

实时荧光定量 PCR 检测血清 miR-375 表达及临床应用^{*}

陈鑫¹, 韩霜¹, 臧素纲¹, 宣世海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 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测血清 miR-375, 并进行临床初步应用。方法 用 Trizol 试剂提取血清总 RNA。miR-375 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, 绝对定量血清中 miR-375 的表达水平。结果 该方法能定量检测血清 miR-375 表达水平, 熔解曲线呈单峰, PCR 扩增产物特异, 在 $10^3 \sim 10^6$ copy/ μ L 范围内有良好的线性关系 ($r^2 = 0.997$), 并且检测重复性好。糖尿病患者血清中 miR-375 表达水平明显高于健康体检者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 所建立的 poly(A) 聚合酶加尾 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 能敏感、特异地检测血清中 miR-375 的表达水平, 为下一步临床应用研究奠定了方法学基础。

【关键词】 SYBR Green I 实时荧光定量聚合酶链反应; miR-375; 糖尿病

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)09-1208-03

Real-time fluorescence quantitative PCR for detecting expression of serum miR-375 and its clinical application^{*}

CHEN Xin¹, HAN Shuang¹, ZANG Su-gang¹, XUAN Shi-hai¹, WANG Xiao-ying², ZHOU Yu-gui^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Dantai Hospital of Nantong University, Dongtai, Jiangsu 224200, China; 2. Department 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 miR-375 in serum and to conduct the preliminary clinical application. **Methods** Total RNA was extracted from serum by Trizol reagent. miR-375 was reversely transcribed into cDNA by tailing poly(A) polymerase, and then the cDNA was amplified and detected by using SYBR Green I real-time FQ-PCR. To generate a standard curve of a dilution series of C. elegans-miR-39 mimic, and detect the expression level of miR-375 in serum quantitatively. **Results** The method could quantitatively detect the expression level of miR-375 in serum. The melting curve showed a single peak, the PCR amplification products were specific, a good linear relationship was showed in the range of $10^3 - 10^6$ copies/ μ L ($r^2 = 0.997$), and the detection had good repeatability. The expression level of miR-375 in diabetic patients was significantly higher than that in healthy subjects, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The established method of SYBR Green I FQ-PCR by poly(A) polymerase tailing can detect the expression level of serum miR-375 sensitively and specifically and lays a methodological foundation for further study on its clinical application.

【Key words】 SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR; miR-375; diabetes mellitus

microRNAs(miRNAs)广泛存在于真核生物中, 是一类参与基因转录后水平调控的非编码小分子单链 RNA。成熟的 miRNAs 通过与其互补的靶 mRNA 碱基配对结合调控基因表达, 不仅参与机体细胞生长、发育、分化、增殖、代谢、凋亡等一系列生理活动的调控, 而且在多种疾病的病理过程中发挥重要作用^[1-4]。病变组织 miRNAs 的表达水平显著异常于正常组织, 呈现高度组织特异性, 可以直接反映机体的病理状况。在胰腺和胰岛 β 细胞中表达的众多 miRNAs 中, miR-375 不仅参与调控胰岛素的合成和分泌, 还在胰岛的发育过程中发挥作用, 提示与糖尿病的发病机制密切相关^[5-7]。因而, 对 miR-375 的研究具有重要的科研意义和应用前景。据此, 本文建立了 poly(A) 聚合酶加尾的 SYBR Green I 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测 miR-375 的方法, 通过此种方法检测血清标本中 miR-375 的表达水平, 初步探讨其对糖尿病诊断的临床应

用价值。

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 WHO(1999 年)糖尿病诊断标准确诊的糖尿病患者 118 例, 其中男 59 例, 女 59 例, 年龄 26~88 岁, 病程数月数年到数年不等。另选择同期健康体检者 106 例, 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, 所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 样本采集 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°C 恒温冰箱保存。

1.3 主要试剂与仪器 Trizol 溶解试剂、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、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、TAE 缓冲液、溴化乙锭、离心管 (南通碧云天技术研究所), 无水乙醇、氯

^{*} 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, 硕士, 技师, 主要从事分子生物学及免疫学研究。 Δ 通讯作者, Email: yugui_z@126.com。

仿、异丙醇(无锡展望化工试剂有限公司),100 bp DNA Ladder Marker(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 引物设计和合成 根据 miRBASE(<http://www.mir-base.org/>) 数据库中 Hsa-miR-375 (UUUGUUCGUUCG-GCUCGCGUGA) 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 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 处理水配制的乙醇,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 处理水中。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 样本、dNTP 混合物、逆转录酶、逆转录缓冲液、DEPC 处理水。逆转录反应参数:37 $^{\circ}$ C 60 min,95 $^{\circ}$ C 5 min。逆转录反应获得的 cDNA 于 -80 $^{\circ}$ C 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-375 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 处理水。PCR 循环参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 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 处理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 处理水稀释 8 个数量级,即 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 及 10^8 copy/ 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,每个反应设置 3 个复孔。扩增后根据扩增曲线设定统一阈值,然后根据标准品浓度及每个浓度对应的循环阈值(Ct)平均值绘制标准曲线。根据此标准曲线及待测样本 Ct 值计算出该血清标本 miR-375 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 采用 SPSS 18.0 软件进行处理。经方差分析发现实时荧光逆转录 PCR 定量检测 miR-375 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,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清总 RNA 抽提及纯度检测结果 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 内,由此表明 RNA 纯度较好,可用于后续试验。

