



数字PCR定量检测血浆中环状RNA方法的建立*

阮 垚 郭俊明 肖丙秀**

(宁波大学医学院、浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 生物标志物一直是医学领域的研究热点. 目前主要以实时荧光定量PCR技术作为分子诊断的检测手段, 用于大样本的核酸检测, 但该技术具有限制性, 会导致假阴性. 作为第三代PCR的数字PCR技术, 优化并提高了检测灵敏度, 无需标准曲线实现绝对定量检测, 大大提高了检测的精准度, 尤其是对于低表达RNA的检测, 显得更为出色. 本研究以hsa_circ_0061276为例, 利用微滴式数字PCR EvaGreen染料法对血浆中hsa_circ_0061276的拷贝数进行绝对定量地检测, 成功检测出胃炎和胃癌患者血浆中hsa_circ_0061276的具体拷贝数. 因此, 数字PCR作为新型检测技术在临床实际应用中有较大推广价值.

关键词 数字PCR, 环状RNA, 生物标志物

中图分类号 Q7, R3

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0431

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术发展已非常成熟, 且广泛应用到基础研究和实际检验工作中^[1]. 为了实现更加精确的检测, 人们采用第三代PCR——数字PCR^[2], 其中微滴式数字PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是目前使用较广的一种数字PCR检测技术, 它主要有4个应用方向: 绝对定量^[3]、稀有拷贝检测^[4]、拷贝数变异分析^[5]和确定基因表达水平^[6]. ddPCR被认为是检测多种癌症相关基因变异的可靠工具^[7]. 因此将其应用于肿瘤标志物的检测将大大提高检测的灵敏度和准确性.

环状RNA (circular RNA, circRNA) 是近年来医学研究领域的新型热点分子, 其独特的环状结构决定了它们高度的稳定性和广泛存在于各种体液中. 将circRNA作为生物标志物, 为癌症早期诊断、监测预后和判断疗效创造了新的可能^[8]. 由于实时荧光定量PCR受限于本身实验技术的相对较低灵敏度, 会出现检测假阴性, 因此不利于对低表达基因的检测, 而ddPCR提高了检测灵敏度, 减少了假阴性率. 本实验室前期研究证明了hsa_circ_0061276具有作为胃癌诊断标志物的优势^[3]. 本研究以hsa_circ_0061276为例, 建立逆转录微滴式数

字PCR染料法检测胃炎和胃癌患者血浆中hsa_circ_0061276水平的方法, 希望为circRNA运用于肿瘤诊断提供新思路.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器

本实验中所使用的主要仪器包括QX200™微滴发生仪、PX1™热封仪、T100™热循环仪和QX200™微滴分析仪等, 均购于美国Bio-Rad公司.

1.1.2 引物设计与合成

先在circRNA常用数据库circBase (<http://circrna.org/>) 中下载hsa_circ_0061276序列, 然后使用Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 在线设计hsa_circ_0061276跨连接点的扩增引物 (图1), 以确保只扩增circRNA, 而不扩增线性RNA. 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物具体序列见表1.

* 宁波大学王宽诚基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0574-87609589, E-mail: xiaobingxiu@nbu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-08, 接受日期: 2021-04-06

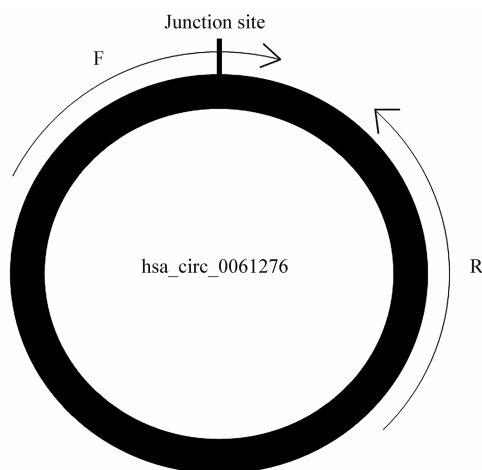


Fig. 1 Design of PCR primers for detecting hsa_circ_0061276

F: Forward primer that crosses the junction site; R: Reverse primer.

