРНК. Кроме повышения чувствитель-

ности за счёт применения методов амплификации, улучшается и специфичность методов определения микроРНК, что чрезвычайно важно, учитывая высокое разнообразие микроРНК в биологических объектах. Применение каскадных методов амплификации и высокочувствительных методов детекции [137–138] создаёт платформу для дальнейшего повышения чувствительности методов анализа микроРНК.

Большое внимание специалистов привлекают не только аналитические параметры методов анализа микроРНК, но также их технологичность, стоимость производства и лёгкость автоматизации. Не последнее место среди этих требований занимает и производительность метода анализа. С учётом сказанного, в первую очередь проявляется интерес к оптическим методам анализа микроРНК, основанным на применении МИА.

Все вышесказанное показывает актуальность дальнейших интенсивных исследований в области разработки методов определения микроРНК и их внедрения в аналитическую практику.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 21-54-53007).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
2. Pritchard, C. C., Cheng, H. H., and Tewari, M. (2012) MicroRNA profiling: Approaches and considerations, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 358-369, doi: 10.1038/nrg3198.
3. De Planell-Saguer, M., and Rodicio, M. C. (2011) Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review, *Anal. Chim. Acta*, **699**, 134-152, doi: 10.1016/j.aca.2011.05.025.
4. Ragan, C., Zuker, M., and Ragan, M. A. (2011) Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations, *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1001090, doi: 10.1371/journal.pcbi.1001090.
5. Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: From microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D155-D162, doi: 10.1093/nar/gky1141.
6. Plotnikova, O., Baranova, A., and Skoblov, M. (2019) Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome, *Front. Genet.*, **10**, 933, doi: 10.3389/fgene.2019.00933.
7. Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 597-610, doi: 10.1038/nrg2843.
8. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S. I., et al. (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly (A) polymerase GLD-2, *Genes Dev.*, **23**, 433-438, doi: 10.1101/gad.1761509.
9. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, **75**, 843-854, doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
10. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
11. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genom.*, **8**, 1-20, doi: 10.1186/1471-2164-8-166.
12. Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., et al. (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development, *Science*, **309**, 310-311, doi: 10.1126/science.1114519.
13. Alvarez-Garcia, I., and Miska, E. A. (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease, *Development*, **132**, 4653-4662, doi: 10.1242/dev.02073.

14. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, **435**, 834-838, doi: 10.1038/nature03702.
15. Lee, J. S., Ahn, Y. H., Won, H. S., Sun, D. S., Kim, Y. H., et al. (2017) Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis, *BioMed Res. Int.*, **2017**, doi: 10.1155/2017/1928021.
16. Zhang, L., Wu, H., Zhao, M., and Lu, Q. (2020) Identifying the differentially expressed microRNAs in autoimmunity: a systemic review and meta-analysis, *Autoimmunity*, **53**, 122-136, doi: 10.1080/08916934.2019.1710135.
17. He, M., Zhang, H. N., Tang, Z. C., Gao, S. G. (2021) Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases, *J. Neural Transplant. Plast.*, **2021**, doi: 10.1155/2021/8884642.
18. Ono, K., Kuwabara, Y., and Han, J. (2011) MicroRNAs and cardiovascular diseases, *FEBS J.*, **278**, 1619-1633, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08090.x.
19. Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., et al. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biol.*, **5**, 1-11, doi: 10.1186/gb-2004-5-3-r13.
20. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell*, **75**, 855-862, doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.
21. Válczy, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S., et al. (2004) Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Res.*, **32**, e175-e175, doi: 10.1093/nar/gnh171.
22. Várallyay, E., Burgyán, J., and Havelda, Z. (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes, *Nat. Protoc.*, **3**, 190-196, doi: 10.1038/nprot.2007.528.
23. Pall, G. S., Codony-Servat, C., Byrne, J., Ritchie, L., and Hamilton, A. (2007) Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot, *Nucleic Acids Res.*, **35**, e60, doi: 10.1093/nar/gkm112.
24. Ramkissoon, S. H., Mainwaring, L. A., Sloand, E. M., Young, N. S., and Kajigaya, S. (2006) Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes, *Mol. Cell. Probes*, **20**, 1-4, doi: 10.1016/j.mcp.2005.07.004.
25. Kim, S. W., Li, Z., Moore, P. S., Monaghan, A. P., Chang, Y., et al. (2010) A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e98-e98, doi: 10.1093/nar/gkp1235.
