

• 论 著 •

poly(A)加尾的实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-124a 表达及临床初步应用^{*}

陈 鑫¹, 臧素纲¹, 韩 霜¹, 王 伟¹, 汪晓莺², 周玉贵¹

(1. 南通大学附属东台医院检验科, 江苏东台 224200; 2. 南通大学医学院免疫教研室, 江苏南通 226001)

摘要:目的 建立 poly(A)聚合酶加尾的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法检测血清微小 RNA(miR)-124a, 并作临床初步应用。方法 用 Trizol 试剂提取血清总 RNA。miR-124a poly(A)聚合酶加尾逆转录获得 cDNA, 进行 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增检测。制作 C. elegans-miR-39 模拟物浓度梯度稀释的标准曲线, 定量血清中 miR-124a 的表达水平。结果 该方法能定量检测血清 miR-124a 表达水平, 溶解曲线呈单峰, PCR 扩增产物特异, 在 $10^3 \sim 10^6$ copies/uL 范围内有良好的线性关系 ($r^2 = 0.999$), 并且检测重复性好。糖尿病患者血清中 miR-124a 表达水平明显高于健康体检者 ($P < 0.05$)。结论 所建立的 poly(A)聚合酶加尾 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法能敏感、特异地检测血清中 miR-124a 的表达水平, 为下一步临床应用的研究奠定了方法学基础。

关键词: SYBR Green I 实时荧光定量 PCR; 微小 RNA-124a; 糖尿病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)09-1176-03

SYBR Green I real-time FQ-PCR by poly(A) polymerase tailing for detecting expression of miR-124a in serum and its clinical primary application^{*}

Chen Xin¹, Zang Sugang¹, Han Shuang¹, Wang Wei¹, Wang Xiaoying², Zhou Yugu¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Dongtai Hospital, Nantong University, Dongtai, Jiangsu 224200, China;

2. Teaching and Research Section of Immunology, Medical College of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: **Objective** To establish a method of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR(FQ-PCR) by poly(A) polymerase tailing for the determination of microRNA-124a(miR-124a) in serum, and to preliminarily apply it in clinic. **Methods** Total RNA was extracted from serum by Trizol reagent. miR-124a was performed the reverse transcription into cDNA by tailing poly(A) polymerase, and then the cDNA was amplified and detected by using SYBR Green I real-time FQ-PCR. The standard curve of a gradient dilution series of C. elegans-miR-39 mimic was prepared, and the expression level of miR-124a in serum was quantitatively detected. **Results** The method could quantitatively detect the expression level of miR-124a in serum. The melting curve showed a single peak, the PCR amplification products were specific, the good linear relationship existed in the range of $10^3 - 10^6$ copies/uL ($r^2 = 0.999$), and the detection had good repeatability. The expression level of miR-124a in diabetic patients was significantly higher than that in healthy subjects ($P < 0.05$). **Conclusion** The established method of SYBR Green I FQ-PCR by poly(A) polymerase tailing could detect the expression level of serum miR-124a sensitively and specifically, which lays a methodological foundation for further study on its clinical application.

Key words: SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR; microRNA-124a; diabetes mellitus

微小 RNAs(microRNAs)是一类小的调节性单链 RNA 分子, 能够通过完全或部分互补与细胞内 mRNA 结合从而干扰其表达。英国 Sanger 研究所的 miRBase 数据库是记录 miRNAs 序列最权威的数据库^[1], 迄今为止已记录了 223 个物种的 35 828 种成熟的 miRNAs 序列信息。一系列的研究表明, 这些 miRNAs 广泛地参与了生物体内各种各样的调节途径, 发挥着重要的调控作用^[2-4]。有关 miRNAs 检测与临床疾病的研究显示出良好的应用前景。有文献报道, miRNA-124a 除在神经系统高表达之外, 在胰岛 β 细胞中也大量存在, 并且参与胰岛素分泌的调控^[5-6]。这一研究结果提示 miRNA-124a 与糖尿病的发病机制关系密切, 具有重要的科研价值。寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是目前 miR-124a

应用于临床亟待解决的问题。

据此, 本研究建立了 poly(A)聚合酶加尾的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 miR-124a 的方法。应用此种方法检测血清标本中 miR-124a 的表达水平, 初步探索 miR-124a 能否成为糖尿病的基因诊断标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 6 月至 2013 年 6 月南通大学附属东台医院经世界卫生组织(WHO)糖尿病诊断标准(1999 年)确诊的糖尿病患者 118 例作为糖尿病组, 其中男 59 例, 女 59 例, 年龄 26~88 岁, 病程数月数年不等。同期健康体检者 106 例作为对照组, 其中男 52 例, 女 54 例, 年龄 28~84 岁。本研究经医院伦理委员会批准, 所有试验对象均签署知情同意

