

使用安捷伦生物分析仪和 SurePrint miRNA 微阵列芯片分析外泌体 miRNA

作者

Yayoi Fukuoka 和 Allant Kodaka
安捷伦科技（日本）有限公司

摘要

外泌体 microRNA (miRNA) 是一种独特的 RNA，在细胞间通讯中发挥着重要的作用，由于其被包裹在外泌体中，可避免被 RNA 酶降解。最近，外泌体 miRNA 作为液体活检的微创生物标志物引起了极大的关注。然而，对这些 miRNA 的检测或分析面临着极大挑战，部分原因是它们的丰度较低。在本研究中，我们考察了多种试剂盒从富含外泌体的 1 mL 或 3.7 mL 血清中提取 RNA 的能力，然后使用 2100 生物分析仪进行质量控制 (QC)，并使用 SurePrint G3 人 miRNA 微阵列芯片对 miRNA 进行分析。我们的数据表明，外泌体 RNA 可被生物分析仪检测，显示为弥散峰。此外，我们还使用 SurePrint G3 人 miRNA 微阵列芯片分析了从癌症患者和正常对照的 2 mL 血清中提取的差异表达 miRNA。本研究表明，安捷伦 miRNA 微阵列芯片是一种检测和分析液体活检中 miRNA 的强大工具，无需修改标准的微阵列芯片流程。

前言

外泌体是一种小囊泡，在细胞间通讯中发挥着重要的作用，近年来被用作液体活检中的分析物。外泌体还会转运 RNA（包括 miRNA），保护 RNA 不被 RNA 酶降解。虽然外泌体和外泌体 RNA 的功能尚不明确，但据报道，癌细胞释放的外泌体 miRNA 可能与肿瘤发生和转移有关，并可能诱导其他细胞产生耐药性^[1]。因此，外泌体 miRNA 具有作为非侵入式生物标志物的潜力，但由于它们的浓度较低，可能低于传统分光光度计的检测限，因而对它们的分析较为困难^[2]。安捷伦为 miRNA 分析提供了从样品 QC 到最终分析的完整工作流程。此工作流程包括 Agilent 2100 生物分析仪、SurePrint miRNA 微阵列芯片平台和 GeneSpring GX 软件。Agilent 2100 生物分析仪是一种电泳仪，能够利用微流控芯片分析各种浓度的 DNA 和 RNA。安捷伦 miRNA 微阵列芯片平台是直接检测组织、细胞和 FFPE 样品中 miRNA 的有效工具，无需逆转录和扩增。在本研究中，我们考察了几种用于从血清中提取外泌体 RNA 的市售试剂盒，并通过生物分析仪 RNA 6000 Pico 分析试剂盒对这些样品进行了评估。此外，我们使用 SurePrint miRNA 微阵列芯片对这些样品进行了分析，以鉴定癌症患者和正常对照之间差异表达的 miRNA。

实验部分

外泌体 RNA 由 DNA Chip Research Inc. 从市售血清 (PromedDx) 中提取。血清样品于 -80°C 储存; 解冻后, 使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤以除去污染物。

我们使用多种市售试剂盒评估了从 3 个正常样品中提取的外泌体 RNA (A、B 和 C; 女性、白种人和 70 多岁的老年人)。用于评估的提取试剂盒和血清用量汇总于表 1 中。为了检测通过微阵列芯片检测到的 miRNA 数量, 使用 exoRNeasy Maxi 试剂盒 (Qiagen) 从 1 mL 或 2 mL 血清中提取正常样品 A。为了分析差异表达的 miRNA, 使用了 6 种血清样品 (正常样品 A、B 和 C; 癌症患者样品 D、E 和 F), 各 2 mL。按照制造商说明书进行提取。

