

• 论 著 •

血浆 microRNA 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

李 静, 谭彩虹[△]

(湖北文理学院医学院附属谷城县人民医院检验科, 湖北襄阳 441700)

摘要:目的 建立特异、稳定且可靠的血浆 microRNA(miRNAs)实时荧光定量 PCR 技术。方法 收集 10 例健康人血浆标本, 采用 mirVanaTM PARIS kit 试剂盒法提取血浆 miRNAs, 以 miRNA 特异的茎环引物引导逆转录, 通过 SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)对外参照 cel-miR-39、cel-miR-238 及血浆 miR-342-3p 进行检测。结果 健康人血浆 miR-342-3p 及外参 cel-miR-39、cel-miR-238 可以实现特异性扩增及定量。溶解曲线显示 10 例健康人血浆标本中 cel-miR-39、cel-miR-238 和 miR-342-3p 扩增产物分别在 81.44、81.62、82.71 °C 时出现单一峰, 无引物二聚体峰和其他非特异峰出现。血浆 miR-342-3p 批内批间重复性实验的标准差在 0.13~0.20 之间、变异系数(CV)在 0.42%~0.66% 之间, 显示该方法重复性较好。以 cel-miR-39、cel-miR-238 作为外参照, 同一血浆标本 miR-342-3p 的 5 次检测结果 Δ Ct 的标准差为 0.22、CV 为 1.68%, 说明 cel-miR-39、cel-miR-238 可作为血浆 miRNAs 实时荧光定量 PCR 检测的稳定外参。结论 实时荧光定量 PCR 技术可作为研究血浆 miRNAs 较好的技术平台。

关键词:实时荧光定量聚合酶链反应; 血浆 microRNAs; 外参

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0057-03

Establishment of quantitative PCR assay technique for plasma miRNA

Li Jing[△], Tan Caihong

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Gucheng Country People's Hospital, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441700 China)

Abstract: **Objective** To establish a specific, stable and reliable real-time fluorescence quantitative PCR for detecting plasma microRNAs(miRNAs). **Methods** The plasma samples from 10 healthy individuals were collected, and miRNAs was extracted using mirVanaTM PARIS kit. Exogenous cel-miR-39 and cel-miR-238 and endogenous plasma miRNAs were reversely translated by specific stem-loop primers and quantified by real time fluorescence quantitative PCR. **Results** cel-miR-39, cel-miR-238 and miR-342-3p were amplified and quantified specifically in RNA preparations isolated from plasma samples of healthy individuals. The amplification products of cel-miR-39, cel-miR-238 and miR-342-3p showed a single melting peak at 81.44 °C, 81.62 °C and 82.71 °C, respectively, without primer dimer peak or non-specific peak in all 10 cases of healthy individual plasma samples. The standard deviation (SD) of intra-assay and extra-assay of miR-342-3p was 0.13-0.20, and the coefficient of variation(CV) was 0.42%-0.66%, which suggesting that this detection method has a good repeatability. The levels of miR-342-3p were detected in a same plasma sample, each experiment was repeated for 5 times, and normalized by cel-miR-39 and cel-miR-238. The SD and CV of Δ Ct was 0.22, 1.68%, respectively, which indicating that cel-miR-39 and cel-miR-238 could be taken as the stable exogenous reference for the plasma miRNAs detection by real-time fluorescence quantitative PCR. **Conclusion** Real-time fluorescence quantitative PCR could serve as a good platform for plasma microRNA research.

Key words: real-time fluorescence quantitative PCR; plasma microRNAs; exogenous reference

MicroRNAs(miRNAs)是一类长约 19~23 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 分子^[1]。过去一直认为 miRNAs 可能被细胞外大量存在的 RNA 酶所降解, 初期研究主要针对细胞内 miRNAs。2008 年, 中国学者张辰宇教授课题组以及美国 Fred Hutchinson 肿瘤研究中心几乎同时报道 miRNAs 可稳定存在于血清/血浆中, 并可作为肿瘤或其他疾病潜在的生物标志物^[2-3]。血清/血浆中 miRNAs 的丰度较细胞中低, 常规的 Trizol 法难以提取到较高浓度的 RNA。血清/血浆中缺乏稳定的内参, 这是血浆 miRNAs 定量的又一大挑战。本研究旨在建立一种试剂盒提取 RNA, 以 cel-miR-39 和 cel-miR-238 为外参照的血浆 miRNAs 定量检测方法, 为研究疾病相关循环 miRNAs 奠定技术平台。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 10 例谷城县人民医院健康体检者空腹静脉血 2 mL, 以 EDTA-K₂ 抗凝, 960 r/min 离心 10 min, 将上清液移至 1.5 mL free-RNase 的 Eppendorf 管中, 4 °C 16 000 r/min 离心 10 min, 进一步去除残留的血细胞, 血浆置于 -80 °C 保存。

