



论文

茎环引物实时定量 PCR 技术用于检测异核苷修饰的 siRNA 的可行性研究

王雨斯, 马元, 刘欣洁, 张礼和, 杨振军*

北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: yangzj@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2015-02-27; 接受日期: 2015-04-10; 网络版发表日期: 2015-06-23

doi: 10.1360/N032015-00029

摘要 本文考察了茎环引物实时定量 PCR 技术用于定量检测 *D*-/*L*-异核苷 (*D*-/*L*-isoNA)修饰的 siRNA 的可行性. 根据阈值循环数(*C_t* 值)及异核苷修饰的 siRNA 模板的初始浓度的对数值(*lgC*)绘制了标准曲线, 与 siRNA 的标准曲线进行对比, 发现 *D*-异尿苷(*D*-isodU)修饰的 siRNA (*D*-isodU-siRNA)不影响茎环引物实时定量 PCR 过程, 而 *L*-isodU 修饰的 siRNA (*L*-isodU-siRNA)降低了逆转录效率, 而使测得的 *C_t* 值偏高, 且对逆转录效率的影响有浓度依赖性和修饰位点特异性. 因此, 对前者既可进行绝对定量也可进行相对定量, 对于后者只能进行绝对定量. 将上述方法应用于 isodU-siRNA 血清稳定性的检测, 获得了更可靠的定量结果. 运用双标准曲线法, 可进行胞内 isodU-siRNA 的定量检测.

关键词

茎环引物实时定量 PCR

异核苷

绝对定量

双标准曲线法

1 引言

MicroRNA (miRNA)和 siRNA 均为内源性的非编码 RNA, 在基因表达的调控中发挥着至关重要的作用^[1-3]. 与信使 RNA (mRNA)相比, miRNA 和 siRNA 长度较短, 无法通过普通 PCR 进行定量. 茎环引物实时定量 PCR (stem-loop RT-qPCR)就是在实时定量 PCR (RT-qPCR)^[4]的基础上, 通过对引物的改良, 发展出的定量检测 miRNA 及 siRNA 的方法. 该方法首次由 Chen 等^[5]提出, 用于胞内和组织中 miRNAs 的定量分析^[6,7]. 随后, 此方法又被用于 siRNA 的定量分析^[8,9], 在 siRNA 的药代动力学^[10-14]、载体评价^[15]、作用机制^[16]等方面具有广泛的应用.

茎环引物实时定量 PCR 包括逆转录和 qPCR 两个过程. 在逆转录过程中, 采用特异性的 RT-primer

代替传统 RT-qPCR 中的非特异性线性引物. RT-primer 自身可组装成茎环结构, 并与模板 ssRNA 3'-端的约 8 个碱基互补配对, 延伸出比模板更长的 cDNA. 在 qPCR 过程中, 正向引物与模板 ssRNA 5'-端对应, 并在该引物的 5'-端引入了一段加长序列, 进一步增加 PCR 产物的长度; 反向引物可与 RT-primer 的茎环部分结合, 为通用引物. 经 RT-primer 及正向引物的两次延伸作用, 使得 PCR 终产物的长度从 19 bp 增至约 75 bp, 从而使得对短链 RNA 的定量成为可能(图 1).

与普通 RT-qPCR 类似, 茎环引物实时定量 PCR 分为染料法和探针法. SYBR Green I 染料通用性好, 价格较低, 应用较广泛. Taqman 探针^[17]可特异性与靶 cDNA 结合, 具有更高的准确性, 但是每次检测均需根据待测序列重新设计. 为了提高探针的通用性, 近年来发展出了通用探针 UPL^[18]. UPL 探针由 8~9 个

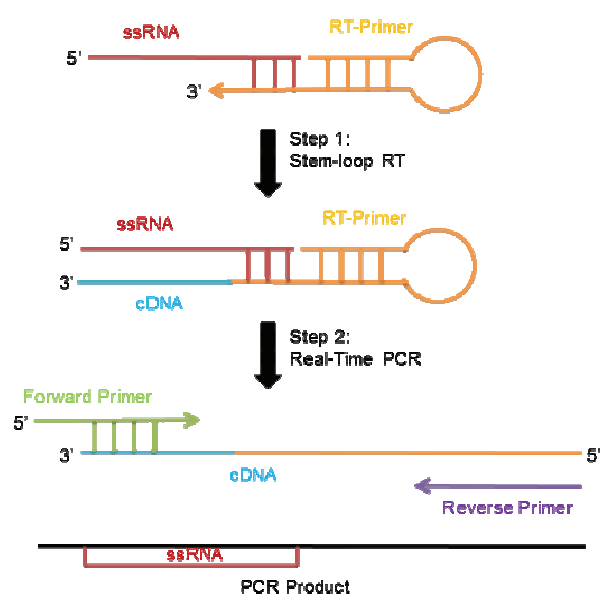


图 1 茎环引物实时定量 PCR 原理

碱基长度的锁核苷(LNA)构成, 可识别单位点突变, 同时具有灵敏性和灵活性。

与传统 RT-qPCR 相同, 茎环引物实时定量 PCR 表现出的阈值循环数(C_t 值)与初始模板的对数呈线性关系。因此, 绝对定量法及相对定量法均适用于茎环引物实时定量 PCR 的检测, 用于测定样品中 siRNA 的绝对拷贝数或相对含量。绝对定量是利用已知拷贝数的标准品绘制出标准曲线, 再通过测得的未知样品的 C_t 值计算出初始拷贝数的一种方法。相对定量则是借助于在生物体中稳定表达的看家基因, 以此作为内参, 通过测定目的基因在不同样品中与同一内参之间含量的比值, 得到目的基因在两个或多个样本中的相对含量的一种方法。绝对定量的应用范围更广泛, 但是需要使用标准品制备标准曲线, 操作较繁琐; 相对定量的实验方法较简单, 但通常要求目的基因与内参基因具有相似的扩增效率, 应用上具有一定的局限性。

