

研究
简报

利用不同实时定量 PCR 方法分析相对基因表达差异

余舜武¹ 刘鸿艳¹ 罗利军^{1,2,*}

(¹上海市农业生物基因中心/作物遗传改良国家重点实验室种质资源分室(上海),上海 201106;²华中农业大学,湖北武汉 430070)

摘要: 利用实时荧光定量 PCR 方法分析目标基因转录本之间的表达差异,目前常用的分析实验数据的有绝对定量和相对定量方法。为了克服绝对定量方法的繁琐和简化相对定量的分析方法,分别利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 、 $2^{-\Delta C_t}$ 和标准曲线法对水稻 *OsRDB1* 基因在不同化学试剂和激素处理下的表达差异进行了分析,发现 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 必须引入标准的看家基因作为参考,计算方法繁琐,计算结果受扩增效率影响;而利用 $2^{-\Delta C_t}$ 和标准曲线法计算方便,节省定量 PCR 试剂,但其结果易受到 RNA 浓度测量准确率的影响,其中标准曲线法引入斜率消除扩增效率的影响,最能测得实际的原始拷贝数差异。

关键词: 相对定量; 标准曲线; 实时荧光定量 PCR; *OsRDB1*

Analysis of Relative Gene Expression Using Different Real-Time Quantitative PCR

YU Shun-Wu¹, LIU Hong-Yan¹, and LUO Li-Jun^{1,2,*}

(¹ Shanghai Agrobiological Gene Center / Germplasm Resources Division (Shanghai), National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Shanghai 201106;

² Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: Real-time quantitative PCR is often used to analyze the target gene expression variation. The most commonly used methods to analyze data from real-time quantitative PCR include two types: absolute quantification and relative quantification. To avoid the complex of absolute quantification and simplify the relative quantification, the methods of $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $2^{-\Delta C_t}$ and standard curve were used to analyze the *OsRDB1* expression variation under different chemical and hormone treatments in this study. The ratio of gene expression variation was calculated with the slope of standard curve. The results revealed that the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method had to be introduced a housekeeping gene as a control, with a complicated calculation and the relative ratio was deviated by PCR amplification efficiency. The $2^{-\Delta C_t}$ and standard curve methods were convenient and saved chemicals used in the quantitative PCR, but the results were liable to the effect of the veracity of the RNA concentration. The modified method of standard curve introduced the curve slope to eliminate the effect of amplification efficiency, and the result of standard curve method most closely revealed the diversity of original copy.

Keywords: Relative quantification; Standard curve; Real-time quantitative PCR; *OsRDB1*

实时荧光定量 PCR 是最近几年新发展起来的方法,具有准确和高灵敏度特点,不要求扩增后电泳等的处理,可以节省时间,有效消除实验室 PCR 产物如核酸和溴化乙锭等污染,已经被广大科研工作者广泛应用于农作物转基因和基因的差异表达研究,如转基因玉米检测^[1]和水稻低丰度表达基因 *OsAMT1*; 3 的表达分析^[2]。为了深入挖掘实时定量 PCR 的优越性,发展了多种分析实验数据的方法^[3]。检测基因表达变化有绝对定量和相对定量两种方法。绝对定量需要借助其他手段和方法标定 RNA 的绝对量,然后通过建标准曲线来分析样品的模板绝对量^[4,5],方法复杂、耗时、成本高,在基因的表达差异分析中已经很少采用。通常,研究人员关注的不是目标转录本的拷贝数,而是该基因在不同外界

处理和生理状态下基因表达的改变情况。所以在不需要了解样品绝对拷贝数时,通过一些假设和特殊的公式直接推导出基因表达的变化情况,将大大简化研究方法。目前常用的相对定量方法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,需引入看家基因作参照^[6];如果直接与未处理的样品作比较,可以使用 $2^{-\Delta C_t}$ 法^[6]。本文以 SYBR GREEN I 实时定量 PCR 为基础,分别采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 、 $2^{-\Delta C_t}$ 和修改的标准曲线法分析水稻基因 *OsRDB1* (GenBank accession No. DQ680143) 在不同化学试剂和激素处理下的基因表达变化情况。*OsRDB1* 是在 N 端包含 BURP 区域的蛋白基因^[7],能够响应各种激素和胁迫处理^[8]。为了有效减少 PCR 规模,同时检测 PCR 扩增效率,将传统的绝对定量法进行了修改,即将处理样品中的一个样品分别稀释 10 ~ 10⁶

基金项目:上海市青年科技启明星计划项目(06QA14045)

作者简介:余舜武(1971-),男,博士,副研究员。*通讯作者。(Corresponding author):罗利军,男,博士,研究员,E-mail: lijun@sagc.org.cn

Received (收稿日期): 2006-08-23; Accepted (接受日期): 2006-12-19.

