

两种分析 miRNA 相对表达量方法的比较研究*

郑传浩,姚磊,李毅[△](第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

【摘要】目的 基于实时反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)基因表达相对定量的分析方法;GenEx 软件分析与 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法,建立一种简便、准确的 miRNA 相对定量方法。**方法** 以 HK-2 细胞系 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,确定最佳退火温度;再倍比稀释该模板,用荧光定量 PCR 测定的 Ct 值作 miR-122 和 miR-16 的标准曲线,计算出相应 miRNA 的扩增效率。用荧光定量 PCR 测定健康者和乙型肝炎患者血清中内参 miR-16 和靶基因 miR-122 的表达,分别采用 GenEx 软件分析与 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法来评价相对表达量。**结果** 系列稀释法制作的标准曲线呈现较好的线性相关性,两种 miRNA 的标准曲线 r^2 值均为 0.999,miR-16 的扩增效率为 97%,miR-122 扩增效率为 107%。 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法分析乙型肝炎患者血清中 miR-122 的表达较健康者增高了 44.3 倍,而 GenEx 软件分析为 54.1 倍。**结论** GenEx 软件分析考虑了更多的影响因素,其结果比 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法更可靠,适用于临床分析。

【关键词】 实时 RT-PCR; 相对定量; 标准曲线

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-2937-02

Comparative study on two analysis methods of miRNA relative expression* ZHENG Chuan-hao, YAO Lei, LI Yi[△] (Laboratory Department, Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

【Abstract】Objective Based on the data obtained from the real-time RT-PCR, there are two methods for analysis: GenEx software analysis and $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. This study is to establish a simple and accurate microRNA relative quantitative method. **Methods** To determine the optimal annealing temperature, we amplified HK-2 cell line cDNA by PCR. Standard curve of miR-122 and miR-16 were made from the 10-fold diluted cDNA template from HK-2 cells. According to the curve, calculate respective miRNA amplification efficiency. The expression of target gene miR-122 and reference gene miR-16 were determined by quantitative PCR. Base on the Ct data, the GenEx software analysis and $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method were used to evaluate the miR-122 relative expression rate in the sera of healthy subjects and hepatitis B patients. **Results** A good linear correlation ($r^2=0.999$) was obtained from two standard curve of miRNA genes. The amplification efficiency of miR-16 and miR-122 were 97% and 107%, respectively. The expression of miR-122 that $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ analysis received was 44.3 times higher in the serum of hepatitis B patients compared with healthy controls. But the rate that GenEx software analysis obtained was 54.1. **Conclusion** Because the GenEx software analysis considered more factors, so the result was more reliable and suitable for clinical application.

【Key words】 real-time RT-PCR; relative quantification; standard curve

相对定量法广泛应用于实时反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)中,然而 PCR 产物的准确定量需要可用于数据分析的数学模型,目前 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 方法已经常规运用于实时 RT-PCR 的相对定量分析,但是它没考虑 PCR 过程中的各种影响因素^[1-5]。本文介绍了一种简便、准确的基因表达相对定量实时 RT-PCR 的 GenEx 软件分析方法,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 HK-2 细胞系(本实验室提供)、3 例健康者和 3 例乙型肝炎患者血清(已向患者交代血清的用途,并征求了患者的同意)。

1.2 方法

1.2.1 最优 PCR 退火温度的选择 以 HK-2 细胞 cDNA 为模板,利用锐博生物购买的 miR-16 的 PCR 引物,按照 TaKaRa TaqTM(DR001A)试剂说明书配制反应体系,分别设定 4 个重复管,进行退火温度为 62℃、59℃、55℃、53℃的 PCR 反应,各反应温度设定 2 个重复管。然后通过 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳评价最适退火温度。

1.2.2 实时荧光 PCR 采用 SYBR premix Ex TaqTM(Tli

RNaseH Plus)(Takara DRR420)试剂盒和相应 miRNA 引物(锐博生物提供)。20 μL 反应体系中含 SYBR Green Mix 10 μL、cDNA 2 μL、miRNA、Bulge-LoopTM miRNA Forward Primer(锐博生物提供,62.5 nmol/L)0.8 μL、Bulge-LoopTM miRNA Reverse Primer(锐博生物提供,62.5 nmol/L)0.8 μL、RNase-free H₂O 6 μL。在 ABI StepOne 仪器上按照如下顺序进行反应:95℃预变性 2 min,95℃变性 10 s,以得到的最优退火温度反应 30 s,循环 40 次。反应结束后立即进行融解曲线分析,检测温度为 70~95℃,升温速率为 0.4℃/次,恒温时间为 1 分钟/次。