26. Johnson, B. N., and Mutharasan, R. (2014) Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges, *Analyst*, **139**, 1576-1588, doi: 10.1039/C3AN01677C.
27. Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., et al. (2013) MicroRNA: function, detection, and bioanalysis, *Chem. Rev.*, **113**, 6207-6233, doi: 10.1021/cr300362f.
28. Shimomura, A., Shino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., et al. (2016) Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage, *Cancer Sci.*, **107**, 326-334, doi: 10.1111/cas.12880.
29. Gungormez, C., Aktas, H. G., Dilsiz, N., and Borazan, E. (2019) Novel miRNAs as potential biomarkers in stage II colon cancer: microarray analysis, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 4175-4183, doi: 10.1007/s11033-019-04868-7.
30. Li, W., and Ruan, K. (2009) MicroRNA detection by microarray, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1117-1124, doi: 10.1007/s00216-008-2570-2.
31. Ueno, T., and Funatsu, T. (2014) Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray, *PLoS One*, **9**, e90920, doi: 10.1371/journal.pone.0090920.
32. Wang, H., Ach, R. A., and Curry, B. O. (2007) Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA, *RNA*, **13**, 151-159, doi: 10.1261/rna.234507.
33. Castoldi, M., Schmidt, S., Benes, V., Noerholm, M., Kulozik, A. E., et al. (2006) A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA), *RNA*, **12**, 913-920, doi: 10.1261/rna.2332406.
34. Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S., and Croce, C. M. (2008) MicroRNA expression profiling using microarrays, *Nat. Protoc.*, **3**, 563-578, doi: 10.1038/nprot.2008.14.
35. Tian, R., Ning, W., Chen, M., Zhang, C., Li, Q., et al. (2019) High performance electrochemical biosensor based on 3D nitrogen-doped reduced graphene oxide electrode and tetrahedral DNA nanostructure, *Talanta*, **194**, 273-281, doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.110.
36. Kutluk, H., Bruch, R., Urban, G. A., and Dincer, C. (2020) Impact of assay format on miRNA sensing: Electrochemical microfluidic biosensor for miRNA-197 detection, *Biosens. Bioelectron.*, **148**, 111824, doi: 10.1016/j.bios.2019.111824.
37. Smith, D. A., Simpson, K., Cicero, M. L., Newbury, L. J., Nicholas, P., et al. (2021) Detection of urinary microRNA biomarkers using diazo sulfonamide-modified screen-printed carbon electrodes, *RSC Adv.*, **11**, 18832-18839, doi: 10.1039/D0RA09874D.
38. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2019) Chemiluminescent determination of microRNA-141 using target-dependent activation of the peroxidase-mimicking DNAzyme, *Anal. Lett.*, **52**, 813-824, doi: 10.1080/00032719.2018.1498506.
39. Lai, M., and Slaughter, G. (2019) Label-free MicroRNA optical biosensors, *Nanomaterials*, **9**, 1573, doi: 10.3390/nano9111573.
40. Xue, T., Liang, W., Li, Y., Sun, Y., Xiang, Y., et al. (2019) Ultrasensitive detection of miRNA with an antimonene-based surface plasmon resonance sensor, *Nat. Commun.*, **10**, 1-9, doi: 10.1038/s41467-018-07947-8.
41. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179, doi: 10.1093/nar/gni178.
42. Lao, T. D., and Le, T. A. H. (2020) Development of stem-loop real-time PCR technique for miRNA-141 expression analysis in nasopharyngeal carcinoma, *Asian J. Pharm. Res. Health Care*, **11**, 30-36, doi: 10.18311/ajphrc/2019/24990.
43. Xu, Y. F., Hannafon, B. N., Khatir, U., Gin, A., and Ding, W. Q. (2019) The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells, *RNA Biol.*, **16**, 770-784, doi: 10.1080/15476286.2019.1585738.
44. Zhang, L., Lin, J., Ye, Y., Oba, T., Gentile, E., et al. (2018) Serum microRNA-150 predicts prognosis for early-stage non-small cell lung cancer and promotes tumor cell proliferation by targeting tumor suppressor gene SRCIN1, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **103**, 1061-1073, doi: 10.1002/cpt.870.
45. Konoshenko, M. Y., Lekhnov, E. A., Bryzgunova, O. E., Zaporozhchenko, I. A., Yarmoschuk, S. V., et al. (2020) The panel of 12 cell-free microRNAs as potential biomarkers in prostate neoplasms, *Diagnostics*, **10**, 38, doi: 10.3390/diagnostics10010038.
46. Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R., and Kubista, M. (2017) Two-tailed RT-qPCR: A novel method

- for highly accurate miRNA quantification, *Nucleic Acids Res.*, **45**, e144-e144, doi: 10.1093/nar/gkx588.
47. Raabe, C. A., Tang, T. H., Brosius, J., and Rozhdestvensky, T. S. (2014) Biases in small RNA deep sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1414-1426, doi: 10.1093/nar/gkt1021.
48. Zhang, J., Li, Z., Wang, H., Wang, Y., Jia, H., and Yan, J. (2011) Ultrasensitive quantification of mature microRNAs by real-time PCR based on ligation of a ribonucleotide-modified DNA probe, *Chem. Commun.*, **47**, 9465-9467, doi: 10.1039/C1CC13466C.
49. Tian, H., Sun, Y., Liu, C., Duan, X., Tang, W., et al. (2016) Precise quantitation of microRNA in a single cell with droplet digital PCR based on ligation reaction, *Anal. Chem.*, **88**, 11384-11389, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01225.
50. Zhao, G., Jiang, T., Liu, Y., Huai, G., Lan, C., et al. (2018) Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer, *BMC Cancer*, **18**, 1-10, doi: 10.1186/s12885-018-4601-5.
51. Cirillo, P. D., Margiotti, K., Mesoraca, A., and Giorlandino, C. (2020) Quantification of circulating microRNAs by droplet digital PCR for cancer detection, *BMC Res. Notes*, **13**, 1-6, doi: 10.1186/s13104-020-05190-3.
52. Friedländer, M. R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., et al. (2008) Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 407-415, doi: 10.1038/nbt1394.
53. Dave, V. P., Ngo, T. A., Pernestig, A. K., Tilevik, D., Kant, K., et al. (2019) MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics, *Lab. Invest.*, **99**, 452-469, doi: 10.1038/s41374-018-0143-3.
54. Castoldi, M., Collier, P., Nolan, T., and Benes, V. (2013) Expression profiling of microRNAs by quantitative real-time PCR: the good, the bad, and the ugly, *PCR Technology: Current Innovations*, 307-319, Boca Raton, FL: CRC Press.
55. Borst, A., Box, A. T. A., and Fluit, A. C. (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**, 289-299, doi: 10.1007/s10096-004-1100-1.
56. García, P. B., Robledo, N. L., and Islas, A. L. (2004) Analysis of non-template-directed nucleotide addition and template switching by DNA polymerase, *Biochemistry*, **43**, 16515-16524, doi: 10.1021/bi0491853.
57. Lomidze, L., Williford, T. H., Musier-Forsyth, K., and Kankia, B. (2018) Isothermal amplification of long DNA segments by quadruplex priming amplification, *Anal. Methods*, **10**, 2972-2979, doi: 10.1039/C8AY00843D.
58. Jonstrup, S. P., Koch, J., and Kjems, J. (2006) A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification, *RNA*, **12**, 1747-1752, doi: 10.1261/rna.110706.
59. Wu, X., Zhu, S., Huang, P., and Chen, Y. (2016) Highly specific quantification of microRNA by coupling probe-rolling circle amplification and Förster resonance energy transfer, *Anal. Biochem.*, **502**, 16-23, doi: 10.1016/j.ab.2016.03.001.
60. Li, R., Liu, Q., Jin, Y., and Li, B. (2020) Sensitive colorimetric determination of microRNA let-7a through rolling circle amplification and a peroxidase-mimicking system composed of trimeric G-triplex and hemin DNAzyme, *Microchim. Acta*, **187**, 1-8, doi: 10.1007/s00604-019-4093-2.
61. Kumara, G. S. R., Pandith, A., and Seo, Y. J. (2020) Highly fluorescent morpholine naphthalimide deoxyuridine nucleotide for the detection of miRNA 24-3P through rolling circle amplification, *Analyst*, **145**, 4777-4781, doi: 10.1039/D0AN00723D.
62. Zhou, Y., Huang, Q., Gao, J., Lu, J., Shen, X., et al. (2010) A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e156, doi: 10.1093/nar/gkq556.
