

獐茅 *AlHAK1* Real-time PCR 定量方法的建立

王 兰, 苏 乔

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁大连 116024)

摘 要:以 β -actin 为内参基因, 根据已克隆的 *AlHAK1* 及 β -actin 碱基序列, 分别设计了实时定量特异性引物, 优化了反应的退火温度与引物浓度, 并以优化的条件建立了相对定量标准曲线, 同时对该方法的稳定性进行了评价。结果表明 *AlHAK1* 及 β -actin 基因的 real-time PCR 扩增效率分别为 1.09 和 1.04, 线性相关系数分别为 0.996 和 0.997, 批内及批间变异系数 $<5\%$ 。所建立的 *AlHAK1* real-time PCR 定量方法操作简便、定量准确、重复性好, 为进一步探索 *AlHAK1* 的功能、mRNA 表达水平的变化及转 *AlHAK1* 农作物的检测奠定了方法学基础。

关键词: 獐茅; *AlHAK1*; real-time PCR; mRNA

中图分类号: Q-33 **文献标识码:** A

Establishment of Real-time PCR Assay for Quantitative Analysis of *AlHAK1*

Wang Lan, Su Qiao

(Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian Liaoning 116024)

Abstract: According to the sequences of *AlHAK1* and β -actin (as a reference control), two sets of primers were designed. Subsequently, PCR conditions, including annealing temperature and concentration of primers were optimized. Relative quantitative standard curves were established and the repeatability of the assay was also evaluated. The results show that PCR efficiency of *AlHAK1* and β -actin was 1.09 and 1.04, respectively. The correlation coefficient was 0.996 and 0.997, respectively. Intra-assay and inter-assay coefficient variation for both genes were less than 5%. The real-time PCR for *AlHAK1* established in this study is simple, precise and repeatable for relative quantifying gene, and will provide useful methodological basis for understanding functions of *AlHAK1*, clarifying relationship between mRNA expression levels and detecting the expression level of transgenic crops.

Key words: *Aeluropus littoralis*, *AlHAK1*, Real-time PCR, mRNA

KUP/HAK/KT 是一个大的基因家族, 其众多成员广泛分布在植物的不同器官和组织中, 其中一些在特定的部位和发育时期表达, 绝大多数被证明为高亲和 K^+ 转运体, 受 K^+ 饥饿的诱导, 其作用是吸收 K^+ 并在植物不同部位和组织间分配, 是植物中负责 K^+ 吸收转运的一个重要系统^[1-3], 另一方面盐生植物中的 KUP/HAK/KT 家族可能在盐胁迫及低钾条件下更好地保持植物较高的 K^+ 吸收水平, 维持植株高 K^+/Na^+ , 提高植物

耐盐性^[4-6]。

AlHAK1 属于 KUP/HAK/KT 基因家族, 从盐生植物獐茅 (*Aeluropus littoralis*) 中克隆获得。它在异源表达系统酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* strain WΔ3) 中介导高亲和性钾离子吸收, 并且对 300 mmol/L 钠离子不敏感^[6]。因此研究 *AlHAK1* 的表达对于了解其在钾素营养和耐盐机制中的作用有着十分重要的意义。目前对植物基因进行定量分析的手段主要有 RT-PCR、

基金项目: 辽宁省科技攻关项目“农业生物技术”(2006208001)。

第一作者简介: 王兰, 女, 1983 年出生, 硕士研究生, 主要从事植物基因克隆及其表达调控的研究。通信地址: 116024 辽宁省大连市 大连理工大学环境与生命学院生化楼, Tel: 0411-84706356, E-mail: wanglan0714@163.com。

通讯作者: 苏乔, 女, 1971 年出生, 博士, 副教授, 从事植物基因工程研究。Tel: 0411-84706356, E-mail: dsuqiao@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2009-02-20, **修回日期:** 2009-03-22。

