

技术与方法

一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR
相对定量方法的建立*

张驰宇** 徐顺高 黄新祥

(江苏大学医学技术学院, 镇江 212001)

摘要 为建立一种新颖、简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法, 根据实时定量标准曲线, 推导出相对定量基因表达的公式. 公式显示相对表达指数只与 C_T 值和标准曲线的斜率相关. 构建标准曲线的标准品需要通过克隆和体外转录获得, 实验过程繁琐. 当人为成比例增减标准品各个稀释度的具体拷贝数时, 标准曲线的斜率并不改变, 说明标准曲线斜率与标准品的具体拷贝数无关. 因此, 新的相对定量方法可以用任何一个待测样品的总 RNA (或 cDNA), 经系列稀释后作为标准品, 来构建相对定量标准曲线, 获得斜率. 与绝对定量法比较, 新方法获得了基本相同的斜率和非常一致的定量结果(差异小于 4%), 而传统的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法却表现出较大的定量误差. 这些结果表明, 新的相对定量方法是一种简便、准确和高效的定量基因表达的方法.

关键词 荧光实时定量 RT-PCR, 相对定量, 绝对定量, 标准曲线, mRNA 定量, 斜率

学科分类号 Q781

基因表达的定量已被广泛应用于生物医学研究的许多领域. 荧光实时定量 RT-PCR 技术能够实时检测记录 PCR 扩增产物的增加, 克服了终点法定量 PCR 产物的不足, 使准确定量 RNA 成为现实^[1,2]. 目前荧光实时 RT-PCR 定量基因表达常采用两类方法, 即绝对定量和相对定量. 绝对定量法准确, 但需要先克隆一段目标基因, 构建体外 RNA 合成载体, 在 RNA 聚合酶存在下, 合成大量 RNA, 用作标准品构建标准曲线^[1,3]. 相对定量通常以表达恒定的看家基因作为参照, 来获得目的基因相对于参照基因的表达指数. 实验组与正常对照组目的基因表达指数的比值就代表目的基因的相对表达量, 反映实验组基因表达的变化情况^[2,4].

绝对定量能够获得基因表达的准确量, 但针对不同的目的基因, 需要构建不同的标准品, 大大增加实验的难度和复杂性^[3]. 传统的相对定量方法是 $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 其操作简单, 但因为将 PCR 的扩增效率设定为 1, 而实际 PCR 的扩增效率难以达到 1, 且目的和参照基因的扩增效率不一定相同, 使定量结果很不准确^[4]. 这里, 我们介绍一种新的、准确、简便的荧光实时相对定量方法.

达时, 需要利用已知拷贝数的标准品来构建标准曲线. 根据目的基因和参照基因的标准曲线, 可以获得 C_T 与初始拷贝数对数值之间的一阶方程:

$$C_{T,T} = A_T \cdot X_T + B_T \quad (1)$$

$$C_{T,R} = A_R \cdot X_R + B_R \quad (2)$$

T 和 R 分别代表目的基因和参照基因, 则 $C_{T,T}$ 和 $C_{T,R}$ 分别代表目的基因和参照基因的 C_T 值; X 代表初始拷贝数的以 10 为底的对数; A 和 B 分别代表一阶方程的斜率和截距.

因此, 目的基因和参照基因 mRNA 的定量结果可以分别表示为:

$$Q_T = 10^{X_T} = 10^{(C_{T,T} - B_T)/A_T} \quad (3)$$

$$Q_R = 10^{X_R} = 10^{(C_{T,R} - B_R)/A_R} \quad (4)$$

Q_T 和 Q_R 分别代表目的基因和参照基因 mRNA 的绝对拷贝数.

定量目的基因表达时, 常用一些看家基因作为参照, 对目的基因的表达进行标准化, 使结果具有可比性和可靠性. 因此, 根据公式(3)和(4)可以得出:

$$Q_T/Q_R = 10^{(C_{T,T} - B_T)/A_T - (C_{T,R} - B_R)/A_R} \quad (5)$$

设定正常组织或正常对照组细胞中, 目的基因

1 材料和方法

1.1 相对定量公式的推导

用荧光实时定量 RT-PCR 绝对定量 mRNA 表

*江苏省高校自然科学指导性计划资助项目 (04KJD180044) 和江苏大学高级人才科研启动基金资助项目 (2281270002).

