

结直肠癌组织定量 RT-PCR 分析中内参基因的选择

黎书炜¹, 杜牧龙¹, 金 经¹, 储海燕¹, 朱陵君², 张正东¹, 王美林^{1*}

(¹南京医科大学职业医学与环境卫生学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院肿瘤内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 筛选适用于结直肠癌组织样本的内源性参照基因。方法: 以 10 例结直肠癌患者组织总 RNA 为研究材料, 采用实时定量 RT-PCR 检测 GAPDH、ACTINB、UBC、HRPT1 和 18S rRNA 这 5 个候选内参基因的表达量, 应用 geNorm 和 NormFinder 两种软件分析选择最佳内参基因。结果: geNorm 软件发现 GAPDH 与 ACTINB 的 M 值相对最小, 为最佳内参基因组合, 18S rRNA 的 M 值最大, 稳定度最低; 而 NormFinder 软件分析认为 GAPDH 表达稳定性最佳, UBC 次之。结论: 适用于结直肠癌组织样本 RT-PCR 实验的内参基因为 GAPDH, 最佳组合为 GAPDH 与 ACTINB, 而 18S rRNA 及 HRPT1 不是合适的内参基因。

[关键词] 结直肠癌; 内参基因; 实时定量 RT-PCR

[中图分类号] Q344.13; R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-952-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160811

Selection of internal reference genes for real-time quantitative RT-PCR of colorectal cancer tissue

Li Shuwei¹, Du Mulong¹, Jing Jin¹, Chu Haiyan¹, Zhu Lingjun², Zhang Zhengdong¹, Wang Meilin^{1*}

(¹Department of Occupational Medicine and Environmental Health, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To select the optimal internal reference genes for gene expression analysis in colorectal tumor tissues. **Methods:** The total RNA of colorectal cancer tissues from 10 patients were studied. The mRNA transcription profiles of five frequently used housekeeping genes, including GAPDH, ACTINB, UBC, HRPT1, and 18S rRNA, were tested by real-time quantitative RT-PCR. The stability of these control genes was analyzed by geNorm and NormFinder softwares. **Results:** The M value of GAPDH and ACTINB was the least and identified as the suitable and stable internal reference gene combinations using geNorm software. The M value of 18S rRNA was the highest and its stability was the lowest. Furthermore, GAPDH was the most stable reference gene, which was followed by UBC using NormFinder software. **Conclusion:** The combination of GAPDH and ACTINB, but not 18S rRNA and HRPT1, is the most reliable reference gene group for normalization of real-time RT-PCR in colorectal tumor tissues.

[Key words] colorectal cancer; internal reference gene; real-time quantitative RT-PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 952-955]

实时定量 RT-PCR (real-time quantitative RT-PCR) 是一种高通量、高精度的 PCR 技术。通过实时定量 RT-PCR 技术将 mRNA 逆转录为 cDNA 后再作为模板进行实时荧光 PCR 检测基因的表达已然成为了一种快速精确的实用技术^[1]。采用实时定量 PCR 进行基因表达分析时, 选择合适的管家基因 (housekeeping gene) 作为内源性参照基因, 通过标准化和校正等方法获得目的基因表达量的真正差

异是控制不同样本间变异的基础。近年来, 多篇研究报道, 常见的管家基因表达量在不同类型的组织、细胞以及不同实验条件下并非恒定, 甚至有很大差异^[2-3]。管家基因的不合理选择可能导致假阴性或假阳性的结论^[4]。

结直肠癌是常见的消化道肿瘤之一, 近年来发病率 and 病死率均呈上升趋势^[5]。定量 PCR 在结直肠癌基因表达分析研究中的应用越来越广泛。目前, 国内外对结直肠癌组织的相关内源参照基因的研究较少, 因此筛选出最为稳定的管家基因作为内参, 对于提高其 RT-PCR 分析结果的可信度具有重

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81373091); 江苏省高校优势学科建设资助(公共卫生与预防医学)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: mwang@njmu.edu.cn

