

实时荧光定量 PCR 检测多鳍鱼 Shh 基因表达标准品质粒和标准曲线的构建

张昌盛^{1,2}, 王俊杰¹, 李湘涛¹, 翟红¹, 刘群²

1. 北京自然博物馆, 北京 100050

2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094

[摘要] 为了快速、准确定量多鳍鱼 Shh 基因在机体组织中的表达水平, 根据笔者克隆的 Shh 基因序列, 选择其高度保守区域设计一对引物, 对多鳍鱼各组织提取 mRNA, 经 RT-PCR 扩增, 产物纯化后与 pGEM-T-easy 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。筛选后得到重组标准品质粒, 对重组标准品质粒进行酶切、PCR 和测序鉴定, 表明 Shh 基因保守区段已经成功克隆。将重组标准品质粒进行倍比稀释, 然后以此为模板, 进行荧光定量 PCR, 系统自动分析软件显示 Ct 值与标准品浓度的对数之间存在良好的线性关系。回归方程为 $y = -0.32x + 10.47$, 回归系数为 1.00。构建 Shh 基因表达检测标准品质粒和标准曲线, 建立检测多鳍鱼 Shh 基因荧光定量 PCR 方法, 为进一步研究 Shh 基因在组织中的动态分布和研究多鳍鱼系统发育奠定了基础。

[关键词] Shh 基因; 实时荧光定量 PCR; 标准曲线; 多鳍鱼

[中图分类号] Q341, Q959.46+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)13-0041-04

Construction of Senegal Bichir Shh Gene Standard Plasmid DNA and Curve Using Real-time RT-PCR

ZHANG Changsheng¹, WANG Junjie¹, LI Xiangtao¹, ZHAI Hong¹, LIU Qun²

1. Beijing Museum of Natural History, Beijing 100050, China

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: As a rapid and accurate approach, the real-time fluorescent quantitative PCR method is established to quantify the Senegal bichir Shh gene expression in tissue. The method consists of choosing the object, the sample of mRNA, increasing RT-PCR, purifying, connecting it with pGEM-T-easy and transforming pGEM-T-easy. Through selecting, cutting, testing the sample, it is indicated that the colon has been shaped. The conduction is then followed by PCR detection of plasmid and recombinant T-easy-vectors digested by *EcoRI*. The equation is $y = -0.32x + 10.47$ and the ratio is 1.00. 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. This study intends to set up a solid basis for a further investigation on the distribution and the action of Shh gene and its system.

Key Words: Shh gene; real-time quantitative PCR; standard curve; Senegal bichir

CLC Numbers: Q341, Q959.46+2

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)13-0041-04

Hedgehog(Hh)是果蝇发育中一种必需的体节极性基因^[1], Hedgehog 编码的蛋白在胚胎体节发育和肢芽图式形成过程中起着重要作用^[2-4], 在高等脊椎动物中, Hedgehog 基因家族至少含有 Shh(Sonic hedgehog), Ihh

(Indian hedgehog), Dhh(Desert hedgehog)3 种成分^[3-6]。音猬因子(Sonic hedgehog, Shh)是 Hh 在脊椎动物中的同源基因之一, 是胚胎发育的过程中由脊索产生的一种因子, 已相继在斑马鱼、鸡、鼠、人等不同物种中被发

收稿日期: 2007-03-24

基金项目: 北京市科学技术研究院萌芽计划项目

作者简介: 张昌盛, 北京市崇文区天桥南大街 126 号北京自然博物馆, 助理研究员, 中国农业大学动物医学院, 在职博士研究生, 主要从事动物分子系统学研究; E-mail: zhangdoudou77@sina.com

刘群(通讯作者), 北京市圆明园西路 2 号中国农业大学动物医学院, 教授, 主要从事动物医学研究; E-mail: qunliu63@sina.com

现^[7]。Shh 是 Hh 家族中表达最广泛的基因,在 Hh 信号传导通路中起主要作用。分泌性糖蛋白 Shh 作为一种胞外信号因子^[8]参与脊椎动物胚胎发育的许多过程,它与细胞在肢体、体节、神经管发育中的分化建立有关,调节着神经管 D-V (Dorsal-Ventral) 发育模式、肢体 A-P (Anterior-Posterior) 发育模式、胚胎早期不对称发育模式和体节形成模式^[9],与多种器官如脑、脊索、肺脏、毛发、眼、颌面结构、牙齿、四肢等的形态形成有关^[10-12]。

多鳍鱼 (Senegal bichir) 体被具有菱形的厚硬鳞,是远古时代遗留下来的鱼类之一,由于其在进化关系上的地位特殊,所以有活化石之称。为了快速、准确定量多鳍鱼 Shh 基因在机体组织中的表达水平,探明 Shh 基因在组织中的动态分布,进一步研究 Shh 基因在多鳍鱼系统发育中的作用,本文构建了实时荧光定量 PCR 检测多鳍鱼 Shh 基因表达标准品质粒和标准曲线,为从分子水平上研究 Shh 基因在多鳍鱼进化中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和宿主菌

