

# miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用\*

周萍, 杨玉琮, 王聪, 胡健, 陶丹, 刘红莉

(西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061)

**摘要:**目的 建立一种用于肝癌早期诊断和监测的血清 miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法。方法 采用 Trizol 法提取肝癌患者血清中总 RNA, 以肝癌发生具有代表性的 miRNA-125a 基因为检测序列, 分别设计逆转录引物、扩增引物和 Taqman 探针; 构建和制备 miRNA-125a 重组质粒标准品, 建立血清 miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法。结果 成功构建了 miRNA-125a 重组质粒载体, 制备了 miRNA-125a 重组质粒标准品, 建立了血清 miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 扩增体系。经实验验证, 所设计引物具有较好的特异性, 引物的最低检测限为  $78.125 \text{ copies}/\mu\text{l}$ ; 对 17 例肝癌患者血清 miRNA-125a 的检测结果在  $(1.45 \times 10^2 \sim 3.52 \times 10^5) \text{ copies}/\mu\text{l}$  之间。结论 血清 miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立, 为原发性肝癌早期诊断和监测提供一种新的分子诊断定量方法。

**关键词:** miRNA; 肝癌; Taqman 探针; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735.7; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-010-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.003

## Establishment and Preliminary Application of miRNA-125a Taqman Real-time Fluorescent Quantitative PCR Detection Method

ZHOU Ping, YANG Yu-zong, WANG Cong, HU Jian, TAO Dan, LIU Hong-li

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital  
of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** **Objective** To build the method of real-time fluorescence quota PCR examination of serum miRNA-125a Taqman for diagnosing and monitoring liver cancer early. **Methods** 1st, based on specific miRNA-125a gene associated with liver cancer, to design reverse transcriptase primer, amplification primer and Taqman probe individually through the Trizol method to extract patients' total RNA from serum. 2nd, to prepare the miRNA-125a recombinant plasmid standard substance and build the method of real-time fluorescence quota PCR examination of serum miRNA-125a Taqman. **Results** To form the miRNA-125a recombinant plasmid carriers successfully. To prepare the miRNA-125a recombinant plasmid standard substance successfully. To build amplification system of real-time fluorescence quota PCR of serum miRNA-125a Taqman. It had been proved that the designed primer whose minimum detection limit was  $78.125 \text{ copies}/\mu\text{l}$  had proper specificity. The examination results of serum miRNA-125a of 17 patients with liver cancer vary between  $1.45 \times 10^2 \sim 3.52 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{l}$ . **Conclusion** To set up the method of real-time fluorescence quota PCR examination of serum miRNA-125a Taqman can offer an efficient molecular diagnosis way to diagnose and monitor the primary liver cancer early.

**Keywords:** miRNA; liver cancer; Taqman probe; real-time fluorescence quota PCR

利用实验生物学及生物信息学方法对与肿瘤相关的 miRNA 进行研究和检测是当前研究的热点。miRNA-125a 被证明能够抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和转移, 是一种与肝癌发生具有密切相关性的 miRNA<sup>[1~4]</sup>。目前, 小分子量的 miRNA 定量检测方法多利用颈环引物法<sup>[5,6]</sup>。由于颈环引物法存在引物设计复杂、荧光染料特异性差、操作步骤繁琐等诸多问题, 至今尚未得到临床的认可和应用。因此, 本研究拟建立利用 Taqman PCR 技术

检测循环血中的 miRNA 的方法, 以肝癌发生具有代表性的 miRNA-125a 基因为检测序列, 分别设计逆转录引物、扩增引物和 Taqman 探针, 建立血清中 miRNA-125a Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法, 并进行临床检测验证, 以期对肝癌的早期诊断提供一种新的分子诊断方法。

