

实时荧光定量 PCR 构建绵羊 PrP 基因标准 品质粒和标准曲线

韩彩霞, 赵德明*, 吴长德, 宁章勇, 杨建民, 刘美丽, 马李颖
(中国农业大学动物医学院 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100094)

关键词: PrP; RT-PCR; 实时荧光定量 PCR; 标准曲线; 绵羊

中图分类号: S852.65⁺ 9.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)12-1363-04

羊痒病是一种传染性的致死性神经退行性疾病, 常引起绵羊和山羊发病, 该病在欧洲流行了大约 250 年, 但是它的流行病学和传播机制还不是很清楚^[1-3]。正常的朊蛋白(PrP^C)不能引起神经退行性病变, 虽然目前已经对许多组织的 PrP mRNA 进行了检测, 但是对它的生物学功能还知之甚少, 对 PrP 基因表达的机制尚不清楚^[4]。研究显示, 不同组织来源的细胞中朊蛋白的表达程度差异很大, 主要出现于神经细胞中^[5,6]。PrP^C 在细胞中的高水平表达可促使 PrP^C 向 PrP^{Sc} 转变, 目前的研究中, 对绵羊 PrP mRNA 的转录机制尚未阐释清楚^[1]。因此, 对绵羊外周和中枢系统 PrP mRNA 的表达进行定量, 有助于探讨各组织器官中的 PrP 在羊痒病的发生过程中的作用。

以往的研究中, 主要使用原位杂交或 Northern Blot 分析对 PrP mRNA 进行检测, 这些方法不能对 mRNA 进行定量, 只能对 mRNA 的表达进行定性研究。而实时 RT-PCR 方法的建立解决了这些问题, 并且已应用于 PrP mRNA 定量分析^[7]。实时荧光定量 PCR 精确定量的前提是构建标准品质粒和标准曲线, 这样才能对未知模板进行准确的定量分析^[8]。鉴于 PrP 基因在外周和中枢系统表达谱和表达量的研究对于羊痒病病理发生具有重要意义, 本研究构建了实时荧光定量 PCR 检测绵羊 PrP 基

因表达标准品质粒和标准曲线, 为阐释羊痒病发生的分子机理奠定基础, 从而为进一步研究朊蛋白疾病的发病机理提供有力的工具。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 动物和宿主菌 绵羊, 购自内蒙古北方地区; 宿主菌 JM109 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 TRIZOL RNA 提取试剂盒 (Gibco 公司)、dNTPs (TaKaRa 公司)、Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司)、M-MLV 反转录酶 (Promega 公司)、DEPC (Promega 公司)、RNASE-OUT[®] Ribonuclease (Promega 公司)、SYBR[®] Green qPCR Kit (FINNZYMES 公司)、EcoRI (TaKaRa 公司)、质粒快速提取试剂盒 (博大泰克公司)、pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega 公司)、E. Z. N. A[®] Gel Extraction Kit (Promega 公司)、PCR 仪 (PTC-150 型, MJ Research 公司)、实时荧光定量 PCR 仪 (OPTICON 2 型, MJ Research 公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织 RNA 提取 绵羊屠宰后, 立即取大脑、小脑、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、淋巴结, 液氮速冻, 然后转入到 -86 °C 超低温冰箱内。称取 100 mg 组织, 用 TRIZOL RNA 提取试剂盒按照文献 [9] 进行。提取的 RNA 用 30 μL DEPC 处理的灭菌三蒸水溶解, -86 °C 保存备用。

1.2.2 组织总 RNA 的 RT-PCR

1.2.2.1 引物设计: 根据已经发表的绵羊 PrP 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号为 AY585240), 分析并选择其保守序列区段, 利用 Primer5.0 软件, 设计并合成 1 对特异性引物, P₁: 5' - GGTCAAG-GTGGTAGCCACAGTCAGTGGAAAC-3', P₂: 5'-

收稿日期: 2004-12-22

基金项目: 国家自然科学基金 (30371062; 30400325); 教育部博士点基金 (20020019006)

作者简介: 韩彩霞 (1976-), 女, 内蒙人, 博士生, 主要从事分子病理学研究。E-mail: hancaxia01@cau.edu.cn; Tel: 010-62732980