63. Li, R., Wang, Y., Wang, P., and Lu, J. (2017) A dual discrimination mode for improved specificity towards let-7a detection via a single-base mutated padlock probe-based exponential rolling circle amplification, *Luminescence*, **32**, 1574-1581, doi: 10.1002/bio.3362.
64. Liu, H., Li, L., Duan, L., Wang, X., Xie, Y., Tong, L., et al. (2013) High specific and ultrasensitive isothermal detection of microRNA by padlock probe-based exponential rolling circle amplification, *Anal. Chem.*, **85**, 7941-7947, doi: 10.1021/ac401715k.
65. Chen, S., Zhao, J., Xu, C., Sakharov, I. Y., and Zhao, S. (2021) Absolute quantification of microRNAs in a single cell with chemiluminescence detection based on rolling circle amplification on a microchip platform, *Anal. Chem.*, **93**, 9218-9225, doi: 10.1021/acs.analchem.1c01463.
66. Zhang, X., Liu, Y., Yang, Y., Huang, J., Wang, H., et al. (2018) Ligation-promoted hyperbranched rolling circle amplification enables ultrasensitive detection of microRNA in clinical specimens, *Sens. Actuators B Chem.*, **277**, 634-639, doi: 10.1016/j.snb.2018.09.058.
67. Бодулев О. Л., Сахаров И. Ю. (2022) Планшетный хемилюминесцентный метод определения микроРНК-141, основанный на применении каталитической сборки шпилек и конъюгата стрептавидина и полипероксидазы, *Журн. Анал. Химии*, **77**, 366-374, doi: 10.31857/S0044450222040053.
68. Eslamizadeh, S., Heidari, M., Agah, S., Faghiehloo, E., Ghazi, H., et al. (2018) The role of microRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal cancer, *Cell J.*, **20**, 220, doi: 10.22074/cellj.2018.5366.
69. Zhang, S., Liu, C., Zou, X., Geng, X., Zhou, X., et al. (2021) MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer, *PeerJ*, **9**, e11441, doi: 10.7717/peerj.11441.
70. Zyrina, N. V., and Antipova, V. N. (2021) Nonspecific synthesis in the reactions of isothermal nucleic acid amplification, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 887-897, doi: 10.1134/S0006297921070099.
71. Van Ness, J., Van Ness, L. K., and Galas, D. J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4504-4509, doi: 10.1073/pnas.0730811100.
72. Jia, H., Li, Z., Liu, C., and Cheng, Y. (2010) Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5498-5501, doi: 10.1002/anie.201001375.
73. Wu, H., Wu, J., Liu, Y., Wang, H., and Zou, P. (2019) Fluorometric determination of microRNA using arched probe-mediated isothermal exponential amplification combined with DNA-templated silver nanoclusters, *Microchim. Acta*, **186**, 1-8, doi: 10.1007/s00604-019-3836-4.
74. Reid, M. S., Le, X. C., and Zhang, H. (2018) Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and enzyme activities: An EXPAR example, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 11856-11866, doi: 10.1002/anie.201712217.
75. Chen, J., An, T., Ma, Y., Situ, B., Chen, D., et al. (2018) Isothermal amplification on a structure-switchable symmetric toehold dumbbell-template: A strategy enabling MicroRNA analysis at the single-cell level with ultrahigh specificity and accuracy, *Anal. Chem.*, **90**, 859-865, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03713.

76. Li, C., Li, Z., Jia, H., and Yan, J. (2011) One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Chem. Commun.*, **47**, 2595-2597, doi: 10.1039/C0CC03957H.
77. Tran, D. H., and Phung, H. T. T. (2020) Detecting *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *J. Parasit. Dis.*, **44**, 364-373, doi: 10.1007/s12639-019-01164-w.
78. Du, W., Lv, M., Li, J., Yu, R., and Jiang, J. (2016) A ligation-based loop-mediated isothermal amplification (ligation-LAMP) strategy for highly selective microRNA detection, *Chem. Commun.*, **52**, 12721-12724, doi: 10.1039/C6CC06160E.
79. Liu, L., Deng, D., Wu, D., Hou, W., Wang, L., et al. (2021) Duplex-specific nuclease-based electrochemical biosensor for the detection of microRNAs by conversion of homogeneous assay into surface-tethered electrochemical analysis, *Anal. Chim. Acta*, **1149**, 338199, doi: 10.1016/j.aca.2021.338199.
80. Yin, B. C., Liu, Y. Q., and Ye, B. C. (2012) One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 5064-5067, doi: 10.1021/ja300721s.