### 1 材料和方法

1.1 血清标本来源 所用标本取自在我院传染科住院患者, 经病理学证实确诊为 HBV 相关肝癌患

\* 基金项目: 陕西省科技计划项目(2013K12-05-12), 西安市卫生局科技计划项目(2013)资助。

作者简介: 周萍(1975—), 女, 本科, 主管检验师, 主要从事临床免疫和肿瘤诊断。

通讯作者: 刘红莉(1965—), 女, 主任医师, 主要从事分子免疫及感染疾病研究, E-mail: liuhonglili@sina.com。

者的血清样本。诊断标准符合2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》,所有患者均排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒混和感染及其他原因引起的肝炎。清晨空腹采集患者外周静脉血3~5 ml,室温下静置1 h。然后置于离心机上,3 000 r/min离心15 min,取上清(血清)保存于-80℃冰箱待测。

**1.2 主要仪器设备和试剂** miRNeasy Serum/Plasma Kit 购自德国 Qiagen 公司,逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司,ABI7500 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。引物和探针的设计与合成:采用 miR-125a 基因序列设计引物和探针,以 FAM 为报告基团,以 Eclipse+4zip 为淬灭基团,引物和探针均由广州达安股份有限公司设计、合成。其序列为:反转录引物:5'-CTCAACTGGT-GTCGTGGAGTCGGCAATTTCAGTTGAGTCA CAGGTT-3',上游引物:5'-GCCTCCCTGAGAC-CCTTTA-3',下游引物:5'-GTGTCGTG-GAGTCGGCA-3',探针序列:5'-FAM-TTCAGT-TGAGTCACAGGTT-MGB-Eclipse-3'。

### 1.3 方法

**1.3.1 血清总 RNA 的制备:**采用 Trizol 提取法提取外周血中总 RNA,利用紫外分光光度计测定其 A 值以及浓度。利用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,确保提取的 RNA 的完整性,放置于-80℃保存备用。

**1.3.2 RNA 逆转录:**将总 RNA 做适当的浓度调整,在去 RNase 的 PCR 管中进行反应体系的配置,包括 microRNA 特异逆转录引物、RNase inhibitor、dNTP、M-MLV 反转录酶及反应缓冲液,配置过程按照 TAKARA 逆转录试剂盒说明书进行。将反应体系混匀后,42℃孵育 60 min,72℃孵育 10 min,灭活逆转录酶。

#### 1.3.3 重组标准品的制备

**1.3.3.1 目的基因的扩增:**以肝癌患者(AFP>10 000)血清作为标本提取血清 RNA,应用所设计的引物对其进行反转录及 RT-PCR 扩增,产物经 1.5 g/dl 琼脂糖凝胶电泳确证,获的目的扩增片段,产物回收纯化后测其吸光度进行定量。

**1.3.3.2 目的片段与载体的连接:**在 10  $\mu$ l 连接反应体系中,包括:2 $\times$  Buffer 5  $\mu$ l, PGEM-T-easy vector 1  $\mu$ l, PCR 产物 2  $\mu$ l, T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ l, 用无菌水补足至 10  $\mu$ l,轻轻混匀,室温放置 1 h, 4℃过夜连接。

**1.3.3.3 重组质粒的转化:**取上述连接产物 1  $\mu$ l 加入 100  $\mu$ l 新鲜配制的 *E. coli* JM109 感受态细胞中,轻轻混匀;冰浴 30 min,42℃热休克 90 s,随即冰浴 2 min 后,加入 800  $\mu$ l 预热的 LB 培养液中;

37℃,220 r/min 振摇 1 h;12 000 r/min 离心 5 min,弃上清剩余约 100  $\mu$ l 菌液,混匀,用 L 型玻棒均匀涂布于含 Amp<sup>+</sup> 的筛选平板上;37℃培养过夜,同时设定未转化菌作为阴性对照。

**1.3.3.4 重组质粒的鉴定:**挑取经 Amp 抗性筛选出的白色转化的菌落,于 LB 培养液(含有 Amp<sup>+</sup>)中,进行小量增菌,37℃ 220 r/min 振摇过夜。对重组质粒进行 PCR 扩增鉴定,T-A 克隆阳性的菌落提取质粒进行测序。

**1.3.4 重组质粒标准品标准曲线的绘制:**将鉴定好的重组质粒,测吸光度值,计算出原始拷贝数,然后按比例稀释成 10E4~625 copies/ml 浓度梯度,加入 20  $\mu$ l 反应体系,置实时荧光定量 PCR 扩增仪上进行扩增,反应条件为 95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,进行 40 个循环。反应结束后在计算机上自动形成标准曲线。

