

表 2 乳糜组初始及处理后检测结果

项目	n	初始结果	低温高速离心后	无水乙醚处理后
PT(S)	20	26.35±3.86	12.41±1.28 [#]	12.25±1.45 [#]
FIB(mg/dL)	20	—	312.25±26.3	319.16±24.9

[#]: P<0.01, 与初始结果比较; —: 无数据。

3 讨 论

测定凝血因子的经典方法为手工法,但由于手工法操作繁琐,对操作者要求高,且检测时间长,不能适应现代临床需求。因此,全自动血液凝固分析仪的使用已经逐步成为主流^[2]。SYSMEX CA-7000 血液凝固分析仪是具有代表性的光电比浊法的仪器^[3],该仪器使用本底扣除法对轻、中浊度标本有一定的补偿作用,但在检测高浊度的标本时会出现较大误差^[4]。通过对对照组的检测发现,PT、FIB 初始结果与低温高速离心处理和无水乙醚处理后的结果之间差异无统计学意义(P>0.05),表明经过这 2 种处理后对标本的 PT、FIB 的检测值无明显变化,对标本自身血浆变化无影响;乳糜组标本经 2 种方法处理后 PT 结果由高值降至正常范围内,FIB 结果由原来检测不出至可以被检测出结果,且都与患者病情相符,2 种方法处理后的 FIB 结果差异无统计学意义(P>0.05),说明这 2 种方法能有效消除高度乳糜标本对凝血因子检测的影响^[5]。笔者在工作中发现,当三酰甘油含量大于 6.35 mmol/L 时,标本

• 检验技术与方法 •

的 FIB 就检测不出,当三酰甘油含量大于 11.00 mmol/L 时,标本的 PT 检测值明显偏高,与有关报道相符^[6]。因此,在日常工作中,正确处理乳糜标本后再进行检测,有助于提高检测的精确度。低温高速离心法对离心机设备要求高,对于一般不易装备的实验室,则可以采用无水乙醚处理法进行乳糜标本处理,该法对离心机没有特殊要求,更适合广大基层医院。

参考文献

- [1] 尹玲,王风学,林光,等.高脂肪乳糜对凝血功能测定结果影响的探讨[J].实用医技杂志,2008,15(4):495-460.
- [2] 王鸿利.血栓与止血检测的临床应用[J].中华检验医学杂志,2008,31(1):3-7.
- [3] 郭惠,王忠诚,蒋丽莉.三种方法测定血浆纤维蛋白原的结果对比[J].国际检验医学杂志,2007,20(3):145-146.
- [4] 陈建芸,石凌波.高速离心法消除高血脂对凝血酶原时间测定的影响[J].检验医学,2005,20(4):401-402.
- [5] 崔冬生,耿玉兰.临床乳糜血对凝血检测项目的处理[J].中国血液流变学杂志,2003,13(1):40-41.
- [6] 王栋.乳糜血对光散射法血凝仪检测结果的影响[J].中外医疗,2009,12(6):167.

(收稿日期:2013-01-23)

5 种 microRNA 检索引擎的应用和比较*

刘辰庚,王培昌[△]

(首都医科大学宣武医院检验科,北京 100053)

摘要:目的 对 miRBase 等 5 种 microRNA(miRNA)检索引擎的功能、特点等作一比较分析。方法 使用人、小鼠和大鼠 3 个种属及 hsa-miR-92b 等 5 种 miRNA 对 miRBase 等 5 种数据库的容量、检索功能特点、预测准确性等方面进行检索分析。结果 miRBase 的种属收录量、单一种属中 miRNA 的收录量都是最多的。针对 5 种人源 miRNA 的靶基因检索, RNA22 和 TargetScan 的数据返回量显著小于 miRBase(P<0.05), miRGen Targets 的数据返回量显著多于 miRBase(P<0.05),其中 miRGen Target 和 miRBase 对 APP 检索结果的重合率最高。结论 miRNAbase 的综合检索能力和功能设置最为全面,对不同搜索引擎的功能和检索结果进行综合分析及合理利用将有助于研究效率的提高。

关键词: 生物信息学; 检索; 微 RNAs

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1725-03

随着情报科学、信息技术特别是计算机技术和网络技术的发展,使得生物信息学发展成为一门前沿交叉学科,生物信息学检索对科研中的实验设计和结果预期的作用日趋显著^[1]。由于 microRNA(miRNA)在发育、肿瘤和衰老等方面具有的重要作用,成为近年来一个研究热点,生物信息学检索在 miRNA 的序列存储和比对,靶基因和信号转导通路的预测等方面有较高的价值^[2]。本文旨在对目前常用的 miRBase 等 5 种 miRNA 检索引擎的数据库容量、检索功能特点、预测准确性等方面作一比较分析。

