

适合于 miRNA 的荧光定量 PCR 优化体系的建立及其标准

秦剑英^{1,2}, 刘灶长¹, 孔德艳¹, 周立国¹, 罗利军¹

(¹上海市农业生物基因中心, 上海 201106; ²上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 实时荧光定量 PCR 是目前基因表达量差异分析的首选方法之一。虽然其操作简单, 但如何保证其定量结果的可信度一直是个难题。特别是针对只有 20 多个碱基的 miRNA 的定量分析。本研究以水稻 miR408 在不同组织中的表达差异为实例, 系统地优化和阐述了有关荧光定量的新标准及要求。结果表明, 引物的浓度对于荧光定量 PCR 体系的优化至关重要。

关键词: 基因表达量分析; MIQE 标准; miRNA; 荧光定量 PCR

Establishment and Criteria of Optimal Reaction System of RT-qPCR Suitable for miRNA

QIN Jian-ying^{1,2}, LIU Zao-chang¹, KONG De-yan¹, ZHOU Li-guo¹, LUO Li-jun¹

(¹ Shanghai Agrobiological Gene Center, Shanghai 201106; ² Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract: Fluorescent quantitative PCR is one of the first choices for the methods in analyzing gene expression level. It is simple for operation, but how to ensure the credibility of the quantitative PCR results is still a problem to be tackled especially for the quantitative analysis of miRNA with only about 20 nucleotides. In this paper, the expression difference of miR408 gene in different tissues in rice was taken for instance. The new criteria and requirements of fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) were systematically optimized and summarized. The results indicate that the concentration of primers plays a crucial role in optimizing the fluorescence qPCR detection system.

Key words: Gene expression analysis; miRNA; Standards for MIQE; RT-qPCR

荧光定量 PCR 因其简单快速、灵敏度高、成本相对低廉, 在分子生物学研究中被广泛应用于转基因生物检测、基因表达量分析以及基因型分析等多个方面。特别是随着基因芯片以及高通量测序的大规模应用, 基于非特异性荧光染料分子的相对定量方法, 已逐步成为基因表达量分析的常规方法之一^[1]。在植物学研究中, 一方面, 荧光定量 PCR 技术是对其他分子生物学数据结果的验证和补充; 另一方面, 也常常作为生物学表型的主要分子依据, 被越来越多的实验室所采用。

目前, 荧光定量 PCR 技术虽然被称为基因定量的“金标准”, 其应用范围也很广, 但在实验设计、RNA 样品的制备和预处理以及数据结果分析等方面仍然

存在很多误区, 大量的技术性缺陷直接影响到了实验数据的准确度以及相关实验结论的可靠性^[2]。特别是反应条件的优化如果不做好, 很有可能成为实验结果不真实或实验结论完全相反的原因。在植物学领域包括《Plant Cell》在内的一些主流刊物针对定量 PCR 实验也因此而提出了更高的要求^[3-4]。MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) 标准的提出无疑是为定量 PCR 技术要求提供了一份更加详尽的参数列表, 同时也为定量实验数据的标准化制定了一个规范性的概念性框架^[5]。此外, 基于定量 PCR 数据的可扩展性标记语言协议 (RDML) 的建立, 更进一步使得定量实验数据相关信息的共享及交换成为可能^[5]。虽然

收稿日期: 2011-04-01 修回日期: 2011-12-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31071400)

作者简介: 秦剑英, 硕士研究生。E-mail: qjy08@sagc.org.cn

通讯作者: 刘灶长, E-mail: lzc@sagc.org.cn; 罗利军, E-mail: lijun@sagc.org.cn

上述的一些标准或者协议,在理论上讲完全能够满足投稿的需要和同行评审专家的要求,但是在实际的实验操作中却很难完全做到。

为了更加清晰、明确地阐述荧光定量的标准及其在实际实验过程中的应用,本试验主要针对荧光定量 PCR 技术当前存在的种种实验误区和不规范的技术性操作,参考有关定量 PCR 的国际最新标准,以水稻 *miR408* 基因为特例,主要研究了该 RNA 在水稻不同组织中的表达差异。在 miRNA 的表达分析实验的基础上,以实验研究报告的形式,为适合于 miRNA 的荧光定量 PCR 标准体系的建立提供了一整套简单实用的实验技术方案。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本实验选取旱稻 IRAT109 幼苗(叶龄 3.1)期的幼根和抽穗初期的茎、剑叶以及幼穗组织(各自包括 3 个独立的生物学重复)。液氮速冻,置于 -80°C 保存。

1.2 定量方法

以水稻 *Actin2* 基因作标准内参,采用最为常用的 Livak(2- $\Delta\Delta\text{Ct}$)方法^[6]计算 miR408 基因在 4 种组织中的相对表达量。

1.3 主要的仪器及耗材

实时荧光定量 PCR 仪(ABI7000),普通 PCR 扩增仪,水平电泳仪及检测系统,离心机(4°C 和常温),进口八连管(with EU wide optical 8-Cap strip)和 Eppendorf 管。

