



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103074431 B

(45) 授权公告日 2013.12.11

(21) 申请号 201310012196.1

(22) 申请日 2013.01.14

(73) 专利权人 山东大学齐鲁医院

地址 250014 山东省济南市历下区文化西路107号

(72) 发明人 王传新 张欣 王海燕

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 彭成

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101988060 A, 2011.03.23, 权利要求书, 说明书 [0019]-[0041] 段.

Yuan-Dong Zhu 等.《Distinctive microRNA

signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia》.《Med Oncol》.2012, 第29卷第2325页表2.

Keith E. Giles 等.《Packaging and reverse transcription of snRNAs by retroviruses may generate pseudogenes》.《RNA》.2004, 第10卷第306页左栏.

Cheng Fang 等.《Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma》.《Ann Hematol》.2012, 第91卷第554页表格1.

审查员 罗德明

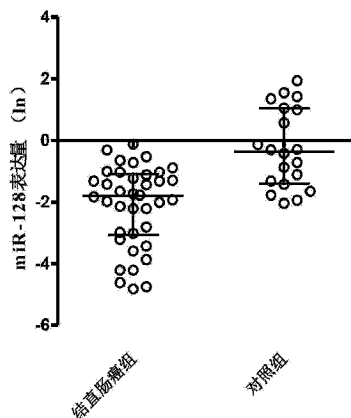
权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物、试剂盒及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物,包括 miRNA-128 的逆转录引物和检测引物、U6 的逆转录引物和检测引物、miRNA-16 的逆转录引物和检测引物,如 SEQ IDNO:1~9 所示。一种检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用试剂盒,包括上述引物,以及 RNA 分离液。一种检测结直肠癌血清 miRNA-128 表达量的方法,步骤如下:(1) 将待检测的血清标本与等体积 RNA 分离液混合,16000g 离心 10 分钟,分离上清液;(2) RT-PCR 扩增;(3) 制作标准曲线(4) 计算:得出基因的校正起始拷贝数 Q;将 miRNA-128 的 Q 值与内参基因 U6、miRNA-16 的 Q 值的几何平均数相比,得到 miRNA-128 的相对表达量。本发明的检测方法,为结直肠癌的早期发现、早期治疗提供了重要的参考依据。



CN 103074431 B

1. 一种检测结直肠癌血清 miR-128 的专用试剂盒,其特征在于:包括检测结直肠癌血清 miR-128 的专用引物,以及 RNA 分离液;所述 RNA 分离液由吐温 20、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、牛血清白蛋白和水组成,其中,浓度如下:吐温 20:2.5%;三羟甲基氨基甲烷:50mmol/L;乙二胺四乙酸:1mmol/L;牛血清白蛋白:1%;

还包括 PCR 反应液,PCR 反应液由 Syber Green I 荧光染料、DNA 聚合酶、dNTPs、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁和水组成,其中,各物质的浓度如下:DNA 聚合酶:100U/ml, dNTPs:0.2mM;氯化镁:6mM;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐:16.5mM;氯化钾:89.3mM;

其中,检测结直肠癌血清 miR-128 的专用引物,包括:

(1)miR-128 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:1 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示:

miR-128-RT:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAGAG-3';

miR-128-F:5'-GGCTCACAGTGAACCGGT-3';

miR-128-R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';

(2)U6 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:4 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示:

U6-RT:GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAC;

U6-F:GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAC;

U6-R:AAATATGGAACGCTTCACGAATT;

(3)miRNA-16 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:7 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示:

miRNA-16-RT:

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA-3';

miRNA-16-F:5'-CGCCTAGCAGCACGTAAATA-3';

miRNA-16-R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物、试剂盒,以及检测结直肠癌血清 miRNA-128 表达量的方法,属于分子生物学检测技术领域。