Table 1 The sequences of PCR primers

Name	Length /nt	Sequence (5'→3')
Forward primer (F)	24	GGAGAAACACAGCCAGAAGGAAGT
Reverse primer (R)	24	CAGTTCTGAAATAGCTCACAATCC

本实验利用染料法完成 ddPCR 的检测。ddPCR EvaGreen Supermix（购于 Bio-Rad 公司）用于反应体系的构建。EvaGreen 微滴生成油（购于 Bio-Rad 公司）用于包裹核酸分子以生成微滴。逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 提取血浆总 RNA、逆转录成 cDNA

在 1.5 ml 离心管中加入 250 μ l 血浆和 750 μ l TRIzol LS，旋涡震荡后 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 5 min。然后，加入 200 μ l 三氯甲烷混匀，4 $^{\circ}$ C 冰箱放置 5 min。在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 后，取上清至干净 1.5 ml 离心管中，加入 500 μ l 异丙醇，旋涡震荡，4 $^{\circ}$ C 静置 15 min。接着 4 $^{\circ}$ C，12 000 r/min 离心 10 min。弃上清，加入 1 ml 75% 乙醇，旋涡震荡。继续 4 $^{\circ}$ C，12 000 r/min 离心 5 min，弃上清。再离心 3 min，弃上清，干燥 3 min。加入 20 μ l 无 RNA 酶水溶解 RNA。最后取 10.5 μ l RNA 和 9.5 μ l 逆转录混合液，按照说明书逆转录成 cDNA。

1.2.2 ddPCR 检测

按照表 2 配置 ddPCR 反应体系。先用排枪将反应体系转移到微滴发生卡中间一排，然后在最下面

一排每孔加入 70 μ l EvaGreen 微滴生成油，放入 QX200TM 微滴生成仪中生成微滴。用排枪吸取上排微滴（每孔 40 μ l）转移至 96 孔板。用 180 $^{\circ}$ C 预热过的热封仪进行封膜。将 96 孔板放入 PCR 仪中进行扩增反应。反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 60 s，循环 40 次；4 $^{\circ}$ C，5 min；90 $^{\circ}$ C，5 min；4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应结束后将 96 孔板放入微滴分析仪中逐一进行读数。

Table 2 Reaction system of ddPCR

Reagents	Volume/ μ l
Supermix for EvaGreen	10.0
cDNA	2.0
Forward primer (10 μ mol/L)	0.2
Reverse primer (10 μ mol/L)	0.2
RNase/DNase-free water	7.6

1.2.3 微滴分析仪结果分析

打开 Quantasoft 软件，清洗管路，填写样品信息，选择绝对定量（absolute quantification, ABS），点击运行，导出数据和图片。

2 结果

2.1 测序结果

为验证设计引物的准确性，将测序结果（图 2）与 hsa_circ_0061276 的序列进行比对。结果显示，检测到的序列与 hsa_circ_0061276 序列完全匹配，并通过剪接点。这说明引物设计正确，成功扩增 hsa_circ_0061276。

2.2 阴性对照

每次实验的第一个孔用来做阴性对照（negative control, NEG）。此孔不加模板，用 H₂O 替代 cDNA，理论上不会检测出拷贝数，显示为 NO CALL，用来判定是否有引物二聚体生成。

2.3 阳性结果

本实验利用油包水方法将 20 μ l 液体平均分配到数万个微滴中。图 3a 显示检测到的总微滴数、阳性微滴数和阴性微滴数。微滴总数通常在 1.2 万以上说明微滴成功生成，阳性微滴数为能检测到荧光信号的微滴数，而阴性微滴数为没有待测核酸分子的微滴数。微滴读数仪能精准地判读阳性微滴和阴性微滴，分析软件将阴性微滴的比例带入 Poisson 分布公式，即可直接得到该样本的绝对拷贝数，单位为每 μ l 样本所含拷贝数。本实验共检测 12 例胃炎

