



miR-451a 和 miR-21-5p 双重实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用*

胡舒啸^{1,2)} 陈惠香^{2,3)} 胡 胜²⁾ 赵一霞²⁾ 季安全²⁾ 李 洋²⁾ 廉 洁^{1)**} 孙启凡^{2)**}

(¹⁾ 中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038;

(²⁾ 公安部鉴定中心, 现场物证溯源技术国家工程实验室, 法医遗传学公安部重点实验室, 北京 100038;

(³⁾ 山西医科大学法医学院, 太原 030001)

摘要 目的 为了提高微量样本中 miRNA 的检测通量和检测效率, 本文建立了一种能够同时准确定量两种 miRNA 的双重实时荧光定量 PCR (real time fluorogenic quantitative PCR) 检测体系, 并通过实际样本检测验证其应用于体液鉴别的效果。**方法** 设计适用于 miRNA 双重检验的相关引物及探针并优化实验体系组分, 建立基于 TaqMan 技术的 miRNA 双重实时荧光定量 PCR 检测体系并验证其特异性、灵敏度和可重复性; 使用此检测体系对 58 份不同体液样本中的 miR-451a 与 miR-21-5p 进行检测, 并借助 miR-451a 与 miR-21-5p 的比值鉴定法评估该体系的体液鉴别能力; 使用该检测体系样本数据确定的最佳截断值对模拟案件样本进行鉴别。**结果** 优化的检测体系能够实现对血液与非血液、月经血与外周血的 100% 区分, 同时可以实现对模拟案件样本的准确鉴别。**结论** 该双重实时荧光定量 PCR 检测体系将时间和材料成本均缩短至原来的一半, 为后续建立更多重的实时荧光定量 PCR 检测体系并应用于体液鉴别打下了基础。

关键词 法医遗传学, 体液鉴别, 双重实时荧光定量 PCR, microRNA

中图分类号 DF795.2

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0211

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性非编码 RNA, 具有高度稳定性及组织特异性等优点^[1]。自 2009 年 Hanson 及其团队首次揭示了 miRNA 应用于法医体液鉴别的潜力以来, 越来越多的体液特异性 miRNA 被筛选和验证^[2-5]。体液鉴别是法医学中的一个重要课题, 它可以为犯罪现场重建、嫌疑人排除、受害者辨认等提供重要的线索和证据。目前法医学借助特异性 miRNA 对未知样本进行体液鉴别主要依靠的是实时荧光定量 PCR (real time fluorogenic quantitative PCR) 检测技术。该方法可以高效灵敏地定量检测低丰度表达的 miRNA 分子, 也被称为法医学定量检测 miRNA 的金标准^[6-7]。但目前使用该技术的相关研究大多采用单独逆转单重扩增的检测方式, 当实验中需要对多个 miRNA 标记进行同时检测时, 就不可避免地需要进行多个单重检测反应^[8-11]。同时犯罪现场中提取到的检材往往是微量的, 此时往往需要对其等分或者进行稀释, 而这两种策略都是以降低灵敏度为代价。此外, 并行多个单重分析会成倍地增加工作量、各项成本以及错误风险, 不利于将相应的研究成果真正

意义的应用到法医实践中。基于以上原因, 建立起 miRNA 多重实时荧光定量 PCR 检测体系可以使其在兼顾准确的同时更高效地对 miRNA 进行检测。

血液 (血痕) 是犯罪现场中最为常见的检材, 在一些性侵案中确定血痕是暴力损伤性出血还是女性正常的生理性出血造成的对于确定案件性质以及犯罪现场重建都有着十分重要的意义^[12]。本实验室前期基于 miR-451a/miR-21-5p 的表达量关系鉴别月经血 (menstrual blood, MB) 与外周血 (peripheral blood, PB) 的方法以及单重实时荧光定量 PCR 检测技术, 成功实现了对 PB 和 MB 的 100% 鉴别^[10-11], 但该检测方法需要分别对两种 miRNA 进行定量检测。本文在此基础上, 进一步建立了可同时定量 miR-451a 和 miR-21-5p 的双重检测体系, 并对其鉴别能力和实际应用能力进行了验

* 国家重点研发计划 (2022YFC3341002) 和公安部科技强警基础工作专项 (2022JC11) 资助项目。

** 通讯联系人。

廉洁 Tel: 010-83903363, E-mail: rlianjie@163.com

孙启凡 Tel: 010-66269531, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

收稿日期: 2023-05-29, 接受日期: 2023-10-07

证。结果表明, 该检测体系具有良好的特异性、重复性和准确度, 同样可以 100% 区分 PB 和 MB, 同时还大大节省了实验时间和样本消耗, 为建立更多重 miRNA 的实时荧光定量 PCR 检测体系提供了思路 and 参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集

依据知情同意原则, 本实验共采集国内北方地区 25~35 岁志愿者样本 64 份, 其中 PB 样本和 MB 样本各 23 份, 唾液 (saliva, SA) 样本、精液 (semen, SE) 样本和阴道分泌物 (vaginal secretion, VA) 样本各 6 份。58 份用作构建鉴别方法, 剩余 6 份 (3PB, 3MB) 被制作成模拟案件样本验证 58 份样本数据所得到的鉴别方法的准确性。