提取的所有 RNA 样品在安捷伦生物分析仪上使用 RNA 6000 Pico 分析试剂盒 (安捷伦部件号 5067-1513) 进行电泳。使用通用 miRNA 参比 RNA (安捷伦部件号 750700, 在本简报中也被称为 miR UniRef) 作为电泳的阳性对照, 以评估样品缓冲液中盐或其他污染物可能产生的影响 (可能影响 Pico 分析生成的电泳图)。提取后, 通过快速真空浓缩 RNA 样品, 并使用不含核酸酶的水 (赛默飞世尔科技, 部件号 10977015) 稀释至 $9\ \mu\text{L}$ 。

我们对 $2\ \mu\text{L}$ 浓缩 RNA 样品进行了标记, 并按照制造商的实验方案 (安捷伦 miRNA 微阵列芯片方案 3.1.1 版, G4170-90011) 与 SurePrint G3 人 miRNA 微阵列芯片 $8 \times 60\ \text{K Rel. 21.0}$ 杂交。由于 RNA 浓度较低, 难以定量, 因此我们通过体积 ($2\ \mu\text{L}$) 而不是总 RNA 量实现样品起始量的标准化。

向每份 RNA 样品中加入标记加标物 (miRNA 加标试剂盒的一部分, 安捷伦部件号 5190-1934), 然后使用 miRNA 完全标记和杂交试剂盒 (安捷伦部件号 5190-0456) 用 Cy3-pCp 标记 RNA 样品。标记的样品使用 MicroBio Spin 6 色谱柱纯化 (BioRad 部件号 732-6221)。使用杂交加标物 (miRNA 加标试剂盒的一部分, 部件号 5190-1934) 在 55°C 下将纯化的样品与 miRNA 微阵列芯片杂交 20 小时。

作为实验的阳性对照, 对 $100\ \text{ng}$ miR UniRef 进行标记, 并与每个玻片的两个微阵列杂交。杂交后, 按照标准方案清洗微阵列芯片, 并使用 Agilent SureScan DNA 微阵列芯片系统进行扫描。使用安捷伦特征提取软件和 Agilent GeneSpring GX 软件分析扫描数据。

由于本研究的目的是评估血清起始量的差异, 因此未在微阵列芯片之间进行标准化。我们注意到, 第 90 百分位移位被推荐用于分析组织和细胞样品的 miRNA 微阵列芯片数据。

结果与讨论

生物分析仪的电泳图显示出弥散峰, 当使用更多血清进行提取时, 总体趋势是检测到更高的峰 (图 1)。

使用两种不同的 Qiagen 试剂盒提取的一些外泌体 RNA 不仅在小 RNA 区域, 而且在高分子量区域表现出多个峰。使用稀释 3 倍的样品重复电泳分析得到了相似的结果 (数据未示出)。由于得到的分子量标准品、miRNA UniRef 和空白的泳道轨迹是正常的 (图 1A 和 1B), 因此这些运行仍然包含在内。使用 Total Exosome Isolation from Serum 和 Total Exosome RNA & Protein Isolation 试剂盒 (赛默飞世尔科技, 部件号 4478360 和 4478545) 提取的 RNA 样品在小 RNA 区域显示出弥散峰。然而, 尽管样品 B 表现出较大的噪声以至于无法检测到 RNA 峰, 但除外泌体 RNA 泳道外还有正常数据, 因此我们判断电泳成功。

表 1. 提取试剂盒和血清量汇总

提取试剂盒	提取的数量	用于提取的血清量 (mL)	色谱柱的最终洗脱体积 (μL)	洗脱物体积 (μL)
exoRNeasy Serum/Plasma Midi 试剂盒 (Qiagen 部件号 77044)	正常 A、B 和 C, 每个 $n = 2$	1	14	10~12.8
exoRNeasy Serum/Plasma Maxi 试剂盒 (Qiagen 部件号 77064)	正常 A、B 和 C, 每个 $n = 2$	3.7	14	11.8~12.6
Total Exosome isolation from serum 和 Total Exosome RNA & Protein Isolation 试剂盒 (赛默飞世尔科技, 部件号 4478360 和 4478545, 本简报中使用 Total Exosome 试剂盒)	正常 A、B 和 C, 每个 $n = 2$	1	100	85.6~100

