

## 专家指南：

# miRNA 分析中的 qRT-PCR 疑难解答

实践出真知。我们的实验中往往会遇到一些很细节的问题，但在普通的教科书上又找不到现成的答案。怎么办？寻找身边的实验达人。可是在 miRNA 这个相对较新的领域，达人还不太多。生物通就帮大家找了一班实验达人，就 miRNA 分析中的 qRT-PCR 检测的 6 个热门问题，谈谈自己的经验。希望大家可以从中受到一点启发。

**Q1:** 如何为 miRNA 设计引物？利用茎环结构还是引物延伸？

**Q2:** 如何确定 Ct 值？理想的 Ct 值是多少？

**Q3:** 如何检测 miRNA？使用 SYBR green 吗？

**Q4:** 你如何确定检测效率？怎样称之为好的效率？

**Q5:** 如何区分前体和成熟的 miRNA？

**Q6:** 还需要其他的定量分析来进行补充吗？

**Q1:** 如何为 miRNA 设计引物？利用茎环结构还是引物延伸？

**John Rasko & Stephane Flamant** 美国 centenary 大学的基因和干细胞治疗计划  
我们的方法是基于经典的小分子 RNA 克隆。从总 RNA 入手，在 microRNA 的 3'端加上一个接头。然后利用接头特异的引物来进行反转录（引物延伸法）。接着还是利用同样的引物，连同 5'microRNA 特异的引物，来进行定量 PCR 反应。由于 microRNA 的确很小，引物的选择余地也不大。我们通常设计的引物覆盖最初 15-17 个核苷酸，留下最后 6 个核苷酸用于测序验证。

**Thomas Schmittgen** 俄亥俄州立大学副教授

我们只利用 ABI 的 TagMan assay（茎环结构）来检测成熟的 microRNA。这些 assays 是预先设计并验证过的。

**Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas** 耶鲁大学医学院

我们应用的是 TaqMan assays。由于 microRNA 很短，采取茎环结构的引物会更好。

**M.azim Surani & Fuchou Tang** 剑桥大学 Gurdon Institute

我们也是应用茎环结构的引物来定量 microRNA。对于每一个 microRNA，我们设计了三条引物：一条反向引物用于反转录，一条正向引物，还有一条通用的反向引物，同时用于 pre-PCR 扩增步骤和实时定量 PCR 步骤。特异的反向引物约 42-44 个核苷酸，其 5'端的 36 个核苷酸序列是固定的，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 microRNA 互补。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 microRNA 互补，而剩余 14 个核苷酸的 Tm 值高于 65 摄氏度。通用的反向引物为 23nt，其中 18 个核苷酸对应特异反向引物的茎环结构部分，而 5'端的 5 个核苷酸的 Tm 值高于 65 摄氏度。

**Wei Yan** 美国内华达州大学医学院



我们的 microRNA PCR 方法是将小分子 RNA 的 cDNA (srcDNA) 作为模板。srcDNA 由 microRNA 聚腺苷酸后, 用 RTQ 引物反转录产生。RTQ 引物在 5'端包含一个 100bp 的接头序列, 然后是 25 oligo dT, 以及两个简并核苷酸 V (A、G 或 C) 和 N (A、G、C 和 T)。特定 microRNA 产生的 srcDNA 水平可由 PCR 进行分析, 用 microRNA 特定的引物作为正向引物, 对应 srcDNA 3'端接头序列的通用引物作为反向引物。整个 microRNA 序列除了最后的 2 个核苷酸都可以用作正向引物, 而反向引物可以根据 Tm 值和 GC 含量从接头序列中选择。

**Q2: 如何确定 Ct 值? 理想的 Ct 值是多少?**

**John Rasko & Stephane Flamant**

循环阈值是由扩增指数期的中部来决定的, 大约是在 25-35 个循环之间, 取决于样品和目的 microRNA。每一个反应进行三次, 同时还有一个阴性的反转录对照。对于每一个检测的样品, 我们都用广泛表达的 microRNA, 如 let-7a 或 miR-21, 作为阳性内参。

