

血清 miRNA 提取方法的优化

李迎迎, 王 丽, 仇晓文, 袁园园, 王曦辉, 王林嵩

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:利用正交试验法优化血清 miRNA 的提取方法,为进一步研究血清 miRNA 作为生物标记物提供方法学基础. 本文以 *hsa-miRNA-223-3p*, *hsa-miRNA-483-5p* 和 *hsa-miRNA-16* 为检测目标,通过比较 Trizol 法和 Trizol+酚/氯仿法的 miRNA 提取效率和 qPCR 检测结果,应用正交试验选择出最优实验方案. 结果表明血清 miRNA 的最优提取方法为:血清用 DEPC 水 4 倍稀释,离心条件为 4 ℃, 12 000 r·min⁻¹, 离心时间为 10 min, Trizol 法提取.

关键词:正交试验; 血清; miRNA

中图分类号:Q74

文献标志码:A

随着血清 miRNA 研究的深入,其作为一种疾病特别是肿瘤微创早期诊断方法也日益受到人们的青睐. 高质量血清 miRNA 的提取是血清 miRNA 能否有效作为诊断方法的第一步,也决定着诊断结果的准确性. 国内外已有较多文献报道血清 miRNA 的提取方法^[1-3],常用的有试剂盒、水饱和酚和 Trizol 等提取方法. 大多数报道认为试剂盒的提取效果较好^[4],但无可争议的事实是试剂盒的价格昂贵,每个反应大概需要 60~70 元^[3]. 血清中蛋白含量较高,有效去除蛋白质是获取高质量血清 miRNA 的关键步骤之一,而试剂盒在此方面明显比酚、Trizol 等常规方法具有优势,如应用 miRNA easy RNA 提取试剂盒(Qiagen, Inc)提取血清 miRNA 时,为保证蛋白质有效变性,可在血清中加入 10 倍体积的蛋白质变性液,而用酚、Trizol 等提取时,在血清中仅加入等体积的蛋白质变性液^[5]. 为此本实验采用正交法以 Trizol 提取方法为手段,对影响 miRNA 提取的因素进行优化,以获得经济方便的血清 miRNA 的提取方法.

1 材 料

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

Trizol 试剂(invitrogen 公司);水饱和酚(北京索莱宝科技有限公司);miRNA first-strand cDNA synthesis kit 和 miRNA Real-Time PCR Assay kit(北京艾德莱生物科技有限公司).

1.1.2 仪器

微量台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司);NanoDrop RND-2000 超微量分光光度计(美国 Thermo scientific 公司);7500 Real-Time PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司).

1.2 血清采集及处理

1.2.1 样本

样本采集于河南师范大学校医院,健康者 45 例,男 22 例,女 23 例,25~30 岁 26 例,30~60 岁 11 例,60~90 岁 8 例. 空腹采集静脉血 5 mL. 所有血液抽取均经本人同意.

1.2.2 血清制备

采集血液后,立即 37 ℃ 水浴 20 min,室温下离心 3 000 r·min⁻¹, 5 min 后收集血清.

收稿日期:2014-12-23;修回日期:2015-06-10.

基金项目:国家自然科学基金(31301883);新乡市重点科技攻关项目(ZG13002).

作者简介:李迎迎(1989-),女,河南焦作人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为动物生物化学.

通信作者:王林嵩(1957-),女,河南师范大学教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: wls@henannu.edu.cn.

1.3 实验方法

根据文献报道的 miRNA 提取方法所涉及因素^[6],设计正交试验,采用 $L_8(2^7)$ 正交试验表考察最佳提取条件^[7]. 正交因素水平安排见表 1,以血清 miRNA 绝对含量及纯度(A_{260}/A_{280})作为观测指标.

表 1 设定的影响因素及水平

水平	因素			
	A	B	C	D
	血清稀释倍数	离心时间/min	离心转速/($r \cdot \min^{-1}$)	miRNA 提取方法
1	4	5	10 000	Trizol 法
2	0	10	12 000	Trizol+酚/氯仿法

Trizol 提取血清 miRNA 的步骤按说明书操作. 所用血清样品按不稀释或用灭菌的 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)水将血清分别按 2、4 和 6 倍稀释后进行实验.

酚/氯仿提取血清 miRNA 参照文献^[5]中方法进行.

用微量法测定 RNA 浓度和纯度^[5]. RNA 逆转录按照逆转录试剂盒说明书进行.

实时荧光定量 PCR 按试剂盒说明书进行操作,反向引物由试剂盒提供,正向引物由 invitrogen 公司合成分别为: hsa-miR-223-3p: 5'-GCGCTGTCAGTTTGTCAAATACCCC-3'; hsa-miR-483-5p: 5'-CGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG-3'; hsa-miR-16: 5'-CGGTAGCAGCACGTAAATATTGGGCG-3'. PCR 条件: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 60 °C 40 s, 40 个循环. 每组反应设 3 个重复,加入 96 孔 PCR 板中,置于 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪中运行,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析基因相对表达量.

