

三种方法提取血清 miRNA 效果的比较^{*}

陈昌国¹, 陈秋圆^{1,2}, 郭建巍¹, 马志家¹, 刘 敏¹, 赵强元¹, 张雅芳¹ (1. 中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048; 2. 北方医学院检验医学系, 河北张家口 075000)

【摘要】 目的 比较 Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法及沉淀裂解法提取血清 miRNA 的效果。**方法** 分别选取 2 例健康人、2 例肺炎患者和 2 例肺癌患者血清, 以 Let-7a-5p 作为目标 mRNA, 线虫 Cel-miR-39-3p 作为内参, 分别采用 Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法及沉淀裂解法提取血清 miRNA, 以 Let-7a-5p 及 Cel-miR-39-3p 特异性引物进行反转录 PCR, 以反转录 PCR 产物为模板运用 SYBGreen I 法进行荧光定量 PCR 检测。**结果** Trizol 法与蛋白酶 K 消化+Trizol 法均能有效提取到血清 miRNA, 而沉淀裂解法由于没有对血浆中的 RNA 进行富集故提取效果不佳。Trizol 法提取较蛋白酶 K 消化+Trizol 法相比, 可以减少蛋白酶 K 的消化时间且提取效果更好, 并且血清与 Trizol 试剂的体积比为 200 : 600 时效果相对较好。三种方法检测 Cel-miR-39-3p 的 Ct 值基本一致。Trizol 法和蛋白酶 K 消化+Trizol 法在提取过程中加入的内参丢失较少。**结论** Trizol 法作为总 RNA 提取的手段适用于血清 miRNA 提取, 通过调整血清与 Trizol 试剂的用量可使提取到的血清 miRNA 能够满足试验需要。

【关键词】 miRNA; Let-7a-5p; Cel-miR-39-3p; 提取

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)20-2976-03

Comparing the serum miRNA extraction effect of three methods^{*} CHEN Chang-guo¹, CHEN Qiu-yuan^{1,2}, GUO Jian-wei¹, MA Zhi-jia¹, LIU Min¹, ZHAO Qiang-yuan¹, ZHANG Ya-fang¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the North Medical College, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

【Abstract】 Objective To compare the serum miRNA extracting efficiency of Trizol method, protease K digestion combined with Trizol method and precipitation pyrolysis method. **Methods** 2 healthy persons, 2 pneumonia patients and 2 lung cancer patients were enrolled in the study and their serum samples were collected. miRNA were extracted from serum samples respectively by using Trizol method, protease K digestion combined with Trizol method and precipitation pyrolysis method. Let-7a-5p was the objective miRNA of detection, with Cel-miR-39-3p as the incorporation of spike-in reference. The specific primers of Let-7a-5p (objective miRNA) and Cel-miR-39-3p (internal reference) were used in reverse transcription PCR. The products of reverse transcription PCR were used as templates for SYBGreen I fluorescence quantitative PCR assay. **Results** The Trizol method and protease K digestion combined with Trizol method could effectively extract serum miRNA, but precipitation pyrolysis method was not so suitable for extraction of serum miRNA. Trizol method was better than protease K digestion combined with Trizol method, which could save the proteinase K digestion time and had better extracting effects. When the volume ratio of serum and Trizol reagent was 200 : 600, the extracting effect of Trizol method was best. The Ct values of Cel-miR-39-3p extracted by three methods were basically the same. There was a little loss of internal reference in the extraction process of Trizol method and protease K digestion combined with Trizol method. **Conclusion** The Trizol method as the extracting method of total RNA is suitable for miRNA extraction from serum. The extracted serum miRNA can meet the detection needs by adjusting the dosage of serum and Trizol reagent.

【Key words】 miRNA; Let-7a-5p; Cel-miR-39-3p; extracting

miRNA 是近年来发现的一类 18~24 nt 的单链非编码 RNA 小分子, 最早由 Lee 等^[1]在秀丽新小杆线虫中首次发现, 其主要通过与靶 RNA 分子以不完全互补和完全互补的方式影响基因的表达和稳定性, 从而参与调控多种生物学行为, 如: 发育的进程、干细胞分化、细胞凋亡、疾病及肿瘤的发生^[2-3]。miRNA 是一类自然形成的小非编码 RNA, 50% 以上的 miRNA 位于与癌症相关的染色体区域, 多种 miRNA 与肿瘤的发生、发展、转移有重要的关系, 因此有学者将 miRNA 命名为“oncomirs”^[4]。血清 miRNA 因具有取材方便、对冷热稳定、保存时间长、表达与肿瘤的诊断、分期、进展及预后等相关特点被认为是一种潜在的肿瘤标志物^[5-9]。本研究旨在通过比较三种