**Thomas Schmittgen**

我们应用的是 ABI 7900 定量 PCR 仪。通常我们利用软件的默认参数来计算 Ct 值。对于成熟的 microRNA 来说, Ct 值在 20 多是正常的 (一般在 25 到 30 之间)。许多人认为 Ct 值高于 35 就代表背景或干扰。我们使用 TaqMan 探针, 它背景很低, 因此我们能检测到低水平的 microRNA。另一个方法是实时定量 PCR 的数据表示为“每个细胞中 microRNA 的拷贝数”。这在 2005 年《Nucleic Acids Research》杂志上 Caifu Chen 的文章

中描述过。其中有一些假设, 不过它对细胞中 microRNA 的拷贝数进行了很好的评估。它还有助于了解背景问题。一般说来, 每个细胞中 microRNA 的拷贝数为 10 或以下就可以认为是背景。

**Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas**

我们通常让 ABI TaqMan 程序来选择循环阈值。如果我们需要手工设定, 我想需要依赖阳性和阴性对照。

**M.azim Surani & Fuchou Tang**

我们通常将表达谱研究中的检测阈值设为恒定的 0.2。对于 pre-PCR 18 个循环扩增的 cDNA 样品来说, 理想的 Ct 值在 10-28 之间。如果 Ct 值大于 32, 表示 cDNA 模板的拷贝数很低。一般说来, Ct 值大于 28 时标准偏差相对很大。

**Wei Yan**

我们利用 SYBR green 和 ABI 的 7300 定量 PCR 仪进行 microRNA 定量分析。Ct 值是指荧光信号到达阈值水平时的循环数。将阈值水平设定为 0.1-0.3 时, 每个 microRNA 样品的 Ct 值可以自动计算。所有的 Ct 值都取决于目标 microRNA 的丰度。例如, 当使用 25ng scrDNA 时, let-7 的平均 Ct 值介于 17-20 之间。

**Q3: 如何检测 miRNA? 使用 SYBR green 吗?**

**John Rasko & Stephane Flamant**

我们是通过 TaqMan 探针来检测 microRNA 的。

**Thomas Schmittgen**

我们利用 TaqMan 探针来检测成熟的 microRNA。对于 microRNA 前体，我们用 SYBR green 或 TaqMan 探针。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

我们用的是 ABI 的 TaqMan 探针，因为它比 SYBR green 特异性更好。但是也要贵一些。

M.azim Surani & Fuchou Tang

我们用 TaqMan 探针来检测 microRNA 的表达。对于多重 microRNA 分析来说，使用 SYBR green 降低特异性，并降低了检测的灵敏度，因为在 pre-PCR 扩增反应中，可能出现引物二聚体。

Wei Yan

对于定量 PCR 分析，我们利用 SYBR green 方法，因为它便宜一些，而且准确度和重复性与探针方法差不多。

**Q4: 你如何确定检测效率？怎样称之为好的效率？**

John Rasko & Stephane Flamant

为了确定这个实验方案，我们使用了 10 倍连续稀释的 let-7f 合成寡核苷酸。当起始物质低至 70 飞克时，let-7f 都可以检测到。

Thomas Schmittgen

谈到效率，这可是一个棘手的问题，尤其是对几百个不同的 microRNA 进行图谱分析时。由于 ABI 的不同 TaqMan assays 中引物及长度都是相似的，那么效率也或多或少相同。估计效率的简便方法就是比较 PCR 曲线的形状。相似的形状意味着相似的 PCR 效率。如果真正计算 PCR 效率，就要扩增 10 倍连

续稀释的 cDNA。然后就 Ct 值对稀释对数做图。效率等于  $10^{-1/\text{斜率}}$ 。效率在 1.85-2.05 这个范围都是可以接受的。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

我们通过连续稀释 microRNA 标准来确定 PCR 反应的效率。每 3.3 个循环阈值表现为 10 倍扩增，那么效率就达到了 100%。如果一个对数扩增需要 3.3 个 Ct 以上，那么效率就低一些。好的效率应该是在 90%或以上。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