1.2.3 计算扩增效率 以 10 倍系列稀释的 HK-2 细胞 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 检测。由对数浓度值为横坐标,Ct 值为纵坐标制作标准曲线。通过公式 $E=10^{(-1/S)}$ 分别计算出 miR-16 和 miR-122 的扩增效率。式中 E 代表扩增效率,S 代表标准曲线的斜率。

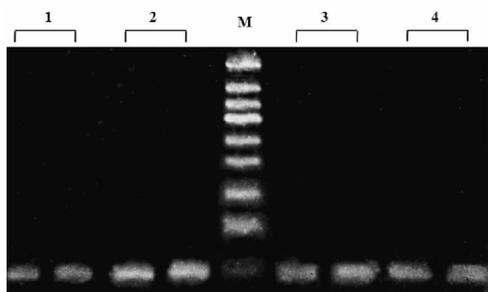
1.2.4 RNA 的提取 收集 3 例健康者和 3 例乙型肝炎患者血清各 1 mL,将其分为 500 μL 的 2 管,然后按照 Trizol LS (Invitrogen)说明书操作,提取血清总 RNA。

1.2.5 cDNA 的合成 在无核酸酶污染的 EP 管中加入 RNA 2 μL, 逆转录引物(锐博生物提供) 1 μL, 按 M-MLV (Promega) 的说明书操作合成 cDNA。

1.2.6 数据分析 实验分别采用 GenEx 软件分析和 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 计算两种方法来进行 miRNA 相对定量分析。GenEx 软件可通过 <http://www.qpcrforum.com/> 下载, 将内参基因和目的基因的扩增效率和测定得到的 Ct 值输入该软件中, 按软件说明进行操作, 然后得到表达比值及统计分析结果。 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 分析是按照文献[2]提供的公式进行相应的计算。

2 结 果

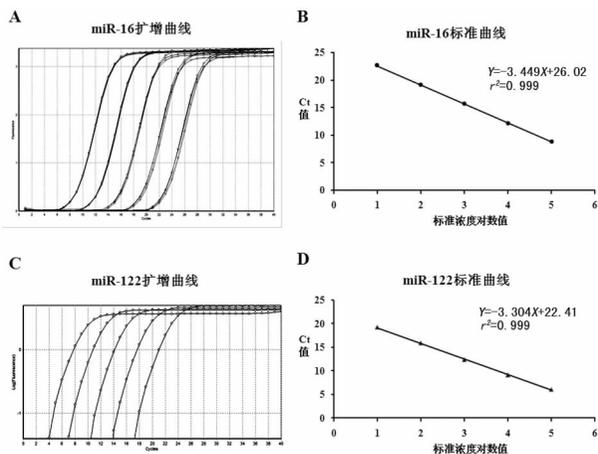
2.1 最优 PCR 退火温度的选择 以 HK-2 细胞 cDNA 为模板, 分别以退火温度为 62 °C、59 °C、55 °C、53 °C 来进行 PCR。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳发现, 退火温度为 55 °C 时, PCR 扩增后的产量最多, 图 1。



注:1 表示退火温度为 53 °C;2 表示退火温度为 55 °C;3 表示退火温度为 59 °C;4 表示退火温度为 62 °C;M 表示相对分子质量标准, 由下至上分别为 50、100、150、200、250、300、350、400、500 bp。

图 1 HK-2 细胞系 cDNA PCR 扩增产物电泳图。

2.2 扩增效率的计算 以 10 倍系列稀释的 HK-2 细胞 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 检测。由对数浓度值为横坐标, Ct 值为纵坐标制作标准曲线。由图 2 可知, miR-16 的斜率为 -3.449, miR-122 的斜率为 -3.304, 通过公式 $E = 10^{(-1/s)}$ 可计算出 $E_{miR-16} = 0.97$, $E_{miR-122} = 1.1$ 。



注:A 为参考基因(miR-16)的扩增曲线, 横轴为循环数, 纵轴为荧光值。B 为参考基因(miR-16)的标准曲线。C 为靶基因(miR-122)的扩增曲线, 横轴为循环数, 纵轴为荧光值的对数。D 为靶基因(miR-122)的标准曲线。