要的作用。本研究拟以结直肠癌组织样本和常用的管家基因作为研究对象,通过实时定量 PCR 技术检测候选基因在结直肠癌组织样本中的表达水平,并用 geNorm 和 NormFinder 两种软件系统评价其基因表达的稳定性,筛选出适宜的内参基因用以定量检测结直肠癌组织转录水平基因。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 2011—2012 年南京医科大学第一附属医院收治的 10 例初发结直肠癌患者的组织样本,术

前均未行放化疗。取原发肿瘤组织及癌旁组织大约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm。组织取出经 PBS buffer 冲洗后,放入盛满 RNAlater 的 1.5 mL 冻存管内,4℃过夜后于-80℃保存。本研究获得了南京医科大学伦理委员会的批准。

RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国), PrimeScript™ RT Master Mix 逆转录试剂盒及 SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNase H Plus)试剂盒(TaKaRa Biotechnology 公司,日本)。PCR 引物合成由南京 realgene 生物技术有限公司提供(表 1)。荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 7900 FAST 型荧光定量 PCR 仪。

表 1 内参基因引物序列
Table 1 Primer sequences of reference genes

基因名称	正义(5'→3')	反义(5'→3')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
ACTINB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
UBC	CTGGAAGATGGTCGTACCCTG	GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT
HRPT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTTCAGTCTGTCCATAA
18S rRNA	CAGCCACCCGAGATTGAGCA	TAGTAGCGACGGGCGGTGTG

1.2 方法

1.2.1 组织中 RNA 的提取

采用 TRIzol 试剂说明书要求提取组织中的 RNA,并取适量 RNA 样本进行质量检测,用 NanoDrop 2000 检测出 RNA 含量及纯度[纯度要求: $D(280\text{ nm})/D(260\text{ nm}) \geq 1.8$]。提取的 RNA 原液放入-70℃冰箱保存待用。

1.2.2 cDNA 的合成

按日本 TaKaRa Biotechnology 公司的 Prime-Script™ RT Master Mix 逆转录试剂盒说明书操作。合成后的 cDNA 可稀释 10 倍后用于 RT-PCR 实验或于-20℃冰箱保存备用。

1.2.3 实时定量 PCR

按日本 TaKaRa Biotechnology 公司的 SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNase H Plus)试剂盒说明书操作,在 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪上进行检测,实行 3 个复孔平行。反应体系为 10 μL ^[6],反应条件为:第一阶段 95℃ 10 min,第二阶段 95℃ 15 s、60℃ 1 min,40 个循环。最后添加熔解曲线:95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。熔解曲线可鉴定产物的特异性。

1.2.4 候选基因稳定性分析

近年来,用于分析选择内参基因的软件不断推出,如 geNorm^[7]、NormFinder^[8]及 BestKeeper^[9]等,其均可用来筛选在特定实验条件下表达最为稳定的

内照基因。其中,geNorm 与 NormFinder 是最为常用的两种软件。

本研究采用 geNorm 软件和 NormFinder 程序来实现。首先从 <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/> 网站下载 geNorm 软件,将 NormFinder 程序附加在 Excel 软件上;随后将不同候选管家基因和不同样本的名称,及对应的实时定量 PCR 分析中所获得的相应 Ct 值录入 Excel 中;再选取不同样本中各管家基因 Ct 值最小者作为标准,设定其表达量为 1,其余样本中该基因的表达量设定为 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (ΔCt = 各样品原始 Ct 值 - 最小的 Ct 值)。将转换后的 Ct 值导入 geNorm 软件,统计分析出候选管家基因的表达稳定度均值 M 及配对变异度 V。M 值越小,基因表达越稳定,推荐阈值为 1.5,若内参基因 M 值大于 1.5,说明其表达不稳定,应首先被排除; $V_n/n+1$ 用以确定作为标准化指标所需管家基因的最佳数目,推荐阈值为 0.15^[7]。在 Excel 软件上运行 NormFinder,统计计算管家基因的表达稳定值,并由低到高依次排序。稳定值越低,表明联合差异越小,基因表达相对越稳定。