不同的血清 miRNA 提取方法, 为后续血清 miRNA 相关研究奠定基础, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取正常体检且各项指标正常的健康体检者 2 例, 依据《肺炎诊断 (WS 382-2012) 指南》经呼吸科临床医生诊断为肺炎的患者 2 例, 以及依据《013ACCP 肺癌的诊断与治疗指南 (第 3 版)》经病理诊断为肺癌的患者 2 例。采集各研究对象全血标本 3 mL 离心后收集血清。

1.2 仪器与试剂 普通 PCR 仪器为 ABI 公司 GeneAmp[®] PCR System 9700 PCR 仪, 荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司 StepOne PCR 仪。SYBR[®]Green QPCR Master Mix 购自安捷

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81401311); 首都临床特色应用研究项目 [吴阶平 (Z141107006614009)]。

作者简介: 陈昌国, 男, 博士, 主管技师, 主要从事分子免疫相关研究。

伦公司(批号 0006148864);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(批号 00127244)购自 Thermo SCIENTIFIC 公司;miRNA 特异性反转录引物、PCR 引物及线虫 Cel-miR-39-3p 内参(20 fmol/sample)miRNA 购自广州瑞博生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 Trizol 法提取血清 miRNA 200 μ L 血清中加入 500 μ L Trizol,涡旋振荡 30 s,室温静置 5 min;加 200 μ L 三氯甲烷,剧烈颠倒混匀 45 s,室温静置 5 min;4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 30 min,小心将上清液移至新的 1.5 mL 离心管;加等体积的异丙醇至上清液中,颠倒混匀,置-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min;4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 30 min,沉淀总 RNA;吸弃上清液,沉淀用体积分数 75% 乙醇洗 1 次;4 $^{\circ}$ C,以 7 500 r/min 离心 5 min,沉淀 RNA;吸净乙醇,50 μ L DEPC 水溶解 RNA。

1.3.2 蛋白酶消化法提取血清 miRNA 取 200 μ L 血浆样本于 1.5 mL 离心管中,加入 10 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),56 $^{\circ}$ C 消化 30 min 后进行 RNA 提取,步骤同 1.3.1。

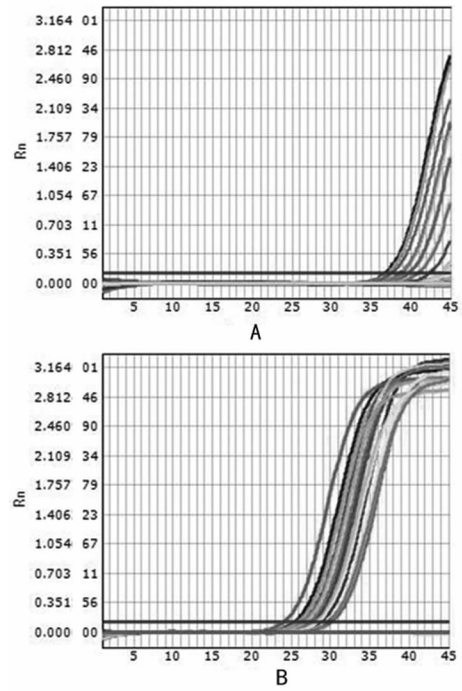
1.3.3 沉淀裂解法提取血清 miRNA 取 200 μ L 血浆样本于 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L 核酸提取液,涡旋振荡 15 s,室温 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;在沉淀中加入 50 μ L 核酸裂解液吹打混匀,涡旋振荡 15 s,100 $^{\circ}$ C 金属浴加热 10 min,室温 13 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为反转录 PCR 的模板。

1.3.4 反转录及荧光定量 PCR 反应体系及条件 采用 Thermo SCIENTIFIC 公司反转录试剂盒进行反转录,所有体系及步骤按照说明书进行操作,取 2 μ L 反转录 cDNA 为模板以 Let-7a-5p 荧光定量 PCR 引物进行扩增。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,70 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环,收集荧光。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件包进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种方法提取血清 miRNA 后 Let-7a-5p 及 Cel-miR-39-3p 检测情况 三种方法提取的血清 miRNA 经荧光定量 PCR 检测均使 Let-7a-5p 和 Cel-miR-39-3p 有效扩增,见图 1。

