

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00228

MirVana 分离试剂盒提高孕妇血浆中 miRNA 的富集浓度

MirVana miRNA isolation kit enrichs plasma miRNA of pregnant women

费明钰, 张毅, 贾音, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[关键词] 孕妇; 血浆; 微 RNA; 富集

[中图分类号] R 446.39

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)02-0228-02

孕妇血浆中胎儿游离 DNA、RNA 的发现使无创产前诊断成为可能^[1]。利用母体血浆中的胎儿游离 DNA 可获得胎儿的遗传信息, 包括胎儿性别、血型 Rh(D) 状态等^[2]; 母体血浆胎儿 RNA 的发现也为应用胎儿游离核酸无创进行产前诊断提供了条件^[3]。MicroRNAs (miRNAs) 是一种大小约 21~23 个碱基的单链小分子 RNA, 可通过与靶基因非编码区的结合来抑制翻译, 从而调控基因表达, 参与一系列生命进程, 包括早期发育、细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化等^[4]。

母体血浆胎源性 miRNAs 的发现为无创性产前诊断开辟了一个新视角^[5]。miRNA 通过与一些小分子微颗粒结合免于被 RNases 降解, 而稳定存在于孕妇血浆中^[6], 有利于无创性产前诊断; 但由于其含量甚微且对保存温度要求较高, 后续检测工作难度较大。因此, 必须制定合理的孕妇血浆处理规范, 以保证从血浆中稳定获得高浓度 miRNA 进行无创产前诊断。本研究观察 mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems) 和 TRIzol 抽提法提取血浆中胎盘特异性 has-miR-141 的效果及稳定性, 比较两者对血浆中 miRNA 的富集效率。

1 材料和方法

1.1 一般资料 2008 年 1 月至 2009 年 1 月, 在第二军医大学长海医院妇产科采集 20 例孕妇的血浆样本, 年龄 22~31 岁, 孕周 26.7~35.9 周, 无妊娠并发症和妊娠合并症。本研究经第二军医大学长海医院伦理委员会批准, 入选的受检者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 血样采集和处理 入院第 1 天采集孕妇外周静脉血 8 ml, 将其加入已含有 50 mmol EDTA 的采血管中, 并立即分为 2 份, 每份 4 ml。在 4℃ 的条件下, 采取两步离心法, 首先以 1 600×g 离心 10 min, 将上清液置入新的离心管中, 再以 16 000×g 离心 10 min 上清液, 再取其上清液并以 1:0.8 的体积比加入 TRIzol Reagent (Invitrogen) 并混匀。

1.3 血浆中游离 miRNA 的提取与富集 将经过上述处理的

样本置于冰上 15 min 后, 在 4℃ 的条件下以 1 000×g 离心 10 min, 取上清液, 置入 1.5 ml 的 EP 管中, 并以 1:0.25 的体积比加入氯仿, 摇晃混匀, 置于冰上 10 min, 在 4℃ 的条件下以 12 000×g 离心 15 min, 取上层水相。之后将上述分为 2 份的血浆样本取一份用传统 TRIzol 抽提法进行 miRNA 抽提, 另一组参照 mirVana miRNA Isolation Kit 说明书中的步骤提取 miRNA。分别使用 Eppendorf 紫外分光光度仪测定 RNA 的 D_{260} 值和 D_{260}/D_{280} 比值, 以评估提取物中 miRNA 的浓度和质量。符合定量检测要求的样本进行下一步反应。

1.4 反转录 PCR 及 Real-time PCR

1.4.1 反转录 PCR 取富集液 50 ng 为模板, 以经过设计的特异性 hsa-miR-141 反转录引物进行反转录, 引物为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC CAT CT-3'。按照 5×PrimeScript™ Buffer (for real-time) 4 μl、PrimeScript™ RT Enzyme Mix 0.5 μl (PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa)、hsa-miR-141 反转录引物 0.5 μl、富集的小 RNA 50 ng、DEPC H₂O (补充 DEPC H₂O 使总体积达到 20 μl) 进行反转录。

