



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107746886 B

(45)授权公告日 2019.10.01

(21)申请号 201710810621.X

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2017.09.11

审查员 郭玉洁

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107746886 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(73)专利权人 朱伟

地址 210029 江苏省南京市鼓楼区广州路
300号

(72)发明人 朱伟 周鑫 张澜 张获 黄泽波

朱明霞 王同杉 刘平

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 夏平 李晓峰

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

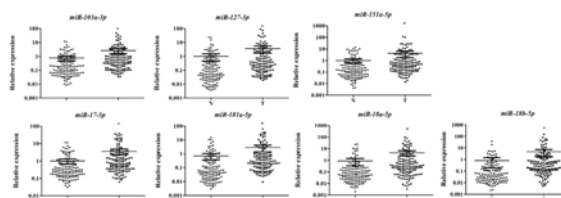
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物及其应用

(57)摘要

本发明公开一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物及其应用,该标志物为miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中的一种或多种。血浆miRNA作为新型的生物标志物,具有稳定性好、微创、易获取、灵敏性和特异性高的特点。这类分子标志物的开发利用将为包括肿瘤在内的各种疾病的诊断以及进一步治疗提供新的方向。本研究将更有针对性的得出具有临床诊断潜能的结直肠癌血浆miRNA标记物。研究证实了这组miRNA作为诊断结直肠癌的无创标记物的可靠性以及可重复性。



1. 定量检测血浆中miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p七种miRNA表达水平的试剂在制备结直肠癌辅助诊断试剂盒中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述的试剂盒中包含特异性扩增miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p七种miRNA的引物。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述的试剂盒中还包括逆转录酶,缓冲液,dNTPs,MgCl₂,DEPC 水,荧光探针,RNA 酶抑制剂,Taq酶。

一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程及肿瘤学领域,涉及一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物及其应用。

背景技术

[0002] 结直肠癌(Colorectal,CRC)是全球发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一。在中国,结直肠癌的死亡率仍居肿瘤第五位。在生存期方面,早期结直肠癌患者的五年生存率可以达到90%以上,而IV期患者只有略大于10%的生存率。目前,由于经济条件和人群接受水平,我国尚未能推广以肠镜为基础的早期结直肠癌筛查项目。而且由于肠镜检查依赖于检查者经验,且有一定的创伤风险,亦导致无法推广。目前临床应用最为广泛的肿瘤标志物,如癌胚抗原(CEA)和糖类抗原19-9(CA19-9),以及粪便隐血实验(FOBT)筛查结直肠癌,均缺乏一定的灵敏性和特异性。随着基因组学、蛋白组学以及代谢组学等生物技术的发展,越来越多的生物标志物已被发现或研究。因此,发现新的能够早期诊断结直肠癌的标记物指日可待,从而促进结直肠癌早期干预和治疗,延长病人的生存期。

[0003] 微小RNA(miRNAs)是一类长度在22个左右的核苷酸的小非编码RNA分子,其通过转录后调控广泛参与了各种生命活动过程,包括肿瘤的发生、侵袭及转移等。研究发现,miRNA的表达在肿瘤中有不同程度的上调和下调,为其能够作为一种新兴的肿瘤标志物奠定了基础。2008年,Mitchell在外周血中检测到游离的miRNA,发现其能够稳定存在于外周血中,并且可以作为诊断肿瘤的无创标志物。现已有研究证实了循环miRNA在胃癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤中的潜在诊断价值。但由于研究方法及纳入人群的差异,导致研究结果不完全一致。因此,本研究利用Exiqon miRNA qPCR panel芯片以及基于qRT-PCR的绝对定量法,通过对大样本的结直肠癌血浆的研究,旨在寻找对结直肠癌具有潜在诊断价值的血浆miRNA。并对这些miRNA在结直肠癌组织中以及外周血浆外泌体中的表达进行验证,以进一步明确其与结直肠癌的关系。若根据这类miRNA设计针对结直肠癌的诊断试剂盒,将会推动我国结直肠癌的诊治水平,也为将来对结直肠癌的进一步研究提供思路。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物。

[0005] 本发明的另一目的在于提供上述血浆miRNA标志物及其引物在制备结直肠癌辅助诊断试剂盒以及在制备治疗结直肠癌的药物中的应用。

[0006] 本发明的又一目的在于提供一种用于结直肠癌辅助诊断和治疗的试剂盒及药物。

[0007] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0008] 一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物,该标志物为miR-103a-3(AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA),miR-127-3p(UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU),miR-151a-5p(UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU),miR-17-5p(CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG),miR-181a-5p(AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU),miR-18a-5p(UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG和miR-18b-5p

(UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG)中的一种或多种。该血浆miRNA标志物优选为miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中两种或两种以上的组合,进一步优选为miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p七种miRNA所组成的组合。