1.2 仪器与试剂 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), 核酸/蛋白定量仪 Bio-mate 3(美国 Thermo 公司), 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), mirVanaTM PARIS kit 血浆 miRNA 提取试剂盒(美国 Ambion 公司), 反转录试剂(美国 Promega 公司), qRT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), miRNAs 引物(中国 RiboBio 公司)。人工合成 cel-miR-39、cel-miR-238 标准品(中国 RiboBio 公司)。

1.3 血浆 RNA 的提取 200 μL 血浆加入变性溶液混匀,冰浴 5 min,分别加入 10 μL 25 fmol/ μL 的外参 cel-miR-39 和 cel-miR-238(终浓度为 0.61 fmol/ μL),加入 400 μL 氯仿混匀冰浴 5 min,12 000 r/min 低温离心 10 min,吸取 200 μL 上清液放过滤柱,加入 250 μL 100%乙醇 10 000 r/min,低温离心 1 min. 弃废液,加入 700 μL washing solution1,10 000 r/min 低温离心 1min. 弃废液,加入 500 μL washing solution2/3,10 000 r/min 低温离心 1min. 重复 1 遍,弃废液加入 100 μL 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 RNase-free water,10 000 r/min 低温离心 1 min,弃去过滤柱,RNA 溶液置冰上备用。

1.4 RNA 纯度及浓度测定 参照核酸/蛋白定量仪 Biomate 3 操作手册测定试剂盒抽提的 RNA 纯度和浓度,其中纯度以 OD260/280 表示,浓度按 OD260/280 \times 40 ng/ μL 计算。

1.5 荧光定量 RT-PCR 血浆 RNA 逆转录体系为 50 μL ,包括 RNase-free water 15 μL ,RNA 溶液 15 μL ,miRNA 特异性逆转录引物 4 μL ,5 \times Bufier 10 μL ,dNTP Mixture 4 μL ,M-MLV Reverse Transcriptase 1 μL ,RNase inhibitor 1 μL ,反应参数:42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,-4 $^{\circ}\text{C}$ + ∞ ,cDNA 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。PCR 体系为 20 μL ,包括 RNase-free water 5 μL ,SYBR Green 9 μL ,miRNA 特异性前向引物 2 μL ,miRNA 后向通用引物 2 μL ,cDNA 2 μL ,循环参数设定:95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,共 40 个循环。以不含 RNA 模板的 RNase-free water 作为阴性对照。每个样本检测 3 个复孔,以线虫 cel-miR-39、cel-miR-238 为外参照,以 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 计算 miRNA 的相对表达量,其中 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - (\text{Ct}_{\text{cel-miR-39}} + \text{Ct}_{\text{cel-miR-238}}) / 2$ 。

1.6 RT-qPCR 重复性试验 因 miR-342-3p 在血浆中的丰度较高,故本实验选取 miR-342-3p 进行批内重复及批间重复性验证。批内重复性:mirVanaTM PARIS kit 试剂盒法提取两份健康人血浆标本 RNA,经 miR-342-3p 特异性茎环引物逆转录成 cDNA 后,RT-qPCR 同批次进行 5 个平行孔检测 miR-342-3p 的表达水平,求 miR-342-3p Ct 值的平均值、标准差、变异系数(CV)。批间重复性:mirVanaTM PARIS kit 试剂盒法提取两份健康人血浆标本 RNA,经 miR-342-3p 特异性茎环引物逆转录成 cDNA 后,RT-qPCR 检测 miR-342-3p 的表达水平,一周重复检测 5 次,求 miR-342-3p Ct 值的平均值、标准差、CV。

1.7 cel-miR-39、cel-miR-238 作为外参照的稳定性试验 将同一血浆标本分为 5 份,提取血浆 RNA 之前依次加入等量的人工合成的外参照 cel-miR-39、cel-miR-238 标准品,,RT-qPCR 检测 cel-miR-39、cel-miR-238 及 miR-342-3p 的水平,求 ΔCt 的平均值、标准差、CV。

1.8 统计学处理 数据使用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。样本 Ct 值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本 Ct 值的批内、批间检测的变异程度由 CV 公式[$CV = (SD/X)100\%$]进行评价。