样本采集已通过公安部物证鉴定中心伦理委员会审查批准。样本的采集均符合研究要求和操作规范, 制备处理后置于 -80℃ 冰箱中备用^[11]。

1.1.2 制备标准品及引物探针

从 miRBase 数据库中查询并下载 miR-451a 与 miR-21-5p 的序列信息, 结合引物探针设计原则和 miRNA 的自身特殊属性^[13-17], 使用在线软件 OligoAnalyzer™ Tool 和软件 Primer Express 3.0 自行设计适用于双重检测的茎环逆转录引物、实时荧光定量 PCR 引物 (通用正向引物、特异性反向引物) 以及 TaqMan-MGB 探针 (表 1)。以上材料委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。miR-451a、miR-21-5p、miR-891a-5p、miR-144-5p、miR-203a-3p 和 miR-320a-3p 标准品由本实验室前期委托宝日医生物技术 (北京) 有限公司合成并于 -80℃ 冰箱中储存^[18-19]。

Table 1 Sequences of miR-451a and miR-21-5p themselves and their primers/probes

miRNA	Information type	Sequences
has-miR-451a	RNA sequence	AAACCGUUAACCAUACUGAGUU
	Reverse transcription primer (miR-451a-RT)	GTCGTATCCAGAGACTTAGGACCGA CCGTGTCTCTGGATACGACAACCTCAG
	Forward primer (F)	AGACTTAGGACCGACCGTG
	Reverse primer (miR-451a-R)	ACCTCCGAAACCGTTACCAT
	Fluorescent probe (miR-451a-P)	6-FAM-TGGATACGACAACCTCAGT-MGB
has-miR-21-5p	RNA sequence	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
	Reverse transcription primer (miR-21-5p-RT)	GTCGTATCCAGAGACTTAGGACCGA CCGTGTCTCTGGATACGACTCAACAT
	Forward primer (F)	AGACTTAGGACCGACCGTG
	Reverse primer (miR-21-5p-R)	TCCGCCGTAGCTTATCAGACT
	Fluorescent probe (miR-21-5p-P)	VIC-GATACGACTCAACATC-MGB

1.2 方法

1.2.1 RNA提取与定量

选用 miRNeasy mini 试剂盒 (Qiagen, 德国) 提取样本的总 RNA^[20], 震荡离心后通过 NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定其浓度并通过纯度 (A_{260}/A_{280}) 判断提取的 RNA 质量。

1.2.2 逆转录

选用 TaqMan™ MicroRNA 逆转录试剂盒 (Thermo Fisher, 美国) 进行复合逆转录实验合成 cDNA。15 μl 反应体系包括: 10× 逆转录缓冲液 1.5 μl、Multiscribe™ 逆转录酶 (50 U/μl) 1.00 μl、RNase 抑制剂 (20 U/μl) 0.19 μl、dNTP mix (100 mmol/L) 0.15 μl、miR-451a-RT 与 miR-21-5p-

RT (1 μmol/L) 各 0.75 μl、无核酸酶水 5.66 μl、样本 5 μl (总 RNA 含量为 10 ng)。程序运行条件为: 16℃、30 min, 42℃、30 min, 85℃、5 min。运行完成后置于 4℃ 保存。将样本替换为无核酸酶水, 设置无模板阴性对照 (no template control, NTC)。

1.2.3 双重qPCR反应体系的建立和优化

对 miR-451a 和 miR-21-5p 的混合标准品 (各含 5 ng) 进行逆转录实验, 接着使用 QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR 仪运行该实时荧光定量 PCR 反应, 反应体系包括: TaqMan™ Universal Master Mix II (no UNG) 5 μl、miR-451a 正反向引物各 0.4 μl (终浓度均为 400 nmol/L)、miR-21-5p 正反向引物各 0.4 μl (终浓度均为 400 nmol/L)、miR-451a-P 与 miR-21-5p-P 各 0.3 μl (终浓度均为

300 nmol/L)、cDNA 模板 0.67 μ l、无核酸酶水 2.13 μ l。扩增反应程序为：50°C 2min, 95°C 10 min; 95°C 15 s, 57°C 1 min, 72°C 30 s, 循环 40 次。

在保证以上双重实时荧光定量 PCR 反应体系中其他条件不变的情况下重点优化引物终浓度 (100、200、300、400、500 nmol/L) 和探针终浓度 (100、200、300、400 nmol/L), 并设置阴性对照组 (将 cDNA 替换为 NTC 组产物)。以上所有检测均重复 3 次, 尽可能减少操作误差。

1.2.4 构建标准曲线

使用 miR-451a 和 miR-21-5p 的混合标准品 (各含 5 ng) 先进行 8 个梯度的 5 倍连续稀释, 再继续后续的双重实时荧光定量 PCR 扩增实验, 最终根据中间 6 个梯度的实验数据制作 miRNA 定量循环 (quantification cycle, Cq) 均值和起始拷贝数对数值 ($\lg(\text{copies}/\mu\text{l})$) 间的标准曲线 (所有梯度均重复 3 次实验), 其中各梯度下标准品起始拷贝数根据公式 $\text{Copies}/\mu\text{l} = N_A \times C / M_w$ 计算得到。 N_A 是阿伏伽德罗常数, 计算时取 6.02×10^{23} ; C 为标准品稀释后的浓度 ($\text{g}/\mu\text{l}$); M_w 为分子质量 (g/mol)。

