

• 论 著 •

SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链反应宽范围检测人 GAPDH 基因体系的建立^{*}

李 喆, 张 影, 徐颖华, 辛晓芳[△]

(中国食品药品检定研究院/计生委生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘 要:目的 建立一种快速、灵敏的人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 基因实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)方法。方法 根据 GeneBank 数据库中提供的人 GAPDH 基因(NC_000012)mRNA 序列,在其保守区域设计一对用于 RT-PCR 引物,通过优化反应体系和反应条件,成功建立了检测人 GAPDH 基因的 SYBR Green RT-PCR 方法。结果 实验结果表明,该检测方法检测人 GAPDH 基因的最低检测拷贝数可达到 15 copies/ μL ,在一个较宽的浓度范围内($1.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^7$)具有良好的线性关系($r=0.992$)。溶解曲线呈现了清晰的单一峰型, T_m 值为 $(84.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 。结论 该研究为人 GAPDH 基因作为内参基因进行人功能基因与病原基因表达的定量分析提供了一种更为快速、灵敏的方法。

关键词:内参基因; 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 荧光定量-聚合酶链反应; 灵敏

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)22-3229-03

Developing SYBR Green Real-Time PCR assay for wide range detection of human GAPDH gene^{*}

Li Zhe, Zhang Ying, Xu Yinghua, Xin Xiaofang[△]

(National Institutes for Food and Drug Control/Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To develop a quick and sensitive real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) method for detecting human GAPDH gene. **Methods** According to the published GAPDH gene(NC_000012) mRNA sequence in GeneBank, a pair of primers was designed in the conserved region. After optimization of reaction system and condition, the method for detection of human GAPDH gene by SYBR Green RT-PCR was established. **Results** The measuring range lower limit of GAPDH gene could reach 15 copies per microlitre and there was a nice linear relationship in statistics between the Ct value and the concentration gradient of standard plasmid DNA specimen was from 1.5×10^1 to 1.5×10^7 per microlitre($r=0.992$). The melting curve present a single and clear peck and the T_m value was $(84.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$. **Conclusion** The method established in this research is rapid and sensitive, which provides a methodological basis for quantitative analysis of human functional and etiological gene using GAPDH as reference gene.

Key words: reference gene; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; sensitive

实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)是通过对聚合酶链反应(PCR) 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测,从而实现对起始模板定量及定性的分析,可以分为绝对定量和相对定量两种类型。绝对定量可用于目的基因拷贝数的检测领域,而相对定量可用于差异表达分析、芯片评估及基因型检测等方面。在相对定量检测中,受制于实验操作、模板来源估算等差异造成的影响,需要一个参数进行校准,于是引入了管家基因的概念。管家基因即系统内部稳定表达的一种基因,它的作用是在分析 RT-PCR 结果差异时,需要同时对不同样品中的内参基因进行定量 PCR,以此对目的基因的定量结果进行校正^[1-2]。目前常用的内参基因有 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)^[3-4]、 β -肌动蛋白及 $\beta 2$ -微球蛋白基因等^[5-6]。人 GAPDH 基因作为 RT-PCR 内参基因,常见于国内外实验室及临床研究报道,但多存在检测灵敏度较低及不稳定的情况^[7],本研究根据 GeneBank 收录的人 GAPDH 基因序列,设计优化并合成一对引物,建立了人 GAPDH 基因的 RT-PCR 方法,为人体功能基因及病原基因的表达进行定量分析提供一种更为快速灵敏的方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 健康人外周血单核淋巴细胞。

1.2 仪器与试剂 磷酸盐缓冲液(PBS)、RPMI 1640 培养基(Hyclone, 美国), Ficoll-paqueTM Plus 单个核细胞分离液(Amersham Biosciences, 美国), RNeasy[®] Mini Kit 试剂盒、QIAquick 凝胶电泳回收试剂盒(Qigen, 美国), SuperScript III 逆转录第一链合成系统、Platinum[®] Taq DNA 聚合酶(Life technologies, 美国), pMD[®] 18-T Simple Vector 载体系统、大肠埃希菌(E. coli)感受态细胞 DH5 α 、SYBR[®] Premix EX TaqTM II PCR 扩增试剂盒(日本, Takara), Endo-free 质粒试剂盒(Omega, 美国), Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo, 美国), 7900HT 实时荧光定量 PCR 扩增仪(Applied Biosystems, 美国), DNA Engine 基因扩增仪(Bio-Rad, 美国), 凝胶成像仪(UVItect, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 根据 GeneBank 数据库中提供的人 GAPDH 基因(NC_000012)mRNA 序列,在其保守区域设计一对用于实时荧光定量 PCR 引物(上游 F: 5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT G-3', 下游 R: 5'-AGT AGA GGC AGG GAT GAT G-3'), 扩增片断长度为 105 bp。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.3.2 PBMCs 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 PBMCs 的