2 结果

2.1 RNA 纯度分析

由表 2 中极差分析结果(R 值)可知,4 个因素对评价指标(A_{260}/A_{280} 和 RNA 绝对含量)影响的主次顺序为: A(血清稀释倍数) > D(miRNA 提取方法) > B(离心时间) > C(离心转速). 未经稀释的血清所提 RNA 纯度(A_{260}/A_{280})为 1.48~1.61, RNA 绝对含量为 13.75~34.46, 而血清 4 倍稀释时所提 RNA 纯度为 1.61~1.89, RNA 绝对含量为 31.04~62.62, 均较未稀释血清明显提高. 由表 3 RNA 纯度方差分析表的 F 值, A(血清稀释倍数)对 RNA 纯度有极显著影响($P < 0.01$); D(提取方法)对 RNA 纯度有显著影响($P < 0.05$). 由此,获得高纯度血清 miRNA 的最佳提取条件是 $A_1B_2C_2D_1$, 即 A 为血清用 0.1% DEPC 水 4 倍稀释, B 为离心时间 10 min, C 为离心转速 $12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$, D 为 Trizol 法提取. 鉴于 RNA 的浓度和纯度的结果相似, 本实验仅显示了 RNA 纯度分析.

表 2 RNA 纯度的 $L_8(2^7)$ 正交试验结果

试验号	因素				评价指标	
	A	B	C	D	A_{260}/A_{280}	RNA 绝对含量 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	1	1	1	1	1.76	44.01
2	1	1	1	2	1.65	42.11
3	1	2	2	1	1.89	62.62
4	1	2	2	2	1.61	31.04
5	2	1	2	1	1.57	23.65
6	2	1	2	2	1.48	13.75
7	2	2	1	1	1.61	34.46
8	2	2	1	2	1.50	22.43
T1	6.91	6.46	6.52	6.83	T=13.07	T=274.07
T2	6.16	6.61	6.55	6.24		
\bar{x}_1	1.73	1.62	1.63	1.71		
\bar{x}_2	1.54	1.65	1.64	1.56		
R	0.18	-0.03	-0.01	0.15		

T1、T2 表示各因素各水平之和; \bar{x}_1 、 \bar{x}_2 表示各因素各水平的平均值; R 表示各水平平均数的差值; T 为总和; A、B、C 和 D 注解见表 1.

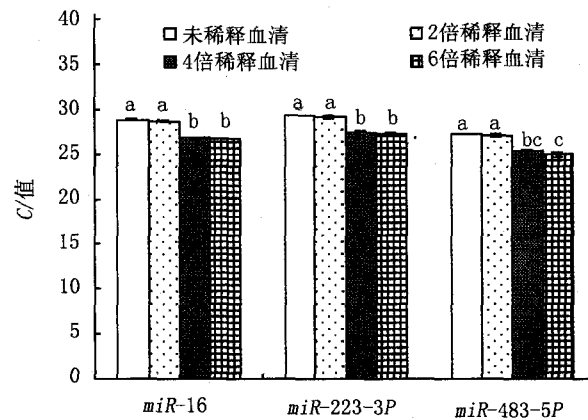
2.2 实时荧光定量 PCR 分析

为进一步确保正交法优化组合的血清 miRNA 提取方法的稳定性和可靠性,对血清进行梯度稀释后提取 miRNA 并采用 qPCR 分析 *miR-16*、*miR-223-3P* 和 *miR-483-5P* 的表达水平. 由图 1 可见,与未稀释血清相比,经 DEPC 水稀释的血清所得 miRNA 经 qRT-PCR 检测 *Ct* 值均降低,且随稀释倍数的增加,*Ct* 值逐步降低,4 倍和 6 倍稀释的血清所得 miRNA 经 qPCR 检测 *Ct* 值降低显著($P < 0.05$).