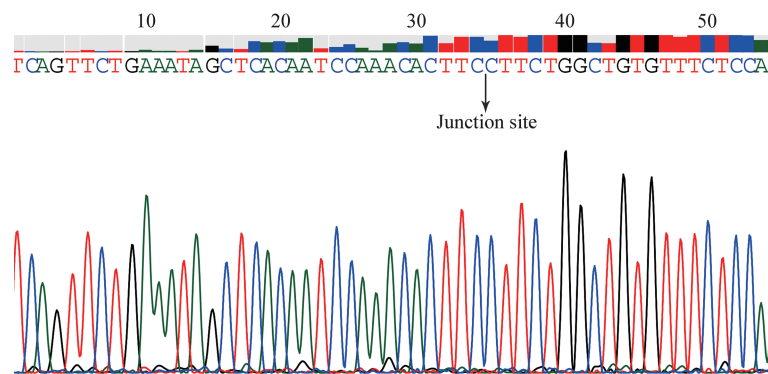


Fig. 2 Sequencing results of the products of hsa_circ_0061276 PCR

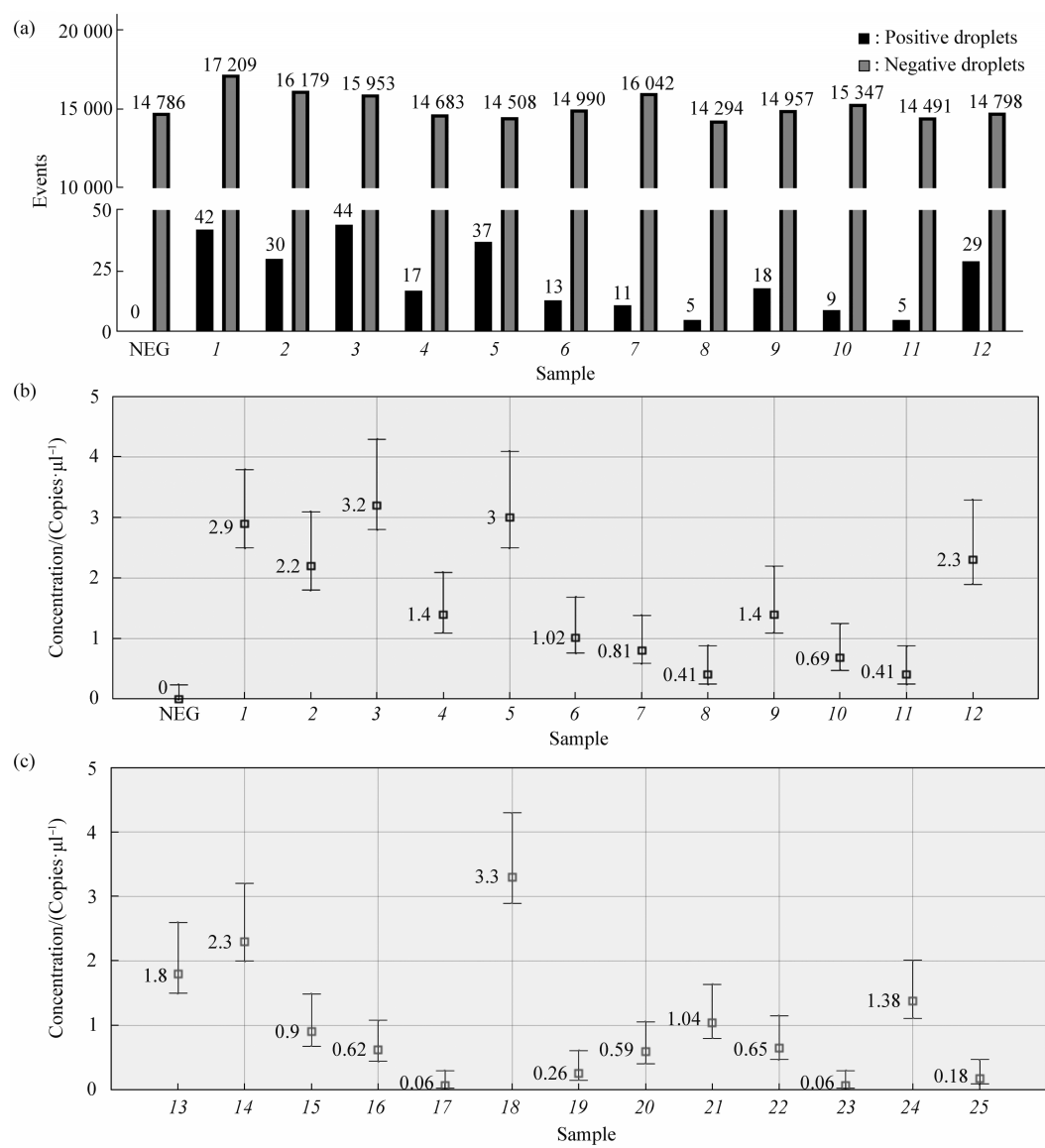


Fig. 3 ddPCR detection of the absolute copy number of hsa_circ_0061276 in plasma from patients with gastritis and gastric cancer

(a) The results show the number of positive and negative droplets of one negative control (NEG) and twelve samples, respectively. (b) The copy number of hsa_circ_0061276 in plasma from patients with gastritis. NEG, negative control. 1–12: twelve gastritis patients. (c) The copy number of hsa_circ_0061276 in plasma from patients with gastric cancer. 13–25: thirteen gastric cancer patients.