所有 18 个样品均按照标准 miRNA 微阵列芯片方案进行分析。正如预期，与 miR UniRef 数据相比，外泌体 RNA 样品微阵列芯片的整体信号强度非常低。安捷伦特征提取软件为每个微阵列提供了几个指标，帮助评估微阵列数据的质量。CV% 代表重复探针之间信号强度的变异系数。较低的信号强度往往 CV% 较高，表明给定微阵列中的重现性较低。在本研究中，外泌体 RNA 样品的 CV% 略高于 miR UniRef，但没有超过 15% 的理想值（图 2）。

特征提取软件包含一个经验证的自动化分析工作流程，以确定在从扫描的微阵列芯片图像中提取信号强度的过程中，检测到的每个 miRNA 信号强度是否高于噪声。由于外泌体样品中 RNA 的含量有限，我们预计其生成的信号强度较低。因此，评价的参数之一是检测到的 miRNA 数量（图 3）。正如预期，血清起始量较少时检测到的 miRNA 数量也较低，当增加所用的血清量时，miRNA 的数量成比例地增加。然而，需要强调的是，使用的提取试剂盒和血清起始量在结果中引入了一些变异性，大多集中在低表达的 miRNA。这种偏差最可能与不同方案引入的微小变化相关，并且与这些小分子的固有性质相关。因此，确保相同的血清起始量，并在同一项目内使用相同的 RNA 提取试剂盒非常重要，以便归一化数据和控制实验变异性。

