

一种快速构建 cRNA 标准曲线 检测基因表达方法的建立*

张 燕 沈 茜**

(第二军医大学附属长海医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要 为了建立一种适于实验室乃至常规定量检测 mRNA 表达的、可快速构建 cRNA 标准曲线的方法, 设计带有 T7 启动子序列和 PolyT 序列的引物对目的基因和内参照进行 PCR, 克隆入载体作为体外合成 cRNA 的模板, 快速构建 cRNA 标准。结果表明: 该曲线的线性范围至少达 6 个数量级, 相关系数为 0.99。该法快速、简便, 适用于所有靶基因。

关键词 实时 RT-PCR, mRNA 定量, 基因表达

学科分类号 Q503

实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 利用荧光实时检测 PCR 反应, 具灵敏度高、特异性好、节约时间等特点, 对于检测来自有限组织中低丰度 mRNA 表达尤为适用。实时 RT-PCR 中, 常用内标准和外标准两种检测方式。内标准是对目的基因进行相对定量, 即相对于某一管家基因如 GAPDH、 β -actin 等的相对含量; 外标准则可绝对定量, 但大多使用 DNA 标准曲线, 而不是 RNA 标准曲线。为了能更准确地反映 mRNA 的实际含量, 我们建立了一种可在体外快速构建的 cRNA 标准曲线进行实时 RT-PCR, 并利用该标准曲线测定了细胞因子 TNF α mRNA 表达的变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Trizol 为 Gibco 公司产品, pMD-18T 载体、T7 RNA 聚合酶、DNase I、禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶、RT-PCR 试剂盒购自 TAKARA 公司, TNF α 和 GAPDH Taqman 荧光探针由 TAKARA 公司合成, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, Taq 酶由申友公司提供, 荧光定量 PCR 仪 LightcyclerTM 为 Roche 公司产品, PCR 仪为 Biometra 公司产品, 紫外分光光度仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 标本

急性烧伤实验组和对照组大鼠各 7 只, 共 14 只的脾脏组织。Trizol 抽提总 RNA, 按说明书进行。-80℃保存。

1.3 TNF α 和 GAPDH 基因片段的克隆

引物合成参照文献 [1]。引物序列如下: T1 5'-AGGCTCCTCTCCGCCATCAAGAG-3'; T2 5'-TGGGCTCATACCAAGGGCTT-3'; Taqman probe - CTCATGGCCCTCTCTGGCTGTTACTGCG1; G1 5'-AGGGAACATCATCCCTGCATCCA-3'; G2 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'; Taqman probe - CTTGCCCACAGCCTTGGCAGC。以抽提的大鼠总 RNA 为模板进行 RT-PCR, 产物克隆入 pMD-18T 载体。

1.4 TNF α 和 GAPDH 基因片段的修饰及克隆

对两基因进行修饰的目的在于在其 5' 端加上 T7 启动子序列, 3' 端加上 poly T 序列。两对修饰引物序列如下: T3 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG AGGCTCCTCTCCGCCATCAAGAG-3'; T4 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT TGGGCTCATACCAAGGGCTT-3'; G3 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG AGGGAACATCATCCCTGCATCCA-3'; G4 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT CCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'。分别以前一步得到的质粒为模板, 以两修饰引物为引物进行 PCR, 产物克隆入 pMD-18T 载体。大量抽提质粒并用聚乙二醇沉淀法纯化。分光光度法在 260 nm 处测定 DNA 含量。

* 国家自然科学基金资助项目 (39970270)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-25070648, E-mail: MSminli@hotmail.com

收稿日期: 2002-11-20, 接受日期: 2002-12-26

1.5 合成 TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA

鉴定两基因在 T 载体的方向后, 以 *Sma* I 酶切, 分别胶回收. 以回收纯化的线性质粒为模板, 体外用 T7 RNA 聚合酶分别合成 TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA. 反应体系如下: 50~500 ng DNA, 0.5 mmol/L NTP, 1 U/ μ l RNase 抑制剂, 10~50 U T7 RNA 聚合酶, 5 mmol/L DTT. 37℃ 反应 40 min 后加入 10 U DNase I, 37℃ 反应 10 min. 酚氯仿抽提后, 冷乙醇沉淀. 溶于 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水溶液.

1.6 定量和稀释 cRNA 标准

用分光光度法在 260 nm 处测定 cRNA 含量 (g/L). 按以下公式换算为每微升所含分子数 (N).

$$N = \frac{\text{cRNA 含量}}{\text{cRNA 长度}} 182.5 \times 10^{13}$$

用 DEPC 水溶液进行系列稀释, cRNA 的分子数为 $10^3 \sim 10^9$.

1.7 逆转录标本和 cRNA 标准

1~2 μ g 大鼠胰腺组织总 RNA 和 cRNA 系列稀释标准同时进行逆转录. 20 μ l 体系中含 5 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTP, 1 U/ μ l RNase 抑制剂, 0.25 U/ μ l AMV 逆转录酶, 2.5 pmol polyA 引物, 1 μ g 总 RNA. 反应条件为: 30℃ 10 min, 45℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min.