**1.3.5 荧光定量 PCR 检测体系的建立:**在 20  $\mu$ l 反应体系中,PCR Master Mix (包括 10 $\times$ PCR 缓冲液,MgCl<sub>2</sub>,dNTP,DNA 聚合酶等)10  $\mu$ l,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ l,探针(10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ l,DNA 模板 2  $\mu$ l,用灭菌重蒸水补足 20  $\mu$ l。荧光定量 PCR 反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,进行 40 个循环。

**1.3.6 临床初步应用检测:**取在我院确诊的 17 例肝癌患者血清,提取总 RNA 应用本研究所建立的方法,经逆转录、RT-PCR 扩增,根据标准曲线计算出样本中 miRNA-125a 的含量。

## 2 结果

**2.1 血清总 RNA 的提取** 以肝癌患者血清作为标本提取血清总 RNA,经紫外分光光度计测  $A_{260nm}/A_{280nm}>1.8$ ,通过琼脂糖凝胶电泳检测,见图 1。28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍,说明总 RNA 的提取质量可以满足 miRNA 实时荧光定量 PCR 的要求。

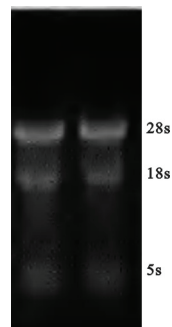


图1 血清样品总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

**2.2 miRNA-125a 重组质粒标准品的制备** 以肝癌患者血清作为标本提取血清总 RNA,应用所设

计的引物对以其为模板进行反转录及 RT-PCR 扩增,经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳证实获得目的扩增片段,大小约为 110 bp,见图 2。扩增产物经纯化回收、酶切、连接、转化至克隆载体,阳性克隆经鉴定,成功构建了 miRNA-125a 重组质粒标准品。

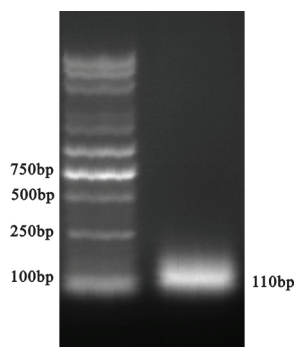


图 2 miRNA-125a RT-PCR 引物扩增琼脂糖凝胶电泳图

2.3 miRNA-125a 标准曲线的绘制 将制备的 miRNA-125a 重组质粒标准品稀释成系列浓度,其 DNA 含量分别为:10 000,5 000,2 500,1 250,625 copies/ $\mu$ l;采用本文所建立的荧光定量 PCR 扩增体系进行扩增,结果重组质粒标准品浓度可形成较为理想的扩增曲线,见图 3。以 CT 值为横坐标,以其对数浓度为纵坐标由计算机自动绘制出标准曲线,见图 4。

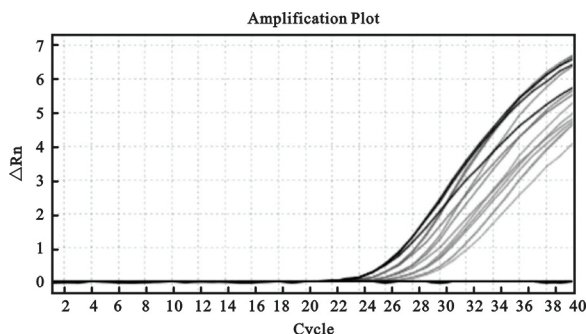


图 3 miRNA-125a 扩增曲线图

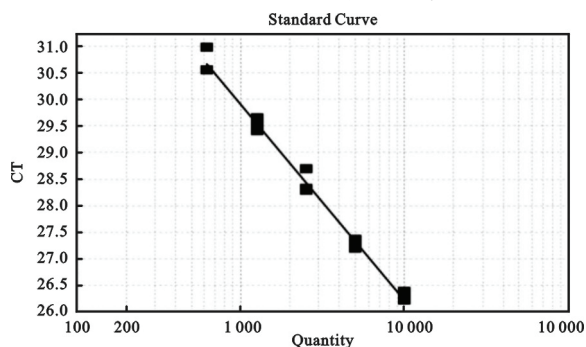


图 4 miRNA-125a 标准曲线图

2.4 引物、探针的特异性 PCR 扩增结果 采用本文所建立的方法,对已知肝癌患者血清和健康对照血清中提取的不同浓度 miRNA 分别进行扩增,结果只有肝癌患者血清 miRNA 出现阳性扩增,见图 5,说明 miRNA-125a 引物和探针具有较好的特异性。