倍,然后构建标准曲线,利用标准曲线的斜率比较每一个样品的拷贝变化率。结果表明该方法不仅能准确反映基因的 PCR 扩增效率,而且与 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法获得一致的试验结论,能有效应用于水稻基因的相对定量研究。此外本文还比较了三种方法之间的实验限制因子。

1 材料与方 法

1.1 材 料

水稻品种沪早 3 号发芽后,移植于液体培养基(自来水配制 1/5MS 大量元素)。幼苗生长 15 d 后,分别用 3 种不同浓度的 NaCl、 H_2O_2 、水杨酸(SA)和甘露醇处理 1 h,然后剪取叶片,快速投入液氮保存,用于 RNA 的抽提。

1.2 实验方 法

1.2.1 无 DNA 的总 RNA 制备 按上海舜华生物技术有限公司提供的植物叶 RNA 小量抽提试剂盒使用说明书抽提。使用 Beckman Coulter™ DU®640 紫外分光光度计测定 RNA 浓度。为除去残留在 RNA 中的 DNA,每个总 RNA 样品取 5 μ g,加入 1 μ L DNAase I (美国 Invitrogen 公司)和 1 μ L $10\times$ 反应缓冲液,补足体积至 10 μ L,常温反应 30 min,然后每管加入 1 μ L 2 mmol L^{-1} EDTA 终止反应,最后在 70°C 加热 10 min 使 DNAase I 失活。

1.2.2 第一链 cDNA 的合成 将上述 RNA 样品各取 2 μ L,按美国 Promega 公司反转录试剂盒提供的试剂依次添加 4 μ L 25 mmol L^{-1} $MgCl_2$, 2 μ L $10\times$ RT 缓冲液, 2 μ L dNTP 混和液和 1 μ L oligo(dT)₁₅,加水补足体积到 18.5 μ L,在 70°C 加热变性 10 min,快速在冰上冷却。然后加 0.5 μ L RNase inhibitor 和 1 μ L AMVRTase,在 42°C 水浴 60 min,70°C 下加热 10 min 终止反应。

1.2.3 定量 PCR 根据我们从水稻克隆的基因 *O_sRDB1* (GenBank accession No. DQ680143)的序列设计特异性引物 RF: 5'-GCCAGCTGCTTTGCATACCT-3', RR: 5'-TGGATGAAGC AACATATCAGC-3' 用于荧光定量 PCR,根据 *Actin* (GenBank accession No. AY212324)基因的 cDNA 序列设计特异性引物 AF: 5'-CTTCTCATGCGCATCTCG-3', AR: 5'-GCAAGCTTCT CCTTGATCTCC-3' 用于参照基因的荧光定量 PCR。PCR 使用美国 ABI PRISM® 7000 定量 PCR 仪,每一个 PCR 设置一次重复。反应体系包含 SYBR Premix Ex Taq™ ($2\times$) 12.5 μ L,正反向引物各 0.5 μ L,各种处理的 cDNA 模板 1 μ L,加水补足体积至 25 μ L。反应程序为: 95°C 30 s,然后在 95°C 10 s,60°C 35 s 下循环 40 次,设定在每个循环中 60°C 35 s 时读取荧光值,同时进行 ROX 值校正,最后添加荧光 PCR 产物融解曲线分析,其他操作详见仪器使用说明书。为了检测 RNA 样品中是否存在 DNA 的污染,随机选取 3 个样品,各取 1 μ L RNA 作为模板进行 PCR,方法同上。

1.2.4 分析方法 为了构建 *O_sRDB1* 基因 C_t 值标准曲线,选取 200 mmol L^{-1} NaCl(简称 N200)和 100 mmol L^{-1} 甘露醇(简称 M100)处理 1 h 的 cDNA 材料,分别按照 10^{-1} 倍稀释,PCR 程序同上。制作标准曲线时,假定稀释 10^6 倍的

样品中 RNA 起始模板数为 10,其他梯度稀释的样品拷贝数也依次递增,这样可以得到标准曲线的相关参数。 C_t 是通过 7000 System SDS Version 1.2.3 软件在 PCR 的荧光域值通过手工确定为 0.2 后产生的,将数据输入到 Excel 进行计算分析。

