

RNA 完整值 (RIN) — RNA 质量控制标准化

应用

Odilo Mueller
Samar Lightfoot
Andreas Schroeder

摘要

评估 RNA 完整性是获得有意义基因表达数据的第一个关键步骤。采用完整 RNA 是成功微阵列或 qRT-PCR 分析的关键要素。Agilent 2100 生物分析仪系统和 RNA 试剂盒在协助研究者确定 RNA 质量方面发挥重要作用。Agilent 2100 生物分析仪系统上生成的谱图包括浓度信息，允许直观检查 RNA 完整性，并生成核糖体比率。本应用简报描述的新软件算法开发用于从生物分析仪电泳图提取 RNA 样品完整性的信息。

前言

确定 RNA 起始材料的完整性是基因表达分析中的一个关键步骤。

Agilent 2100 生物分析仪系统及相关的 RNA 6000 Nano 试剂盒和 Pico 试剂盒已成为 RNA 质量评估和定量的标准^{1,2}。在精密加工的芯片上利用电泳分离，分离 RNA 样品，并随后通过激光诱导荧光检测法检测。生物分析仪软件生成电泳图和凝胶样图像，并展示多种结果，如样品浓度和核糖体比率。电泳图提供了 RNA 样品质量的详细直观评估结果。然而，依赖人工目视解释数据的方法具有内在缺陷。此前，研究者们已经将核糖体比率在平板凝胶分析中并作为特征在生物分析仪软件中用来表征 RNA 完整性的状态。采用核糖体比率的总 RNA 样品平板凝胶分析通常得到不准确的 RNA 完整性评估结果³。通过显示 RNA 片段大小分布的详细画面，Agilent 2100 生物分析仪系统提供更好的 RNA 完整性评估结果。

RNA 降解是一个逐渐的过程。随着降解推进（图 1），18S/28S 核糖体条带比减小，而两个核糖体峰和下

位内标之间的基线信号增大。生物分析仪软件自动生成 18S/28S 核糖体亚基的比率。尽管核糖体比率在确定凝胶电泳中样品降解程度方面发挥重要作用，但 Agilent 2100 生物分析仪系统中更详细的分析表明，该比率未充分描述样品完整性。

为了将 RNA 完整性解释过程标准化，安捷伦科技有限公司已经推出一种新的 RNA 质量评估工具。开发 RNA 完整值 (RIN) 旨在消除 RNA 质量控制中的个人解释。它将完整电泳图

纳入考量。基于 1 至 10 的编号系统，RIN 软件算法可将真核生物总 RNA 分类，其中 1 代表降解最严重的情况并且 10 代表最完整。通过这种方式，有助于解释电泳图，令样品比较成为可能，并确保实验的重复性。

RIN 工具的开发

RIN 软件算法针对 Agilent 2100 生物分析仪系统中用真核生物总 RNA Nano 分析法采集的样品开发。输入数据包括来自三个哺乳动物物种（人类、小鼠和大鼠）的不同组织