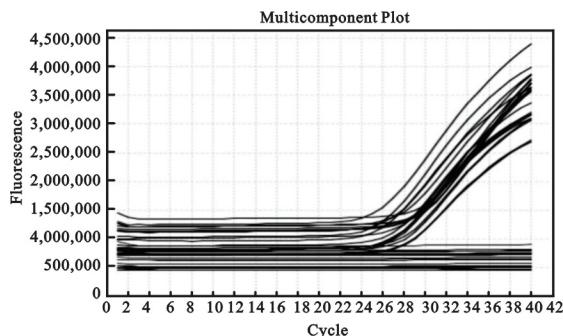


图 5 miRNA-125a 引物、探针特异性扩增曲线图

2.5 重复性试验结果 采用本文所建立的方法,从同一份血清标本中提取总 RNA,在同一条件下经 5 次分别扩增,结果 5 孔均呈现基本相同的阳性扩增,见图 6,说明 miRNA-125a 方法具有良好的重复性。

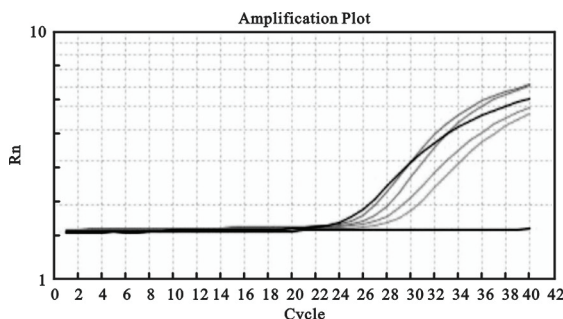


图 6 miRNA-125a 重复性试验扩增图

2.6 最低检测限结果 将 miRNA-125a 重组质粒标准品定量成 10 000 copies/ $\mu$ l,然后进行倍比稀释,采用本文所建立的荧光定量扩增体系分别进行扩增,结果显示本方法最低检测限为 78.125 copies/ $\mu$ l。

2.7 临床标本检测结果 对 17 例肝癌患者血清 miRNA-125a 的检测结果显示在  $1.45 \times 10^2 \sim 3.52 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l 间。

3 讨论 原发性肝癌(primary hepatic carcinoma,PHC)是我国常见的恶性肿瘤。所有 PHC 几乎都有肝硬化基础,确诊时多属中晚期,缺乏有效的治疗方法,预后较差。肝癌血清标志物众多,尚无单一标志物能够诊断所有肝癌。敏感而特异的标志物如甲胎蛋白 AFP2L3,异常凝血酶原(PIV-KA2 II),肝癌特异性 GGT 等,这些标记物之间并无相关性,但在肝癌患者血清中均具有明显变化。肝癌标志物分析有助于肝癌早期诊断、疗效观察及术后随访、复发或转移监测。

Micro RNAs 或 miR 是真核生物中一类约 22nt 大小的非编码单链 RNA 分子,在生物体发育、信号传导、凋亡、细胞增殖等生理和病理过程中发挥重要的作用。已成为当今肿瘤分子生物学研究的热点<sup>[7,8]</sup>。随着对 miR 研究的不断深入,越来越多的 miR 被发现,目前,人类已发现 miR 与肿瘤

相关基因约400余种,其中在肝癌中已发现若干miRNA,如miRNA-122,miRNA-22,miRNA-125a,miRNA-200a,miRNA-199a等的异常表达与之有关。不仅如此,许多miR的改变在肿瘤形成之前即已出现,并非只是在肿瘤形成之后的一种继发性改变,因此,miR可能是一类新的肿瘤形成的相关基因<sup>[9]</sup>。利用颈环引物法检测小分子量的miRNA技术已经成熟,但利用Taqman PCR技术检测循环血中miRNA的方法尚未见报道应用。本实验以肝癌患者血液为检测对象,以肝癌发生率的miRNA-125a基因为检测序列,分别设计引物和探针,建立miRNA125a Taqman PCR检测方法,用于肝癌的早期诊断,试图证明血清miRNA作为一种有效的肿瘤早期诊断分子标志物的可能性。

