

两种微量RNA扩增方法的比较研究

陈林华* 赵月娥 陈晓燕 高 英

(温州医学院附属眼视光医院, 温州 325027)

摘要 本研究通过比较体外转录和单引物扩增这两种扩增微量RNA的不同方法, 以寻找一种高效的扩增方法。我们用两种不同方法分别扩增小鼠大脑全皮层及第五皮层细胞的RNA, 扩增的RNA合成cDNA后进行荧光定量PCR实验, 根据PCR结果比较两种不同扩增方法的效率。WT-ovation扩增RNA的效率约为IVT效率的2.8倍; IVT方法扩增后, 基因D-Ct值与引物距离mRNA 3'端的长度及mRNA的长度均存在正线性相关($P < 0.05$), 即引物距离mRNA的3'端越近、mRNA越短, 基因D-Ct值越低。而WT-ovation方法扩增后, 基因D-Ct值与引物距离mRNA 3'端的长度及mRNA的长度均不存在统计学相关性。与IVT方法相比, WT-ovation方法效率更高, 扩增时受影响因素较少、更稳定。

关键词 RNA扩增; IVT扩增; WT-ovation扩增; 定量PCR

随着激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)的发展, 现已能够从含有不同成分的组织中高度选择性地获取某一特定的同类细胞甚至单个细胞。近年来发展起来的基因芯片技术^[1,2], 使我们能够检测组织或细胞中大量基因的表达情况。但典型的芯片杂交需要大于2 μg mRNA, 直接来源于LCM的细胞很难提取足够量的mRNA用于基因芯片分析^[1,3]。

Van Gelder^[4]和Eberwine^[5]发明了一种基于cDNA合成和模板指导多循环线性方式的RNA扩增方法^[6,7]。Eberwine法中的体外转录(*in vitro* transcription, IVT)扩增, 是利用Oligo dT引物对mRNA进行反转录为cDNA, 再将mRNA-cDNA用RNase H处理以合成双链cDNA, 然后在T7 RNA聚合酶作用下进行体外转录, 合成反义RNA(antisense RNA, aRNA)的线性扩增。单引物扩增(single primer amplification, SPA)方法是利用DNA聚合酶, DNA/RNA、随机引物、Oligo dT等引物对mRNA进行扩增, 合成RNA/DNA稳定的中间产物, 再不断循环扩增出cDNA产物。美国Nugen公司用SPA原理, 研发了WT-ovation试剂盒。本研究通过比较IVT和WT-ovation这两种扩增微量RNA的不同方法, 以寻找高效的扩增方法。

1 材料与方法

1.1 实验对象

清洁级美国癌症研究所(Institute of Cancer Re-

search, ICR)小鼠, 来自并繁殖于温州医学院动物实验室。

1.2 实验材料

MEM(modified Eagle's medium)、TRIzol、Superscript III Firststrand Kit均购自美国Invitrogen公司, RNeasy Mini Kit和PCR Purification Kit购自德国Qiagen公司, MEGAscript T7 Kit 购自美国Ambion公司, WT-ovation Kit购自美国Nugen公司, Picopure RNA Kit及激光显微切割试剂均购自Arcturus公司, Real-time PCR试剂均购自美国ABI公司, 实验所需主要仪器为Arcturus公司的XT系统激光切割机和ABI公司的7500型荧光实时定量PCR仪。

1.3 小鼠大脑全皮层RNA的提取

选取8只ICR小鼠, 颈椎脱臼法处死小鼠, 显微镜下用眼科镊分离得到小鼠大脑全皮层组织, 用TRIzol方法提取并纯化RNA。

1.4 小鼠第五皮层细胞RNA的提取

小鼠冰冻麻醉后, 在大脑椎体交叉处注射逆行示踪剂Redbeads, 标记第五皮层细胞。待小鼠存活两天后处死, 取脑组织包埋, 做冰冻切片, 用激光显微切割仪捕获标记的第五皮层细胞; 使用Picopure

收稿日期: 2010-12-22 接受日期: 2011-01-20

国家自然科学基金(No.30970924), 浙江省自然科学基金(No.Y2100855)和温州医学院附属眼视光医院科研启动基金(No.KYQD090701)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-88067935, E-mail: chenlinhua14159@yahoo.com.cn