2 结果与分析

2.1 RNA 样品的质量检测

高质量的 RNA 无疑是获得准确定量实验结果的基本前提。随机抽取的 8 个 RNA 样品,电泳结果条带清晰,28S 与 18S rRNA 亮度接近 1:1,且无明显降解(图 1)。通过 NanoDrop ND-4000 紫外分光光度计检测样品 OD260/OD280,结果是该比值均大于 1.8(表 1),说明样品无蛋白质污染,质量符合实验要求。OD260/OD230 比值部分小于 1.8,表明 RNA 样品中盐离子浓度偏高。这一点对于“两步法”反

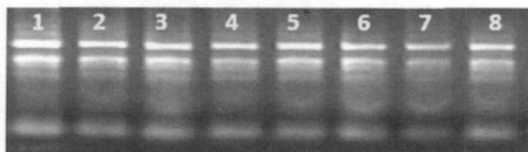


图 1 总 RNA 样品的电泳检测结果
Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA

转录而言,由于 cDNA 转录反应和定量检测是不同的反应体系,所以并不会影响最终的定量结果。

表 1 RNA 样品浓度及纯度的检测结果

Table 1 Determination of RNA concentration and purity			
样本 Sample	RNA 浓度(ng/ μL) RNA concentration	A260/A280	A260/A230
1	536.07	2.07	2.09
2	320.51	2.04	1.95
3	432.94	2.06	1.79
4	363.00	200	1088
5	301.80	2.03	1.62
6	415.30	2.10	1.93
7	198.60	2.08	1.76
8	273.37	2.07	1.66

2.2 定量 PCR 体系的系统优化

荧光定量实验反应体系包括了商业化的混合反应液、SYBR Green I 染料、定量引物和 cDNA 模板 4 个主要成分。为了保证定量检测反应的高灵敏度和特异性,一方面需要选择合适的商业化试剂盒,另一方面可在实验的基础上进一步优化反应体系,选择合适的退火温度和引物浓度,从而保证在较宽的动态范围内都有很好的扩增效率。

2.2.1 引物浓度的影响 按照一般的商业试剂盒中所推荐的引物终浓度(100~200nmol/L),正向引物(F)和反向引物(R)分别设置了 4 个不同的浓度梯度(表 2)。水稻内参基因 *Actin2* 的引物浓度组合 F1/R2 最佳(反应体系中引物最终浓度 F1/R2 为 100/200 nmol/L),与 F1/R0.5 组合相比 Ct 值相对较低(图 2)。在其他组分未作任何改变的前提下,充分说明 F1/R2 的扩增效率较 F1/R0.5 而言相对较高。对于 miR408 基因而言,由于引物设计本身的原因,扩增反应特异性较差。通过不同浓度的引物组合配比,优化结果显示 F1/R3 浓度组合明显改善了扩增产物的特异性,R 引物浓度相同(300nmol/L),F 引物终浓度为 100nmol/L 时的反应特异性明显优于 300nmol/L(图 3)。

表 2 RT-qPCR 反应优化体系中 F/R 引物浓度梯度的组合
Table 2 Combinations of different primer concentrations in RT-qPCR reaction system ($\mu\text{mol/L}$)

引物终浓度 Primer concentration		F0.5	F1	F2	F3
		0.5	1	2	3
R0.5	0.5	50/50	100/50	200/50	300/50
R1	1	50/100	100/100	200/100	300/100
R2	2	50/200	100/200	200/200	300/200
R3	3	50/300	100/300	200/300	300/300

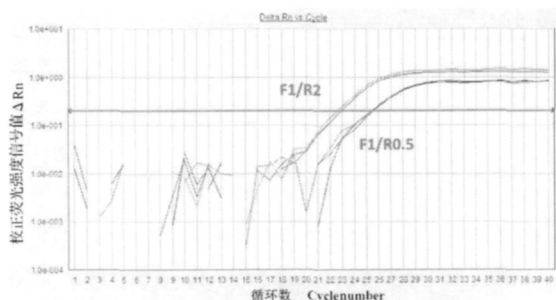


图2 引物浓度对 Ct 值的影响

Fig. 2 Effect of primer concentration on Ct value

PCR 体系中其他组分保持不变,

仅 R 引物的不同导致 Ct 值发生明显的改变

In the reaction system change of reverse primer concentration caused significant change of Ct value while other conditions remain constant

2.2.2 退火温度的确定 为了进一步优化 PCR 扩增效率, 分别设定了 4 个不同的退火温度。通过荧光定量 PCR 仪检测系统的溶解曲线和扩增曲线分析表明, 内参基因 *Actin2* 在不同退火温度条件下, PCR 扩增效率和反应特异性均无明显差异(图 4)。

