

## • 基础实验研究论著 •

# 生物素标记探针-液相杂交-非变性 PAGE 检测非编码小 RNA 方法的建立和优化<sup>\*</sup>

郭跃辉<sup>1</sup>, 刘立宾<sup>2</sup>, 徐芒华<sup>1</sup>, 郭竹英<sup>1</sup>, 姜斌<sup>1</sup>, 李伟<sup>2</sup>, 高丰厚<sup>1△</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属第三人民医院实验中心, 上海 201900; 2. 浙江省医学遗传学重点实验室/检验医学省部共建教育部重点实验室/温州医学院检验医学院与生命科学学院, 浙江温州 325035)

**摘要: 目的** 建立生物素标记探针-液相杂交-非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测非编码小 RNA(sRNA)的方法。  
**方法** 将生物素标记的 sRNA U6 寡核苷酸探针经非变性 PAGE 电泳后转印至尼龙膜上, 然后用辣根过氧化物酶(HRP)耦联链霉亲和素进行检测。从细胞中提取总 RNA, 用已标记 U6 探针优化液相杂交退火条件及杂交缓冲液; 用建立的方法检测并计算 BEAS-2B、A549 细胞中 sRNA U6 与 miRNA145 的含量。**结果** 将 Biotin-11-dUTP 成功标记至寡核苷酸上, 随着寡核苷酸浓度增加, 检测信号强度越强, 10 μmol/L 时达到最强。采用水浴反应条件与采用聚合酶链反应(PCR)仪梯次降温反应条件下得到的杂化链无明显差异; 以磷酸盐缓冲液作为杂交缓冲液优于 Tris-HCl/DEPC 水; BEAS-2B、A549 细胞 5 μg RNA 中 U6 含量接近; BEAS-2B 细胞中 miRNA145 绝对含量高于 A549 细胞。**结论** 成功建立并优化了 sRNA 检测新方法, 为简单、易行、可靠地检测 sRNA 提供了可能。

**关键词:** 非编码小 RNA; 生物素化探针; 液相杂交; 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.003

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)06-0645-03

## Establishment and optimization of non-coding small RNA detection methods by biotin-labeled probe-liquid hybridization-non-denaturing PAGE<sup>\*</sup>

Guo Yuehui<sup>1</sup>, Liu Libin<sup>2</sup>, Xu Manghua<sup>1</sup>, Guo Zhuying<sup>1</sup>, Jiang Bin<sup>1</sup>, Li Wei<sup>2</sup>, Gao Fenghou<sup>1△</sup>

(1. Experimental Centre, Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics/ Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education/School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou Zhejiang 325035, China)

**Abstract: Objective** To develop a method for detecting non-coding small RNA(sRNA) by biotin-labeled probe-liquid hybridization-non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). **Methods** The biotinylated oligonucleotides of sRNA U6 were treated by non-denaturing PAGE, transferring to nylon membrane, and then were detected by horseradish peroxidase(HRP)-conjugated streptavidin-biotin. U6 and miRNA-145 contents in BEAS-2B and A549 cells were detected and calculated through the established method. **Results** The U6 oligonucleotides were successfully labeled with bio-11-dUTP, which had the strongest signal at concentration of 10 μmol/L. There was no significant difference of hybrid chains, acquired by water bath or polymerase chain reaction(PCR) instrument. According to liquid hybridization solution, phosphate buffer was superior to Tris-HCl and DEPC water. U6 content in BEAS-2B cells was almost equivalent to the content in A549, while the abundance of miRNA-145 in BEAS-2B was higher than that in A549. **Conclusion** A new method for detecting sRNA was successfully established and optimized, which could offer possibility for simple and reliable detection of sRNA.

**Key words:** non-coding small RNA; biotin-labeled probe; liquid hybridization; non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

非编码小 RNA(sRNA)是细胞中一大类由几十核苷酸到几百核苷酸组成的、不编码蛋白质的 RNA, 包括核小 RNA、核仁 RNA、微小 RNA、干扰小 RNA、时序小 RNA 等, 其本身或与蛋白质结合形成复合体有重要生物学功能<sup>[1]</sup>。目前 sRNA 检测技术主要有 RNA 印迹(Northern 印迹)、逆转录聚合酶链反应(rt-PCR)、微阵列芯片及测序技术。rt-PCR、微阵列芯片及测序技术与 Northern 印迹相比, 均需要特殊仪器设备, 且检测费用高昂<sup>[2-4]</sup>。传统 Northern 印迹技术不仅可直接检出待测 RNA, 能明确 RNA 碱基数目, 同时也可进行半定量检测, 是检测 sRNA 不可取代的方法<sup>[5-6]</sup>。然而 Northern 印迹检测 sRNA 耗时长, 步骤繁琐, 技术要求较高, 尤其是需使用同位