由于天然的 siRNA 通常具有稳定性较差^[19]、选择性不高^[20]、易产生脱靶效应^[21]等缺点, 通常会对其进行化学修饰。常采用的方法有 2'-甲氧基修饰^[22]、硫代修饰^[23]、锁核苷(LNA)修饰^[24]、开环核苷(UNA)修饰^[25]和异核苷修饰(IsoNA)^[26]等。其中, 异核苷是一类核苷碱基由糖环 1'-位移至 2'-位的核苷类似物, 包括 *D*-和 *L*-两种构型(图 2), 已经成功应用于反义寡

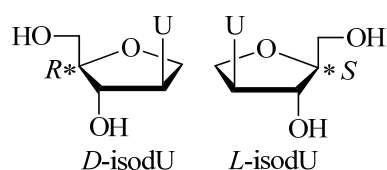


图 2 *D*-/*L*-异尿苷(*D*-/*L*-isodU)的结构

核苷酸(ASODN)^[27]和 siRNA^[28]的修饰。异核苷可一定程度调整寡核苷酸局部构象, 提高其活性和稳定性, 具有广泛的应用前景。但是, 化学修饰的引入通常会干扰酶的催化效率^[29], 不同类型的异核苷对不同种类 DNA 聚合酶识别能力的影响程度也不尽相同^[30]。关于异核苷的掺入是否会影响茎环引物实时定量 PCR 检测的准确性, 目前尚没有系统报道。本文以 *D*、*L* 两种构型的异核苷为例, 考察其掺入后对 siRNA 定量结果的影响。在逆转录过程中, 茎环引物可与待检测的 ssRNA 间形成茎环结构, 由于 ssRNA 3'端有 8 个核苷酸与茎环引物配对, 反转录过程实际从 13 位开始。为了更全面地考察不同位置的修饰对于茎环引物实时定量 PCR 的影响, 选取了 ssRNA 的 3'端, 以及靠近反转录起始位点的 10 位以及结束位点附近的 2 位进行修饰。具体序列见表 1。

2 实验部分

2.1 异核苷修饰 siRNA 的合成

采用标准亚磷酸化法, 亚磷酸胺 *D*-/*L*-isodU 单体偶联 900 s。EMAM 溶液(33%甲胺水: 33%甲胺醇, 1:1, v/v) 60℃ 反应 1.5 h, 合并滤液冻干后在 60℃ 条件下加 Bu_4NF 反应 1.5 h 脱除 2'-TBDMS。粗品用 3.0 mol/L 乙酸钠沉淀并用正丁醇及乙醇洗涤。产物用离子交换柱(Dionex DNAPac, PA200, 9×250 mm, Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离, 随后脱盐(Sephadex G25, GE Healthcare, Sweden)冻干待用, 产物用 MALDI-TOF MS 进行鉴定。

2.2 逆转录及实时定量 PCR

siRNA 样品进行倍比稀释, 取浓度范围在 10~0.001 nmol/L 之间的 5 个标准样品绘制标准曲线。1.0 μL siRNA 样品与 1.5 μL (0.5 μmol/L) 逆转录茎环引物(RT-Primer, 锐博生物科技有限公司, 中国)混合, 补加无酶水至 8.0 μL, 85℃, 5 min; 60℃, 5 min 变性反

表 1 *D*-/*L*-isodU 修饰序列

	No.	Name	Sequence ^{a)}
Unmodified	1	siMB3	SS: 5'-GCUACAGAGAAAUCUCGAUdtdt-3' AS: 5'-AUCGAGAUUUCUCUGUAGCddt-3'
Sense strand modification	2	siMB3-SDD	5'-GCUACAGAGAAAUCUCGAU U_D U_D -3'/AS
Antisense strand modification	3	siMB3-A2D	SS/5'- A_{U_D} CGAGAUUUCUCUGUAGCddt-3'
	4	siMB3-A8D	SS/5'-AUCGAGAU U_D UUCUCUGUAGCddt-3'
	5	siMB3-A8L	SS/5'-AUCGAGAU U_L UUCUCUGUAGCddt-3'
	6	siMB3-A10D	SS/5'-AUCGAGAUU U_D CUCUGUAGCddt-3'
	7	siMB3-A10L	SS/5'-AUCGAGAUU U_L CUCUGUAGCddt-3'

a) *D*-/*L*-isodU 修饰位点用红色斜体标示. U_D : *D*-isodU; U_L : *L*-isodU.

应, 随后立即置于 4℃; 逆转录反应按照 TaqMan® MicroRNA 逆转录试剂盒 (L/N 4366597, Applied Biosystems, USA) 体系和程序进行. 取逆转录产物 2.0 μL, 加入正向引物和反向引物(锐博生物科技有限公司, 中国)各 2.0 μL (5.0 μmol/L), 使用 GoTaq®qPCR Master Mix (L/N A6001, Promega, 美国)进行实时定量 PCR, 反应程序为 95℃变性, 10 min; 40 个循环: 95℃变性 15 s; 60℃退火延伸 1 min.