1.2.5 验证扩增效率

对逆转录产物使用无核酸酶水进行连续 5 倍梯度稀释进行后续双重扩增实验并制作 qPCR 扩增效率曲线 (所有梯度均重复 3 次实验), 并根据公式 $E = (10^{1/k} - 1) \times 100\%$ 计算各自的扩增效率。 E 代表效率 (efficiency), k 是斜率。

1.2.6 特异性分析

分别以 miR-891a-5p、miR-144-5p、miR-203a-3p、miR-320a-3p 标记的标准品作为反应模板, miR-451a 和 miR-21-5p 标准品作为阳性对照, 无核酸酶水作为阴性对照进行双重实时荧光定量 PCR 检测, 检验其特异性。

1.2.7 重复性分析

选取用于建立标准曲线的 6 个梯度浓度混合标准品为阳性模板, 以无核酸酶水为阴性对照模板, 进行同一批次和不同批次的双重实时荧光定量 PCR 扩增 (均重复 3 次实验), 计算批内和批间变异系数。

1.2.8 样本数据处理

对 40 份血液样本和 18 份非血液样本进行 miR-451a 和 miR-21-5p 的双重实时荧光定量 PCR 检测, 实验数据通过 QuantStudio Real-Time PCR 系统配套软件收集。使用非参数检验 (Mann-Whitney U 检

验) 进行外周血与月经血、血与非血的差异性的分析, $P < 0.05$ 说明两者差异具有统计学意义。同时通过受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线的曲线下面积 (area under the receiver operating characteristic curve, AUC) 评估该检测体系的体液鉴别能力以及确定最佳截断值。

1.2.9 灵敏度检测

取 15 份样本 (PB、MB、SA、SE、VA 各 3 份), 对其从 10 ng 开始进行 10 倍梯度稀释 (10、1、0.1、0.01、0.001 ng) 来进行后续灵敏度检测。目的是确定在 miR-451a/miR-21-5p 拷贝数之比 (451/21Ratio) 结果符合判别标准的前提下双重 qPCR 检测体系在每种体液中的检测极限。

1.2.10 准确性验证

随机选择 20 份血样 (PB 和 MB 各 10 份), 分别使用单重和双重检测体系进行 miR-451a 和 miR-21-5p 的检测, 并对 451/21Ratio 进行比较。

1.2.11 模拟案件样本检测

为进一步验证双重实时荧光定量 PCR 检测体系的实际应用能力, 分别制备 PB 与 MB 模拟案件样本各 3 份 (吸取 50 μ l PB 制成血卡, 剪取 2 cm^2 的带血卫生棉), 并将其放置在室外自然条件下 1、4、8 d 后提取 RNA, 然后按照优化好的双重体系进行检测。

2 结 果

2.1 双重 qPCR 反应体系优化

通过对双重实时荧光定量 PCR 反应体系中的引物探针浓度的重点优化, 最终确定了适用于检测 miR-451a 和 miR-21-5p 的双重实时荧光定量 PCR 反应体系 (表 2)。

Table 2 Components of duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system

System component	Volume/ μ l
TaqMan TM Universal Master Mix II (no UNG)	5.00
F (10 μ mol/L)	0.60
miR-451a-R (10 μ mol/L)	0.30
miR-21-5p-R (10 μ mol/L)	0.30
miR-451a-P (10 μ mol/L)	0.20
miR-21-5p -P (10 μ mol/L)	0.20
cDNA template	0.67
Nuclease-free water	2.73

扩增反应程序为: 50°C 2 min, 95°C 10 min; 40次热循环 (95°C 15 s, 57°C 1 min, 72°C 30 s)。同时, 在该反应条件下阴性对照组没有出现扩增曲线。

2.2 建立标准曲线

miR-451a与miR-21-5p的标准曲线计算公式分别为 $y=-4.869x+63.73$ 和 $y=-4.719x+61.14$, R^2 均超过0.99 (图1a, b)。两条标准曲线均具有良好且较大的线性动态范围。

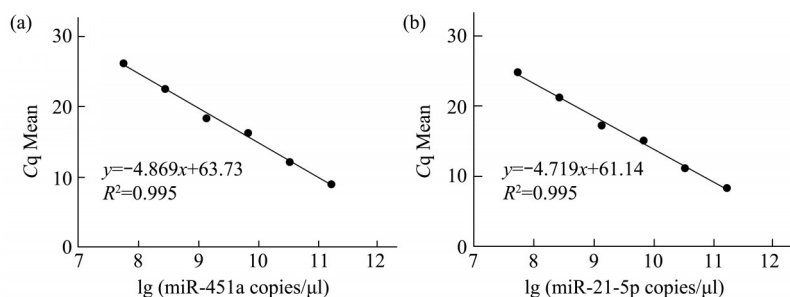


Fig. 1 Standard curve of duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay

(a) miR-451a; (b) miR-21-5p.