81. Ma, X., Xu, H., Qian, K., Kandawa-Schulz, M., Miao, W., et al. (2020) Electrochemical detection of microRNAs based on AuNPs/CNNS nanocomposite with Duplex-specific nuclease assisted target recycling to improve the sensitivity, *Talanta*, **208**, 120441, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120441.
82. Sang, Y., Xu, Y., Xu, L., Cheng, W., Li, X., et al. (2017) Colorimetric and visual determination of microRNA via cycling signal amplification using T7 exonuclease, *Microchim. Acta*, **184**, 2465-2471, doi: 10.1007/s00604-017-2238-8.
83. Zheng, Y., Chen, J., Li, Y., Xu, Y., Chen, L., et al. (2021) Dual-probe fluorescent biosensor based on T7 exonuclease-assisted target recycling amplification for simultaneous sensitive detection of microRNA-21 and microRNA-155, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 1605-1614, doi: 10.1007/s00216-020-03121-6.
84. Wang, M., Fu, Z., Li, B., Zhou, Y., Yin, H., et al. (2014) One-step, ultrasensitive, and electrochemical assay of microRNAs based on T7 exonuclease assisted cyclic enzymatic amplification, *Anal. Chem.*, **86**, 5606-5610, doi: 10.1021/ac5010376.
85. Zhang, P., Zhuo, Y., Chang, Y., Yuan, R., and Chai, Y. (2015) Electrochemiluminescent graphene quantum dots as a sensing platform: A dual amplification for microRNA assay, *Anal. Chem.*, **87**, 10385-10391, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02495.
86. Chen, Z., Xie, Y., Huang, W., Qin, C., Yu, A., et al. (2019) Exonuclease-assisted target recycling for ultrasensitive electrochemical detection of microRNA at vertically aligned carbon nanotubes, *Nanoscale*, **11**, 11262-11269, doi: 10.1039/c9nr02543j.
87. Liu, M. X., Liang, S., Tang, Y., Tian, J., Zhao, Y., et al. (2018) Rapid and label-free fluorescence bioassay for microRNA based on exonuclease III-assisted cycle amplification, *RSC Adv.*, **8**, 15967-15972, doi: 10.1039/c8ra01605d.
88. Tang, Y., Liu, M., Zhao, Z., Li, Q., Liang, X., et al. (2019) Fluorometric determination of microRNA-122 by using ExoIII-aided recycling amplification and polythymine induced formation of copper nanoparticles, *Microchim. Acta*, **186**, 133, doi: 10.1007/s00604-019-3237-8.
89. Yan, X. M., Wang, Y. Q., Chen, Y., Chen, Z. P., and Yu, R. Q. (2020) Detection of microRNAs by the combination of exonuclease-III assisted target recycling amplification and repeated-fishing strategy, *Anal. Chim. Acta*, **1131**, 1-8, doi: 10.1016/j.aca.2020.07.025.
90. Miao, P., Wang, B., Yu, Z., Zhao, J., and Tang, Y. (2015) Ultrasensitive electrochemical detection of microRNA with star trigon structure and endonuclease mediated signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **63**, 365-370, doi: 10.1016/j.bios.2014.07.075.
91. Huang, Y., Wang, W., Wu, T., Xu, L. P., Wen, Y., et al. (2016) A three-line lateral flow biosensor for logic detection of microRNA based on Y-shaped junction DNA and target recycling amplification, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 8195-8202, doi: 10.1007/s00216-016-9925-x.
92. Luo, L., Wang, L., Zeng, L., Wang, Y., Weng, Y., et al. (2020) A ratiometric electrochemical DNA biosensor for detection of exosomal microRNA, *Talanta*, **207**, 120298, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120298.
93. Gong, S., Zhang, S., Lu, F., Pan, W., Li, N., and Tang, B. (2021) CRISPR/Cas-based *in vitro* diagnostic platforms for cancer biomarker detection, *Anal. Chem.*, **93**, 11899-11909, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02533.
94. Kim, S., Ji, S., and Koh, H. R. (2021) CRISPR as a diagnostic tool, *Biomolecules*, **11**, 1162, doi: 10.3390/biom11081162.
95. Zhang, F. (2019) Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond, *Q. Rev. Biophys.*, **52**, e6, 1-31, doi: 10.1017/S0033583519000052.