Northern Blot、基因芯片等方法。然而,这些方法存在着定量不准确、操作繁琐或费用较高等缺点。因此,建立一种定量准确、经济适用的分析方法是必要的。实时荧光定量 PCR(real-time PCR)是 20 世纪 90 年代发展起来的新技术,能对 mRNA 表达水平进行准确的定量分析^[7]。该研究旨在建立獐茅 *AlHAK1* Real-time PCR 定量基因表达的方法,以管家基因 β -actin 为内参,为进一步探索 *AlHAK1* 的功能、mRNA 表达水平的变化及转 *AlHAK1* 农作物的检测提供方法学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 獐茅 (*Aeluropus littoralis* var.*snensis* Debeaux)采自辽宁省大连市营城市镇海边盐碱地,种植于温室内,用 1/2 Hoagland 营养液浇灌处理。实验前用含 0.4 mol/l NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液处理 24 h。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂盒、DEPC、反转录试剂盒、回收试剂盒、LA *Taq*、Ex *Taq*、SYBR Premix Ex *Taq*、DNA Marker 均为 TaKaRa(大连)公司产品;氯仿、无水乙醇等均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 TP600 型 PCR 仪为大连宝生物公司产品;Rotor-Gene 3000 型荧光定量 PCR 仪为澳大利亚 Corbett Research 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 管家基因 β -actin 的 PCR 克隆 根据大麦、玉米等单子叶植物 β -actin 基因序列,设计 PCR 克隆的上、下游引物,分别为 AF 5'-CTCGACTCTGGTGATGGTGTG-3' 和 AR 5'-TCGTACTCCGCCTTGGAGAT-3'。以提取的獐茅总 RNA 为模板(500 ng),按照大连宝生物公司反转录试剂盒要求进行 RT-PCR 反应。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 min,循环 35 次;72 ℃ 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,小量胶回收试剂盒回收 PCR 产物,送大连宝生物工程有限公司测序。

1.2.2 Real-time PCR 引物 根据獐茅 *AlHAK1* 基因(GenBank DQ645465)和獐茅 β -actin 基因的碱基序列,由大连宝生物公司设计引物,利用软件 Primer5.0、BLAST、Clustalx 评价了引物对的 T_m 值、自身及引物间配对情况,最终确定的引物见表 1。

表 1 实时定量所用引物

Primer Name	Sequence	Product Length
HAK1-F	5'-TTTGCTCCTGTCATCTCGTTGT -3'	141bp
HAK1-R	5'-TCCATCCTTCCCGTTCCTC -3'	
Actin-F	5'-CAGCAGCATGAAGGTGAAGG -3'	150 bp
Actin-R	5'-GACAGCAAAGGAACCAAGAAACA -3'	

1.2.3 RNA 提取 取新鲜的獐茅叶片 100 mg,根据 TaKaRa 推荐的 RNAiso Plus 说明书中的方法提取 RNA。RNA 溶于 DEPC 水,经紫外分光光度计分析结合 1% 琼脂糖凝胶电泳确定浓度和质量后,利用 PrimeScriptTM RTase 反转录酶进行 RT-PCR 反应,10 μ l 反应体系包括:500 ng 总 RNA,5 \times buffer 2 μ l,反转录酶 0.5 μ l, Oligo (dT) 25 pmol, Random 6 mers 50 pmol; 反应条件为 37 ℃ 15 min。剩余 RNA -70 ℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 反应体系的优化 采用 SYBR Green I 法,在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析,以得到最小 C_r 值和最大荧光值(ΔRn)为标准,分别对退火温度、引物浓度进行优化,并同时对照溶解曲线进行分析。

1.2.5 标准品的制备及扩增效率评价 使用 EASY Dilution 将 cDNA 溶液进行连续 10 倍稀释,以各稀释浓度为模板,采用优化的反应条件进行 real-time PCR,分别绘制两基因的相对定量标准曲线,并根据曲线斜率对各自的 PCR 扩增效率进行计算。

1.2.6 稳定性评价 对同一个 cDNA 样品及 1 个阴性对照样品(无模板)在同一次扩增中进行 3 次 *AlHAK1* 含量重复测定,计算每个样品反应管之间的变异系数(CV%);对同一样品进行 3 次测定(各相隔 3 天),计算同一样品多次测定结果之间的变异系数(CV%)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增獐茅 β -actin 基因

根据大麦、玉米等单子叶植物 β -actin 保守序列设计引物(AF/AR),以獐茅总 RNA 反转录生成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得的产物长度为 714 bp(如图 1),该序列已登陆 GenBank 数据库,注册号为 FJ603097。该基因序列与 *Zea mays*、*Hordeum vulgare*、*Mycosphaerella graminicola*、*Lolium perenne*、*Magnolia denudata*、*Gossypium hirsutum* 的 β -actin 序列同源性分别达到 89%、84%、83%、82%、80%、79%。