研究证实,MiR-125a为一种与HBV肝癌高度相关的基因<sup>[10]</sup>。通过基因芯片和实时荧光定量PCR方法检测肝癌患者组织中miR发现,与正常人肝脏组织相比,有些miR在乙型肝炎、肝硬化和HBV相关肝癌密切相关<sup>[11]</sup>,提示这些在不同类型肝脏组织中的差异性表达的miR可能在HBV感染、肝硬化、肝癌的发生、发展过程中起到重要的作用,但在乙型肝炎肝硬化组织和HBV相关肝癌组织中的表达即无明显的变化,说明miR的表达变化主要发生在HBV感染→肝硬化→肝癌进程的早期,因此推测miR有望成为HBV相关肝癌早期诊断的新的标志物<sup>[12]</sup>。因为循环中的miR不仅丰度较高,而且稳定,能够抵抗内源性RNA酶<sup>[13]</sup>,标本来源方便,表明miR具有临床早期诊断标志物的重要特质。

本研究以肝癌发生具有代表性的miRNA-125a基因为检测序列,自肝癌患者血清中提取总RNA,采用设计逆转录引物、扩增引物和Taqman探针,通过miRNA-125a重组质粒载体构建,制备了miRNA-125a重组质粒标准品,优化了miRNA-125a Taqman实时荧光定量PCR扩增体系,绘制了标准曲线,经特异度和敏感度及重复性试验,所设计引物具有较好的特异度和良好的重复性,引物的最低检测限为78.125 copies/ $\mu$ l;并经过临床肝癌样本验证,证实成功建立了血清miRNA-125a Taqman实时荧光定量PCR检测方法。此方法的建立为原发性肝癌早期诊断和监测提供了一种新的分子诊断定量方法。随着对miRNA研究的不断深入,miRNA作为肿瘤诊断、治疗、疗效预测及预后判断的重要分子标志将可能会得到极大程度的认可和推广。有关miRNA-125a Taqman实时荧光定量PCR方法的临床应用尚需大量临床标本

的验证。

#### 参考文献:

- [1] Tang H, Li RP, Liang P, et al. miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 681-686.
- [2] Zheng J, Zhou Z, Xu Z, et al. Serum microRNA-125a-5p, a useful biomarker in liver diseases, correlates with disease progression[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 1584-1590.
- [3] Coppola N, Potenza N, Pisaturo M, et al. Liver microRNA hsa-miR-125a-5p in HBV chronic infection: correlation with HBV replication and disease progression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e65336.
- [4] Bi Q, Tang S, Xia L, et al. Ectopic expression of MiR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40169.
- [5] 刘笙楠, 颜润川, 李玲玲, 等. miRNA-34c 实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(11): 11-15.
- [6] Liu SN, Yan RC, Li LL, et al. Establishment of real-time qPCR for detecting miRNA-34c[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 34(11): 11-15.
- [7] Lin Q, Mao W, Shu Y, et al. A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(1): 85-93.
- [8] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science (New York)*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [10] Pogribny IP, Tryndyak VP, Boyko A, et al. Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure[J]. *Mutat Res*, 2007, 619(1/2): 30-37.
- [11] 刘建华, 程涛, 王洪敏, 等. 血清miRNA表达水平检测与原发性肝癌早期诊断的研究[J]. *热带医学杂志*, 2010, 10(6): 666-668, 706.
- [12] Liu JH, Cheng T, Wang HM, et al. Serum miRNA in the early diagnosis of primary hepatic carcinoma[J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2010, 10(6): 666-668, 706.
- [13] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [14] Waldman SA, Terzic A. MicroRNA signatures as diagnostic therapeutic targets[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(6): 943-944.
- [15] 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.

收稿日期: 2016-03-10

修回日期: 2016-05-18