1.8 实时 PCR 和标本中 TNF α 定量

25 μ l 反应体系含 5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L dNTP, 引物各 20 pmol, 20 pmol 探针, 5 U Taq 酶, cDNA 各 1 μ l. 反应条件为 92℃ 2 min 变性, 92℃ 15 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环.

1.9 标准曲线及计算

标准曲线及数据分析均由 LightCycle™ 分析软件自动进行. 标准曲线以 C_t (threshold cycle) 对起始拷贝数的对数作图. 样本中 TNF α 和 GAPDH 拷贝数的计算由分析软件根据标准曲线自动计算.

2 结 果

2.1 TNF α 和 GAPDH 基因片段的克隆

两基因片段的产物长度分别为 76 bp 和 77 bp, 分别克隆入 T 载体. 以 T 载体为模板, PCR 初步鉴定后 (图略), 测序证实.

2.2 TNF α 和 GAPDH 基因片段的修饰及克隆

两基因分别加上 T7 启动子序列和 polyT 序列

后, 片段长度分别为 117 bp 和 118 bp, 分别克隆入 T 载体. 以 T 载体为模板, PCR 鉴定 (图略).

2.3 合成 TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA

体外合成 TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA 后, 测定 cRNA 含量分别为 0.227 g/L 和 0.223 g/L. 换算为拷贝数为 3.14×10^{12} / μ l 和 3.08×10^{12} / μ l.

2.4 TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA 标准曲线

图 1 为以 TNF α cRNA 为标准曲线, 图 2 为 GAPDH cRNA 为标准曲线. 稀释倍数均为 $10^3 \sim 10^9$. 由图 1 和图 2 可以看出, 两标准曲线的线性范围较广, 至少可达 6 个数量级; C_t 值和起始模板拷贝数对数的相关性非常好, r^2 均为 0.99. 两基因的扩增效率可根据标准曲线的斜率计算得到 ($E = 10^{1/m} - 1$). TNF α cRNA 和 GAPDH cRNA 的扩增效率分别为 94.88% 和 96.92%.

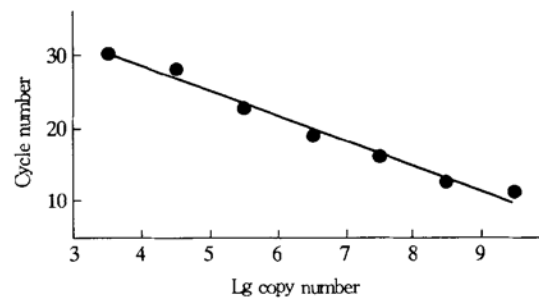


Fig. 1 TNF α cRNA standard curve

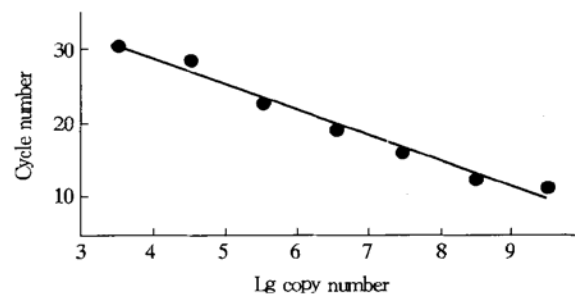


Fig. 2 GAPDH cRNA standard curve

2.5 样本定量

每份样本的总 RNA 和体外合成的 TNF α cRNA、GAPDH cRNA 平行进行逆转录及实时 PCR, 样本中 TNF α 和 GAPDH 的初始拷贝数由分析软件根据标准曲线和样本的 C_t 值自动计算出. 14 份样本中 TNF α 和 GAPDH 的初始拷贝数分别为 2 564 000~35 440 000 和 90 730~5 883 000 (表 1). 各样本中 TNF α 与 GAPDH 的初始拷贝数的比值为 0.005~0.202, $\bar{x} = 0.075$, $s = 0.071$.

Table 1 C_1 value and initial copy number of TNF α and GAPDH in 14 samples

	TNF α		GAPDH	
	C_1	Copies	C_1	Copies
Sample 1	23.24	9.970×10^4	21.40	2.564×10^6
Sample 2	21.80	3.461×10^5	21.01	3.237×10^6
Sample 3	23.10	1.123×10^5	19.50	7.875×10^6
Sample 4	22.59	1.743×10^5	19.81	6.577×10^6
Sample 5	22.83	1.423×10^5	17.38	2.769×10^7
Sample 6	22.51	1.877×10^5	19.97	5.974×10^6
Sample 7	22.98	1.252×10^5	18.19	1.714×10^7
Sample 8	21.75	3.623×10^5	19.22	9.296×10^6
Sample 9	20.41	1.148×10^6	20.04	5.750×10^6
Sample 10	23.35	9.073×10^4	20.65	4.009×10^6
Sample 11	18.52	5.883×10^6	16.96	3.544×10^7
Sample 12	20.58	9.879×10^5	18.83	1.173×10^7
Sample 13	20.80	8.176×10^5	19.65	7.230×10^6
Sample 14	19.56	2.387×10^6	18.82	1.182×10^7

3 讨 论

实时 RT-PCR 对检测表达丰度较低的 mRNA 为首选方法, 常采用两种方法对靶基因进行定量: 一是标准曲线法, 该法可绝对定量; 二是同时测定管家基因, 以靶基因与管家基因的比值进行定量, 此为相对定量. 标准曲线是用一系列已知浓度的标准物质来构建的. 这种标准物质可以是纯化的 dsDNA、体外转录的 RNA、体外合成的 ssDNA^[2] 或表达靶基因的任何 cDNA. 对靶基因进行绝对定量, 标准曲线的准确性是关键.