2.2 RNA 纯度和完整性分析

对提取獐茅总 RNA 经分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0。经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,28S、18S 条

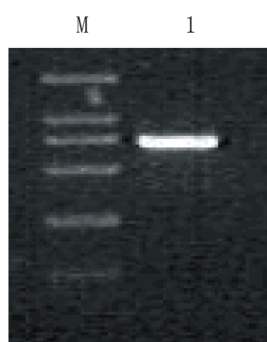


图1 β -actin的PCR扩增

M: DL2000 Marker; 1: β -actin PCR 扩增产物

带清晰可见,无明显降解(如图2)。

2.3 PCR反应体系的优化

按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂(TaKaRa 公司)推荐的体系,反应条件如下:95 °C、10 s;95 °C、5 s,60 °C、20 s 反应35个循环,电泳结果表明,两对引物均可以扩增出单一条带,没有可见的非特异扩增条带(图3)。

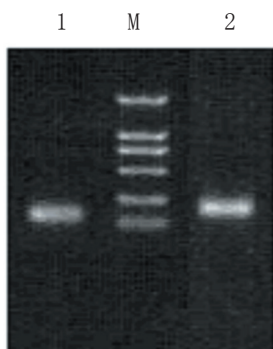


图3 实时定量引物特异性检测

M: DL2000 Marker; 1: *AlHAK1* PCR 产物; 2: β -actin PCR 产物

为了找到最佳的退火温度,在计算得到的 T_m 值上下范围内(55~63 °C)优化退火温度,图4表明 β -actin 温度较低时有弥散条带产生,而 *AlHAK1* 退火温度较高时扩增产物亮度降低,所以选定 58 °C 和 60 °C 进行优化。根据 TaKaRa PCR 反应条件可知,适当延长退火/延伸时间或采用三步法,可改善扩增效率。采用三步

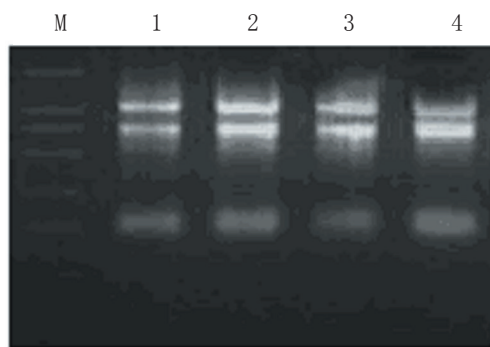


图2 獐茅总 RNA 电泳图谱

M: DL2000 Marker; 1-4: 獐茅总 RNA

法且退火温度为 58 °C 时,反应的特异性不好(图片未给出);由图5可见 β -actin 以 60 °C 为退火温度,退火时间延长至 30 s 时,扩增曲线的荧光信号值较强, *AlHAK1* 以 60 °C 为退火温度,退火时间延长至 30 s 时,具有相同的趋势。

对于 Real Time PCR 反应来说,引物浓度是影响 PCR 反应的关键因素之一:其浓度太低,会致使反应不完全;若引物浓度太高,则发生错配以及产生非特异的产物的可能性会大大增加。对2个引物浓度条件下定量扩增反应 C_T 值进行了分析,结果表明:当模板量一定,引物浓度为 0.25 μ m、0.5 μ m 时, *AlHAK1* 的 C_T 值分别为 18.42、18.53, β -actin 的 C_T 值分别为 18.28、18.31,表明在该实验条件下, *AlHAK1* 和 β -actin 的适宜引物浓度为 0.25 μ m。

2.4 熔解曲线分析

对于以 SYBR Green I 为基础的 real-time PCR 反应而言,PCR 产物的特异性对于实验结果有至关重要的影响。通过熔解曲线分析,可以确定可能伴随特异性产物扩增而出现的非特异性扩增产物。将 SYBR green I 实时定量 RT-PCR 的反应产物,从 60 °C 缓慢而均匀地升温至 95 °C,产生熔解曲线(melting curve)。结果表明扩增产物具有良好的特异性,熔解曲线特异峰出现在 85 °C 附近,没有非特异峰的出现(图5-D)。