对于反转录反应来说，只有 6-8nt 的引物与 microRNA 的 3'端配对，其检测效率差异很大。为了定量确定每个细胞中 microRNA 的绝对拷贝数，我们通过连续稀释的模板绘制标准曲线。虽然绝对的检测效率差异很大，但不同 microRNA 标准曲线的斜率还是相似的。因此，图谱研究的相对定量也是准确的，因为它是基于  $\Delta Ct$  值的。

Wei Yan

我们是通过

[www.stratagene.com/techtoolbox/calc/qpcr\\_slope\\_eff.aspx](http://www.stratagene.com/techtoolbox/calc/qpcr_slope_eff.aspx) (Stratagene) 上的效率计算器将 qPCR 标准曲线的斜率转化成效率。好的效率介于 90~110% 之间，对应的斜率是 -3.1~-3.6。

**Q5: 如何区分前体和成熟的 miRNA？**

John Rasko & Stephane Flamant

在 microRNA 分析之前，我们首先通过经典的 RT-PCR 来分析，用同样的 5' microRNA 特异引物和 3' 接头特异引物来扩增，然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。只有那些能扩增出预期大小如 95bp 左右的引物才用于 qPCR。如

果 PCR 产物大于理论值，我们会优化 PCR 条件或设计新的 5'引物。

Thomas Schmittgen

在 2004 年，我们发表了第一个定量 microRNA 的 PCR 方法。那个方法适用于定量 microRNA 前体。我们原本认为在某个特定的细胞或组织中，前体与成熟 microRNA 的量接近。在一些情况下是这样，但随着我们进行了更多的图谱分析，我们发现很多时候存在相当多的前体，却没有成熟的 microRNA。于是我们使用自己的 PCR 分析来检测前体，用 ABI 的 TaqMan assay 来检测成熟的 microRNA。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

利用 TaqMan 实时分析，你应当设计两套不同的引物组和探针来检测前体和成熟 microRNA。对于成熟的 microRNA，你可以使用茎环结构的引物，对于前体，我想可以使用常规的引物，因为序列很长。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

我们利用茎环结构的引物来进行 microRNA 定量，它只针对成熟的 microRNA。它不能转录前体 microRNA，因此 pri-microRNA 和 pre-microRNA 不会转变成 cDNA，也就不会干扰成熟 microRNA 的定量。

Wei Yan

在 qPCR 之后，所有的 PCR 产物都去跑一个 2%的琼脂糖胶，看看是否是单一条带，大小是否正确。成熟 microRNA 与前体 microRNA 的大小不同，在凝胶中会明显分开。包含 microRNA 的 PCR 产物大约为 120bp，而包含 pre-microRNA 的产物则在

170bp 左右。不过，我们的 PCR 方法优先扩增成熟的 microRNA。我们利用它分析了 140 多个 microRNA 的表达图谱，从没检测到 pre-microRNA。

**Q6: 还需要其他的定量分析来进行补充吗?**

John Rasko & Stephane Flamant

实际上我们的定量分析是作为普通 RT-PCR 的补充来获得定量数据，也可以进行半定量 PCR。我们还做 microRNA 芯片实验，另外，我们用实时定量 PCR 来验证候选的 microRNA。

Thomas Schmittgen

偶尔会做 northern blot。我们会用 northern blot 来帮助确认前体 microRNA 是否存在于反应中。因为 northern blot 能很好地区分 pri-microRNA 和 pre-microRNA，因此很有用。

Frank Slack, Phong Trang, & Joanna Weidhaas

如果我有足够的样品，而 microRNA 的水平足够高，我想我会做 northern 来检测。用 northern 来检测 microRNA 也是一个金标准。

M.Azim Surani & Fuchou Tang

我们通常会用基于实时定量 PCR 的 microRNA 图谱分析来核对样品中已知 microRNA 的表达，以及发现分化表达的候选 microRNA。然后再做单个的定量 PCR，用茎环结构的引物来检查一系列样品中的候选 microRNA 表达，以确认它们的生物相关性。

Wei Yan

如果是第一次做定量 PCR 或半定量 PCR 的话，就需要另一种定量分析如 northern blot 或 RNA 保护分析来证明 qPCR

的结果。至少要做 3 个样品，来看看定量结果能不能用另一种方法重现。

（生物通 余亮）