2.3 验证扩增效率

对稀释好的标准品产物进行优化好的双重qPCR反应并制作miR-451a与miR-21-5p的扩增效率

率曲线 (图2a, b)。两曲线的扩增效率分别为71.77%和74.81%, 且 R^2 均达到了0.998。

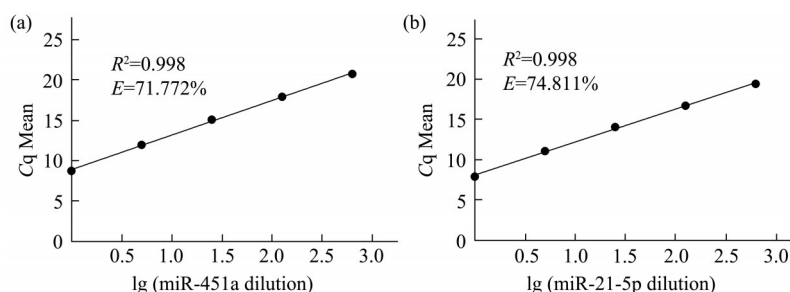


Fig. 2 Amplification efficiency diagram of duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay

(a) miR-451a; (b) miR-21-5p.

2.4 特异性分析

使用优化好的双重实时荧光定量PCR检测体系对miR-451a、miR-21-5p、miR-891a-5p、miR-144-5p、miR-203a-3p、miR-320a-3p标记的标准品进行特异性检测, 结果显示只有miR-451a和miR-21-5p两标记出现扩增曲线, 其余标记和阴性对照没有出现扩增, 说明该双重检测体系具有良好的特异性 (图3)。

2.5 重复性验证

使用已经优化的双重实时荧光定量PCR方法

对选取的各浓度梯度混合标准品进行批内和批间重复实验。结果显示两组实验变异系数均在8%以下, 说明实验结果可重复性高^[21-22], 所建立的双重实时荧光定量PCR方法具有良好的重复性 (表3)。

2.6 样本鉴别能力分析

将451/21 Ratio定义为成miR-451a和miR-21-5p的拷贝数之比, 其中miR-451a和miR-21-5p的含量可分别通过其标准曲线得到^[10], 451/21 Ratio计算公式如下所示:

$$451/21 \text{ Ratio} = \frac{\text{miR-451a Copies}}{\text{miR-21-5p Copies}} = \frac{10^{\frac{63.73 - (\text{miR-451a } Cq \text{ Mean})}{4.869}}}{10^{\frac{61.14 - (\text{miR-21-5p } Cq \text{ Mean})}{4.719}}}$$

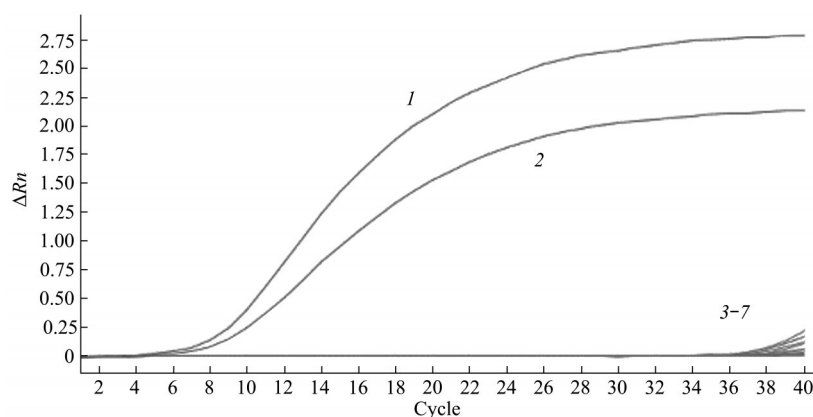


Fig. 3 Specificity test results of duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay

1: miR-21-5p; 2: miR-451a; 3-6: miR-891a-5p, miR-144-5p, miR-203a-3p, miR-320a-3p; 7: nuclease-free water.

Table 3 Repeatability test results

miRNA	Dilution multiple	Intra-batch variability			Inter-batch variability		
		Mean	SD	CV/%	Mean	SD	CV/%
miR-451a	25	12.26	0.04	0.30	12.19	0.20	1.61
	125	16.33	0.07	0.43	15.54	0.73	4.69
	625	18.46	0.07	0.37	19.4	0.68	3.49
	3 125	22.64	0.06	0.28	24.14	1.71	7.10
	15 625	26.31	0.07	0.27	28.66	1.75	6.12
	78 125	29.15	0.07	0.23	32.2	2.52	7.82
miR-21-5p	25	11.19	0.08	0.68	11.3	0.09	0.84
	125	15.13	0.03	0.17	14.55	0.61	4.17
	625	17.3	0.03	0.15	18.27	0.69	3.78
	3 125	21.3	0.02	0.08	22.71	1.5	6.59
	15 625	24.94	0.04	0.16	27.07	1.51	5.58
	78 125	27.87	0.05	0.18	30.59	2.19	7.16

