

茎-环 RT-PCR 法定量 miRNA-421 的引物设计

赵 丽 杨 洋 温传俊

(南京师范大学生命科学学院分子细胞生物学研究所,江苏 南京 210046)

[摘要] 本研究旨在通过茎-环 RT-PCR 法,建立有效定量 miRNA-421 的 PCR 方法,探讨该方法在定量检测 miRNA 方面的应用价值。利用 miRBase 数据库获得 miRNA-421 的成熟序列,设计 3 条 miRNA-421 特异性反转录引物、Q-PCR 上游引物及通用下游引物。通过 10 倍梯度稀释 RNA 后特异性反转录,RT-PCR 分析不同引物互相配对 PCR 的扩增曲线及熔融曲线,鉴定出特异性好、扩增效率高的引物。为进一步鉴定引物的有效性,过表达 miRNA-421,用鉴定的成熟引物定量扩增。利用茎-环 RT-PCR 法设计、鉴定出 miRNA-421 引物:421RT7、F19,且这对引物特异性好、扩增效率高。通过设计引物组合,茎-环 RT-PCR 法能够很好地用于 miRNA 定量分析,并具有准确、快速、节约成本的优点。

[关键词] 茎-环 RT-PCR, miRNA-421, 引物设计

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2012)02-0083-06

Stem-Loop Real-Time Quantitative PCR for Quantification of miRNA-421 by Specific Primers

Zhao Li, Yang Yang, Wen Chuanjun

(Institute of Molecular Cell Biology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: This study was to establish a method of quantitative detecting miRNA-421 by stem-loop RT-PCR, and to evaluate the feasibility of this method in quantitative assay miRNA. miRBase database was used to get the mature sequence of miRNA-421. 6 primers were designed, including 3 primers for miRNA-421 specific reverse transcription, 2 forward and 1 general reverse primers for quantitative PCR, respectively. Different RT primers and forward primers were paired in Q-PCR. RNA after 10 times dilution was reverse transcribed and then detected by Q-PCR. Amplification curves and melting curves were analyzed to identify the primers with high specificity and efficiency of amplification. In order to further validate this primer, miRNA-421 was over-expressed in HepG2 and detected by Q-PCR. 2 primers, 421RT7 and 421F19 with high specificity and efficiency of amplification were obtained using stem-loop RT-PCR. Stem-loop RT-PCR provided a method that enabled fast, accurate and sensitive detection of miRNA.

Key words: stem-loop RT-PCR, miRNA-421, primers design

Micro RNA(miRNA)是一类在真核细胞中广泛存在的非编码单链小分子 RNA,其长度为 19 nt ~ 24 nt^[1]。miRNAs 通过与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区互补结合,抑制靶基因的翻译或诱导靶基因的降解和基因沉默^[2,3]。人类基因组编码超过 1 000 个 miRNA^[4]。据推测,人类超过 30% 的基因受 miRNA 的调控^[5]。

由于 miRNA 成熟序列只有 19 nt ~ 24 nt,没有 poly(A) 家族成员成熟序列差异小,在细胞中的表达水平普遍较低等,对 miRNA 的定量检测就存在一定的难度。目前,定量检测 miRNA 的方法有:Northern 杂交法^[6]、微阵列法^[7]、克隆和测序法^[8]、实时荧光定量 PCR 法^[9,10]等。miRNA 茎-环状引物反转录检测法(stem-loop RT-QPCR)^[11]是实时荧光定量 PCR 法中应用较为广泛的一种。

由于 miRNA 成熟序列短,茎环法通过人为地延长 miRNA 的长度以利于片段的扩增。特异性反转录引物由一段较长的共有序列和一段与 miRNA 成熟序列特异性互补的序列构成,经过退火反转录后,miRNA

收稿日期: 2012-02-23。

基金项目: 国家自然科学基金(81171913)、2008 年江苏省教育厅重大项目(08KJA520001)。

通讯联系人: 温传俊,副教授,研究方向: 肿瘤的发生、发展及转移的信号调控。E-mail: wenchuanjun@hotmail.com

被人为延长反转录为较长的 cDNA. 设计的 Q-PCR 扩增正向引物 3'端与 miRNA 反向互补,下游引物与反转录引物共有序列中通用引物的结合位点反向互补. 该方法具有灵敏度高、样品消耗量少、检测范围广、定量线性范围宽的优点.

