

LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统新应用：

基于定量 PCR 的 microRNA 整体分析

Kai Peter Hofig^{1*}, Dirk Repsilber², Biggi Branke¹, Anja Rochle¹, Christoph Thorns¹, Tiantom Jarutat¹, Eva Lenfert¹,
Christian Kaehler¹, Alfred Feller¹, and Hartmut Merz¹

¹Institute for Pathology, UKSH campus Lubeck, Lubeck, Germany; ²Biomathematics/bioinformatics group, Genetics and
Biometry, Research Institute for the Biology of Farm Animals FBN, Dummerstorf, Germany

* 联系作者: hoefig@patho.uni-luebeck.de

最近的研究表明 microRNA (miRNA) 会直接参与多种人类恶性肿瘤的发展进程, 因此很有可能成为一类新型生物标志物。基于定量 PCR 的各种技术正在成为 miRNA 整体分析的金标准, 本研究用一种商业化的 miRNA 分析方法分别在 LightCycler®480 和另一种定量 PCR 平台上测量及比较 7 种淋巴结样本中的 154 种 miRNA 的表达水平。其中 134 种 miRNA (81%) 的表达水平高度相似, 20 种 (13%) 差异较大。除了大规模的 miRNA 整体分析, 还可以应用 LightCycler®480 系统对少量样本的 miRNA 表达进行评估。我们的实验证实, miR-205 能以剂量依赖的方式在梯度稀释的 KU19-19 细胞系中被检测到, 稀释梯度为 50、10、5 及 1 个细胞。这一结果突显出基于定量 PCR 的 miRNA 整体分析方法相对于芯片技术的优势: 极高的灵敏度和宽广的对数线性范围 (至少 6 个数量级)。

简介

据预测, 人类基因组内有约 1000 条 miRNA 的编码序列, 其中 474 条已经在 Sanger 数据库 (www.microna.sanger.ac.uk/sequences) 中被列为经实验验证的 miRNA。miRNA 首先由 RNA 编码基因转录为初级 miRNA (pri-miRNA, 长数百 bp); 初级 miRNA 经进一步处理后形成发夹状的前 miRNA (pre-miRNA, 长约 90bp); 最后再生成成熟 miRNA (长约 22bp) [1]。在哺乳动物中, 大多数 miRNA 都会与某一目标基因的 3' 端非翻译区 (3'-UTR) 内一段不完全匹配互补序列特异性结合, 从而达到抑制翻译的目的 [1]。平均而言, 每一条 miRNA 据估计可与约 200 种目标基因互补结合 [2]。mRNA 的 3' 端非翻译区提供了数目各不相同的 (0 到 30 个) 各种 miRNA 目标位点。简言之, 超过 30% 的基因可能是由 miRNA 直接参与调控的 [2]。与细胞分化及增殖等过程

相关的信号级联通路是 miRNA 调控最常见的目标 [3]。由于肿瘤细胞通常具有去分化及增殖异常等特征, 我们可以推测不同 miRNA 的表达差异有可能是肿瘤发展的推动因素。

Calin 等人首先报道了慢性淋巴性白血病 (CLL) 病人中 miR-16/15a 水平的普遍下调, 并随后证实有一特异性的 miRNA 序列与该疾病的各种预后因素及发展有相关性 [4, 5]。此后, 大量的文献报道分析了肿瘤发展中 miRNA 表达的相关性。而 miRNA 整体分析技术的出现大大加速了这一进程, 至 2007 年 3 月为止, 以 miRNA 及 cancer 为关键词的文献已达到 271 篇。Lu 等研究人员首次联合多方力量对大量 miRNA 进行了检测和报道 [6]。也有人运用流式细胞仪 (FACS) 对来自 334 种人类组织 (包括多种肿瘤样本) 的 217 条 miRNA 进行整体分析。目前已证实每种组织的 miRNA 整体特征各不相同, 而与基因表达水平特征近似, 并且包含的特征信息也同样丰富。有证据显示, miRNA 整体特征不仅表征了细胞分化的当前状态, 同时还反映了组织的发育起源。

到目前为止, 研究者们已开发出了许多不同的方法并将之相互结合, 用于 miRNA 整体分析研究。现在 miRNA 芯片技术应用也很广, 但同时也有不少问题, 主要是因为该方法在检测是可能混淆 miRNA 前体和成熟 miRNA。而且 miRNA 芯片也不适于区分高同源性的 miRNA, 可能会造成假阳性结果。LightCycler® 480 则可进行灵敏度和特异性都极高的 miRNA 整体特征分析。

材料和方法

总 RNA 用 Recover All 试剂盒 (Ambio, Austin, Texas, USA) 抽提。miRNA 表达整体分析按照 TaqMan® MicroRNA Assay 实验方案 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 和 Bardes 等人 [7] 的描述进行。细胞稀

释实验所用的 qPCR 反应体系（10 μl）包含：5 μl LightCycler® 480 Probe Master, 3.33 μl 无核酸酶的水, 0.67 μl miRNA 第一链 cDNA, 1 ml 引物（含于 TaqMan® MicroRNA Assay 试剂盒中）。在 LightCycler® 480 上采用以下 PCR 程序：酶活化：95℃ 10 分钟；扩增（45 个循环）：95℃ 15 秒（变温速度：4.4℃/S；分析模式：Quantification），60℃ 60 秒（变温速度 2.2℃/S），冷却：40℃ 30 秒（变温速度：2℃/S）。检测模式设为“单色水解探针（Mono Color Hydrolysis Probe）”并使用最大二阶导数法进行绝对定量。

结果和讨论

本小组于 2005 年 10 月开始用另一家公司的实时定量 PCR 仪器进行 miRNA 整体分析研究，共分析了各种扩散大 B 细胞淋巴瘤样本内 154 种 miRNA 的整体表达特征。LightCycler® 480 系统于 2005 年 9 月进入德国。此时我们了解到该系统比我们使用的仪器更为先进，可以

表 1: 7 种淋巴结 miRNA 整体分析（154 种 miRNA）的总体信号强度（Cp 值）。从很小的 Δ Cp 值可知两台实时定量 PCR 仪的结果高度相似。

	LightCycler® 480 系统	竞争对手仪器	Δ Cp
淋巴结 1	35.5	35.8	-0.3
淋巴结 2	36.5	36.3	0.2
淋巴结 3	36.2	35.5	0.7
淋巴结 4	35.6	35.7	-0.1
淋巴结 5	35.9	36.3	-0.4
淋巴结 6	36.8	36.4	0.4
淋巴结 7	36.2	35.8	0.4

更容易地将数据转到 Excel 中进行分析，更换不同通量的模块也更方便，更节能，体积较小，而且价格也低得多。因此，我们非常愿意进行对比实验，以比较两套系统对 miRNA 整体分析的结果。

总 RNA 是从 7 个淋巴结组织的甲醛固定石蜡包埋组织中分离纯化的。miRNA 整体分析分以下两步进行：1、分别对 154 种 miRNA 进行逆转录，合成第一链 cDNA；2、定量 PCR。

7 套完整的淋巴结 miRNA-cDNA 用作测定 7 种 miRNA 整体特征的模板，在 LightCycler® 480 和竞争者的仪器上分别进行实验。在总共 2,156 次定量 PCR 反应中，每组生成了 1,075 个 Cp 值。两台仪器均使用各自的默认设置计算每一组 2 × 7 个 miRNA 的平均 Cp 值，得到总的信号密度。所得结果非常接近（表 1）。所有 7 组 miRNA 的平均 Cp 值为：LightCycler® 480：36.1，竞争者仪器：36.0。总体标准误为 0.1（表 1）。图 1 显示了两台仪器各自测得的 7 种淋巴结样本数据计算出的 48 种 miRNA 平均表达强度。这些结果清楚地标明分析样本间差异与技术差异（如：加样误差、定量 PCR 仪器差别、Cp 值算法差异）都很小。因而 LightCycler® 480 完全可用于基于定量 PCR 的 miRNA 整体分析。