1.2.5 定量 PCR 数学计算公式 PCR 指数扩增的公式^[5]是:

$$X_T = X_0(E + 1)^{C_t} = K_X \quad (1)$$

对于同一个基因而言, K_X 是一个常数。达到域值时,PCR 循环数(C_t 值)与起始模板的对数成线性关系。因此,将所研究的基因模板 DNA 量梯度稀释,其浓度的对数与相应的 C_t 值可以作出一条直线,常称为标准曲线(Standard Curve)。PCR 效率与常数 K 可以通过标准曲线的斜率 S (Slope)和截距 I (intercept)计算出来^[9]。

$$E + 1 = 10^{-I/S} \quad (2)$$

$$K = 10^{-I/S} \quad (3)$$

将(2)和(3)代入公式(1),则对于不同处理的材料,靶基因的起始浓度比 $-X_{N_0}/X_{C_0}$ 可以由最终公式(4)计算出来,

$$X_{N_0}/X_{C_0} = 10^{\Delta C_t/S} \quad (4)$$

其中 X_{N_0} 代表经过处理的材料中靶基因的初始分子数, X_{C_0} 代表未经过任何处理的材料中靶基因的初始分子数, ΔC_t 表示在处理 and 未处理材料中靶基因分子达到域值时 C_t 值的差异。由于 I 和 S 是已知的,可以根据标准曲线参数,在不需要了解初始模板分子数的情况下计算处理样品相对于未处理样品的目标基因表达水平。

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 详细的推导过程见文献[6]。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法直接将处理样品和未处理样品进行比较。

$$X_{N_0}/X_{C_0} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (5)$$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法引入看家基因 *Actin*, 以该基因为基础进行各样品中 *O_sRDB1* 相对量的比较。

$$X_{N_0}/X_{A_0} = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t - N - \Delta C_t)} \quad (6)$$

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

分别选取两个处理样品进行梯度稀释,以基因 *O_sRDB1* 进行定量 PCR。系列稀释的 cDNA 模板浓度与 C_t 值的关系曲线见图 1-a 和 b。在初始浓度未知的情况下,无论假定初始浓度为多少,其斜率和截距都是一定的(数据未显示)。N200 和 M100 处理的标准曲线的斜率分别为 -3.192 和 -2.711,两标准曲线的相关系数 R^2 分别为 0.997 和 0.998,反应效率都高于 0.99,说明该体系可以用于荧光定量 PCR 体系。

2.2 定量 PCR 产物特异性

为了提高 PCR 的可靠性和准确性,必须知道 PCR 产物特异性和 PCR 的动力学特征。通过融解曲线分析,发现 *Actin* 基因在 83 ~ 84°C, *O_sRDB1* 基因在 80°C 左右各有单一的峰,见图 2-a 和 b,表明两个基因均被特异扩增。在荧光定量 PCR

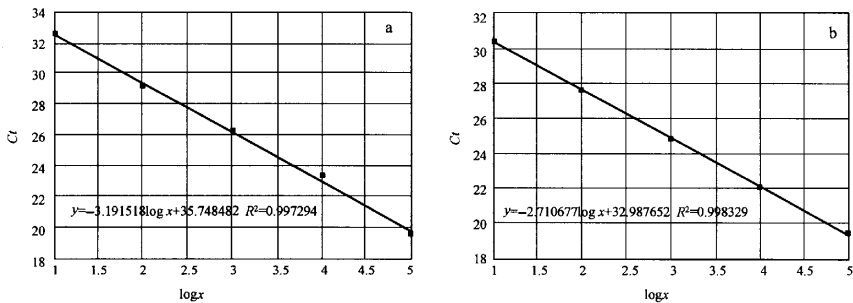


图 1 系列稀释的 cDNA 模板浓度与 Ct 值的标准曲线
 Fig.1 Standard curve between Ct and cDNA templates with gradient dilution
 a: N200 样品的标准曲线; b: M100 样品的标准曲线。
 a: standard curve for N200; b: standard curve for M100.