和13例胃癌患者血浆样本,总微滴数均超过1.4万.胃炎患者的绝对拷贝数分别为2.90 Copies/ μ l、2.20 Copies/ μ l、3.20 Copies/ μ l、1.40 Copies/ μ l、3.00 Copies/ μ l、1.02 Copies/ μ l、0.81 Copies/ μ l、0.41 Copies/ μ l、1.40 Copies/ μ l、0.69 Copies/ μ l、0.41 Copies/ μ l和2.30 Copies/ μ l(图3b).胃癌患者的绝对拷贝数分别为1.80 Copies/ μ l、2.30 Copies/ μ l、0.90 Copies/ μ l、0.62 Copies/ μ l、0.06 Copies/ μ l、3.30 Copies/ μ l、0.26 Copies/ μ l、0.59 Copies/ μ l、1.04 Copies/ μ l、0.65 Copies/ μ l、0.06 Copies/ μ l、

1.38 Copies/ μ l和0.18 Copies/ μ l(图3c).

微滴图(图4)中可以直观地观察阳性微滴(蓝色圆点)和阴性微滴(灰色圆点)在同一孔中的荧光强度差异,横坐标(Event number)为实时记录的微滴数,纵坐标(振幅,Amplitude)为荧光强度.阳性微滴荧光强度在15 000左右,阴性微滴荧光强度在5 000以下,两者分界明显,背景干净且无弥散现象.这些结果说明成功利用ddPCR染料法检测到血浆中hsa_circ_0061276的具体拷贝数.

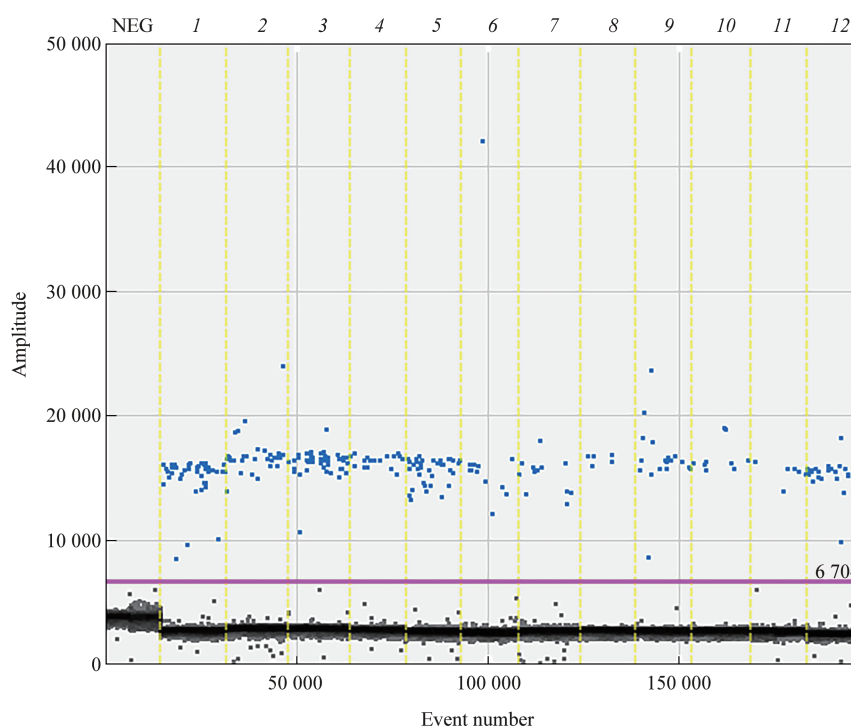


Fig. 4 The droplet figure of hsa_circ_0061276 in plasma detected by EvaGreen dye

The gray and blue bands are negative and positive droplets, respectively. NEG, negative control. 1–12: twelve gastritis patients.

