

参 考 文 献

- 1 Collins F S, Patrinos A, Jordon E, *et al.* New goals for the U. S. human genome project: 1998 ~ 2003. *Science*, 1998, **282** (5389): 682~ 689
- 2 Rychlik W, Spence W J, Rhoach R E, *et al.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acids Res*, 1990, **18** (21): 6409~ 6412
- 3 曾昭钧. 均匀设计及其应用. 沈阳: 辽宁人民卫生出版社, 1994. 1~ 219
Zeng Z J. Uniform Design and Its Application. Shenyang: Liaoning People's Health Press, 1994. 1~ 219
- 4 Schachter F, Faure Delanef L, Guenof F, *et al.* Genetic associations with human longevity at the Apo E and AEC-loci. *Nature Genetics*, 1994, **6** (1): 29~ 32
- 5 Finckh U, Rolf A. PCR optimization strategies. In: Boehringer Mannheim ed. PCR Application Manual. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, 1995. 36~ 41

Optimization of the Amplified Conditions for Human Apo E Gene Fragment by Uniform Design.

ZHU Bin, WANG Guo-Quan, CHEN Jian
(Pharmacy College, Xinjiang Medical University,
Urumuqi 830054, China).

Abstract PCR is now one of the key procedure in the field of molecular biology, but too many things affect the PCR result. Sometimes, a lot of PCR optimization experiments must be done before satisfactory results are obtained. So an optimization project with minimum times of test is needed. Uniform Design is what can meet this requirement. For 244 bp fragment in human apo E gene, the optimization of the amplified conditions included concentration of Mg^{2+} , concentration of DMSO, denature time, annealing temperature, elongation time, number of cycles based on Uniform Design was reported. The results show that a set of PCR conditions with specific, high yield amplified product can be obtained for purified template or simple-treated template by 6~ 10 times of optimization experiment. The Uniform Design is useful for the optimization of PCR conditions.

Key words uniform design, PCR, gene, apo E, optimization

定量 RT-PCR 中人干细胞因子的 RNA-CRS 的构建*

谭文斌 聂怡玲 罗赛群 郭小珊 成光杰 陈汉春 朱定尔¹⁾

(湖南医科大学分子生物学研究中心, 长沙 410078)

摘要 一种适用于定量 RT-PCR、用 Exonuclease III 部分酶切剔除技术, 构建人干细胞因子 (hSCF) 基因的 RNA 竞争性参考标准 (RNA-CRS) 的新方法: 用 RT-PCR 技术, 从 HepG2 细胞中扩增出全长人 hSCF cDNA, 并克隆入质粒 pGEM-T 获重组的 pGEMSCF 载体, 经 Exonuclease III 和 S1 核酸酶适当处理, 以导致 hSCF cDNA 中一小片段缺失, 由此获得重组 pGEMSCF 模拟体 (mimic), 经体外转录得到 hSCF RNA-CRS. 测序表明: 该 RNA-CRS 与 hSCF mRNA 比较, 缺失了从第 499 位至 608 位共 110 个核苷酸, 但二者 RT-PCR 反应可用同一对扩增引物, 反应动力学极为相似. 这种 hSCF RNA-CRS 可作为一种较理想的竞争性参考标准, 适用于定量 RT-PCR 中, 以对重组 hSCF 在真核细胞中的表达水平进行准确的定量分析. 此方法亦可推广应用于其他真核基因的表达水平及/或调控的检测和研究.

关键词 基因表达定量, 定量 RT-PCR, 人干细胞因子基因

学科分类号 Q7

定量 RT-PCR 是当前精确定量分析基因表达的一种快速、敏感的方法, 它与传统的 RNA 分析法相比具有许多优越性: a. 敏感性高, 比传统 RNA 印迹杂交技术敏感 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 倍; b. 特异性高, 在扩增过程中选用一严格的内标准可以使相差仅一个核苷酸的两个模板区分; c. 能快速分析大量样本, 比其他技术更能满足当今发展的需要^[1].