2.3 血清稳定性

siRNA 样品(20 pmol, 10 μL 体系)在 30% FBS 中 37℃ 分别孵育 0 min、30 min、1 h、3 h、6 h 后取出, 20% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 110 V, 3 h. SYBR gold (L/N S11494, Invitrogen, 美国)染色, 采用高灵敏凝胶成像仪检测. 另取 1 μL 样品稀释 200 倍后取 1 μL 进行茎环引物实时定量 PCR 检测.

2.4 胞内定量

A375 细胞系, 按 25 万个/孔的密度铺制 6 孔板. 24 h 后, 使用 Lipofectamine RNAiMAX (L/N 13778-150, Invitrogen, 美国)转染 siRNA (10 nmol/L). 48 h 后收取细胞, 加入 50 μL 含 0.5 μL Dnase I (L/N 1309047, Ambio, 美国)的裂解液 (L/N 1402035, Ambion, 美国)室温裂解 8 min, 加入 5 μL 终止剂 (L/N 1405036, Ambio, 美国)终止反应. 取 5 μL 进行茎环引物实时定量 PCR.

2.5 数据分析

标准曲线由 Excel 软件依据已知的 siRNA 初始浓

度的对数值和 *C_t* 值绘制, 并给出拟合直线方程.

3 结果与讨论

3.1 不同类型的异核苷修饰对 RT-qPCR 具有不同影响

为了验证茎环引物实时定量 PCR 的准确性和重现性, 分别以天然 siRNA 的正义链及反义链各自为模板进行茎环引物实时定量 PCR, 获得的正反义链标准曲线基本一致(图 3), 表明茎环引物定量 PCR 方法对 siRNA 定量的可靠性.

随后在正反义链中分别考察了 *D*-isodU 修饰的影响. 选取 siMB3 正义链 overhang 双位点 *D*-isoU 修饰(siMB3-SDD)或反义链 2 位(siMB3-A2D)、10 位(siMB3-A2D)单位点 *D*-isoU 修饰. 实验结果显示, *D*-isodU-siRNA 的标准曲线与天然 siRNA 基本一致(图 4), 而且与修饰位置无关.

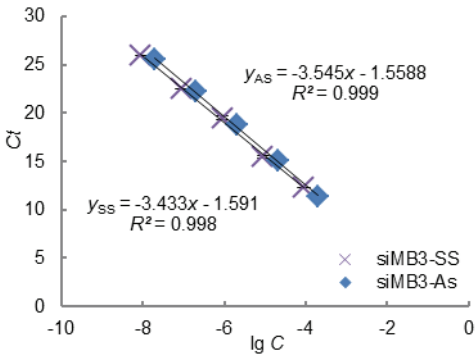


图 3 天然 siMB3 茎环引物实时定量 PCR 标准曲线. 以 siMB3 初始浓度(mmol/L)的对数值为横坐标, *C_t* 值为纵坐标. siMB3-SS: siMB3 正义链; siMB3-AS: siMB3 反义链

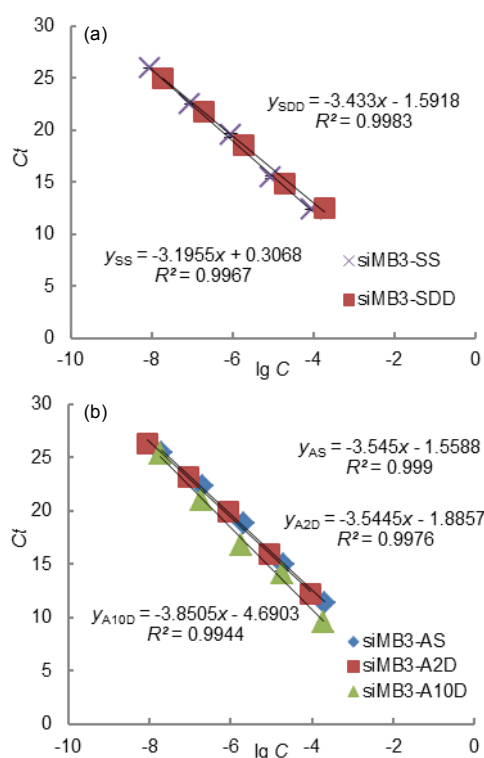


图4 *D*-isodU 修饰 siMB3 茎环引物实时定量 PCR 标准曲线. 以 siMB3 的初始浓度(mmol/L)的对数值为横坐标, *Ct* 值为纵坐标. (a) 正义链修饰序列; (b) 反义链修饰序列

为了考察 *L*-isodU 修饰对于定量的影响, 选取了 siMB3 反义链 8 位(siMB3-A8L)及 10 位(siMB3-A10L)进行 *L*-isodU 修饰. 实验结果显示, *L*-isodU 修饰 siRNA 的标准曲线与天然 siRNA 相差较大, 在具有相同初始浓度的条件下, *L*-isodU 修饰靶标的 *Ct* 值较天然 siRNA 提高了 3~4 倍(图 5), 而且与修饰位置有关.