** 通讯联系人.

Tel: 0511-5038334, E-mail: zhangcy1999@hotmail.com

收稿日期: 2005-04-04, 接受日期: 2005-05-28

相对于参照基因的表达量为 1, 则实验组织或实验处理组细胞中, 目的基因的相对表达量(或表达指数, F)可以表示为:

$$F=10^{\frac{\Delta C_{T,T}-\Delta C_{T,R}}{\Delta C_{T,R}}} \quad (6)$$

如果定量基因表达时不设参照基因, 则目的基因的相对表达指数为:

$$F=10^{\frac{\Delta C_{T,T}}{\Delta C_{T,R}}} \quad (7)$$

在公式(6)和(7)中, $\Delta C_{T,T}$ 代表实验组减去对照组的基因 C_T 值的差, $\Delta C_{T,R}$ 代表实验组减去对照组参照基因 C_T 值的差。

当 PCR 扩增目的基因和参照基因的效率相同或相近时, 定量目的基因和参照基因的标准曲线斜率也相同和相近, 则有 $A_T=A_R=A$; $B_T=B_R$, 公式(6)变为:

$$F=10^{\frac{\Delta \Delta C_T}{\Delta \Delta C_R}} \quad (8)$$

在公式(8)中, $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,T} - \Delta C_{T,R}$ 。

1.2 新的相对定量方法的描述

从上面公式可以看出, 用荧光实时定量 RT-PCR 测定基因的相对表达量, 关键在于获得标准曲线的斜率。因此, 新相对定量法采用一种非常简单的策略, 来获取标准曲线的斜率。其关键步骤如下: a. 提取待测样品(实验和对照)总 RNA, 测定核酸浓度; b. 任意选取一个待测样品总 RNA(或 cDNA)(如果核酸浓度较低, 可将其浓缩), 按一定倍数(如 10 倍或 5 倍)进行系列稀释; c. 将 b 中稀释好的样品作为“标准品”, 与其他待测样品一起进行荧光实时定量 RT-PCR 反应。在仪器分析界面, 按照系列稀释的倍数, 成比例地将各个稀释度“标准品”设定为具体拷贝数(拷贝数必须 >0 , 如 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5); d. 反应结束后, 设定最佳阈值, 获取“标准品”及待测样品的 C_T 值, 并由荧光定量 PCR 仪给出标准曲线和斜率。或者将各个稀释度“标准品”的 C_T 值和人为设定的拷贝数输入 Excel 软件中, 对拷贝数以 10 为底取对数, 作为横坐标, C_T 值为纵坐标作图, 给出数据点的趋势线, 也可以获得相对定量的标准曲线和斜率; e. 从(6)~(8)选择合适的相对定量公式, 代入斜率和相应样品 C_T 值即可获得目的基因的相对表达指数。

1.3 伤寒杆菌鞭毛抗原 z66 和 d/j mRNA 表达的相对定量

1.3.1 z66 和 d/j mRNA 的 SYBR green I 实时定量 RT-PCR 反应。

伤寒杆菌鞭毛抗原 z66 和 d/j mRNA 表达的绝

对定量方法在先前的工作中已经详细描述^[5]。在本研究中, 我们用绝对定量、 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 和新的相对定量 3 种方法对伤寒杆菌在低 (50 mmol/L)、等 (150 mmol/L) 和高 (300 mmol/L) 渗透压(NaCl 浓度)下, 两个基因的表达变化进行测定。除了新方法和绝对定量法在构建标准曲线的策略上不同外, 3 种方法的实验过程基本相同。因此, 定量反应所用试剂、引物、SYBR green I RT-PCR 试剂盒等, 以及核酸提取、RT 反应和实时定量 PCR 反应条件等均与文献[5]相同(详见文献[5])。在 SYBR green I 实时定量 PCR 反应中, 所有待测样品均设 2 个重复, 在 Gene 2000 Real-Time Amplification 上进行^[6]。反应完毕, 手动设定最佳阈值, 并给出标准品和待测样品的 C_T 值。