96. Shan, Y., Zhou, X., Huang, R., and Xing, D. (2019) High-fidelity and rapid quantification of miRNA combining crRNA programmability and CRISPR/Cas13a trans-cleavage activity, *Anal. Chem.*, **91**, 5278-5285, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00073.
97. Yuan, C., Tian, T., Sun, J., Hu, M., Wang, X., et al. (2020) Universal and naked-eye gene detection platform based on the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas12a/13a system, *Anal. Chem.*, **92**, 4029-4037, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05597.
98. Bruch, R., Johnston, M., Kling, A., Mattmüller, T., Baaske, J., et al. (2021) CRISPR-powered electrochemical microfluidic multiplexed biosensor for target amplification-free miRNA diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, **177**, 112887, doi: 10.1016/j.bios.2020.112887.
99. Granados-Riveron, J. T., and Aquino-Jarquín, G. (2021) CRISPR/Cas13-based approaches for ultrasensitive and specific detection of microRNAs, *Cells*, **10**, 1655, doi: 10.3390/cells10071655.
100. Sha, Y., Huang, R., Huang, M., Yue, H., Shan, Y., et al. (2021) Cascade CRISPR/Cas enables amplification-free microRNA sensing with fM-sensitivity and single-base-specificity, *Chem. Commun.*, **57**, 247-250, doi: 10.1039/D0CC06412B.
101. Zhang, G., Zhang, L., Tong, J., Zhao, X., and Ren, J. (2020) CRISPR-Cas12a enhanced rolling circle amplification method for ultrasensitive miRNA detection, *Microchem. J.*, **158**, 105239, doi: 10.1016/j.microc.2020.105239.
102. Zhou, T., Huang, R., Huang, M., Shen, J., Shan, Y., et al. (2020) CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific miRNA detection, *Adv. Sci.*, **7**, 1903661, doi: 10.1002/adv.201903661.
103. Giuffrida, M. C., Zanolli, L. M., D'Agata, R., Finotti, A., Gambari, R., et al. (2015) Isothermal circular-strand-displacement polymerization of DNA and microRNA in digital microfluidic devices, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 1533-1543, doi: 10.1007/s00216-014-8405-4.
104. Wang, B., You, Z., and Ren, D. (2019) Target-assisted FRET signal amplification for ultrasensitive detection of microRNA, *Analyst*, **144**, 2304-2311, doi: 10.1039/C8AN02266F.
105. Ma, W., Situ, B., Lv, W., Li, B., Yin, X., et al. (2016) Electrochemical determination of microRNAs based on

- isothermal strand-displacement polymerase reaction coupled with multienzyme functionalized magnetic microcarriers, *Biosens. Bioelectron.*, **80**, 344-351, doi: 10.1016/j.bios.2015.12.064.
106. Cai, S., Ye, J., Al-Maskri, A. A. A., Sun, L., and Zeng, S. (2019) A conformational switch-based aptasensor for the chemiluminescence detection of microRNA, *Luminescence*, **34**, 823-829, doi: 10.1002/bio.3677.
107. Solovjev, A. M., Galkin, I. I., Pletjushkina, O. Y., Medvedko, A. V., Zhao, S., et al. (2021) Isothermal chemiluminescent assay based on circular strand-displacement polymerization reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts, *Int. J. Biol. Macromolecules*, **182**, 987-992, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.101.
108. Ang, Y. S., and Yung, L.-Y. L. (2016) Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification, *Chem. Commun.*, **52**, 4219-4222, doi: 10.1039/C5CC08907G.
109. Zhang, H., Liu, X., Zhang, C., Xu, Y., Su, J., et al. (2020) A DNA tetrahedral structure-mediated ultrasensitive fluorescent microarray platform for nucleic acid test, *Sens. Actuators B Chem.*, **321**, 128538, doi: 10.1016/j.snb.2020.128538.
110. Miao, P., Tang, Y., and Yin, J. (2015) MicroRNA detection based on analyte triggered nanoparticle localization on a tetrahedral DNA modified electrode followed by hybridization chain reaction dual amplification, *Chem. Commun.*, **51**, 15629-15632, doi: 10.1039/C5CC05499K.
111. Ge, Z., Lin, M., Wang, P., Pei, H., Yan, J., et al. (2014) Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor, *Anal. Chem.*, **86**, 2124-2130, doi: 10.1021/ac4037262.