根据所得标准曲线的线性拟合公式, 计算天然 siMB3-AS 与 siMB3-A8L、siMB3-A10L 之间的差距. 当 *Ct* 为 20 时, siMB3-A8L 对应的 siRNA 初始浓度比天然 siMB3-AS 高约 3.98 倍, siMB3-A10L 比天然 siMB3-AS 高约 9.4 倍. 以上结果说明, 要达到一致的拷贝数, *L*-isodU 修饰后的 siRNA 需要更高的初始浓度. 说明 *L*-isodU 的掺入会降低茎环引物实时定量 PCR 的扩增效率, 且这种影响还与 *L*-isodU 的掺入位点相关.

上述结果说明, 异核苷修饰对于茎环引物实时定量 PCR 的影响与修饰的类型相关. 其中, *D*-isodU 修饰几乎不影响 siRNA 的定量, 而 *L*-isodU 修饰则会使得逆转录扩增效率降低, 引起 *Ct* 值偏高, 不同位

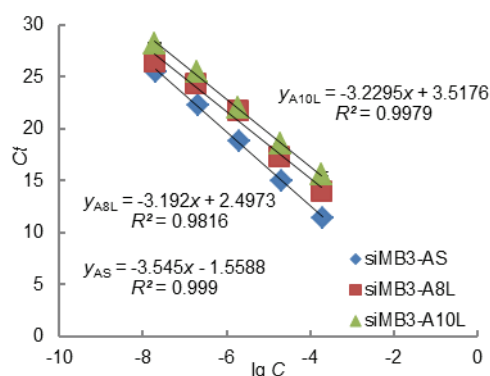


图5 *L*-isodU 修饰 siMB3 茎环引物实时定量 PCR 标准曲线. 以 siMB3 的初始浓度(mmol/L)的对数值为横坐标, *Ct* 值为纵坐标. siMB3-SS: siMB3 正义链; siMB3-AS: siMB3 反义链

点异核苷修饰影响程度有一定差异. 然而在最低及最高检测浓度(0.001、10 nmol/L)条件下, ($\lg C$, *Ct*)坐标值仍位于 *L*-isodU-siRNA 标准曲线上, 说明即使 *L*-isodU 修饰在一定程度上影响反转录效率, 但在检测浓度范围内(0.001~10 nmol/L)并不影响 *L*-isodU-siRNA 定量过程.

3.2 异核苷掺入影响 RT-qPCR 扩增的机制考察

茎环引物实时定量 PCR 通过 *Ct* 值反应初始模板量的多少. 在 RT-PCR 的过程中, 单链 RNA (ssRNA) 在逆转录酶的作用下形成 cDNA, 随后以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR.

逆转录为线性反应, 设 siRNA 模板链的初始浓度为 C_0 , 假定逆转录效率始终为 E_1 , 经逆转录后 cDNA 的浓度为 X_0 , 则有:

$$X_0 = C_0 E_1 \quad (1)$$

PCR 为链式反应, 经 n 个循环后, 所得产物的总浓度为 X_n , PCR 扩增效率为 E_2 , 则有:

$$X_n = X_0 (1 + E_2)^n \quad (2)$$

当荧光强度达到阈值时, 所对应的循环数 n 即为 *Ct* 值, 此时的扩增产物浓度 X_{Ct} 为已知常数. 对式(2)进行变换, 得到:

$$X_{Ct} = X_0 (1 + E_2)^{Ct} \quad (3)$$

将式(1)代入式(3)并取对数进行变换后得到:

$$Ct = -\frac{1}{\lg(1 + E_2)} \lg C_0 + \frac{\lg X_{Ct} - \lg E_1}{\lg(1 + E_2)} \quad (4)$$

由式(4)可知, Ct - $\lg C_0$ 曲线中, 斜率由 PCR 的扩增效率 E_2 决定, 扩增效率越高, 斜率的绝对值越小. 而曲线的截距则由逆转录扩增效率 E_1 以及 PCR 的扩

增效率 E_2 共同决定。

为了探究 *L*-isodU 具体作用于哪一个阶段, 设计了如下实验. 首先取梯度浓度的 *L*-isodU-siRNA 进行逆转录, 获得相应的 cDNA, 随后进行 PCR 获得标准曲线 1 (siMB3-XX-1), 该曲线反映了 *L*-isodU 对逆转录及 PCR 两个过程的影响. 接着, 取最高浓度组 siRNA 的逆转录产物 cDNA 按初始 siRNA 的稀释比例进行倍比稀释, 随后进行实时定量 PCR 获得标准曲线 2 (siMB3-XX-2), 该曲线仅反映了 PCR 过程对结果的影响. 同天然 siRNA 进行比较后, 得到如下结果(图 6): C_t -lgC 曲线的斜率, 是衡量 PCR 扩增效率的重要指标. 标准曲线 2 的斜率与天然 siRNA 的斜率相近, 说明异核苷修饰并非在 PCR 阶段影响了扩增效率. 曲线 1 同时体现了修饰后的 siRNA 对逆转录以及 PCR 过程的影响, 其斜率的绝对值明显降低(图 6(a, b)), 说明 *L*-isodU 是通过影响逆转录过程, 干扰了实时定量 PCR 的整体效率.

根据上述公式推导得出, 斜率绝对值的降低预示着 PCR 扩增效率的增高, 但实际情况是 *L*-isodU 修饰后, C_t 值升高, 整体扩增效率降低. 反推其可能的原因, 则在于逆转录效率 E_1 并不是一个恒定的常数, 而是随着模板量的增高而降低的. *L*-isodU 掺入后, 会引起局部构象的扭转, 在与 RNA 及氨基酸残基的相互结合过程中, 其结构更为松散^[31]. 由此推知, *L*-isodU 的掺入对逆转录酶的识别具有一定的干扰.