1.3.2 z66 和 d/j mRNA 表达的相对定量。

设定等渗条件下 z66 和 d/j mRNA 的表达指数为 1。绝对定量时, 取每个样品 2 个具体拷贝数的平均值, 用高、低渗下基因表达的值除以等渗下的值, 获得高、低渗下的相对表达指数。在新相对定量法和 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 法中, 取每个样品 2 个 C_T 值的平均值, 分别代入公式 (7) 和 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 计算相对表达指数。新方法的标准曲线由 Excel 软件依据人为输入的拷贝数和 C_T 值绘制, 并给出斜率。因为绝对定量是比较准确的定量方法, 其结果能够代表基因的真实表达指数。因此, 我们将新方法和 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 法的结果分别与绝对定量结果进行比较, 计算它们之间的差异(%), 以衡量新方法的准确性。

2 结 果

2.1 标准曲线的构建

任何一个含有目的基因和参照基因 mRNA (cDNA) 的样品, 均可用作“标准品”来构建相对定量的“标准曲线”。

构建绝对定量标准曲线的标准品经过系列稀释后, 各个稀释度的实际拷贝数是固定的, 在实时定量反应中, 它们的 C_T 值也是固定的。进行绝对定量时, 荧光定量 PCR 仪要求输入各个稀释度标准品的具体拷贝数, 来绘制标准曲线。如图 1a 中, 5 个 5 倍系列稀释的标准品的实际拷贝数分别为: 100、500、2 500、12 500、62 500, 软件根据标准品的具体拷贝数和 C_T 值绘制出标准曲线, 并给出斜率、截距及相关系数等参数。从图 1a 中可以看到, 标准曲线的斜率为 -4.52。如果我们在输入标准品的具体

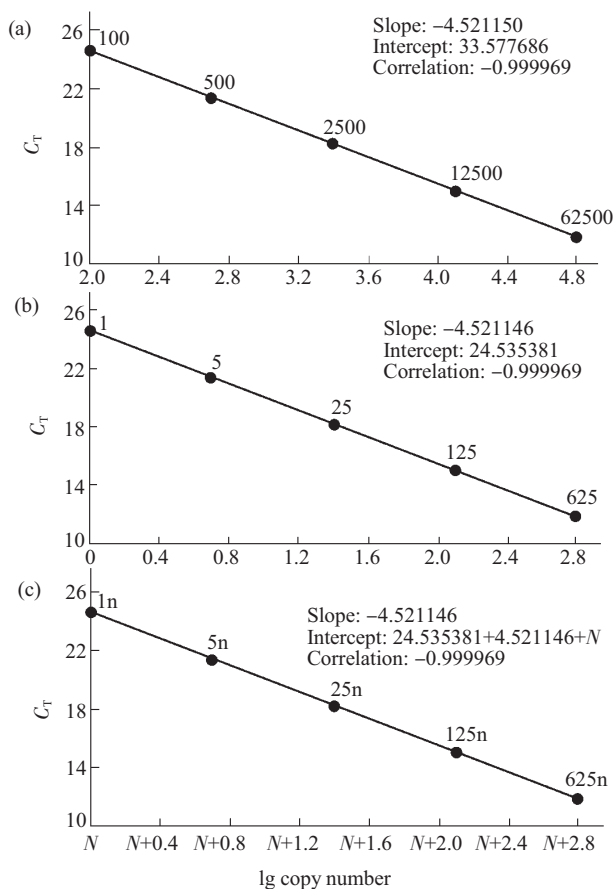


Fig.1 The influence of proportionally contrived change of input copy numbers of serial diluted RNA standard on the slope of standard curve

(a) An example of a standard curve of RNA standards from 100 to 62 500 copies. (b) The standard curve when input copy numbers of all RNA standards were divided factitiously by 100. (c) The deduced standard curve when input copy numbers of all RNA standards were divided factitiously by $100/n$. $n > 0$, $N = \lg n$.