目前对 miRNA 的研究中,定量试剂盒和 TaqMan 探针法是研究者大多采用的 miRNA 定量方法,对 miRNA-421 的定量研究也是如此^[12-44]. 这些方法虽然特异性好、灵敏度高、样品消耗量少,但是与茎-环 RT-PCR 法定量 miRNA-421 相比,价格昂贵、步骤繁琐,而且可以定量检测的样本量有限. 本实验通过茎-环 RT-PCR 法,建立有效定量 miRNA-421 的 PCR 方法. 该方法的建立为今后利用 SYBR Green I 染料,茎-环法定量检测样本中的 miRNA 奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞、人肝癌细胞 HepG2 来源于本实验室,RPMI1640 培养液、DMEM 高糖培养基及胎牛血清购自 GIBCO,总 RNA 抽提试剂 Trizol 及转染试剂 Lipo2000 购自 Invitrogen,RT-PCR 试剂盒、SYBR Premix EX Taq(Perfect real time) 试剂均为 TAKARA 公司产品,miRNA-421 及其阴性对照购自上海吉玛公司.

1.2 细胞及培养

人乳腺癌 MCF-7、人肝癌细胞 HepG2 置于另加 RPMI1640 培养液和 10% 胎牛血清的培养基中,于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养.

1.3 方法

1.3.1 MicroRNA-421 成熟序列的获得

在 miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org>) 中获得 hsa-miR-421 成熟序列(MIMAT0003339): 5'-AU-CAACAGACAUAUAAUUGGGCGC-3'.

1.3.2 miRNA-421 引物序列的设计

对于每 1 个 miRNA,设计了 3 条引物: 1 条特异性反向引物用于反转录,1 条正向引物,还有 1 条通用的反向引物.

每个特异性反转录引物的都带有 1 段固定的序列,可以形成 1 个茎环,其 5'端的 36 个核苷酸序列是固定的,固定的序列为: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG-3',其形成一个 8 核苷酸环和 20 核苷酸茎的结构,其 3'端的 6~8 个核苷酸就与 miRNA 反向互补,分别命名为 421RT6、421RT7、421RT8(引物序列见表 1) .

正向引物长约 25~32 个核苷酸,在 3'端有 11~18 个核苷酸与相应的 miRNA 互补. 每个正向引物也带有 1 段固定的序列,固定的序列为: ACACTCCAGCTGGG. 在这个序列后加上 miRNA 成熟序列,5'端起除 3'端 6~8 个核苷酸后剩下的碱基序列,把 U 变成 T 即可. 因为我们设计的正向引物分别包含 mir-421 成熟序列 5'端 18、19 个核苷酸,因此命名为 421F18、421F19.

通用的下游引物(General Reverse ,GR) 23 nt,其中 18 个核苷酸对应特异反向引物的茎环结构部分. 通用下游引物序列见表 1.

表 1 反转录引物及实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1 Primers for reverse transcription and fluorescent quantification PCR

Genes	Names	Sequence	Product length
mi421RT	421RT6	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG GCGCCC-3'	
	421RT7	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG GCGCCCA-3'	
	421RT8	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG GCGCCCA-3'	
mi421F	421F18	5'-ACACTCCAGCTGGGATCAACAGACATTAATTG-3'	
	421F19	5'-ACACTCCAGCTGGGATCAACAGACATTAATTGG-3'	
mi421R	GR	5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'	94 bp
U6	U6-F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	
	U6-R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	

U6 基因作为内参,其特异性反转录引物与反向引物序列相同,见表 1。

1.3.3 总 RNA 提取及质量检测

收集 MCF-7 细胞,根据 Invitrogen 公司的使用说明,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,所得 RNA 溶于 0.1% DEPC 水中。总 RNA 样品经过 2% 琼脂糖电泳检测 RNA 完整性,再用 Nanodrop 光度计测定 RNA 的浓度,读取在 260 nm 和 280 nm 波长处的光吸收值的比值。

1.3.4 RNA 特异性反转录

在做反转录时用的引物不再是 oligodt 和 random6,而是改用 miRNA 对应的特异性反向引物(加上一个 U6 特异性反转录引物)。

取 MCF-7 细胞 RNA(无需去除基因组),参照 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明操作合成 cDNA,以 miRNA-421 特异性反转录引物 mi421RT6 为例,20 μ L 反转录体系如下:5 \times primer script buffer 4 μ L,Enzymix 反转录酶 1 μ L,mi421RT6 0.5 μ L,U6 特异性反转录引物(U6R) 0.5 μ L,RNA 1 ug,加水(无 RNA 酶)补至 20 μ L 体系;同时用 RNase-free 水 10 倍梯度稀释 RNA,使 20 μ L 反转录体系分别含有 RNA 0.1 ug、0.01 ug、0.001 ug、0 ug(RNase-free 水),即以 mi421RT6 为引物特异性反转录 5 个体系,使其各体系中分别反转录 RNA 1 ug、0.1 ug、0.01 ug、0.001 ug、0 ug。其他 2 个 miRNA-421 特异性反转录引物 mi421RT7、mi421RT8 同上进行反转录。反应条件为:42 $^{\circ}$ C 温育 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s 灭活逆转录酶,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.5 定量 PCR 反应鉴定引物