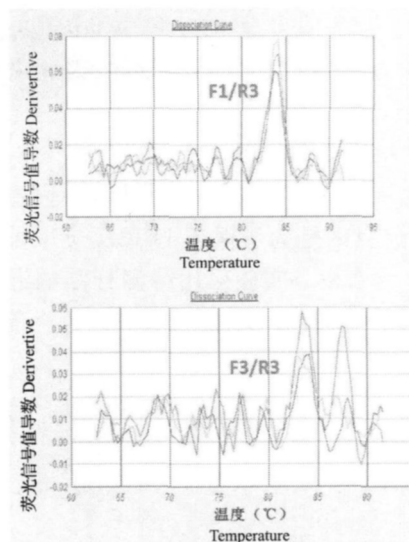
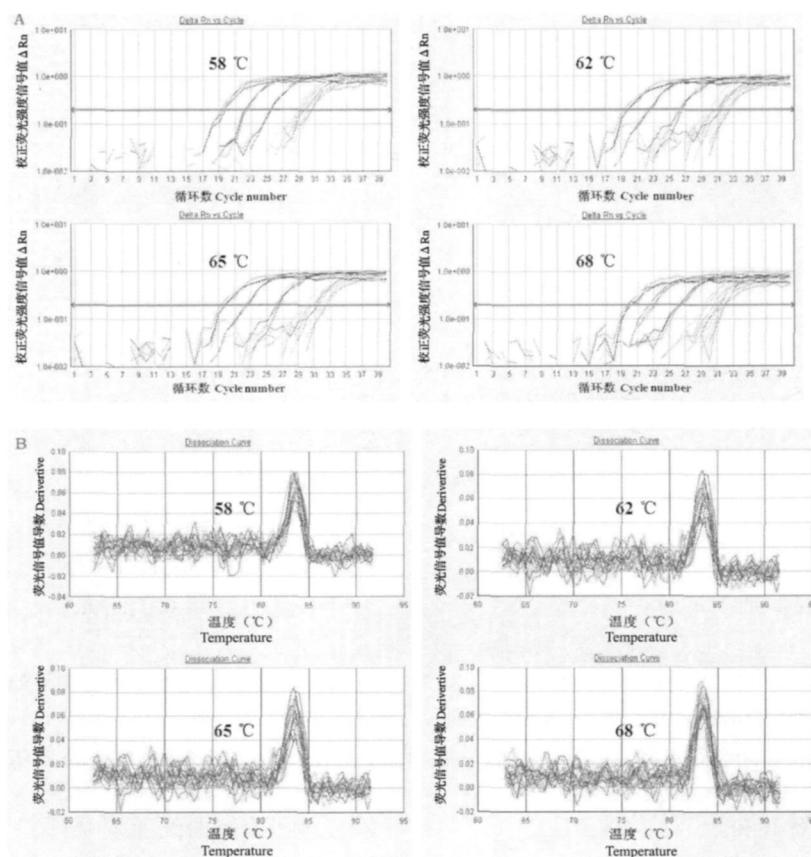
图3 引物浓度对 *miR408* 基因 RT-qPCR 反应扩增特异性的影响Fig. 3 Effect of primer concentrations on specificity of amplified products for gene *miR408*

图4 RT-qPCR 反应温度的优化选择

Fig. 4 Optimization of RT-qPCR reaction temperature

A: 以 10 倍梯度稀释后的 8 个混合样品为模板, 内参基因 *Actin2* 在不同温度条件下的扩增曲线(每个样品 3 次重复)

B: 以 10 倍梯度稀释后的 8 个混合样品为模板, 内参基因 *Actin2* 在不同温度条件下相应的溶解曲线峰

A: Amplification curves of inter reference gene *Actin2* under different temperatures in 8 templates of 10 fold diluted samples with 3 replications;

B: Melting curves of inter reference gene *Actin2* under different temperatures in 8 templates of 10 fold diluted samples with 3 replicates

由于在上述引物浓度优化过程中 *miR408* 基因在 62℃ 的退火温度条件下特异性较好, 因此未作进一步的优化。

2.3 PCR 扩增效率比较

通过对引物浓度的一系列优化和不同退火温度的选择, 最终目的是为了保证 PCR 反应尽可能地达到 100% 扩增效率。实验采用待测样品的混合样进行了 10 倍系列浓度梯度的稀释, 其中每个稀释梯度

设置 3 个重复。检测结果显示内参基因与目的基因二者之间的扩增效率基本一致, 均在可接受范围之内。*Actin2* 的扩增效率为 105%, 涵盖了 4 个浓度梯度的跨度范围, 最大 Ct 值为 31 (图 5A)。*miR408* 基因的扩增效率为 97.6%, Ct 值跨度范围介于 19~34 之间 (图 5B)。内参基因和目的基因的标准曲线可信度 (R^2) 均大于 98%, 说明该检测样品具有非常好的可重复性, PCR 反应优化成功。