后,获得了循环数与荧光相对强度的 S 型动力学曲线(见图 3-a 和 b)。无论 *OsRDB1* 还是 *Actin* 基因,其指数扩增期和平台期均十分明显,线性范围广,从 17 ~ 31 个循环都能检测

出,表现为理想的扩增曲线,表明本次 PCR 实验数据足够应用于 *OsRDB1* 基因的相对定量分析。

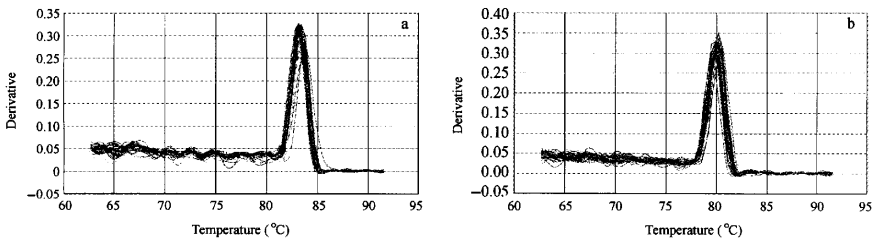


图 2 熔解曲线
 Fig.2 Dissociation curve
 a: *Actin* 基因的熔解曲线; b: *OsRDB1* 基因的熔解曲线。
 a: Dissociation curve of *Actin*; B: Dissociation curve of *OsRDB1*.

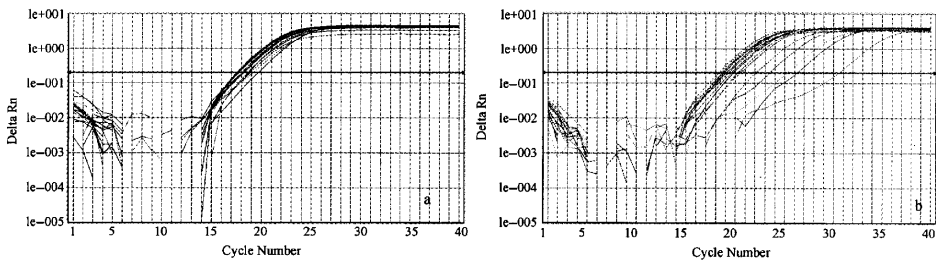


图 3 Real-time PCR 对数曲线
 Fig.3 Logarithmic curve of Real-time PCR
 a: *Actin* 基因的对数曲线; b: *OsRDB1* 基因的对数曲线。
 a: Logarithmic curve of *Actin*; b: Logarithmic curve of *OsRDB1*.

2.3 不同分析方法对 *OsRDB1* 相对定量检测

2.3.1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法和 $2^{-\Delta Ct}$ 法 在水稻基因研究中, *Actin* 基因作为看家基因已经被广泛地应用于基因的相对定量分析^[2,10]。从 *Actin* 基因的溶解曲线和扩增曲线(见图 2-a 和图 3-a), 可以明确该基因进行了有效而准确的扩增, 其 C_t 值柱状图见图 4-a, 平均 C_t 值为 18.15 ± 0.61 , 说明在操作或 RNA 浓度测定中存在误差, 但误差在可接受范围。*OsRDB1* 基因也得到了有效而准确的扩增(图 2-b 和图 3-b), 其与 *Actin* 基因比较的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值[计算公式见(6)]柱状图见图 4-b。无需引入看家基因作为参考, 直接将各种处理样品的 PCR 结果与对

照样品的结果进行比较, 依据计算公式(5), 得到结果见图 4-a。2.3.2 标准曲线法 为了提高研究的可靠性, 分别稀释了两个处理样品, 即 200 mmol L^{-1} NaCl 和 100 mmol L^{-1} 甘露醇处理的样品进行了梯度稀释, 然后采用公式(5)的计算方法, 分别得到 *OsRDB1* 基因在不同处理下的相对表达情况, 见图 4-d 和 e。根据上面分析的结果, 200 mmol L^{-1} H_2O_2 、 0.5 mmol L^{-1} SA 和 500 mmol L^{-1} 甘露醇在处理 1 h 后, 增强该基因的表达, 其中 0.5 mmol L^{-1} SA 效果最好, 其基因的表达量达到原基因表达量的 4~6 倍。但 100 mmol L^{-1} H_2O_2 抑制该基因的表达, 使表达量下降。