[0009] 上述的血浆miRNA标志物在辅助诊断结直肠癌中的应用。

[0010] 上述的血浆miRNA标志物在制备结直肠癌辅助诊断试剂盒中的应用。

[0011] 上述的血浆miRNA标志物在制备治疗结直肠癌药物中的应用。

[0012] 一种与结直肠癌辅助诊断相关的血浆miRNA标志物的引物,该引物包含miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中的一种或多种miRNA的引物;优选为包含血浆miRNA中miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中两种或两种以上miRNA的引物;进一步优选为包含血浆miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p七种miRNA的引物。

[0013] 上述的引物在辅助诊断结直肠癌或制备结直肠癌辅助诊断试剂盒中的应用。

[0014] 一种结直肠癌辅助诊断试剂盒,该试剂盒中含有血浆miRNA中miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中的一种或多种miRNA的引物;优选为含有血浆miRNA中miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中两种或两种以上miRNA的引物;进一步优选为含有血浆miRNA中miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p七种miRNA的引物。

[0015] 该试剂盒中还包括PCR技术常用的试剂。如逆转录酶,缓冲液,dNTPs,MgCl₂,DEPC水和Taq酶等;还可以含有标准品和/或对照品。

[0016] 本发明所涉及的与结直肠癌诊断相关的血浆miRNA标志物miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p中的每种miRNA的序列均已公开,但是将各miRNA标志物进行组合作为结直肠癌辅助诊断标志物需要本领域技术人员付出创造性劳动。各miRNA标志物的扩增引物均可通过市场购买获得,本发明实施例中使用的血浆miRNA标志物的引物为购自广州锐博公司所合成生产的特异性miRNA茎环RT-PCR引物。

[0017] 具体地说,本发明解决问题的技术方案包括:(1)建立统一标准的标本库和数据库:以标准操作程序(SOP)采集符合标准的血液样本,系统收集完整的人口学资料和临床资料。(2)血浆miRNA差异表达谱分析:分析结直肠癌和正常对照人群中差异表达的血浆miRNA,并对差异表达miRNAs进行进一步大样本多阶段验证。(3)通过多阶段的验证,明确这些miRNA诊断结直肠癌的能力。(4)血浆miRNA诊断试剂盒的研制:根据结直肠癌患者与正常人群血浆中的差异表达miRNA开发miRNAs诊断试剂盒,实现对结直肠癌患者的无创辅助诊断。(4)分析这些miRNA在结直肠癌组织以及外泌体中的表达情况,揭示这些miRNA与结直肠癌的关系,为将来研制可能与这些miRNA相关的治疗结直肠癌的药物提供依据。

[0018] 本发明人以标准操作程序(SOP)采集符合标准的血液样本,系统收集完整的人口学资料、临床资料,并采用了Exiqon miRNA qPCR panel芯片以及qRT-PCR方法等。

[0019] 具体来说研究的实验方法主要包括以下几个部分:

[0020] 1. 研究样本选择: 初治、未行手术以及放化疗干预且经病理确认为结直肠癌的患者。正常对照为在医院进行体检的正常人群。

[0021] 2. Exiqon miRNA qPCR panel 芯片初筛: 利用TRIZOL-LS试剂对血浆混合样本进行RNA提取, 并进行qRT-PCR操作获得初筛结果。

[0022] 3. 训练集、测试集和额外验证集: 利用AM1556试剂盒 (ABI公司) 对每个血浆样本进行RNA提取, 通过逆转录反应得到cDNA样品, 加入PCR引物和SYBR Green 荧光染料进行PCR反应。通过比对标准品的Ct值, 得出样本中的miRNA含量。

[0023] 4. 利用AM1975试剂盒 (ABI公司) 提取结直肠癌和癌旁组织中的RNA, ExoQuick试剂盒 (SBI公司) 和AM1556试剂盒 (ABI公司) 提取外泌体中的RNA, 通过qRT-PCR的方法, 检测miRNA在组织以及外泌体中的表达差异。

[0024] 5. 统计分析: 运用 χ^2 检验、配对t检验以及非参数秩和检验比较miRNA表达水平在不同研究组中的差异。通过计算ROC曲线分析证实血浆miRNA的诊断价值。

[0025] 本发明研究组目前通过对结直肠癌病人的外周血浆中的miRNA进行系统的表达分析, 现已发现了一组7个具有临床诊断潜能的结直肠癌血浆microRNA标记物 (miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p)。

[0026] 本发明的有益效果:

[0027] 1. 相较于传统的肿瘤标志物, 血浆miRNA作为新型的生物标志物, 具有稳定性好、微创、易获取、灵敏性和特异性高的特点。这类分子标志物的开发利用将为包括肿瘤在内的各种疾病的诊断以及进一步治疗提供新的方向。

[0028] 2. 研究者通过Exiqon miRNA qPCR panel 芯片以及基于qRT-PCR的绝对定量法, 对结直肠癌和正常对照人群血浆中的差异表达miRNA进行严密、多阶段的验证和评价。证实了这组miRNA作为诊断结直肠癌的无创标记物的可靠性以及可重复性。