1.4.2 Real-time PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 试剂和 Step Plus One 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems), 定量检测 has-miR-141 的含量, has-miR-141 上游引物: 5'-TCC GCA CTA ACA CTG TCT GGT AA-3', 下游引物: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; U6 上游引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游引物: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; Real-time PCR 条件: 95℃ 30 s, 90℃ 5 s, 60℃ 15 s, 72℃ 30 s, 55 个循环。采用标准反转录产物倍比稀释法建立标准曲线, 每 20 μl 体系分别添加标准反转录产物 2、1、0.5、0.25、0.125 μl, 每种浓度设立 3 个平行复管。按照上述 Real-time PCR 条件, 对前期制备的各样本的反转录产物进行检测。每批次 PCR 均设立标准曲线作为批次间参照, 并依据标准曲线设立 Ct 值阈值。每

[收稿日期] 2009-11-09 [接受日期] 2010-01-25

[基金项目] 国家科技支撑计划(2006BAI05A05), 国家自然科学基金(30901613), 上海市科委基础研究重大项目(08JC1405300), 上海市自然科学基金(09ZR1439100)。Supported by National Key Technology R&D Program of China (2006BAI05A05), National Natural Science Foundation of China (30901613), the Major Basic Research Program of Shanghai(08JC1405300), and Natural Science Foundation of Shanghai(09ZR1439100)。

[作者简介] 费明钰, 硕士生。E-mail: mingyu_fei@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

样本均做3个平行复管,取其平均值分析,每个PCR测定中都包括阴性(水)对照。获得的各样本 hsa-miR-141 表达量均由标准曲线转换为相对定量值,管家基因 U6 表达量进行标准归一化处理,最终获得比值进行比较和统计分析。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 hsa-miR-141 在孕妇血浆当中的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,使用配对 t 检验比较两组抽取 miRNA 间的差异,并计算两组间的 Pearson 相关系数。

2 结果

2.1 MicroRNA 含量的测定结果 结果(图1)表明:mirVana miRNA Isolation Kit 提取值为 2.763 ± 0.589 , TRIzol 法提取值为 1.224 ± 0.262 , 组间差异有统计学意义 ($t = 18.325, P < 0.001$), 且二者间相关性较好 (Pearson 系数 = $0.890, P < 0.001$)。结果表明:采用 mirVana miRNA Isolation Kit 对目的血样进行 miRNA 富集,血浆中富集得到的 miRNA 浓度较传统 TRIzol 抽提法明显提高。

2.2 MicroRNA 稳定性的观察 结果(图1)表明:两组使用不同抽提方法抽提的 miRNA 产物在 -80°C 的条件下存放 30 d,通过 real-time PCR 检测 miRNA 含量后发现, mirVana miRNA Isolation Kit 提取值为 2.760 ± 0.592 , 与原含量间无统计学差异 ($P = 0.069$), TRIzol 法提取值为 1.221 ± 0.232 , 与原含量间也无统计学差异 ($P = 0.110$)。