RNA Kit提取细胞的RNA,并于-80℃保存。

1.5 IVT方法扩增微量RNA(图1)

在0.2 ml EP管中加入50 ng RNA、200 pmol T7-Oligo (dT)₂₄引物和10 nmol dNTPs,根据Superscript III First Strand Kit方法逆转录成双链cDNA;再加入MEGAscript T7 Kit中提供的8 μl DEPC-water, 2 μl 75 mmol/L ATP, 2 μl 75 mmol/L CTP, 2 μl 75 mmol/L GTP, 2 μl 75 mmol/L UTP, 2 μl 10×Buffer, 2 μl T7 Enzyme Mix,混匀后37℃水浴4小时,进行体外转录扩增;扩增后的aRNA用Qiagen Kit纯化,加入随机引

物,根据Superscript III First Strand Kit方法逆转录合成cDNA后做Real-time PCR实验。

1.6 WT-ovation方法扩增微量RNA(图2)

在0.2 ml EP管中,加入50 ng的RNA、WT-ovation Kit中提供的2 μl First Strand Primer A1, 2.5 μl Buffer Mix A2, 0.5 μl Enzyme Mix A3,混匀后孵育65℃, 2 min→4℃, 1 min→25℃, 10 min→42℃, 10 min→70℃, 15 min→4℃,合成双链cDNA;SPA扩增:在纯化的cDNA中,加80 μl C2, 40 μl C1, 40 μl C3溶液,混匀后,4℃, 1 min→47℃, 60 min→95℃, 5 min→4℃,置冰上

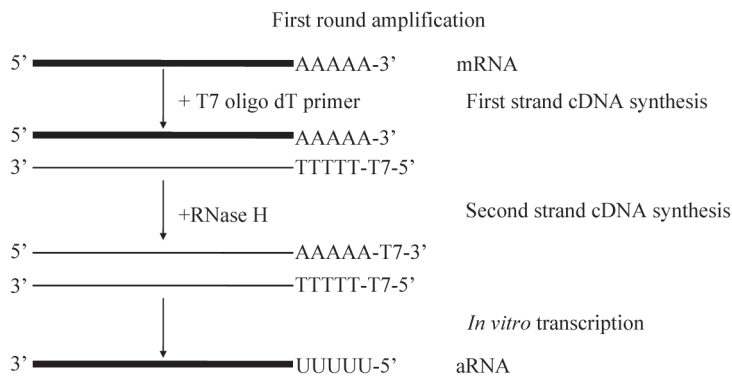


图1 IVT扩增流程图^[8]

T7-oligo dT primer: 含有T7噬菌体RNA聚合酶启动子序列的寡聚dT引物;粗线表示RNA,细线表示cDNA。

Fig.1 Flowchart of RNA amplification by IVT method^[8]

T7-oligo dT primer: an oligo dT primer which contains T7 RNA polymerase promoter sequence. Thick line represents RNA, while thin line represents cDNA.

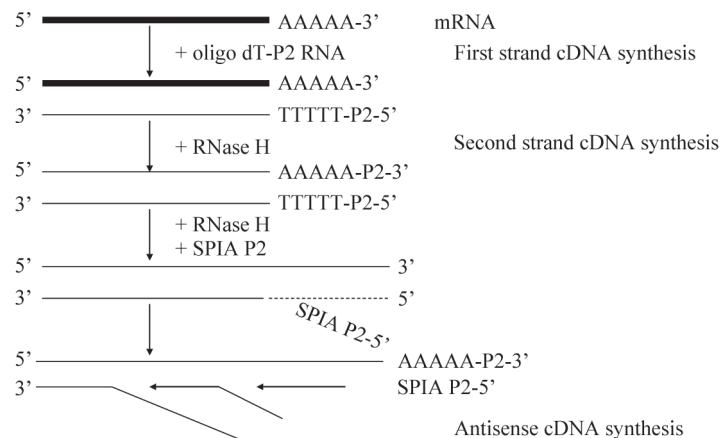


图2 WT-ovation扩增示意图^[8]

Oligo dT-P2 RNA: 含寡聚dT和RNA序列的引物; SPIA P2: DNA-RNA融合引物。

Fig.2 Flowchart of RNA amplification by WT-ovation method^[8]

Oligo dT-P2 RNA: a primer containing oligo dT and RNA sequence; SPIA P2: DNA-RNA chimeric primer.