多鳍鱼,北京自然博物馆提供;宿主菌 DH5 α ,北京自然博物馆动物研究室保存。

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)、RNASEOUT[®] 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

解剖多鳍鱼,迅速取各组织器官,液氮速冻,然后转入到 -86 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱内。称取 100 mg 组织,用 TRIZOL RNA 提取试剂盒按照文献^[13]所述方法进行。提取的 RNA 用 30 μL DEPC 处理的灭菌三蒸水溶解, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 组织总 RNA 的 RT-PCR

1.2.2.1 引物设计

将已克隆的多鳍鱼 Shh 基因 mRNA 序列进行分析并选择其保守序列区段,设计一对特异性引物。上游引物为 P1: 5'-AAGAGCAAATATGGGACACTC-3', 下游

引物为 P2: 5'-CCAGCACCTTGTACCTC-3', 扩增片段长度为 214 bp。

1.2.2.2 反转录 (RT) 合成

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

1.2.2.3 常规 PCR

总体积 25 μL , 体系组分为: 10 $\times$ buffer 2.5 μL , dNTPs 2 μL , P₁ 和 P₂ (25 pmol/L) 各 0.5 μL , Ex Taq 酶 0.2 μL , cDNA 2 μL , 灭菌三蒸水 17.3 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL , 其反应组分为: pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng) 1 μL , PCR 纯化产物 3 μL , T₄DNA 连接酶 1 μL , 连接酶 buffer 1 μL , 灭菌三蒸水 4 μL 。将连接体系置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜。将连接体系加入到 200 μL 感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 经热激转化后, 加入 800 μL Amp-LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇振过夜培养。

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 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇振过夜培养的大肠杆菌进行重组质粒 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, 计算出复制数。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 μL 体系, 反应组分为: Mix 12.5 μL , P₁ 和 P₂ (25 pmol/L) 各 0.2 μL , 重组质粒 DNA 2 μL , 灭菌三蒸水 10.1 μL 。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 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 每 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 读板 1 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 200 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 200 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

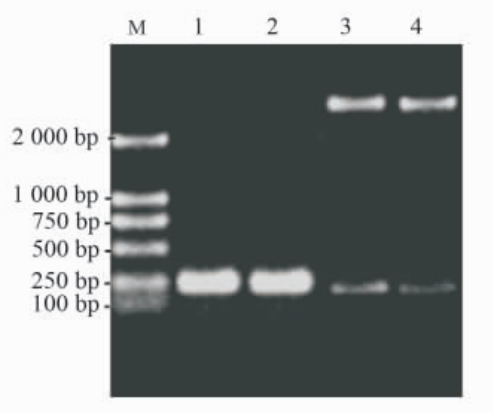


图 1 重组质粒的 PCR 扩增与酶切鉴定

M—标准条带;1~2—PCR 产物;3~4—酶切产物

Fig. 1 PCR detection of plasmid and recombinant T-easy-vectors digested by *EcoRI*

M: Marker DL-2000; 1 and 2: PCR products
3 and 4: Product digested by *EcoRI*

粒 DNA 进行 *EcoRI* 酶切,酶切产物在 200 bp 左右有单一的条带,与预期的结果相符,酶切鉴定的结果如图 1 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。

2.3 定量标准曲线的构建

经鉴定重组质粒构建成功,测重组标准品质粒 OD 值,对质粒进行 10 倍倍比稀释,然后进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应结束后系统自动生成起始模板浓度与循环数(*Ct* 值)之间呈良好的线性关系(见图 2)。

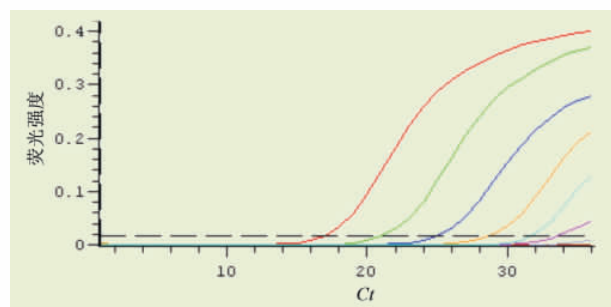


图 2 实时荧光定量扩增曲线

Fig. 2 Representative standard curve obtained by plotting the starting copy numbers of recombinant plasmid against their cycle numbers

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 倍稀释,实时荧光定量 PCR 扩增后,根据荧光值的变化规律,通过基线设定,系统自动生成实时定量 PCR 重组质粒 DNA 标准曲线(见图 3)。由