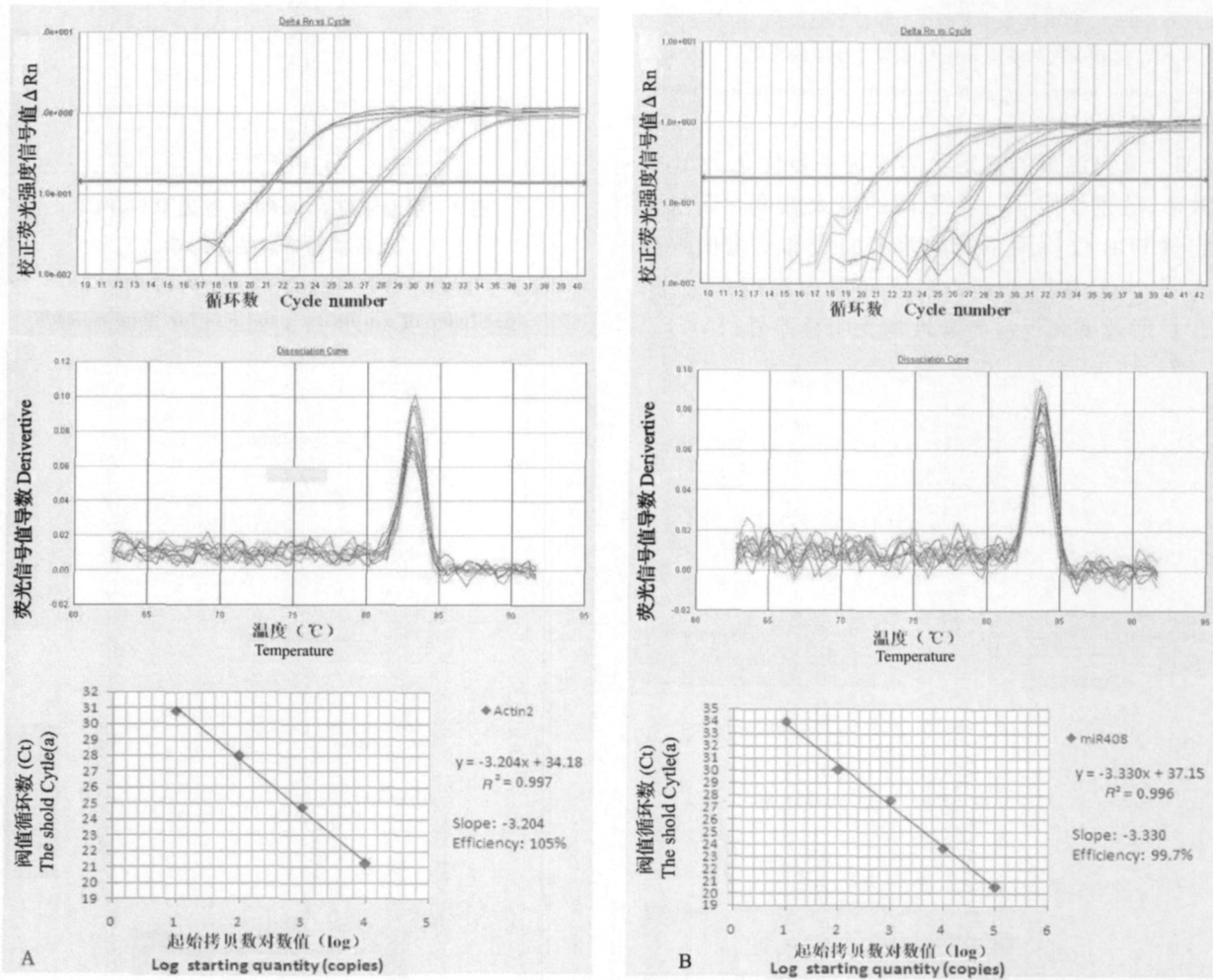


图 5 内参基因 *Actin2* (A) 和目标基因 *miR408* (B) 的扩增曲线、溶解曲线及其相对应的标准曲线和扩增效率

Fig. 5 Amplification curves, melting curves and the corresponding standard curve and amplification efficiency of inter reference gene *Actin 2* (A) and the target gene *miR408* (B)

2.4 定量结果的整体评价

按照标准的排布方式“样品最大化原则”(图 6), 红、绿、蓝、紫 4 个区域对应样品分别为根、茎、剑叶以及分化中的幼穗组织。其中 A、B、C 分别为 3 个生物学重复, D、E、F 为各自对应的内参基因。G1-6 和 H1-6 分别为 *miR408* 基因和内参 *Actin2* 基因的非模板对照 (NTC)。定量结果显示非

模板对照溶解曲线无明显峰值, 扩增曲线也无法检测到相应的 Ct 值, 充分说明样品中无外源 DNA 污染, 也无引物二聚体形成。以剑叶组织样品的扩增曲线为例, 内参基因与 *miR408* 的 Ct 值均在可检测范围之内。二者退火温度基本一致, 溶解曲线呈明显单峰, 引物特异性较好, 这一点与电泳检测结果相一致。以上结果完全符合定量的基本要求。最终的