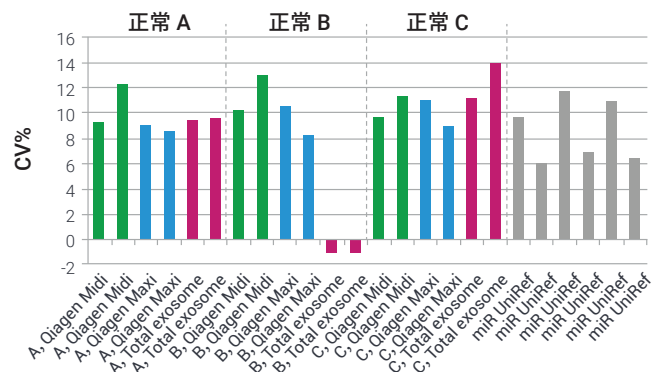


图 2. 每个微阵列中重复探针的 CV%

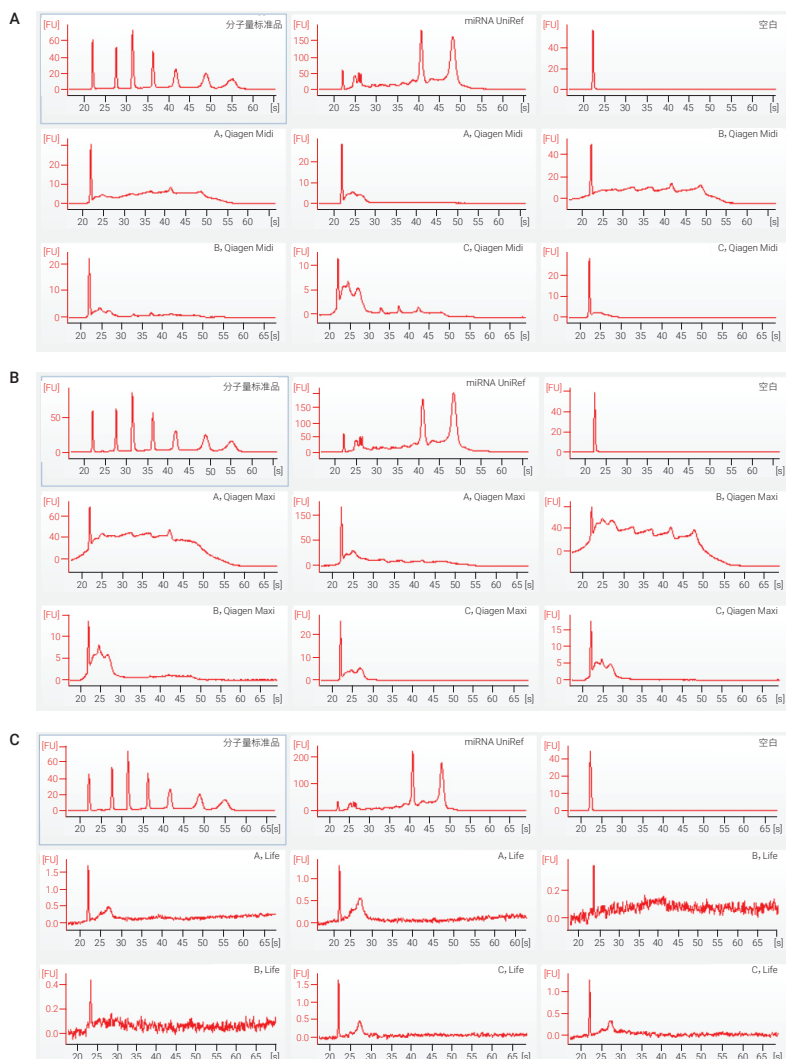


图 1. 通过生物分析仪 RNA 6000 Pico 分析试剂盒测得的外泌体 RNA 电泳图。所有数据包括分子量标准品、miRNA UniRef 和空白泳道。

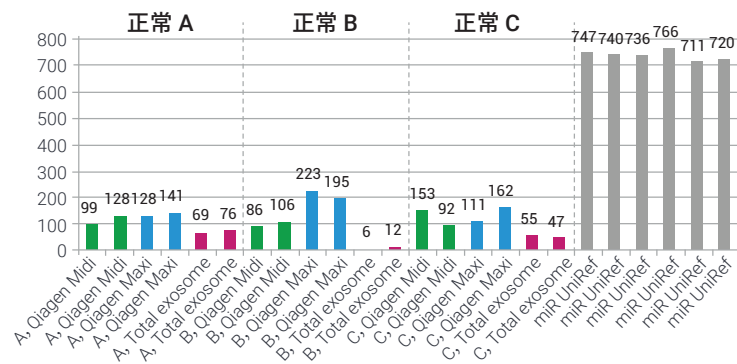


图 3. “检测到的” miRNA 数量

图 4 展示了使用 exoRNA Maxi 试剂盒从 3.7 mL 血清中提取的 6 份样品之间的相关系数（使用 GeneSpring GX 软件计算）。正如预期，来自同一样品的两个数据点之间的重现性高于来自不同样品的数据。这有助于差异表达的检测，同时表明生物分析仪的差异电泳图不会影响微阵列芯片数据。这很可能是由于安捷伦 miRNA 微阵列芯片直接标记 miRNA，并设计用于仅检测成熟 miRNA。与需要多个修饰步骤来检测这类小分子的其他技术相比，这限制了引入样品的偏差。

我们接下来考察了使用安捷伦微阵列芯片平台分析 miRNA 表达所需的血清量。将血清样品 A 分为 6 管，其中 3 管各 1 mL，另外 3 管各 2 mL，然后使用 exoRNAeasy Maxi 试剂盒提取 RNA。通过生物分析仪系统检测到与图 1A 和 1B 相似的弥散峰（数据未示出）。在 1 mL 和 2 mL 血清中均可可靠地检测到 miRNA（图 5）。我们选择使用 2 mL 血清，因为它是一个更实用的体积，并且因为使用更大量的血清和/或洗脱的样品浓缩到 2 μ L 进行标记反应时，可以检测到更多的 miRNA。

差异表达 miRNA 的分析

我们分析了 3 例正常（A、B 和 C）和 3 例肺癌（D、E 和 F）患者样品之间的差异表达 miRNA。每个样品使用 2 mL 血清。为了评估癌症样品起始量的潜在影响，还将 1 mL 样品 F 作为单独样品（样品 G）进行了分析。