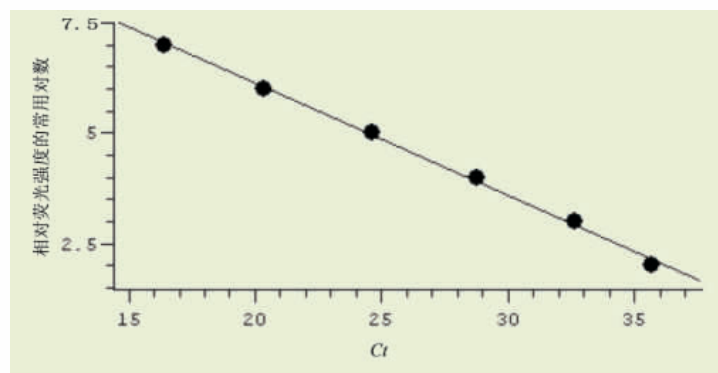


图 3 实时定量 PCR 重组质粒 DNA 标准曲线

Fig.3 Real-time RT-PCR amplification standard curves

回归曲线看出,起始模板与 *Ct* 值之间呈良好的线性关系,相关系数 $r^2=1.00$ 。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: $y=-0.32x+10.47$ 。

2.5 溶解曲线分析

经系统自动分析,扩增峰值单一,产物的解链温度值非常均一,为 83.5 °C(见图 4),说明产物扩增具有特异性。

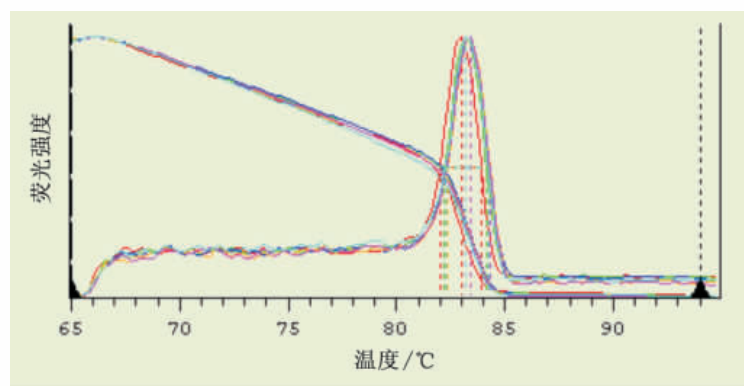


图 4 实时荧光定量熔解曲线

Fig. 4 Representative set of melting curves obtained by plotting fluorescence data against their cycle numbers

3 讨论和结论

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。

在实时荧光定量 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。

在本实验中, 以不同浓度标准品质粒 DNA 分别进行荧光定量 PCR 扩增, Ct 值相对固定, 重复性好, 同时发现起始浓度越高, 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。本文通过 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 1.00, 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, 对基因进行准确的定量。

本文构建了 Shh 基因表达检测标准品质粒和标准曲线, 建立检测多鳍鱼 Shh 基因荧光定量 PCR 方法, 为进一步研究 Shh 基因在组织中的动态分布和研究多鳍鱼系统发育奠定了基础。

参考文献 (Refercenes)

- [1] NUSSLEIN V C, WIESCHAUS E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. Nature, 1980, 287: 795-801.
- [2] SPINELLA J S, RAWADI G, KAWAI S, *et al.* Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal

cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation [J]. J Cell Sci, 2001, 114: 2085-2094.

- [3] ALTABA A R. Catching a gli-mpse of hedgehog [J]. Cell, 1997, 90: 193-196.
- [4] YAMAGUCHI A, KOMORI T, SUDA T, *et al.* Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfal [J]. Endoc Rev, 2000, 21(4): 393-411.
- [5] McMAHON A P. More surprises in the hedgehog signaling pathway[J]. Cell, 2000, 100: 185-188.
- [6] TAIPALE J, BEACHY P A. The hedgehog and wnt signaling pathways in cancer[J]. Nature, 2001, 411: 349-354.
- [7] POWNALL M E. More to patterning than sonic hedgehog [J]. Bioessay, 1994, 16(6): 381-383.
- [8] INGHAM P W. Transducing hedgehog: the story so far[J]. Embo J, 1998, 17(13): 3505-3511.
- [9] INGHAM P W, McMAHON A P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles (Review)[J]. Genes Dev, 2001, 15(23): 3059-3087.
- [10] MILENKOVIC L, GOODRICH L V, HIGGINS K M, *et al.* Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning [J]. Development, 1999, 126 (20): 4431-4440.
- [11] MING J E, ROESSLER E, MUENKE M. Human developmental disorders and the sonic hedgehog pathway [J]. Mol Med Today, 1998, 4(8): 343-349.
- [12] NASRALLAH I, GOLDEN J A. Brain, eye, and face defects as a result of ectopic localization of sonic hedgehog protein in the developing rostral neural tube[J]. Teratology, 2001, 64(2): 107-113.
- [13] 张昌盛, 刘群, 李湘涛, 等. 多鳍鱼 Shh 基因克隆与同源性分析[J]. 科技导报, 2007, 25(12): 23-27.

ZHANG Changsheng, LIU Qun, LI Xiaotao, *et al.* Cloning and polymorphic analysis of Shh gene from Senegal bichir [J]. Science & Technology Review, 2007, 25(12): 23-27.

(责任编辑 王 芷)