

毛细管电泳测定 micro RNA346 基因多态性的方法研究*

任冬霞¹, 曹一凡¹, 孙成均^{1,2}, 周琛¹, 王丽梅¹, 李永新^{1,2△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041);

2. 四川省食品安全监测与风险评估重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 建立 micro RNA346 基因多态性的毛细管电泳(CE)测定方法。方法 采用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取血清样品基因组 DNA, PCR 扩增 micro RNA346 目的基因, BciT130 I 限制性内切酶酶切, 产物用 CE 测定。对 CE 筛分介质质量浓度、分离电压等参数进行了优化。在优化的条件下(筛分介质质量浓度为 10 g/L 分离电压为 12 kV), 分别测定类风湿性关节炎患者和正常人血清样品 micro RNA346 酶切产物, 并对其进行基因分型。结果 在优化的 CE 实验条件下(筛分介质质量浓度为 10 g/L, 分离电压为 12 kV, 25 min 内可完成 micro RNA346 基因酶切产物检测。方法日内相对标准偏差(RSD)为 0.43%~0.63%, 日间 RSD 为 1.49%~1.56%。用该法测定了 96 份类风湿性关节炎患者样品和 43 份正常人样品, 结果均为 micro RNA346 I 型, 未发现 micro RNA346 II 型。结论 本研究建立的方法操作简单, 具有高效、快速、样品用量少、自动化程度高等优点, 适用于 micro RNA 类小分子 RNA 基因多态性的测定。

【关键词】 毛细管电泳法 基因多态性 micro RNA346 类风湿性关节炎

The Detection of Micro RNA346 Gene Polymorphism by Capillary Electrophoresis REN Dong-xia¹, CAO Yi-fan¹, SUN Cheng-jun^{1,2}, ZHOU Chen¹, WANG Li-mei¹, LI Yong-xin^{1,2△}. 1. Department of Laboratory Science in Public Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Risk Assessment of Sichuan, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lyxlee2008@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To develop a method for the detection of micro RNA346 gene polymorphism by capillary electrophoresis (CE). **Methods** The genome DNA was extracted with the kit of blood/cell/tissue genome DNA extraction, then micro RNA346 gene was amplified by PCR, digested by BciT130 I restriction enzyme and detected by CE. The conditions for CE separation were optimized. Samples from rheumatoid arthritis patients and healthy persons were detected under the optimal conditions. **Results** Under the optimized experimental conditions of CE (sieving medium mass concentration was 10 g/L and the separation voltage was 12 kV), the detection of the digested products of microRNA346 gene could be completed within 25 min. The intra-day relative standard deviation (RSD) of the method was 0.43%-0.63% and inter-day RSD was 1.49%-1.56%. Samples from 96 rheumatoid arthritis patients and 43 healthy persons were analyzed by the proposed method. The results showed that only micro RNA346 I type was detected but micro RNA346 II type wasn't. **Conclusion** This method is easy to operate, and has the advantages of high efficiency, fast speed, less sample consumption and high automation level. This method is suitable for the determination of RNA gene polymorphism of mirco RNA.

【Key words】 Capillary electrophoresis (CE) Gene polymorphism Micro RNA346 Rheumatoid arthritis

微核糖核酸(micro RNA)是一类由内源性基因编码的非编码单链小 RNA 分子, 可以参与免疫系统的调控, 与多种炎性和自身免疫性疾病的发病有关^[1-2]。有研究表明, micro RNA346 可能有助于类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的炎症反应微调: 其可通过间接抑制脂多糖(LPS)来间接

调节白介素-18 的释放^[3]。而白介素-18 是 RA 疾病发病的重要因子之一^[4-6]。虽然 micro RNA346 与 RA 的关联已有研究, 但鲜有从基因层面分析的报道, 因此探究 RA 与 micro RNA346 基因多态性之间的关系对了解 RA 的发病机制及针对性治疗具有实际意义。