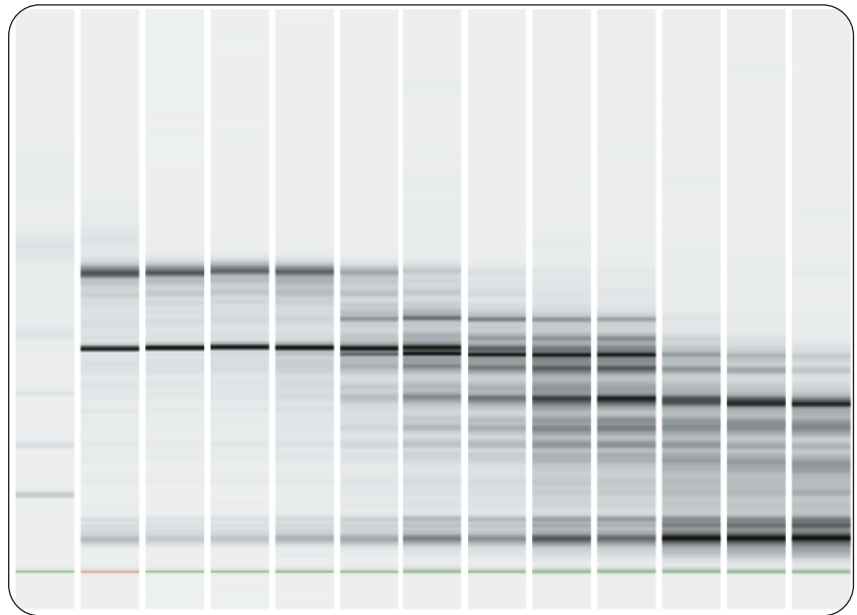


图 1
总 RNA 样品经过不同时间降解，并且在 Agilent 2100 生物分析仪系统上使用真核细胞总 RNA Nano 分析法分析所得的样品。随着降解推进，可以观察到向较短片段大小方向偏移

中约 1300 份总 RNA 样品，所有样品的完整程度各不相同。RNA 样品的分类由应用专家手动进行，他们将每份总 RNA 样品分类至 1-10 的预定编号系统。图 2 展示了不同 RIN 类别的代表性电泳图（编号分别为 10、6、3、2）。

为开发 RIN 算法，采用了神经网络等自适应学习工具（工具由 Quantiom Bioinformatics 提供）。这些工具允许确定可以从电泳图提取的关键特征。这些特征是可以采用合适积分仪分析的电泳图组成部分。它们可以是信号面积、强度、比值等。图 3 中列出电泳图的重要要素。它们包括不同的区域（前区、5S 区、快速区、中区、前体区、后区）和峰（标准品、18S、28S）。

RIN 可视化

先前版本生物分级软件中存在的数
据可以同样存在于下一版 Expert 软件中，例如 RNA 面积、RNA 浓度和 rRNA 比率。RIN 软件包括 RIN 值（图 4），该值可以表述为小数或整数。RIN 值可以在“全局高级”设置下的“设点浏览器”中的“分析性质”选项卡中从小数变为整数。如果软件在某些区域发现意外的峰或信号，可能无法计算 RIN 值。

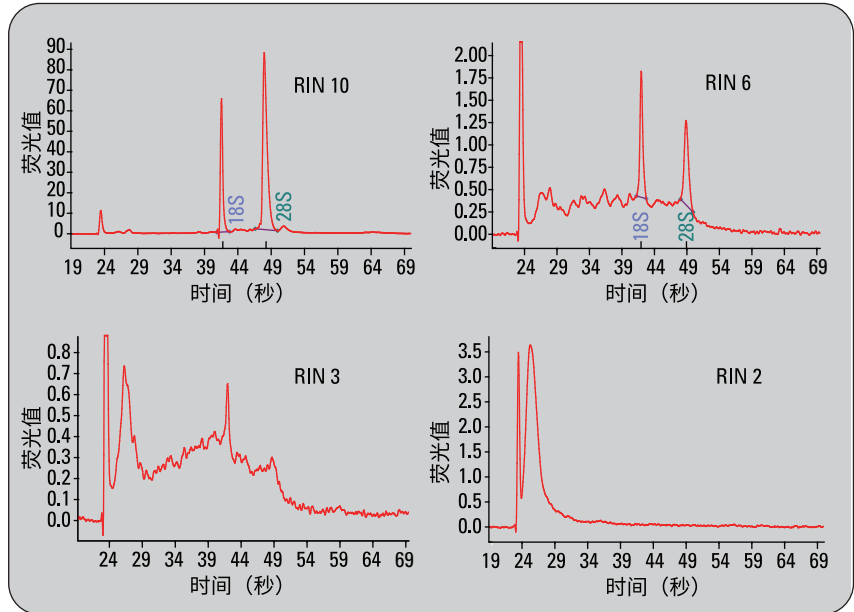


图 2
用于调试 RNA 完整值 (RIN) 软件的样品电泳图。样品为完整样品 (RIN 10) 至降解样品 (RIN 2)