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81471968);国家科技“重大新药创制”专项课题项目(2013ZX09304101)。 作者简介:李喆,男,助理研究员,主要从事微生物学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xinxiaofang08@aliyun.com。

分离采用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离。PBMCs 总 RNA 的提取采用 RNeasy® Mini Kit 试剂盒,操作步骤参照其说明进行。RNA 溶于 30 μL DEPC 水中。cDNA 合成(30 μL 体系)采用 SuperScript III 逆转录第一链合成系统(Life technologies, 美国),操作步骤参照其说明进行。

1.3.3 GAPDH 基因目的片段的扩增、克隆及鉴定 (1) GAPDH 基因的 PCR 扩增。以反转录合成的 cDNA 为模板,使用针对 GAPDH 基因设计的引物进行 PCR 扩增。扩增反应采用 Platinum® Taq DNA 聚合酶试剂(Life technologies, 美国),反应总体积为 50 μL;DEPC-treated H₂O 38.1 μL,10×高保真 PCR 缓冲液 5 μL,50 mmol/L 硫酸镁溶液 1.5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L primer F 1 μL,10 μmol/L primer R 1 μL,Platinum® Taq DNA 聚合酶高保真液 1 μL,cDNA 2 μL。反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 30 s,选择 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保温。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。检测到目的条带后,使用 QIAquick 凝胶电泳回收试剂盒切胶回收目的产物,操作步骤参照其说明进行。最后检测纯化结果,以确保回收正确。(2)GAPDH 基因的克隆与鉴定。将回收产物与 pMD18-载体进行连接。反应总体积 10 μL;GAPDH 扩增回收片段 4 μL,pMD18-T 载体 1 μL,Solution I 5 μL,16 ℃ 反应 30 min。连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,涂布于含 X-gal 和 IPTG 并具氨苄西林抗性的 LB 培养基琼脂平板上,37 ℃ 避光倒置培养过夜。挑取白色菌落,接种于含有氨苄西林的 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养过夜。利用 Endo-free 质粒试剂盒进行质粒提取,并送上海英骏公司测序。

1.3.4 SYBR Green RT-PCR 方法的建立 (1)阳性标准品的制备。通过测序鉴定重组质粒无误后,采用 Nanodrop 2000 分光光度计检测并准确定量,并转换为 copy/μL,已知拷贝数的标准品进行 10 倍梯度稀释作为标准品,—80 ℃ 保存备用,即为 GAPDH 的阳性标准品。(2)标准品的实时荧光定量 PCR 反应。采用 Takara SYBR®Premix EX Taq™ II PCT 扩增试剂盒,以 10 倍梯度稀释好的标准品为模板,利用 ABI 7900HT Fast R-TPCR 系统扩增并检测荧光,得到模板起始拷贝数的对数和临界循环数(CT)的标准曲线和标准方程。荧光定量 PCR 反应体系(20 μL):SYBR Premix Ex Taq II (2X) 10 μL,10 μmol/L 上下游引物各 0.8 μL,Rox Reference Dye (50X) 0.4 μL,模板(稀释好的标准品) 2.0 μL,灭菌水 6 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,60 个循环。融解曲线分析:95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,95 ℃ 15 s,温度以每 10 s 0.5 ℃ 的速率从 60 ℃ 缓慢递增至 95 ℃,根据溶解曲线判断反应的特异性。

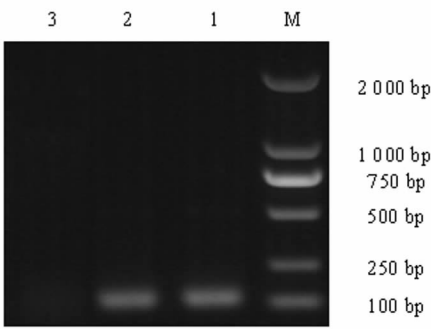
2 结 果

2.1 GAPDH 基因的 PCR 扩增 提取全血分离的 PBMC 总 RNA,并将其逆转录为 cDNA,进行普通 PCR 扩增,得到 105 bp 的产物片断,与预期结果一致并经测序确认,见图 1。

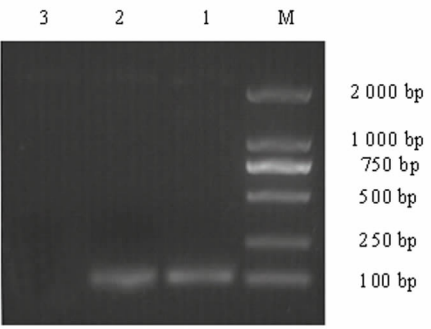
2.2 GAPDH 基因的克隆与鉴定 挑取白色菌落,LB 液体培养及小量培养并提取质粒,以其作为模板,进行 PCR 扩增鉴定,电泳得到 105 bp 大小的条带,与预期结果一致,结果见图 2。测序确认阳性克隆中含 105 bp 的外源序列,经序列比对,证实与引物结合区的 GAPDH 核苷酸序列一致。以上结果表明重组质粒构建成功,可作为建立 RT-PCR 方法的阳性标准品。