此外，我们也希望知道能否将来自两台定量 PCR 仪的每一种 miRNA 的数据进行比较。于是我们计算了置信区间（95 %），用于配对 t 测试（见图 2）。多数置信区间包含了零差异的理论值，证实所有 miRNA 表达结果中 84 % 的无论检测装置还是 Cp 值算法均无偏向性。通过对比两组完整的淋巴结 miRNA 整体特征数据，我们还测试了

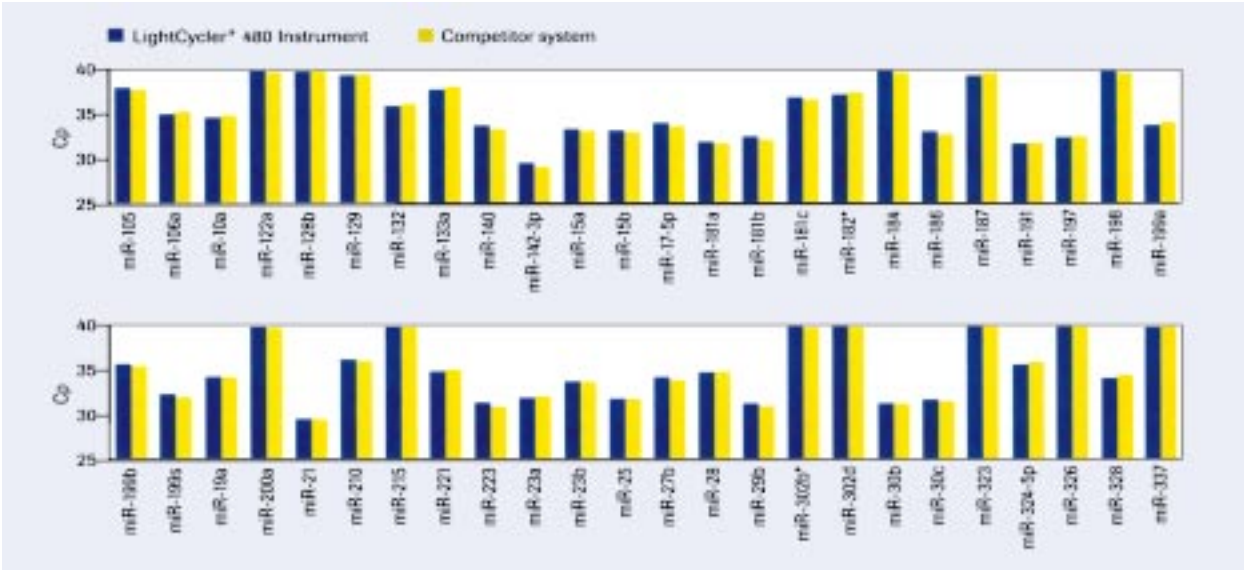


图 1: 7 种淋巴结 miRNA 整体分析中 48 种 miRNA 的平均 Cp 值。LightCycler® 480 系统测得的表达结果与竞争对手仪器类似。

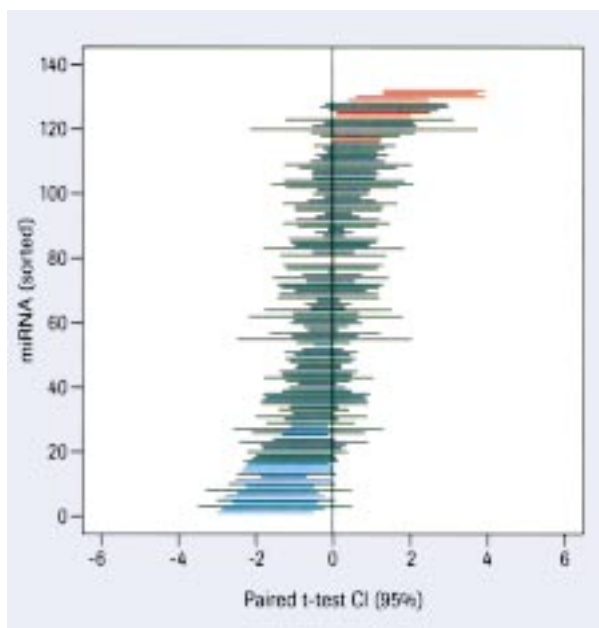


图2：配对t测试的置信区间（95%），按预计差异排序。大多数置信区间均包含了零差异的理论值。

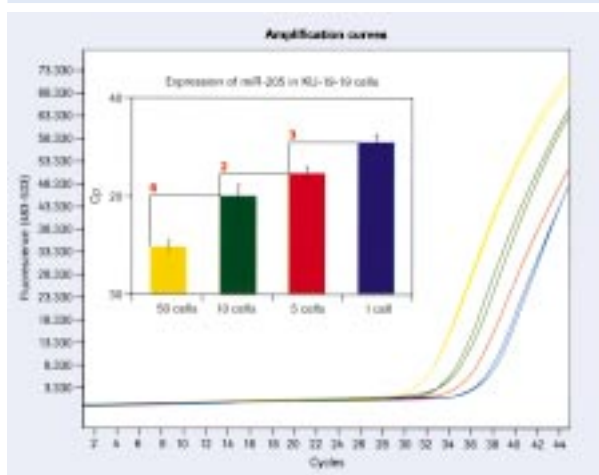


图3：膀胱癌细胞（KU-19-19）梯度稀释（50、10、5及1个细胞）后miR-205的定量结果。理论稀释倍数为5倍、2倍和5倍，与定量PCR测得结果相关性良好（6倍、2倍和3倍/（图中红色数字））。实验采用2平行样。50个细胞的结果以黄色显示，10个细胞绿色，5个细胞红色，1个细胞为蓝色。

TaqMan® PCR反应混合液能否用LightCycler® 480 Probe Master 替代。两组数据几乎完全一致（数据未显示）。因此我们用LightCycler® 480 Probe Master 进行以下实验。

肿瘤组织分析通常需要同时分析数量有限的细胞，这就要求检测方法必须特别灵敏，例如实时定量PCR。组织特异miRNA的表达量通常都非常高（如miR-122a表达量约为每个肝细胞66,000个拷贝），这对微量组织的分析很有好处。我们测定了miR-205在梯度稀释的KU19-19细胞系中的表达水平。从以前的实验中知道，miR-205在这种膀胱癌细胞系是大量表达的。将细胞用PBS稀释后进行热裂解（10分钟，95℃），裂解液直接用于miRNA逆转录及定量PCR。如图3所示，我们可以测出50个、10个、5个及1个细胞内的miRNA表达水平。理论上的和实际测得的稀释倍数变化相互吻合得很好。激光捕获显微解剖技术及甲醛固定石蜡包埋样本所得miR-16（在各种组织中广泛表达）的结果相近。这些数据表明我们所选的miRNA的表达研究使用非常少的组织样本就可以轻易完成。