与正常样品相比，在癌症样品中检测到的 miRNA 更多（图 6）。3 个生物学重复样品之间的散点图非常紧密，表明各组内具有较高重现性（图 7）。此外，样品 F 和 G 微阵列数据之间的散点图反映了癌症患者不同血清起始量的影响，因为样品 G 绘制在 $\frac{1}{2}$ 线上（图 8）。

一般而言，在生物分析之前对使用的微阵列数据进行归一化有助于减少实验误差。然而，尚未有报道用于归一化样品的对照（如“管家”）外泌体 miRNA。虽然之前有三种 miRNA 被用于血清 miRNA 分析的样品归一化（尽管没有进行外泌体富集）^[3]，但在本研究中，未检测到这三种 miRNA 的谱图，或它

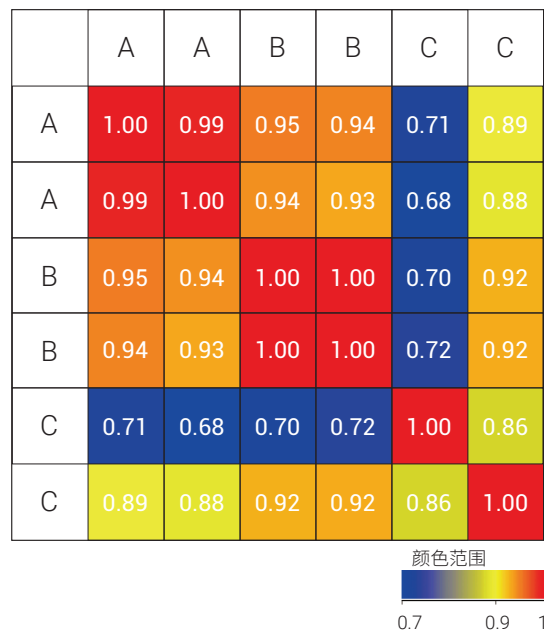


图 4. 使用 exoRNAeasy Maxi 试剂盒从 3.7 mL 血清中提取的样品之间的相关系数（所有 6 组数据中检测到 75 个 miRNA）

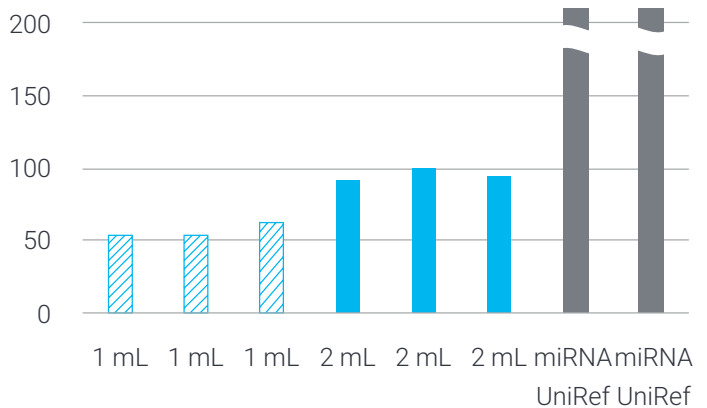


图 5. 使用 exoRNAeasy Maxi 试剂盒从 1 mL 和 2 mL 血清中检测到的 miRNA 数量

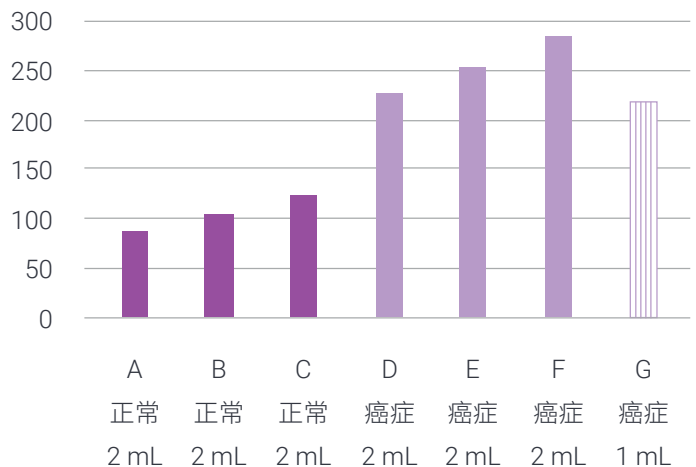


图 6. 从正常样品和癌症样品中检测到的 miRNA 数量



图 7. 六个微阵列之间的散点图。红色矩形框代表 3 个生物学重复样品