背景技术

[0002] 结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,随着人民生活方式和膳食结构的改变,结直肠癌的发病率和死亡率呈逐年上升的趋势。结直肠癌在早期阶段相对容易治愈,而到晚期阶段往往预后较差。据统计,无侵袭转移的结直肠患者的 5 年生存率可高达 90%,有局部转移者的 5 年生存率有 68%,而带有远处转移者的 5 年生存率则仅有 11%。因此早期发现是改善结直肠癌预后的关键。CT 和 MRI 等对于小于 1cm 的病灶无法早期诊断,不能用于结直肠癌的早期筛查和诊断。电子肠镜检查虽可早期诊断结直肠癌,但却是有创检查,一定程度上增加了病人的痛苦。肿瘤标志物以其简便、经济、非侵入性等特点日益受到关注。但是,目前临床上推荐用于结直肠癌诊断和预后判断的肿瘤标志物只有 CEA,而 CEA 作为肿瘤标志物其特异性以及在结直肠癌诊断方面的应用也备受质疑。因此目前的结直肠癌肿瘤标志物远远不能满足临床需求,寻找理想的用于早期诊断结直肠癌肿瘤标志物具有重要的临床意义。

[0003] miRNAs 是一类分布广泛的小的非编码蛋白质的单链小分子 RNAs,其通过对 mRNA 降解或抑制其翻译,从而在转录后对靶标基因的表达水平进行调节,参与细胞分化、生长、凋亡、代谢等功能。近年来,肿瘤相关 miRNAs 陆续在肿瘤患者的血清中被发现,为肿瘤的无创性早期诊断提供了一条新的途径。作为潜在的生物标志物,miRNAs 具有蛋白标志物无法比拟的优势。miRNAs 稳定性非常好,有研究显示体液样本中的 miRNAs 的稳定性源于其在血液中以核酸-蛋白复合物形式存在或包被于外排颗粒当中,使 miRNAs 耐受包括核糖核酸酶、反复冻融、pH 变化、长期保存等情况,不易被降解。miR-128 最早作为一种抑癌基因在神经母细胞瘤中被发现,其有 128-1 和 128-2 两种前体形式,基因分别定位在第 2 和 3 染色体。Zhu 等研究发现,miR-128 通过靶向癌基因 Bmi-1 和 ABCC5 导致对化疗的耐受,并且 miR-128 在乳腺癌组织中的表达与患者的预后呈明显负相关。最新研究发现,miR-128 的上调表达可以抑制肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡、迁移和血管生成等,与人类多种肿瘤的发生、发展相关,提示对 miR-128 的表达检测可以成为肿瘤检测的指标之一。

[0004] 血清 miRNAs 主要的检测方法有克隆测序、RNA 印迹杂交、基因芯片、逆转录-聚合酶链反应,其中基于 SYBR Green 的逆转录-实时荧光定量 PCR 方法是分析血清中 miRNAs 最常用的方法,其具有操作简便、敏感性高、重复性好,目前已在核苷酸检测领域得到广泛应用。采用该方法通常情况下需先对血清样本中的 miRNAs 进行分离提取,然后再对分离得到的 miRNAs 进行逆转录、PCR 扩增检测,但目前关于 miRNAs 的提取步骤繁琐、试剂昂贵,并且在提取过程中不可避免的造成 miRNAs 分子的丢失,给实验造成了误差。因此,如果建立一种对血清中 miRNAs 直接进行检测的方法,无疑会给研究带来方便。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术,本发明提供了一种快速、简便、准确的检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物、试剂盒,以及检测结直肠癌血清 miRNA-128 表达量的方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0007] 一种检测结直肠癌血清 miR-128 的专用引物,包括:

[0008] (1) miR-128 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:1 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示:

[0009] miR-128-RT:

[0010] 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAGAG-3';

[0011] miR-128-F:5'-GGCTCACAGTGAACCGGT-3';

[0012] miR-128-R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';

[0013] (2) U6 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:4 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示:

[0014] U6-RT:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAAC-3';

[0015] U6-F:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAAC-3';

[0016] U6-R:5'-AAATATGGAACGCTTCACGAATT-3';

[0017] (3) miRNA-16 的逆转录引物和检测引物,逆转录引物的序列如 SEQ ID NO:7 所示,检测引物的序列如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示:

[0018] miRNA-16-RT:

[0019] 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA-3';

[0020] miRNA-16-F:5'-CGCCTAGCAGCACGTAAATA-3';