图 2 HK-2 细胞 cDNA 经过荧光定量 PCR 后所得的扩增曲线及根据所得的 Ct 值绘制标准曲线。

2.3 miR-122 基因相对定量分析

2.3.1 GenEx 软件相对定量分析 按照实验分组, 将相应的 Ct 值(表 1)导入 GenEx 软件中, 进行数据的预处理。把 miR-

16 和 miR-122 的扩增效率:0.97 和 1.1 的输入软件, 就可轻松地得到其校正后的 Ct 值, 见表 2。设定 miR-16 为参考基因, miR-122 为目的基因, 然后软件可自动计算重复测定同血清来源 miRNA 的均值, 然后进行相对定量分析最终得到乙型肝炎患者血清中 miR-122 的表达量是健康者的 54.06 倍, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 健康者和乙型肝炎患者 qPCR 结果

血清编号-测定频次	健康者		乙型肝炎患者	
	miR-16	miR-122	miR-16	miR-122
1-1	24.93	21.80	22.30	25.24
1-2	25.39	21.68	23.78	26.78
2-1	21.39	17.71	21.89	24.40
2-2	22.09	19.09	22.38	24.33
3-1	25.02	23.63	25.47	27.61
3-2	27.97	24.88	24.63	26.92

表 2 健康者和乙型肝炎患者的 E 值校正后数据

血清编号-测定频次	健康者		乙型肝炎患者	
	miR-16	miR-122	miR-16	miR-122
1-1	24.39	23.34	21.81	27.02
1-2	24.83	23.21	23.26	28.66
2-1	20.92	18.96	21.41	26.11
2-2	21.61	20.44	21.89	26.04
3-1	24.47	25.30	24.91	29.55
3-2	27.36	26.64	24.09	28.81

2.3.2 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法数据分析 将表 1 的数据采用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法计算后, 最终得到乙肝患者血清中 miR-122 的表达量是正常人群的 44.30 倍, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

总结以上实验数据, 分别采用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法及 GenEx 软件分析来进行相对定量分析, 用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 得出乙型肝炎患者血清中 miR-122 的表达量是健康者的 44.30 倍, 而采用 GenEx 软件分析为 54.06 倍, 可见采用 GenEx 分析的比值较 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 高。

3 讨 论

采用的实时 RT-PCR 技术进行基因表达分析包括绝对定量及相对定量法。由于研究者多关注目的基因的表达变化, 即实验组与对照组的基因表达比值的变化的。相对定量已经成为基因表达分析最常用的手段。但是目前大多数相对定量的研究都用于 mRNA 的水平上, 对于 miRNA 的研究还很少^[6-8], miRNA 具有高度保守性、时序性和组织特异性, 在逆转录的时候变异较小, 本实验着重于 miRNA 的研究。用两种数据分析方法研究 HBV 患者血清相对于健康者血清中 miR-122 相对表达量的改变。

GenEx 软件具有如下特点:(1)Ct 值的校正, 输入原始 Ct 值(表 1)以及 miR-16 和 miR-122 相应的扩增效率为 0.97 和 1.1, GenEx 软件自动通过公式 $Ct_{new} = Ct_{old} \frac{\ln(1+E_{ts})}{\ln(2)}$ 进行了 Ct 值的校正, 得到了表 2 的校正后结果 Ct_{new} 为校正后的 Ct 值, Ct_{old} 为校正前的 Ct 值, E_{ts} 为扩增效率。因为在实验过程中会出现由于引物的设计、染料和 DNA 的结合效率等的影响而出现的基质抑制现象, 通过这一步骤, 可(下转第 2942 页)

发展的重要因素。支架植入术能从根源上改善肾实质灌注不足所引起的 RASS 激活、交感神经的兴奋及氧化应激,而药物治疗只能抑制 ARAS 所引起的病理生理改变,不能解除病因,这或许可以解释在改善患者心功能方面,介入合并药物治疗要优于单纯药物治疗。

综上所述,应综合评估介入治疗的风险与获益,分析狭窄动脉与所患疾病的相互关联;ARAS 是全身动脉粥样硬化的一部分,介入治疗的成功并不意味着动脉硬化的终止,积极控制危险因素,如改善不良生活方式、降压、调脂、控糖、抗血小板等治疗,对防止动脉粥样硬化快速发展及基础疾病的治疗有深远的影响,对预防心血管并发症有重大意义,应予高度重视。