目前基因多态性常用的分析方法主要有: 单链构象多态性分析(single strand conformation polymorphism analysis, SSCP), 其检测灵敏度高,

* 大学生创新创业训练计划项目(No. 201610610150)资助

△ 通信作者, E-mail: lyxlee2008@hotmail.com

但是所需时间长,效率低,多用于基因点突变检测^[7];限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析,该法采用琼脂糖凝胶电泳检测酶切后的片段,存在分析周期长、肉眼观察条带敏感度低、样品消耗量大(至少 5 μL)等缺点^[8];多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-DNA 测序法特异性好、准确度高,但是克隆和测序操作过于繁琐、费时费力^[9]。

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型电泳与色谱相结合的分选分析技术,具有高效、快速、灵敏、样品用量少(纳升级)、分离模式多等特点^[10-12]。CE 与高灵敏的激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)检测技术相结合,在基因多态性研究方面显示出独特的优越性。本研究采用 CE 建立 micro RNA346 基因多态性的测定方法,并将其用于 96 份 RA 患者血清样品和 43 份正常人血清样品检测,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

P/ACE™ MDQ 型毛细管电泳仪(美国贝克曼公司,美国 Sciex 生产),配有 LIF 检测器(488 nm 激光模块);石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂,总长度 50 cm,有效长度 42 cm,内径 75 μm ,其内表面的聚丙烯酰胺化学键合涂层由本实验室完成);凝胶成像系统、PCR 仪、PowerPac 系列电泳仪(BIO-RAD, 美国)。

TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)[天根生化科技(北京)有限公司]; TaKaRa Clontech premix Taq™ Version 2.0 试剂(TaKaRa, 日本);引物 miR-346-R/miR-346-F[生工生物工程(上海)股份有限公司]; TaKaRa Clontech BciT130 I (*EcoR* II, *Mva* I)限制性内切酶(TaKaRa, 日本); Thermo Scientific Fast ruler Ultra Low Range DNA ladder (Thermo Scientific, 美国); Solarbio Gold View (GV) I 型核酸染色剂(北京索莱宝科技有限公司); SYBR Gold (SG) 核酸荧光染料(美国 Life Technologis 公司);甲基纤维素(methyl cellulose, MC, 美国 Sigma 公司);琼脂糖(100 g, Biowest, 西班牙)。

限制性内切酶、引物 miR-346-R/miR-346-F、DNA marker、SG 核酸染料(避光)、premix 染料均

需分装后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;GV 染料、MC 溶液均需置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2 研究对象

本研究选取 2015 年 12 月至 2016 年 3 月四川某医院新确诊的 RA 患者 96 例为病例组,平均年龄(57.13 ± 14.51)岁,均符合 2010 年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)^[13]诊断标准;对照组选取同院类风湿因子(RF)阴性,无相关症状,因骨折或其他非相关疾病入院者 43 例,平均年龄(60.12 ± 16.07)岁。研究对象之间均无相近的血缘关系。

1.3 实验方法

1.3.1 血清中基因组 DNA 提取 由研究对象所在医院按照临床采血的要求无菌抽取受试者肘静脉血 2 mL,用 EDTA 抗凝,而后取 300 μL 在样本采集当日按照基因组 DNA 提取试剂盒说明,通过酶裂解法和吸附介质纯化法对血液样品进行红细胞裂解和核酸纯化等,提取血清基因组 DNA,并将其保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.3.2 micro RNA346 基因 PCR 扩增 PCR 扩增体系:总体积为 50 μL ,包括 5 μL DNA 模板,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ,25 μL $2\times$ Premix 和 16 μL 蒸馏水。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s)共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 10 min。

琼脂糖凝胶电泳:制备 20 g/L 琼脂糖凝胶(含 GV 染料),上样后,采用 95 V 电压对 DNA marker 及 PCR 扩增产物进行电泳,凝胶成像系统观察结果。