1 资料与方法

1.1 检索引擎 根据文献检索,总结国内外研究者使用较多的 5 种 miRNA 检索引擎,其中 miRBase(<http://www.mirbase.org>)和 pictar(<http://pictar.mdc-berlin.de>)的主要功能为 miRNA 靶基因预测及不同器官的 miRNA 表达情况分析; RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22>)、miRGen

Targets (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miR-Gen>)和 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)的主要功能为 miRNA 靶基因的预测。上述 5 种 miRNA 检索引擎均具备不同程度的序列分析计算功能和不同种属 miRNA 和/或其靶基因的上游、下游序列查询功能。

1.2 检索引擎的数据容量和功能 比较不同的 miRNA 检索引擎中收录 miRNA 数据量的大小。对于不同种属间 miRNA 的收录情况,以较常用的人类(Homo sapiens)、小鼠(Mus musculus)和大鼠(Rattus norvegicus)的 miRNA 数据收录量分别进行统计。对于从同一个 miRNA 前体的 5'端臂和 3'端臂加工所生成的“-5p”和“-3p”及带有“*”的 miRNA,按照其前体数量进行统计。对于高度同源的 miRNA 如 hsa-miR-34a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c 等进行分别计数。对于由不同染色体上的 DNA 序列转录加工而成的具有相同成熟体序列的 miRNA 如 hsa-miR-199a-1 和 hsa-miR-199a-2 等进行分别计

* 基金项目:教育部博士点基金编号(20121107110001)。[△] 通讯作者, E-mail: peichangwang@yahoo.com。

数。对不同检索引擎的功能进行比较,分析各个应用模块对研究人员的潜在帮助程度。

1.3 靶基因预测比对分析 随机选取 5 种 miRNA(hsa-miR-92b、hsa-miR-132、hsa-miR-325、hsa-miR-512-5p 和 hsa-miR-920),分别在 5 个检索引擎中针对 homo sapiens、Mus musculus(如有)和 Mus musculus(如有)3 个种属进行靶基因的预测分析,比较不同引擎检索结果的数量以及一致性的差异。选取目前在 miRNA 调控方面研究较少但对衰老及相关疾病有重要意义的 β 淀粉样前体蛋白(amyloid β -protein precursor, APP)和 β -分泌酶(β -secretase, BACE-1)进行检索分析,比较不同检索引擎的数量以及一致性的差异。将上述检索结果分别在 NCBI 和 CNKI 上进行检索,根据已有的研究初步分析各个检索引擎预测的准确程度。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 13.0 对不同检索引擎针对某种对象检索结果进行配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 收录量和功能比较结果 在 5 种搜索引擎中,miRBase

的种属收录量、单一种属中 miRNA 的收录量都是最多的,miRGen Targets 的上述指标次之,pictar 在哺乳动物中仅提供了小鼠的检索选项。miRBase 提供了 miRNA 序列比对分析、查询和输出等附加功能,但未提供检索参数调节功能(表 1)。

2.2 miRNA 靶基因检索结果 针对 5 种人源 miRNA 的靶基因检索,miRBase 返回的结果最多,pictar 未提供人源 miRNA 的检索。以 miRBase 为对照对其余引擎返回数据量进行配对 *t* 检验,结果表明 RNA22 和 TargetScan 的数据返回量显著小于 miRBase($P < 0.05$),miRGen Targets 的数据返回量显著多于 miRBase($P < 0.05$)(表 2)。

2.3 靶基因对 miRNA 检索结果 miRBase 针对 APP(NM_000484)返回 27 个结果,针对 BACE-1(NM_012104)未返回结果。miRGen Targets 针对 APP 返回 59 个结果,针对 BACE-1 返回 39 个结果。TargetScan 针对 APP 返回 1 个结果,针对 BACE-1 返回 12 个结果。RNA22 针对 APP 返回 15 个结果,针对 BACE-1 返回 11 个结果。其中 miRGen Target 和 miRBase 对 APP 检索结果的重合率最高,为 8 个(表 3)。

表 1 miRNA 检索引擎收录量和基本功能比较

项目		miRBase	pictar	RNA22	miRGen Targets	TargetScan
miRNA 收录量	人	2 042	无	1 987	1 835	435
	小鼠	1 281	541	1 567	1 412	578
	大鼠	732	无	无	631	无
附加功能	序列比对分析	√	√	√	√	√
	检索参数调整	无	√	无	√	无
	上下游序列查询	√	无	√	√	√
	数据文本输出	√	√	√	无	√
	序列检索	√	√	√	√	√
	文献链接	√	无	无	无	无