表 3 RNA 纯度的方差分析表

变异来源	<i>df</i>	SS	S^2	<i>F</i>	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
稀释倍数(A)	1	0.07	0.07	23.81**	6.61	16.26
方法(D)	1	0.04	0.04	14.74*		
试验误差	5	0.01	0.003			
总变异	7	0.13				

注:*df* 表示自由度,SS 表示平方和, S^2 表示样本方差, F 、 $F_{0.05}$ 、 $F_{0.01}$ 表示显著性检验, $F > F_{0.05}$ 表示差异显著, $F > F_{0.01}$ 表示差异极显著.* $P < 0.05$,** $P < 0.01$



不同小写字母代表差异显著(LSD, $P < 0.05$)

图1 正交法优化组合提取的miRNA的定量PCR验证

3 讨论

本实验针对血清 miRNA 应用的关键因素-血清 miRNA 的提取进行了正交试验优化. 利用正交表设计试验可以用最少的试验次数达到一个最优实验方法. 这是因为在正交试验设计时,考虑的因素及水平合理、分布均匀,减少重复实验次数^[8]. RNA 纯度是 PCR 实验成败的关键因素之一,因此,最优实验条件是:血清用 0.1%DEPC 水 4 倍稀释后,Trizol 法提取,离心条件为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min.

血清总蛋白含量为 $60\sim 80\ \text{g/L}$,相比于组织细胞,血清中蛋白含量远远高于核酸的含量,因此,如何有效去除血清蛋白质,提高 RNA 的纯度是血清 miRNA 检测应用的关键因素. 本实验正交优化结果显示血清稀释倍数是关键因素,通过对血清进行梯度稀释,进一步表明在一定范围内稀释倍数增加时 RNA 纯度和含量也增加,qPCR 的 *Ct* 值则下降. 结合文献报道,miRNA 提取试剂盒^[9-11]、酚^[5,12]、Trizol^[13,14] 等提取方法间的差异,可以解释为当血清稀释倍数增加时,单位血清体积的蛋白含量降低,同时 Trizol 用量随血清稀释倍数增加而增加,而 Trizol 的主要成分酚和异硫氰酸胍是蛋白质强变性剂,因此能有效去除血清蛋白,提高 miRNA 纯度而降低 qPCR 的 *Ct* 值. 相比于试剂盒,Trizol 法提取血清 miRNA 时每个反应仅需 $20\sim 30$ 元,可有效降低血清 miRNA 提取成本,有利于血清 miRNA 检测方法的应用普及.

参 考 文 献

[1] 聂 宇,张 洋,韩变梅,等. 常规 Trizol 法提取血清 microRNA 的改良[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(5):427-432.

- [2] 马雪梅. 基于 qPCR 的循环 miRNA 定量检测的方法探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(7): 503-505.
- [3] 徐翔, 贺丽卉. 血清中 miRNA 常用提取方法的综合比较[J]. 北方药学, 2012, 9(7): 31-32.
- [4] Jarry J, Schadendorf D, Greenwood C, et al. The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions[J]. Mol Oncol, 2014, 8(4): 819-829.
- [5] Wu C, Wang C, Guan X, et al. Diagnostic and prognostic implications of a serum miRNA panel in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. PloS One, 2014, 9(3): e92292.
- [6] Page K, Guttery D S, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids[J]. PloS One, 2013, 8(10): e77963.
- [7] 李春喜, 邵云, 姜丽娜, 等. 生物统计学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [8] 杨晶, 刘嘉琪, 王宝昌, 等. 正交试验优选桑白皮总黄酮的最佳提取工艺[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 319-321.
- [9] Takeshita N, Hoshino I, Mori M, et al. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2013, 108(3): 644-652.
- [10] Zhang T, Wang Q, Zhao D, et al. The oncogenetic role of microRNA-31 as a potential biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Sci, 2011, 121(10): 437-447.
- [11] Wu C, Li M, Hu C, et al. Clinical significance of serum miR-223, miR-25 and miR-375 in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(3): 1257-1266.
- [12] Zhang C, Wang C, Chen X, et al. Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Chem, 2010, 56(12): 1871-1879.
- [13] Cai E H, Gao Y X, Wei Z Z, et al. Serum miR-21 expression in human esophageal squamous cell carcinomas [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1563-1567.
- [14] 蒋敏, 喻文彬, 顾国浩. 实时荧光定量 PCR 检测食管癌血清中 miR-21 和 miR-205 的表达及意义[J]. 广东医学, 2014, 35(4): 535-537.

Optimization of a Method to Extract MicroRNA from Serum

LI Yingying, WANG Li, ZHANG Xiaowen, YUAN Yuanyuan, WANG Xiye, WANG Linsong

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To provide the methodological basis for serum miRNA as a biomarker, an orthogonal array design for optimizing miRNA extraction from serum was studied. In this study, RNA extraction efficiency and expression levels of *hsa-miRNA-223-3p*, *hsa-miRNA-483-5p* and *hsa-miRNA-16* were measured by real-time PCR to make a comparison between single Trizol method, and combination of Trizol and phenol/chloroform method. The results showed that the optimum miRNA extraction method was that serum was diluted 4 times with DEPC water, centrifuged at $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 10 min at $4\ ^\circ\text{C}$ and then used to extract miRNA by Trizol method.

Keywords: orthogonal test; serum; miRNA