定量数据表明 *miR408* 基因在根中的表达量最高、幼穗中次之、茎中的表达量最低(图 7A)。与本实验室对 *miR408* 启动子的组织 GUS 染色研究结果基本一致(图 7B), 进一步说明了该定量实验结果的可靠性。

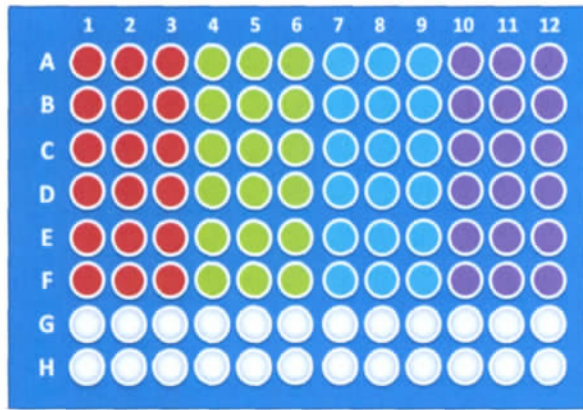


图 6 标准的荧光定量排布示意图

Fig. 6 Diagram of the standard qPCR reaction tubes arrangement in a 96 pole plate

红、绿、蓝、紫、白 5 种不同的颜色分别代表了 5 个不同的功能模块区。红、绿、蓝、紫 4 个区域可分别按照不同的基因或者按照不同的样品来排布。以红色区为例: A、B、C 为生物学重复设置, 1、2、3 为技术重复; 与此相对应的 D、E、F 为相应的内参基因。

白色区域视定量引物的不同可设置不同的 NTC 或者 IRC

Colors in red green blue purple and white represent 5 different reaction zones for different genes or for different samples. The white zone is used for no template control (NTC) or inter-run calibrator (IRC). Other color zones are used for samples. For example, A B and C are for sample repeats 1 2 and 3 are for technical repeats; D E and F are for corresponding inter reference gene

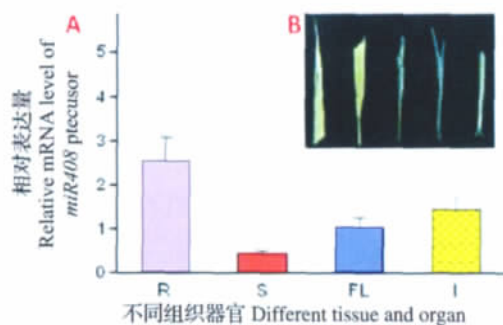


图 7 *miR408* 组织表达特异性

Fig. 7 Tissue specific expression profile of *miR408*

A: R: 根 S: 茎 FL: 剑叶 I: 幼穗; B: *miR408* 基因启动子的 GUS 组织染色(主要位于根基部以及幼嫩的穗部组织, 剑叶和茎部的相对较弱)

A: R root; S stem; FL flag leaf; I inflorescence. B: Histological dying of GUS driving by *miR408* promoter (dying mainly in the root base and inflorescence and weak in the flag leaf and stem)

3 结论与讨论

RNA 样品质量、体系的优化和定量结果的评价无疑是荧光定量实验最重要的 3 个方面。首先, 高质量的 RNA 是实验成功的基本条件; 体系的进一步优化为定量数据的准确性提供了根本性保证; 对于荧光定量实验数据本身的可信度完全可以从溶解曲线和扩增曲线中得到体现, 而对于采用相对定量计算方法所得到的定量实验结果, 则必须提供相应的目的基因和内参基因的梯度扩增曲线和标准曲线图谱, 当然从定量结果本身来看, 与其他实验结论基本一致, 一定程度上也能够反映出该定量实验方法的可靠性。本实验主要从这 3 个方面入手对 *miRNA* 的定量实验体系进行了系统优化。

定量引物优化的结果表明, 除了引物本身的特异性之外, 引物浓度也是影响最终实验结果准确性的重要因素之一。本研究表明在普通的荧光定量实验中, 关于引物浓度的优化还是非常必要的。特别是对于 *miRNA* 前体而言, 基因序列本身较短而且存在较为保守的二级结构, 通过引物浓度的系统优化, 一方面大大提高了 PCR 的扩增效率, 同时也可以在一定程度上避免引物二聚体对定量结果的影响。

总体而言, 荧光定量的实验操作本身相对比较简单, 但是想要获得一个较为准确的定量结果需要注意的实验细节还很多。结合国际最新的荧光定量 MIQE 新标准, 主要从以下几个方面展开讨论。

3.1 实验材料的选取

根据研究目的的不同, 选取实验材料的要求各异。总的来讲, 至少 3 个或以上的生物学重复样品才符合统计学意义, 否则只能作为预实验参考, 其结果本身是不可信的。此外, 样品的处理方法、取样的时间以及样品的保存方式等在每一个定量实验方法中是必须注明的。