[0021] miRNA-16-R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

[0022] 所述引物的序列是根据 microRNA 数据库(<http://www.mirbase.org/>)上报的核苷酸序列 miR-128 (MIMAT0000424)、miRNA-16 (MIMAT0000069)以及 GeneBank 数据库中的 U6 序列(X07425.1)为模板自主设计的。

[0023] 一种检测结直肠癌血清 miR-128 的专用试剂盒,包括上述引物,以及 RNA 分离液;所述 RNA 分离液由吐温 20、三羟甲基氨基甲烷、乙二醇四乙酸、牛血清白蛋白和水组成,其中,浓度如下:吐温 20:2.5% (体积百分数);三羟甲基氨基甲烷:50mmol/L;乙二醇四乙酸:1mmol/L;牛血清白蛋白:1% (质量百分数)。

[0024] 所述检测结直肠癌血清 miR-128 的专用试剂盒还包括 PCR 反应液,PCR 反应液由 1×Syber Green I 荧光染料、DNA 聚合酶、dNTPs、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁和水组成,优选的,各物质的浓度如下:DNA 聚合酶:100U/ml, dNTPs:0.2mM;氯化镁:6mM;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐:16.5mM;氯化钾:89.3mM。

[0025] 上述检测结直肠癌血清 miR-128 的专用引物、检测结直肠癌血清 miR-128 的专用试剂盒在定性检测血清 miR-128 或定量检测血清 miR-128 表达量中的应用。

[0026] 一种检测结直肠癌血清 miR-128 表达量的方法,步骤如下:

[0027] (1) 将待检测的血清标本与等体积 RNA 分离液混合,16000g 离心 10 分钟,分离上清液;

[0028] (2) RT-PCR 扩增:向上述分离的上清液中加入 SEQ ID NO:1 所示的 miR-128 的逆

转录引物,进行反转录得 cDNA,取 cDNA 为模板,加入 SEQ ID NO:2、3 所示的引物以及 PCR 反应液,进行 PCR 扩增,检测样本阈值 C_q (test sample);同时,从人结直肠癌细胞株 HT29 细胞(购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)中提取 miRNAs,逆转录成 cDNA,10 倍梯度稀释,作为校对样本,在每个 PCR 反应板中进行检测,记录 C_q 值;内参基因 U6、miR-16 的 RT-PCR 扩增,除引物采用相对应的逆转录引物和检测引物外,方法相同;

[0029] (3)制作标准曲线:上述检测完成后,拷贝数以 10 为底取对数作为横坐标, C_q 值为纵坐标作图,绘制标准曲线,计算斜率 S,然后根据公式 $E=10^{(-1/S)}-1$,计算扩增效率 E;

[0030] (4)计算:选中样本和校对样本检测孔,应用实时荧光定量 PCR 仪的随机软件得出样本阈值 C_q (T)和校对样本阈值 C_q (C),根据公式 $Q=(E+1)^{-\Delta C_q}$, $\Delta C_q=[C_q(T)-C_q(C)]$,得出基因的校正起始拷贝数 Q;将 miR-128 的 Q 值与内参基因 U6、miR-16 的 Q 值的几何平均数相比,得到 miR-128 的相对表达量。

[0031] 本发明所建立的结直肠癌血清 miR-128 检测方法,为结直肠癌的早期发现、早期治疗提供了重要的参考依据。

[0032] 本发明利用 RNA 分离液对血清样本进行处理,得到的混合液直接用于逆转录反应,省略了对需求样本 RNA 的提取过程,不仅简化了操作步骤,降低了检测成本,还避免了传统方法提取 RNA 降解的问题。

[0033] 本发明根据公式 $E=10^{(-1/S)}-1$,计算扩增效率(E),根据公式 $Q=(E+1)^{-\Delta C_q}$ 计算 miR-128 基因相对 miR-191、miR-16 的表达量,避免了传统 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法必须要求 PCR 扩增效率为 100% 的限制,使结果分析更加可靠。

附图说明

[0034] 图 1 为 U6、miR-16 和 miR-128 的标准曲线,其中, A :U6 的标准曲线 ;B :miR-16 的标准曲线 ;C :miR-128 的标准曲线。