表 2 检索特定 miRNA 靶基因比较

项目	miRBase	pictar	RNA22	miRGen Targets	Targ Scan
hsa-miR-92b	885	无	654	810	893
hsa-miR-132	1113	无	547	1992	407
hsa-miR-325	952	无	658	1099	75
hsa-miR-512-5p	924	无	456	1003	147
hsa-miR-920	891	无	513	无	178
<i>P</i>	对照	无	< 0.05	< 0.05	< 0.05

pictar:未提供人源 miRNA 的检索;miRGen、Targets:使用全数据库检索。

表 3 靶基因对 miRNA 检索结果[n(%)]

返回结果的数量	miRBase	RNA22	miRGen Targets	TargetScan
APP(准确率*)	27(22.2)	15(26.7)	59(8.5)	1(100)
BACE-1(准确率*)	0(0)	11(18.2)	39(6.7)	12(8.3)

*:准确率以 2012 年 12 月至 2013 年 1 月在 NCBI 和 CNKI 上检索到的数量计算。

3 讨 论

miRNA 是一类内生的、长度约 19~24 个核苷酸的小 RNA,在细胞内具有重要的调节作用。目前在人体内至少已经发现了 2 000 种 miRNA,据推测,miRNA 调控着人类 1/3 的基因。miRNA 以多对多的形式对其靶基因进行调控;既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可以通过几个 miRNAs 的组合来精细调控某个基因的表达^[3]。多种检索引擎的出现使研究者对 miRNA 进行高效的筛选成为可能。目前 TargetScanS 的检索引擎也对 miRNAbase 进行了索引,故

其检索结果与 miRNAbase 相近,但该项检索仅提供了对人类 miRNA 的检索服务,应用范围相对有限。不同的检索引擎其种属范围有所不同,其中最全面的是 miRNAbase,提供了人、小鼠等 84 个种属的数据。因为 miRNA 的序列在种属之间相对保守,故有一些引擎提供了综合搜索,如 MicroInspector 和 RNAhybrid 可针对哺乳动物进行检索,PicTar 可针对脊椎动物进行检索等。

检出率和阳性率是检验搜索引擎检索结果质量的两大指标,较高的检出率往往意味着较低的阳性率和较高的假阳性率^[4]。目前的检索程序主要考虑了 miRNA 靶位点的保守性、miRNA 与靶 mRNA 的互补性以及二者结合区附近核酸序列的二级结构等信息。其中 miRNAbase 除考虑上述因素外,还加入了 miRNA 与其靶基因 mRNA 序列的碱基之间所可能形成的二聚体间相互作用的热力学特性这一参数,使其预测结果的假阳性率相对较低^[5]。这也在 APP 和 BACE-1 的检索结果中得到了印证。目前,miRNA 和靶 mRNA 的仿真模拟结合是检索程序设计的发展趋势,随着更多仿真参数的引入,其检索结果的阳性率可望进一步提高。检索参数的调整可直接导致检索结果量的改变,pictar 和 miRGen Targets 提供了不同检索参数的选择,如保守区和非保守区的选择、数据库容量的选择等。这对于有经验的研究者来说是有帮助的^[1-2,6]。

对与特定靶基因和靶 miRNA 的检索,miRNAbase 均返回了最多的结果。miRNAbase 是较早建立也是目前在功能和数据量方面最为全面的 miRNA 数据库,其 miRNA 序列和特征检索在其主要网站 miRNAbase 上,其靶基因检索则与 microcosm 合作为研究者提供服务^[7]。虽然其他引擎也提供了 pubmed 基因数据库的链接或者编号,但 miRNAbase 将 miR-

NA 上下游序列查找功能及序列检索功能做了无缝连接,给甲基化和信号转导通路的相关研究提供了很大帮助。各个引擎对检索特定对象返回的检索结果的数量也有很大不同,其原因应是其数据库容量以及计算方法不同所致^[8]。从 NCBI 和 CNKI 的检索结果来看,检索引擎之间重复出现的 miRNA 其文献检出率较高,提示在不同引擎搜索结果中重复出现的 miRNA 的预测阳性率较高,但也可能是研究者更加倾向于优先研究各个引擎中检索结果中的重合 miRNA。综上,miRN-Abase 的综合检索能力和功能设置最为强大,但其他 4 种引擎也各具特色,对不同搜索引擎的检索结果和功能进行综合分析及合理利用将有助于研究效率的提高。

参考文献

[1] Goswami CP, Nakshatri H. PROGmiR: a tool for identifying prognostic miRNA biomarkers in multiple cancers using publicly available data [J]. J Clin Bioinforma, 2012, 2(1): 23.
 [2] Lai X, Wolkenhauer O, Vera J. Modeling miRNA Regulation in