[0029] 3. 研究者发现miR-17-5p和miR-151a-5p在结直肠癌组织中的表达也与血浆中表达一致, 显示了这组miRNA与结直肠癌之间的紧密关系。同时miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p在血浆外泌体中的表达也是高于正常对照的。这些结果将给未来研究这些miRNA对于结直肠癌的机制以及针对这些miRNA对于结直肠癌的治疗提供新的思路。

附图说明

[0030] 图1: 实验流程图

[0031] 图2: 在结直肠癌血浆中高表达的7个miRNA

[0032] 图3: 对所获得的miRNA进行ROC曲线分析。

[0033] A: 训练集与测试集的合集; B: 训练集; C: 测试集。D: 额外验证集

[0034] 图4: 7个miRNA在结直肠癌组织中的表达情况

[0035] 图5: 7个miRNA在结直肠癌患者血浆外泌体中的表达情况

具体实施方式

[0036] 发明人于2013年至2015年从南京医科大学第一附属医院收集了大量的结直肠癌患者和正常体检人群的静脉血浆样品, 通过对样品资料的整理, 从中选择了139例结直肠癌和132例正常对照的样本作为Exiqon miRNA qPCR panel 芯片初筛和后续一系列qRT-PCR验

证的实验样品。同时还留取了24例结直肠癌组织和24例癌旁组织。所选择的患者血浆样本均来自于初治、未行手术以及放化疗干预且经病理确认为结直肠癌的病人。并系统采集了这些样本的人口学资料、临床资料。

[0037] 参照流程图(图1),从结直肠癌以及正常对照血浆样本中随机选择了30例结直肠癌样本以及10例正常对照,并且分别混合成了3例结直肠癌血浆混合样本和1个正常混合样本(一个混合样本由10例200u1血浆样本汇合形成2ml的样本)。对这4例混合样本进行Exiqon miRNA qPCR panel芯片初筛和分析,具体步骤参照Exiqon miRNA qPCR panel芯片的说明书:

[0038] 1. 血浆抽提

[0039] 取出血浆样品,样品化冻后3000x g离心5min去除一些碎片及一些不溶成分。转移上清至新的1.5ml管中,加入750u1 TRIZOL-LS后,剧烈震荡5s。

[0040] 2. 两相分离

[0041] 匀浆后样品于15到30℃孵育5分钟。每1ml的TRIZOL-LS试剂匀浆的样品中加入0.2ml的氯仿,盖紧管盖。手动剧烈振荡管体15秒后,15到30℃孵育2到3分钟。4℃下13,000g离心15分钟。

[0042] 3. RNA沉淀

[0043] 将水相转移到新离心管中。水相与异丙醇混合以沉淀其中的RNA,加入异丙醇的量为:1ml TRIZOL-LS试剂匀浆的样品中加0.5ml的异丙醇和5u1的糖元。4℃静置半小时,让RNA尽可能的析出。于4℃13,000g离心15分钟。

[0044] 4. RNA清洗

[0045] 移去上清液,每1ml TRIZOL-LS试剂匀浆的样品中加入至少1ml的75% (v/v) 乙醇,清洗RNA沉淀。静置10分钟,然后4℃下10000g离心5分钟。

[0046] 5. 重新溶解RNA沉淀

[0047] 去除乙醇溶液,空气中干燥RNA沉淀5-10分钟,加入无RNA酶的水用枪反复吹打几次,然后55到60℃孵育10分钟。

[0048] 6. 测量浓度:

[0049] 通常能得到~5μg RNA/50ml血浆。

[0050] 7. cDNA合成

[0051] (1) 稀释模板RNA:使用DEPC水将20-25ng模板RNA稀释至14u1 (终浓度为1.492-1.786ng/μl)。

[0052] (2) 准备反应液:将5×Reaction Buffer以及DEPC水置于冰上溶解,并震荡混匀。Enzyme mix置于-20℃冰盒,使用前轻弹混匀后置于冰上。所有试剂均离心后使用。

[0053] (3) 配置反应液:配置下表中的反应液

[0054]

试剂	体积 (μl)	终浓度
5X Reaction buffer	4	1×
Enzyme mix	2	1×
总 RNA 模板 (稀释后)	14	20-25ng
总体积	20	

[0055] (4) 混合并离心试剂:震荡或者抽吸混匀反应液后离心,以保证所有溶液彻底混合均匀。

[0056] (5) 逆转录反应及热失活:将反应液于42℃温育60分钟后,于95℃温育5分钟以失活逆转录酶。

[0057] 8.Real-Time PCR

[0058] 试剂:

[0059] Nuclease free water (Exiqon)

[0060] SYBR™Green master mix (Exiqon)

[0061] cDNA模板

[0062] ROX (Invitrogen)

[0063] miRNA PCR ARRAY (Exiqon)

[0064] 仪器:

[0065] ABI PRISM7900system (Applied Biosystems)

[0066] (1) 准备Real-time PCR试剂:将制备的cDNA模板,DEPC水和SYBR™Green master mix置于冰上溶解15-20分钟。

[0067] (2) 稀释cDNA模板:将RT反应获得的cDNA模板用nuclease free water稀释110倍(例如,向20μl反应液中加入2180ul nuclease free water)。

[0068] (3) 混合所有反应试剂:

[0069] A. 将PCR板简单离心后,移去封膜。

[0070] B. 将110倍稀释的cDNA模板与2×SYBR Green master mix按照1:1体积混合。

[0071] C. 倒置混匀反应液并离心

[0072] D. 将混合反应液加入板中的每个孔

[0073] E. 重新封好PCR板

[0074] (4) 将PCR板简单低温离心

[0075] (5) Real-time PCR扩增:根据下表中的反应条件进行Real-time PCR扩增和溶解曲线分析。

[0076] Real-time PCR循环条件如下表:

[0077]

步骤	设置
聚合酶激活/变性	95℃, 10 分钟
扩增 40 个循环	95℃, 10 秒
	60℃, 1 分钟, 降温速度 1.6℃/秒*
	读值

溶解曲线分析**

[0078] 数据分析:采用 $\Delta \Delta C_t$ 方法

[0079] 使用PCR仪器附带的软件进行初步数据分析,获得原始的Cq值(Cp或Ct,依仪器不同名称可能不同)。

[0080] 我们建议使用GenEx qPCR分析软件 (www.exiqon.com/mirna-pcr-analysis) 对数据进行标准和深入的数据分析。

[0081] a. 计算每个处理组中的每个通路相关基因的 ΔCt 。

[0082] $\Delta Ct(\text{group } 1) = \text{average Ct} - \text{average of HK genes' Ct for group 1 array}$

[0083] $\Delta Ct(\text{group } 2) = \text{average Ct} - \text{average of HK genes' Ct for group 2 array}$

[0084] b. 计算2个PCR Array (或两组) 中每个基因的 $\Delta \Delta Ct$ 。

[0085] $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{组}2) - \Delta Ct(\text{组}1)$

[0086] 备注:通常组1是对照,组2是实验组。

[0087] c. 通过 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 计算组2与组1对应基因的表达差异。

[0088] 在芯片初筛后,得到了如下表中的44个差异表达miRNA (3个结直肠癌血浆混合样本中相对于正常样本都超过了1.5倍差异)。

[0089]

MiRNA	倍数差异 (Fold change)			Mean fold
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	
hsa-let-7f-5p	3.216472454	1.932496766	3.048855974	2.732608398
hsa-miR-103a-3p	2.695534423	2.668335364	2.584046443	2.64930541
hsa-miR-107	2.438891087	2.163411343	3.416750731	2.67301772
hsa-miR-127-3p	1.641737533	1.771466275	1.638425416	1.683876408
hsa-miR-133a	2.003258364	3.566359158	3.238500574	2.936039365
hsa-miR-136-5p	9.154957572	7.2489071	5.046871427	7.150245367
hsa-miR-139-5p	2.806654542	2.890956031	3.959455373	3.219021982
hsa-miR-140-5p	1.799279734	2.525108711	3.393568183	2.572652209
hsa-miR-148a-3p	2.390861403	2.025657599	2.227879186	2.214799396
hsa-miR-151a-5p	5.463136613	4.108767416	2.136940887	3.902948305

[0090]