* 通讯作者: 赵德明 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 国家动物传染性海绵状脑病实验室主任, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn; Tel: 010-62732980

AGCCTGGGATTCTCTCTGGTACTGGGTGAT-3', 扩增片段长度为 402 bp (278~ 680 bp)。

1.2.2.2 反转录(RT)合成 cDNA: 取 RNA 5 μ L, 加入 10 mmol/L dNTPs 1 μ L、Oligo (dT)₁₈ (20 pmol/L) 1 μ L、DEPC 处理灭菌三蒸水 7 μ L 置于 PCR 仪 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 迅速置冰上 5 min, 然后加入 RT 反应液 6 μ L, 其中 5 \times buffer 4 μ L、RNasin 1 μ L (40 U/ μ L)、M-MLV 反转录酶 1 μ L (200 U/ μ L), 于 PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 70 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

1.2.2.3 常规 PCR: 总体积 25 μ L, 体系组分为: 10 \times buffer 2.5 μ L、dNTPs 2 μ L、P₁ 和 P₂ (25 pmol/L) 各 0.5 μ L、Ex Taq 酶 0.2 μ L、cDNA 2 μ L、灭菌三蒸水 17.3 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.2.3 重组标准品质粒制备

1.2.3.1 PCR 产物纯化: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 割胶后按照 E. Z. N. A[®] Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 扩增片段进行纯化、回收。

1.2.3.2 PCR 产物与载体连接、转化: 按照 pGEM[®]-T Easy Vector Systems 试剂盒的说明书将纯化产物与 pGEM[®]-T 载体在 T₄DNA 连接酶作用下进行连接反应, 构建扩增产物的重组质粒。连接体系为 10 μ L, 其反应组分为: pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng) 1 μ L、PCR 纯化产物 3 μ L、T₄DNA 连接酶 1 μ L、连接酶 buffer 1 μ L、灭菌三蒸水 4 μ L。将连接体系置于 4 $^{\circ}$ C 水浴中过夜。将连接体系加入到 200 μ L 感受态大肠杆菌 JM 109 中, 经热激转化后, 加入 800 μ L Amp⁻ LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 活化 1 h, 低速离心, 涂于 Amp⁺、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑取单个白色菌落, Amp⁺ LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡过夜培养。

1.2.3.3 重组质粒的提取和鉴定: 按照质粒快速提取试剂盒的操作要求对经 Amp⁺ LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡过夜培养的大肠杆菌进行重组质粒 DNA 提取, 对提取的质粒 DNA 进行重组质粒 PCR、酶切和测序鉴定。

1.2.3.4 重组质粒定量标准曲线的建立: 测定阳性重组质粒的 OD 值, 计算出拷贝数。将标准品重组质粒进行 10 倍系列稀释, 以系列稀释的质粒为模板在实时荧光定量 PCR 仪上扩增。反应为 25 μ L 体系, 反应组分为: Mix 12.5 μ L、P₁ 和 P₂ (25 pmol/L)

各 0.2 μ L、重组质粒 DNA 2 μ L、灭菌三蒸水 10.1 μ L。反应条件与常规 PCR 条件相同, 在每个循环内加入读板步骤, 总延伸结束后, 加入溶解曲线的制备 (65~ 95 $^{\circ}$ C 范围内, 每 0.2 $^{\circ}$ C 读板一次) 步骤。反应结束后, 计算机自动得到标准曲线。

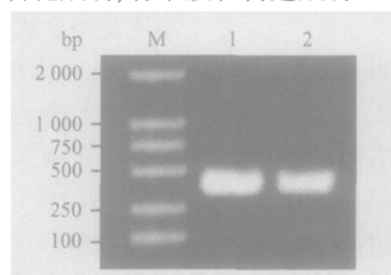
2 结果

2.1 组织 RNA 提取和目的基因片段的扩增

组织提取的总 RNA 紫外分光 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~ 2.0 之间, 电泳结果表明 RNA 分子保持完整。经 RT-PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得大约 400 bp 左右的目的条带。序列测定表明, 获得的目的条带同原始序列的同源性为 100%。