2.2 溶解曲线及 PCR 扩增产物电泳验证 见图 1。由图 1 可见,溶解曲线呈单峰,未见杂峰信号,溶解温度约为 77 $^{\circ}$ C。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 获得的 PCR 扩增产物大小为 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,与理想大小一致,见图 2。

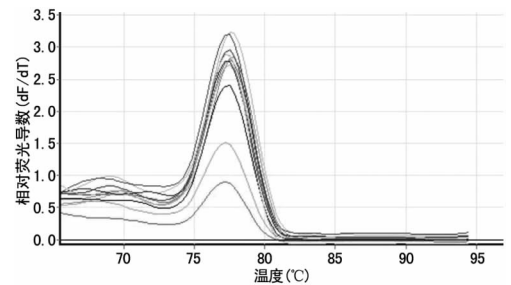


图 1 实时荧光定量 PCR 溶解曲线

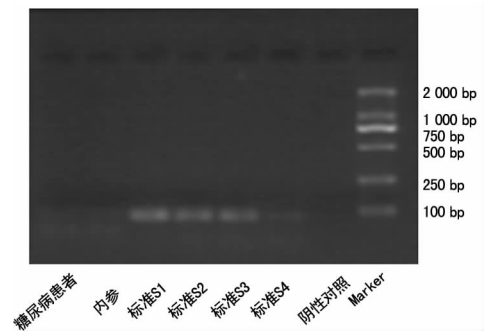


图 2 逆转录 PCR 扩增产物电泳图

2.3 荧光定量 PCR 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-375 的拷贝数为 $(2.77 \pm 0.06) \times 10^3$ copy/ μ L,批内 CV 为 2.16%。对同 1 份标本连续进行 10 次荧光定量 PCR 检测,计算批间 CV。结果显示,miR-375 的拷贝数为 $(2.75 \pm 0.14) \times 10^3$ copy/ μ L,批间 CV 为 5.13%。

2.4 检测 miR-375 时标准品的扩增曲线及标准曲线 见图 3。由图 3 可见,检测标准品 *C. elegans*-miR-39 模拟物的扩增曲线呈 S 型。在 $10^3 \sim 10^6$ copy/ μ L 范围内 Ct 值和标准品浓度呈良好线性关系, $r^2 = 0.997$,制作成标准曲线见图 4。

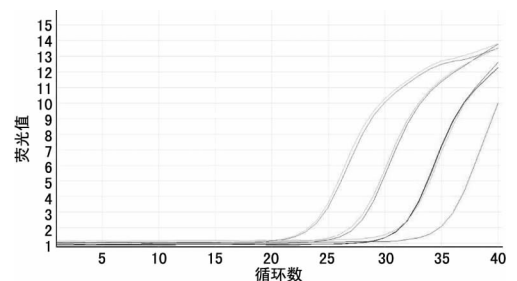


图 3 $10^3 \sim 10^6$ copy/ μ L 梯度标准品的扩增曲线

2.5 miR-375 在糖尿病患者及健康体检者血清中检测结果比较 118 例糖尿病患者和 106 例健康体检者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-375 表达水平分别为 $(3.40 \pm 2.37) \times 10^3$ copy/ μ L 和 $(1.11 \pm 0.67) \times 10^3$ copy/ μ L,糖尿病患者血清 miR-375 的表达水平高于健康体检者。经 Mann-Whitney U 检验进行组间比较,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

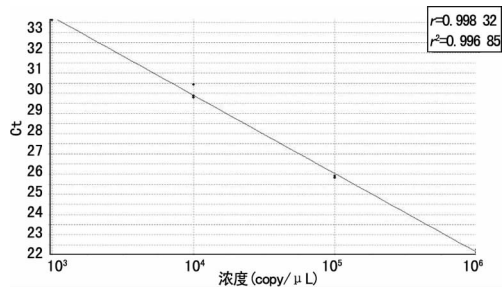


图 4 检测标准曲线

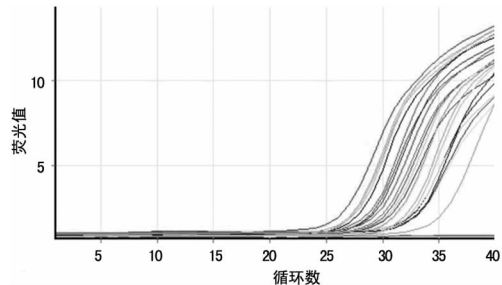


图 5 部分糖尿病患者及健康体检者血清中 miR-375 荧光定量 PCR 扩增曲线

表 1 两组血清 miR-375 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	平均 Ct 值	平均拷贝数(10^3 copy/ μ L)
糖尿病患者	118	30.96 $\pm$ 3.65	3.40 $\pm$ 2.37
健康体检者	106	35.09 $\pm$ 1.53	1.11 $\pm$ 0.67