3.2 RNA 样品的制备及检测

目前植物总 RNA 的提取方法多数都参照 TIANGEN 公司 Trizol-A + 商业试剂盒进行抽提。需要特别注意的是: 由于 RNA 极易降解, 关于 RNA 的保存, 最好使用 95% 的乙醇重悬后, 置于 -80°C 长期保存。若短期内使用完, 则少量分装后置于 -20°C 即可。

关于 RNA 的质量评价包括了纯度和完整性两个方面。由于 *miRNA* 前体基因是由聚合酶 II 转录而来, 具有普通基因的结构特征, 因此从这两个方面对 RNA 质量进行评价是完全可行的。传统方法主

要通过紫外分光光度计 (spectrophotometer) 测定 A260/A280 吸光值的比值来检测纯度 (图 1 A)。RNA 的定量目前常用的还有 Agilent BioAnalyser、BioRad Experion、Ribogreen 以及 Nanodrop 等。采用不同仪器所测定的 RNA 定量数据之间不具可比性, 有相关实验证明: 迄今还没有哪两种方法所得到的实验数据是完全相同的^[1]。因此, 在具体的实验操作过程中采用同一种技术方法测定所有的 RNA 样品是必要的。关于 RNA 的完整性, 主要通过凝胶电泳系统分析比较 rRNA 28S 和 18S 带型及亮度来间接评价 RNA 的完整性 (图 1 B)。另外一种 RNA 评价方法就是通过对内参基因, 如 GAPDH 3' 与 5' 端 cDNA 不同的扩增比率衡量 mRNA 的完整性。3:5 的比值接近 1 说明 RNA 是完整的, 比值大于 5 则表明已经发生降解。同样的方法也可以应用于 cDNA 完整性的检测^[7]。

3.3 反转录 cDNA 第 1 链的制备

在进行反转录之前对 RNA 样品进行适当的 DNase 处理以保证消除 DNA 污染对定量结果的影响。定量实验的反转录与基因克隆所不同的是, 必须选择 RNaseH 为阳性的反转录酶 (如, 本实验中所用到的 Promega Cat# A3500) 这样做不仅降低了实验成本, 更重要的是能够保证 RNA 模板与 cDNA 之间具有更好的线性关系。目前虽然大多数生物公司都在宣称各自产品的反转录效率高。但是为了能够获得更加可靠的定量数据, 在反转录之前最好还是尽可能地把 RNA 浓度调整到相同水平, 而且 RNA 浓度必须适中, 以保证各样品相同的反转录效率。在植物体内, 保守和非保守 miRNA 的表达丰度差异很大, 因此保证每次反转录效率和体系的一致性显得更为重要。

3.4 定量引物的设计

首先需要考虑的是 PCR 扩增反应的特异性, 引物的长度要求一般为 18 ~ 25bp, GC 含量在 50% 左右, 引物退火温度 (T_m 值) 为 58 ~ 65℃ 之间。为了进一步确保目标扩增片段的特异性, 最简单的方法就是选择合适的数据库 (如 NCBI) 进行 Blast 序列比对。同时为了保证具有较高的扩增反应效率, 扩增片段长度需介于 80 ~ 150bp 之间, 因为扩增片段过长会影响到扩增效率, 过短则导致无法与可能产生的引物二聚体区分。引物结合位点最好位于目标序列 2 级结构区域之外。此外, 为了提高引物结合的稳定性, 增强 PCR 扩增效率, 引物 3' 末端 1 ~ 2 个 G/C 碱基为佳, 同时也要避免连续 3 个以上 G 或 C

单碱基的重复出现。如果不可避免地存在引物二聚体, 自由能最好不低于 -10kcal/mol, 并且首先保证 3' 端不存在互补配对^[1]。在 miRNA 前体定量实验中, 选择在 miRNA 茎环前体的同一侧进行引物设计可以最大限度地避免引物二聚体的形成。另外, 由于 miRNA 前体自身序列较短, 仅仅通过对定量引物的设计很难避开扩增区段内所形成的茎环二级结构。而这一点与 MIQE 标准中有关定量引物设计原则的要求完全不符, 这也是 miRNA 前体定量引物实验的最大难题。最终这种含有前体茎环二级结构的前体是否会影响定量实验结果的准确性, 仍需要进一步通过实验来进行验证。

3.5 实验的总体设计

合理的实验设计不仅能够节约时间、节省成本, 同时也可以大大提高实验结果的准确性和精确度。无论是 miRNA 还是普通的定量实验, 3 个生物学重复和 3 个技术重复是必须的, 另外, 在每一次的 PCR 定量检测反应中 2 ~ 3 个重复的非模板对照 (NTC) 也是必不可少的。待测样品在每一轮 PCR 反应中的合理排布方式, 不仅仅方便后续的数据处理, 而且会影响到实验结果的准确性。