冷却, 扩增后cDNA做Real-time PCR实验。

1.7 Real-time PCR实验

用SYBR Green荧光标记方法, 以 β -actin为内参基因。Real-time PCR反应体系为25 μ l, 包括12.5 μ l 2 \times SYBR Green mix, 1.25 μ l 20 \times primer, 1.5 μ l cDNA, 9.75 μ l ddH₂O。反应程序为: 50 $^{\circ}$ C预热2 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C预变性10 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火延伸60 s, 体系均反应40个循环。

1.8 统计学方法

统计学分析采用SPSS 16.0软件包, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 基因的D-Ct值与扩增效率相关因素关系采用线性相关分析, 统计结果以相关系数(r)表示, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠全皮层及第五皮层细胞RNA电泳结果

取5 μ l全皮层及第五皮层细胞(未扩增)的RNA, 进行电泳检测。结果如图3所示: 两样品的原始RNA条带均完整、未降解, 可用于后续扩增实验。

2.2 RNA经IVT及WT-ovation扩增结果

小鼠大脑皮层组织50 ng RNA经IVT扩增后, 所

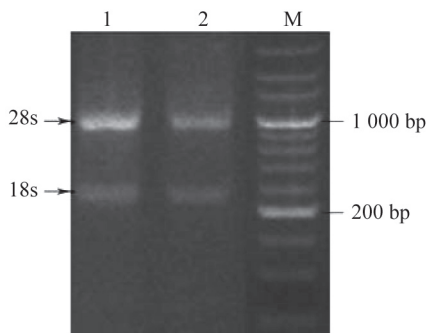


图3 全皮层及第五皮层细胞RNA电泳图

1: 全皮层组织; 2: 第五皮层细胞; M: 200 bp marker.

Fig.3 RNA electropherogram of cerebral cortex tissue and the layer V of cortical cortex

1: cerebral cortex tissue; 2: layer V of cortical cortex; M: 200 bp marker.

得到的RNA量为 $3.022 \pm 0.232 \mu\text{g}$ (扩增效率约60倍); WT-ovation扩增后的RNA量为 $8.018 \pm 0.153 \mu\text{g}$ (扩增效率约160倍)。LCM捕获第五皮层1 500个细胞, 经IVT扩增后的RNA为 $3.305 \pm 0.361 \mu\text{g}$, 经WT-ovation扩增后的RNA为 $10.003 \pm 0.224 \mu\text{g}$ (表1)。根据扩增效率的比较, WT-ovation方法比IVT方法相对效率高, 约为其2.8倍。

2.3 RNA扩增后定量PCR结果

定量PCR结果数据中, 基因D-Ct值=目标基因(Ct_{rest})-内参基因(Ct_{ctrl}), D-Ct值与基因相对表达量成反比。基因相对表达量与引物位置、mRNA长度等均可能相关。因此对小鼠大脑全皮层87个基因和第五皮层17个基因的定量PCR结果进行分析, 将基因D-Ct值和引物距离mRNA 3'端的长度及mRNA的长度作图, 图中斜线的斜率表示统计学相关系数(r), 并统计与基因相对表达量相关的因素。

2.3.1 RNA扩增后D-Ct与引物距离mRNA 3'端的长度关系 小鼠大脑全皮层和第五皮层的RNA经IVT和WT-ovation扩增后, 根据定量PCR结果, 对基因D-Ct和引物距离mRNA 3'端长度作图(图4)。结果如下: IVT扩增后D-Ct值与引物距离mRNA 3'端长度存在正线性统计学相关($P_{\text{全皮层}}=0.003, r_{\text{全皮层}}=0.263; P_{\text{第五皮层}}=0.018, r_{\text{第五皮层}}=0.552$); 即引物距离mRNA的3'端越近, D-Ct值越低, 检测到的基因相对表达量越高。而WT-ovation扩增后, D-Ct与引物距离mRNA 3'端长度两者之间不存在统计学相关性($P_{\text{全皮层}} > 0.05, P_{\text{第五皮层}} > 0.05$)。

2.3.2 RNA扩增后D-Ct与mRNA长度关系 小鼠大脑全皮层和第五皮层的细胞RNA经IVT和WT-ovation扩增后, 根据定量PCR结果, 对基因D-Ct和mRNA长度作图(图5)。结果如下: IVT扩增后D-Ct值与mRNA长度存在正线性统计学相关($P_{\text{全皮层}}=0.008, r_{\text{全皮层}}=0.232; P_{\text{第五皮层}}=0.002, r_{\text{第五皮层}}=0.689$); 即mRNA越短, D-Ct值越低, 检测到的基因相对表达量越高。

表1 全皮层及第五皮层细胞RNA的原始量及扩增后的RNA量

Table 1 The RNA quantity of cerebral cortex tissue and the layer V of cortical cortex before and after amplification

