doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.03.003

NanoString nCounter 分析系统进行多基因表达计数的评价 *

欧阳胜荣[1] 刘 卓[1,2] 唐认桥[1,2] 李媛媛[1] 赵 欣[3] 吴建新[1△]

（1 首都儿科研究所 北京 100020；2 北京协和医学院研究生院 北京 100020；3 北京大学首都儿科研究所教学医院 北京 100020）

摘要 目的：NanoString nCounter 是近年发展起来的进行基因表达谱检测的新平台，它利用分子条形码直接对基因表达进行多重计数。本实验通过对 mRNA 表达量的检测，分析 nCounter 系统进行基因表达计数的可靠性。**方法：**应用 NanoString 公司提供的 CAE Kit 试剂盒，通过杂交（mRNA 样品与报告探针和捕获探针杂交）、纯化（清洗未结合探针）和计数（读取 mRNA 的条数）三个步骤，检测由人参考 RNA 和人脑 RNA 构成的 4 个样品中 48 个目的基因的 mRNA 表达量；对获得的未进行标准化的原始数据，应用 Excel 2007 软件进行线性分析，从再现性、稳定性、准确性方面对 nCounter 分析系统进行评估。**结果：**再现性分析所有 R2 均大于 0.998，线性拟合良好；试剂盒中阳性控制所有 R^2 均大于 0.99，高于质控要求的 0.95；样品 H70B30 和 H30B70 的预期表达量与实测值线性 R2 大于 0.999，预期值与实测值一致性良好。**结论：**nCounter 分析系统稳定性好，准确性高，检测 mRNA 表达可靠。

关键词：NanoString nCounter；多基因表达计数；评价

中图分类号：R-331 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2015)03-413-04

Evaluation of multi-gene Expression Counting by NanoString nCounter*

OUYANG Sheng-rong[1], LIU Zhuo[1,2], TANG Ren-qiao[1,2], LI Yuan-yuan[1], ZHAO Xin[3], WU Jian-xin[1△]

(1 Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China; 2 Graduate School, Chinese Academy of Medical Science, Beijing, 100020, China; 3 Clinical College, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT Objective: The NanoString nCounter is a new platform for multi-gene expression counting using color- coded molecular barcodes. The aim of this study was to evaluate the reliability of the nCounter Analysis System by detecting the mRNA expression. **Methods:** The expression levels of 48 genes in 4 mRNA samples (composed of human references RNA and human brain RNA) were detected using the CAE Kit provided by NanoString company. The procedure includes three steps of hybridization of mRNA(reporter probes with capture probes), purification (washing off the uncombined probes) and mRNA counting. The unnormalized results were evaluated by linear analysis using Excel 2007. Reproducibility, stability and accuracy of the nCounter Analysis System were evaluated. **Results:** All of the R-squared value was larger than 0.998 by reproducibility analysis and the linear fitting was perfect. R-squared value of the positive control was above 0.99, better than the specified data by quality control (0.95). R-squared value of the expected values and actually measured values in H70B30 and H30B70 was larger than 0.999 by linear analysis, which indicated a consistence of expected levels and actually measured values. **Conclusions:** nCounter Analysis System is stable, accurate and reliable on the detection of mRNA expression.

Key words: NanoString nCounter; Multi-gene expression counting; Evaluation

Chinese Library Classification(CLC): R-331 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)03-413-04

前言

随着分子生物学技术的发展，基因表达检测技术经历了从单基因表达变化检测，如 Northern 杂交、实时定量 PCR（qPCR），到高通量的基因芯片技术的广泛应用。基因芯片检测通量高，但它是根据对照组样本得到的相对量，不同实验或不同实验室之间数据存在较大的差异[1]。NanoString nCounter 分析系统属于第三代基因表达检测技术，其检测原理与基因芯片完全不同。该技术运用了一种全新的分子条形码技术，对基因表达进行直接的多重测定，以数字方式准确显示样品中的基因表达真实数量，具有极高的灵敏度和精确度[1]。nCounter 使用两种探针（捕获探针和报告探针）与目标基因产物特异结合，形成探针 / 目标分子荧光复合物，一个复合物即代表一条 mRNA 分子，不同的基因序列以不同的荧光分子排列组合，nCounter 可以一次性直接测定一个样本中多达 800 种基因的表达量[2]。在设计探针时，首先按照引物设计的一般原则为每一个目标基因选择一段 100 bp 左右长度的互补序列，再将其分成两段各 50 bp 的序列，分别作为捕获探针和报告探针的特异性结合序列，

