

Hcmv - miR - UL112 荧光定量 RT - PCR 检测方法的建立

陈琼娜 沈 凯 黄燕燕 查 瑶 方建玮 续力云 周吉航 陈 芬 刘晓光

摘 要 **目的** 建立一种能快速准确检测 hcmv - miR - UL112 的方法。**方法** 根据 miRBase 网站中公布的 hcmv - miR - UL112 基因序列,通过设计引物、探针及优化反应条件,建立了一种实时荧光定量 PCR 方法对 hcmv - miR - UL112 进行定量检测,并进行敏感度、重复性和特异性实验,同时对 PCR 产物进行测序验证。**结果** 获得了 1 条特异性茎环反转录引物,一条特异性 PCR 正向引物和通用反向引物。PCR 最佳反应条件为 95℃ 10min,53℃ 2min;95℃ 15s,57℃ 40s,共 40 个循环。该方法的批内变异系数 CV 和批间 CV 均 <5%,相关系数 R^2 均 >0.99,扩增效率均 >90.0%。**结论** 成功建立了一种敏感度高、特异性强、重复性好并且简便快速的 hcmv - miR - UL112 荧光定量 qRT - PCR 检测方法。

关键词 hcmv - miR - UL112 microRNA RT - PCR 荧光定量

中图分类号 R71;R73 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.015

Development of a Fluorescent Quantitative RT - PCR assay for Hcmv - miR - UL112. Chen Qionгна, Shen Kai, Huang Yanyan, et al. Department of Clinical Laboratory, Zhoushan Hospital, Zhejiang 316000, China

Abstract **Objective** To establish a rapid and accurate method for the detection of hcmv - miR - UL112. **Methods** The primers and optimum reaction condition were designed based on the gene sequences published in miRBase. Real - time RT - PCR was established and optimized for the detection of hcmv - miR - UL112 and carried on the sensitivity, the duplication and the specificity experiments. PCR products are validated by gene sequencing. **Results** The results acquired a specific stem - loop reverse transcription primer, a specific PCR forward primer and a general reverse primer. The optimum reaction condition of hcmv - miR - UL112 TaqMan fluorescence quantitative PCR is 95℃ 10min, 53℃ 2min; 40 circulations; 95℃ 15s, 57℃ 40s. Both the variance inter - batch CV and the variance intra - batch CV of this method was below 5%. The correlation of association R^2 reaches was as high as 0.99, and the amplification efficiency was greater than 90.0%. **Conclusion** We successfully established a method of hcmv - miR - UL112 fluorescence quantitative RT - PCR detection which is highly sensitive, strongly specific, well reproducible, simple and quick.

Key words Hcmv - miR - UL112; miRNA; RT - RCR; Fluorescent quantitative

microRNA (miRNA) 是一类非编码的、内源性的单链低分子 RNA,成熟 miRNA 长约 18~25nt,普遍存在于各种生物中,它们调节了多种生物学信号通路^[1,2]。Hcmv - miR - UL112 是由人类巨细胞病毒 (HCMV) 编码的 miRNA^[3]。已有的研究结果显示, hcmv - miR - UL112 不仅是 HCMV 病毒发挥免疫逃逸在体内长期存活的关键,也是 HCMV 感染导致血管伤害和高血压的节点分子^[4]。迅速、准确地定量

检测 hcmv - miR - UL112 基因的表达是探究其功能的重要环节。

实时荧光定量 PCR 能够灵敏、快速地精确定量起始模板浓度,但是 miRNA 在不同物种和组织的表达水平有很大差异,特别是就成熟的 miRNA 而言,因其片段长度较短、丰度较低等特点都给传统的实时定量 PCR 检测带来很大的难度^[5]。笔者通过特殊设计的茎环结构的反转录引物,配合实时定量 PCR 引物及探针精确的检测了微量样品中 miRNA 的表达水平。本研究以巨细胞病毒小 RNA hcmv - miR - UL112 为模板,建立了一种快速、简便、敏感、特异的 hcmv - miR - UL112 Taqman qRT - PCR 检测方法,为揭示 hcmv - miR - UL112 生物学功能奠定基础,并为 miRNA 定量检测提供新思路、新方法。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目 (LY13H020001, LQ13H10001);浙江省公益性技术应用研究计划 (2012C37036);舟山市科技计划项目 (2011C32004, 2012C13024)