对提取的58份样本进行miR-451a与miR-21-5p的双重扩增并对得到的数据进行比值计算以评估其应用效果。其中40份血液样本与18份非血液样本的451/21 Ratio比较结果显示血液样本的比值显著大于非血液样本,且两者具有显著性差异($P < 0.0001$) (图4a)。20份月经血样本与20份外周血样本的451/21 Ratio比较结果显示外周血样本比值整体大于月经血样本的比值,两者同样具有显著性差异($P < 0.0001$) (图4b)。

对实验数据进行ROC分析,血与非血、月经

血与外周血的ROC曲线的AUC均为1。这表明基于miRNA双重实时荧光定量PCR检测体系得到的数据在采用该鉴别方法后对血与非血、月经血与外周血同样有100%的鉴别效果(图5a, b)。同时,血与非血、月经血与外周血的最佳截断值分别为2.989和16.240,即该双重实时荧光定量PCR检测体系的体液判别标准如下所示:当 $0 < 451/21 \text{ Ratio} < 2.989$ 时,判别为非血液样本, $2.989 < 451/21 \text{ Ratio} < 16.24$ 时,判别为月经血,当 $16.24 < 451/21 \text{ Ratio}$ 时,判别为外周血。

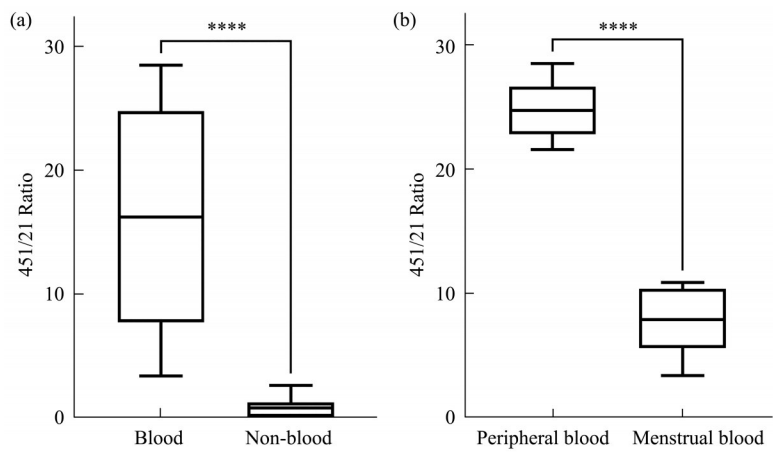


Fig. 4 Sample detection results
(a) Blood and non-blood samples; (b) peripheral blood and menstrual blood samples. **** $P<0.0001$.

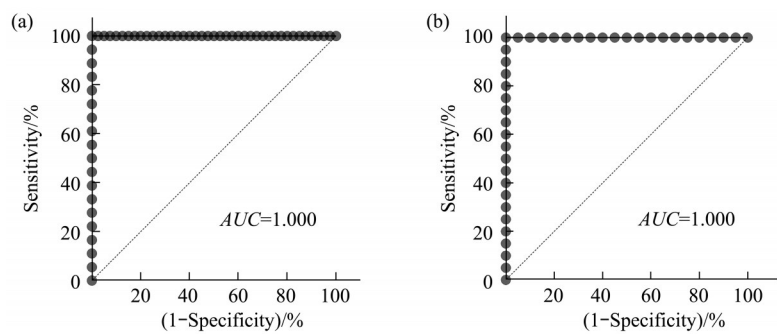


Fig. 5 ROC analysis results
(a) Blood and non-blood samples; (b) peripheral blood and menstrual blood samples.

2.7 灵敏度检测

由于该实验为同时检测两个标记,所以检材不仅需要满足该样本类型下灵敏度偏低的单个标记所需的总RNA用量,同时451/21 Ratio结果还需要符合该双重实时荧光定量PCR检测体系的判别标准(表4),即外周血和月经血至少需要0.1 ng总

Table 4 The sensitivity of miR-451a, miR-21-5p and 451/21 Ratio in 5 body fluid

Sample type	Minimum amount of sample/ng		
	miR-451a	miR-21-5p	451/21 Ratio
PB	0.01	0.01	0.1
MB	0.01	0.01	0.1
SA	1	1	1
SE	1	0.1	1
VA	1	1	1

RNA,唾液、精液和阴道分泌液至少需要1 ng总RNA。

2.8 准确性验证

对经过双重和单重检测的20个血液样本的451/21 Ratio结果进行配对 t 检验,两组数据差异无统计学意义($P>0.05$)(表5),说明该双重实时荧光定量PCR检测体系所得结果与单重检测的结果准确性一致。

2.9 模拟案件样本检测

对模拟放置在室外自然条件下1、4、8 d的血液样本进行双重实时荧光定量PCR检测(表6)。结果显示3个时间梯度下的模拟样本均能够根据该体系的判别标准进行体液的准确判别,表明该双重检测体系具有应用于法医实践的潜力。