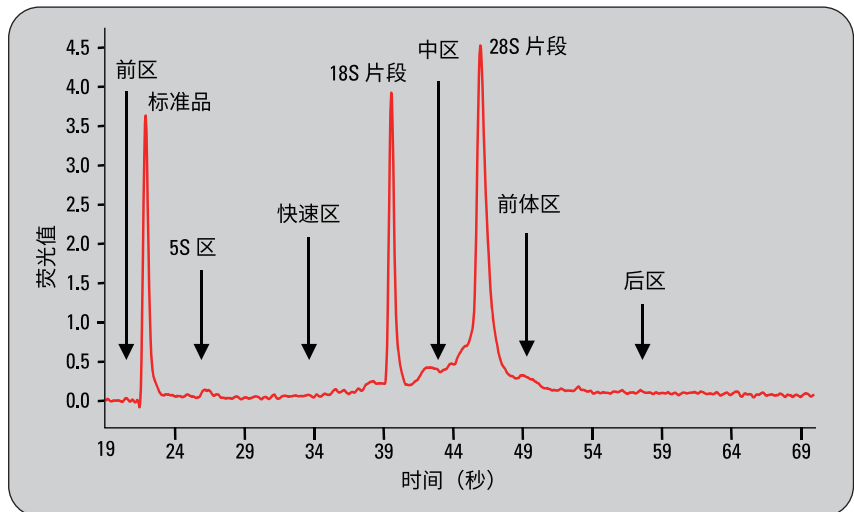


图 3
详述提示 RNA 质量的各区域的电泳图

这将产生提示已检测到异常的错误消息（列在软件的错误选项卡中）。异常包括基因组 DNA 污染、鬼峰、尖峰和波浪状基线。异常可以分为两类：关键和非关键。非关键异常（如后区的尖峰）将导致计算 RIN 值，而关键异常（如快速区的尖峰）将导致 RIN 值无法计算。如果认定某个异常非关键（如基因组污染，此事应当进行 DNA 酶消化以获取有意义的的数据），对于已经标记的样品，仍可以通过在“设点浏览器”的高级设置中提高异常阈值设定，计算 RIN 值（图 5）。异常阈值检测的最大值为 1。错误消息的描述将与适当阈值相对应。

利用 RIN 得到的结果

开发 RIN 软件以消除依赖用户的 RNA 质量解释过程。总 RNA 样品的表征基本上与仪器、样品浓度和操作人员无关，从而允许跨不同实验室比较样品。

RNA 完整性

图 6 展示三份完整程度状态不同的 RNA 样品。RIN 工具赋予三种不同命名，代表相应的完整性。在样品与调试算法时所用样品不同的大型验证研究期间，得到了可靠的样品分类。

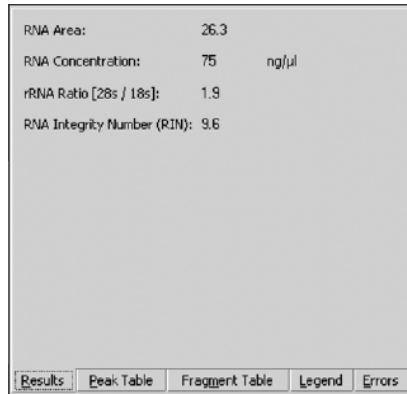


图 4 Agilent 2100 生物分析仪系统 Expert 软件中的 RIN 可视化。“结果”选项卡中显示 RIN 值，而“错误”选项卡将包含在 RIN 未计算情况下有用的信息