拷贝数时,人为地将各个稀释度的实际拷贝数都成比例缩小 100 倍,使其成为 1、5、25、125、625 后,仪器绘制出另外一条标准曲线(图 1b).比较 a、b 两条标准曲线,发现除截距不同外,它们的斜率和相关系数基本完全相同.由此可以推论:当人为将各个稀释度标准品的实际拷贝数分别成比例变为 n 、 $5n$ 、 $25n$ 、 $125n$ 、 $625n$ 时 ($n > 0$),系统绘制出的标准曲线就如图 1c.它的斜率和相关系数与原标准曲线相同,只是截距变为: $24.535381 + 4.521146N$ ($N = \lg n$) (图 1c).因此,输入标准品的具体拷贝数时,人为成比例改变拷贝数,不会影响标准曲线的斜率.

从相对定量公式(6)~(8)可以看出,定量结果与标准曲线的斜率有关,而与截距无关.因此,对于任何一个实验 RNA (cDNA) 样品,我们都可以设定它所包含的目的(参照)基因的实际拷贝数为 625 n 或 mn (m 和 n 均大于 0,其中 m 可依据系列稀释倍数设定).将此样品进行系列 5 倍(或 m 倍)稀释,各个稀释度样品由高到低,可以分别作为实际拷贝数是 625、125、25、5、1……的“标准品”,来构建标准曲线.通过该方法可以简便地获得相对定量所需的标准曲线斜率,其与真正的标准曲线斜率相同.

2.2 新相对定量法、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法与绝对定量法的比较

我们用新相对定量法、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法和绝对定量法,对 z66 和 d/j 基因在低渗和高渗下的相对表达指数进行了测定.新方法和绝对定量法构建标准曲线的标准品均为 10 倍系列稀释.图 2 显示了定量 z66 和

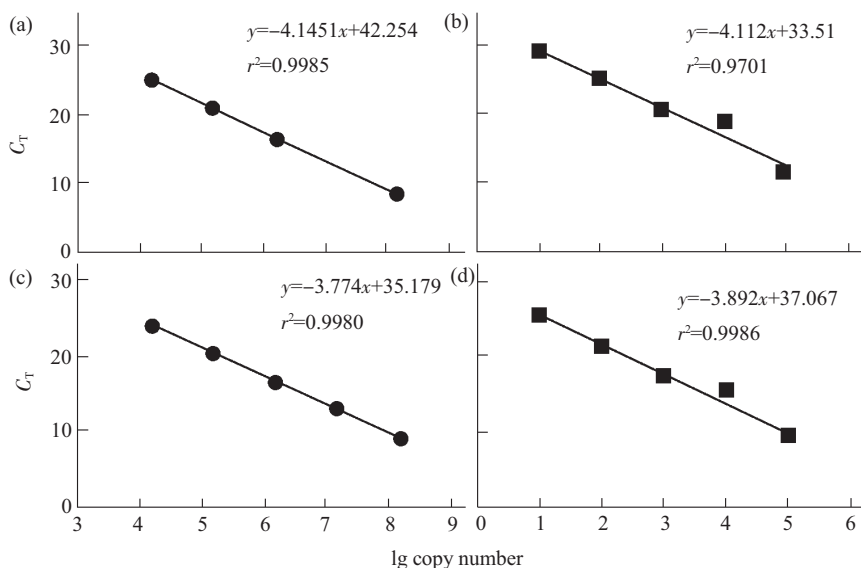


Fig.2 Standard curves for absolute and relative quantitative methods

(a) For absolute quantification of z66 mRNA. (b) For relative quantification of z66 mRNA. (c) For absolute quantification of d/j mRNA. (d) For relative quantification of d/j mRNA.

d/j mRNA 所建的两标准曲线. 从图 2 可以看出, 绝对和相对定量标准曲线的截距明显不同, 而斜率基本一致, 差异很小(z66: 0.8%; d/j: 3.13%). 表 1 显示了 3 种方法定量 z66 和 d/j mRNA 相对表达指数的结果. 从表 1 中可见, 新方法获得的表达指数与绝对定量法获得的基本相同, 它们之间的差异

均小于 4%, 并且大部分小于 1.5%, 说明新的相对定量法可以获得与绝对定量法一样可靠的结果. 然而比较 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 和绝对定量法发现, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的定量结果均明显高于绝对定量法, 差异大多超过 10%, 其中最大差异达 36.3%, 说明 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法不够准确, 并且通常会高估相对定量结果.