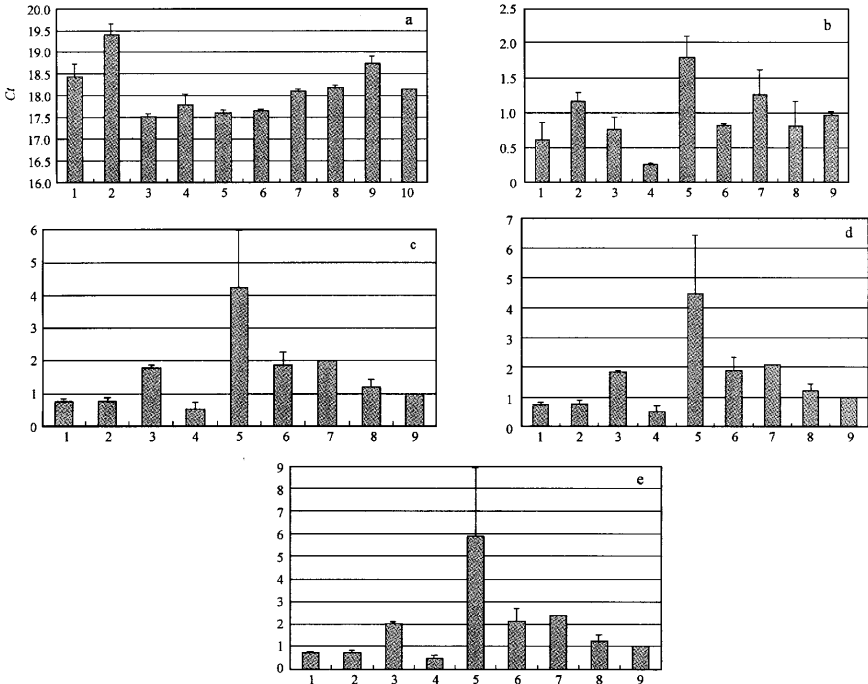


图 4 各种处理后 *Actin* 和 *OsRDB1* 基因的表达值柱状图

Fig. 4 Histogram of *Actin* C_t and *OsRDB1* with treatments

a: 各种处理后 *Actin* C_t 值; b: 各种处理后 *OsRDB1* 基因的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值; c: 各种处理后 *OsRDB1* 基因的 $2^{-\Delta Ct}$ 值; d: 以 200 mmol L^{-1} NaCl 处理样品进行梯度稀释后构建的标准曲线分析值; e: 以 100 mmol L^{-1} 甘露醇处理样品进行梯度稀释后构建的标准曲线分析值。1~9 为各种激素和化学试剂处理 15 d 龄水稻幼苗 1 h 后抽提 RNA 样品。1: 500 mmol L^{-1} NaCl; 2: 200 mmol L^{-1} NaCl; 3: 200 mmol L^{-1} H_2O_2 ; 4: 100 mmol L^{-1} H_2O_2 ;

5: 0.5 mmol L^{-1} SA; 6: 2 mmol L^{-1} SA; 7: 500 mmol L^{-1} 甘露醇; 8: 100 mmol L^{-1} 甘露醇; 9: 未经处理; 10: *Actin* C_t 平均值。

a: C_t of *Actin* with treatments; b: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ histogram of *OsRDB1* with treatments; c: Histogram of $2^{-\Delta Ct}$ for *OsRDB1* gene with treatments; d: the result of standard curve for gradient dilution sample with 200 mmol L^{-1} NaCl treatment; e: the result of standard curve for gradient dilution sample with 100 mmol L^{-1} mannitol treatment. 1~9: indicates different chemical and hormone treatments to 15-day-old rice seedling for 1 h which their RNA were extracted. 1: 500 mmol L^{-1} NaCl; 2: 200 mmol L^{-1} NaCl; 3: 200 mmol L^{-1} H_2O_2 ; 4: 100 mmol L^{-1} H_2O_2 ; 5: 0.5 mmol L^{-1} SA; 6: 2 mmol L^{-1} SA; 7: 500 mmol L^{-1} mannitol; 8: 100 mmol L^{-1} mannitol; 9: control, without any treatment; 10: average of *Actin* C_t .

3 讨论

RT-PCR 检测中一个重要的步骤是确定检测到的信号是来自 RNA 反转录后的 cDNA,而不是来自污染的 DNA。本试验随机选取了 3 个 RNA 样品进行定量 PCR 分析,仪器未检测到荧光信号(数据未显示),故认为从 RNA 中除去污染的 DNA 的方法是有效的,对于本次荧光定量 RT-PCR 实验 RNA 纯度是足够的。依据梯度稀释的 cDNA 样品构建的标准曲线,其线性回归分析后的相关系数 R^2 在 0.99 以上(图 1),说明实验的过程和数据是可信的;熔解曲线分析表明本次 PCR 扩增是特异的(见图 2);其荧光定量动力学曲线是平滑的 S 形,都表明本次 PCR 是成功的,可以应用于该基因的表达分析。本研究表明水稻基因 *OsRDB1* 在不同浓度的 4 种化学物质的处理下的表达水平不同,具有表达量差异。