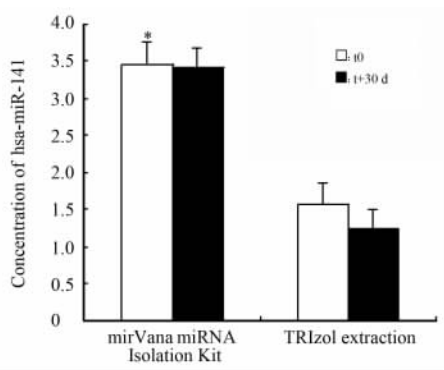


图1 不同抽提方法对 hsa-miR-141 含量和稳定性的影响

* $P < 0.01$ vs TRIzol 法; $n = 20, \bar{x} \pm s$

3 讨论

无创性产前诊断是近年来众多研究机构关注的领域,致力于在最大程度保障母婴安全的前提下,为胎儿或高危孕妇的疾病检出提供一个较为可靠的风险预估。孕妇外周血中胎儿游离 miRNA 的发现为无创性产前诊断带来了希望,胎儿游离 miRNA 提取及分析过程简单,易于发展成为可应用于临床的大样本、高通量的检测方法。此外,胎儿 miRNA 在未分娩孕妇的血浆中具有性质稳定、分娩后很快被清除的特点。然而利用母体血浆中存在的小分子标志物进行无创性产前诊断的前提条件是这种标志物在血浆中的含量充足、纯度较高、稳定性较好^[7],以便为后续的一系列研究提供可靠的实验结果。因此,探索、发展和利用高效的富集方法获取 miRNA 等小分子标志物对于无创性产前诊断非常必要。

miRNA 表达含量的多少在很大程度上依赖于样本中

RNA 的含量及 miRNA 的抽提方法。基于 miRNA 广泛的生物学功能,人们对 miRNA 的关注往往集中于其作用机制的研究,忽略了对 miRNA 的分离方法和样本储存的研究。无论是后续的芯片分析,还是 miRNA 的功能研究,miRNA 的抽提都是最基础的步骤。因此,miRNA 样本的分离质量很大程度上影响了研究者后续的实验结果。传统的 TRIzol 提取方法通常使用高浓度的酸性酚、氯仿灭活 RNase,从其他多种生物活性分子中提取 RNA,这一方法为获取高纯度的 RNA 创造了条件。然而,这些 RNA 必须经过去盐处理并用乙醇沉淀,因而常规的乙醇沉淀法并不适合富集 miRNA。MirVana miRNA Isolation Kit 通过采用改良的玻璃纤维滤膜方法快速回收样本中的全部 RNA,包括 miRNA。首先用变性裂解液裂解样品,让 RNase 失活,使 RNA 稳定,之后用酸性酚、氯仿进行萃取,留下半纯的 RNA 样品,之后再用玻璃纤维滤膜来进行纯化,以此提高 miRNA 的得率。has-miR-141 在孕妇胎盘中特异性表达。因此,本研究以 has-miR-141 作为孕妇血浆中胎源性标志物开展进一步研究,发现 mirVana miRNA Isolation Kit 法和传统的 TRIzol 法在提取同样样本中的 has-miR-141 时,它们的结果表现出了非常好的相关性 ($P = 0.001$),而运用 mirVana miRNA Isolation Kit 法较传统的 TRIzol 法在提取 miRNA 的浓度上却大大增加 ($P = 0.001$);同时,在将抽提样本放置在 -80°C 条件下 30 d 后, mirVana miRNA Isolation Kit 法分离的 miRNA 产物无明显降解,显示出其提取物的稳定性较好。这提示 mirVana miRNA Isolation Kit 法是提取 miRNA 的更佳选择,也从根本上提高了后续对 miRNA 研究的准确性,为建立合理的孕妇血浆中胎源性 miRNA 抽提操作规范奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tong Y K, Chiu R W, Leung T Y, Ding C, Lau T K, Leung T N, et al. Detection of restriction enzyme-digested target DNA by PCR amplification using a stem-loop primer: application to the detection of hypomethylated fetal DNA in maternal plasma [J]. Clin Chem, 2007, 53: 1906-1914.
- [2] Al-Yatama M K, Mustafa A S, Ali S, Abraham S, Khan Z, Khaja N. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction [J]. Prenat Diagn, 2001, 21: 399-402.
- [3] Tsang J C, Lo Y M. Circulating nucleic acids in plasma/serum [J]. Pathology, 2007, 39: 197-207.
- [4] Nicolas F E, Lopez-Gomollon S, Lopez-Martinez A F, Dalmay T. RNA silencing: Recent developments on miRNAs [J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2009, 3: 77-87.
- [5] Chim S S, Shing T K, Hung E C, Leung T Y, Lau T K, Chiu R W, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma [J]. Clin Chem, 2008, 54: 482-490.
- [6] Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 4402-4407.
- [7] Bischoff F Z, Lewis D E, Simpson J L. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11: 59-67.

[本文编辑] 贾泽军