2 结 果

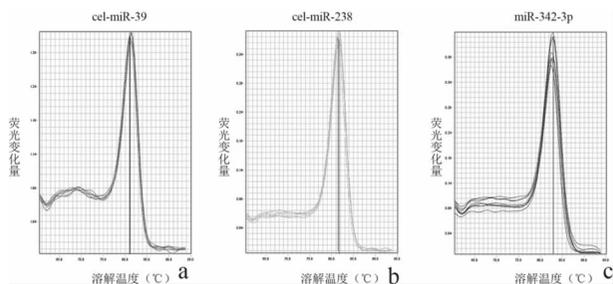
2.1 RNA 提取液纯度及浓度鉴定 利用核酸/蛋白定量仪 Biomate 3 测定试剂盒法提取的 10 份健康人血浆 RNA 提取液纯度及浓度,从表 1 可知,试剂盒抽提血浆 RNA 的纯度可达 1.30~1.99,浓度可达 52.00~79.60 ng/ μL ,表明试剂盒法可以获得较高纯度和浓度的 RNA 溶液,尽管核酸的 OD260/280 在 1.8~2.0 之间为理想比值,但是血浆 RNA 丰度低和种类少的特点决定了血浆 RNA 抽提液的纯度和浓度不可能达到

细胞 RNA 抽提液的标准。后续试验也进一步证实了表 1 中的 RNA 足可以满足 miRNAs 荧光定量 RCR 的要求。

表 1 血浆 RNA 提取液纯度及浓度鉴定

RNA 样本编号	OD260/280 比	浓度 (ng/ μL)
1	1.38	55.20
2	1.99	79.60
3	1.75	70.00
4	1.73	69.20
5	1.30	52.00
6	1.49	59.60
7	1.52	60.80
8	1.60	64.00
9	1.71	68.40
10	1.55	62.00

2.2 血浆 miRNAs RT-qPCR 检测法溶解曲线分析 溶解曲线显示所有标本中 cel-miR-39、cel-miR-238 和 miR-342-3p 的产物溶解峰,扩增产物分别在 81.44、81.62、82.71 $^{\circ}\text{C}$ 出现单一峰,提示 RT-qPCR 法可以检测血浆中 miRNAs 的表达且具有较高的特异性,见图 1。



a 图: T_m=81.44 $^{\circ}\text{C}$, b 图: T_m=81.62 $^{\circ}\text{C}$, c 图: T_m=82.71 $^{\circ}\text{C}$

图 1 血浆 miRNAs RT-qPCR 检测法溶解曲线分析

2.3 血浆 miRNA 荧光定量 RT-PCR 批内、批间重复性验证 取两份不同浓度 RNA 标本检测 miR-342-3p 的表达水平,进行批内及批间重复性验证,求 Ct 值的平均值、标准差、CV。从表 2 可知,对于 miR-342-3p 浓度不同的核酸,Ct 值的标准差在 0.13~0.20 之间,CV 在 0.42%~0.66%之间,CV<1%,说明此方法具有较好的批内及批间重复性。

2.4 cel-miR-39、cel-miR-238 作为血浆 miRNA 外参的稳定性验证 将同一血浆标本分为 5 等份,依次加入等量的人工合成的外参照 cel-miR-39、cel-miR-238 标准品,再分别提取血浆 RNA,RT-qPCR 检测 5 组血浆中 cel-miR-39、cel-miR-238 及 miR-342-3p 的水平,按公式 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-342-3p}} - (\text{Ct}_{\text{cel-miR-39}} + \text{Ct}_{\text{cel-miR-238}}) / 2$ 计算出 ΔCt 值,求 ΔCt 值的平均值、标准差、CV,结果见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.5 CV 作为血浆 miRNAs 外参照的稳定性验证试验 从表 3 可知(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),对于同一标本不同 RNA 提取、逆转录及 PCR 过程,外参照 cel-miR-39 和 cel-miR-238 的 Ct 值分别保持在 21.41~22.68 及 11.95~12.96 之间。5 组血浆中外参 cel-miR-39 和 cel-miR-238 Ct 值的标准差分别为 0.27 和 0.21,CV 分别为 1.23% 和 1.68%,CV<2%,miR-342-3p ΔCt 的均值保持在 12.71~13.95 之间,标准差为 0.22,CV 为 1.68%,CV<2%,以上结果说明 cel-miR-39、cel-miR-238 可作为血浆 miRNA RT-qPCR 检测的稳

定外参照。

3 讨 论

miRNAs 可通过胞外体、微囊泡、微粒等形式由细胞主动分泌至血液、唾液、尿液、乳汁、精浆、胸腹水等体液中^[4-7]。血浆中的 miRNAs 既可作为疾病诊断的生物标志物,又可以胞外体或微囊泡的形式被受体细胞所摄取,从而调控受体细胞的功能^[8-9]。但是,血浆中目标 miRNAs 分子的低丰度以及缺乏稳定的定量 miRNAs 的内参照使其难以建立适宜的检测手段。