2.3 标准曲线的建立 GAPDH 阳性标准品原始浓度为 50 ng/μL,换算成拷贝数即 1.5×10^{10} copies/μL。将定量的阳性标准品进行 10 倍系列稀释,选取 $1.5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^1$ 7 个稀释度进行荧光定量 RT-PCR 扩增,每个稀释度 3 个复孔,并设

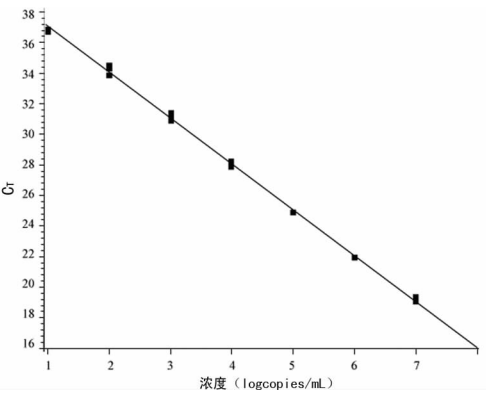
立阴性对照。得到标准曲线,见图 3。如标准曲线所示,该方法在最低拷贝数为 15 copies/μL 仍可以准确的检测 GAPDH。7 个不同稀释度有良好的线性关系,且各自复孔间的重复性良好。回归方程为 $Y = -2.96X + 39.63(r = 0.992)$ 。



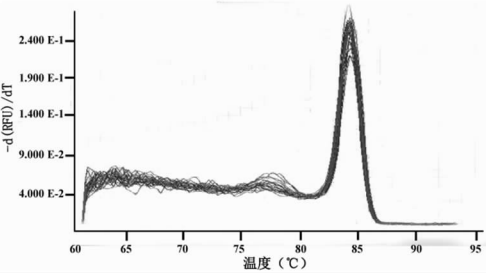
M:DNA 标记物;1~2:105 bp GAPDH 片段;3:阴性对照。
图 1 GAPDH 基因扩增结果鉴定



M:DNA 标记物;1~2:105 bp GAPDH 片段;3:阴性对照。
图 2 GAPDH 克隆结果鉴定



C_T:循环阈值。
图 3 GAPDH 基因 RT-PCR 标准曲线



-d(RFU)/dT:荧光信号量改变的负一次导数;RFU:随时间推移的相对荧光单位。
图 4 GAPDH 基因 RT-PCR 溶解曲线

2.4 GAPDH 荧光定量的溶解曲线分析 扩增产物溶解曲线

表明 GAPDH 质粒扩增产物的 T_m 值为 $(84.5 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 所有产物溶解曲线均为单一峰型, 表明无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的 PCR 扩增产物, 见图 4。

3 讨 论

RT-PCR 的设想是由 Higuchi 等^[8]于 1992 年最早提出。所谓 RT-PCR 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术结合了 RT-PCR 仪、实时荧光定量试剂、通用电脑和自动分析软件, 构成 PCR-DNA/RNA 实时荧光定量检测系统。

与普通 PCR 相比, RT-PCR 优势在于可以对目的基因表达水平进行准确的绝对定量或者相对定量分析, 因此被广泛用于病毒学研究中, 如病毒的快速诊断、定量检测、毒力鉴别、致病机理等研究^[9-12]。

本研究采用 SYBR Green I 染料进行检测, 不需合成荧光探针。相比探针法, 具有较高的灵敏性和试验稳定性。由于非特异性扩增和引物二聚体同样会产生荧光信号, 因此在 PCR 结束后立即进行溶解曲线分析, 非特异性扩增与特异性扩增产物吸收峰 T_m 值存在差异, 可以进行区分。而本研究的溶解曲线显示每一条扩增曲线均为特异性单峰, 无非特异性扩增, T_m 值符合要求。

本研究检测人 GAPDH 基因的灵敏度从 10^1 拷贝数量级延伸到 10^7 数量级, 灵敏度高, 范围宽。每个稀释度三个复孔重复性良好, CV 值均低于 1%, 且多次试验基本无差别, 体现了良好的稳定性。