2 结果

2.1 候选管家基因表达水平比较

5 个候选的管家基因表达范围较宽,循环数 Ct 值在 7.80~33.18 之间(图 1)。18S rRNA 在结直肠癌

患者组织中表达最高,HRPT1 表达最少,其余 3 种管家基因表达量相近,居于中部。

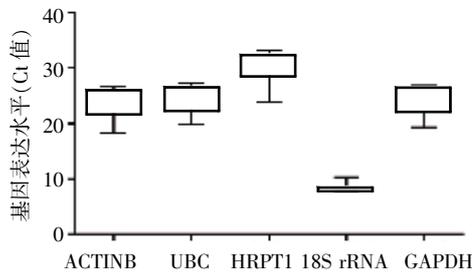


图 1 候选内参基因在结直肠癌患者组织中表达水平
Figure 1 The mRNA expression level of reference genes in colorectal cancer tissue

2.2 候选管家基因表达稳定性比较

应用 geNorm 软件分析研究的 5 个候选管家基因的相对表达量,计算出 M 值及 V 值。M 值代表了各候选基因表达的稳定性,M 值越小,说明该基因表达越稳定。本次研究的管家基因按稳定性由高至低排序依次为 GAPDH、ACTINB、UBC、HRPT1、18S rRNA,其 M 值分别为 0.300、0.300、0.307、0.483、1.209,均小于 1.5。其中,18S rRNA 在不同样本间的表达量变化最大,稳定性最低,HRPT1 次之。GAPDH 与 ACTINB 的 M 值相对最小,为最佳内参基因组合,可作为结直肠癌相关基因表达分析研究中的内参基因。

在对基因表达定量分析的精确度要求较高,或检测分析一些表达量变化微小的目的基因时,采用单个管家基因并不能达到实验的要求。目前,越来越多的研究者在定量 PCR 研究中,同时采用 2 个或 2 个以上稳定性高的管家基因对目的基因进行校正和标化,提高可信度^[10-12]。通过 geNorm 软件分析得到了各管家基因的配对变异度 V,其默认阈值为 0.15。当 $V_{n/n+1} < 0.15$ 时,表明应用定量荧光 PCR 分析结直肠癌相关基因表达时,无需引入数量 $\geq n+1$ 个管家基因作为内参,最佳内参基因数量为 n 。在本研究中, $V_{2/3}$ 为 0.091,故管家基因的最适数目为 2 个(图 2)。结合稳定性 M 值,本研究筛选出的管家基因最佳组合为 GAPDH 与 ACTINB。

应用 NormFinder 程序根据各候选管家基因的相对表达量计算出表达稳定值(stability value)并排序。本研究提供的 5 个候选内参基因 GAPDH、ACTINB、UBC、HRPT1 和 18S rRNA 稳定值分别为 0.104、0.156、0.105、0.612 和 1.579。其中,GAPDH 的稳定值最低,说明该管家基因表达相对其他基因更

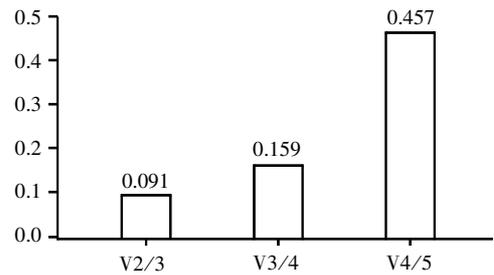


图 2 geNorm 软件分析确定最佳校正的内参基因数目
Figure 2 Determination of the best number of reference genes for normalization by geNorm

稳定。18S rRNA 稳定值最高,其稳定度也最差。这一结果与 geNorm 软件分析的结果相一致。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 扩增过程中,通过荧光信号的积累用以实时监测 PCR 的进程。这种技术需要依靠较为准确的标准化和校正的方法来去除非生物学变化引起的差异。目前大多研究采用的方法是使用内源性参照基因。然而越来越多的研究发现,常见内参基因的表达量在不同的样本类型,不同的实验条件等出现了不稳定的表达情况^[13-14]。所以,在使用内参基因对目的基因的表达量进行校正前,需要研究者根据所研究的对象筛选出最适的特异性稳定表达的内参基因,来提高实验结果的可信度。

针对结直肠癌相关的基因表达研究中,实时定量 PCR 已成为成熟可靠,应用广泛的技术,但大多研究者未根据实验特定的条件筛选管家基因,而是直接选用传统的管家基因作为内参,如 18S rRNA^[15]。内参选择不合理可能导致基因表达的检测结果出现偏差甚至得出错误的结论。目前,研究者尚未发现探索结直肠癌组织 RNA 内参基因稳定性的报道。本研究通过实时定量 PCR 技术检测 10 例结直肠癌患者组织中 5 种管家基因(GAPDH、ACTINB、UBC、HRPT1 和 18S rRNA)mRNA 转录水平,运用两种软件(geNorm 和 NormFinder)计算出最稳定的内参基因。geNorm 软件分析结果显示 GAPDH 和 ACTINB 是表达最稳定的管家基因,其次是 UBC,且同时使用这 2 个管家基因作为结直肠癌组织基因表达研究的内参基因是最佳选择。本研究使用 NormFinder 程序计算,发现 GAPDH 的表达稳定性最高,UBC 和 ACTINB 次之。

近年来,大多研究者选用传统的几种管家基因作为各种癌症相关基因表达研究中的内参,如

ACTINB(膀胱癌)^[16]、HRPT(肾癌)^[17]、18S rRNA(胰腺癌)^[18]等。而本研究综合上述两种软件分析的结果,认为 GAPDH 是较为合适的结直肠癌组织基因表达的内参基因,如果需要多基因校正,选择 GAPDH 和 ACTINB 一起作为内参基因的组合进行校正较为理想。

[参考文献]

- [1] Du M, Liu S, Gu D, et al. Clinical potential role of circulating microRNAs in early diagnosis of colorectal cancer patients[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(12):2723-2730
- [2] De Santis C, Smith-Keune C, Jerry DR. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*[J]. *Mar Biotechnol(NY)*, 2011, 13(2):170-180
- [3] Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, et al. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise[J]. *Physiol Genomics*, 2004, 18(2):226-231
- [4] Zeng C, He L, Peng W, et al. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2014, 68(1):113-121
- [5] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(2):104-117
- [6] Nischalke HD, Lutz P, Kramer B, et al. A common polymorphism in the NCAN gene is associated with hepatocellular carcinoma in alcoholic liver disease[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(5):1073-1079
- [7] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7):RESEARCH0034
- [8] Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15):5245-5250
- [9] Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of

stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6):509-515

- [10] Zhuang H, Fu Y, He W, et al. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6:475
- [11] Li Q, Fan CM, Zhang XM, et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds[J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(10):1789-1798
- [12] Die JV, Roman B, Nadal S, et al. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions [J]. *Planta*, 2010, 232(1):145-153
- [13] Ling H, Wu Q, Guo J, et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative rt-PCR[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e97469
- [14] Guo J, Ling H, Wu Q, et al. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses[J]. *Sci Rep*, 2014, 4:7042
- [15] Amankwatia EB, Chakravarty P, Carey FA, et al. MicroRNA-224 is associated with colorectal cancer progression and response to 5-fluorouracil-based chemotherapy by KRAS-dependent and -independent mechanisms[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(9):1480-1490
- [16] Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, et al. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(15):4725-4730
- [17] Yin B, Zeng Y, Wang X, et al. Expression and clinical significance of cancer-testis genes in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7):4112-4119
- [18] Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, et al. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7):2345-2356

[收稿日期] 2016-01-23