Table 5 451/21 Ratio detection results in different systems

Sample type	Single detection	Duplex detection
PB	25.64	26.78
	25.66	26.36
	23.21	22.99
	27.77	26.07
	23.88	22.76
	22.74	23.28
	24.97	24.84
	21.34	21.59
	23.29	23.43
	22.79	21.71
MB	11.79	7.58
	7.32	8.15
	5.12	6.56
	8.21	8.25
	2.4	3.47
	6.25	8.87
	3.36	4.26
	3.45	4.33
	5.07	5.68
	9.42	10.64

Table 6 451/21 Ratio detection results of simulated samples under different placement times

Sample type	Placement time		
	1 d	4 d	8 d
PB	29.37	28.45	25.33
	26.91	28.29	27.36
	26.36	27.93	24.04
MB	4.41	4.53	3.31
	11.99	9.12	13.96
	8.05	10.40	11.63

3 讨 论

近年来伴随分子生物学的快速发展,实时荧光定量PCR已经逐渐成为核酸定量检测中至关重要的技术。传统意义上的多重实时荧光定量PCR技术是在同一反应体系内使用多组特异性引物和探针,并利用多荧光通道的实时荧光定量PCR仪同时检测两个或两个以上分子标记。多重实时荧光定量PCR技术的出现和应用显著的降低了实验成本,并大大提高检测效率。相较于单重实时荧光定量PCR扩增,多重实时荧光定量PCR技术面临的最大挑战是避免多组引物之间形成二聚体或探针错配,从而导致非特异性扩增、扩增效率降低、检测灵敏度和特异性下降。为解决此问题,一方面需优

化各引物序列以减少二聚体的形成,另一方面需优化反应体系中各组分的用量及反应条件,以尽可能提高扩增效率并保持一致性。

尽管在长链RNA或DNA分子上多重实时荧光定量PCR技术已经有了较多应用^[23-25],但是目前国内外有关miRNA的多重实时荧光定量PCR检测方法却较为稀少^[26]。犯罪现场所遗留的体液斑迹往往是微量的,借助实时荧光定量PCR技术进行体液鉴别往往需要对检材中多个特异性miRNA标记以及内参基因进行检测分析。多重实时荧光定量PCR技术能够有效解决传统单重实时荧光定量PCR同时定量多种miRNA时检材不足和消耗成倍试剂的问题,实现等量检材和试剂对多个标记进行检测,在法医学方向的应用前景十分广阔。本实验室前期利用SYBR Green染料法和单重TaqMan探针法开创性的建立了一种基于两种miRNAs表达量比值的月经血与外周血鉴别方法^[10-11]。为进一步探索miRNA多重实时荧光定量PCR扩增的适用性以及优化该实验方法,本文在之前的基础上建立了一种miRNA双重实时荧光定量PCR检测体系。本研究首先根据miR-451a和miR-21-5p的序列特点及相关设计原则自主设计了更适合于双重实时荧光定量PCR的引物以及探针。随后重点对引物和探针浓度进行了优化,优化首先要保证阴性对照无扩增,同时在该条件下荧光曲线拥有良好的扩增效果以及较低的C_q值。在出现荧光强度和C_q值接近的条件时,优先考虑低浓度条件,这样一方面是节省耗材,一方面也能将双重扩增中引物探针间可能存在的竞争抑制和相互干扰降到最低。优化完成的双重检测体系具有较强的特异性和可重复性,检测得到的样本数据与单重检测体系之间没有显著性差异。从鉴别能力来看,该双重检测体系依旧能够实现血液与非血液、月经血与外周血样本的100%正确区分,且双重检测体系用于区分外周血与月经血的最佳截断值16.24与单重检测体系的16.57基本一致^[11],同时其灵敏度相较于前期的单重体系也提高了一倍^[10]。除此之外,本文还模拟了在室外自然条件下不同放置时间的血液检材,结果显示18个样本均能够精确鉴别,进一步验证了该检测体系的鉴别能力和应用潜力。