样品	样品量(n)	原始量	IVT扩增RNA (μg)	WT-ovation扩增RNA (μg)
Sample	The quantity of sample(n)	The primitive quantity of RNA	The RNA quantity after IVT amplification (μg)	The RNA quantity after WT-ovation amplification (μg)
Cerebral cortex	8	50 ng RNA	3.022 ± 0.232	8.018 ± 0.153
Layer V of cortical cortex	8	1 500 cells	3.305 ± 0.361	10.003 ± 0.224

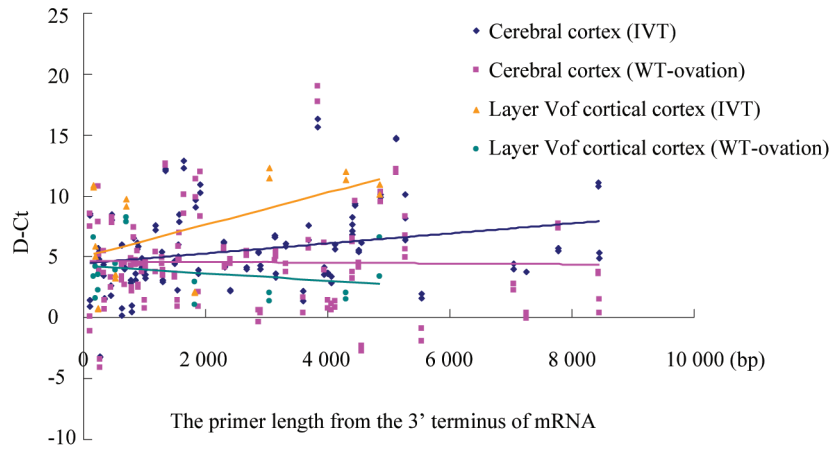


图4 定量PCR的D-Ct与引物距离mRNA 3'端长度的关系图

斜线斜率表示统计学相关系数(r)。

Fig.4 The relationship between D-Ct of quantitative PCR and the primer length from the 3' terminus of mRNA

The slope rate of line represents correlation coefficient (r) in statistics.

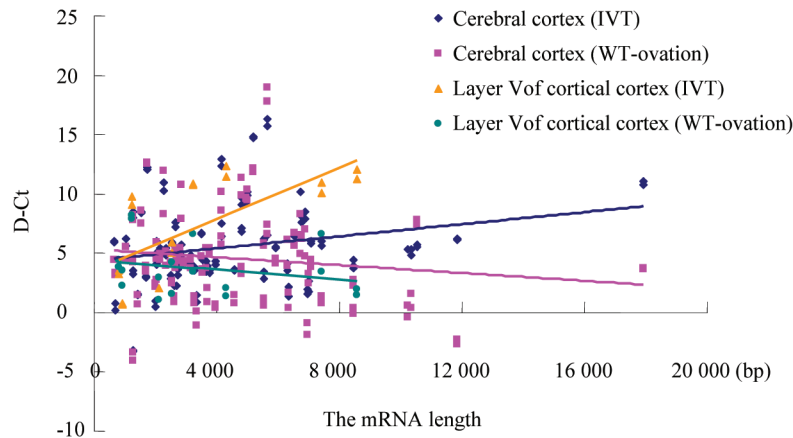


图5 定量PCR的D-Ct与mRNA长度的关系图

斜线斜率表示统计学相关系数(r)。

Fig.5 The relationship between D-Ct of quantitative PCR and the mRNA length

The slope rate of line represents correlation coefficient (r) in statistics.

而WT-ovation扩增后, D-Ct与mRNA长度两者不存在统计学相关性($P_{\text{全皮层}} > 0.05$, $P_{\text{第五皮层}} > 0.05$)。

3 讨论

根据产物的增长方式, RNA 扩增可分为指数扩增和线性扩增。指数扩增是建立在PCR方法上的反应; 线性扩增是采取cDNA合成和模板指导的体外转录的多循环反应。利用PCR法进行指数扩增有许多优点: 首先, PCR方法方便, 简单易行, 中间环节少, 其扩增倍数可以达到 10^{11} 数量级^[9], 且扩增产物是双链的, 稳定性远高于RNA, 后续应用广泛。虽