本组实验还同时对比了 *D*-isodU 修饰的 siRNA 在两种方法下的标准曲线(图 6(c, d)), 并无显著性差异, 且与天然 siRNA 标准曲线基本重合.

综合上述结果发现, 在逆转录酶以 ssRNA 为模板转录出 cDNA 的过程中, *L*-isodU 影响了逆转录酶的识别, 进而影响了 cDNA 的形成, 并且逆转录效率 E_1 与 ssRNA 的含量成负相关关系. 无论 ssRNA 是否经过异核苷修饰, 其转录出的 cDNA 均为天然结构, 在相同的条件下, 具有一致的 PCR 扩增效率. 综合

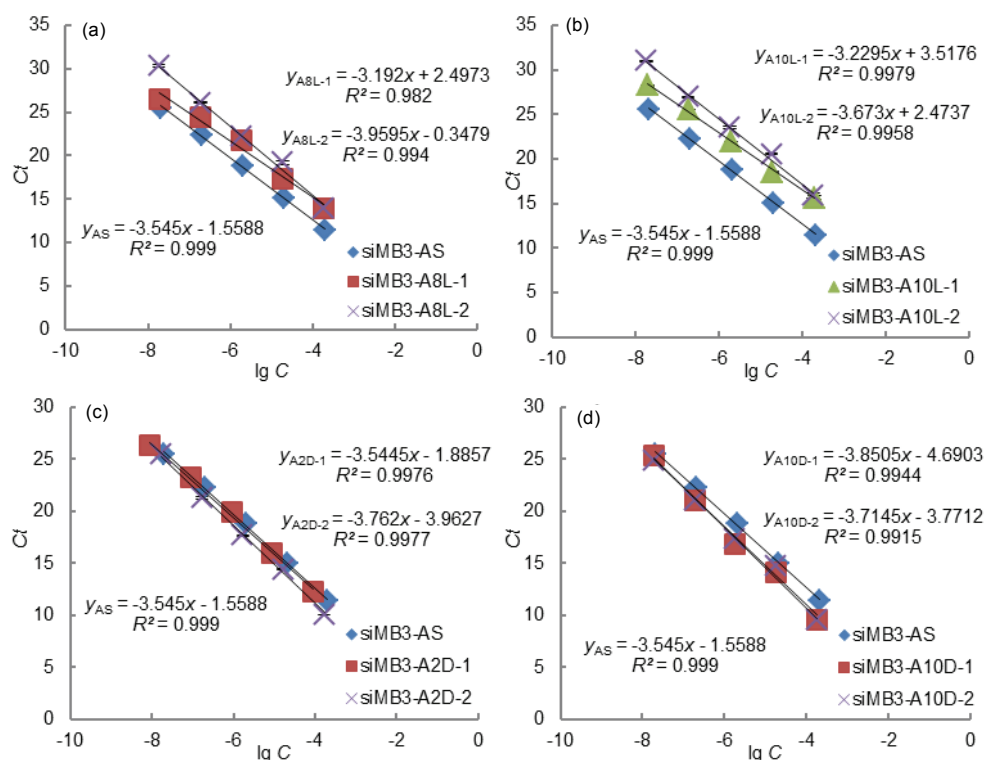


图 6 异核苷修饰对茎环引物实时定量 PCR 影响的机制考察. 以 siMB3 的初始浓度(mmol/L)的对数值为横坐标, C_t 值为纵坐标. siRNA-1: 以梯度浓度的 *L*-isodU 修饰 siRNA 进行逆转录, 获得相应的 cDNA, 随后进行 PCR 获得 C_t 值, 绘制 C_t -lgC 曲线, 反映了逆转录和 PCR 两个过程的影响; siRNA-2: 取最高浓度组 siRNA 的逆转录产物 cDNA 进行倍比稀释, 随后进行 PCR 获得 C_t 值, 绘制 C_t -lgC 曲线, 仅反映 PCR 过程的影响. (a) 反义链 8 位 *L*-isodU 修饰; (b) 反义链 10 位 *L*-isodU 修饰; (c) 反义链 2 位 *D*-isodU 修饰; (d) 反义链 10 位 *D*-isodU 修饰

可知, *L*-isodU 修饰通过影响逆转录过程, 造成了和天然 siRNA 定量结果的差异. 由于 *D*-isodU 与天然核糖核苷酸结构较相似, 对茎环引物实时定量 PCR 的整个过程并没有产生显著影响. 因此, 对于 *D*-isodU-siRNA 可直接进行绝对定量或相对定量, 而针对 *L*-isodU-siRNA 则需要绘制标准曲线进行绝对定量.

3.3 异核苷修饰 siRNA 定量的方法的应用

由于 *D*-isodU 修饰对茎环引物实时定量 PCR 过程不产生干扰, 下文仅对 *L*-isodU-siRNA 的定量进行讨论.

3.3.1 血清稳定性

siRNA 未与蛋白结合前, 在体内环境中极不稳定, 通过化学修饰提高 siRNA 的血清稳定性是改善其成药性的重要方法. 通常对 siRNA 血清稳定性的考察多采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 利用条带的明暗程度定性检测 siRNA 的剩余量. 使用茎环引物实时定量 PCR 方法对血清中完整 siRNA 进行检测, 则可较准确地获得定量结果, 同时也提高了检测的灵敏性.