* 基金项目：国家重点基础发展规划项目（973 项目）（2013CB530605）

作者简介：欧阳胜荣（1978-），男，助理研究员，主要研究方向：遗传代谢性疾病

△通讯作者：吴建新，电话：010-85610322，E-mail: cipbiolab@163.com

（收稿日期：2014-08-14 接受日期：2014-09-12）

两个序列都要满足与非特异扩增序列的同源性小于 85 %,或少于 15 个连续互补碱基。该数字基因表达谱技术诞生于 Leroy Hood 博士创立的系统生物学研究所。2008 年,Nature Biotechnology 杂志上以封面故事的形式报道了他们的研究成果 [2]。由于 nCounter 技术在表达谱定量分析领域具备了与 qPCR 相似的灵敏度和精确度[3],又兼备基因表达谱芯片的高通量的优势,该技术已经被越来越多的研究者所采用。然而,目前国内还没有应用该技术进行研究的实验报道。本实验拟应用 NanoString 公司提供的试剂盒,通过对样本 mRNA 表达的检测,从再现性、稳定性、准确性方面分析 nCounter 系统进行基因表达计数的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 NanoString nCounter 多基因表达分析系统。

1.1.2 试剂 评价试剂盒为 NanoString 公司提供的用于用户培训的 CAE Kit 试剂盒,包括 48 个人类基因,8 个阴性控制,6 个阳性控制。试剂主要成分包括杂交缓冲液、特异性报告探针、捕获探针、人参考 RNA(UHR)和人脑 RNA(Brn)等。本试剂盒可检测 12 份样品。

1.1.3 测定样品 测定样品为试剂盒中自带的 UHR 和 Brn (浓度均为 100 ng/μL) 。分别取 100 ng UHR (H100),70 ng UHR+30 ng Brn (H70B30),30ng UHR +70 ng Brn(H30B70),100 ng Brn(B100),配置成 4 个 mRNA 样品(其中 H70B30 和 H30B70 分别由 2 种不同比例的 mRNA 混合而成),分别加入四个小管,每份样品进行三次平行加样,共得到 12 个样品管。

1.2 方法

1.2.1 操作方法 严格按照试剂盒说明进行各项操作,过程包括:杂交(mRNA 样品与报告探针和捕获探针杂交),纯化(清洗未结合探针),计数(读取 mRNA 的条数)。数字化成像分析仪进行 mRNA 分子计数的方式,计数方式以 Fov(Fields of View,视野)来表示,分为低(25 Fov),中(100 Fov),高(280 Fov),最大(550 Fov)4 种解析度,读取的 Fov 越多,计数结果会越准确,但计数时间也会相应增加。本次实验采用 280Fov 进行分子计数。

1.2.2 再现性分析 由三人对同一样品进行三次平行加样,对所得结果进行线性分析。

1.2.3 阳性控制的线性分析 将实验中得到的阳性控制表达量按照 128 到 0.125 的 4 倍倍比稀释进行线性分析。试剂盒中阳性控制已经进行 4 倍稀释,分为 5 个稀释度(128,32, 8,2, 0.5,0.125)。

1.2.4 准确性评价 对样品 H100 和 B100 的表达量分别取均值,分别记为 aH100 和 aB100,那么,70 % aH100 + 30 % aB100 的值则为 H70B30 的预期表达量,30 % aH100 + 70 % aB100 的值则为 H30B70 的预期表达量。对计算得到的预期表达量与真实检测得的 H70B30 和 H30B70 的表达量进行线性分析。

1.2.5 数据分析 采用 nSolver 分析软件 (NanoString 公司提供)对数据进行质量控制和标准化处理;应用 Excel2007 进行线性分析;所有用于线性分析的结果均是未进行标准化之前的原始数据。

2 结果

2.1 质量控制

首先对实验得到的数据进行质控。本次实验结果满足仪器要求的四个质控标准:1)读到的 FOV ≥ 75 %;2)结合密度介于 0.05 与 2.25 之间;3) 阳性控制倍比稀释线性 R2 ≥ 0.95;4)阴性控制均值与 2 倍标准差的和小于浓度为 0.5 的阳性控制值。