3 讨 论

近年来,miRNAs 在机体生理、病理过程中的重要调控作用受到广泛关注,逐渐成为医学界的研究热点之一。miR-375 是胰岛组织特异性 miRNAs。研究发现,胰岛中高表达的 miR-375 可以抑制胰岛 β 细胞合成和分泌,同时 miR-375 还参与胰岛发育过程的调控^[5-7]。这就为糖尿病基因诊断的研究提供了新的切入点。

miRNAs 的检测技术不仅包括传统的表达文库克隆、Northern blot 和荧光定量 PCR,还包括新近发展起来的基因芯片技术、高通量测序技术等。实时荧光定量 PCR 因其敏感、特异、快速,已逐渐成为最常用且有效的定量检测方法^[8]。目前,miRNAs 检测的逆转录实时荧光定量 PCR 主要是基于茎环的 RT-PCR 和基于 poly(A)加尾的 RT-PCR^[9-10]。这两种方法均可采用 Taqman 探针或 SYBR 荧光染料,前者特异性更高,但费用昂贵;后者通用性好,适合于推广开展。

本研究采用 poly(A)聚合酶加尾逆转录和 SYBR Green I 荧光染料标记技术,建立了一种实时荧光定量 PCR 检测血清中 miR-375 表达水平的方法。熔解曲线峰值单一,扩增曲线呈典型 S 型,显示基本没有引物二聚体和非特异性扩增产物的形成,结果可靠。PCR 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,并且与理论大小一致,由此证明扩增产物特异性较好。以人工合成的 C. elegans-miR-39miRNA 模拟物制作标准曲线,为绝对定量法,这与目前使用较多的相对定量法不同^[11-12]。在 $10^3 \sim 10^6$ copy/ μ L 范围内 Ct 值和标准品浓度呈良好线性关系($r^2=0.997$),反映其能精确定量检测血清中 miR-375 的表达水平。重复性试验结果显示,批内 CV 为 2.16%,批间 CV 为 5.13%,由此表明该方法具有很好的稳定

性。由此可见,本研究建立的检测方法可用于临床检测血清中 miR-375 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-375 表达水平明显高于 106 例健康体检者,差异有统计学意义($P<0.05$)。这一结果不仅与基础研究的文献^[5-7]报道相符合,而且与梁国威等^[12]和 Kong 等^[13]采用其他方法对血清 miR-375 表达水平的检测结果也一致。

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-375 是一种快速、有效、灵敏度高、特异性强和稳定性好的方法,易于临床实验室推广应用,有助于对 miR-375 在糖尿病中的临床应用价值进行深入研究。

参考文献

[1] Bartel DP. MicroRNAs;genomics,biogenesis,mechanism, and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.

[2] Pandey AK,Agarwal P,Kaur K,et al. MicroRNAs in diabetes;tiny players in big disease[J]. Cell Physiol Biochem,2009,23(4/6):221-232.

[3] Calin GA,Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(11):857-866.

[4] Zhang C. MicroRNAs;role in cardiovascular biology and disease[J]. Clinl Sci(Lond),2008,114(12):699-706.

[5] Poy MN,Eliasson L,Krutzfeldt J,et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. Nature,2004,432(714):226-230.

[6] El Ouamari A,Baroukh N,Martens GA,et al. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells[J]. Diabetes,2008,57(10):2708-2717.

[7] Joglekar MV,Joglekar VM,Hardikar AA. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development[J]. Gene Expr Patterns,2009,9(2):109-113.

[8] 王勤熙,姚见儿,顾国浩. microRNAs 的定量分析技术及其应用[J]. 临床检验杂志,2012,30(9):650-652.

[9] Shi R,Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR[J]. Biotechniques,2005,39(4):519-525.

[10] Chen C,Ridzon DA,Broomer AJ,et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res,2005,33(20):e179.

[11] 李晓娜,任海林,马德庆,等. 膀胱癌患者血清 miR-17-5p 和 miR-20a 的表达及意义[J]. 临床检验杂志,2012,30(9):645-646.

[12] 梁国威,宋燕,邵冬华,等. 初诊 2 型糖尿病患者血清中 miR-29a 和 miR-375 表达变化及其与糖、脂标志物相关性研究[J]. 中国实验诊断学,2013,17(3):475-478.

[13] Kong L,Zhu J,Han W,et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes;a clinical study[J]. Acta Diabetol,2011,48(1):61-69.