^{*} 基金项目: 江苏省盐城市医学科技发展计划项目(YK20130103)。 作者简介: 陈鑫, 男, 检验技师, 主要从事分子生物学及免疫学研究

书。

1.2 标本采集 所有研究对象于清晨空腹采集静脉血 3~5 mL。分离血清后分装至-80℃恒温冰箱保存。

1.3 仪器与试剂 Trizol 溶解试剂、三磷酸脱氧核苷(dNTP)混合物、逆转录酶、逆转录缓冲液、Taq DNA 聚合酶、内含 SYBR Green I 荧光染料的 PCR 缓冲液、焦炭酸二乙酯(DEPC)、TAE 缓冲液、溴化乙锭(EB)、离心管(南通碧云天技术研究所)、无水乙醇、氯仿、异丙醇(无锡展望化工试剂有限公司)、100 bp DNA 引物(大连宝生物工程有限公司)。Rotor Gene Q 实时荧光定量 PCR 分析仪(德国 Qiagen 公司)、HC-2518R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、SMA1000 微量紫外分光光度计(北京美林恒通公司)、DYY-III8A 型稳压稳流定时电泳仪(北京六一仪器厂)、DH-2000 凝胶成像系统(北京华电公司)、BSC-1500 II A2X 型生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司)。

1.4 引物设计与合成 根据 miRBASE 数据库中 Hsa-miR-124a(UAA GGC ACG CGG UGA AUG CC)的序列,设计其特异性 poly(A)加尾逆转录引物和 PCR 扩增引物。线虫 *C. elegans*-miR-39 的模拟物、内参 miR-15a 及其引物均由德国 Qiagen 公司设计合成。

1.5 血清总 RNA 提取 取 200 μ L 复溶的血清于离心管中,加入 Trizol 溶解试剂,充分混匀裂解;之后分别用氯仿、异丙醇及 DEPC 水配制的乙醇,并结合硅胶膜特异性吸附作用来分离和纯化 RNA。RNA 从离心管硅胶膜上洗脱溶于 DEPC 水中。通过测定计算 RNA 溶液 260 nm 和 280 nm 的紫外吸收值比值(A260/A280),确认 RNA 浓度和纯度。

1.6 逆转录反应 反应体系体积为 20 μ L,包括总 RNA 样品、dNTP 混合物、逆转录酶、逆转录缓冲液、DEPC 水。逆转录反应参数:37℃ 60 min,95℃ 5 min。逆转录反应获得的 cDNA 于-80℃保存。

1.7 实时荧光定量 PCR 反应体系体积为 20 μ L,包括 miRNA 逆转录产物 cDNA、dNTP 混合物、miR-124a 上游特异引物、下游通用引物、Taq DNA 聚合酶、PCR 缓冲液(内含 SYBR Green I 荧光染料)、DEPC 水。PCR 反应循环参数:95℃ 预变性 15 min;94℃ 变性 15 s,55℃ 退火 30 s,70℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。以同样的反应体系和 Hsa-miR-15a 特异性引物进行内参 Hsa-miR-15a 荧光定量。以 DEPC 水代替逆转录产物作为阴性对照。

1.8 标准曲线的制作 将人工合成的 *C. elegans*-miR-39 的 miRNA 模拟物以 DEPC 水稀释 8 个数量级,即 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 及 10^8 copies/ μ L,分别取每一数量级稀释液 2 μ L 与待测标本同时进行逆转录及 PCR 扩增检测,每反应设置 3 个复孔。扩增后根据扩增曲线设定统一阈值,然后根据标准品的浓度及每个浓度对应的 CT 平均值绘制标准曲线。根据此标准曲线及待测标本的 CT 值计算出该血清标本 miR-124a 的绝对浓度,为绝对定量法。

1.9 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳 配制 2% 的琼脂糖凝胶,加入溴化乙锭(EB)溶液至终浓度 0.5 μ g/mL,80 V 恒压电泳 40 min,待溴酚蓝跑到 2/3 位置处停止电泳,紫外灯下观察产物的有无及大小。

1.10 统计学处理 实验数据采用 SPSS 18.0 软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经方差分析发现实时荧光逆转录 PCR

定量检测 miR-124a 的 CT 值不满足正态分布和方差齐性,故用 Mann-Whitney *U* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清总 RNA 抽提及纯度检测的结果 经测量计算,所有标本提取 RNA 溶液的 A260/A280 比值(1.916 ± 0.089)均在 1.8~2.1 范围内,表明 RNA 纯度较好,可以用于后续的试验。