然用PCR法进行指数扩增有如此多的优点, 但是该方法对不同GC含量模板扩增效率是不同等的, 这一缺点也是不容忽视的。针对指数扩增存在的缺陷, 科学家们使用线性放大的方法来扩增RNA。线性扩增, 特别是基于Eberwine法^[4-7]的扩增, 由于使用的是噬菌体的T7强启动子, 所以认为对真核生物的mRNA序列没有偏好, 扩增出的RNA能够很好地保持mRNA的分布, 因此许多扩增方法都是以该法为标准来评估其效率的。比较不同的RNA扩增方法, 尤其是在评估这些方法本身所能引起误差的可能性方面, 发展一些更有效率的、重复性和可靠性高的

转录扩增方法, 将有益于分子医学、分子诊断和功能基因组学的发展。

根据文献报道, Van Gelder等^[4-7]发明的IVT扩增RNA方法在第一次逆转录循环后, 最大能达到200倍的扩增量, 在第二次逆转录循环后, 能达到最大 10^4 倍的扩增量。在本次实验中, 皮层组织经IVT方法一轮扩增后, 最大能达到约60倍的扩增量, 扩增效率远低于Van Gelder的实验结果, 我们认为扩增效率除了与实验误差有关系外, 还可能与其他因素有关。Clément-Ziza等^[10]认为建立在T7 RNA聚合酶基础上的IVT扩增效率与mRNA的3'端存在关系, 但未对这种关系进行明确和具体的描述。Clément-Ziza等还通过芯片杂交分析, 比较4种商业化扩增试剂盒的优缺点, 他们初步认为WT-Amplification™试剂盒最适合于微量RNA的扩增, 可以从pg数量级总RNA扩增产生足够的RNA, 用于后续芯片杂交分析, 但该研究没有进行定量PCR分析^[10]。针对扩增效率与Van Gelder实验结果的差异以及WT-Amplification™试剂盒尚欠缺的定量实验来验证结果等问题, 进行了本次研究, 利用两种商品化试剂盒(IVT和WT-ovation)对RNA进行线性扩增后进行定量PCR实验, 分析比较两种不同方法的扩增效率, 寻找高效率的扩增方法。

我们选择不同来源的材料(小鼠大脑全皮层及LCM捕获第五皮层细胞的RNA), 分别进行IVT扩增和WT-ovation扩增后, 做定量PCR反应, 对大量基因做统计分析, 寻找扩增效率与引物距离mRNA 3'端具体的相关性及其他相关因素。在本研究中, 我们采用LCM技术在体分离小鼠大脑单一第五皮层的细胞, 但由于LCM来源的细胞量太少, 提取的RNA无法直接进行后续实验如定量PCR分析等, 故需进行RNA扩增后再进行分析。结果显示: 不管材料来源于全皮层组织、还是激光显微捕获的单一类型细胞, IVT扩增后D-Ct与引物距离mRNA 3'端的长度和mRNA长度均存在正线性相关, 即引物距离mRNA 3'端越近、mRNA长度越短, D-Ct值越小, 检测到的基因相对表达量越高。对于检测到的基因相对表达量与引物距离3'端的距离存在正线性相关的原因, 我们推测真核生物的mRNA 3'端大都有Poly-A尾巴, 合成第一链cDNA时, IVT方法用Oligo dT引物, Oligo dT引物与Poly-A尾巴之间碱基互补配对, 目标基因的引物设计越靠近3'端, Oligo dT的效率越

高; 而WT-ovation方法用Oligo dT引物和随机引物, 随机引物可使目标基因的引物设计在mRNA的任何位置。检测到的基因相对表达量与mRNA模板长度相关, 这可能与扩增过程中的聚合酶有关, IVT方法使用的是T7 RNA聚合酶, 该酶在扩增过程中会从长模板上脱落, 只能扩增短片段的RNA; WT-ovation方法用的是DNA聚合酶, DNA聚合酶可与长模板牢固结合, 故可以扩增长片段的DNA。所以用IVT方法扩增微量RNA时, 引物必须设计在靠近mRNA 3'端的位置, 并且扩增的mRNA模板长度须较短; 而WT-ovation扩增时的引物可以在任何位置设计, 并且对mRNA模板长度没要求。

本研究发现经过WT-ovation扩增的RNA量多于IVT的RNA扩增量, 我们得出WT-ovation扩增方法的优点: (1)效率高: 约为IVT方法的2.8倍; (2)简便、快速: WT-ovation扩增用时约5小时, IVT扩增用时约2天; (3)WT-ovation方法中扩增出的DNA-DNA产物比IVT方法得到的aRNA产物更高效、稳定^[11,12]。但WT-ovation方法也存在不足之处: (1)商品化的WT-ovation试剂盒价格昂贵, 成本较高; (2)WT-ovation扩增过程中, 为防止沉淀污染cDNA, 吸取上清cDNA溶液时, 会丢弃较多含cDNA溶液的上清, 造成cDNA量损失。