2.2 标准模板的鉴定

对重组质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得 400 bp 左右片段, 和组织 mRNA 经 RT-PCR 扩增片段大小一致 (见图 1)。对提取的重组质粒 DNA 进行 EcoRI 酶切, pGEM[®]-T 载体有 2 个 EcoRI 酶切位点, 因此相当于双酶切, 酶切鉴定的结果如图 2 所示。对重组质粒 DNA 的测序结果经 Pubmed blast 分析, 插入 DNA 片段的序列与原始序列片段的同源性达到 100%, 说明所插入的外源基因为目的基因片段, 即质粒连接、转化成功, 标准质粒构建成功。



M. Marker DL-2000; 1、2. 重组质粒的 PCR 扩增片段

M. Marker DL-2000; 1 and 2. PCR products

图 1 重组质粒的 PCR 扩增

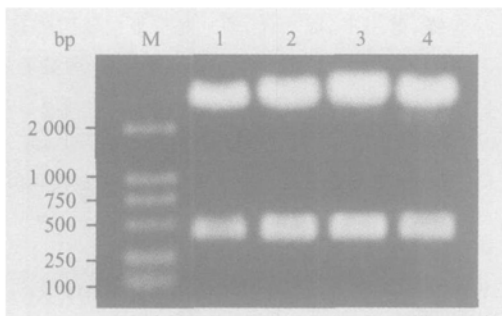
Fig. 1 PCR detection of plasmid

2.3 定量标准曲线的构建

将重组标准品质粒测 OD 值定量后, 对此质粒 10 倍系列稀释, 进行实时荧光定量 PCR 扩增反应, 反应结束后系统根据荧光值的变化规律, 自动生成起始模板数扩增反应的动力学曲线 (见图 3)。

2.4 标准回归曲线的建立和回归方程的设定

对重组质粒 10 倍系列稀释, 实时荧光定量



M. Marker DL-2000; 1~ 4. 重组质粒的 *EcoRI* 酶切片段
M. Marker DL-2000; 1, 2, 3 and 4. Product digested by *EcoRI*

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Recombinant T-easy-vectors digested by *EcoRI*

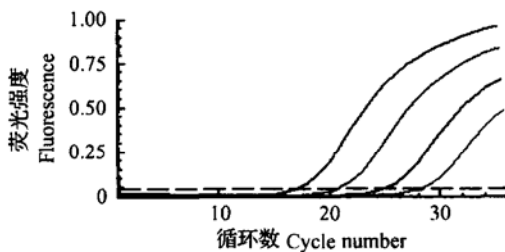
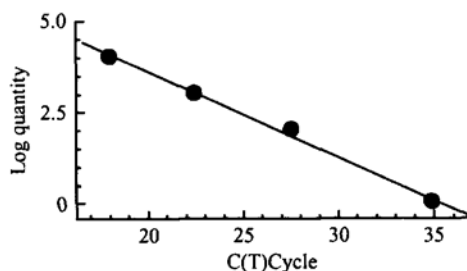


图 3 定量标准曲线

Fig. 3 The quantitative standard curve of Real-time RT-PCR

PCR 扩增后, 根据荧光值的变化规律, 通过基线设定, 系统自动生成(见图 4)。由回归曲线看出, 起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系, 相关系数 $r^2 = 0.997$ 。根据 10 次重复反应的数值, 运行实时荧光定量 PCR 仪上的自动分析过程, 系统生成的回归方程为: $y = -0.23x + 8.27$ 。