目前, 绝大多数用实时 RT-PCR 对 mRNA 表达进行绝对定量时所用的标准曲线由 dsDNA 来构建. 用 dsDNA 质粒构建标准曲线的优越性在于, 一旦靶基因克隆入载体, 很容易大量制备, 因此可用同一标准曲线测定大批标本, 减少了批间误差. 另外, 质粒在 -20°C 条件下长期储存无明显降解. 然而用 DNA 质粒作为标准曲线定量 mRNA 表达存在的一个严重缺陷是它未考虑到逆转录的效率差异问题, 所得结果只能是相对定量^[3]. 用 RNA 作标准曲线的报道远远少于 DNA 标准曲线, 一个最主要原因是构建 RNA 标准较为繁琐, 且 RNA 标准不易保存. 如何能在体外快速合成 cRNA, 建立一种适于实验室乃至常规定量检测 mRNA 表达的方

便易行的 cRNA 标准曲线, 是本研究的目的所在.

我们借鉴 Fronhoffs 等^[4]的方法, 将靶基因和管家基因装入载体后再进行二次克隆, 目的是在两基因的两端分别加上 T7 启动子序列和 poly T 序列, 为体外用 T7 RNase 聚合酶合成 cRNA 作准备. T7 启动子序列是 T7 RNase 聚合酶的识别序列, 而 poly T 序列在进行逆转录反应时与 polyA 引物相配对. 体外合成 cRNA 后, 经一系列稀释与标本 RNA 平行进行逆转录和实时 PCR, 将逆转录这一步的效率也考虑在内, 避免了以 DNA 标准曲线来定量 mRNA 的缺陷. Fronhoffs 方法用修饰引物先扩增目的基因和内参照基因, 再以 PCR 产物为模板进行 cRNA 的合成. 这样, 每次在体外合成 cRNA 均需再次 PCR. 我们则用修饰引物先扩增目的基因和内参照再次克隆, 并用平端酶酶切, 回收后定量, -20°C 可长期保存. 再次合成 cRNA 时, 无需进行 PCR, 只要取出所需量的线性质粒就可立即合成 cRNA. 虽然 cRNA 不易保存, 但可将模板长期保存.

实时 RT-PCR 中, 影响结果准确性的两个最重要因素是 RNA 的质量和逆转录反应的效率. 为减少误差, 校正标本间变异, mRNA 的量常需要用内参照来标准化. 我们用内参照 GAPDH 的 cRNA 标准曲线来校正每一标本内 GAPDH 的拷贝数, TNF α 的表达水平以占相应 GAPDH 的量来表示.

这种快速合成 cRNA 构建标准曲线的方法, 简便易行, 可适用于所有靶基因. 对任何基因来说, 只要在其片段两侧加入 T7 启动子序列和 polyT 序列, 就可合成 cRNA 来构建标准曲线. 若长期应用或检测大量标本, 可克隆入载体, 酶切后保存, 备用. 以此法构建的 cRNA 和样本用相同的引物和探针平行进行逆转录, 避免了只考虑到 PCR 效率而忽略逆转录效率. 该 cRNA 标准曲线具有较宽的线性范围和相当好的相关性, 我们构建的两标准曲线的相关系数均为 0.99.

参 考 文 献

- 1 Allan S M, Harrison D C, Read S, *et al.* Selective increases in cytokine expression in the rat brain in response to striatal injection of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and interleukin 1. *Molecular Brain Research*, 2001, **93** (2): 180~189
- 2 Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000, **25** (2): 169~193
- 3 Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, *et al.* An overview of real-

- time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001, **25** (4): 386~ 401
- 4 Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, *et al.* A method for the rapid construction of cRNA standard curve in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, **16** (2): 99~ 110

Rapid Construction of cRNA Standard Curves in Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA Expression^{*}

Zhang Yan, Shen Qian^{**}

(Department of Central Laboratory, The Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract To establish a rapid construction cRNA standard curves method applicable to common laboratory, PCR was carried to amplify the target gene and internal reference gene using primers containing T7 promotor and polyT sequence, PCR product was cloned as the template of T7 RNase polymerase to synthesize cRNA *in vitro* for establishing standard curves. The result shows that constructed cRNA curve has a wide linear range of at least six orders and correlation coefficient is 0.99. The rapid and simple method can be applicable to measurement of transcripts for any gene.

Key words real-time reverse transcription polymerase chain reaction, mRNA quantification, gene expression

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970270).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-25070648, E-mail: MSminli@hotmail.com

Received: November 20, 2002 Accepted: December 26, 2002