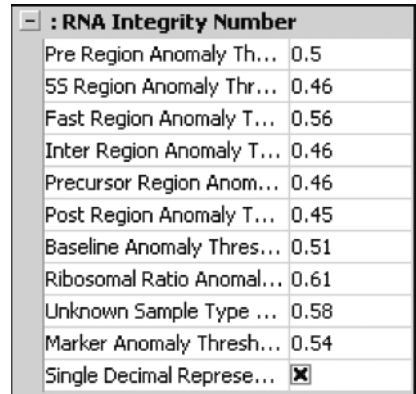


图 5 改变异常阈值和 RIN 单位小数表示。如果分析期间已经检测到关键异常，则在许多情况下仍可以通过提高阈值（最大值为 1）计算 RIN 值。可以在“错误”选项卡中找到关于异常的信息

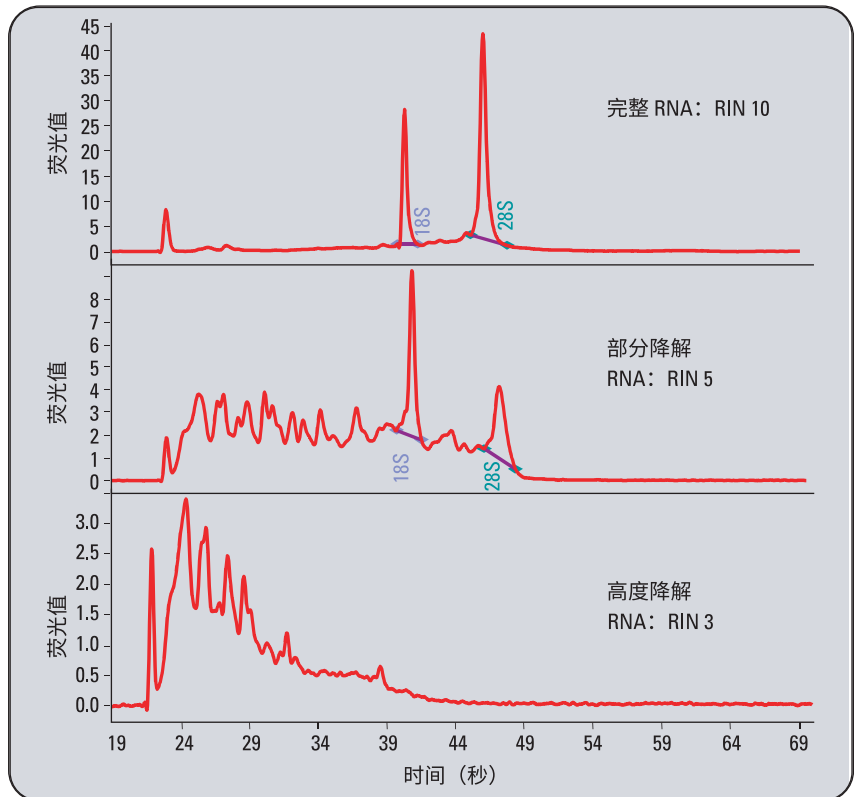


图 6 在完整程度不同的样品上检验 RNA 完整值。RIN 软件算法能够将样品精确分类

核糖体比率

图 7 显示了在三台不同仪器上分析的同一份人脑 (Ambion, Inc.) 总 RNA 样品, 并且显示了仪器 1 和仪器 3 的代表性电泳图。将采用生物分析仪软件生成的核糖体比率与 RIN 值比较。对于 36 份样品, 与 RIN 值相比, 采用核糖体比率时变异程度较大。RIN 计算值的变异系数为 1.4%, 而核糖体比率的变异系数为 5.1%。谨记这些 CV 值指向同一样品。当纳入来自不同物种和组织的样品时, 发现核糖体比率的 CV 值显著增大。

分析不同稀释度的样品时, 获得了类似图像 (图 8)。将小鼠脑总 RNA 稀释为三个不同浓度: 25 ng/ μ L、100 ng/ μ L 和 500 ng/ μ L。对于测试的 108 份样品中, RIN 值大幅度优于核糖体比率。RIN 的变异系数为 3%, 而核糖体比率的变异系数则为 22%。应当指出, 低于 25 ng/ μ L 时, 不能获得准确的 RIN 值。对于大于 50 ng/ μ L 的样品浓度, 获得最佳结果。