由于在 PCR 扩增的指数期内很小的扩增效率

会极大地影响产量, 所以定量 RT-PCR 必须设立一定的 RNA 竞争性参考标准 (RNA competitive reference standard, RNA-CRS) 与目的基因一同进行逆转录和扩增才能获得可靠的定量信息.

* 国家自然科学基金 (39700050) 和 China Medical Board (CMB No. 99-698) 资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0731) 4474411-2547, E-mail: mbrc@public.cs.hn.cn

收稿日期: 1999-06-07, 修回日期: 1999-10-15

RNA-CRS 的选择与构建是定量 RT-PCR 精确性的关键. 作为 RNA-CRS 在二级结构、大小、序列上必须与模板 mRNA 尽可能高度同源. 利用 Exonuclease III 可介导目的基因内小片段缺失的特性, 我们建立了一种经 Exonuclease III 介导的构建 RNA-CRS 的通用方法 (图 1), 用此方法成功地构建了 hSCF RNA-CRS, 并对重组 hSCF (human stem cell factor) 在真核细胞中的表达进行了定量分析.

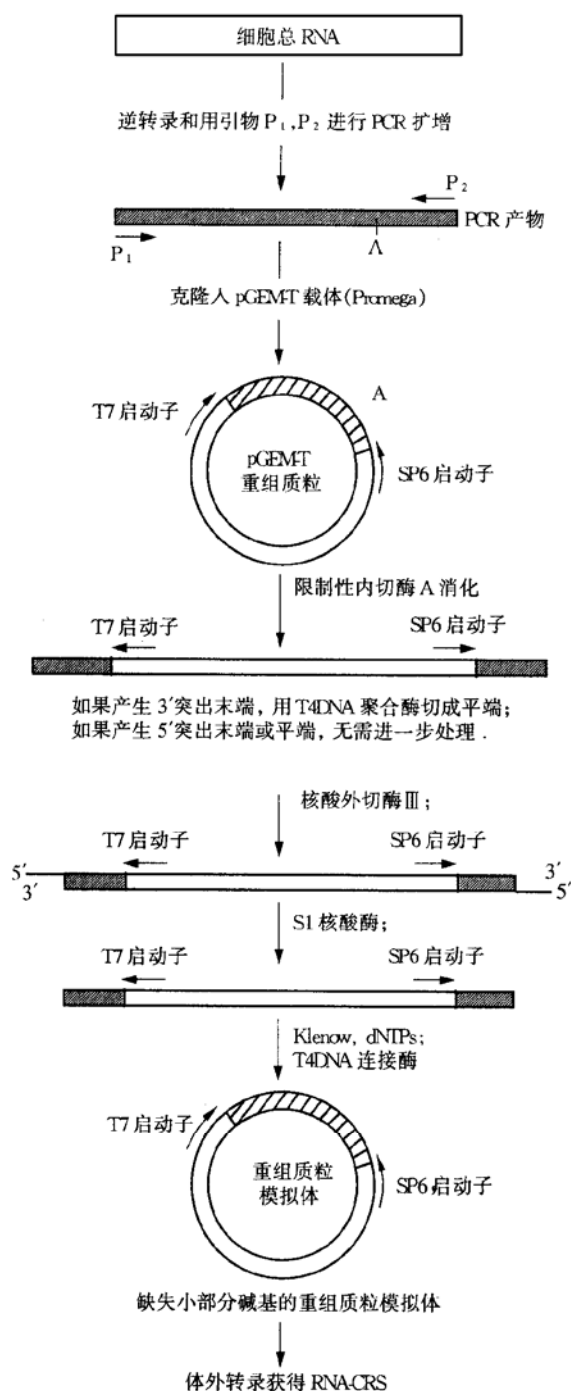


图 1 核酸外切酶 III 介导的 RNA-CRS 构建流程图

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶 *EcoR* I, *Sal* I 等, 修饰酶 Exonuclease III, S1 核酸酶, T7RNA 聚合酶, Taq DNA 聚合酶等及 dNTPs, NTPs, TfxTM-20, pGEM-T 载体为 Promega 公司产品; pcDNA3.0 为 Invitrogen 公司产品; Trizol 为 Gibco 公司产品; 测序试剂为 Perkin Elmer 公司产品; HepG2, BV173 细胞株为本实验室所存. PCR 引物 P₁: 5'-GCCGC-CGCTGTTCTGCAATA-3', P₂: 5'-TAAATA-GAGTCCTGCTCC-3' 为生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 SCF 全长 cDNA 的克隆: Trizol 分离 HepG₂ (5×10^6) 细胞总 RNA, 按文献 [2] 方法, RT-PCR 扩增出全长 SCF cDNA, 片段经回收纯化克隆入 pGEM-T 载体, 获得 pGEMSCF.