由于 miRNA 成熟序列短,碱基数目及序列固定,可能会产生引物二聚体、发夹结构等引物二级结构从而会影响扩增。因此在设计的几组 miRNA 特异性引物需要经过鉴定,筛选出特异性好、扩增效率高的引物才能够使用。

以 U6 为内参,实时荧光定量 PCR 20 μ L 反应体系:2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,模板 cDNA 1 μ L,上下游引物(10 μ M)各 0.5 μ L,双蒸水定容至 20 μ L。实时荧光定量检测时,上游引物 421F18、421F19 分别与通用下游引物 PCR 扩增 3 组模板 cDNA:421RT6、421RT7、421RT8(各有 5 个浓度梯度)。

反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环,循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 开始每 10 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C,取荧光值绘制溶解曲线,确定扩增产物的特异性,用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法分析数据结果。

1.3.6 转染 miRNA-421 并 Q-PCR 检测

将 HepG2 细胞接种到 6 孔板,当 24 h 后细胞汇合度为 40%~50% 时进行转染,设置 MOCK、NC、miRNA-421(NC、miRNA-421 终浓度均为 50 nM)3 组,转染 48 h 后收集细胞,采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA。总 RNA 提取、反转录方法同上,实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-421 的表达。

2 结果

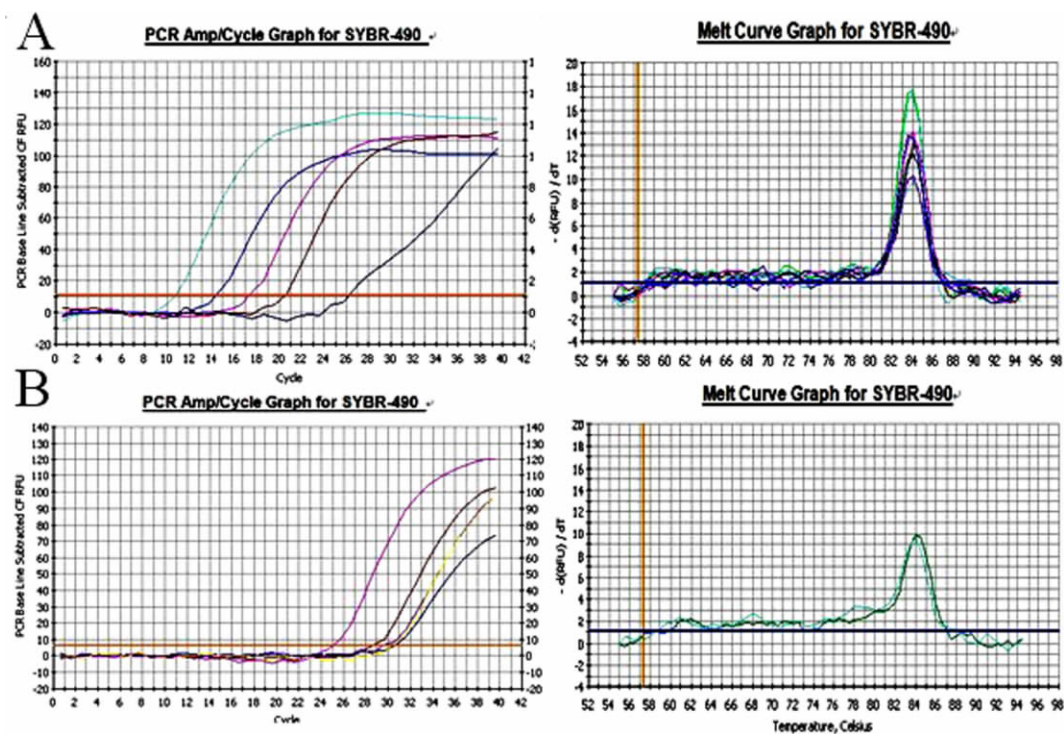
2.1 RNA 质量的检测

提取的总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 的比值,将没有降解、 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 1.8~2.1 之间的 RNA 样品进行反转录。