本研究成功设计了能特异扩增人 GAPDH 基因保守区片段的引物, 来自人体 PBMC 细胞的总 RNA 样品中能扩增到 105 bp 大小的特异性片段, 并成功构建 pMD18-T-GAPDH 重组质粒, 建立了基于 SYBR Green 染料技术的人 GAPDH 基因荧光定量 RT-PCR 方法。所建立的方法快速, 检测线性范围广, 灵敏度高等特点, 为 GAPDH 作为内参基因对人相关基因 mRNA 水平的 RT-PCR 分析及病原基因表达的定量分析提供了方法学借鉴。

参考文献

[1] Yang C, Pan H, Liu Y, et al. Selection of reference genes for expression analysis using quantitative real-time PCR in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera, Aphididae)[J]. PLoS One, 2014, 9(11):110454.

[2] Zhao LM, Zheng ZX, Zhao X, et al. Optimization of reference

genes for normalization of the quantitative polymerase chain reaction in tissue samples of gastric cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(14):5815-5818.

[3] Pugnale P, Latorre P, Rossi C, et al. Real-time multiplex PCR assay to quantify hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Virol Methods, 2006, 133(2):195-204.

[4] Collins C, Patel MV, Colvin J, et al. Identification and evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in the whitefly *Bemisia tabaci* (Asia D) by reverse transcription quantitative realtime PCR[J]. J Insect Sci, 2014, 14(5):63.

[5] Ji X, Wang Q, Gao Y, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of dicer in *G. gallus* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(5):630-636.

[6] Julian GS, de Oliveira RW, Perry JC, et al. Validation of house-keeping genes in the brains of rats submitted to chronic intermittent hypoxia, a sleep apnea model[J]. PLoS One, 2014, 9(10):109902.

[7] Wang E, Wang K, Chen D, et al. Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5):9998-10015.

[8] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology, 1993, 11(9):1026-1030.

[9] Dai M, Feng M, Liu D, et al. Development and application of SYBR Green I real-time PCR assay for the separate detection of subgroup J Avian leukosis virus and multiplex detection of avian leukosis virus subgroups A and B[J]. Virol J, 2015, 12(1):52.

[10] Alsahebhosoul F, Salehi R, Hosseini AZ, et al. Evaluation of SNP rs763361 on Gly307Ser gene in multiple sclerosis patients compared to healthy subjects[J]. Mult Scler Relat Disord, 2015, 3(6):744.

[11] Lee SA, Kim KJ, Kim H, et al. Hepatitis B virus preS1 deletion is related to viral replication increase and disease progression[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(16):5039-5048.

[12] Blake DJ, Graham J, Poss M. Quantification of Feline immunodeficiency virus (FIV_{pco}) in peripheral blood mononuclear cells, lymph nodes and plasma of naturally infected cougars[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 4):967-975.

(收稿日期:2015-07-18)

(上接第 3228 页)

毒和调节免疫系统的作用, 说明维吾尔族抵抗病毒和调节免疫系统的能力比汉族强, 这可能与维吾尔族长期大量食用羊肉、洋葱和胡萝卜以及维吾尔族人好动性格有关。

本研究对 181 例克拉玛依地区健康成人维吾尔族和汉族人群 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 计数及 $CD4^+/CD8^+$ 比值正常值参考范围进行分析, 为本地区的实验室提供了参考依据, 将有助于诊疗各类细胞免疫功能紊乱导致的疾病, 以及指导 HIV 的诊断、治疗及预后。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. WS/T 360-2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.

[2] Lebranchu Y, Thibault G, Degenne D, et al. Abnormalities in $CD4^+$ T lymphocyte subsets in patients with common variable im-

munodeficiency[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1991, 61(4):83-92.

[3] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 3 版. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 2012.

[4] 严亚军, 桂希恩, 陈铁龙, 等. 湖北地区城镇与农村健康人群 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数调查[J]. 中国艾滋病性病, 2010, 16(5):773-775.

[5] 徐晓琴, 陈国红, 刘晓燕, 等. 江苏地区健康汉族人 T 淋巴细胞免疫表型参考值的建立[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 11(32):1616-1620.

[6] 张琰, 温浩, 张朝霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血液淋巴细胞免疫表型参考值范围的调查[J]. 中国试验血液学杂志, 2006, 14(1):133-136.

[7] 梁君, 陶钧, 张辉, 等. 我国部分省市及民族健康人 T 淋巴细胞亚群参考值范围的研究[J]. 中国病毒病杂志, 2013, 3(2):122-127.

(收稿日期:2015-08-08)