4 结 论

本文成功建立了miRNA双重实时荧光定量PCR检测体系。使用该体系对样本进行检测时,

相同样本所需的实验时间以及实验耗材缩减至原来的一半,这使得样本的检测既快速又节省,实现了实验效率与经济性的双重提升,为法医体液鉴别提供了一种更高效、可靠的工具,也为后续建立更多重的qPCR检测体系并应用于法医体液分析打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Kakimoto Y U, Kamiguchi H, Ochiai E, *et al.* MicroRNA stability in postmortem FFPE tissues: quantitative analysis using autoptic samples from acute myocardial infarction patients. *PLoS One*, 2015, **10**(6): e0129338
- [2] Hanson E K, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*, 2009, **387**(2): 303-314
- [3] Zubakov D, Boersma A W M, Choi Y, *et al.* MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*, 2010, **124**(3): 217-226
- [4] Wang Z, Zhang J, Luo H, *et al.* Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*, 2013, **7**(1): 116-123
- [5] Park J L, Park S M, Kwon O H, *et al.* Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis*, 2014, **35**(21-22): 3062-3068
- [6] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, **6**(10): 986-994
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408
- [8] 何红霞,季安全,韩娜,等. 基于 microRNA 表达量及判别分析的外周血与月经血鉴别. *法医学杂志*, 2020, **36**(4): 514-518+524
He H X, Ji A Q, Han N, *et al.* *J Forensic Med*, 2020, **36**(4): 514-518+524
- [9] 王国力,刘扬,何红霞,等. 基于 miRNA 相对表达量自动判别月经血和外周血. *刑事技术*, 2021, **46**(6): 566-572
Wang G L, Liu Y, He H X, *et al.* *Forensic Sci Technol*, 2021, **46**(6): 566-572
- [10] Wang G, Wang Z, Wei S, *et al.* A new strategy for distinguishing menstrual blood from peripheral blood by the miR-451a/miR-21-5p ratio. *Forensic Sci Int Genet*, 2022, **57**: 102654
- [11] 陈惠香,魏孙祥,王哲,等. 基于 miR-451a/miR-21-5p 的表达量关系鉴别月经血与外周血. *中国法医学杂志*, 2022, **37**(5): 476-480+484
Chen H X, Wei S X, Wang Z, *et al.* *Chin J Forensic Med*, 2021, **37**(5): 476-480+484
- [12] Li Z, Bai P, Peng D, *et al.* Screening and confirmation of microRNA markers for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, **30**: 24-33
- [13] Abd-Elsalam K A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol*, 2003, **2**(5): 91-95
- [14] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(20): e179
- [15] Yang H, Schmuke J J, Flagg L M, *et al.* A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs. *Plant Biotechnol J*, 2009, **7**(7): 621-630
- [16] Balcells I, Cirera S, Busk P K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*, 2011, **11**: 70
- [17] Álvarez-Fernández R. Explanatory chapter: PCR primer design. *Methods Enzymol*, 2013, **529**: 1-21
- [18] Liu Y, He H, Xiao Z X, *et al.* A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief Bioinform*, 2021, **22**(4): bbaa324
- [19] Wei S, Hu S, Han N, *et al.* Screening and evaluation of endogenous reference genes for miRNA expression analysis in forensic body fluid samples. *Forensic Sci Int Genet*, 2023, **63**: 102827
- [20] 李冉冉,王兵,胡胜,等. 不同 RNA 提取方法的效能比较. *刑事技术*, 2018, **43**(6): 431-435
Li R R, Wang B, Hu S, *et al.* *Forensic Sci Technol*, 2018, **43**(6): 431-435
- [21] Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*. 8th ed. Boston: Brooks/Cole, 2015
- [22] Van Hooff M, Meijer E J, Scheltinga M R M, *et al.* Test-retest reliability of skeletal muscle oxygenation measurement using near-infrared spectroscopy during exercise in patients with sport-related iliac artery flow limitation. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2022, **42**(2): 114-126
- [23] Standish I, McCann R, Puzach C, *et al.* Development of duplex qPCR targeting *Carnobacterium maltaromaticum* and *Vagococcus salmoninarum*. *J Fish Dis*, 2022, **45**(5): 667-677
- [24] Leurs K, Goossens E, Christensen H, *et al.* Development of a duplex qPCR for the differentiation of a live attenuated *Escherichia coli* aroA mutant vaccine strain from field isolates in chickens. *PLoS One*, 2022, **17**(12): e0278949
- [25] Wu Y, Wang F, Wang C, *et al.* Detection of *Pneumocystis jirovecii* and *Toxoplasma gondii* in patients with lung infections by a duplex qPCR assay. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, **15**(12): e0010025
- [26] Jet T, Gines G, Rondelez Y, *et al.* Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs. *Chem Soc Rev*, 2021, **50**(6): 4141-4161

Establishment and Application of a Duplex Real Time Fluorogenic Quantitative PCR Assay System for miR-451a and miR-21-5p*