们在组间不稳定。我们选择不进行归一化的情况下分析数据，因为微阵列数据反映了癌症血清起始量的差异，并且我们将血清起始量统一为 2 mL。此外，据报道癌组织释放的外泌体要比正常组织多^[4]，因此正常样品和癌症样品中检测到的 miRNA 数量差异可能不是由于实验误差。

使用 GeneSpring GX 软件分析正常样品和癌症样品间差异表达的 miRNA。过滤正常样品和癌症样品中均未检测到的 miRNA 后，185 个 miRNA 被识别为差异表达（非配对 t-检验，校正 p 值临界值 < 0.05，倍数变化 > 2.0）。只有 miR-150-5p 为下调，它靶向包括 MYB 和 MDM4 在内的癌症相关基因。一些上调的 miRNA（如 miR-6794-5p 和 miR-4467）之前被报道在肺癌中上调^[5]。其他上调的 miRNA（尤其是 miR-3195、miR-4459 和 miR-1273g-3p）以及另一些 miRNA 之前有报道可作为卵巢癌生物标志物^[6]。表 2 列出了在正常样品和癌症样品中均被检测到并差异表达的 184 个 miRNA 中的 52 个 miRNA。

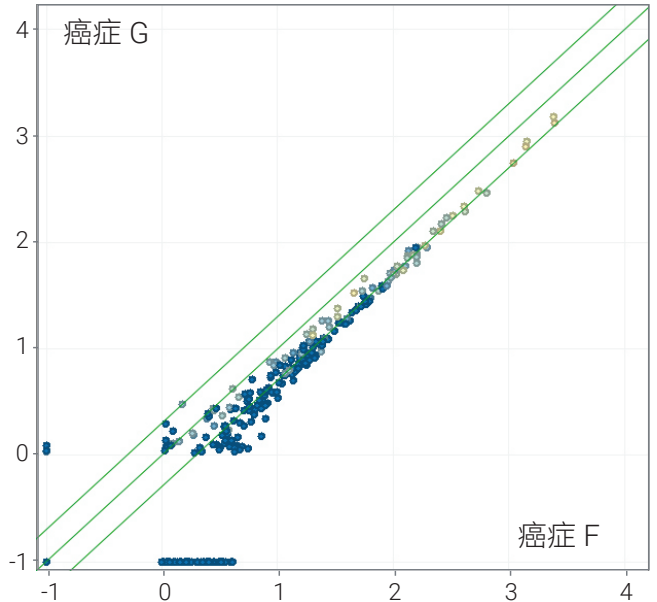


图 8. 来自同一癌症样品的 F (2 mL) 和 G (1 mL) 的散点图。未归一化的 Log10 信号强度。绿色线：中心和 2 倍

利用 GeneSpring GX 软件的靶标预测功能预测 184 个上调 miRNA 的靶向转录本。接下来，对预测的被这些 miRNA 靶向的 2073 个转录本进行基因本体论分析。除了各种发育系统，还出现了一些与大脑相关的术语，如“神经元”和“突触”（表 3）。