常用的 miRNAs 检测方法包括 miRNA 原位杂交、miRNA 芯片、下一代测序、Northern blot 以及实时荧光定量 PCR。miRNA 原位杂交是一种半定量的方法,优点是可以在细胞或组织的原位检测 miRNAs 中的表达,但是对于低丰度的 miRNA 分子容易产生信号噪音比。miRNA 芯片和下一代测序的主要优点是高通量,可以一次在同一样本中检测几百种 miRNAs 的表达,所需样本量少,常用于初筛试验,但是缺点是容易产生假阳性,需要用其他方法进行验证。Northern blot 常用来评价其他检测方法的可靠性,但是通量低,且灵敏度和特异性都不高。实时荧光定量 PCR 是用于 miRNAs 定量的最常用技术,目前用于 miRNAs 荧光定量 PCR 的逆转录方法有两种,一种是 ploy A 加尾法,另一种是茎环引物法。RNA 的抽提效果以及内参照的稳定性直接影响最终定量结果。血浆中目标 miRNAs 丰度低的特点决定了常规 Trizol 核酸抽提法难以获得高浓度的核酸,本研究使用专门用于血浆 miRNAs 抽提的试剂盒,获得了较高浓度和纯度的核酸溶液。U6 snRNA 作为细胞 miRNAs 相对定量的内参照,据研究报道血浆中并不恒定表达 U6 snRNA^[10],所以 U6 snRNA 不适宜作为循环 miRNAs 定量的内参照。本研究利用商品化 miRNAs 试剂盒抽提健康人血浆核酸分子,以 cel-miR-39、cel-miR-238 为外参照,建立了基于茎环引物的实时荧光定量 PCR 检测技术,是一种可靠、稳定的循环 miRNAs 定量方法。

本文研究结果表明,基于茎环引物的实时荧光定量 PCR 具有特异性高、重复性好和稳定性强等优势。在对健康人血标本循环 miR-342-3p 的检测中,该方法的批内和批间 CV 分别为 0.66% 和 0.63%,均小于 5%,重复性较好。此外,通过多次检测同一标本中 miR-342-3p、cel-miR-39 及 cel-miR-238 的表达发现,miR-342-3p Δ Ct 的均值保持在 12.71~13.95 之间,标准差为 0.22,CV 为 1.68%,小于 5%,说明 cel-miR-39、

cel-miR-238 可作为血浆 miRNA RT-qPCR 检测的稳定外参照。

综上所述,本研究建立了用于循环 miRNAs 检测的基于茎环引物的实时荧光定量 PCR 定量方法,该方法具有特异性高、重复性好和稳定性强等优势,为循环 miRNA 研究提供了较好的技术平台。

参考文献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of Cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18(10): 997-1006.
- [3] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for Cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [4] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral Cancer detection [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5473-5477.
- [5] Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder Cancer[J]. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2010, 28(6): 655-661.
- [6] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, et al. microRNA as a new immunoregulatory agent in breast milk[J]. Silence, 2010, 1(1): 7-9.
- [7] 张魁洋, 谢佳韵, 梁宏伟, 等. 人体体液中细胞外 microRNA 的起源、功能及潜在诊疗价值[J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(7): 603-616.
- [8] 梁宏伟, 陈熹, 曾科, 等. 一种细胞间通信的新的信号分子—Microvesicle 运输的 microRNA [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(6): 417-423.
- [9] Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression[J]. Blood, 2013, 121(19): 3908-3917.
- [10] Chen X, Liang HW, Guan DP, et al. A combination of Let-7d, Let-7g and Let-7i serves as a stable reference for normalization of serum microRNAs[J]. PLoS One, 2013, 8(11): 79652.

(收稿日期: 2014-11-08)

(上接第 56 页)

disease[J]. Lancet, 1999, 354(91): 407-413.

- [9] 徐继宾. 血清同型半胱氨酸水平检测在冠心病诊断中的应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(19): 51-52.
- [10] Boushey CJ, Beresford S, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. JAAM Med Assoc, 1995, 274(27): 1049-1057.
- [11] Stampfer MJ, Malinow MR. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians[J]. JAMA, 1992, 268(7): 877-881.
- [12] Frits H, Simon GP, Stephen DM, et al. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and

unstable angina[J]. Lancet, 1997, 349(3): 462-466.

- [13] Elliott M, Antman MD, Christine GS, et al. Detection of unsuspected myocardial necrosis by rapid bedside assay for cardiac troponin T [J]. Am Heart J, 1997, 133(32): 596.
- [14] 盛博, 李志民. 冠心病超敏 C 反应蛋白、肌钙蛋白 T 与心肌梗死面积的相关性研究[J]. 海南医学院学报, 2010, 16(10): 1298-1300.
- [15] Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 3-32.

(收稿日期: 2014-10-18)