hsa-miR-17-5p	2.321930033	6.162867042	1.689682287	3.391493121
hsa-miR-181a-5p	2.060656735	3.250217655	2.350725367	2.553866586
hsa-miR-18a-5p	7.017511388	2.096609965	3.143140291	4.085753881
hsa-miR-18b-5p	5.546687706	1.806649322	3.023221464	3.458852831
hsa-miR-191-5p	4.840749704	4.036983434	2.878876699	3.918869945
hsa-miR-19a-3p	3.657663867	1.636331066	1.650408321	2.314801085
hsa-miR-20a-3p	7.769757114	4.54972706	9.910246896	7.409910356
hsa-miR-223-3p	7.056053502	2.416326654	4.385248707	4.619209621
hsa-miR-23a-3p	4.019453889	2.746807231	1.952123057	2.906128059
hsa-miR-26a-5p	2.543218648	2.34801778	2.836753907	2.575996778
hsa-miR-27a-3p	3.33916064	5.703520375	2.475014539	3.839231851
hsa-miR-28-3p	8.814871264	2.296292622	3.075293276	4.728819054
hsa-miR-29a-5p	2.236339932	2.501455001	8.520416767	4.4194039
hsa-miR-28-5p	3.318334218	6.414924712	7.342007899	5.69175561
hsa-miR-223-5p	2.821592214	4.049356046	3.6541301	3.508359454
hsa-miR-331-3p	4.537043525	3.792135898	2.991752853	3.773644092
hsa-miR-338-3p	1.949766013	2.692877308	1.851447533	2.164696952
hsa-miR-339-5p	3.177881877	3.305930358	3.361785479	3.281865904
hsa-miR-374a-5p	1.69866481	4.762511248	2.060475772	2.84055061
hsa-miR-374b-5p	7.680618542	5.568530527	4.129230631	5.792793233
hsa-miR-421	3.402658817	2.458084765	2.48875463	2.783166071
hsa-miR-425-5p	7.009363776	1.783411345	3.019079332	3.937284818
hsa-miR-505-3p	2.193551381	1.824488849	2.140016618	2.052685616
hsa-miR-652-3p	5.415762601	4.615601488	2.473443594	4.168269228
hsa-miR-1-3p	1.936548321	2.241069411	3.522080784	2.566566172
hsa-miR-122-5p	-7.848945271	-12.5247306	-8.053204672	-9.475626847
hsa-miR-125b-5p	-2.187678395	-2.93739714	-2.294517802	-2.473197779
hsa-miR-205-5p	-4.811746039	-4.020446318	-9.198910491	-6.010367616
hsa-miR-346	-6.735399409	-3.75816133	-2.501852958	-4.331804566
hsa-miR-885-5p	-3.105155821	-6.50907859	-3.450678347	-4.354970919
hsa-miR-92a-3p	-1.696700197	-2.770185013	-2.310219608	-2.25903494
hsa-miR-143-5p	reported			
hsa-miR-378-5p	reported			
hsa-miR-21-5p	reported			

[0091] 对于初筛得到的44个差异表达miRNA (35个高表达的miRNA,6个低表达的miRNA以及3个以往文献报道过差异表达的miRNA),通过训练集、测试集和额外验证集,采用基于qRT-PCR的绝对定量法进行验证,具体步骤为:

[0092] 1. 血浆RNA提取:选用ABI公司血浆RNA提取试剂盒(AM1556),参照试剂盒说明,每个样本吸取200u1进行提取RNA,并最后用100u1 DEPC水进行溶解。

[0093] 2. cDNA的制备:

[0094] 1) 采用50μL反应体系进行逆转录实验

[0095]

反应物	50 μ L 逆转录反应体系 (μ L)
RNA 模板或者标准品 (2 μ g)	15
特异 RT 引物 (锐博, 500nM)	4

[0096] 以上反应体系混匀,瞬时离心后,以下列程序进行反应:

[0097]

步骤时间	温度
10min	70 $^{\circ}$ C
2min	4 $^{\circ}$ C

[0098] 2) 上述反应之后向反应体系中再加入如下反应物

[0099]

反应物	50 μ L RT 反应体系 (μ L)
缓冲液 (Promega)	10
dNTPs Mixture (Takara)	4
RNA 酶抑制剂, 40U/ μ L (Takara)	1
逆转录酶, 200 U/ μ L (Promega)	1
DEPC 水	15

[0100] 3. qPCR

[0101] 1) 采用5 μ L反应体系,按以下比例进行试验

[0102]

反应物	5 μ L 反应体系 (μ L)
SYBR Green 荧光染料 (Takara)	2.25
cDNA	0.5
PCR 前引物工作液 (锐博)	0.5
PCR 后引物工作液 (锐博)	0.5
DEPC 水	1.25

[0103] 反应体系混匀,瞬时离心后,放置于实时定量PCR仪中,以下列程序进行反应:

[0104]

循环	温度 $^{\circ}$ C	时间 sec
1	95	20
40	95	10
	60	20

[0105]

	70	10
--	----	----

[0106] 反应结束后添加溶解曲线。

[0107] 数据分析:通过比对不同浓度的标准品的Ct值,汇成标准曲线后可以计算获得每个样本中的miRNA的绝对浓度。利用SPSS 16.0软件进行统计分析,得到了一组在训练集、测试集和额外验证集中结直肠癌血浆中均一致高表达的7个miRNA:miR-103a-3p、miR-127-3p、miR-151a-5p、miR-17-5p、miR-181a-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p(在训练集、测试集和验证集中P值都小于0.05,图2)。通过这7个miRNA,可以计算每个样本的ROC曲线。如图3,这7个miRNA组成的分子标志物能够很好的区分结直肠癌患者和正常人群。

[0108] 研究组之后进一步检测了这7个miRNA在结直肠癌组织以及血浆中外泌体的表达,结直肠癌组织提取RNA利用AM1975试剂盒(ABI公司),外泌体提取试剂盒为ExoQuick试剂盒(SBI公司)。200ul血浆所提取出的外泌体用200ul DEPC水重悬后,利用AM1556试剂盒(ABI公司)对外泌体RNA进行提取,步骤同血浆RNA提取过程。

[0109] 运用非参数检验分析发现,miR-17-5p和miR-151a-5p在结直肠癌组织中的表达要高于癌旁组织(图4)。miR-181a-5p、miR-17-5p、miR-18a-5p和miR-18b-5p在结直肠癌血浆外泌体中的表达亦明显高于正常人群(图5)。

[0110] 试剂盒包括一批血浆miRNA qRT-PCR引物,还可以有相应PCR技术所需的常用试剂,如:逆转录酶,缓冲液,dNTPs,MgCl₂,DEPC水,荧光探针,RNA酶抑制剂,Taq酶等,可根据具体采用的实验方法选用,这些常用试剂都是本领域技术人员熟知的,另外还可以有标准品和对照(如定量标化的正常人样本等)。此试剂盒的价值在于只需要血浆而不需要其它组织样品,通过最精简的荧光法检测血浆样本中miRNA的表达含量,来辅助诊断该样本来源患者的罹患结直肠癌的可能性。血浆miRNA检测方便,且定量精确,大大提高疾病诊断的敏感性和特异性,因此将此试剂盒投入实践,可以帮助指导诊断以及进一步的个体化治疗。

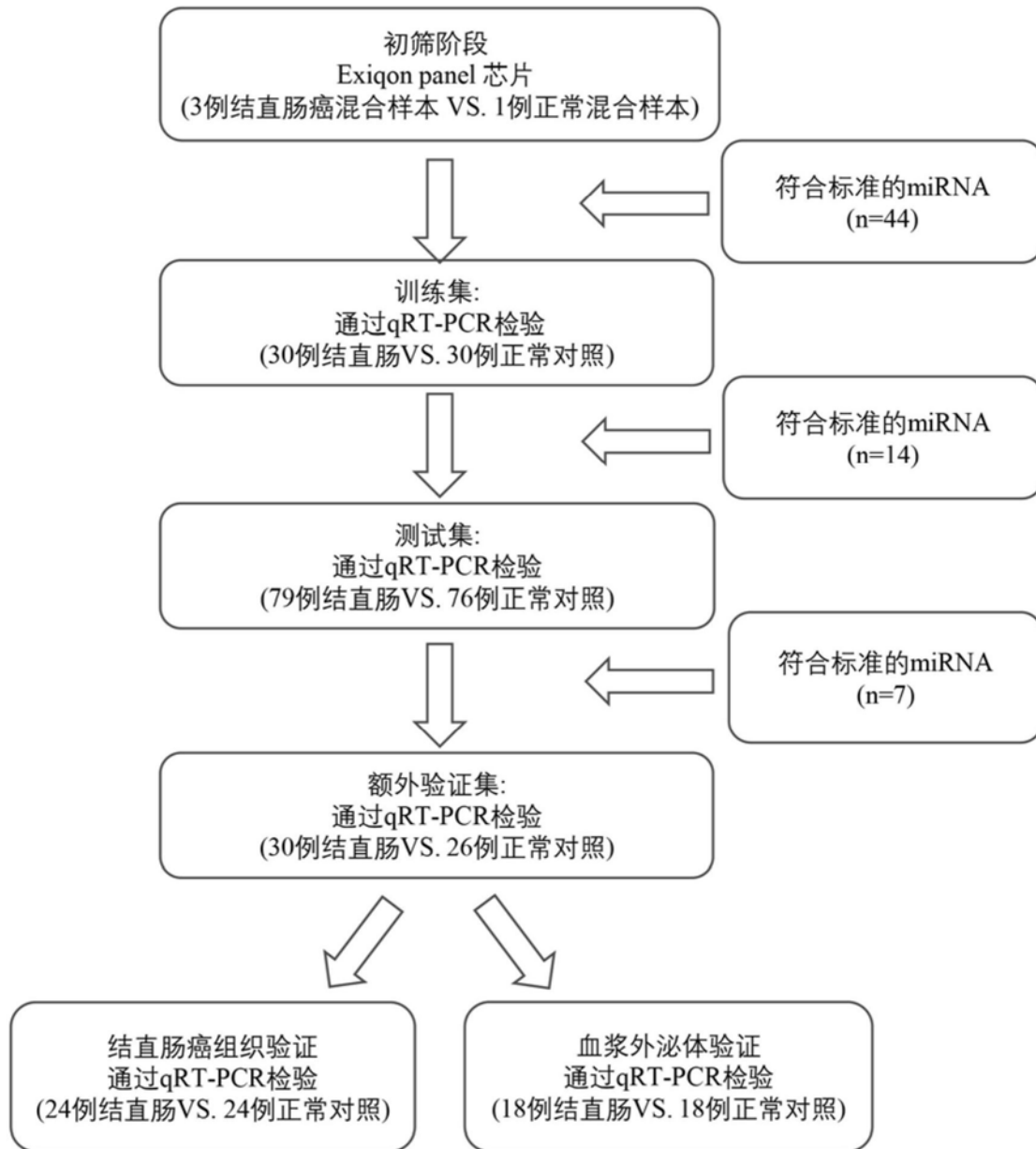


图1