图 7 中比较了两种方法用于反义链 8 位 *L*-isodU-siMB3 血清稳定性考察的结果. *L*-isodU 的掺入对逆转录效率的影响具有浓度依赖性, 不能通过简单的相对定量进行分析. 获得 *C_t* 值后, 先依据图 5 中拟合的 siMB3-A8L 标准曲线公式 $y_{A8L} = -3.192x + 2.497$ 计算得到 lgC, 换算成浓度后, 以 blank 组为标准进行归一化处理, 得到如图 7(b)所示的“RT-PCR 定量”曲线. 通过比较凝胶电泳结果和茎环引物实时定量结果可以看到, 两种方法得到的完整 siMB3-A8L 的含量随时间变化趋势相同, 茎环引物实时定量结果更加灵敏.

3.3.2 细胞内 siRNA 含量的测定

对 siRNA 在胞内的含量进行测定, 可用于考察 siRNA 稳定性、载体转染能力以及 siRNA 的胞内代谢过程等, 具有重要的意义. 由于样品间的细胞数目不同, 单纯考察 siRNA 的绝对量不具备实际意义, 需引入内参基因进行校正, 以排除细胞数目不等造成的干扰. 对于 microRNA 及 siRNA, 通常选择 U6 作为内参基因, 具体的方法则采用双标准曲线法.

首先, 需根据待测 *L*-isodU-siRNA 的 *C_t* 值及相应的标准曲线拟合公式, 计算出样品所有细胞中

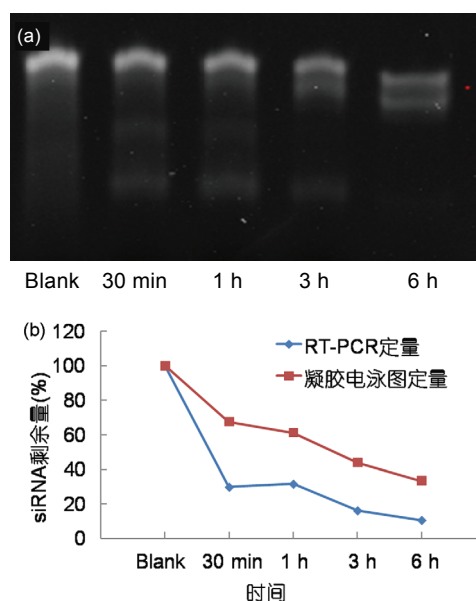


图 7 茎环引物实时定量 PCR 用于 *L*-isodU-siRNA 血清稳定性的定量检测. 30% FBS 中 37℃ 孵育, 在相应时间点取出, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及茎环引物实时定量 PCR; 聚丙烯酰胺凝胶电泳图片通过 Image Lab 软件对条带亮度进行定量分析. (a) 聚丙烯酰胺凝胶电泳图; (b) 聚丙烯酰胺凝胶电泳定量结果及茎环引物实时定量 PCR 结果

L-isodU-siRNA 的总初始浓度 C' . 随后依据 U6 的 *C_t* 值及其标准曲线, 计算出 U6 的总初始浓度, 用于表征样品中的细胞数 N . C'/N 的比值则为单位细胞中 *L*-isodU-siRNA 的初始浓度. 以天然 siRNA 为标准进行归一化后, 即可得到 *L*-isodU-siRNA 相对于天然 siRNA 的含量.

图 8(a)为校正后的 *D/L*-isodU-siRNA 的定量结果, 图 8(b)为采用 RT-PCR 方法检测 *D/L*-isodU-siRNA 对靶 mRNA 的抑制效果. 胞内 siRNA 含量和最终对靶标基因的沉默效果取得了很好的一致性, 间接证明了定量方法的可靠性.

4 结论

茎环引物实时定量 PCR 方法在 siRNA 定量中的应用, 为研究 siRNA 的体内代谢及 RNAi 的分子机制提供了新的思路. 为了改善天然 siRNA 稳定性较差、易产生脱靶效应等缺点, 通常会对 siRNA 进行化学修饰. 因此, 茎环引物实时定量 PCR 用于检测化学修饰 siRNA 的可行性研究就显得尤为重要.

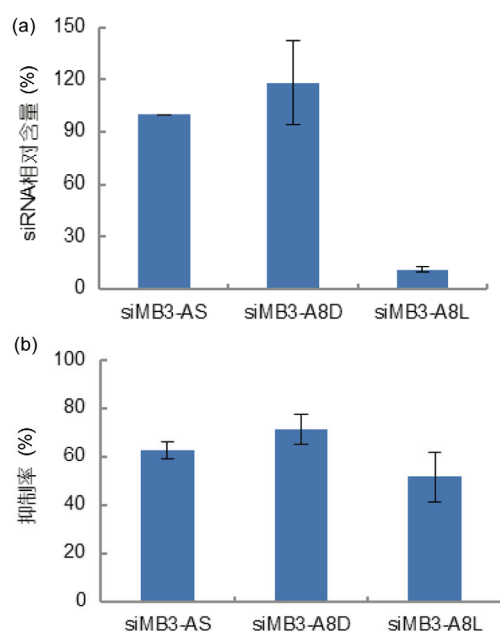


图 8 茎环引物实时定量 PCR 结合双标准曲线法用于胞内 D/L-isodU-siRNA 定量. (a) siRNA 相对含量, A375 细胞转染 siRNA (10 nmol/L) 48 h 后检测; (b) siRNA 靶标抑制率, A375 细胞转染 siRNA (2 nmol/L) 48 h 后定量检测靶 mRNA 含量