简单地讲, 样品的排布方式主要遵循基因最大化和样品最大化两个基本的原则^[7]。基因最大化, 即安排多个不同基因在同一轮 PCR 反应中, 多用于一些商业化的试剂盒或一些预期性试验当中。然而更多的研究目的是想了解某个基因在不同的样品中的表达差异, 所以采用样品最大化的排布方式更为合理。另外, 如果待测样品过多, 对于有限的 96 孔 PCR 板而言不可能将所有的样品都安排于同一轮 PCR (图 6), 此时可在每一轮 PCR 中设置特定的内部循环参比对照样品 (IRC)。在每一轮的 PCR 中都设定一个相同样品的对照, 最终通过对照样品结果的一致性 or 相关度来评价和校正每一轮 PCR 反应之间数据的准确性, 从而消除由于不同批次 PCR 反应所产生的差异。这也是目前更多的实验室选择使用 384 孔定量 PCR 仪的理由之一。需要特别指出的是, 在样品较少或者有时为了节约时间, 很多实验者倾向于在多个基因和样品之间相互拼凑直至排满整个 96 或 384 孔的 PCR 板。这样做的后果一方面使得加样的过程变得繁杂而极易出错, 另外数据处理也不方便, 同时也影响了实验结果的分析比较。从经济的角度考虑, 定量试剂的成本也远远高于 PCR 耗材的造价, 所以完全没有必要去强行拼凑。

3.6 反应体系的进一步优化

虽然目前荧光定量的检测多数使用的是商业化的试剂盒,除了保证合适的退火温度外,PCR 反应体系本身似乎并没有太多需要优化的必要。但是很多实验者包括一些生物公司都过分地关注模板的质量及其影响,而忽视了引物浓度这一影响反应体系的重要因素。特别是对于 miRNA 前体的定量实验而言,引物设计方面本身就存在一定的缺陷,本研究通过引物浓度的系统性优化,发现引物浓度的不同组合不仅影响了扩增目的片段的特异性而且还会导致 Ct 值的明显变化。一方面可能由于所研究的目的基因本身在基因组中所处位置的特殊性或者其自身形成的二级结构导致必须采用不同的引物浓度组合才能达到最大的扩增效率;另一方面,也许正是由于不同浓度的引物组合才避免了过多引物二聚体或扩增区段内二级结构的形成,从而消除了二级结构对于扩增反应的影响,从而提高了定量结果的准确性。总之,该实验结果充分表明了引物浓度优化对 PCR 反应体系的重要性。此外,对于内参基因 *Actin2* 进行了不同温度条件的摸索,发现该基因引物对于退火温度并不敏感,具有较宽的温度范围。这一点对于内参基因而言非常重要,特别是对于一些退火温度相差较大的不同引物之间仍然能够保证扩增效率的一致性。其实,在实际的定量实验过程中,一般对于退火温度的选择范围都不会很大。因为按照严格的定量引物设计原则,引物的长度和扩增片段的大小范围已经基本上决定了定量检测反应的退火温度。在普通的定量试剂盒中,退火温度的选择一般都默认为 60℃。对于 miRNA 前体而言,由于扩增区段内二级结构的存在,所以本研究选择了 62℃ 作为标准的退火温度。实验结果表明,目标基因 *miR408* 在 62℃ 的退火温度条件下特异性较好,而且扩增效率也完全处于可接受范围之内,因此未作进一步的优化。

3.7 PCR 扩增效率的整体评价

以内参基因作标准的相对定量方法,必须要求内参与目标基因的扩增效率保持一致。100% 的扩增效率一方面是实验重复性良好的保证,另一方面也是 Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 方法进行计算表达量变化倍数的一个基本假设^[6]。在实际的实验操作过程中,PCR 扩增效率保持在 95% ~ 105% 的范围内才是可以接受的。在本实验的研究结果中,目标基因 *miR408* 和内参基

因 *Actin2* 的扩增效率均处于可接受范围之内,说明定量实验数据是完全可信的。扩增效率过低,可能是由于反应为优化或引物设计不当。扩增效率过高,最直接的原因是由于引物二聚体的影响,此外,模板浓度过高时反应体系中存在的抑制剂也可能导致 Ct 值滞后延迟,扩增效率计算结果较实际偏高。在实际的定量实验中,对 cDNA 模板进行 10 ~ 100 倍的稀释是完全可行的,同时也可以避免因模板量不够而进行多次反转录所造成的系统实验误差。这一点无论是对于普通基因还是 miRNA 的定量实验都很重要。

3.8 数据分析的要求及标准

对于一个准确的定量实验而言,数据处理非常重要。特别是在没有使用任何特定的定量数据分析软件的情况下,数据分析一定要遵循基本的数理统计规律,如异常值的取舍以及内参基因的校正等等必须特别标注说明,尽可能地做到数据分析处理过程的透明化^[8]。此外需要特别说明的一点是必须保证 3 次技术重复和 3 个生物学重复之间的一致性。在具体的实验操作中,定量检测时的排布方式最好采用样品最大化原则,以便不同样品之间进行比较。