2.2 再现性分析

对同一样品进行三次平行加样的结果进行线性分析显示,所有 R^2 均大于 0.998,线性拟合良好(表 1)。

表 1 再现性分析

Table 1 Reproducibility analysis

Sample	H100			H70B30			H30B70			B100		
Order of sample	1 vs.2	2 vs.3	1 vs.3	1 vs.2	2 vs.3	1 vs.3	1 vs.2	2 vs.3	1 vs.3	1 vs.2	2 vs.3	1 vs.3
R^2	0.9999	1.0000	0.9999	0.9998	0.9992	0.9986	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999

2.3 阳性控制的线性分析

实验中得到的阳性控制表达量按照 128 到 0.125 的 5 个稀释度进行线性分析,所有 R2 均大于 0.99,高于质控规定的 0.95(表 2)。

表 2 阳性控制线性分析

Table 2 Linear analysis of positive control

Sample	H100			H70B30			H30B70			B100		
Order of sample	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
R^2	0.994	0.995	0.993	0.994	0.995	0.995	0.995	0.996	0.992	0.993	0.994	0.996

2.4 准确性评价

样品 H70B30 和 H30B70 的预期表达量与实验真实测得的表达量进行线性分析,线性拟合 $R^2 > 0.999$(图 1-2)。

3 讨论

nCounter 分析系统利用分子条形码及双探针标志,对转录

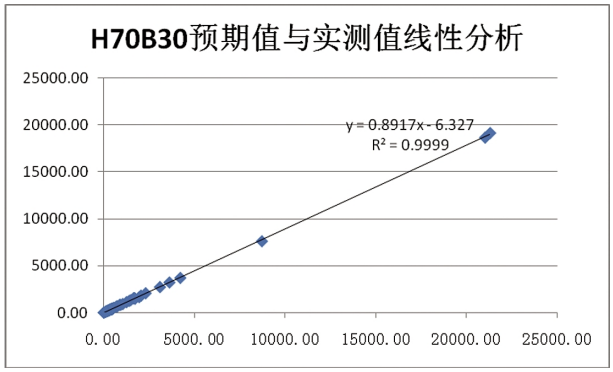

图 1 H70B30 预期值与实测值散点图

Fig. 1 Scatter plots of the expected and actually measured expression value of H70B30

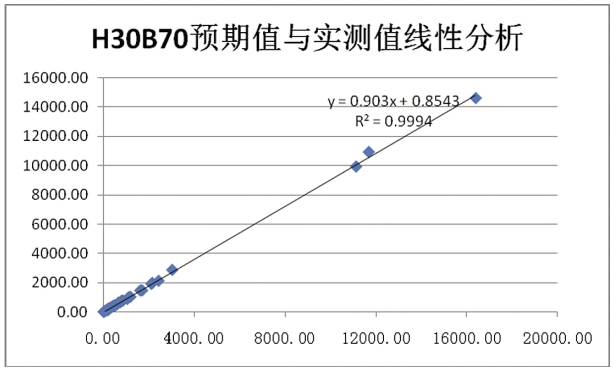

图 2 H30B70 预期值与实测值散点图

Fig. 2 Scatter plots of the expected and actually measured expression value of H30B70

本进行特异性标定;通过影像化的数字计数准确量化样本的表达量,实现高通量、自动化地直接测定多种基因的表达[1]。该分析系统由全自动样品处理工作站和数字化成像分析仪两部分组成,主要实验过程包括杂交、纯化和计数 3 个步骤。

该仪器用于检测 mRNA 表达时,样品适宜加样量为 100 ng。本实验中每个样品加样量为 100 ng。实际上每个人加样会有一定的误差,或者每个样品的浓度本来就存在误差。因此,对同一个样品进行平行加样,加入的量可能会不一致。但是,该仪器只要平行加样所得结果的线性拟合度高,nSolver 软件将会在原始数据的基础上,根据加入的 mRNA 的量将结果进行校正(标准化)。因此,即使加样量有误差,也将不会影响到最后结果分析的准确性。本实验为三人平行加样,加样量可能会存在误差,但本实验检测结果的线性拟合度好(R^2 值见表 1),表明该仪器用于 mRAN 检测稳定性好,有较好的重复性。

nSolver 软件采用两种方式进行数据校正,包括采用阳性控制校正加样量的误差,以及选取 3 个以上管家基因表达的均值当做内参来校正样品表达量水平。试剂盒中阳性控制已经按照 128 到 0.125 进行了 4 倍倍比的稀释。如果实测样品中阳性控制的结果能呈现从 128 到 0.125 的 4 倍倍比递减的关系,则加样量产生的误差不会影响到最终的结果。我们所检测的 12 个样品与设置的倍比关系的线性 R^2 均大于 0.99(质控规定 $R^2 \geq 0.95$),说明仪器有良好的稳定性和准确性。