结论

LightCycler® 480 系统是我们进行大规模miRNA整体分析的首选仪器。我们现在装备了一台自动移液系统，以便对384条miRNA进行同步分析。而且，我们在LightCycler® 480上进行的miRNA表达定量分析是迄今为止最灵敏的方法，超过所有基于芯片的miRNA分析系统。

参考文献

1. He L, Hannon GJ (2004) Nat Rev Genet 5:522-531
2. Lewis BP et al. (2005) Cell 120:15-20
3. Hwang HW, Mendell JT (2006) Br J Cancer 94:776-780
4. Calin GA et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99: 15524-15529
5. Calin GA et al. (2005) N Engl J Med 353:1793-1801
6. Lu J et al. (2005) Nature 435:834-838
7. Bandres E et al. (2006) Mol Cancer 5:29

产品名称	包装规格	序列号
LightCycler®480 Instrument, 96-well block	1 套	04 640 268 001
LightCycler®480 Instrument, 384-well block	1 套	04 545 885 001
LightCycler®480 Probes Master, 5 x 1 ml	5 × 100 反应(20 µl)	04 707 494 001
LightCycler®480 Probes Master, 10 x 5 ml	10 × 500 反应(20 µl)	04 887 301 001
LightCycler®480 Probes Master, 1x 50 ml	1 × 5000 反应(20 µl)	04 902 343 001