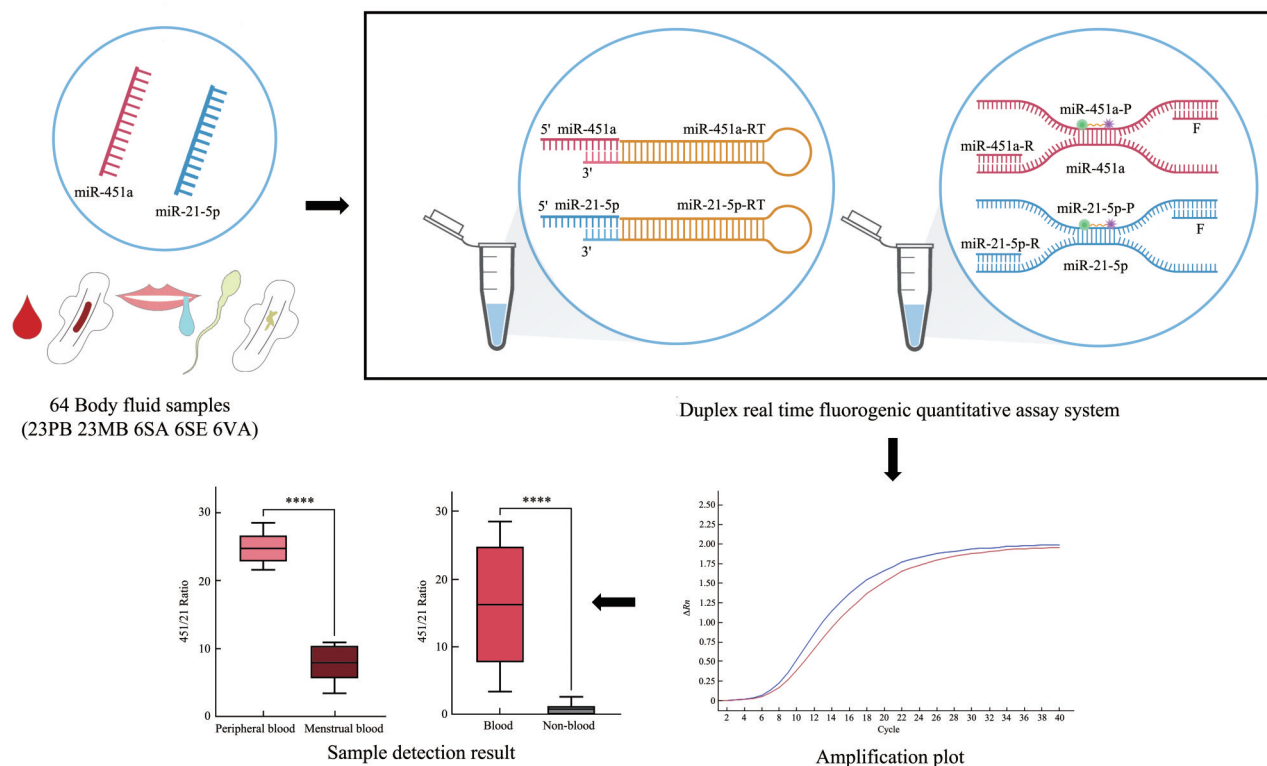
HU Shu-Xiao^{1,2)}, CHEN Hui-Xiang^{2,3)}, HU Sheng²⁾, ZHAO Yi-Xia²⁾, JI An-Quan²⁾, LI Yang²⁾,
LIAN Jie^{1)**}, SUN Qi-Fan^{2)**}

⁽¹⁾School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China;

⁽²⁾MPS's Key Laboratory of Forensic Genetics, National Engineering Laboratory for Crime Scene Evidence Investigation and Examination, Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security (MPS), Beijing 100038, China;

⁽³⁾School of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Body fluid stains left at crime scenes are frequently trace amounts, while the identification of body fluids through real time fluorogenic quantitative technique often necessitates the repeated detection within the limited sample, as multiple miRNA markers are the basis for the identification. Based on the

* This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (2022YFC3341002) and Grants from Ministry of Public Security, China (2022JC11).

** Corresponding author.

LIAN Jie. Tel: 86-10-83903363, E-mail: rlianjie@163.com

SUN Qi-Fan. Tel: 86-10-66269531, E-mail: sunqifan@cifs.gov.cn

Received: May 29, 2023 Accepted: October 7, 2023

goal of both the throughput and efficiency improvement of miRNA analysis in trace samples, a duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system was designed to accurately quantify two miRNAs simultaneously, and the system should be further verified by actual sample for the body fluid identification. **Methods** The duplex real time fluorogenic quantitative PCR system of miR-451a to miR-21-5p was established with specially designed primers and probes, and the concentrations of the primers and probes were both optimized. The specificity, sensitivity and reproducibility of the system were validated, while its capability for body fluid identification was assessed using the miR-451a to miR-21-5p ratio. **Results** The optimized assay system exhibited excellent specificity and repeatability, with coefficients of variation consistently below 8% for both intra- and inter-batch variability. The amplification efficiency of miR-451a and miR-21-5p reached 71.77% and 74.81%, respectively, with high and relatively consistent results. By utilizing this duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system, a total of 58 body fluid samples were analyzed, exhibiting a discrimination rate of 100% between blood and non-blood samples, as well as between peripheral blood and menstrual blood samples. Moreover, the results, obtained from single real time fluorogenic quantitative PCR assay system and duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system, showed no statistically significant difference with randomly selected blood samples ($n=20$). Compared to previous single real time fluorogenic quantitative PCR assay system, the sensitivity of duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system exhibited remarkable improvement. A minimum input of only 0.1 ng total RNA was sufficient for accurate detection of peripheral blood and menstrual blood samples, while saliva, semen, and vaginal secretion required only 1 ng total RNA for precise identification purposes. Additionally, the duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system successfully differentiated between different types of body fluids in simulated samples under natural outdoor conditions. **Conclusion** The duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay system effectively reduced both the time and material costs by half compared to the single system, especially suitable for the examination of body fluid stains left at crime scenes, solving the contradiction between the trace amount and the multiple sample volumes demand of repeated real time fluorogenic quantitative PCR. The duplex real time fluorogenic quantitative PCR assay successfully distinguished blood and other body fluid, as well as peripheral blood and menstrual blood samples, which maintains an equivalent capability for body fluid identification with half sample, time and reagent consumption. This system provides an efficient tool for identifying suspicious body fluids, as well as a foundation for more multiplexed real time fluorogenic quantitative PCR assay system research.

Key words forensic genetics, body fluid identification, duplex real time fluorogenic quantitative PCR, microRNA

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0211