1.2.2 SCF RNA-CRS 的构建: SCF cDNA 第 598 位存在一个 *EcoR* I 位点. 1 μ g 的 pGEMSCF 经 *EcoR* I 消化成线性, 按《Promega 操作手册》用 Exonuclease III 及 S1 核酸酶进行处理, 造成小片段缺失, 并自身环化, 构建成 pGEMSCF mimic. 采用 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 对其进行序列分析.

pGEMSCF mimic 经 *Sal* I 消化成线性, 按《Promega 操作手册》进行体外转录, 获得 SCF RNA-CRS. 测定 260 nm 处的吸光度值, 并调整 SCF RNA-CRS 终浓度为 10^9 拷贝每微升.

1.2.3 重组质粒在 BV173 中瞬时表达: 按文献 [2] 方法, 将 pET₃dSCF^[3,4] 酶切下 SCF 片段, 克隆入真核表达载体 pcDNA 3.0, 获得重组质粒 pcDNASCF. 按 Promega 的操作手册, 采用 TfxTM-20 将 pcDNASCF 转染入 BV173 细胞中进行瞬时表达. 48 h 后用 Trizol 提取 BV173 细胞 (1.87×10^6) 总 RNA, 调整至终浓度为 80 mg/L.

1.2.4 定量 RT-PCR: 每个 RT-PCR 反应中含恒量的 8 ng 总 RNA 以及系列浓度梯度的 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 个拷贝 SCF RNA-CRS. 采用 25 pmol 下游引物 P₂ 先进行竞争性逆转录, 而后加入 25 pmol 引物 P₁ 共同进行竞争性 PCR 扩增, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 2min 变性后, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 50s 分别循环 20、22、24、26、28 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 绘制动力学曲线. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖分析.

1.2.5 数据处理: DNA 片段的荧光信号强度经 Eagleeye II 软件 (Stratagene Co.) 分析. 校正的内标准荧光信号 = (靶基因长度/内标准长度) × 内标准荧光信号, 以 $\lg$ [校正的内标准荧光信号/靶基因的荧光信号] 为纵坐标, $\lg$ [RNA-CRS 拷贝数] 为横坐标, 绘制直线回归方程. 回归直线与横轴的交点 (表示内标准与靶基因的分子数之比为 1:1) 即为 RT-PCR 反应中最初的靶基因分子数^[5].

2 结果与讨论

pGEMSCF mimic 经测序显示缺失了 SCF cDNA 第 499 位至第 608 位共 110 bp 片段, 由此经体外转录获得的 SCF RNA-CRS 与天然 SCF mRNA 高度同源, 在竞争性 RT-PCR 中, 共同竞争引物、dNTPs 和酶, 从而具有极为相同的动力学特征, 最大程度上地消除了 RT 和 PCR 带来的效率差异. PCR 的另一特征是扩增的平台期, 一旦达到平台期, 扩增便不再呈指数形式, 从而使定量不准确. 从 PCR 动力学曲线得知, 当 PCR 进入第 24 个循环后, 开始进入平台期 (图 2). 因此, 我们选择了第 24 个循环的 PCR 产物进行定量分析, 绘制回归直线, 经计算表明每个细胞 SCF mRNA 拷贝数为 189.5 (图 3).