素, 需特殊防护设备及相关专业人员, 使其推广应用受到限制<sup>[5-7]</sup>。因此, 有必要对 Northern 印迹检测 sRNA 进行方法学改良。本研究在传统 Northern 印迹基础上发展了非同位素探针-液相杂交-非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)系统检测 sRNA 技术。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** Trizol 试剂(美国 Invitrogen), 生物素探针标记试剂盒、化学发光检测试剂盒(美国 Pierce), RNA 酶(RNase)抑制剂(RNaseZap)、二乙基焦磷酸(DEPC)(美国 Sigma), 1×PCR 反应液(大连宝生物), 退火缓冲液(南通碧云天), 电泳仪、转印槽、普通 PCR 仪(美国 Bio-rad)。人肺正常

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172322); 上海市自然科学基金资助项目(11ZR1421000); 上海交通大学医学院科技基金资助项目(YZ1027)。△ 通讯作者, E-mail: fenghougao@163.com。

支气管上皮细胞株 BEAS-2B、人肺癌细胞株 A549 细胞购于上海中科院细胞研究所。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞株 BEAS-2B、A549 在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 RPMI 1640 完全培养液内, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养。细胞单层贴壁生长至 70%~80% 融合时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

**1.2.2 总 RNA 提取** 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub>>1.8 且 28S rRNA/18S rRNA>2 用于后续试验。

**1.2.3 寡核苷酸探针合成与标记** hsa-miR-145 探针序列: 5'-AGGGATTCCCTGGGAAACTGGAC-3' 和 hsa-U6 探针序列: 5'-ATTTGCGTGTTCATCCTTGCG-3', 由上海生工有限公司合成。按 DNA 3' 末端生物素标记试剂盒说明书进行寡核酸标记。

**1.2.4 核酸、探针液相杂交及检测** 取总 RNA 5 μg、探针 2 μL 混匀, 用 1×PCR 反应液补充体积至 16 μL。不同退火条件下进行杂交。PCR 仪反应条件为: 95 °C 2 min; 每 90 s 降低 1 °C, 直至 42 °C; 42 °C 60 min。水浴反应条件为: 95 °C 2 min, 42 °C 3 h。采用水浴退火方式, 以不同杂交缓冲液进行杂交。4 种不同杂交缓冲液包括: 磷酸盐缓冲液、1×PCR 反应液 (Tris-HCl 缓冲液, 以 DEPC 水配制)、退火缓冲液 (Tris-HCl 缓冲液, 以 DEPC 水配制) 和 DEPC 水。将杂交后的样品加入 4 μL 上样缓冲液, 非变性 PAGE 分离核酸后, 转移至尼龙膜上, 紫外线强度 1.5 J 条件下交联照射; 42 °C 干燥 10 min, 42 °C 封闭 30 min; 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记链亲和霉素 (稀释比例为 1:300), 42 °C 处理 45 min; 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 每次 5 min; 底物平衡缓冲液 5 mL, 洗涤 5 min; 化学发光检测试剂盒检测发光的核酸条带。

**1.2.5 sRNA 表达量的计算** 反应体系中, 已知总探针量且总探针足量时, 理论上总探针量为与 sRNA 杂交的探针量和未杂交的探针量相加之和, 故与 sRNA 杂交结合的探针量计算公式为: 与 sRNA 杂交结合的探针量 = 总探针量 × [与 sRNA 杂交的探针量 / (与 sRNA 杂交的探针量 + 未杂交的探针量)]。由于探针与目的 sRNA 完全碱基互补配对, 故与 sRNA 结合杂交的探针量即为 sRNA 含量。根据图像处理分析得到的各条带灰度值, 可计算 sRNA 含量: sRNA 含量 = 生物素标记探针总量 × [杂化双链条带灰度值 / (杂化双链条带灰度值 + 未杂交探针条带灰度值)]。

**1.3 统计学处理** 所有试验均重复 3 次, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS11.5 统计学软件进行均数配对 t 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 生物素标记探针非变性 PAGE 检测** 以浓度分别为 1、2、5、10 μmol/L 寡核苷酸探针, 采用末端转移酶于 3' 端标记生物素, 各取等量已标记探针, 经 15% 非变性 PAGE、转膜后检测 HRP, 结果如图 1 所示。探针浓度为 1、2、5、10 μmol/L 时, 均可在探针末端成功标记生物素, 在浓度为 10 μmol/L 时, 探针信号达到最强, 说明探针标记成功。