Table.1 The comparison between absolute and relative quantitative methods in quantifying the relative expression indices of z66 and d/j genes

	Primers ¹⁾	Con. of NaCl	Relative expression index of mRNA ²⁾			Difference/ % between ³⁾	
			Method 1	Method 2	Method 3	1 and 2	1 and 3
z66 gene	Random primer	Isotonic	1	1	1		
		Lower	2.12	2.14	2.56	0.51	20.39
		Higher	3.45	3.50	4.71	1.21	36.30
	Specific primer	Isotonic	1	1	1		
		Lower	1.61	1.62	1.82	1.05	13.39
		Higher	2.33	2.36	2.90	1.39	24.39
d/j gene	Random primer	Isotonic	1	1	1		
		Lower	1.49	1.47	1.57	1.21	5.59
		Higher	3.43	3.31	4.07	3.53	18.49
	Specific primer	Isotonic	1	1	1		
		Lower	1.44	1.43	1.52	1.11	5.10
		Higher	3.58	3.46	4.29	3.34	19.63

¹⁾The primers were used in the reverse transcriptase reactions. ²⁾The methods 1, 2 and 3 represent absolute quantitative method, relative quantitative method and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, respectively. ³⁾The data represent the percentage difference of method 2 and 3 with method 1, respectively.

3 讨 论

相对定量和绝对定量常被用于定量基因表达^[1,2]. 传统相对定量法是用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 来计算实验组相对于对照组目的基因表达的变化倍数^[2,4]. 这种方法的不足在于定量结果不准确, 因为它将 PCR 的扩增效率设定为 1, 而 1 只不过是 PCR 扩增效率的理论值^[2]. 在实际的 PCR 扩增中, 随着循环数的增加, PCR 产物增加, 引物和底物的浓度降低, 扩增效率会下降. 另外, 随着热变性次数的增加, DNA 聚合酶的活性降低, 也会导致扩增效率的下降. 这些因素决定实际的 PCR 扩增效率不可能达到 1, 并且通常会低于 0.6^[2]. 因此, 这种方法计算出的相对定量结果通常比实际结果要高, 误差较大(表 1). 值得注意的是, 相对定量时, $-\Delta\Delta C_T$ 值越大, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 定量的偏差越大. 另一方面, 在相对定量时, 目的

基因和参照基因的扩增效率不可能完全相同, 也会对结果造成影响^[2]. 因此, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 是一种非常不准确的相对定量方法.

绝对定量法是比较准确可靠的基因表达定量方法. 但这种方法需要克隆目的基因和参照基因的扩增片段, 构建体外转录系统, 通过体外转录获得已知拷贝数的标准品, 用于构建标准曲线^[1,3]. 这些过程增加了实验的难度和复杂度. 另外, 如果要定量多种目的基因, 则需要针对不同的目的基因制备不同的定量标准品. 这些注定了用绝对定量法定量基因表达是一种非常费时费力的工作, 将大大降低定量的效率^[1].

为了避免 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 和绝对定量方法的不足, 我们结合两者的特点, 建立了一种新的比较简便的相对定量方法, 能够获得与绝对定量法一致的结果. 该

方法利用公式(6)~(8)来计算基因的相对表达指数.从公式中可以看出,相对定量法的结果只与实验样品的 C_T 值和标准曲线的斜率有关.因此除了 C_T 值,获得斜率就可以计算基因的表达指数.实时定量反应中,获得的各个稀释度标准品的 C_T 值是恒定的,在输入标准品的实际拷贝数时,如果人为成比例地增加(或减少)各个稀释度标准品的实际拷贝数,不改变“标准曲线”的斜率(图1).这说明无论标准品的具体拷贝数是否已知,均可以获得标准曲线的斜率.对于任何一个实验样品,我们都可以设定它所包含的目的(或参照)基因的实际拷贝数为 $625n$ (625 是依据系列稀释倍数人为设定的一个正数, $n > 0$),将其系列稀释后用作“相对标准品”.构建标准曲线时,可以将上述“相对标准品”的实际拷贝数减少 n 倍,成为具体的数字输入软件,获得一个“标准曲线”,它的斜率与真实标准曲线的斜率完全相同(图1).或者在完成实时定量 RT-PCR 反应后,将减少 n 倍的拷贝数和对应的 C_T 值输入 Excel 软件中,通过作图获得斜率.