相对定量实验结果的计算方法主要是采用内参基因对定量数据进行标准化处理,从理论上讲,内参基因的表达量必须在各个样品中是恒定的。以本实验为例,内参基因 *Actin2* 在水稻根、茎、剑叶和幼穗 4 种不同组织中的表达量(Ct 值)几乎完全一致,无明显差异,这样才能够保证定量实验的准确性(图 8)。对于采用单个内参的定量实验而言,必须有相关的实验验证所选取的内参基因在不同组织或细胞以及所有研究样品中表达量变化无明显差异^[9]。但是根据前人的大量研究表明,没有任何一个内参基因(如最常用的 GAPDH、rRNA 和 Actin 等)在所有组织或细胞以及不同的时间点和不同处理样品中是保持不变的。因此,一般要求同时采用多个内参基因同时进行数据校正,方能保证最终定量数据结果能够代表并真实反映目的基因在生物体中的实际表达差异^[10]。关于内参基因的选择,首先必须是针对所有待测样品而言的;其次,一个好的内参基因在所有样品之间的表达差异(ΔCt 值)应该是最小的。目前,普遍的做法就是,同时选择多个内参基因,然后选择差异最小的 2 ~ 3 个内参进行几何平均以校对不同内参之间的差异,从而最大限度地保证定量数据结果的可靠性。

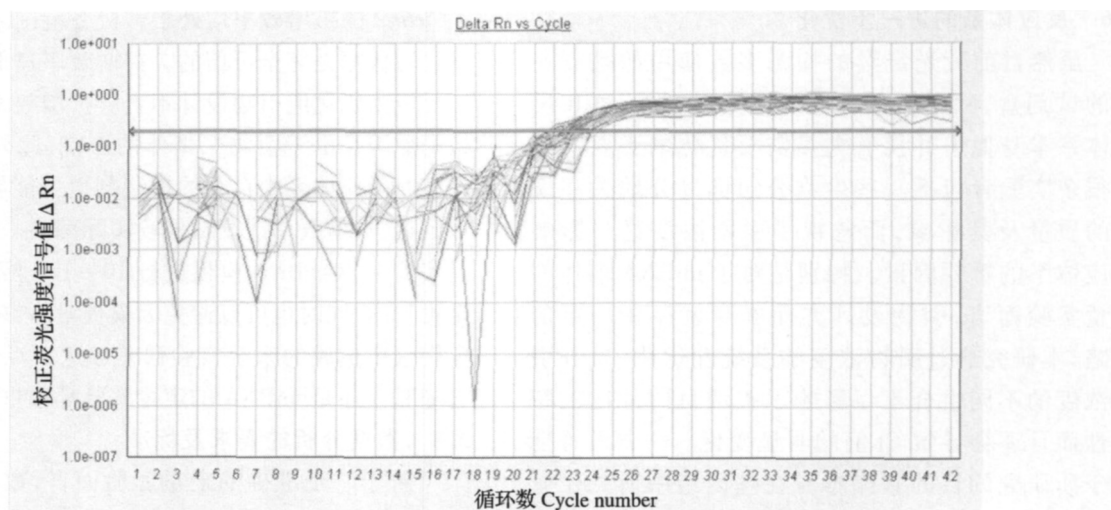


图8 内参基因 *Actin2* 在水稻不同组织中的扩增曲线

Fig.8 Amplification curve of inter reference gene *Actin2* in different tissues of rice

以上8个方面基本涵盖了荧光定量实验标准的所有要求,与MIQE标准最早提出的85项参数细则相比不仅大大简化了其评判条例数目,更重要的是结合了miRNA荧光定量实验的实际操作范例,更有利于定量实验初学者对于荧光定量实验技术要点的快速掌握,从而获得较高质量的基因表达数据。

参考文献

- [1] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. Nat Protoc 2006 1: 1559-1582
- [2] Bustin S A. Why the need for qPCR publication guidelines? — The case for MIQE [J]. Methods 2010 50: 217-226
- [3] Martin C. Refining our standards [J]. Plant Cell 2008 20: 1727
- [4] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. Plant Cell 2008 20: 1736-1737
- [5] Bustin S A, Benes V, Carson J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clin Chem 2009 55: 611-622
- [6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods 2001 25: 402-408
- [7] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. Methods, 2010 50: 227-230
- [8] Bustin S A, Beaulieu J F, Huggett J, et al. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments [J]. BMC Mol Biol 2010 11: 74
- [9] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, et al. Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR [J]. Plant Cell 2008, 20: 1734-1735
- [10] Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: what relevance to plant studies [J]. J Exp Bot 2004 55: 1445-1454