参考文献

- [1] Kane GC, Xu N, Mistrik E, et al. Renal artery revascularization improves heart failure control in patients with atherosclerotic renal artery stenosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(3): 813-820.
- [2] Salehi N, Firouzi A, Gholoobi A, et al. Relationship between distribution of coronary artery lesions and renal artery stenosis in patients undergoing simultaneous coronary and renal angiography[J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2011, 20(5): 35-40.
- [3] Zhang RY, Zhu ZB, Zhang Q, et al. Impact of moderate or severe renal insufficiency on long-term outcomes in patients undergoing drug-eluting stent based coronary intervention[J]. *Int J Cardiol*. 2009, 136(1): 72-79.

- [4] Bax L, Woittiez AJ, Kouwenberg HJ, et al. Stent placement in patients with atherosclerotic renal artery stenosis and impaired renal function; a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*, 2009, 150(12): 840-848.
- [5] Wheatley K, Ives N, Gray R, et al. Revascularization versus Medical Therapy for Renal-Artery Stenosis[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(20): 1953-1962.
- [6] 程庆砾, 蒋雄京, 陈兵, 等. 动脉粥样硬化性肾动脉狭窄诊治中国专家建议[J]. *中华老年医学杂志*, 2010, 29(4): 265-270.
- [7] Dubel GJ, Murphy TP. The role of percutaneous revascularization for renal artery stenosis [J]. *Vascular Medicine*, 2008, 13(2): 141-156.
- [8] Balk E, Raman G, Chung M, et al. Effectiveness of management strategies for renal artery stenosis; a systematic review[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145(12): 901-912.
- [9] Cianci R, Martina P, Borghesi F, et al. Revascularization versus medical therapy for renal artery stenosis; antihypertensive drugs and renal outcome[J]. *Angiology*, 2011, 62(1): 92-99.
- [10] Silva VS, Martin LC, Franco RJ, et al. Pleiotropic effects of statins may improve outcomes in atherosclerotic renovascular disease[J]. *Am J Hypertens*, 2008, 21(10): 1163-1168.

(收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-07-12)

(上接第 2938 页)

以较好地降低实验过程中出现的这类抑制作用。(2)统计学分析,采用 t 检验,克服了传统统计学分析的复杂性,特别是能用于组间(如实验组与对照组)多个基因表达分析。

本文将 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法与 GenEx 软件分析进行了比较,表明采用 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法计算的表达比值比 GenEx 软件分析低 10%,最好采用 GenEx 软件分析。

目前市场上销售的荧光定量 PCR 仪如 Stratagene 公司、Life Technology 公司等多采用的 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 相对定量法。因其将 PCR 的扩增效率设定为 1,但实际的扩增效率不可能达到 1,因此该法计算出的相对定量结果通常不太精确^[9]。GenEx 软件是专门设计用于实时 RT-PCR 技术相对定量基因表达分析,其考虑了各方面的因素,因此相对于 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 的方法来说具有更高的精确度。总之,GenEx 软件分析较 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 法更适用于相对定量的数据分析。

参考文献

- [1] Huang Y, Zou Q, Wang SP, et al. The discovery approaches and detection methods of microRNAs[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(6): 384125-384135.
- [2] Braconi C, Henry JC, Kogure T, et al. The role of microRNAs in human liver cancers[J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(6): 752-763.
- [3] van Malenstein H, van Peh J, Verslype C. Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011[J]. *Eur J*

Cancer, 2011, 47(12): 1789-1797.

- [4] 时姗姗, 王建东. miRNA 在肿瘤分子病理学研究中的应用[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(10): 1111-1113.
- [5] Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization[J]. *Genome Biol*, 2009, 10(6): R64.
- [6] Ye KP, Zhang QQ, Jiang Y, et al. Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR[J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 117-124.
- [7] McCabe EM, Burgess CM, Walsh D, et al. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the hliA gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 447-456.
- [8] Miller ND, Davidson PM, D'Souza DH. Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella typhimurium* detection from lettuce and tomatoes[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(4): 1088-1097.
- [9] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(9): 883-887.

(收稿日期: 2013-04-09 修回日期: 2013-06-28)