**2.2 液相杂交后非变性 PAGE 检测系统的建立** 以 U6 为例, 总 RNA、U6 探针在液体环境下充分杂交后, 非变性 PAGE 检测。只加入 U6 探针时, 仅在 20 核苷酸(nt) 处显示条带; 杂交条带出现在探针条带上方, 过量探针条带在约 20 nt 处。结果见图 2。

**2.3 不同条件下的液相杂交反应** 以 PCR 仪及水浴条件进行杂交, 并对杂交产物进行检测, 结果见图 3。不同的液相杂交条件均能使探针和目的 RNA 杂交, 形成杂化链。

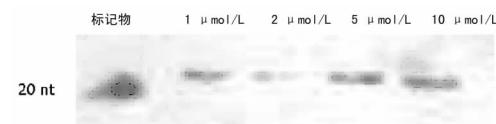


图 1 非变性聚丙烯酰胺电泳-转膜-交联固定-加 HRP 后检测生物素标记 U6 探针



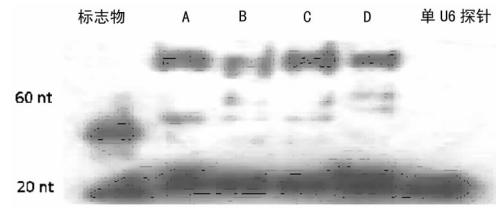
图 2 液相杂交-非变性 PAGE 检测系统建立

**2.4 不同缓冲液体系中的液相杂交反应** 水浴条件下, 采用 4 种不同缓冲液进行杂交, 杂交产物检测结果见图 4。采用 4 种杂交缓冲液均可形成目的杂化链, 其中磷酸盐缓冲液、退火缓冲液形成的杂化链更为明显。采用 4 种杂交缓冲液均可形成非特异杂化链, 但磷酸盐缓冲液形成的非特异性杂化链最少 (仅 1 条)。



lane1: 5 μg 总 RNA + 2 pmol U6 探针; lane2: 5 μg 总 RNA + 5 pmol U6 探针; lane3: 5 μg 总 RNA + 2 pmol U6 探针; lane4: 5 μg 总 RNA + 5 pmol U6 探针; lane5: U6 探针 2 pmol; lane1、lane2 退火条件: 在 PCR 仪上设置逐步降温, 先 95 °C、2 min, 然后每 90 s 降低 1 °C, 直至温度达到 42 °C; 42 °C 维持 60 min。lane3、lane4 退火条件 95 °C 水浴 2 min, 然后置于 42 °C, 3 h。

图 3 液相杂交不同退火条件的比较



A: 磷酸盐缓冲液; B: 1×PCR 反应液 (Tris-HCl 缓冲液); C: 退火缓冲液 (Tris-HCl 缓冲液); D: DEPC 水。

图 4 液相杂交不同杂交缓冲液的比较



图 5 BEAS-2B 与 A549 细胞 U6、MiRNA145 的表达量

**2.5 BEAS-2B 与 A549 细胞 U6、miRNA-145 表达量检测与比较** 分别取 BEAS-2B 与 A549 细胞总 RNA 各 5 μg, 在磷酸盐缓冲液中加入 U6 与 miRNA-145 探针 2 μL (含探针 5 pmol), 水浴条件下退火杂交, 非变性 PAGE 电泳检测 U6 与

miRNA145 含量(见图 5)。在 BEAS-2B 与 A549 细胞中均可检出 U6、miR-145。采用图像处理分析软件计算图 5 各条带灰度值(见表 1)。根据 sRNA 含量计算公式计算 miR-145、U6 表达量。在 5  $\mu$ g BEAS-2B 细胞总 RNA 中, U6、miRNA-145 含

量为(2.59  $\pm$  0.03)和(2.82  $\pm$  0.04) pmol; 在 5  $\mu$ g A549 细胞总 RNA 中, U6、miR-145 含量为(2.66  $\pm$  0.44)和(2.28  $\pm$  0.03) pmol。miRNA145/U6 比值在 BEAS-2B、A549 细胞分别是 1.08、0.85, 差异具有统计学意义( $t=46.77, P<0.05$ )。

表 1 根据图 5 计算的条带灰度值( $\bar{x} \pm s$ )

条带	U6		miR-145	
	BEAS-2B	A549	BEAS-2B	A549
杂交条带	1 159.81 $\pm$ 24.51	1 246.36 $\pm$ 91.01	2 396.35 $\pm$ 33.31	1 564.32 $\pm$ 15.28
未杂交条带	1 078.07 $\pm$ 6.80	1 098.75 $\pm$ 41.38	1 851.85 $\pm$ 41.69	1 861.05 $\pm$ 46.90