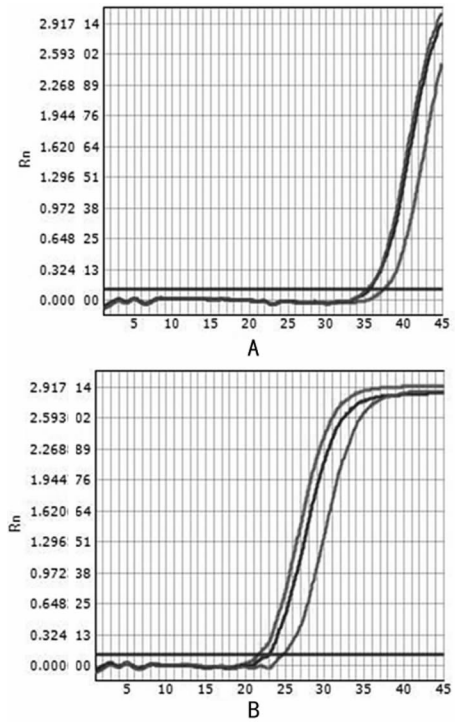


注:A 为 Let-7a-5p 的 PCR 扩增曲线;B 为 Cel-miR-39-3p 的 PCR 扩增曲线。

图 1 荧光定量 PCR 扩增曲线

2.2 三种方法提取血清 miRNA 后内参 Ct 值差异 三种方法提取血清 miRNA 过程中掺入 25 fmol 内参后,经过后续步骤操作,Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法、沉淀裂解法提取的 miRNA 中,Cel-miR-39-3p 的扩增 Ct 值分别为 26.3 ± 1.5 、 27.4 ± 1.3 、 28.2 ± 1.8 ,差异无统计学意义($P = 0.12$)。

2.3 不同血清用量与 Trizol 试剂提取血清 miRNA 的效率 对分别设置 3 个不同的血清与 Trizol 试剂体积比(100 : 600、200 : 600 及 300 : 600),比较不同血清用量与 Trizol 试剂提取血清 miRNA 的效率,同时检测 Let-7a-5p 和 Cel-miR-39-3p,发现血清与 Trizol 试剂体积比为 200 : 600 时,提取效果较好(绿色曲线),荧光定量 PCR 扩增曲线见图 2。



注:A 为 Let-7a-5p 的 PCR 扩增曲线;B 为 Cel-miR-39-3p 的 PCR 扩增曲线。

图 2 不同血清用量与 Trizol 试剂提取血清 miRNA 的效率比较

3 讨论

研究显示,miRNA 表达与肿瘤的诊断、分期、进展及预后相关,其表达水平的检测有可能为观察临床疗效、判断肿瘤是否复发及预后提供帮助。此外,miRNA 广泛存在于泪液、乳汁、唾液等多种体液中,在血浆、血清中具有良好的稳定性,在多次反复冻融、24 h 室温放置、强酸、强碱、DNA 酶、RNA 酶等恶劣情况下仍不被降解且保持相对稳定的水平^[10-11],在血清和血浆中的表达不存在差异,外周血 miRNA 的表达亦不存在明显的性别、个体差异^[5,9,12],这些均提示 miRNA 有潜力作为肿瘤标志物应用于肿瘤的早期诊断、疗效判定及转移复发等病情的判断指标^[7-8]。

目前,常用的血清 miRNA 的提取方法有柱分离法和 Trizol 法,相对于柱分离技术而言,Trizol 法能够较好地保留包括 miRNA 在内的小片段成分,但该方法主要用于细胞总 mRNA 提取,并未考虑 miRNA 与 mRNA 在物理性质及存在方式上的差别。赵德尧等^[13]曾尝试在 Trizol 法抽提 miRNA 前对标本进行加热、加入十二烷基硫酸钠(SDS)、超声裂解及蛋白酶 K 消化等处理,发现加热或加入 SDS 能够显著提高血清 miRNA 的提取效率^[13]。为进一步开展血清 miRNA 的相关研究工作,本课题组分别采用 Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法

及沉淀裂解法抽提血清 miRNA,发现经典的 Trizol 法能够有效提取到血清 miRNA 并且通过调整血清与 Trizol 试剂的比例可满足实验的要求;蛋白酶 K 消化+Trizol 法并未提高提取效率并且操作时间稍长。miRNA 主要以蛋白复合体的形式存在,提高 miRNA 提取效率的关键是使 miRNA 从蛋白复合体上解离下来,依据该特点本研究尝试使用临床提取核酸用的核酸沉淀液及核酸提取液抽提血清 miRNA,实验结果证实该方法不适用于血清 miRNA 的提取。经荧光定量 PCR 检测,三种方法提取物中,内参 Cel-miR-39-3p 的 Ct 值无明显差异,说明三种抽提方法均能有效保留加入的内参^[14-15]。本研究成功地利用 Trizol 法、蛋白酶 K 消化+Trizol 法提取到血清 miRNA,并且 Trizol 法提取效果相对更好,利用荧光定量 PCR 进行检测的结果能满足实验要求。

参考文献

- [1] Lee RC,Feinbaum RL,Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell,1993,75(5):843-854.
- [2] Macfarlane LA,Murphy PR. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer[J]. Curr Genomics,2010,11(7):537-561.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,136(2):215-233.
- [4] Esquela-Kerscher A,Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(4):259-269.
- [5] Cortez MA,Welsh JW,Calin GA. Circulating microRNAs as noninvasive biomarkers in breast cancer[J]. Recent Results Cancer Res,2012,195:151-161.
- [6] 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.