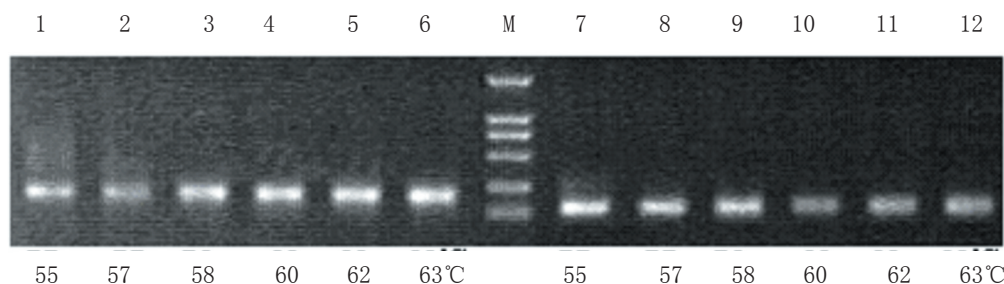


图4 实时定量引物退火温度优化

M: DL2000 Marker; 1~6: β -actin PCR 产物; 7~12: *AlHAK1* PCR 产物

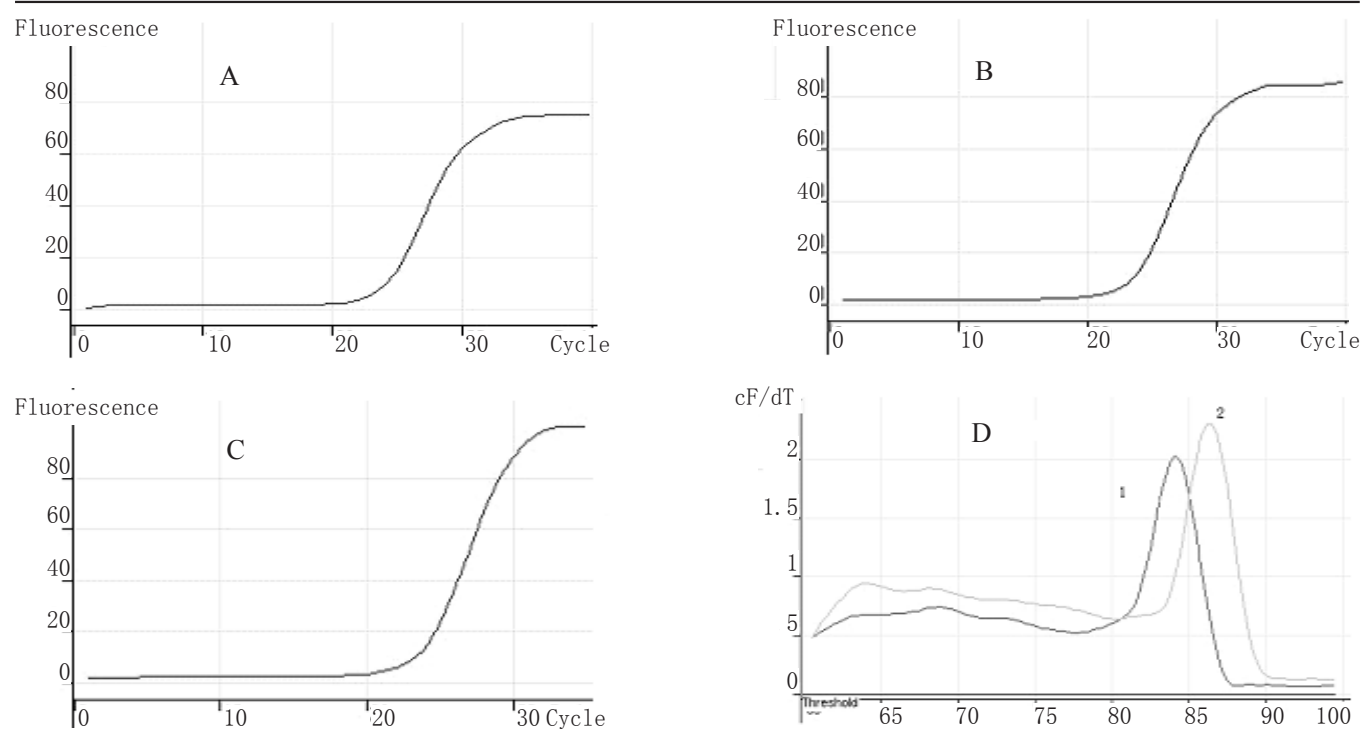


图5 β -actin 的扩增曲线及 β -actin 和 *AlHAKI* 熔解曲线

A: 58 °C、20 s; B: 60 °C、20s; C: 60 °C、30 s; D: Melting curve; 1: *AlHAKI* 的熔解曲线; 2: β -actin 的熔解曲线