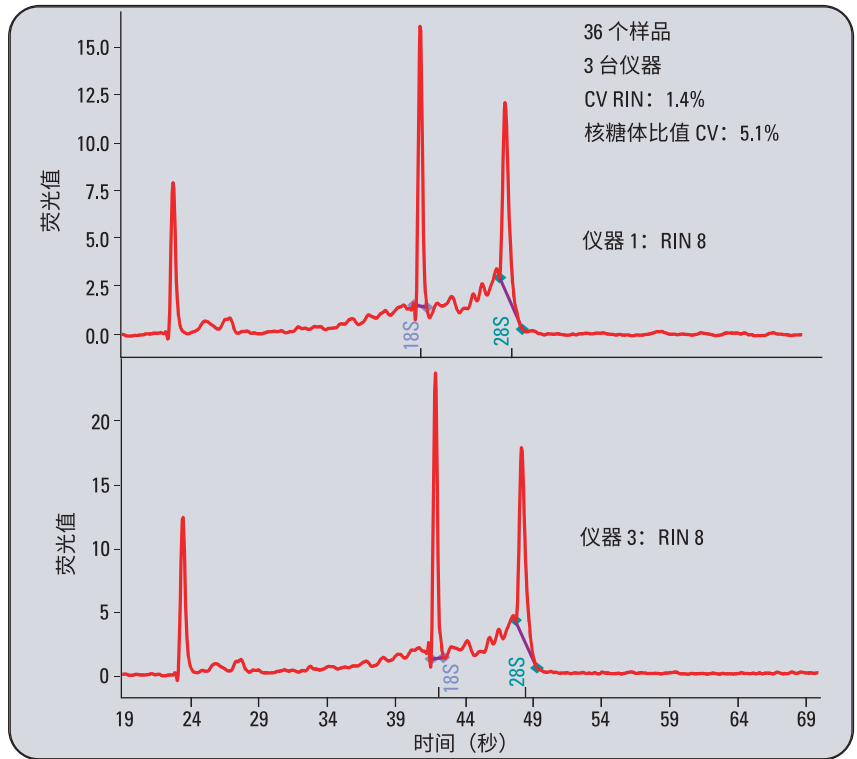


图 7
在三台不同仪器上分析 36 份总 RNA 样品。将 RIN 与核糖体比率比较。RIN 工具的 CV 显著低于核糖体比率

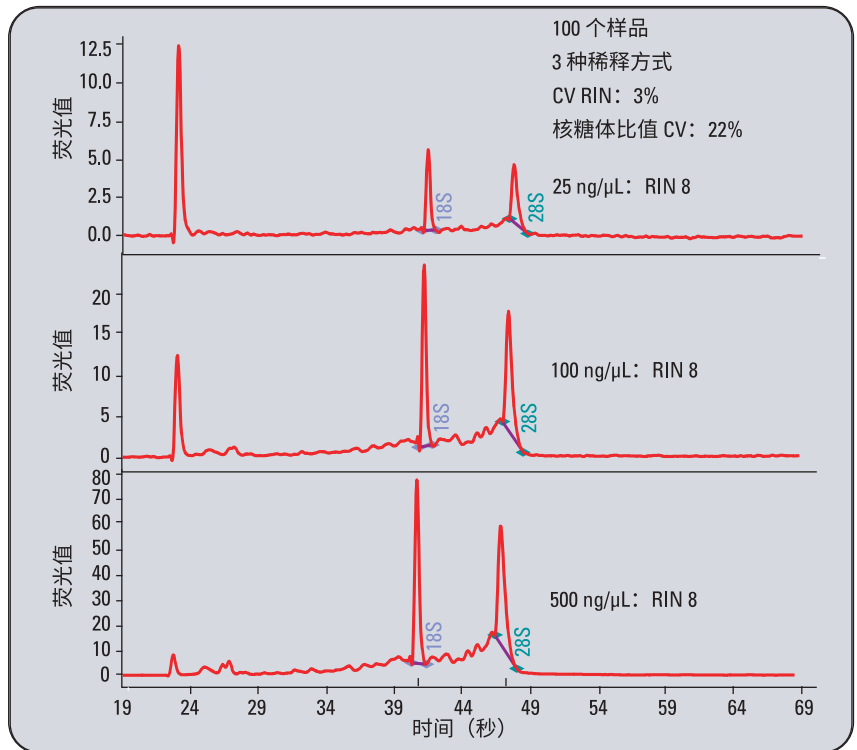


图 8
检验不同稀释程度的同一份 RNA 样品时, 以狭窄限值范围获得相同的 RIN 值, 而核糖体比率显示重现性差得多

利用 RIN

RIN 是测量 RNA 完整性的一款强大的新工具。图 9 中的图示给出了 RIN 的最佳实际使用案例。作为第一步，应当验证 RIN 值（图 9A）。这可以通过将 RIN 值与特定下游实验如微阵列分析或 RT-PCR 关联来进行。可以利用这个关联步骤在成功的下游实验和失败的实验间建立 RIN 阈值。可以在现有生物分析仪数据集（如可获得）上进行此步骤。在已经建立阈值后，这个值可以用于标准 RNA 质量控制程序（图 9B）。RIN 高于阈值的所有样品通过 QC 检验，而丢弃 RIN 低于阈值的样品。如果重要实验参数变更（例如，研究不同的生物、使用不同类型的微阵列、采用不同的探针集等），则应当重复验证 RIN 的关联步骤。截至目前，已采用真核生物总 RNA Nano 分析法检验 RIN 算法。

RIN 局限性

RIN 旨在提供明确的 RNA 完整性评估结果。给出了样品完整性的衡量标准，它可用于直接比较运输前后的样品，或用于比较不同实验室间的样品。最重要的是，它可以用来确保基因表达实验的重复性，只要涉及样品提取步骤。然而，在无前期验证工作的情况下，RIN 不能预测基因表达数据的效能。例如，一份样品可能过度降解而无法进行全基因组微阵列实验，但可能产生良好的 RT-PCR 数据。为了有效利用 RIN，必须进行必要的关联工作。