随着RNA扩增技术的发展, 联合LCM技术、膜片钳技术等, WT-ovation扩增方法已被越来越多地应用于神经元分析。Watson等^[13]用线虫大脑神经元做芯片分析, 发现WT-ovation扩增样品的Present数目明显多于IVT扩增, 他们认为Affymetrix芯片中WT-ovation扩增后样品敏感度低、特异性好。Telfeian等^[14]用膜片钳技术和WT-ovation RNA扩增技术, 发现海马锥体神经元和中间神经元内, GABA及其代谢酶、谷氨酸受体亚单位基因在表达上存在差异, 为癫痫的治疗提供了一定的指导意义。我们推测, 大脑及其他组织中单一类型的细胞都可采用本研究中使用的方法或经过适当的改进, 进行基因表达分析。

参考文献(References)

- 1 Richmond T, Somerville S. Chasing the dream: Plant EST microarrays. *Curr Opin Plant Biol* 2000; 3(2): 108-16.
- 2 Aharoni A, Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol Biol* 2001; 48(1-2): 99-118.
- 3 Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 21(1 Suppl):

- 10-4.
- 4 Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(5): 1663-7.
 - 5 Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, *et al.* Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(7): 3010-4.
 - 6 Hillips J, Eberwine JH. Antisense RNA amplification: a linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. *Methods* 1996; 10(3): 283-8.
 - 7 Eberwine J. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Bio-techniques* 1996; 20(4): 584-91.
 - 8 李轶女, 胡英考, 张志芳, 沈桂芳. RNA扩增的研究进展. *遗传* 2007; 29(8): 907-14.
 - 9 Iscove NN, Barbara M, Gu M, Gibson M, Modi C, Winegarden N. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol* 2002; 20(9): 940-3.
 - 10 Clément-Ziza M, Gentien D, Lyonnet S, Thiery JP, Besmond C, Decraene C. Evaluation of methods for amplification of picogram amounts of total RNA for whole genome expression profiling. *BMC Genomics* 2009; 10(3): 246.
 - 11 Levy WB, Steward O. Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience* 1983; 8(4): 791-7.
 - 12 Job C, Eberwine J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(12): 889-98.
 - 13 Watson JD, Wang S, Von Stetina SE, Spencer WC, Levy S, Dexeheimer PJ, *et al.* Complementary RNA amplification methods enhance microarray identification of transcripts expressed in the *C. elegans* nervous system. *BMC Genomics* 2008; 9: 84.
 - 14 Telfeian AE, Tseng HC, Baybis M, Crino PB, Dichter MA. Differential expression of GABA and glutamate-receptor subunits and enzymes involved in GABA metabolism between electrophysiologically identified hippocampal CA1 pyramidal cells and interneurons. *Epilepsia* 2003; 44(2): 143-9.

Comparison of Two Different Amplification Methods for Small Amounts of Total RNA

Lin-Hua Chen*, Yue-E Zhao, Xiao-Yan Chen, Ying Gao

(School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract Two RNA amplification methods of *in vitro* transcription (IVT) and single primer amplification (WT-ovation) were compared to find a more efficient method for amplification of small amounts of total RNA. RNA was extracted from mouse cerebral cortex tissue or the layer V of cortical cortex, and then was amplified separately with the two different methods. After cDNA was reverse transcribed from the amplified RNA, real-time quantitative PCR was performed. The efficiency of RNA amplification was determined according to the results of real-time PCR. Our results indicated that WT-ovation amplification was about 2.8 times more efficient than IVT amplification. The value of D-Ct was positively correlated with both the primer length from the 3' terminus of mRNA ($P < 0.05$) and mRNA length ($P < 0.05$) after IVT amplification. The nearer distance between primer and the 3' terminus of mRNA and the shorter mRNA could result in lower value of D-Ct. But there was no significant correlation between the value of D-Ct and the primer position or mRNA length when the amplification method of WT-ovation was performed. Compared with IVT, WT-ovation was a more stable method which was more efficient and less affected by amplification factors.

Key words RNA amplification; IVT; WT-ovation; quantitative PCR

Received: December 22, 2010 Accepted: January 20, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970924), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2100855) and Scientific Research Start Fund of the Affiliated Eye Hospital of Wenzhou Medical College (No. KYQD090701)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88067935, E-mail: chenlinhua14159@yahoo.com.cn