通过绘制 *Ct-IgC* 标准曲线, 考察了分别掺入 *D-isodU* 及 *L-isodU* 后对 siRNA 定量的影响. 结果显示, 茎环引物 PCR 的扩增效率与修饰类型密切相关, *D-isodU* 几乎不影响茎环引物 PCR, 而 *L-isodU* 则对其产生较大影响. 随后, 分别绘制了 RT-PCR 标准曲线 (siRNA-1) 以及 PCR 标准曲线 (siRNA-2), 与天然 siRNA 的标准曲线进行对比后, 确定了 *L-isodU*-siRNA 干扰了逆转录过程, 逆转录效率与 siRNA 的初始模板量负相关. 基于上述结果, *D-isodU*-siRNA 既可以进行相对定量也可以进行绝对定量, 而 *L-isodU*-siRNA 只能通过绝对定量的方法进行考察. 结合特定位点 *L-isodU*-siRNA 的标准曲线, 可实现对 *L-isodU*-siRNA 血清稳定性的定量检测, 与传统的聚丙烯酰胺电泳相比, 此法具有更高的灵敏性和准确性. 通过引入内参基因 U6, 采用双标准曲线法, 可实现 *L-isodU*-siRNA 胞内含量的测定, 此方法还可考察 *L-isodU*-siRNA 的体内代谢、组织分布等. 本文中的研究方法亦可用于其他类型修饰的 siRNA 检测, 具有广泛的应用前景.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展计划(2012CB720604)、国家高技术研究发展计划(2012AA022501), 以及国家自然科学基金(20932001)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005, 435: 834–838
- Sheng M, Zhong Y, Chen Y, Du J, Ju X, Zhao C, Zhang G, Zhang L, Liu K, Yang N, Xie P, Li D, Zhang MQ, Jiang C. Hsa-miR-1246, Hsa-miR-320a and Hsa-miR-196b-5p inhibitors can reduce the cytotoxicity of Ebola virus glycoprotein *in vitro*. *Sci China Life Sci*, 2014, 57: 959–972
- Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1006–1010
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e45
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e179–e193
- Tavazoie SF1, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 2008, 451: 147–152
- Liang H, Zhang S, Fu Z, Wang Y, Wang N, Liu Y. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *J Nutr Biochem*, 2015, 26: 505–512
- Cheng A, Li M, Liang Y, Wang Y, Wong L, Chen C, Vlassov AV, Magdaleno S. Stem-loop RT-PCR quantification of siRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Oligonucleotides*, 2009, 19: 834–841
- Stefano C, Hanne MN, Camilla F. Evaluation of carrier-mediated siRNA delivery: lessons for the design of a stem-loop qPCR-based approach for quantification of intracellular full-length siRNA. *J Control Release*, 2013, 166: 220–226
- Landesman Y, Svrzikapa N, Cognetta A, Zhang X, Bettencourt BR, Kuchimanchi S. *In vivo* quantification of formulated and chemically modified small interfering RNA by heating-in-Triton quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (HIT qRT-PCR). *Silence*,