2.2 溶解曲线及 PCR 扩增产物电泳验证 如图 1 所示,溶解曲线呈单峰,未见杂峰信号,溶解温度约为 77℃。表明逆转录 PCR 参数选择适当,产物特异性较好。poly(A)聚合酶加尾法逆转录 PCR 反应获得的 PCR 扩增产物大小应约为 85~87 bp。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳,可见明亮、清晰的电泳条带,与预测大小相符,如图 2 所示。

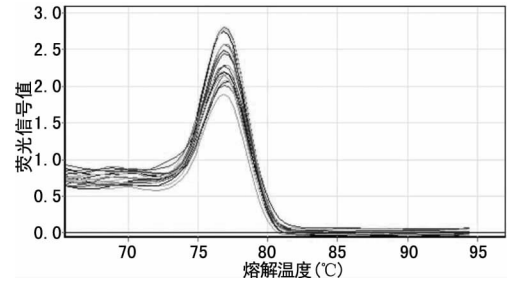


图 1 实时荧光定量 PCR 溶解曲线

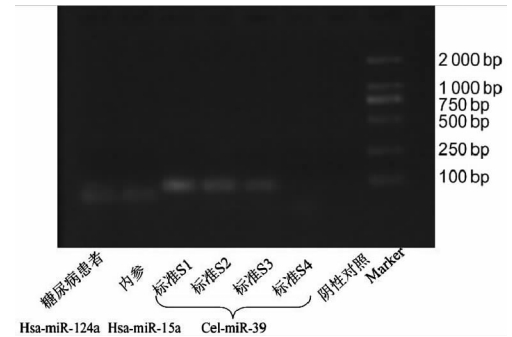


图 2 逆转录 PCR 扩增产物电泳图

2.3 荧光定量 PCR 法的检测重复性试验 任取 1 份糖尿病患者血清标本的 RNA 抽提溶液,在 1 次荧光定量 PCR 中设置 10 个平行孔进行检测,计算批内变异系数(CV)。结果显示,miR-124a 的拷贝数为 $(5.88 \pm 0.20) \times 10^3$ copies/ μ L,批内 CV 为 3.32%。对同 1 份标本进行连续 10 次荧光定量 PCR 的检测,计算批间 CV。结果显示 miR-124a 的拷贝数为 $(5.92 \pm 0.32) \times 10^3$ copies/ μ L,批间 CV 为 5.45%。

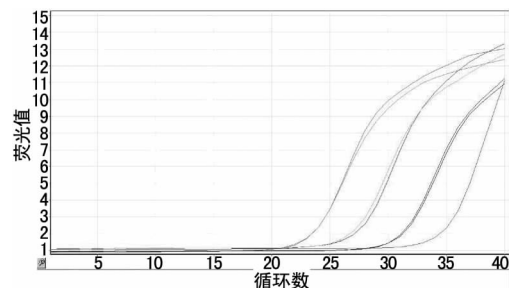


图 3 $10^3 \sim 10^6$ copies/ μ L 4 个浓度梯度标准品的扩增曲线

2.4 检测 miR-124a 时标准品的扩增曲线及标准曲线 如图

3 所示,检测标准品 *C. elegans*-miR-39 模拟物的扩增曲线呈 S 型。在 $10^3 \sim 10^6$ copies/ μ L 的范围内 CT 值和标准品浓度呈良好线性关系, r^2 为 0.999,制作成标准曲线如图 4。

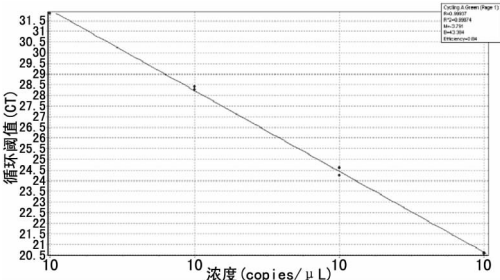


图 4 检测标准曲线

2.5 miR-124a 在糖尿病患者及健康体检者血清中检测结果的比较 118 例糖尿病患者和 106 例健康体检者的血清标本均可见扩增曲线,但表达程度不同,见图 5。由表 1 可见,糖尿病患者和健康体检者血清中 miR-124a 的表达水平分别为 $(2.85 \pm 1.29) \times 10^3$ 和 $(1.44 \pm 0.85) \times 10^3$ copies/ μ L,糖尿病患者血清 miR-124a 的表达水平高于健康体检者。经 Mann-whitney *U* 检验进行组间比较,两组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