正如图2所示,在测定 $z66$ 和 d/j 基因的相对表达时,新相对定量法和绝对定量法获得的标准曲线斜率基本相同.比较这两个基因在低渗和高渗下的相对表达指数,发现两种方法获得的结果非常一致(表1),说明新方法是准确可靠的.因此,在实时定量中,只要将待测样品中的任何一个作为“相对标准品”,系列稀释后用于构建标准曲线,即可获得斜率,求得相对表达量.该方法不仅避免了 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法的不准确性,又大大简化了绝对定量的实验过

程,是一种值得推荐的、准确简便的荧光实时相对定量方法.

致谢 感谢汕头大学医学院变态反应与炎症学研究所魏继福博士对本文的关键性建议.

参 考 文 献

- 1 Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000, **25** (2): 169~193
- 2 Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001, **25** (4): 386~401
- 3 张 燕, 沈 茜. 一种快速构建 cRNA 标准曲线检测基因表达方法的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 474~477
Zhang Y, Shen Q. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (3): 474~477
- 4 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 2001, **25** (4): 402~408
- 5 徐顺高, 黄新祥, 周丽萍. 荧光实时定量 RT-PCR 观察伤寒杆菌鞭毛 $z66$ 和 d/j 抗原基因表达方法的建立. *江苏大学学报(医学版)*, 2005, **15** (1): 21~24
Xu S G, Huang X X, Zhou L P. *J Jiangsu Univ (Med Sci)*, 2005, **15** (1): 21~24
- 6 张驰宇, 张高红, 杨 敏, 等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20** (3): 387~392
Zhang C Y, Zhang G H, Yang M, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20** (3): 387~392
- 7 Liu W, Saint D A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem*, 2002, **302** (1): 52~59

A Novel and Convenient Relative Quantitative Method of Fluorescence Real Time RT-PCR Assay Based on Slope of Standard Curve*

ZHANG Chi-Yu**, XU Shun-Gao, HUANG Xin-Xiang

(Jiangsu University School of Medical Technology, Zhenjiang 212001, China)

Abstract In order to develop a novel, simple and effective relative quantitative method using fluorescence real-time RT-PCR, the formulas were derived from the standard curve for quantifying relative expression of mRNA. The formulas show that the relative expression index is only associated with C_T value and the slope of standard curve. RNA (DNA) standard for absolute quantitative standard curve is obtained generally by cloning and transcription *in vitro*. When input copy numbers of serial diluted RNA standards were increased or decreased n -fold ($n > 0$) proportionally, the slope of standard curve remains invariable, suggesting that the slope is independent of actual copy numbers of RNA standard. Therefore, anyone of tested RNA (cDNA) samples could be used after serial dilution as RNA standards to obtain slope. Compared with absolute quantitative method, the

present one appears to have a more excellent consistency (difference less than 4%) in the relative expression indices with absolute quantitative method, than traditional relative method $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (difference more than 5%). The results show that the method described here is simple, precise and cost-effective for relative quantifying gene expression.

Key words fluorescence real-time quantitative RT-PCR, relative quantification, absolute quantification, standard curve, mRNA quantification, slope

*This work was supported by grants from Guiding Programs of Education Administration of Jiangsu Province for Natural Science Research in Colleges and Universities (04KJD180044), and the Science Foundation of Jiangsu University for Advanced Scholars (2281270002).

**Corresponding author . Tel: 86-511-5038334, E-mail: zhangcy1999@hotmail.com

Received: April 4, 2005 Accepted: May 28, 2005