112. Liu, H., Bei, X., Xia, Q., Fu, Y., Zhang, S., et al. (2016) Enzyme-free electrochemical detection of microRNA-21 using immobilized hairpin probes and a target-triggered hybridization chain reaction amplification strategy, *Microchim. Acta*, **183**, 297-304, doi: 10.1007/s00604-015-1636-z.
113. Guo, Q., Yu, Y., Zhang, H., Cai, C., and Shen, Q. (2020) Electrochemical sensing of exosomal microRNA based on hybridization chain reaction signal amplification with reduced false-positive signals, *Anal. Chem.*, **92**, 5302-5310, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05849.
114. Xiong, Z., Pan, R., Hu, Q., Yun, W., Li, N., et al. (2020) One-step triggered branched DNA nanostructure for ultra-sensitive electrochemical detection of microRNA, *Microchem. J.*, **158**, 105186, doi: 10.1016/j.microc.2020.105186.
115. Hosseinzadeh, E., Ravan, H., Mohammadi, A., and Pourghadamyari, H. (2020) Colorimetric detection of miRNA-21 by DNAzyme-coupled branched DNA constructs, *Talanta*, **216**, 120913, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120913.
116. Li, Y., Huang, C. Z., and Li, Y. F. (2019) Ultrasensitive electrochemiluminescence detection of MicroRNA via one-step introduction of a target-triggered branched hybridization chain reaction circuit, *Anal. Chem.*, **91**, 9308-9314, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02580.
117. Shen, Z., He, L., Wang, W., Tan, L., and Gan, N. (2020) Highly sensitive and simultaneous detection of microRNAs in serum using stir-bar assisted magnetic DNA nanospheres-encoded probes, *Biosens. Bioelectron.*, **148**, 111831, doi: 10.1016/j.bios.2019.111831.
118. Shuai, H. L., Huang, K. J., Xing, L. L., and Chen, Y. X. (2016) Ultrasensitive electrochemical sensing platform for microRNA based on tungsten oxide-graphene composites coupling with catalyzed hairpin assembly target recycling and enzyme signal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **86**, 337-345, doi: 10.1016/j.bios.2016.06.057.
119. Ji, D., Mou, X., and Kwok, C. K. (2019) Label-free and ratiometric detection of microRNA based on target-induced catalytic hairpin assembly and two fluorescent dyes, *Anal. Methods*, **11**, 4808-4813, doi: 10.1039/C9AY01891C.
120. Li, C., Huang, Y., and Yang, Y. (2021) Coupling of an antifouling and reusable nanoplatfrom with catalytic hairpin assembly for highly sensitive detection of nucleic acids using zeta potential as signal readout, *Sens. Actuators B Chem.*, **326**, 128845, doi: 10.1016/j.snb.2020.128845.
121. Jin, F., and Xu, D. (2021) A fluorescent microarray platform based on catalytic hairpin assembly for MicroRNAs detection, *Anal. Chim. Acta*, **1173**, 338666, doi: 10.1016/j.aca.2021.338666.
122. Jiang, Z., Wang, H., Zhang, X., Liu, C., and Li, Z. (2014) An enzyme-free signal amplification strategy for sensitive detection of microRNA via catalyzed hairpin assembly, *Anal. Methods*, **6**, 9477-9482, doi: 10.1039/C4AY02142H.
123. Zhang, Y., Zhang, X., Situ, B., Wu, Y., Luo, S., et al. (2021) Rapid electrochemical biosensor for sensitive profiling of exosomal microRNA based on multifunctional DNA tetrahedron assisted catalytic hairpin assembly, *Biosens. Bioelectron.*, **183**, 113205, doi: 10.1016/j.bios.2021.113205.
124. Zhang, R. Y., Luo, S. H., Lin, X. M., Hu, X. M., Zhang, Y., et al. (2021) A novel electrochemical biosensor for exosomal microRNA-181 detection based on a catalytic hairpin assembly circuit, *Anal. Chim. Acta*, **1157**, 338396, doi: 10.1016/j.aca.2021.338396.
125. Jiang, Y. S., Bhadra, S., Li, B., and Ellington, A. D. (2014) Mismatches improve the performance of strand-displacement nucleic acid circuits, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **126**, 1876-1879, doi: 10.1002/ange.201307418.
126. Bodulev, O. L., Zhao, S., and Sakharov, I. Y. (2021) Improving the sensitivity of the miRNA assay coupled with the mismatched catalytic hairpin assembly reaction by optimization of hairpin annealing conditions, *Anal. Chem.*, **93**, 6824-6830, doi: 10.1021/acs.analchem.1c00820.