此外,我们通过计算 H70B30 和 H30B70 的预期表达量与它们的实测表达量来做线性相关分析,来进一步评价仪器的准确性。结果表明,它们的线性 R^2 值均达到 0.999 以上,由此可以认为,H70B30 的实测值与 70 % H100 和 30 % B100 的 mRNA 的总量相符合,H30B70 实测值与 30 % H100 和 70 % B100 的 mRNA 的总量相符合。预期值与实测值良好的一致性说明了仪器的准确性高,用于 mRNA 表达的检测可靠。

我们的评价结果与国外一些研究报道相一致。他们通过线性分析及通过仪器之间的相互验证研究,认为 nCounter 具有与 qPCR 相似的灵敏度和精确度[2],可以用于表达谱芯片[4]和二代测序[3,5]的结果验证。根据 2008 年 Nature Technology 上的文章,其将此平台与芯片、TaqMan PCR 和 SYBR Green 定量 PCR 进行了比较,发现 nCounter 系统比芯片更为灵敏,与 qPCR 的灵敏度相似[2]。后来,Malkov 等检测了新鲜冻存(FF)、石蜡包埋(FFPE)以及组织粗提液样品中 48 种基因的表达,并与 Taqman PCR 检测结果相比较,证实 nCounter 在多基因检测中确实能获得准确、高质量的数据[6]。Stricker 等检测了 107 例小儿神经母细胞瘤 FFPE 组织,用 nCounter 验证了来自 De Preter[7] 实验室的表达谱芯片的结果。该研究指出,由于 nCounter 可以检测来自 FFPE 组织的低丰度的 RNA,甚至高度降解的 RNA 都能得到可靠的结果,而且该仪器分析时间短,操作简便,其在小儿神经母细胞瘤的诊断与风险预测中将会得到很好的应用[8]。同样,Northcott 等也在小儿髓母细胞瘤 FFPE 标本中获得了快速、可靠、再现性好的检测结果[9]。Reis 等用 19 对口腔上皮癌组织和正常组织为实验材料,分别用 nCounter 、qPCR 技术检测了 FF 和 FFPE 样品中 20 种 mRNA 的表达,进一步证实在 FFPE 样品 mRNA 质量不佳的情况下,nCounter 甚至表现出比 qPCR 更好的准确性[10]。虽然我们没有进行仪器之间的验证比较,例如用 qPCR 来验证该仪器的结果,但依据检测结果进行的线性分析,也很好的反应了仪器的性能。

目前,nCounter 技术在生物医学方面已经有了广泛的应用,如信号通路研究、表观遗传调控研究、临床检测、药物研发和评价以及干细胞质量评估等 [1]。多项研究成果均应用到 nCounter 技术发表的已经很多,如韩国 Lee 等应用 nCounter 系统鉴定中国仓鼠卵巢细胞中 52 个糖基化相关的基因[11];Khan 等应用 nCounter 平台检测老鼠 577 个嗅觉受体基因的 mRNA 水平,探索嗅觉受体基因选择的调控方式[12];Guiducci 等通过 nCounter 技术分析临床样本相关免疫因子的表达,证实自身核苷酸对 Toll 样受体的识别影响了糖皮质激素治疗系统性红斑狼疮的效果 [13];McNab 等应用 nCounter 技术平台检测结核患者血液样本中不同细胞程序性死亡配体基因的表达,发现了与正常人相比中性粒细胞过表达程序性死亡配体基因[14]。由于该技术的明显优势,NanoString 公司开发了基于 nCounter 技术的乳腺癌预后基因诊断试剂盒,通过检测乳腺癌患者肿瘤细胞基因表达谱,可以判断患者肿瘤复发风险,评估病人是否有必要开展化疗和放疗,同时它还能判断乳腺癌病理类型[15-18]。该产品被评为 2013 年度生命科学领域最具创新力产品前 10 名。目前,科研人员已经建立了人和小鼠的基于目标基因、互补序列、分子条形码的数据库,根据不同研究的需要,NanoString 公司能够提供相关基因的检测试剂盒。nCounter 分析系统除了能够