2.2 定量 PCR 结果

RNA 经 10 倍梯度稀释后反转录、Q-PCR 检测,产生的循环阈值 C_t 在理论上相差约 3.3 倍。由于实验过程中影响因素较多,实验数据没有理论值标准,但是从表 2 中可以看出内参 U6 的 C_t 值之间的差值(模板 cDNA 含量相差 10 倍)大约为 3.3,而 miRNA-421 经反转录引物 421RT7 特异性反转录、421F19 及通用下游引物配对扩增之后的 C_t 值的前 3 组差值也接近于 3,并且通过溶解曲线图(图 1)可以看出引物具有较好的特异性。因此我们认为 miRNA-421 的 Q-PCR 扩增引物能够在实时荧光定量 PCR 中真实有效地反映模板中 miRNA-421 的含量。

为了进一步验证 RT7、F19 的有效性,我们又将反转录的 cDNA(1 ug RNA)10 倍梯度稀释后再进行扩增,发现:反转录之后再 10 倍梯度稀释 cDNA 模板,再进行 Q-PCR 检测,数据与引物验证过程(RNA 经 10 倍梯度稀释后反转录、Q-PCR 检测)的数据非常接近(见表 2)。由此进一步验证了引物鉴定过程的可信性。



A. 内参 U6 的扩增曲线及熔解曲线;B. miRNA-421RT7、F19 的扩增曲线及熔解曲线

图 1 Q-PCR 引物扩增曲线及熔融曲线

Fig.1 PCR amp/cycle graph and melt curve graph for SYBR

表 2 实时荧光定量 PCR 数据

Table 2 The PCR cycle datas for SYBR

Treatment		Ct(miRNA-421)	Ct(U6)
RNA amount in 20 uL reverse volume (Reverse transcription after 10 times dilution of RNA)	1 ug	25. 62	10. 98
	0. 1 ug	27. 41	14. 67
	0. 01 ug	30. 53	17. 77
	0. 001 ug	26. 64	20. 24
	0 ug	28. 24	22. 22
	1 ug	24. 76	10. 78
RNA amount in 20 uL reverse volume (10 times dilution of RNA then reverse transcription)	0. 1 ug	27. 47	14. 39
	0. 01 ug	31. 91	17. 41
	0. 001 ug	37. 84	20. 59
	0 ug	N/A	26. 22

2. 3 Q-PCR 检测 miRNA-421 的表达

以 MOCK、Negative Control 为对照组 ,转染 miRNA-421 48 h 后提取 RNA ,利用 miRNA-421RT7 特异性反转录后 ,进行以 F19 为上游引物的 Q-PCR 扩增 ,发现 miRNA-421 的表达与对照组相比上升接近 400 倍 ,这说明我们的引物能够真实地反映 miRNA-421 的表达.

3 讨论

从 1993 年在线虫中首次发现 miRNA^[15] ,其在复杂疾病中的作用越来越受到人们的关注 ,研究者发现 miRNA 功能的异常能够导致各种人类复杂疾病 ,如癌症^[16 ,17]、心血管疾病^[18 ,19]、遗传疾病^[20-22] 等疾病的发生.

随着对 miRNA 的深入研究 ,试验中检测的样本量越

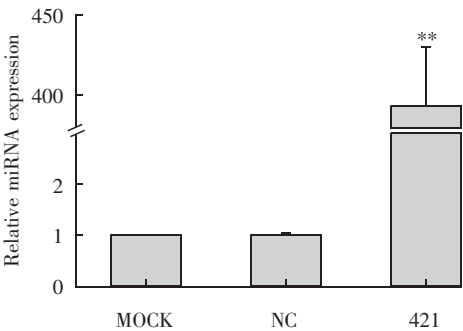


图 2 Q-PCR 引物 RT7、F19 检测 miRNA-421 的表达

Fig.2 The relative expression of miRNA-421 detected by Q-PCR after transfection

来越大,这就对 miRNA 定量检测技术提出了更高的要求.现在实验室多采用商业化的试剂盒对 miRNA 进行提取、反转录及定量检测,如 miRNeasy kit (Qiagen)、Megaplex RT stem-loop primer pool (Applied Biosystems)^[23]、mirVana RNA maker system (Ambion)^[24]等.而通过茎-环 RT-PCR 法检测 miRNA 的含量,可以在同一反转录体系中利用 RT 引物库进行逆转录,满足若干个 miRNA 定量检测的模板需求,节约成本、提高效率;而且每个 miRNA 都设计了 1 套特异性引物,用于 Q-PCR 检测,实现了模板扩增的特异性,从而可以区分同一家族内的不同成员.