[0035] 图 2 为血清 miR-128 在 38 例结直肠癌患者和 20 例健康对照者中的相对表达水平。

[0036] 图 3 为血浆血清 miR-128 检测对结直肠癌诊断的 ROC 曲线。

具体实施方式

[0037] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0038] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0039] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0040] 实施例 1

[0041] (1)试剂盒的组成及配制:

[0042] 所述引物的序列是根据 microRNA 数据库(<http://www.mirbase.org/>)上报的核苷酸序列 miR-128 (MIMAT0000424)、miRNA-16 (MIMAT0000069)以及 GeneBank 数据库中的 U6 序列(X07425.1)为模板自主设计的,其引物序列、 T_m 值见表 1。

[0043] 表 1 引物序列、 T_m 值

[0044]

引物名称	序列	Tm (°C)
miR-128-RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAGAG-3'	
miR-128-F	5'-GGCTCACAGTGAACCGGT-3'	53
miR-128-R	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	51
U6-RT	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	
U6-F	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	54
U6-R	5'-AAATATGGAACGCTTCACGAATT-3'	52
miRNA-16-RT	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCGCAA-3'	
miRNA-16-F	5'-CGCCTAGCAGCACGTAATA-3'	50
miRNA-16-R	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	51

[0045] 所述专用试剂盒还包括 RNA 分离液, RNA 分离液由 2.5% 吐温 20、50mmol/L 三羟甲基氨基甲烷、1mmol/L 乙二胺四乙酸和 1% 牛血清白蛋白组成。

[0046] 所述试剂盒还包括 PCR 反应液: 由 1×Syber Green I 荧光染料、DNA 聚合酶、dNTPs 和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、氯化钾、氯化镁组成。

[0047] 所述 DNA 聚合酶在 PCR 反应液中的终浓度为 100U/ml。

[0048] 所述 dNTPs 在 PCR 反应液中的终浓度为 0.2mM。

[0049] 所述氯化镁在 PCR 反应液中的终浓度为 6mM。

[0050] 所述三羟甲基氨基甲烷盐酸盐在 PCR 反应液中的终浓度为 16.5mM。

[0051] 所述氯化钾在 PCR 反应液中的终浓度为 89.3mM。

[0052] (2) 标本采集

[0053] 采集 38 例结直肠患者和 20 例健康对照者血清 3ml, 1600g 离心 5 分钟, 进一步 16000g 离心 10 分钟, 分离上清, 保存于 -80°C 待测。所有样本均在取得受试者同意的情况下进行。将分离上清液 3 μl 与 RNA 分离液 3 μl 混合, 16000g 离心 10 分钟, 分离上清, 将上清 1:10 稀释用于逆转录模板。

[0054] (3) RT-PCR 扩增

[0055] 采用 Takara 公司的 One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒、逆转录引物对上述 mRNA 进行反转录成 cDNA, 取 5 μl cDNA 为模板, 进行 PCR 反应。

[0056] PCR 反应体系如下:

[0057] 模板 DNA : 5 μl ;

[0058] PCR 反应液 : 12.5 μl ;

[0059] 上游引物 (10 μM) : 1 μl ;

[0060] 下游引物 (10 μM) : 1 μl ;

[0061] 无菌水 : 5.5 μl ;

[0062] 反应条件为 : 37°C → 20 分钟, 95°C → 10 分钟 ; (95°C 15 秒, 60°C 1 分钟) → 40 个循环。

[0063] 内参基因 U6、miR-16 的 RT-PCR 扩增, 除引物采用相对应的逆转录引物和检测引物外, 方法同上 ;

[0064] (4) 标准曲线制作

[0065] 将从人结直肠癌 H29 细胞中提取的 miRNA, 逆转录成 cDNA, 然后 10 倍梯度稀释成 5 个浓度, 作为标准品, 同待测样本一同进行 RT-PCR 扩增, 制作标准曲线。

[0066] (5) 结果判断

[0067] ①拷贝数以 10 为底取对数作为横坐标, C_q 值为纵坐标作图, 绘制标准曲线, 计算斜率 S , 然后根据公式 $E=10^{(-1/S)}-1$, 计算扩增效率 E ;