2010, 1: 16–30

- 11 Shi B, Keough E, Matter A, Leander K, Young S, Carlini E, Sachs AB, Tao W, Abrams M, Howell B. Biodistribution of small interfering RNA at the organ and cellular levels after lipid nanoparticle-mediated delivery. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59: 727–740
- 12 Cheng A, Vlassov AV, Magdaleno S. Quantification of siRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Methods Mol Biol*, 2011, 764: 183–197
- 13 Abrams MT, Koser ML, Seitzer J, Williams SC, DiPietro MA, Wang W, Shaw AW, Mao X, Jadhav V, Davide JP, Burke PA, Sachs AB, Stirdivant SM, Sepp-Lorenzino L. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone-treatment. *Mol Ther*, 2010, 18: 171–180
- 14 Tao W, Mao X, Davide JP, Ng B, Cai M, Burke PA, Sachs AB, Sepp-Lorenzino L. Mechanistically probing lipid siRNA nanoparticle-associated toxicities identifies Jak inhibitors effective in mitigating multifaceted toxic responses. *Mol Ther*, 2011, 19: 567–575
- 15 Pei Y, Hancock PJ, Zhang H, Bartz R, Cherrin C, Innocent N. Quantitative evaluation of siRNA delivery *in vivo*. *RNA*, 2010, 16: 2553–2563
- 16 Wu SY, Yang X, Gharpure KM, Hatakeyama H, Egli M, McGuire MH, Nagaraja AS, Miyake TM, Rupaimoole R, Pecot CV, Taylor M, Pradeep S, Sierant M, Rodriguez-Aguayo C, Choi HJ, Previs RA, Armaiz-Pena GN, Huang L, Martinez C, Hassell T, Ivan C, Sehgal V, Singhanian R, Han HD, Su C, Kim JH, Dalton HJ, Kovvali C, Keyomarsi K, McMillan NA, Overwijk WW, Liu J, Lee JS, Baggerly KA, Lopez-Berestein G, Ram PT, Nawrot B, Sood AK. 2'-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity. *Nat Commun*, 2014, 5: 3459–3488
- 17 Carré JL, Lamon S, Léger B. Validation of a multiplex reverse transcription and pre-amplification method using TaqMan® microRNA assays. *Front Genet*, 2014, 5: 413–424
- 18 Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One*, 2013, 8: 258–264
- 19 Choung S, Kim YJ, Kim S, Park HO, Choi YC. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 919–927
- 20 Khvorov A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, 115: 209–216
- 21 Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 57–67
- 22 Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, Zavolan M, Tuschl T, Meister G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA*, 2008, 14: 263–274
- 23 Shin D, Lönn P, Dowdy SF, Tor Y. Cellular activity of siRNA oligonucleotides containing synthetic isomorphous nucleoside surrogates. *Chem Commun*, 2015, 51: 1662–1665
- 24 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang ZC, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 439–447
- 25 Bramsen JB, Pakula MM, Hansen TB, Bus C, Langkjær N, Odadizic D, Smicius R, Wengel SL, Chattopadhyaya J, Engels JW, Herdewijn P, Wengel J, Kjems J. A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5761–5773
- 26 a) Yu HW, Zhang LR, Zhou JC, Ma LT, Zhang LH. Studies on the synthesis and biological activities of 4'-(R)-hydroxy-5'-(S)-hydroxymethyl-tetrahydrofuran purines and pyrimidines. *Bioorg Med Chem*, 1996, 4: 609–614; b) Zhang HY, Wu XJ, Zhang LH, Yu HW, Ma TL. Synthesis of 3-(R)-(adenin-9'-yl)-4-(R)-hydroxy-5-(R)-hydroxymethyl-tetrahydrofuran. *Chin Chem Lett*, 1996, 12: 1089–1090
- 27 a) Wang Z, Shi J, Jin H, Zhang L, Lu J, Zhang L. Properties of isonucleotide-incorporated oligodeoxynucleotides and inhibition of the expression of spike protein of SARS-CoV. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16: 1081–1087; b) Yang ZJ, Zhang HY, Min JM. Synthesis and duplex stabilization of oligonucleotides consisting of isonucleosides. *Helv Chim Acta*, 1999, 82: 2037–2043; c) Guan Z, Tian XB, Zhang LR. Synthesis and hybridization properties of an oligonucleotide consisting of 1',4'-anhydro-2',5'-dideoxy-2'-(thymine-1-yl)-D-altritol. *Helv Chim Acta*, 2002, 85: 1479–1484
- 28 a) Huang Y, Chen Z, Chen Y, Zhang H, Zhang Y, Zhao Y, Yang Z, Zhang L. Effects of conformational alteration induced by D-/L-isonucleoside incorporation in siRNA on their stability in serum and silencing activity. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 951–959; b) Wang F, Chen Y, Huang Y, Jin HW, Zhang LR, Yang ZJ, Zhang LH. Synthesis, physicochemical and biological properties of oligonucleotides incorporated with amino-isonucleosides. *Sci China Chem*, 2012, 55: 70–79; c) Zhang J, Chen Y, Huang Y, Jin HW, Qiao RP, Xing L, Zhang LR, Yang ZJ, Zhang LH. Synthesis and properties of novel L-isonucleoside modified oligonucleotides and siRNAs. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 7566–7577; d) Li ZS, Qiao RP, Du Q, Yang ZJ, Zhang LR, Zhang PZ, Liang ZC, Zhang LH. Studies on aminoisonucleoside modified siRNAs: stability and silencing activity. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 1017–1024
- 29 Stratford S, Stec S, Jadhav V, Seitzer J, Abrams M, Beverly M. Examination of real-time polymerase chain reaction methods for the

- detection and quantification of modified siRNA. *Anal Biochem*, 2008, 379: 96–104
- 30 Jiang C, Li B, Guan Z, Yang Z, Zhang L, Zhang L. Synthesis and recognition of novel isonucleoside triphosphates by DNA polymerases. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 3019–3025
- 31 Huang Y, Chen Z, Chen Y, Zhang H, Zhang Y, Zhao Y, Yang Z, Zhang L. Effects of conformational alteration induced by *D*-/*L*-isonucleoside incorporation in siRNA on their stability in serum and silencing activity. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 951–959

Feasibility of quantification for isoNA modified siRNA using stem-loop RT-qPCR

Yusi Wang, Yuan Ma, Xinjie Liu, Lihe Zhang, Zhenjun Yang^{*}

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs; School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

*Corresponding author (email: yangzj@bjmu.edu.cn)

Abstract: In this work, the feasibility of quantification for isoNA modified siRNA using stem-loop RT-qPCR was researched. The standard curve was drawn with the cycle threshold (*Ct*) and the logarithm of initial siRNA concentration (lg*C*). Comparing with natural siRNA, the incorporation of *D*-isodU into siRNA had no influence on stem-loop RT-qPCR, while the incorporation of *L*-isodU reduced the reverse transcription efficiency and resulted in higher *Ct* value. The decrease of amplification efficiency caused by *L*-isodU varied with the initial siRNA concentration and modified position. Thus, absolute quantification could be used in both *D*-isodU and *L*-isodU modified siRNAs, while relative quantitation could only be used in *D*-isodU-siRNAs. Stem-loop RT-qPCR could be used in the qualitative analysis of isodU-siRNA serum stability. Besides, the dual-standard curve could also be used to quantify the intracellular isodU-siRNA.

Keywords: stem-loop RT-qPCR, isoNA, absolute quantification, dual-standard curve