1.3.3 BciT130 I 限制性内切酶酶切 酶切体系:总体积为 20 μL ,其中包括 1 μL 限制性内切酶(10 U/ μL),2 μL $10\times$ Buffer,10 μL PCR 产物和 7 μL 蒸馏水。酶切条件:盖温 45 $^{\circ}\text{C}$,孵育温度 37 $^{\circ}\text{C}$,孵育时间 12 h。

1.3.4 CE 测定 micro RNA346 基因多态性 用 0.01 mol/L H_3PO_4 溶液冲洗毛细管柱 3 min,而后充入 10 g/L MC 胶。在 5 kV 下,进样 4 s;在 12 kV 的分离电压条件下对样品进行电泳分析。分别对 96 份 RA 患者样品和 43 份正常人样品酶切产物进行 CE 分离测定,以迁移时间定性,与 DNA ladder 条带迁移时间比对记录样品基因型别。

2 结果与讨论

2.1 CE 分离条件优化

2.1.1 筛分介质质量浓度选择 本研究以 DNA ladder(条带分别为:10 bp、20 bp、50 bp、100 bp、200 bp)为研究对象,考察了不同 MC 质量浓度对分离的影响^[14]。由图 1 可见,在其他分离条件相同的情况下,MC 胶质量浓度为 6 g/L 时,ladder 中的 50 bp 和 100 bp 的 DNA 片段未能实现基线分离[分离度(R) <1.50];MC 胶质量浓度升高至 8 g/L 时,虽然 ladder 中的所有 DNA 片段均能得到基线分离($R>2.00$),分离度满足要求,但各峰出峰时间较接近;MC 胶质量浓度为 10 g/L 时,ladder 分离情况最好($R>2.00$),所有 DNA 片段均得到基线分离,且电泳在 23 min 内完成,分离效果较好,分离时间适中。因此,选择 10 g/L MC 作为 CE 筛分介质。

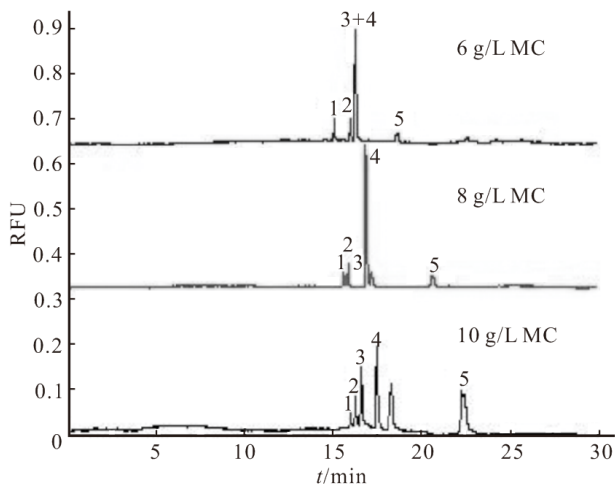


图 1 不同 MC 质量浓度下 DNA ladder 的分离情况比较

Fig 1 The separation effects of DNA ladder under different concentrations of MC

1-5: 10 bp, 20 bp, 50 bp, 100 bp, 200 bp, respectively

2.1.2 分离电压 固定 MC 质量浓度为 10 g/L,考察分离电压对 DNA ladder 分离效果的影响^[15]。由图 2、图 3 可见,在其他分离条件相同的情况下,电压为 14 kV 时,ladder 中 50 bp 与 100 bp 的分离情况不好,分离度比较低,若与 micro RNA346 基因 I 型样品(酶切产物 DNA 片段为 76 bp、97 bp 和 120 bp)出峰时间比对判定其型别时,易产生较大误差;电压为 12 kV 时 ladder 分离情况较好,所有 DNA 片段均能在 22 min 内得到基线分离;电压为 10 kV 时,ladder 条带分离情况最好,但完成分析所需时间过长。因此在 DNA ladder 各片段分离情况较好的前提下,选择分离电压为 12 kV,因其所需时间较短,且分离效果能满足要求。