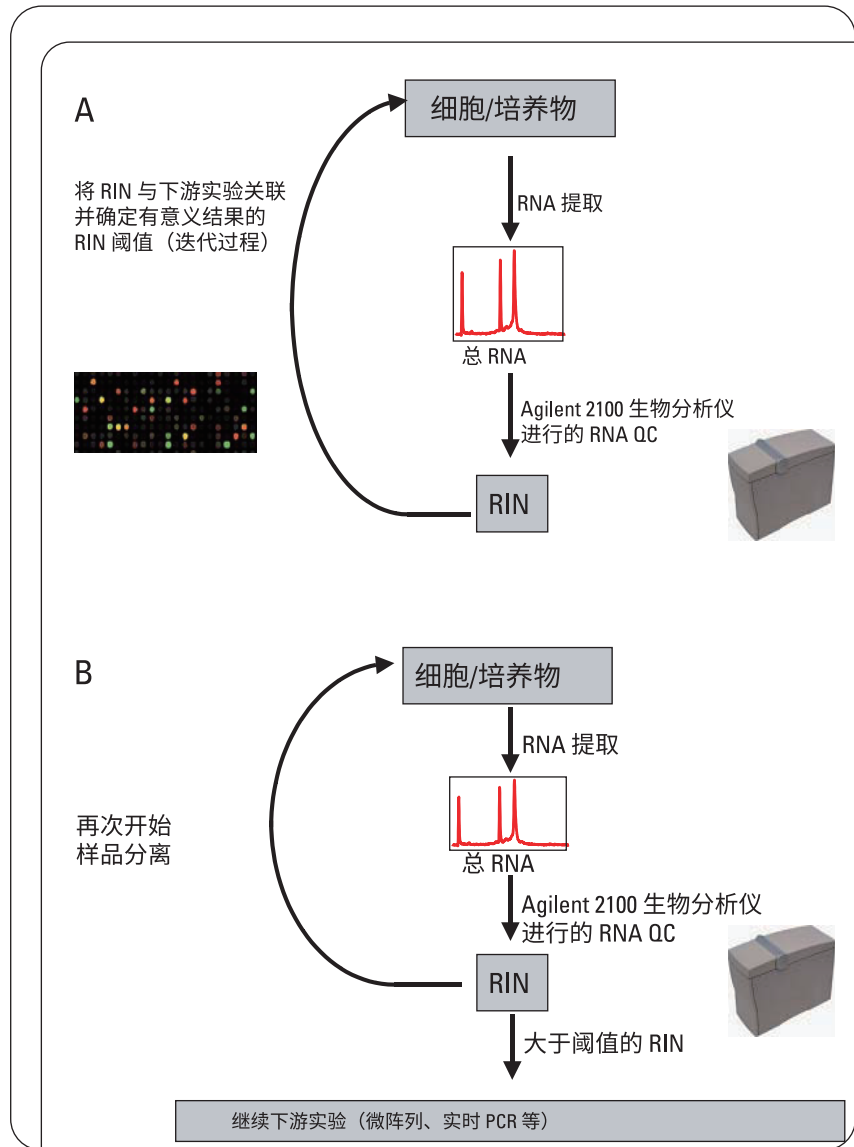


图 9
A. 将 RIN 值与下游实验（例如微阵列或 RT-PCR）关联并确定获得有用基因表达结果的阈值
B. 在已经进行初始关联实验并已经设定数据阈值后，RIN 值可以用于丢弃在 Agilent 2100 生物分析仪系统中未通过样品 QC 的样品（RIN 值低于阈值）

结论

我们已经设计出一款能够比核糖体比率更好评估 RNA 质量的软件算法。RIN 工具是 RNA 完整性评估标准化的重要环节。研究者不再受困于总 RNA 的主观分类。通过进行关联实验，可创建阈值以确保实验的重复性。已经发现 RIN 工具基本上没有仪器变异性及浓度变异性，因此有助于仪器间及实验室间样品的比较。

参考文献

1. "Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis, and UV spectrometry" (采用 Agilent 2100 生物分析仪、RiboGreen 分析试剂和紫外光谱对总 RNA 进行定量比较)，安捷伦应用简报，出版号 5988-7650EN, **2002**
2. "A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation", *Electrophoresis*, 21(1), 128-34, **2000**
3. "Advancing the quality control methodology to assess isolated total RNA and generated fragmented cRNA" (通过改进质量控制方法评估游离总 RNA 以及生成的 cRNA 片段，安捷伦应用简报，出版号 5988-9861EN, **2003**

致谢

我们要特别感谢合作伙伴 Ambion Inc.、德国基因组研究资源中心 (RZPD) 以及 Quantiom Bioinformatics。我们还要特别感谢对 RIN 算法进行内部测试并提供宝贵意见的所有研究人员。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

Odilo Mueller 是 LabChip 核酸试剂盒的分析产品经理，Samar Lightfoot 是核酸分析支持生化专家，Andreas Schroeder 是软件专家，以上三位均任职安捷伦科技公司（德国瓦尔德布隆）。

www.agilent.com/chem/labonachip



LabChip® 是 Caliper Life Sciences, Inc. 在美国及其他国家/地区的注册商标。

仅限研究使用。不可用于诊断目的。
本文信息如有变更，恕不另行通知。

版权所有 © 2016 安捷伦科技有限公司。保留所有权利。除根据版权法允许的情形外，未经书面许可，不得复制、改编或翻译。

2016 年 1 月 21 日，中国出版
出版号 5989-1165CHCN



Agilent Technologies