横坐标是 Ct 值, 纵坐标是起始拷贝数的对数

图 4 回归曲线

Fig. 4 Real-time RT-PCR amplification standard curves

2.5 溶解曲线分析

经系统自动分析, 产物的 T_m 值非常均一, 为 83.5°C (见图 5), 说明产物特异。

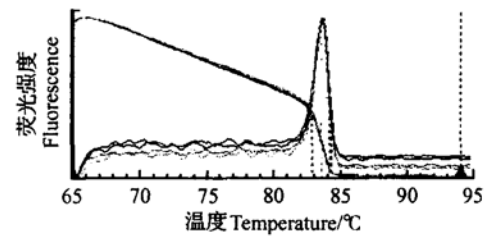


图 5 溶解曲线

Fig. 5 Real-time RT-PCR amplification melting curves

3 讨论

传统的 RT-PCR 方法常被用于 mRNA 转录的检测, 但此方法是非定量的^[10]。近年来出现的实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR) 技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 采用实时荧光定量 PCR 技术可以在 PCR 反应的过程中实时地检测其产物, 并可在反应处于指数期时对 PCR 产物的量进行检测, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析^[11, 12]。实时荧光定量 PCR 准确检测样品的前提是构建重组标准品质粒和制定标准曲线。本研究采用绵羊组织的 mRNA 经 RT-PCR 扩增后, 将扩增产物回收纯化后, 用 T₄DNA 连接酶与 pGEM[®]-T 载体连接, 将连接产物转化到感受态大肠杆菌 JM 109, 挑取单个白色菌落, 提取质粒 DNA, 经质粒 PCR 扩增、酶切和测序鉴定证实重组质粒构建成功。成功构建的标准品质粒和标准曲线是 mRNA 表达水平定量的基础, 对绵羊的各组织器官中的 PrP 进行定量, 进而确定 PrP mRNA 表达的水平, 为研究羊痒病的分子发病机理奠定基础, 同时为研究朊病毒病的发病机理提供了一种新的研究手段。

在 real-time Q-PCR 中, 对整个 PCR 反应扩增过程进行了实时的监测和连续分析扩增相关的荧光信号, 随着反应时间的延伸, 监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小^[11]。

本研究中的 Ct 值相对固定, 重复性好, 以不同浓度标准品质粒 DNA 分别进行荧光定量 PCR 扩增, 发现起始浓度越高, Ct 值越小, 即起始模板浓度与 Ct 值之间呈良好的线性关系, 与文献报道一致。利用已知起始拷贝数的标准品质粒可做出标准曲线, 因此只要获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准

曲线上计算出该样品的起始拷贝数。本研究中,通过10倍系列稀释标准品质粒浓度所得到的Ct值绘制的标准曲线的相关系数高达0.997,能够保证数据的精确性。根据回归方程,计算机可直接计算出各样品模板的初始含量。

参考文献:

- [1] Kubosaki A, Ueno A, Matsumoto Y, et al. Analysis of prion protein mRNA by *in situ* hybridization in brain and placenta of sheep [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 273(3): 890~ 893.
- [2] Brandsma J H, Janss L L G, Visscher A H. Association between PrP genotypes and litter size and 135 days weight in Texel sheep [J]. *Livestock Production Science*, 2004, 85: 59~ 64.
- [3] Skretting G, Espenes A, Ulvund M J, et al. cDNA representational difference analysis of ileal Peyer's patches in lambs after oral inoculation with scrapie [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 316: 272~ 279.
- [4] Kniazeva M, Orman R, Terranova V P. Expression of PrP mRNA is regulated by a fragment of MRP8 in human fibroblasts [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 234: 59~ 63.
- [5] Baybutt H, Manson J. Characterization of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neural cells [J]. *Gene*, 1997, 184: 125~ 131.
- [6] 孙宪锋,董小平,周伟,等.人朊蛋白基因外显子I及其上游序列具有启动子样活性[J].*中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, 14(4): 305~ 308.
- [7] Tichopad A, Pfaffl M W, Didier A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17: 5~ 10.
- [8] Walker N J. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2001, 15(3): 121~ 127.
- [9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1997, 162: 156~ 159.
- [10] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 278: 261~ 269.
- [11] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream [J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30: 503~ 512.
- [12] Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills A G, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 285: 194~ 204.

Construction of Sheep PrP Gene Standard Plasmid DNA and Curve Using Real-time RT-PCR

HAN Ca-xia, ZHAO De-ming*, WU Chang-de, NING Zhang-yong,

YANG Jian-min, LIU Mei-li, MA Li-ying

(National Laboratory for Transmissible Spongiform Encephalopathy, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Here we report the construction of sheep PrP gene standard plasmid DNA and curve using real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from each sample and the fragments of target gene were amplified by RT-PCR. The plasmid was constructed for calibrating unknown samples. In this study, the constructed plasmid containing only the target gene was used to construct a calibration curve. The absolute standard curve method was shown to be of high linearity, sensitivity and reproducibility. The purpose of this study is to investigate the quantification of PrP mRNA expression for knowing the scrapie pathogenesis and providing powerful tool for further studies on prion diseases pathogenesis.

Key words: PrP; RT-PCR; real-time quantitative PCR; standard curve; sheep

* Corresponding author