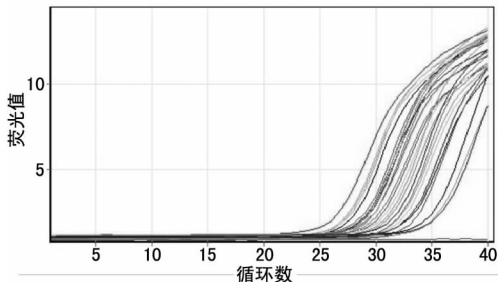


图 5 部分糖尿病患者及健康体检者血清中 miR-124a 荧光定量 PCR 扩增曲线

表 1 miR-124a 在糖尿病患者及健康体检者血清中的比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	平均 CT 值	平均拷贝数(10^3 copies/ μ L)
糖尿病组	118	25.93 ± 2.35	2.85 ± 1.29
对照组	106	29.75 ± 4.23	1.44 ± 0.85

3 讨 论

在机体不同生理和病理状态下,miRNAs 的表达水平不同,这种特性使得 miRNAs 可能成为一些疾病理想的候选基因诊断标志物。miR-124a 最初被发现主要在神经细胞内高表达,后来发现也大量存在于胰岛 β 细胞中。近期有研究表明,在基础条件下胰岛 β 细胞中过表达的 miR-124a 可提高胰岛素的分泌,但可以降低高浓度葡萄糖刺激的胰岛素分泌^[5-6]。这些重要研究发现使得 miR-124a 有望成为新的基因诊断标志物,应用于临床对糖尿病的分子生物学诊断。

实时荧光定量 PCR 是目前检测 miRNAs 的主要方法,该方法快速、便捷,精确度和灵敏度可满足临床需求。本研究建立了 poly(A)聚合酶加尾的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的方法来检测血清中 miR-124a 的表达水平。这一方法采用

poly(A)聚合酶加尾技术和 SYBR Green I 染料标记技术,无需设计探针,引物设计相对容易,且成本低廉^[7],适合于普通临床实验室的开展。研究可见熔解曲线呈特异性单峰,扩增曲线呈典型 S 型,表明基本没有引物二聚体和非特异性扩增产物。PCR 反应扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,也可见明亮清晰的电泳条带,并且与预测大小相符,证明扩增产物的特异性较好。以人工合成的 *C. elegans*-miR-39miRNA 模拟物绘制标准曲线,为绝对定量法,这与目前实时荧光定量 PCR 检测 miRNAs 报道较多的相对定量法不同^[8-9]。标准品浓度与其相应 CT 值在 $10^3 \sim 10^6$ copies/ μ L 的范围内呈良好线性关系 ($r^2 = 0.999$),表明该方法能精确地定量检测血清中 miR-124a 的表达水平。检测重复性试验结果,批内 CV 为 3.32%,批间 CV 为 5.45%,表明该方法具有很好的稳定性。由此可见,所建立的检测方法可用以检测血清中 miR-124a 的表达水平。通过分析定量检测数据发现,118 例糖尿病患者血清中 miR-124a 的表达水平明显高于 106 例健康体检者 ($P < 0.05$),这一结果与之前的文献报道相符合^[5-6]。

综上所述,本研究建立的 ploy(A)聚合酶加尾的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 miR-124a 是一种操作简便、灵敏度高、特异度高和稳定性好的方法,便于临床实验室的常规开展,为 miR-124a 在糖尿病临床应用价值的进一步研究奠定了方法学基础。

参考文献

[1] Griffiths-Jones S,Grocock RJ,van Dongen S,et al. miRBase: mi-croRNA sequences, targets and gene nomenclature [J]. Nucleic Acids Res,2006,34(2):140-144.

[2] Chang S,Johnston RJ,Frokjaer-Jensen C,et al. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode[J]. Nature,2004,430(71):785-789.

[3] Chen CZ,Li L,Lodish HF and bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science,2004,303(4):83-86.

[4] Takamizawa J,Konishi H,Yanagisawa K,et al. Reduced expres-sion of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. Cancer Res,2004,64(11):3753-3756.

[5] Baroukh N,Ravier MA,Loder MK,et al. MicroRNA-124a regu-lates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic be-ta-cell lines[J]. J Biol Chem,2007,282(27):19575-19588.

[6] Lovis P,Gattesco S,Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs[J]. Biol Chem,2008,389(3):305-312.

[7] 叶燕,申娟娟,鞠少卿. 微小 RNA 检测方法的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(8):689-692.

[8] 赵苏瑛,吴倩,高峰,等. 血清 miR-155 水平检测在乳腺肿瘤患者早期诊断中的研究[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(13):1569-1571.

[9] 韩志君,史万青,沈红远,等. 血浆 miR-499 对急性心肌梗死的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(12):1096-1099.