

• 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\*

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  $\mu\text{mol/L}$  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交链无明显差异;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  $\mu\text{g}$  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\*

Guo Yuehui<sup>1</sup>, Liu Libin<sup>2</sup>, Xu Manghua<sup>1</sup>, Guo Zhuqing<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  $\mu\text{mol/L}$ . 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)、二乙基焦磷酸胺(DEPC)(美国 Sigma),1 $\times$ 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℃、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'-AGGGATTCTGGGAAAACTGGAC-3' 和 hsa-U6 探针序列: 5'-ATTTGCGTGTCATCCTTGCG-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℃ 2 min; 每 90 s 降低 1℃, 直至 42℃; 42℃ 60 min。水浴反应条件为: 95℃ 2 min, 42℃ 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℃ 干燥 10 min, 42℃ 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℃ 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。

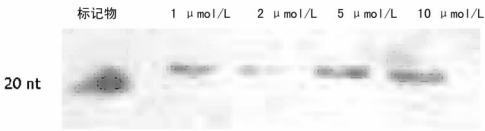
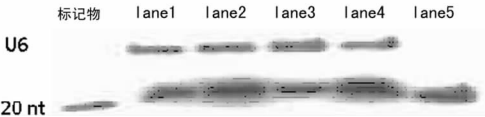


图 1 非变性聚丙烯酰胺电泳-转膜-交联固定-加 HRP 后检测生物素标记 U6 探针



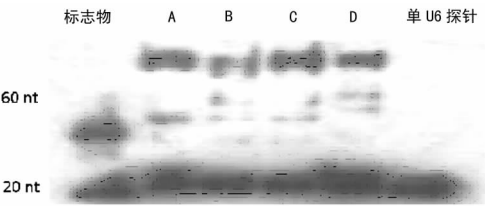
图 2 液相杂交-非变性 PAGE 检测系统建立

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℃、2 min, 然后每 90 s 降低 1℃, 直至温度达到 42℃; 42℃ 维持 60 min。lane3、lane4 退火条件 95℃ 水浴 2 min, 然后置于 42℃、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

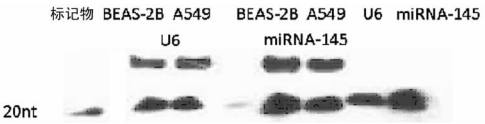


图 5 BEAS-2B 与 A549 细胞 U6、MiRNA145 的表达量

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。本研究建立检测方法的主要流程为:生物素标记探针→液相杂交→非变性 PAGE 电泳→转印至尼龙膜→HRP 耦联链霉素和素检测。

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 & 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 quatification 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. 全反式视磺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 bots[J]. Methodology,2009,2(1):1-3.  
[8] Duan Z,Choy E,Nielsen GP,et al. Differetial 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)

Different mechanisms for anti-tumor effects of low-and high-dose cyclophosphamide[J]. Oncol Rep,2006,16(1):141-146.  
[11] Teraoka H,Sawada T,Yamashita Y,et al. TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cel-

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