本实验中,茎-环 RT-PCR 法反转录,人为地延长了 miRNA-421 的长度,有利于 miRNA-421 的扩增.由于 miRNA-421 前体在自然状态下也存在发夹结构,因此无法与反转录引物结合,避免了 pre-miRNA 对检测的干扰.当然,在 miRNA 引物鉴定过程中,由于实验条件及部分人为原因制作的扩增曲线并不完全标准,这有待于我们在今后的试验中进一步优化条件、完善体系.但是茎-环 RT-PCR 法鉴定出的引物仍能够较为真实有效地检测样本中目标 miRNA-421 的表达量.该方法的建立为今后对 miRNA-421 的深入研究奠定了基础.

[参考文献]

- [1] Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(5): 525-532.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766-770.
- [5] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [6] Lim L P, Glasner M E, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes [J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540.
- [7] Krichevsky A M, King K S, Donahue C P, et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development [J]. *RNA*, 2003, 9(10): 1274-1281.
- [8] Ambros V, Lee R C. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning [J]. *Mol Biol*, 2004, 265: 131-158.
- [9] Shi R, Chiang V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525.
- [10] Raymond C K, Roberts B S, Garrett-Engle P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs [J]. *RNA*, 2005, 11(11): 1737-1744.
- [11] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [12] Jiang Z, Guo J, Xiao B, et al. Increased expression of miR-421 in human gastric carcinoma and its clinical association [J]. *J Gastroenterol*, 2010, 45(1): 17-23.
- [13] Hao J, Zhang S, Zhou Y, et al. MicroRNA 421 suppresses DPC4/Smad4 in pancreatic cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(4): 552-557.
- [14] Hu H, Du L, Nagabayashi G, et al. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1506-1511.
- [15] Lee R C, Feinbaum R L, 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.
- [16] He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 828-833.
- [17] Mraz M, Pospisilova S, Malinova K, et al. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes [J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(3): 506-509.
- [18] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure [J]. *Circulation*, 2007, 116(3): 258-267.
- [19] van Rooij E, Sutherland L B, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science*, 2007, 316(5824): 575-579.

- [20] Mencia A , Modamio H S , Redshaw N , et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyn-dromic progressive hearing loss [J]. *Nat Genet* , 2009 , 41(5) : 609-613.
- [21] Hughes A E , Bradley D T , Campbell M , et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract [J]. *Am J Hum Genet* , 2011 , 89(5) : 628-633.
- [22] de Pontual L , Yao E , Callier P , et al. Germline deletion of the miR-17 approximately 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans [J]. *Nat Genet* , 2011 , 43(10) : 1 026-1 030.
- [23] Ma L , Young J , Prabhala H , et al. miR-9 , a MYC/MYCN-activated microRNA , regulates E-cadherin and cancer metasta-sis [J]. *Nat Cell Biol* , 2010 , 12(3) : 247-256.
- [24] Tang F , Hajkova P , Barton S C , et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells [J]. *Nucleic Acids Res* , 2006 , 34(2) : e9.

[责任编辑: 黄 敏]

(上接第 82 页)

- [26] Wood Z A , Schrder E , Robin H J , et al. Structure , mechanism and regulation of peroxiredoxins [J]. *Trends in Biochemi-cal Sciences* , 2003 , 28(1) : 32-40.
- [27] Zhang Q , Li F , Zhang J , et al. Molecular cloning , expression of a peroxiredoxin gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and the antioxidant activity of its recombinant protein [J]. *Molecular Immunology* , 2007 , 44(14) : 3 501-3 509.
- [28] Maningas B , Koyama T , Kondo H , et al. A peroxiredoxin from kuruma shrimp , *Marsupenaeus japonicus* , inhibited by pep-tidoglycan [J]. *Developmental and Comparative Immunology* , 2007 , 32(3) : 198-203.
- [29] Rawadi G , Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism dis-tinct from that of lipopolysaccharide [J]. *Infection and Immunity* , 1996 , 64(2) : 637-643.
- [30] Razin S , Yogev D , Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 1998 , 62: 1 094-1 156.
- [31] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells [J]. *Physiological Reviews* , 2003 , 83(2) : 417-432.

[责任编辑: 黄 敏]