结论

近来，小 RNA 测序已被用于分析 miRNA；然而，这种方法存在一些难点，例如复杂的文库制备步骤和多种非 miRNA 小 RNA 的检测^[7]。安捷伦 miRNA 微阵列芯片平台提供了一种简单而强大的工具，用于分析已知的成熟 miRNA。它提供了一种独特的工作流程，包括直接标记来自组织和细胞的总 RNA 样品，减少了引入到样品中的误差。本研究表明，Agilent SurePrint G3 miRNA 微阵列芯片能够检测血清中的外泌体 miRNA，并分析差异表达的 miRNA，这可能有助于分析其他液体活检分析（如血浆）中的外泌体。

表 2. 差异表达的 52 个 miRNA

hsa-miR-1202	hsa-miR-4459	hsa-miR-5787	hsa-miR-6800-5p
hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-4466	hsa-miR-6087	hsa-miR-6819-3p
hsa-miR-1225-5p	hsa-miR-4516	hsa-miR-6088	hsa-miR-6821-5p
hsa-miR-1273g-3p	hsa-miR-4532	hsa-miR-6089	hsa-miR-6850-5p
hsa-miR-1908-3p	hsa-miR-4634	hsa-miR-6090	hsa-miR-6869-5p
hsa-miR-2861	hsa-miR-4687-3p	hsa-miR-6124	hsa-miR-6879-5p
hsa-miR-3195	hsa-miR-4767	hsa-miR-6125	hsa-miR-6891-5p
hsa-miR-328-5p	hsa-miR-4778-5p	hsa-miR-6165	hsa-miR-7107-5p
hsa-miR-3610	hsa-miR-4787-3p	hsa-miR-630	hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-3663-3p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-638	hsa-miR-7150
hsa-miR-3665	hsa-miR-5100	hsa-miR-642a-3p	hsa-miR-762
hsa-miR-3960	hsa-miR-5703	hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-765
hsa-miR-4281	hsa-miR-5739	hsa-miR-6740-5p	hsa-miR-8069

表 3. GeneOntology 结果 (前 15 项)

GO ACCESSION	GO Term	p 值	校正的 P 值
GO:0048731	系统发育	1.25538E-30	1.51032E-25
GO:0007399	神经系统发育	6.07322E-29	3.65326E-24
GO:0007275	多细胞生物发育	1.42849E-27	5.72861E-23
GO:0048856	解剖结构发育	1.48083E-26	4.45387E-22
GO:0032502 GO:0044767	发育过程	2.77794E-25	6.68414E-21
GO:0097458	神经元部分	5.57105E-23	1.11706E-18
GO:0045202	突触	1.24013E-22	2.13138E-18
GO:0044456	突触部分	2.40977E-21	3.62392E-17
GO:0030054	细胞连接	3.43148E-21	4.58702E-17
GO:0005515 GO:0001948 GO:0045308	蛋白质结合	5.26826E-21	6.33811E-17
GO:0023051	信号调节	2.6237E-20	2.86955E-16
GO:0003674 GO:0005554	分子_功能	1.69804E-19	1.70239E-15
GO:0005488	结合	2.1747E-19	2.01256E-15
GO:0048522 GO:0051242	细胞过程的正调控	1.77038E-18	1.52135E-14
GO:0022008	神经发生	3.87768E-18	2.91571E-14

参考文献

1. Takahashi RU. et al., The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin Chem Lab Med.* **2017**, 55(5):648-656
2. Garcia-Elias A. et al., Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Sci Rep.* **2017**, 7(1):7725
3. Bhome R. et al., Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett.* **2018**, 420:228-235
4. Shimomura A. et al., Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci.* **2016**, 107(3):326-34
5. Dejima H. et al., Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* **2017**, 13(3):1256-1263
6. Yokoi A. et al., Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun.* **2018**, 9(1):4319
7. Buschmann D. et al., Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles.* **2018**, 7(1):1481321

致谢

作者感谢 DNA Chip Research Inc. 对本项目做出的重要贡献，特别是从血清样品中提取 RNA。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。
PR7000-2696

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021年1月15日，中国出版
5994-2923ZHCN