[0068] ②选中样本和校对样本检测孔, 应用实时荧光定量 PCR 仪的随机软件得出样本阈值 $C_q(T)$ 和校对样本阈值 $C_q(C)$, 根据公式 $Q=(E+1)^{-\Delta C_q}$, $\Delta C_q=[C_q(T)-C_q(C)]$, 得出基因的校正起始拷贝数 Q ; 将 miR-128 的 Q 值与内参基因 U6、miR-16 的 Q 值的几何平均数相比, 得到 miR-128 的相对表达量。

[0069] (7) 检测结果

[0070] ①标准曲线见图 1。

[0071] ② 38 例结直肠癌患者和 20 例健康对照者血清 miR-128 检测结果见图 2。结直肠癌患者和健康对照者血清 miR-128 中位水平分别为 -1.779 ($-3.019 \sim -1.032$) 和 -0.422 ($-1.422 \sim 1.00443$)。结直肠癌患者血清 miR-128 水平明显低于健康对照者, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

[0072] ③结直肠癌血清 miR-128 检测方法对结直肠癌的诊断价值分析

[0073] 以 38 例结直肠癌患者作为结直肠癌组, 20 例健康对照者作为非结直肠癌组, 采用 SPSS13.0 统计学软件中的受试者工作曲线分析, 得出血清 miR-128 检测结直肠癌的临界值为 -0.893 , 敏感性为 86.84%, 特异性为 80.00%, 诊断效能为 -0.878 (见图 3), 说明血清 miR-128 对结直肠癌具有较大的诊断价值。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学齐鲁医院

<120> 检测结直肠癌血清 miRNA-128 的专用引物、试剂盒及方法

<130>

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gtcgtatcca gtcagggtc cgaggatfc gcactggata cgacaaagag

50

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ggctcacagt gaaccggt

18

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gtcagggtc cgaggt

16

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

[0002]

gtgctcgctt cggcagcaca tatac	25
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
gtgctcgctt cggcagcaca tatac	25
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
aaataiggaacgcctcacga att	23
<210> 7	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
gtcgtatcca gtgcagggtc cgaggtatc gcactggata cgaccgcaa	50
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
cgcctagcag cacgtaata	20
<210> 9	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
[0003]	
gtgcagggtc cgaggt	16