利用实时定量 PCR 分析基因表达,目前常用的是相对定量法,多采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,如果针对单个基因的表达,可以采用简化的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。 $\Delta\Delta CT$ 方法比标准曲线法有更高的通量^[1],但要求有 100% 扩增效率。如果假设未达要求,将影响其准确性。标准曲线法却不要求这些假设。为了克服两者的缺点,在不需要基因原始拷贝数的情况下构建标准曲线,通过对基因扩增曲线公式进行推算[公式(4)],可以直接使用标准曲线的斜率来计算两者之间的表达差异,从而排除了扩增效率对计算结果的影响。本试验以水稻基因 *OsRDB1* 为研究对象,采用 3 种不同的计算方法分析该基因在两个不同浓度的化学试剂处理 1 h 后基因表达的变化情况。从每一个处理的表达变化趋势来看, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法和标准曲线法之间是一致的,但 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算出来的比值略低于标准曲线法(见图 4-c, d 和 e),主要由于实际的 PCR 扩增中,扩增效率无法达到 100%。从两个处理进行的梯度稀释比较来看,200 mmol L⁻¹ NaCl 处理的梯度稀释样品的扩增效率比 100 mmol L⁻¹ 甘露醇高,其比值更接近标准曲线法结果,更好地印证了上面的推论。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 由于加入了看家基因 *Actin* 作为对照,其计算结果不仅与 *OsRDB1* 扩增效率有关,而且与 *Actin* 基因的扩增效率有关,所以整体的比值都低于 $2^{-\Delta\Delta CT}$,甚至影响到部分处理样品的比值低于对照(图 4-b),导致部分处理的表达变化趋势与另两种方法不一致。这种不一致的原因,部分是由于原始 RNA 总量均一化不够(见图 4-a)。例如 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理样品,可能其总 RNA 低于其他样品,导致利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法和标准曲线法计算处理的结果低于 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。但这几个发生变化的样品,其表达量与未处理样品之间的变化本身就不大,或者是该处理不影响该基因的表达,在分析过程中受到了 RNA

总量均一化不够影响,但对主要的处理诱导趋势不会引起大的变化。

总而言之,这几方法都有其优点。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法可以高通量分析大量基因,但其定量结果受到基因扩增效率的影响,同时引入看家基因,又容易受到看家基因表达本身的影响,增加了分析工作量和成本。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法和标准曲线法都能方便有效而准确地分析基因相对表达量,但其结果容易受到 RNA 总量均一化程度影响,其中 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法还受到基因扩增效率的影响。本试验改进的标准曲线法引入斜率消除扩增效率的影响,在仅只增加 3~4 个 PCR 循环的情况下,能有效检测 PCR 扩增的效率,排除 PCR 扩增效率对计算结果的影响,更加准确地计算出基因的相对表达量,该方法也可以应用于其他物种和基因的相对定量研究。

References

- [1] Chen Y(陈颖), Su N(苏宁), Xu B-L(徐宝梁), Ge Y-Q(葛毅强), Wang S-G(王曙光). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and YieldGard maize. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(6): 602-607 (in Chinese with English abstract)
- [2] Sun S-B(孙淑斌), Li B-Z(李宝珍), Hu J(胡江), Xu G-H(徐国华). Establishment and application of a real-time fluorescence quantitative PCR for detecting transcripts of low abundance gene, *Osa M T₁*; 3, in Rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(11): 8-12 (in Chinese with English abstract)
- [3] Schmittgen T. Real-time quantitative PCR. *Methods*, 2001, 25: 383-385
- [4] Vu H L, Troubetskov S, Nguyen H H, Russell M W, Mestecky J. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(7): e18
- [5] Niesters H G M. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*, 2001, 25: 419-429
- [6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [7] Hattori J, Boutilier K A, van Lookeren Campagne M M, Miki B L. A conserved BURP domain defines a novel group of plant proteins with unusual primary structures. *Mol Gen Genet*, 1998, 259: 424-428
- [8] Yu S, Zhang L, Zuo K, Li Z, Tang K. Isolation and characterization of a BURP domain-containing gene *BnBDC1* from *Brassica napus* involved in abiotic and biotic stress. *Physiol Plant*, 2004, 122: 210-218
- [9] Rutledge R G, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(16): e93
- [10] Kim B R, Nam H Y, Kim S U, Kim S I, Chang Y J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(21): 1869-1872
- [11] Winer J, Jung C K, Shackel I, Williams P M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*, 1999, 270(1): 41-49