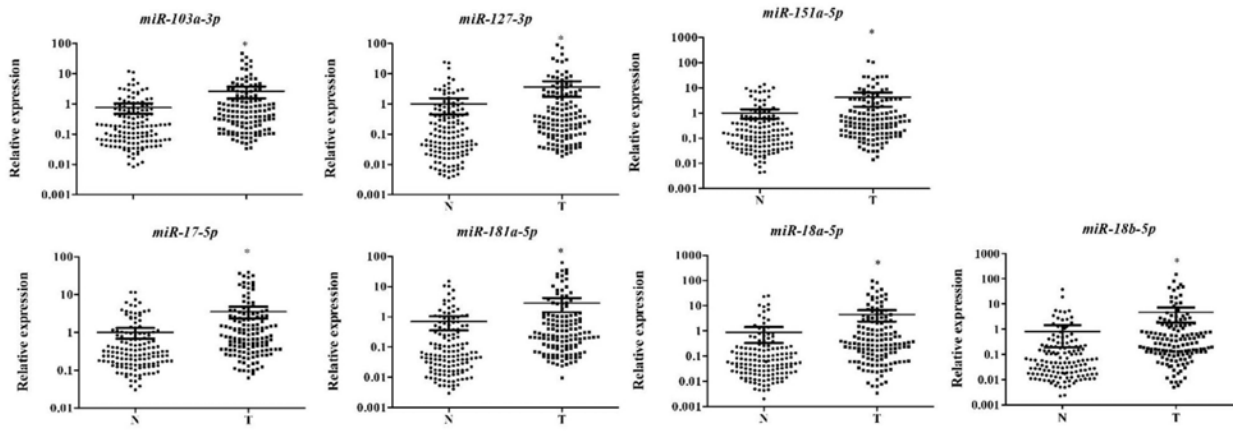


图2

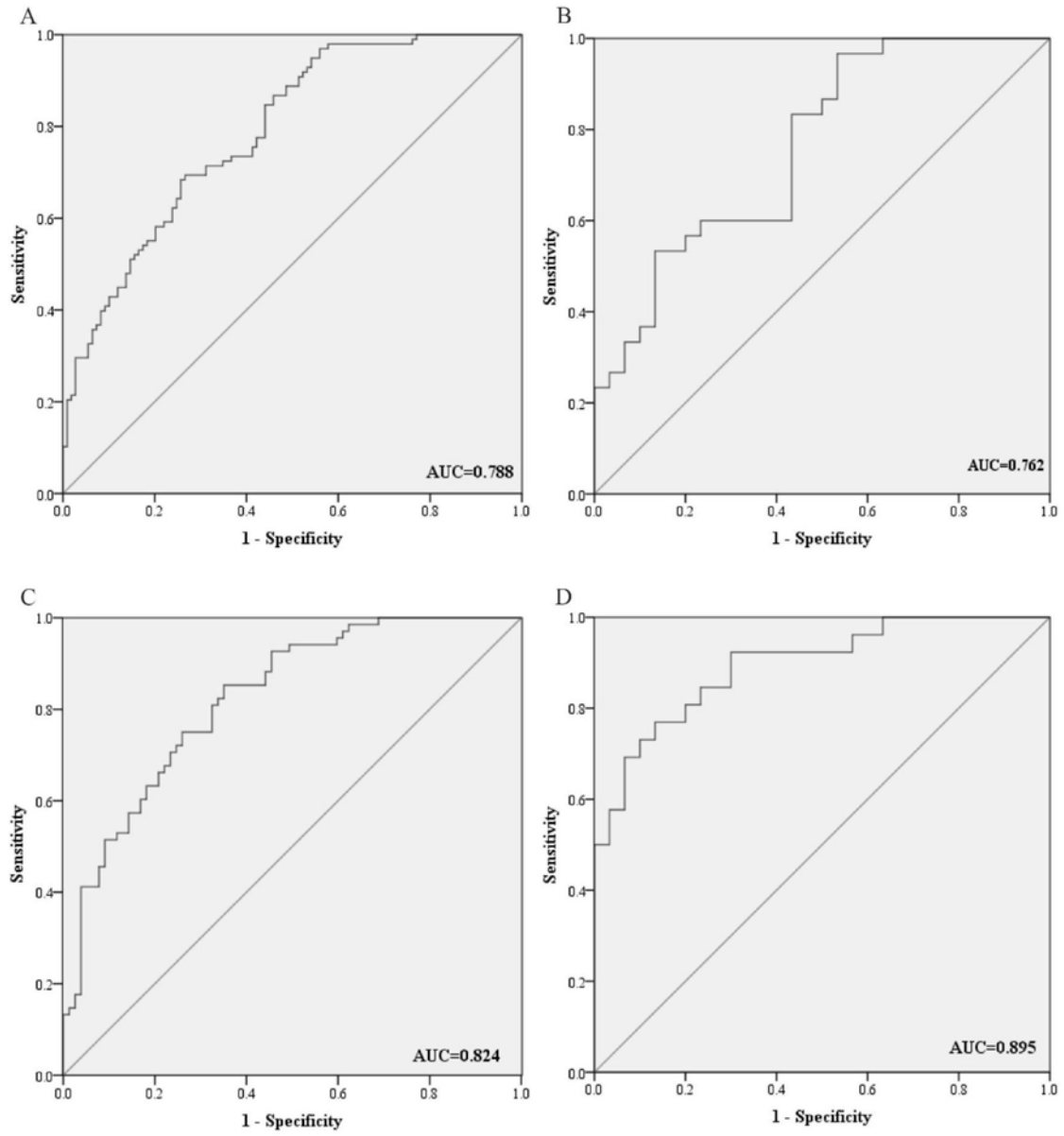


图3

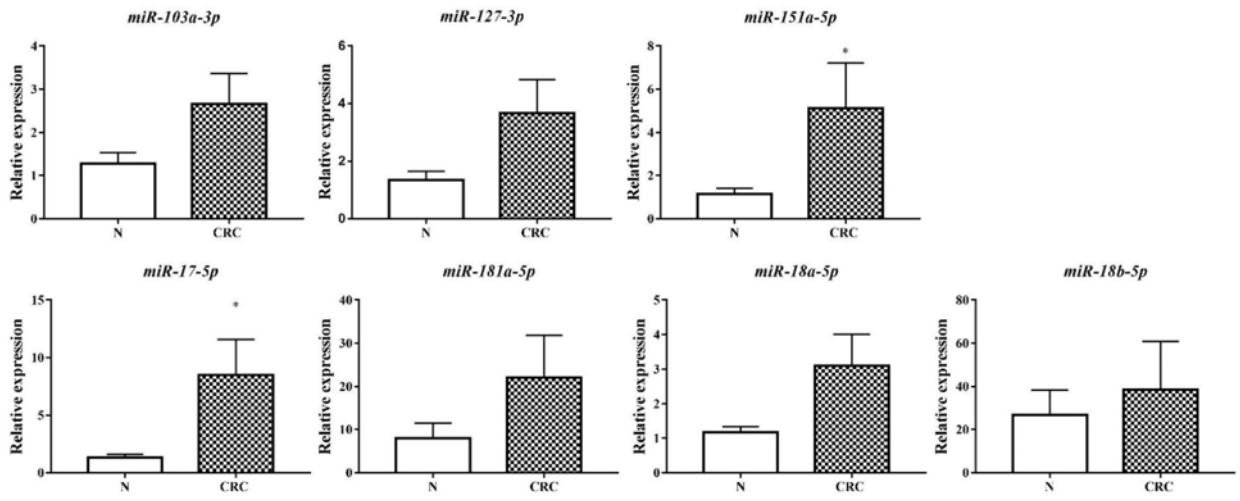


图4

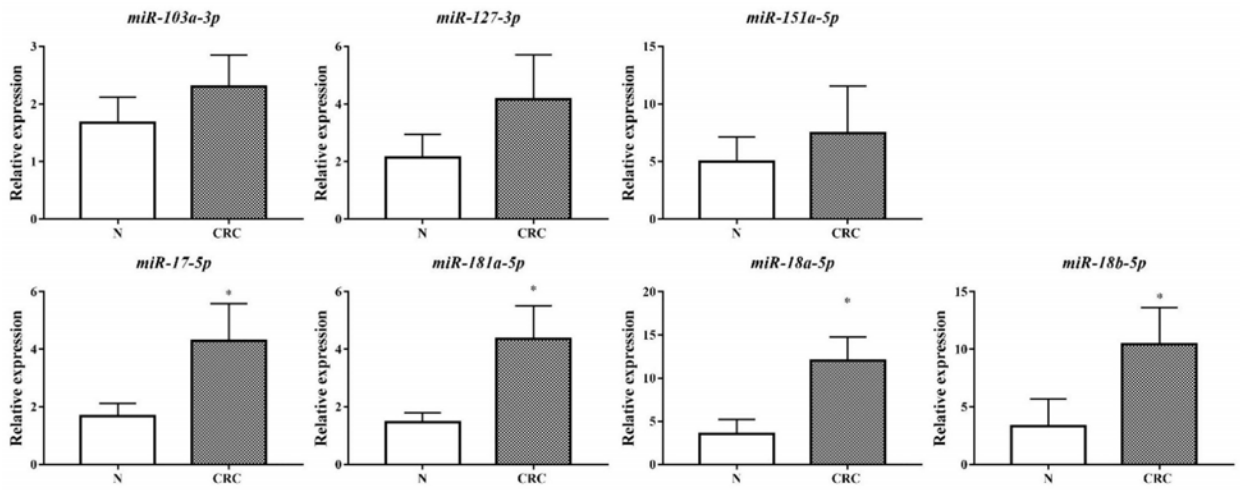


图5