Cancer Signaling Systems: miR-34a Regulation of the p53/Sirt1 Signaling Module [J]. Methods Mol Biol, 2012, 880: 87-108.
 [3] Kunej T, Godnic I, Horvat S, et al. Cross talk between microRNA and coding cancer genes [J]. Cancer J, 2012, 18(3): 223-231.
 [4] 孟双, 徐冲, 陈丽媛, 等. 生物信息学在生物学研究领域的应用 [J]. 微生物学杂志, 2011, 31(1): 78-81.
 [5] 高青, 鞠志花, 王长法, 等. miRBase-microRNA 序列数据库 [J]. 家畜生态学报, 2011, 32(6): 101-104.
 [6] Lee CC, Yen CJ, Liu T. Prediction of personalized microRNA activity [J]. Gene, 2012, 20(1): 16.
 [7] 罗维, 林宇翔, 纪纪坡, 等. 靶向细胞外基质磷酸糖蛋白的 microRNA 的筛选及鉴定 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23(3): 74-81.
 [8] Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, et al. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51111.

(收稿日期: 2013-01-29)

• 检验技术与方法 •

骨髓涂片铁快速染色法的临床应用

李建华¹, 刘玉军², 邓克廷¹, 王永锋¹, 杨超¹, 康炜¹

(1. 西安医学院第一附属医院检验科, 陕西西安 710077; 2. 神木县医院检验科, 陕西榆林 719300)

摘要:目的 探讨研究骨髓铁微波快速滴染法的临床应用价值。方法 对日常血液科骨穿患者骨髓液涂片取两张采用常规铁染色及铁快速染色, 观察细胞内、外铁。结果 两种方法结果一致, 对统计结果进行配对计量资料 *t* 检验, $t=0.306, P>0.05$ 。结论 铁快速染色法方便、快捷、环保、安全, 适合临床常规应用。

关键词:骨髓涂片; 铁染色; 实验室技术和方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)13-1727-01

骨髓铁染色是用于诊断和鉴别缺铁性贫血(IDA)、巨幼细胞性贫血(MA)、慢性病性贫血(ACD)等重要检查指标, 包括细胞外铁和细胞内铁染色。目前, 常规的铁染色方法是利用酸性亚铁氰化钾染色, 再经沙黄复染, 但由于此法在操作过程中费时、费试剂和不安全等, 有些学者对骨髓铁染色方法进行了改良^[1-7]。我们用微波炉, 采用中档火力对骨髓染片进行 30 秒处理后, 以 0.25% 沙黄液进行复染, 并将此快速染色法与常规染色法的染色效果进行比较分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取近期日常骨髓穿刺患者 14 例, 每例选涂片两张。

1.2 方法

1.2.1 铁快速染色法的低浓度酸性亚铁氰化钾溶液的配制与保存 (1) 亚铁氰化钾 2 g 溶于 100 mL 蒸馏水中, 浓度为 2%; (2) 浓盐酸 2 mL 稀释至 100 mL 蒸馏水中, 各加 (1)(2) 0.8 mL 立即用江苏康健 1.5 mL 刻度离心管分装新鲜配制的酸性亚铁氰化钾溶液放入 -40 °C 冰箱中冷冻保存。使用时分装管于 37 °C 水浴中解冻 5 min, 用滴管来回抽吸以混匀, 再滴加于骨髓涂片上染色, 放入微波炉, 4 档 25 s 后, 水冲洗 2~3 min, 再用蒸馏水漂洗 2 次后, 用 0.25% 沙黄复染 1~2 min, 水冲洗, 晾干后镜检。

1.2.2 对照组的处理 用常规染色液, 临用时, 在试管内先放 200 g/L 亚铁氰化钾 5 mL, 再将浓盐酸慢慢滴入, 边滴边摇, 直到出现白色沉淀为止, 然后再滴入亚铁氰化钾至白色沉淀消失为止^[8]。

1.2.3 两组间的比较 分别用铁微波快速滴染法和常规铁染

色法进行染色, 并观察细胞外铁、细胞内铁进行积分计量比较。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行数据统计分析, 对积分结果进行配对计量资料 *t* 检验。

2 结果

14 例患者两种方法观察细胞内、外铁有很好的一致性, 相比较差异无统计学意义 ($t=0.306, P>0.05$), 见表 1。

表 1 14 例患者常用铁染色与快速铁染色阳性程度比较

病人号	A 组		B 组		d(A2-B2)	d ²
	细胞外铁	细胞内铁	细胞外铁	细胞内铁		
1	+	20	+	15	5	25
2	++	30	+	30	0	0
3	+++	50	+++	55	0	0
4	++	25	++	30	-5	25
5	+	15	+	15	0	0
6	-	0	-	5	-5	25
7	+	10	+	10	0	0
8	++	30	++	25	5	25
9	+	15	+	15	0	0
10	++	40	++	40	0	0
11	++	25	++	30	-5	25
12	++++	50	++++	40	10	100
13	+	10	+	15	-5	25
14	++	20	++	15	5	0
合计					5	250

A 组: 常规法; B 组: 快速法。

(下转插 I)