作者单位:316005 舟山医院检验中心 (陈琼娜),心血管内科 (沈凯),细胞分子生物学实验室 (黄燕燕、续力云、周吉航、刘晓光); 325000 温州医科大学 (查瑶、方建玮、陈芬)

通讯作者:刘晓光,电子信箱:lxg2004@foxmail.com

材料与方法

1. 材料: DEPC 和 Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司), hcmv - miR - UL112 人工合成模板 (百奥迈科生物技术有限公司), 引物、探针 (上海捷瑞公司), T 载体 (美国 Promega 公司), 其他常规试剂 (国产分析纯)。MyCycler 96 孔 PCR 仪, ChemoDoc 凝胶成像系统 (美国 Bio - Rad 公司), RT 和 PCR 试剂盒、3130XL 测序仪和 7500 real time PCR System (美国 ABI 公司)。

2. 方法: (1) 实时定量 PCR 引物和探针的合成: 根据 miRBase 中公布的 hcmv - miR - UL112 基因序列, 参考本课题组之前申请的专利 (专利申请号: 201210217137.3; 专利名称: 一种用于扩增短链 RNA 的引物及其相关方法), 合成相应 PCR 引物和探针, hcmv - miR - UL112 序列: 5' - AAGUGACGGUGAGAUC-CAGGCU - 3'; 茎环反转录引物序列: 5' - GTCGTATC-CAGAGGTCATCGAGGTGCTCGTAGTCGGAGCGTCCCT-GCGAGGCTATGACCTCTGGATACGACAGCCTGGA - 3'; 特异性正向引物: 5' - TCAGCTAAGTGACGGT-GAGATCCA - 3'; 通用反向引物: 5' - CCAGAGGT-CATCGAGGTGCTCGT - 3'; 通用探针: FAM-CG-GAGCGTCCCTGCGAGGCT - - TAMRA。(2) 反转录反应体系的配制: 参照反转录试剂盒 (ABI 公司, 美国), 反转录反应体系: 100mm dNTP mix 0.15 μ l, 反转录酶 1.0 μ l, RNA 酶抑制剂 0.19 μ l, hcmv - miR - UL112 模板 5.0 μ l, 反转录引物 3.0 μ l, 加水至 15 μ l。条件参数如下: 16 $^{\circ}$ C 30min, 42 $^{\circ}$ C 30min, 85 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。(3) 荧光定量 PCR 制定标准曲线: 经反转录得到的 cDNA 用 DEPC 水倍比稀释成 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 拷贝/微升 7 个浓度梯度作标准曲线, 另设一个空白对照 (加 DEPC 水)。参照 PCR 试剂盒 (ABI 公司, 美国), 反应体系如下: 2 $\times$ PCR master mix 10 μ l, 反向引物 0.5 μ l, 正向引物 0.5 μ l, cDNA 1.5 μ l, probe 0.5 μ l, 加水至 20 μ l。引物终浓度为: 10 μ mol/L。按以上反应体系进行循环参数的优化, 笔者选用两步法, 即变性和退火两步循环。变性选择在 93 $^{\circ}$ C, 20s, cDNA 第 2 链退火和收集荧光信号的温度梯度如下: 52 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C, PCR 扩增循环的退火温度梯度为 56 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C。通过荧光曲线的背景、形态、峰值、信噪比来判断反应体系和循环参数的优劣。以每个浓度标准品作模板进行荧光定量反应, 所得荧光曲线经软件处理得标准曲线。(4) 测序验证扩增目的产物: 使用 Agarose Gel

DNA Purification Kit Ver. 2.0 (TaKaRa, 大连) 琼脂糖凝胶电泳回收目的 DNA 片段。将回收的片段使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。再用热击法转化 E. coli DH5 α , 少量提取质粒 DNA, 取 3 μ l 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测条带是否单一; 取 1 μ l 测 A 值 (空白为 EB 液), 计算测序反应所得的模板量, -20 $^{\circ}$ C 保存。测序反应体系如下: BigDye 原液 0.2 μ l, 5 $\times$ buffer 1 μ l, 测序引物 0.5 μ l, PCR 产物 1 μ l, 加水至 5 μ l。反应条件: 96 $^{\circ}$ C 1min, 96 $^{\circ}$ C 10s, 25 次循环: 50 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 4min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将测序产物纯化后, 立即置于冰上 4min, 上机测序。

3. 方法学评价: (1) 根据标准曲线判断方法的线性范围, 维持相关系数在 0.99 以上。(2) 构建标准曲线重复性: ①批内重复性: 1 次检测标准品重复做 3 个平行管; ②批间重复性: 每天做 1 次, 连续做 5 天。(3) 敏感度: 将构建的标准品 10 倍倍比稀释至浓度极限 10^1 拷贝/微升, 用 DEPC 水做空白对照, 进行荧光定量反应, 能区别于空白对照的最低 miRNA 浓度即为该法的敏感度。(4) 特异性: 标准品加入等体积的血清 RT-PCR 后经电泳检测得到条带分析, 经测序检测目的片段。

结 果

1. 荧光定量 PCR 最佳反应体系和循环参数: 经过对反应体系和循环参数的优化, PCR 最佳反应体系为 20 μ l, 最佳反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10min, 53 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 15s, 57 $^{\circ}$ C 40s, 共 40 个循环。

2. 标准曲线和方法学评价: 线性范围和敏感度: 本方法在 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/微升构建的标准品范围内取得了较好的线性 (图 1), 相关系数 $r^2 = 0.997$, 扩增效率 98.667%; 荧光定量 RT-PCR 的检出限试验

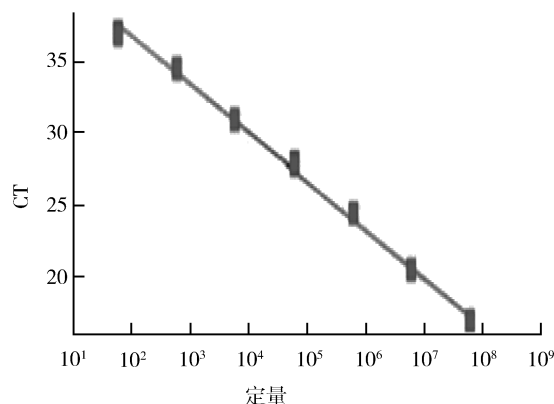


图 1 定量 PCR 的标准曲线

$10^7 \sim 10^1$ 拷贝/微升, 从下往上

显示 PCR 的扩增敏感度高(图 2);并在批内及批间重复性实验中可见标准品的扩增曲线重复性很好(图 3);特异性强:PCR 产物经电泳检测得到条带,分析显示除目的片段外无其他非特异性条带的存在(图 4);并经测序验证扩增的产物与预期设计的含茎环结构的的目的基因 hcmv - miR - UL112 片段序列相符(图 5)。

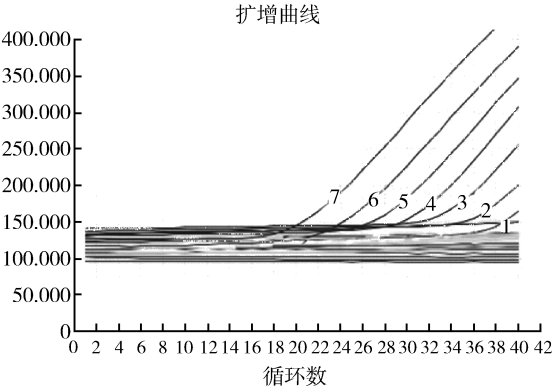


图 2 荧光定量 RT-PCR 的检出限试验
标准品由 7~1 分别代表 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/微升

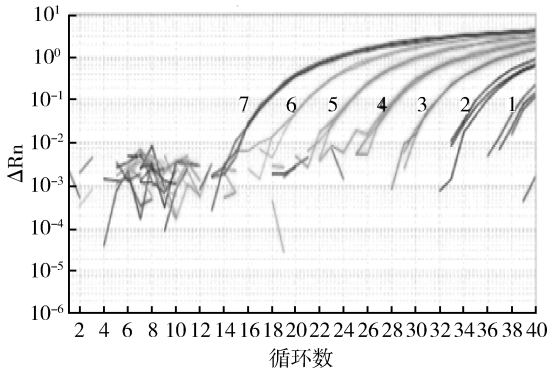


图 3 荧光定量 RT-PCR 的重复性试验
7~1 代表 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/微升标准品

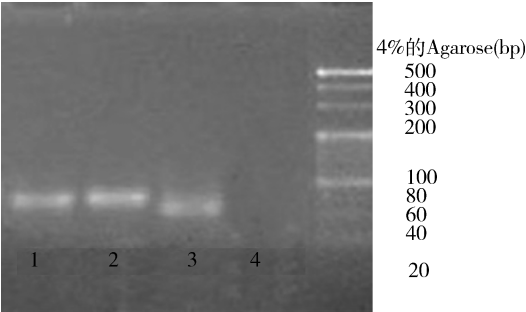


图 4 PCR 扩增产物的鉴定

1. 标准品 10^2 加等体积血清进行 RT-PCR;2. 标准品 10^5 加等体积血清 RT-PCR;3. 直接加血清 RT-PCR;4. 阴性对照

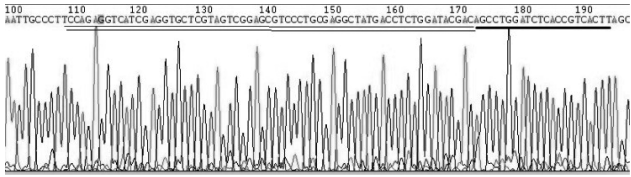


图 5 测序验证扩增目的产物

双下划线的为茎环引物序列,单下划线的为目的基因 hcmv - miR - UL112 片段序列

讨 论

在对 miRNA 作用与功能研究的不断深入后发现 miRNA 通过调控基因表达来参与生命过程中的一系列重要进程,包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞死亡以及各种人类疾病的发生、发展过程,而建立可靠的 miRNA 定量检测方法是一切研究的基础^[1,2,6,7]。

常用的 miRNA 检测方法包括 miRNA 芯片、原位杂交 (in situ hybridization histochemistry, ISHH)、Northern blot 和荧光定量 PCR^[8,9]。miRNA 芯片可以检测组织特异的 miRNA,以其高通量和并行处理的特点在基因信息分析中占据重要地位,但其信息质量的稳定性和可重复性比较差,且要实现定量检测难度较大,只能作为一种初筛手段^[10,11]。ISHH 是一种应用标记探针与组织细胞中的待测核酸杂交,再应用标志物相关的检测系统,在核酸原有的位置将其显示出来的一种检测技术,但是对于序列较短的 miRNA 无疑增加了 ISHH 法的检测难度^[12]。

Northern blot 法是检测 miRNA 的一般方法,常用来评价其他检测方法的可靠性,但是低通量,且敏感度和特异性都不够^[13]。而基于茎环引物的实时荧光定量 PCR 是目前 miRNA 定量的标准技术之一^[14]。由于成熟的 miRNA 碱基过少,很大程度地限制了引物、探针核苷酸序列的选择余地,与常规定量 PCR 不同,茎环引物的碱基堆积力和空间约束力有助于增强 miRNA 与 RT 引物结合的稳定性,提高反转录效率^[15]。但同样的,该 PCR 技术中存在 Taqman 探针荧光淬灭不彻底,针对这项不足,美国 ABI 公司推出了一种新 TaqMan 探针 - MGB 探针 (minorgroove binder oligodeoxynucleotide conjugate, MGB - ODN),优势在于大大降低了本底信号的干扰,且可以稳定探针与模板的杂交,升高探针 T_m 值,使较短的探针同样能达到较高的 T_m 值^[16]。其缺点在于探针设计有一定难度,需要验证效果,探针的合成和双荧光标记成本高,关键的是 MGB 受到专利保护。而本课题所

用的新式茎环引物和改进的 PCR 条件,很好地解决了 Taqman 探针荧光淬灭不彻底和探针长度短 T_m 值低的问题,同时节省了大量的时间和费用,规避了 MGB 的专利保护问题。

检测结果表明,本研究中建立的基于茎环引物的实时荧光定量 PCR 检测方法批内 CV 和批间 CV 均 $<3\%$,相关系数 R^2 均 >0.99 ,扩增效率均 $>90.0\%$ 。另外,通过对 4°C 下存放 1 周的临床血清标本中的 miRNA 的检测,证实了循环 miRNA 的稳定性。综上所述,本研究成功建立了一种敏感度高、特异性强、重复性好并且简便快速的 hcmv - miR - UL112 荧光定量 RT - PCR 检测方法,为 miRNA 的深入研究搭建了较好的技术平台。

参考文献

- 1 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2):215 - 233
- 2 Lim LP, Glasner ME, Yekta S, *et al.* Vertebrate microRNA genes [J]. Science, 2003, 299(5612):1540
- 3 Huang Y, Qi Y, Ma Y, *et al.* The expression of interleukin - 32 is activated by human cytomegalovirus infection and down regulated by hcmv - miR - UL112 - 1 [J]. Viro J, 2013, 10:51
- 4 Li S, Zhu J, Zhang W, *et al.* Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infectionclinical perspective [J]. Circulation, 2011, 124(2): 175 - 184
- 5 Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, *et al.* Real - time quantification of microRNAs by stem - loop RT - PCR [J]. Nucleic Acid Res, 2005, 33(20):e179
- 6 Feng J, Wang K, Liu X, *et al.* The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem - loop real - time RT - PCR

[J]. Gene, 2009, 437(1 - 2):14 - 21

- 7 Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. Cell, 2001, 107(7):823 - 826
- 8 Hunt EA, Broyles D, Head T, *et al.* MicroRNA detection: current technology and research strategies [J]. Annu Rev Anal Chem, 2015, 8(1):217 - 237
- 9 Johnson BN, Mutharasan R. Biosensor - based microRNA detection: techniques, design, performance and challenges [J]. Analyst, 2014, 139(7):1576 - 1588
- 10 Liang RQ, Li W, Li Y, *et al.* An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(2):e17
- 11 Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays [J]. Trends Biotechnol, 2008, 26(2):70 - 76
- 12 Nagata K, Hama I, Kiryu - Seo S, *et al.* microRNA - 124 is down regulated in nerve - injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3 [J]. Neuroscience, 2014, 256:426 - 432
- 13 Kim SW, Li Z, Moore PS, *et al.* A sensitive non - radioactive northern blot method to detect small RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(7):e98
- 14 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
- 15 Ful J, Zhu J, Yang M, *et al.* A novel method to monitor the expression of microRNAs [J]. Mol Biotechnol, 2006, 32(3):197 - 204
- 16 Bergallo M, Gambarino S, Martino S, *et al.* Comparison of two available RNA extraction protocols for microRNA amplification in serum samples [J]. J Clin Lab Anal, 2015, epub ahead of print

(收稿日期:2015 - 08 - 31)

(修回日期:2015 - 10 - 12)

(上接第 52 页)

- 5 管向东,刘紫钰. 2013 年《呼吸机相关性肺炎诊断、预防和治疗指南》——目标性治疗的解读 [J]. 中华医学杂志, 2014, 5: 333 - 334
- 6 李良,单仁飞,顾慧珍,等. 慢性阻塞性肺疾病对重症监护病房患者合并呼吸机相关性肺炎病死率的影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2013, 33(15): 1144 - 1148
- 7 Dymicka - Piekarska V, Wasiluk A. Procalcitonin (PCT), contemporary indicator of infection and inflammation [J]. Postepy Hig Med Dosw:Online, 2015, 69:723 - 728
- 8 黄燕新,姜朝新,叶振望,等. 血清降钙素原检测对血流感染的诊断价值分析 [J]. 检验医学与临床, 2014, 11(17): 2412 - 2414
- 9 Vikse J, Henry BM, Roy J, *et al.* The role of serum procalcitonin in the diagnosis of bacterial meningitis in adults: a systematic review and

meta - analysis [J]. Int J Infect Dis, 2015, 38:68 - 76

- 10 段红斌. 降钙素原对急性重症胆管炎病情严重程度及疗效评估的价值 [J]. 山西医药杂志, 2014, 43(21): 2538 - 2540
- 11 Zhou XY, Ben SQ, Chen HL, *et al.* A comparison of APACHE II and CPIS scores for the prediction of 30 - day mortality in patients with ventilator - associated pneumonia [J]. Int J Infect Dis, 2015, 30:144 - 147
- 12 Rumende CM, Mahdi D. Role of combined procalcitonin and lipopolysaccharide - binding protein as prognostic markers of mortality in patients with ventilator - associated pneumonia [J]. Acta Med Indones, 2013, 45(2):89 - 93

(收稿日期:2015 - 09 - 28)

(修回日期:2015 - 10 - 12)