检测 mRNA 外,还能检测 miRNA 及 DNA 拷贝数变异。

然而,nCounter 分析系统不同于转录组测序技术,它不能对未知的 mRNA 进行检测。那些目前应用较广泛的转录组测序技术,如罗氏公司的 454 技术、Illumina 公司的 Solexa 技术以及 ABI 公司的 SOLiD 技术,则能同时检测新的 mRNA[1, 19]。但是 nCounter 技术无需使用酶,也不需要进行 PCR 扩增,从而减少误差的产生。它弥合了 qPCR 和芯片之间的鸿沟,继承了高通量与精确性的优点[20]。由于它在表达谱定量分析领域具有的明显优势,可以预见,该技术将会在生物和医学领域得到越来越广泛的应用。

参 考 文 献(References)

[1] 陈阳, 何琪杨. 多基因表达计数技术及其生物医学应用 [J]. 中国生物医药计数, 2012, 7(6): 441-444
Chen Yang, He Qi-yang. Multi-gene expression counting technology and its application[J]. Chin Med Biotechnol, 2012, 7(6): 441-444

[2] Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs [J]. Nature biotechnology, 2008, 26(3): 317-325

[3] Sun Z, Asmann YW, Kalari KR, et al. Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing[J]. PloS one, 2011, 6(2): e17490

[4] Chan C, Virtanen C, Winegarden NA, et al. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction [J]. Fertility and sterility, 2013, 100(3): 810-817

[5] Smallridge RC, Chindris AM, Asmann YW, et al. RNA sequencing identifies multiple fusion transcripts, differentially expressed genes, and reduced expression of immune function genes in BRAF (V600E) mutant vs BRAF wild-type papillary thyroid carcinoma [J]. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2014, 99(2): E338-347

[6] Malkov VA, Serikawa KA, Balantac N, et al. Multiplexed measurements of gene signatures in different analytes using the Nanostring nCounter Assay System[J]. BMC research notes, 2009, 2: 80

[7] De Preter K, Vermeulen J, Brors B, et al. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature [J]. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010, 16(5): 1532-1541

[8] Stricker TP, Morales La Madrid A, Chlenski A, et al. Validation of a prognostic multi-gene signature in high-risk neuroblastoma using the high throughput digital NanoString nCounter system [J]. Molecular oncology, 2014, 8(3): 669-678

[9] Northcott PA, Shih DJ, Remke M, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples[J]. Acta neuropathologica, 2012, 123(4): 615-626

[10] Reis PP, Waldron L, Goswami RS, et al. mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes[J]. BMC biotechnology, 2011, 11: 46

[11] Lee SM, Kim YG, Lee EG, et al. Digital mRNA profiling of N-glycosylation gene expression in recombinant Chinese hamster ovary cells treated with sodium butyrate[J]. Journal of biotechnology, 2014, 171: 56-60

[12] Khan M, Vaes E, Mombaerts P. Regulation of the probability of mouse odorant receptor gene choice[J]. Cell, 2011, 147(4): 907-921

[13] Guiducci C, Gong M, Xu Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus [J]. Nature, 2010, 465 (7300): 937-941

[14] McNab FW, Berry MP, Graham CM, et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis[J]. European journal of immunology, 2011, 41(7): 1941-1947

[15] Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2013, 31(22): 2783-2790

[16] Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, et al. The PAM50 Risk-of-Recurrence Score Predicts Risk for Late Distant Recurrence after Endocrine Therapy in Postmenopausal Women with Endocrine-Responsive Early Breast Cancer[J]. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2014, 20 (5): 1298-1305

[17] Nielsen T, Wallden B, Schaper C, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens[J]. BMC cancer, 2014, 14(1):177

[18] Gnant M, Filipits M, Greil R, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone [J]. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2014, 25(2): 339-345

[19] Chen G, Wang C, Shi T. Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses[J]. Science China Life sciences, 2011, 54(12): 1121-1128

[20] Kulkarni MM. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system [M]. Current protocols in molecular biology, 2011, 25B.10.1-7