127. Tian, W., Li, P., He, W., Liu, C., and Li, Z. (2019) Rolling circle extension-actuated loop-mediated isothermal amplification (RCA-LAMP) for ultrasensitive detection of microRNAs, *Biosens. Bioelectron.*, **128**, 17-22, doi: 10.1016/j.bios.2018.12.041.
128. Zhou, C., Huang, R., Zhou, X., and Xing, D. (2020) Sensitive and specific microRNA detection by RNA dependent DNA ligation and rolling circle optical signal amplification, *Talanta*, **216**, 120954, doi: 10.1016/j.talanta.2020.120954.
129. Zhuang, J., Lai, W., Chen, G., and Tang, D. (2014) A rolling circle amplification-based DNA machine for miRNA screening coupling catalytic hairpin assembly with DNAzyme formation, *Chem. Commun.*, **50**, 2935-2938, doi: 10.1039/C3CC49873E.
130. Fan, T., Mao, Y., Liu, F., Zhang, W., Lin, J. S., et al. (2019) Label-free fluorescence detection of circulating microRNAs based on duplex-specific nuclease-assisted target recycling coupled with rolling circle amplification, *Talanta*, **200**, 480-486, doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.038.
131. Wang, S., Lu, S., Zhao, J., Ye, J., Huang, J., and Yang, X. (2019) An electric potential modulated cascade of catalyzed hairpin assembly and rolling chain amplification for microRNA detection, *Biosens. Bioelectron.*, **126**, 565-571, doi: 10.1016/j.bios.2018.09.088.
132. Huang, M., Huang, R., Yue, H., Shan, Y., and Xing, D. (2020) Ultrasensitive and high-specific microRNA detection using hyper-branching rolling circle amplified

- CRISPR/Cas13a biosensor, *Sens. Actuators B Chem.*, **325**, 128799, doi: 10.1016/j.snb.2020.128799.
133. Liu, H., Tian, T., Zhang, Y., Ding, L., Yu, J., et al. (2017) Sensitive and rapid detection of microRNAs using hairpin probes-mediated exponential isothermal amplification, *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 710-714, doi: 10.1016/j.bios.2016.10.099.
134. Fu, P., Xu, M., Xing, S., Zhao, Y., and Zhao, C. (2021) Dual cascade isothermal amplification reaction based glucometer sensors for point-of-care diagnostics of cancer-related microRNAs, *Analyst*, **146**, 3242-3250, doi: 10.1039/D1AN00037C.
135. Song, W., Zhang, F., Song, P., Zhang, Z., He, P., et al. (2021) Untrasensitive photoelectrochemical sensor for microRNA detection with DNA walker amplification and cation exchange reaction, *Sens. Actuators B Chem.*, **327**, 128900, doi: 10.1016/j.snb.2020.128900.
136. Yuan, Y. H., Chi, B. Z., Wen, S. H., Liang, R. P., Li, Z. M., et al. (2018) Ratiometric electrochemical assay for sensitive detecting microRNA based on dual-amplification mechanism of duplex-specific nuclease and hybridization chain reaction, *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 211-216, doi: 10.1016/j.bios.2017.11.030.
137. Bodulev, O. L., Burkin, K. M., Efremov, E. E., and Sakharov, I. Y. (2020) One-pot microplate-based chemiluminescent assay coupled with catalytic hairpin assembly amplification for DNA detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 5105-5111, doi: 10.1007/s00216-020-02438-6.
138. Kolosova, A. Y., and Sakharov, I. Y. (2019) Triple amplification strategy for the improved efficiency of a microplate-based assay for the chemiluminescent detection of DNA, *Anal. Lett.*, **52**, 1352-1362, doi: 10.1080/00032719.2018.1539091.

## MODERN METHODS FOR DETERMINATION OF microRNAs

### Review

O. L. Bodulev and I. Y. Sakharov\*

*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia; E-mail: sakharovivan@gmail.com*

This review discusses modern methods for the quantitative and semi-quantitative determination of miRNAs, small non-coding RNAs that affect many biological processes such as development, differentiation, metabolism and the formation of an immunological response and are considered promising biomarkers in the diagnosis of a number of diseases.

**Keywords:** bioanalysis, microRNA, nucleic acids, amplification, polymerases