2.5 标准曲线扩增效率评价

样品 cDNA 在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪上进行实时定量扩增, 最后得到了一系列反映核酸扩增过程的 S 形荧光定量动力学曲线; NTC 因为没有模

板, 也不产生引物二聚体, 一直是水平线。系列浓度稀释的 cDNA 标准模板与 C_T 值的关系曲线见图 6。 *AlHAKI* 和 β -actin 标准曲线的扩增效率分别为 1.09 和 1.04, 线性相关系数分别为 0.996 和 0.997。

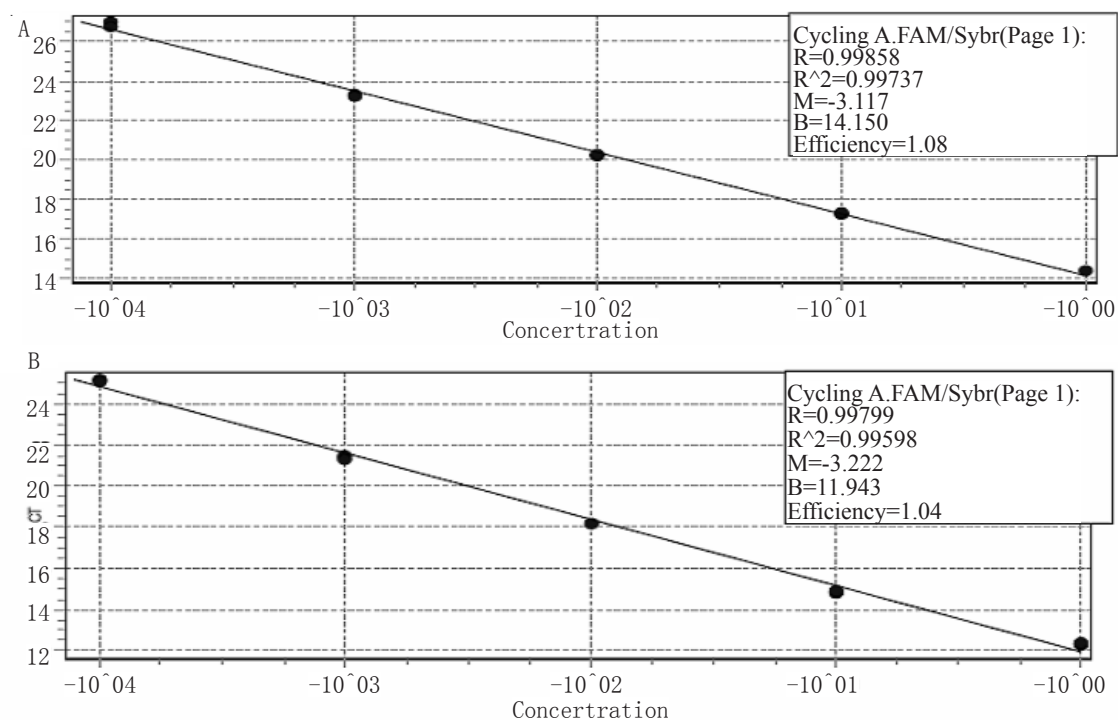


图6 *AlHAKI* 和 β -actin 的标准曲线

A: *AlHAKI* 的标准曲线; B: β -actin 的标准曲线

2.6 检测优化体系的重复性

为了验证优化体系的重复性,笔者对同一处理同一浓度的cDNA样品重复检测*AtHAK1*含量3次,得到的 C_T 值分别为18.14、18.43、18.23,其平均值($\bar{x} \pm s$)为 18.27 ± 0.15 ,变异系数为0.81%。对同一cDNA样品进行3次测定(各相隔3天),批间得到的 C_T 值分别为18.51、18.23、18.79,其平均值($\bar{x} \pm s$)为 18.51 ± 0.28 ,变异系数为1.51%。