3 讨 论

早发现、早诊断、早治疗是提高疾病治愈率的最有效方法,尤其像胃癌这种早期无特异性临床表现的疾病,往往发现时已错过最佳治疗的时间.然而,目前对于胃癌诊断的金标准为病理组织活检,而它是一种有创检查,不利于早期筛查,因此寻找一种新型的胃癌标志物对于其早期诊断具有重大意义.本实验室研究发现血浆 hsa_circ_0061276 具有作为胃癌诊断生物标志物的潜力^[3].

对于肿瘤的大多数研究都会应用 qRT-PCR 进

行相关基因表达水平相对定量检测.目前实时荧光定量 PCR 是临床上应用广泛的检测手段,染料法进行定量检测成本较低,但引物二聚体的干扰可能会导致定量不准确,因而降低了其灵敏度.为了解决这一问题,本研究使用 RT-ddPCR 来检测血浆中 hsa_circ_0061276 的拷贝数,绝对定量地检测让实验结果更加真实和可信.数字 PCR 通过采用染料法或探针法实现定量检测,而选择染料法比探针法更为经济,更适用于普通分子生物学实验室和常规临床检验科^[9].

ddPCR 的应用涉及多个研究领域,例如:检测

胃癌患者组织和血浆样品中人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的拷贝数^[10], 检测黑色素瘤患者血浆 BRAF V600E 突变^[11], 等等. 在2020年突发的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 疫情中, ddPCR 技术在检测其病原体——严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 中体现出良好的优越性^[12-14]. 有研究报道, 由于病毒载量低和 RT-PCR 技术的局限性, 不可避免地会产生假阴性, 导致无法及时诊断, 而 ddPCR 可减少假阴性, 从而可以对疑似患者进行快速治疗和正确管理^[12-13]. 因此, 有专家建议使用 ddPCR 检测 SARS-CoV-2 和对阳性患者进行随访直至完全缓解^[14]. 我们的研究发现, ddPCR 更适合于检测低表达的 circRNA, 无需标准曲线实现绝对定量 (图 3b, c), 对于结果的分析更加方便.

在进行 ddPCR 实验时, 本研究也发现了一些问题需要引起操作者注意. 例如: qRT-PCR 与 ddPCR 在配制 20 μ l 混合体系之前的步骤是一致的, 前者完成后即可 PCR 扩增检测, 但后者还需要在扩增完成后进行微滴生成、转移微滴至 96 孔板进行微滴上机分析等步骤. 微滴生成受环境温度和湿度等因素影响, 微滴转移过程要十分小心, 避免微滴破碎; 微滴生成油开启后应尽快用完, 如变浑浊会影响实验结果的准确性. 总之, 使用 ddPCR 时, 样品前处理过程可能会受人为因素影响, 操作过程稍为繁琐, 实验时间较长不能快速出结果. 另外 ddPCR 所使用的配套仪器设备较多, 试剂耗材较 qRT-PCR 稍贵. 然而, 作为新一代核酸绝对定量检测技术, 数字 PCR 具有明显的优势, 随着技术的进步和检测成本的下降, 相信数字 PCR 将在临床诊断和基础研究中发挥更大的作用.