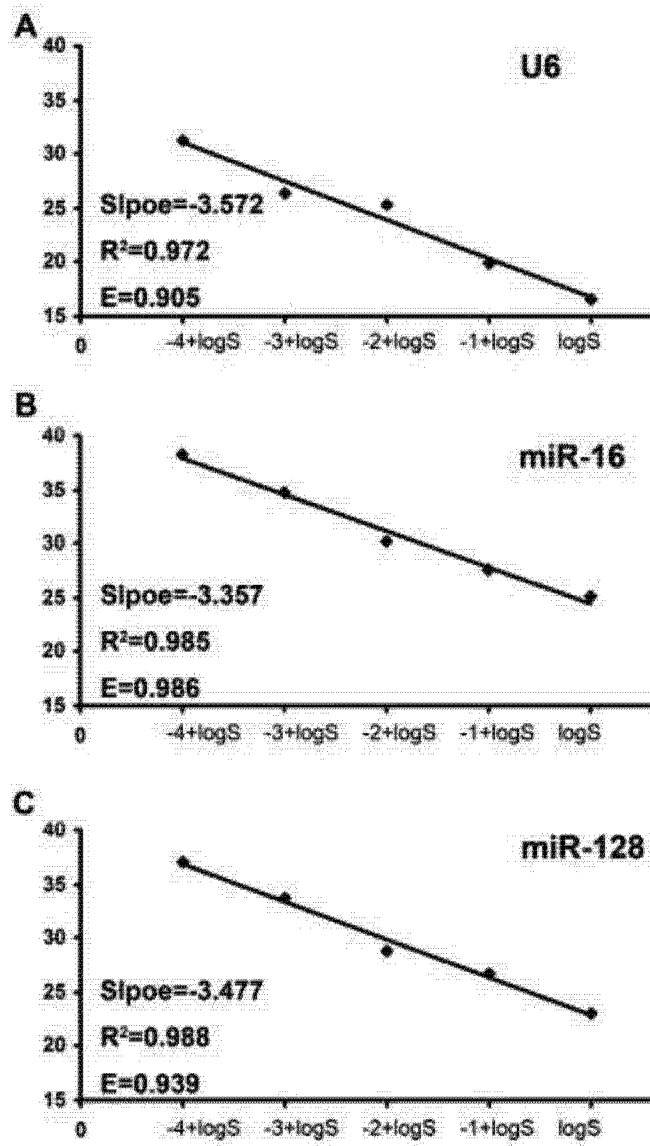


图 1

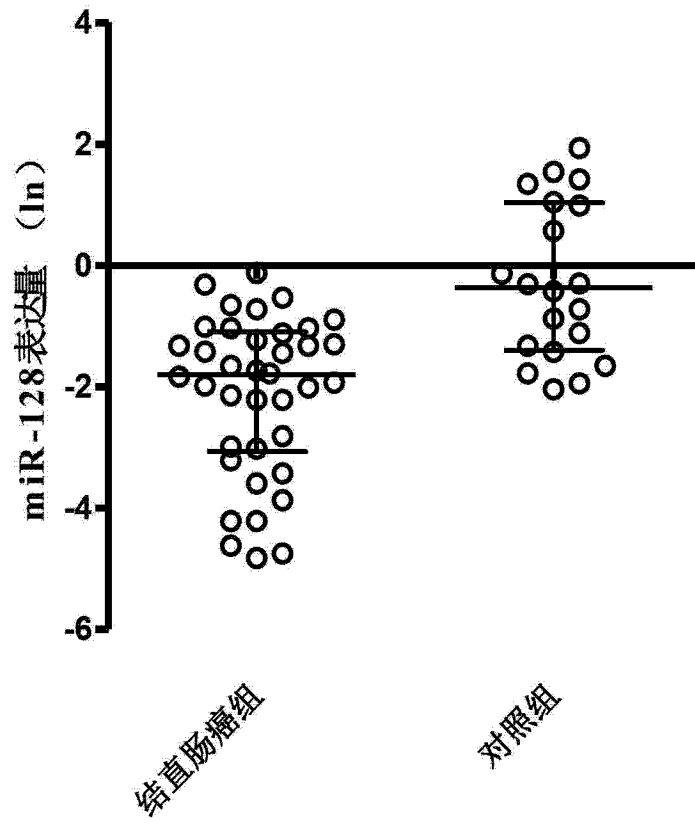


图 2

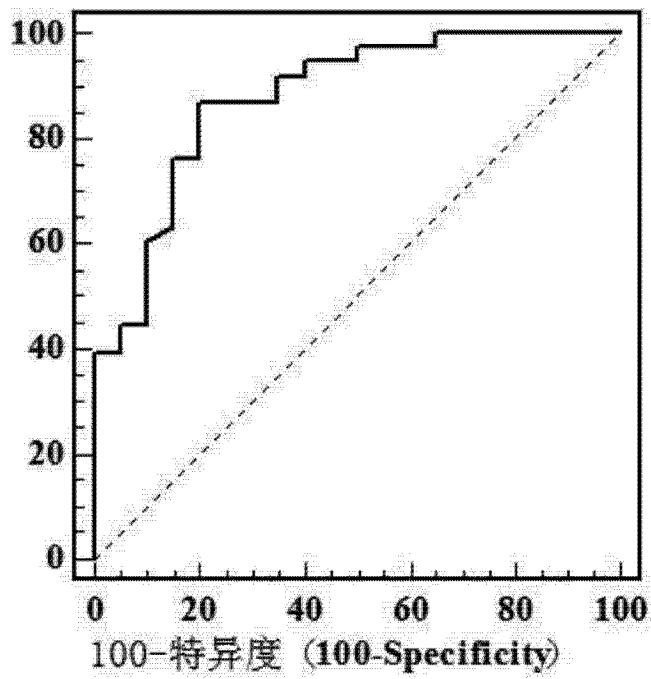


图 3