3 讨论

SYBR Green I是一种只与双链DNA小沟结合的染料,当它与DNA双链结合时,发出荧光;当它从DNA双链上释放出来时,荧光信号急剧减弱。这样,在一个体系内,其信号强度代表了双链DNA分子的数量。因此,SYBR Green I荧光染料方法可以实现其对特异性产物的鉴别和定量^[8]。SYBR Green I技术的实时定量PCR是目前定量检测核酸较准确的一种方法^[9]。

笔者主要采用了带有SYBR Green I染料的real-time PCR技术来测定*AtHAK1*的表达状况。以管家基因 β -actin为内参,按照Livak和schmittgen设计的比较阈值法来测定目的基因的相对表达,使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量,较为简便、省时和可靠^[10]。但是,SYBR Green I对双链DNA的结合是非特异性的,PCR中的非特异性扩增产物,特别是引物二聚体也会产生荧光信号并严重干扰对目的基因的定量^[11-12]。要避免这种不利因素,可以通过选择良好的引物及合适的引物浓度,并优化反应条件来解决。实验得出的适宜引物浓度为0.25 μ m,退火温度为60 $^{\circ}$ C,退火/延伸时间为30 s。熔解曲线分析表明没有非特异性产物的干扰,从而保证了实验结果的可靠性。

评价标准曲线的优劣有两个指标,即相关系数和斜率,相关系数反映标准曲线的直线性,理想值应大于0.98,越接近1,说明直线性越好,定量越准确。该实验的标准曲线相关系数为0.996和0.997,表明实验结果可信度高,误差小;扩增效率可以由斜率计算得出,理想的扩增效率 $0.8 < E < 1.2$,该实验的扩增效率为1.09和1.04,两基因的扩增效率很接近,所以在进行相对定量分析时可采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行计算^[10],保证了定量分析的准确性。

另外,笔者采用两步法进行检测,RT-PCR产生的

cDNA可以用于许多实验,从而减少了RNA的提取次数,同时将得到的cDNA稀释后扩增,可以降低体系内抑制物质的作用,提高扩增质量,减少引物二聚体的形成。

笔者建立的獐茅*AtHAK1* real-time PCR定量方法具有扩增效率高,特异性强,可重复性好的特点,为下一步研究獐茅*AtHAK1*表达调控及耐盐机制奠定了基础。

参考文献

- [1] HUI HUA FU, SHENG LUAN. AtKUP1: a dual-affinity K^+ transporter from *arabidopsis*. The Plant Cell, 1998, 10(1):63-73.
- [2] RIGAS S, DEBROSSES G, HARALAMPIDIS K, et al. *TRHI* encodes a potassium transporter required for tip growth in *arabidopsis* root hairs. Plant Cell, 2001, 13:13-151.
- [3] ELUMALAI Rangasamy P, NAGPAL Punita, REED Jason W. A mutation in the *arabidopsis* KT2/ KUP2 potassium Transporter gene affects shoot cell expression. The Plant Cell, 2002, 14(1):119-131.
- [4] Su H, Gollack D, Zhao C.S. et al, The expression of HAK-type K^+ transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. Plant Physiol, 2002, 129:1482-1493.
- [5] Blanca G, Begona B, Alonso RN. Molecular cloning and functional expression of potassium transporters *CnHAK1* and *CnHAK2* of the seagrass *Cymodocea nodosa*. Plant Mol. Biol., 2002, 50: 623-633.
- [6] Qiao Su, Shuyang Feng, Lijia An, et al. Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a K^+ transporter, *AtHAK1*, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus litoralis*. Biotechnol Lett, 2007, 29(12):1959-1963.
- [7] Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. Biol Proced Online, 2006, 8(1):1-10.
- [8] Yin JL, Shackel Na, zekry A, et al. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. Immunol Cel Biol, 2001, 79:213-221.
- [9] Valasek M A, Repa J J. The power of real-time PCR. Advan Physiol Educ, 2005, 29:151-150.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Methods, 2001, 25:213-221.
- [11] Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al. The elimination of Primer-dimer accumulation in PCR. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3235-3241.
- [12] Halford WP, Falco VC, Gebhardt BM, et al. The inherent quantitative capacity of the reverse transcription-polymerase chain reaction. Anal Biochem, 1999, 266:181-191.