### 3 讨 论

生物体内存在的大量 sRNA 组成了细胞中高度复杂的 RNA 调控网络, 对细胞增殖、周期、分化和凋亡等进行调控。因此, 有必要建立快速、简单、可靠的 sRNA 检测方法。本研究所建立检测方法的主要流程为: 生物素标记探针  $\rightarrow$  液相杂交  $\rightarrow$  非变性 PAGE 电泳  $\rightarrow$  转印至尼龙膜  $\rightarrow$  HRP 桥联链霉亲和素检测。

采用 Northern 印迹技术检测非编码 RNA 的原理是用已标记的寡核苷酸探针检测与寡核苷酸探针互补的未知 RNA。寡核苷酸探针可根据需要选择性合成, 因此探针的标记是实现检测目的的关键。由于同位素标记法存在局限, 具有较高敏感性及稳定性的生物素-亲和素系统得到广泛应用<sup>[8]</sup>。本研究通过末端转移酶将 Biotin-11-dUTP 成功连接至合成的寡核苷酸 3' 末端, 且随着寡核苷酸浓度增加, 检测信号强度越强, 10  $\mu$ mol/L 时达到最强, 说明标记体系最好选用浓度为 10  $\mu$ mol/L 的寡核苷酸。

传统 Northern 印迹固相杂交反应过程繁琐, 耗时费力, 且 RNase 无处不在, 进行多步操作增加了 sRNA 被降解的可能<sup>[5-6]</sup>。液相杂交使杂交反应在溶液里完成, 简化了步骤, 缩短了时间, 增加了特异性和敏感性<sup>[9-12]</sup>。因此, 本研究选择将探针与待杂交样品置于不同杂交缓冲液中, 采用不同退火条件, 探索 sRNA 最佳检测条件。结果显示液相杂交检测 sRNA 无需特殊试剂及仪器, 采用磷酸盐缓冲液及水浴条件即可进行杂交反应。

生物素标记寡核苷酸探针稳定性较高, 如在液相杂交体系中加入准确定量的寡核苷酸探针, 便可根据最终的灰度值计算样品中的 sRNA 含量。本研究证实 5  $\mu$ g 肺支气管上皮细胞 BEAS-2B 与肺癌细胞 A549 总 RNA 中, U6 绝对含量相近( $t=1.5, P=0.27$ ); miRNA145 在 BEAS-2 细胞中的含量高于 A549。说明本研究所建立的方法可用于 sRNA 的定量检测, 甚至可直接检测目的 RNA, 且无需设置内参。

综上所述, 本研究在传统 Northern 印迹基础上建立并优化了检测 sRNA 的新方法, 为简单、易行、可靠地检测 sRNA 提供了可能, 也为 sRNA 基础及临床研究提供了有力地保障。

### 参考文献

[1] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer[J]. Annu

Rev Med, 2009, 60(1): 167-179.

- [2] Tang F, Hajkova P, Barton SC, et al. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2006-01-24 [2012-01-14], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351374/?tool=pubmed>.
- [3] Chen C, Ridzon DA, Bromer AJ, et al. Real time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2005-11-27 [2012-01-14], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16314309/?tool=pubmed>.
- [4] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)[J]. RNA, 2006, 12(5): 913-920.
- [5] Strit S, Michalisk CW, Erkan M, et al. Northern blot analysis for detecting and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 37-43.
- [6] 李善清, 唐万兵, 孙鹏, 等. 全反式视黄酸及干扰素对胃癌细胞系 MNK45 中 p16, p21, cMyc 基因表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011; 32(2): 159-162.
- [7] Tran N. Fast and simple microRNA northern blot[J]. Methodology, 2009, 2(1): 1-3.
- [8] Duan Z, Choy E, Nielsen GP, et al. Differential expression microRNAs in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression [J]. J Orthop Res, 2010, 28(6): 746-752.
- [9] Wang X, Tong Y, Wang S. Rapid and accurate detection of plant miRNAs by liquid northern hybridization[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(9): 3138-3148.
- [10] Yan F, Wu X, Crawford M, et al. The search for an optimal DNA, RNA, and protein detection by in situ hybridization, immunohistochemistry, and solution-based methods[J]. Methods, 2010, 52(4): 281-286.
- [11] 徐卫, 李建勇, 陆凤翔. 液相杂交检测 B 细胞淋巴瘤细胞系 miR-28 的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(2): 289-292.
- [12] Chamnongpol S, Maroney PA, Nilsen TW. A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation[J]. Methods Mol Biol, 2010, 667(1): 3-17.

(收稿日期: 2011-12-18)

(上接第 644 页)

lular invasion[J]. Int J Oncol, 2001, 19(4): 709-715.

- [11] Teraoka H, Sawada T, Yamashita Y, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cel-

[12] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 271.

(收稿日期: 2011-12-19)