参 考 文 献

- [1] 张晓元, 张艳艳, 张小刚, 等. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 检测技术的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2020, **47**(4): 275-285
Zhang X Y, Zhang Y Y, Zhang X G, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2020, **47**(4): 275-285
- [2] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem, 2011, **83**(22): 8604-8610
- [3] Li T, Shao Y, Fu L, *et al.* Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection. J Mol Med (Berl), 2018, **96**(1): 85-96
- [4] Vargas D Y, Marras S A E, Tyagi S, *et al.* Suppression of wild-type amplification by selectivity enhancing agents in PCR assays that utilize superselective primers for the detection of rare somatic mutations. J Mol Diagn, 2018, **20**(4): 415-427
- [5] Shebanits K, Günther T, Johansson A C V, *et al.* Copy number determination of the gene for the human pancreatic polypeptide receptor NPY4R using read depth analysis and droplet digital PCR. BMC Biotech, 2019, **19**(1): 31
- [6] Taylor S C, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. Sci Rep, 2017, **7**(1): 2409
- [7] Olmedillas-López S, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology. Mol Diagn Ther, 2017, **21**(5): 493-510
- [8] 王攀, 徐高生, 马蔚, 等. 环状 RNA 在胃癌中的研究现状与策略. 生物化学与生物物理进展, 2019, **46**(3): 238-247
Wang P, Xu G S, Ma W, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2019, **46**(3): 238-247
- [9] Luo Y H, Yang Y P, Chien C S, *et al.* Plasma level of circular RNA hsa_circ_0000190 correlates with tumor progression and poor treatment response in advanced lung cancers. Cancers (Basel), 2020, **12**(7): 1740
- [10] Kim B, Nam S K, Seo S H, *et al.* Comparative analysis of HER2 copy number between plasma and tissue samples in gastric cancer using droplet digital PCR. Sci Rep, 2020, **10**(1): 4177
- [11] Tzanikou E, Haselmann V, Markou A, *et al.* Direct comparison study between droplet digital PCR and a combination of allele-specific PCR, asymmetric rapid PCR and melting curve analysis for the detection of BRAF V600E mutation in plasma from melanoma patients. Clin Chem Lab Med, 2020, **58**(11): 1799-1807
- [12] Alteri C, Cento V, Antonello M, *et al.* Detection and quantification of SARS-CoV-2 by droplet digital PCR in real-time PCR negative nasopharyngeal swabs from suspected COVID-19 patients. Plos One, 2020, **15**(9): e0236311
- [13] Liu X, Feng J, Zhang Q, *et al.* Analytical comparisons of SARS-CoV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets. Emerg Microbes Infect, 2020, **9**(1): 1175-1179
- [14] Falzone L, Musso N, Gattuso G, *et al.* Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. Int J Mol Med, 2020, **46**(3): 957-964

Establishment of a Method for The Quantitative Detection of Circular RNA in Plasma Using Digital PCR*

RUAN Yao, GUO Jun-Ming, XIAO Bing-Xiu**

(Ningbo University School of Medicine, Zhejiang Key Laboratory of Pathophysiology, Ningbo 315211, China)

Abstract Due to the unique structure of circular RNAs (circRNAs) and their widespread presence in body fluids, circRNAs are considered to have the potential as tumor biomarkers. At present, real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) technology is thought as one of the main detection methods for molecular diagnosis in clinical practice. However, this technology has limitations with relatively higher false negatives. The digital PCR technology, the third generation PCR, optimizes and improves the detection sensitivity. More important, it does not require a standard curve to achieve absolute quantitative detection, which greatly improving the accuracy of detection, especially for the detection of low-expressed RNAs. In this study, to establish a new method for the quantitative detection of circRNAs in plasma, hsa_circ_0061276 was used as an example. Its specific primers were first designed, and then the economical droplet digital PCR (ddPCR) EvaGreen dye method was used to determine its absolute copy number in plasma samples from 12 patients with gastritis and 13 patients with gastric cancer. Besides, a negative control (without template) was set. The results showed that the total number of droplets in all samples exceeded 14 000. The absolute copy numbers in patients with gastritis are 2.90 Copies/ μ l, 2.20 Copies/ μ l, 3.20 Copies/ μ l, 1.40 Copies/ μ l, 3.00 Copies/ μ l, 1.02 Copies/ μ l, 0.81 Copies/ μ l, 0.41 Copies/ μ l, 1.40 Copies/ μ l, 0.69 Copies/ μ l, 0.41 Copies/ μ l, and 2.30 Copies/ μ l, respectively. The absolute copy numbers in patients with gastric cancer are 1.80 Copies/ μ l, 2.30 Copies/ μ l, 0.90 Copies/ μ l, 0.62 Copies/ μ l, 0.06 Copies/ μ l, 3.30 Copies/ μ l, 0.26 Copies/ μ l, 0.59 Copies/ μ l, 1.04 Copies/ μ l, 0.65 Copies/ μ l, 0.06 Copies/ μ l, 1.38 Copies/ μ l, and 0.18 Copies/ μ l, respectively. The bands of positive droplets and negative droplets are clearly distinguished, indicating that the specific copy number of hsa_circ_0061276 in plasma has been successfully detected. In conclusion, ddPCR may become a new technology for the detection of DNA/RNA-based biomarkers in biomedical researches and clinical applications with greater promotion value.

Key words digital PCR, circular RNA, biomarker

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0431

* This work was supported by a grant from the K. C. Wong Magna Fund in Ningbo University.

** Corresponding author.

Tel: 86-574-87609589, E-mail: xiaobingxiu@nbu.edu.cn

Received: December 8, 2020 Accepted: April 6, 2021