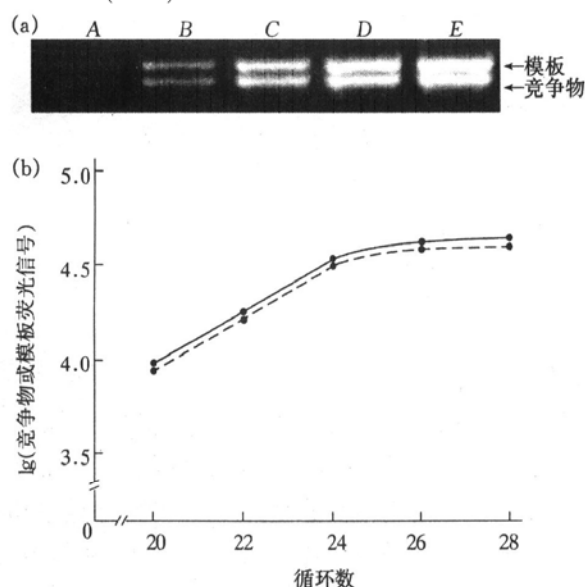


图 2 各循环数时 PCR 产物及动力学曲线

(a) PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱, A ~ E: 20、22、24、26、28 各循环数时 PCR 产物. (b) PCR 动力学曲线, 24 个循环后进入平台期. 模板指数扩增期动力学方程为: $Y = 1.1921 + 0.1393X$, $r = 0.9998$; 竞争物指数扩增期动力学方程为: $Y = 1.1267 + 0.1405X$, $r = 0.9999$.

——: 模板; - - -: 竞争物.

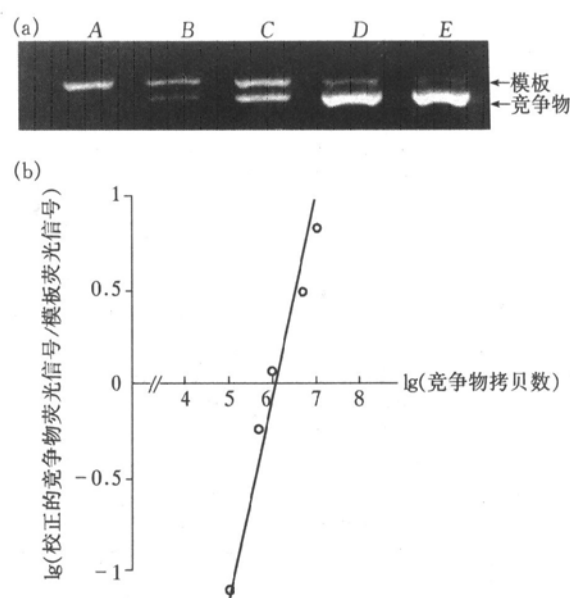


图 3 竞争性 RT-PCR 产物及回归直线

(a) 竞争性 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱, A ~ E: 含恒量 (8 ng) 总 RNA 及分别掺入 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 拷贝的 RNA-CRS 竞争性 RT-PCR 产物. (b) 竞争性 RT-PCR 回归直线图. 回归方程为: $Y = -5.4802 + 0.9023X$, $r = 0.9844$.

定量 RT-PCR 的关键在于 RNA-CRS 的构建. 以往人们常选择某些管家基因如 β -actin 的 mRNA 为内标准, 由于它们与靶基因使用不同的引物, 两种 mRNA 在序列、大小及二级结构上可能存在较大的差异, 使两者的扩增效率差异极大, 从而影响了定量的准确性. 不同来源的组织或细胞的 mRNA 中可能存在抑制因子, 抑制逆转录; 同时由于来源和结构不同, 各种 mRNA 可能有着不同的逆转录效率, 这种逆转录效率的差异在随后进行的 PCR 扩增中被成百万倍地放大. 因此, 定量 RT-PCR 中的 RNA-CRS 必须与靶基因在序列、大小、二级结构上高度类似, 才能保证 RT 和 PCR 这两个步骤中的效率一致, 获得可靠的定量信息^[1]. 有许多作者创立了一些构建 RNA-CRS 的方法, 如 PATTY (PCR aided transcript titration assay)^[6], RLM-mimic (RNA ligase-mediated mimic)^[7]等. 我们的方法与这些方法相比更具有有一些优势: a. 适应于任何一种带有一种或多种限制性内切酶位点的靶基因, 与这些酶的种类以及所产生的末端类型无关; b. 可通过 Exonuclease III 消化条件的改变而获得不同长度缺失的内标准, 我们可以选择其中最合适长度的内标准; c. 所获得的 RNA-CRS 与靶基因

高度同源,可最大程度上地消除 RT 和 PCR 的效率差异,从而得到可靠的数量信息.