2.2 CE 分离酶切产物结果

在优化的 CE 条件下检测 micro RNA346 目的

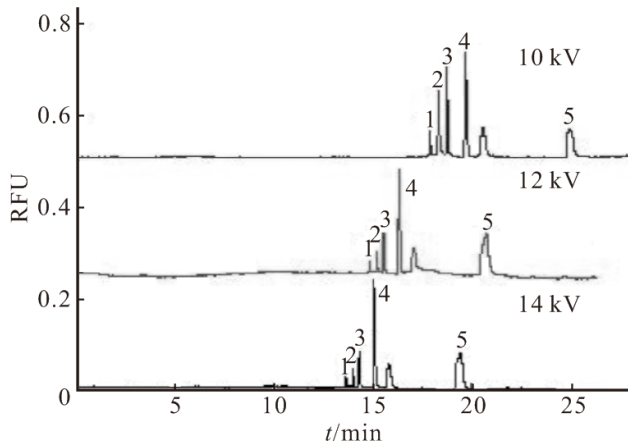


图 2 不同电压下 DNA ladder 的分离情况比较

Fig 2 The separation effects of DNA ladder under different separation voltages

1-5: 10 bp, 20 bp, 50 bp, 100 bp, 200 bp, respectively

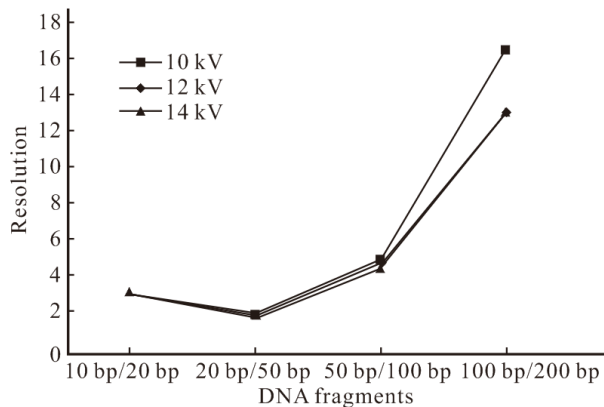


图 3 不同电压下 DNA ladder 的分离度

Fig 3 Resolutions of DNA ladder under different separation voltages

基因 PCR 产物酶切片段。图 4 为 DNA ladder 和 micro RNA346 基因 I 型毛细管电泳图谱。图中 DNA ladder(峰 1~5)各峰分离度均大于 3.79; micro RNA346 基因 I 型 3 个目的片段(峰 6~8)76 bp、97 bp 和 120 bp,在优化的实验条件下可达到较好分离(分离度均大于 3.59)。

本研究共测定 RA 患者血清样品 96 份,基因型别均为 I 型,正常人对照样品 43 份,基因型别均为 I 型,RA 病例样品和正常人对照样品均未发现 micro RNA346 基因 II 型样品,因此不能进一步分析 RA 与 micro RNA346 基因多态性之间的关系。考虑其原因可能与样本量不够大和采样范围较小有关(全部样品均来自于四川省某医院),也可能与酶切位点设计有关。

2.3 琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物结果

同时,采用 50 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 micro RNA346 目的基因酶切片段,与 CE 测定结果比对。micro RNA346 目的基因片段总长度为 293 bp,其

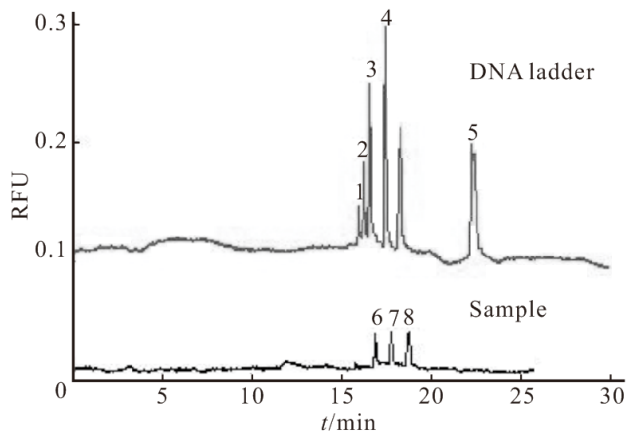


图 4 micro RNA346 基因 I 型毛细管电泳酶切图谱

Fig 4 Capillary electrophoresis of micro RNA346 I genotype

1-5: 10 bp, 20 bp, 50 bp, 100 bp, 200 bp, respectively; 6-8: 76 bp, 97 bp, 120 bp, respectively

酶切产物分为 I 型 (76 bp、97 bp、120 bp) 和 II 型 (76 bp、217 bp)。图 5 为 micro RNA346 基因 I 型及 DNA ladder 琼脂糖凝胶电泳图。可见，DNA ladder 条带分别为：10 bp (因电泳时间较长已不可见)、20 bp、50 bp、100 bp、200 bp；样品图谱中对应于 100 bp 附近附近的 3 个条带，为 micro RNA346

基因 I (76 bp/97 bp/120 bp)，50 bp 左右为引物二聚体条带。

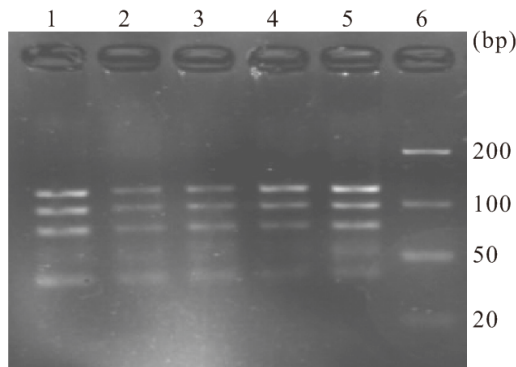


图 5 micro RNA346 基因 I 型琼脂糖凝胶电泳酶切图谱

Fig 5 Agarose gel electrophoresis of micro RNA346 I genotype

1-5: Micro RNA346 I gene; 6: DNA ladder

2.4 方法精密度实验

2.4.1 仪器精密度 在优化的实验条件下，将 DNA ladder 于同一日内连续 5 次进样、连续测定 5 日，计算日内相对标准偏差 (RSD) 和日间 RSD 以考察方法的重复性，结果显示 (表 1、表 2)，日内 RSD 为 0.34%~0.53%、日间 RSD 为 2.21%~

表 1 仪器的日内精密度

Table 1 Intra-day precision of DNA ladder

DNA ladder fragment	Migration time/min					RSD/%
	1 st measured	2 nd measured	3 rd measured	4 th measured	5 th measured	
10 bp	15.983	15.833	15.983	15.979	16.021	0.46
20 bp	16.300	16.129	16.288	16.288	16.337	0.50
50 bp	16.613	16.450	16.621	16.621	16.683	0.53
100 bp	17.529	17.371	17.483	17.479	17.563	0.42
200 bp	21.891	21.741	21.885	21.887	21.929	0.34

表 2 仪器的日间精密度

Table 2 Inter-day precision of DNA ladder

DNA ladder fragment	Migration time/min					RSD/%
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
10 bp	15.983	15.600	15.775	15.479	14.817	2.22
20 bp	16.300	15.900	16.087	15.771	15.204	2.61
50 bp	16.613	16.196	16.400	16.075	15.542	2.50
100 bp	17.529	17.079	17.283	16.908	16.317	2.69
200 bp	21.891	21.573	21.712	21.825	20.725	2.21

2.69%，表明仪器稳定。

2.4.2 方法精密度 在优化的实验条件下，取 5 个平行样于同一日进行测定考察方法的日内 RSD；同时，连续测定 5 日，计算日间 RSD，结果显示 (表 3、表 4)，日内 RSD 为 0.43%~0.63%、日间 RSD 为 1.49%~1.56%，表明方法的重现性较好，样品的测定结果可靠。

本研究建立了 micro RNA346 基因多态性 CE 分析方法。采用试剂盒法提取 RA 患者与正常人血清样品基因组 DNA，经 PCR 扩增 micro RNA346 基因和 BciT130 I 限制性内切酶酶切，CE 分离测定酶切产物。方法简便快速，具有高效、快速、样品用量少、自动化程度高等优点，能满足分析要求，适用于 micro RNA 类小分子 RNA 基因多态性的测定。

表 3 方法的日内精密度

Table 3 Intra-day precision of digested products

Digested fragment	Migration time/min					RSD/%
	1 st measured	2 nd measured	3 rd measured	4 th measured	5 th measured	
76 bp	16.317	16.367	16.346	16.346	16.496	0.43
97 bp	16.783	16.838	16.817	16.808	17.004	0.52
120 bp	17.375	17.400	17.333	17.312	17.588	0.63

表 4 方法的日间精密度

Table 4 Inter-day precision of digested products

Digested fragment	Migration time/min					RSD/%
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
76 bp	16.996	17.021	16.496	17.083	17.108	1.49
97 bp	17.437	17.600	17.004	17.625	17.579	1.49
120 bp	17.925	18.196	17.588	18.308	18.088	1.56

因本研究未发现 micro RNA346 基因 II 型样品,所以未能进一步探究 RA 的发病是否与 micro RNA346 基因多态性有关。本研究不排除样本量不足影响了结果,因此在后续实验中可尝试扩大样本量进一步研究。

参 考 文 献

- [1] HE JH, LI YG. Function of microRNA-346 and its roles in human diseases. *Intern Chin Med Sci J*, 2012, 27(2): 127-128.
- [2] TSAI NP, LIN YL, WEI LN. MicroRNA miR-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J*, 2009, 424(3): 411-418.
- [3] ALSALEH G, SUFFERT G, SEMAAN N, *et al.* Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol*, 2009, 182(8): 5088-5097.
- [4] 于金三. 白介素 17、18 与类风湿关节炎的相关性研究. *中国基层医药*, 2008, 15(11): 1809-1810.
- [5] ROONEY T, BENITO M, FITZGERALD O, *et al.* Synovial tissue interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(11): 1393-1398.
- [6] JOOSTEN LA, SMEETS RL, KOENDERS ML. Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *Am J Pathol*, 2004, 165(3): 959-967.
- [7] 赵广荣, 郭晓静, 元英进, 等. 核酸单链构象多态性技术研究进展. *化工进展*, 2005, 24(4): 378-382.
- [8] 阮佳, 李永儒, 孙成均, 等. 毛细管电泳-激光诱导荧光法检测 HSP70-2 基因多态性研究. *分析试验室*, 2014, 33(10): 1135-1138.
- [9] 张瑛, 阮晓红. 分子生物学技术及其在环境样品微生物分析中的应用. *河海大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(3): 241-245.
- [10] BAN E, YOO YS, SONG EJ, *et al.* Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis. *Talanta*, 2015, 141: 15-20 [2017-01-18]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015001733?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.talanta.2015.03.020.
- [11] 李海华, 林树茂. 毛细管电泳在基因突变检测中的应用. *宁夏农林科技*, 2012, 53(4): 82-84.
- [12] 李全文, 王峻梅, 陈缙光. 毛细管电泳在核酸分析中的应用. *分子诊断与治疗杂志*, 2005, 17(2): 16-19.
- [13] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [14] 刘春叶, 张剑, 苗延青, 等. 脱氧核糖核酸的毛细管无胶筛分电泳迁移规律研究. *化学研究与应用*, 2011, 23(6): 761-766.
- [15] 俞娟, 丛辉, 施秀英, 等. 无胶筛分毛细管电泳法检测 DNA 的条件优化. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(12): 1466-1468.

(2017-08-31 收稿, 2017-12-10 修回)

编辑 余琳