- [7] Wang J,Zhang KY,Liu SM,et al. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer[J]. Molecules,2014,19(2):1912-1938.
- [8] Shen J,Stass SA,Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors[J]. Cancer Lett,2013,329(2):125-136.
- [9] Cortez MA,Bueso-Ramos C,Ferdin J,et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers[J]. Nat Rev Clin Oncol,2011,8(8):467-477.
- [10] Grasedieck S,Scholer N,Bommer M,et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability[J]. Leukemia,2012,26(11):2414-2416.
- [11] Mraz M,Malinova K,Mayer J,et al. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,390(1):1-4.
- [12] 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.
- [13] 赵德尧,杜权,郭江峰,等. 血浆 microRNA 提取技术优化[J]. 浙江理工大学学报,2010,27(4):595-599.
- [14] Kroh EM,Parkin RK,Mitchell PS,et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) [J]. Methods,2010,50(4):298-301.
- [15] Arroyo JD,Chevillet JR,Kroh EM,et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2011,108(12):5003-5008.

(收稿日期:2015-03-06 修回日期:2015-06-12)

(上接第 2975 页)

作用,IL-17 表达水平与气道高反应性和临床严重程度有关^[8-10];卵清蛋白致敏性支气管哮喘小鼠肺组织中 IL-17 mRNA 和蛋白水平均高于正常小鼠^[11]。本研究发现 B 组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-17 浓度较 A 组和 C 组均显著升高,而 C 组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-17 浓度与 A 组相近,同时肺组织病理及免疫组化结果亦证实尘螨疫苗治疗后的 C 组小鼠气道和肺组织 IL-17 浓度显著低于 B 组,提示 IL-17 在哮喘发生和发展中起着重要作用,尘螨疫苗免疫治疗可能通过降低 IL-17 的表达减轻哮喘炎症反应及气道高反应性。

参考文献

- [1] Mizutani N,Nabe T,Yoshino S. IL-17A promotes the exacerbation of IL-33-induced airway hyperresponsiveness by enhancing neutrophilic inflammation via CXCR2 signaling in mice[J]. J Immunol,2014,192(4):1372-1384.
- [2] Choi JP,Kim YS,Tae YM,et al. A viral PAMP double-stranded RNA induces allergen-specific Th17 cell response in the airways which is dependent on VEGF and IL-6[J]. Allergy,2010,65(10):1322-1330.
- [3] Sade K,Roitman D,Kivity S. Sensitization to Dermatophagoides,Blomia tropicalis, and other mites in atopic patients[J]. J Asthma,2010,47(8):849-852.
- [4] 陈代雄,周平坤,冉丕鑫,等. 屋尘螨和粉尘螨主要变应原的筛选和分析[J]. 中国热带医学,2009,9(2):232-234.

- [5] Schulze J,Voss S,Zissler U,et al. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge [J]. Respir Res,2012,13(3):224-233.
- [6] Iwakura Y,Ishigame H,Saijo S,et al. Functional specialization of interleukin-17 family members [J]. Immunity,2011,34(2):149-162.
- [7] 柴若楠,林小平,谢华,等. 阿罗格尘螨疫苗治疗儿童哮喘安全性评价[J]. 临床军医杂志,2012,40(2):428-430.
- [8] Barczyk A,Pierzchala W,Sozańska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine[J]. Respir Med,2003,97(6):726-733.
- [9] Albano GD,Di Sano C,Bonanno A,et al. Th17 immunity in children with allergic asthma and rhinitis: a pharmacological approach[J]. PLoS One,2013,8(4):e58892.
- [10] Chien JW,Lin CY,Yang KD,et al. Increased IL-17A secreting CD4⁺ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity [J]. Clin Exp Allergy,2013,43(9):1018-1026.
- [11] 胡斯明,罗雅玲,赖文岩,等. 地塞米松对哮喘小鼠 Th17 细胞因子 IL-17 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2009,29(6):1185-1188.

(收稿日期:2015-03-25 修回日期:2015-07-02)