参 考 文 献

- 1 谭文斌. RT-PCR 内标准 RNA 的选择与构建. 国外医学分子生物学分册, 1997, **19** (1): 7~ 11
Tan W B. Foreign Medical Sciences, Fascicle of Molecular Biology, 1997, **19** (1): 7~ 11
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 976~ 980
- 3 成光杰, 徐海明, 谭文斌, 等. 人干细胞因子的 cDNA 克隆. 湖南医科大学学报, 1994, **21** (4): 301~ 304
Cheng G J, Xu H M, Tan W B, *et al.* Bulletin of Hunan Medical University, 1994, **21** (4): 301~ 304
- 4 谭文斌, 成光杰, 李卫民, 等. 重组人干细胞因子在大肠杆菌的表达及活性检测. 生命科学研究, 1999, **3** (1): 48~ 52
Tan W B, Cheng G J, Li W M, *et al.* Life Science Research, 1999, **3** (1): 48~ 52
- 5 Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al.* PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990. 185~ 187
- 6 Becher Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR): a novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). Nucleic Acids Res, 1989, **17** (23): 9437~ 9446
- 7 Frank B, James L. Construction of Quantitative RT-PCR MIMICs. BioTechniques, 1995, **19** (4): 580~ 584

Construction of Human Stem Cell Factor's RNA-CRS in Quantitative RT-PCR. TAN Wen-Bin, NIE Yi-

Ling, LUO Sai-Qun, GUO Xiao-Shan, CHENG Guang-Jie, CHEN Han-Chun, ZHU Ding-Er (*Molecular Biology Research Center, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract A novel method was developed to prepare an Exonuclease III partially-digesting RNA as a competitive reference standard (RNA-CRS) of human stem cell factor (hSCF) gene in quantitative RT-PCR: complete hSCF cDNA was already amplified from HepG2 cells using RT-PCR and cloned into pGEM-T vector. After the recombinant pGEMSCF was treated with Exonuclease III and S1 nuclease at a favorable condition to make a limited deletion in hSCF cDNA, the recombinant pGEMSCF mimic was constructed successfully and transcribed *in vitro* to obtain the RNA-CRS. The hSCF RNA-CRS with a 110 bp deletion from base 499 to 608 in hSCF cDNA was identified by DNA sequencing and it is suitable to be used as a reliable RNA-CRS for the quantitation of the transcriptional expression level of recombinant hSCF in eukaryotic cells by quantitative RT-PCR.

Key words quantitation of gene expression, quantitative RT-PCR, human stem cell factor gene

欢迎订阅 欢迎投稿

生物化学与生物物理进展

ISSN 1000-3282

邮发代号 2-816

CN 11-2161/Q

订价 (2000 年) 12.80 元/本

本刊是国内外公开发行的全国性学术期刊,由中国科学院生物物理研究所和中国生物物理学会共同主办.报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展,设有微型述评,综述与专论,研究报告,技术与方法,研究快报等十几个栏目.目前为双月刊(逢双月20日发行),国际标准开本(210 mm×297 mm),114页,2000年每本订价¥12.80元.自1974年创刊以来,我刊始终以推动生命科学发展和促进国家经济建设为宗旨,不断提高学术、编辑和出版质量.经过二十余年的不懈努力,我刊已成为一个在我国生命科学、基础医学及其他相关领域具有一定影响、深受广大读者欢迎及专家好评的学术期刊.被SCI Search、CA等国际权威检索系统收录.ISI最新出版的期刊引征报告表明,我刊1998年影响因子(即SCI影响因子)0.04.

编辑部地址:北京朝阳区大屯路15号中国科学院生物物理研究所 邮政编码:100101

电话:(010) 64888459 E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn