

大鼠 bFGF 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立

舒剑波 张瑞 董茵 郭刚

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0001-04

摘要:目的 建立用荧光定量 PCR 方法检测大鼠 bFGF 基因 mRNA 水平。方法 以 Trizol 一步法提取新鲜骨组织总 RNA 以 Oligo(dT)18 为引物逆转录产生 cDNA 并进行扩增,以 T-A 克隆法将纯化的目的片段与 PGEM-T Easy 载体连接成重组质粒并转化 *E. coli* DH5 α 。采用碱裂解法提取重组质粒,经蓝白筛选、酶切、测序鉴定后,根据标准品建立标准曲线,由软件自动计算出待测样本中靶基因 mRNA 准确含量,并以靶基因和内参 GAPDH mRNA 含量的比值作为评价靶基因表达水平的指标。结果 由 PGEM-T Easy-bFGF 所构建的标准曲线线性关系良好(反应体系中含 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝大鼠 bFGF 基因分子时,扩增反应 C_t 值与拷贝数的对数成线性关系),灵敏度高、特异性强、准确可靠。批内和批间重复性测定的变异系数分别为 1.03% ~ 4.59% 以及 2.24% ~ 6.46%。结论 成功建立了用实时荧光定量 PCR 检测大鼠 bFGF 基因表达量的方法。

关键词:碱性成纤维生长因子; SYBR Green I 法; 实时荧光定量 PCR; T-A 克隆; 标准曲线

Establishment of the method for detecting rat bFGF mRNA with fluorescence quantitative polymerase chain reaction SHU Jianbo, ZHANG Rui, DONG Yin, et al. Institute of Endocrinology, Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Key Lab of Hormones and Development, Ministry of Health, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** The method for detecting rat bFGF mRNA expression with fluorescence quantitative polymerase chain reaction was developed. **Methods** Total RNA was isolated from fresh bone tissue sample using Trizol one step method and reverse transcribed to cDNA using Oligo(dT)18 as primer. The target fragment of bFGF cDNA was amplified and then was linked with PGEM-T easy vector to construct recombinant plasmid with T-A clone method. Recombinant plasmids transformed to *E. coli* DH5 α were extracted with alkaline lysis method. Target plasmids in white colonies selected by ampicillin screening were linearized by EcoR I restrictive enzyme and had their specificity identified by DNA sequencing. According to the standard curves created by plasmid DNA, the expression level of target genes in samples have been determined using software. The results were presented as the ratios of target genes' mRNA to GAPDH' mRNA. **Results** The standard curve made by PGEM-T easy bFGF had good linear dependence, and it was sensitive and specific. The coefficient of variation values for both intra-experimental and inter-experimental reproducibility ranged from 1.03% to 4.09% and 2.24% to 4.46%, respectively. **Conclusion** The method for detecting rat bFGF mRNA expression with fluorescence quantitative polymerase chain reaction was developed successfully.

Key words: Basic fibroblast growth factor; SYBR Green I method; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; T-A clone method; Standard curve

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF)在骨缺损修复中起重要作用,其存在于骨基质内,是成骨细胞和成软骨细胞等许多

细胞的有丝分裂刺激原,可刺激微血管生成及成骨细胞的基因表达^[1,2]。本研究旨在建立大鼠 bFGF 基因荧光定量 PCR 的检测方法,以管家基因磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)为阳性对照,为进一步研究 bFGF 在骨重建中的作用机理奠定基础。

作者单位: 300070 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所 卫生部与天津市激素与发育重点实验室

通讯作者: 郭刚, Email: guoangtj@126.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

取 Wistar 大鼠骨组织置于液氮中,转存于 -80°C 超低温冰箱中,用于总 RNA 的提取。菌种为本室保存的 *E. coli* DH5 α 。PGEM-T easy 购自 Promega 公司。

1.2 试剂

Trizol Reagent、M-MLV 逆转录酶、Rnase Inhibitor 等购自 Invitrogen 公司;EcoR I 限制性内切酶、 λ -gal、IPTG、Taq DNA 聚合酶、Oligo (dt)18、dNTP mix、DL2000、Easy dilution 稀释液等购自大连宝生物有限公司。引物由 Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 仪器

Roche 公司荧光定量 PCR 仪 LightCycler, MJ 公司 PTC-200 梯度 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司 BioPhotometer 分光光度计,德国 Heraeus 公司 Contifuge 17RS 台式冷冻离心机和 Suprafuge 22 高速冷冻离心机, DH-2000 凝胶图像采集系统。

1.4 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

取约 100 mg 骨组织,采用 Trizol 一步法进行总 RNA 的提取,利用分光光度计检测浓度。取约 2 μg 总 RNA 提取液进行逆转录,体系含 100 $\mu\text{mol/L}$ Oligo (dt)18 1 μl , 10 mmol/L dNTPs 1 μl , 5 \times Buffer 4 μl , Rnase inhibitor 1 μl (40 U/ μl), 0.1 mol/L DTT 1 μl , 1 μl M-MLV (200 U/ μl), DEPC 水补齐至 20 μl 体系,混匀后短暂离心, 37°C 50 min,取出置 70°C 15 min,冰浴 2 min。 -20°C 保存备用。

1.5 目的片段引物的设计、合成

应用软件 Genrunner 根据 GenBank 所发布的序列 (GeneBank No. NM_019305) 及 (GeneBank No. NM_017008) 进行设计,引物跨越内含子,排除 DNA 干扰,目的片段 bFGF 长度为 152 bp,管家基因 GAPDH 长度为 161 bp,并经 NCBI BLAST 检索无显著同源性序列。引物用上海英骏生物技术公司负责合成。引物序列:

bFGF 上游 5'-AAGCAGAAGAGAGAGGAGTTG-3';

bFGF 下游 5'-CGGTAAGTGTGTAGTTATTGG-3';

GAPDH 上游 5'-ATGCTGAAGCTCGGTGTG-3';

GAPDH 下游 5'-AACTTGCCGTGGGTAGAG-3'。

1.6 重组质粒 PGEM-T Easy-bFGF 及 PGEM-T Easy-GAPDH 的构建

采用下述反应体系和条件应用 PCR 仪进行扩

增:上下游引物各 1 μl (10 mmol/L), dNTPs 0.5 μl (10 mmol/L each), RT 产物 1 μl , 10 \times Taq Buffer with Mg^{2+} 2.5 μl , ddH $_2\text{O}$ 18.8 μl , Taq 酶 0.2 μl (5 U/ μl) 轻轻混匀,短暂离心,按下述条件进行扩增: 95°C 预变性 5 min, 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环, 72°C 8 min。经胶回收的 PCR 电泳产物 3 μl 与 PGEM-T Easy 载体 4°C 连接过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂布于 λ -gal 和 IPTG 处理的含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37°C 倒置培养 16 h,经蓝白斑筛选, EcoR I 酶切初步鉴定,阳性克隆进行测序分析 (由上海英骏生物技术公司完成)。将筛选出的阳性菌株进一步扩增,应用 TIANGEN 公司超纯质粒快速小量提取试剂盒提取质粒。用 BioPhotometer 分光光度计测定重组质粒的浓度,将重组质粒浓度稀释为 1×10^{10} copies/ μl ,用宝生物的 Easy Dilution 稀释液将重组质粒做 10 倍梯度稀释, -20°C 保存备用。

1.7 标准曲线的建立与结果计算

20 μl PCR 反应体系: SYBR[®] Premix 10 μl ; Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μl ; Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μl ; cDNA Template 1 μl ; ddH $_2\text{O}$ 7.4 μl 。反应条件: 95°C 预变性 10 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 10 s, 72°C 延伸 10 s, 进行 40 个循环。温度变化速度为 20°C/s ,在每个循环的延伸末检测荧光信号。随后是一个缓慢升温的程序: 95°C 0 s, 65°C 15 s, 95°C 0 s, 温度变化速度为 0.1°C/s ,同时连续监测双链 DNA 逐渐变性过程中荧光信号的变化情况,绘制 PCR 产物的溶解曲线,以了解样品扩增的特异性,保障测定的结果的准确可靠。反应结束后电脑根据定量标准模板的扩增情况自动绘制标准曲线。根据各自的标准曲线,由软件自动计算出待测样品中 bFGF 基因或管家基因的准确含量。以同一样本中 bFGF 基因和管家基因含量的比值作为评价 bFGF 基因表达水平的指标。

2 结果

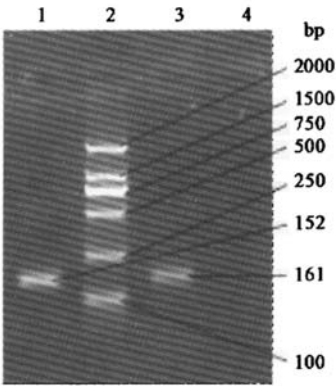
2.1 骨组织总 RNA 提取的结果

提取的 Wistar 大鼠骨组织总 RNA,吸光度 A_{260}/A_{280} 为 1.91, A_{260}/A_{230} 为 1.92,说明总 RNA 纯度较高,基本去除蛋白质和糖类等其他物质的污染。经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 28 S 与 18 S 的吸光度比值约为 2,说明总 RNA 的完整性较好,基本无降解。

2.2 bFGF 及 GAPDH cDNA 目的片段的制备

以提取的总 RNA 为模板,采用 cDNA 第一链合成法,以 Oligo d(18) 为引物合成 cDNA 第一链,用设

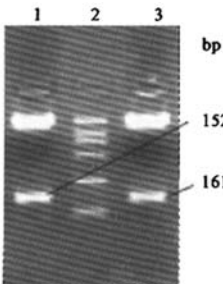
计的引物分别进行扩增 ,2% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,发现有特异的条带 (152 bp)及 (161 bp) ,结果见图 1。



1: pbFGF PCR 产物;2: DL2000 marker;
3: pGAPDH PCR 产物;4: 阴性对照
图 1 pbFGF 及 pGAPDH PCR 产物电泳图

2.3 重组质粒的酶切鉴定和 DNA 序列分析

bFGF 目的片段的长度为 152 bp ,GAPDH 目的片段的长度为 161 bp ,构建的重组质粒模板分别经 EcoR I 酶切后 ,出现一条约 3000 bp 的大片段和一条约 170 bp 的小片断及一条约 3000 bp 的大片段和一条约 180 bp 的小片断。与实验预期相符 ,即重组质粒中含有目的片段 ,结果见图 2。将测序结果与预期序列用 gene runner 软件进行比对 ,结果序列完全相同 ,说明目的片段已经成功重组与 PGEM-T easy 中并保持了序列的完整性。



1: pbFGF 酶切鉴定;2: DL2000 marker;3: pGAPDH 酶切鉴定
图 2 pbFGF 及 pGAPDH 重组质粒鉴定图

2.4 标准曲线和线性关系

反应体系中含 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝大鼠 bFGF 及 GAPDH 基因分子时 ,扩增反应 Ct 值与拷贝数的对数呈线性关系 ,标准曲线回归方程分别为 $y = -3.3761gx + 38.69$, $y = -3.362x + 39.56$,其中 y 为 Ct 值 ,x 为质粒模板拷贝数以 10 为底的对数 ,见图

3。标准曲线显示出相关系数为 1.00。通过斜率可以计算出 PCR 反应的扩增效率(E) ,依据公式 $E = 10^{-1/slope} - 1$,计算出扩增效率分别为 97% 和 98%。

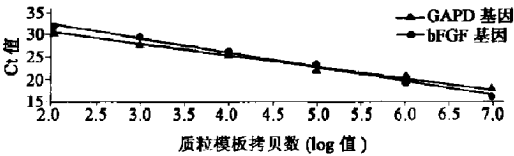


图 3 大鼠 bFGF 及 GAPDH 基因的标准曲线

2.5 标准曲线的灵敏性及溶解曲线分析

将 bFGF 基因和 GAPDH 基因标准品做梯度稀释 ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$) ,进行荧光定量 PCR ,得到系列曲线 ,至 1×10^2 拷贝时仍有特征性扩增曲线 ,呈明显的“S”型 ,说明用此引物通过荧光定量 PCR 测定鼠 bFGF 基因及 GAPDH 基因敏感性好 ,见图 4。溶解曲线只见一特异性峰 ,说明此引物特异性高 ,见图 5。

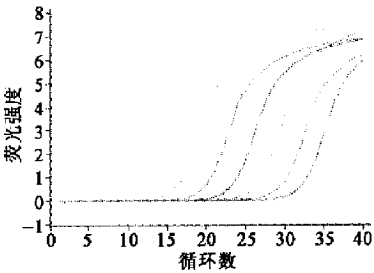


图 4 大鼠 bFGF 基因的荧光定量 PCR 的扩增曲线

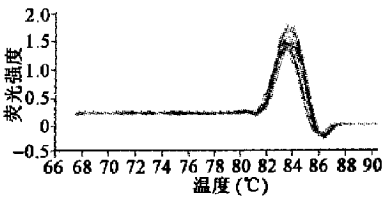


图 5 大鼠 bFGF 基因的荧光定量 PCR 的溶解曲线

2.6 重复性

将系列稀释的质粒标准品 ,用荧光定量 PCR 重复测定 3 次 ,每次每个稀释度重复 3 管。结果表明 ,用该方法检测的批内和批间变异系数(CVs%) 分别为 1.03 ~ 4.59 以及 2.24 ~ 6.46 ,说明该方法具有较好的可重复性及再现性。

3 讨论

基于 SYBR Green I 技术的实时荧光定量 PCR 是目前定量检测核酸较准确的一种方法^[3]。SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染

料。其与双链 DNA 结合后,荧光大大增强。因此,SYBR Green I 的荧光信号强度与双链 DNA 的数量相关,可以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量。由于 SYBR Green I 没有特异性,不能识别特定的双链,只要是双链就会结合发光,对 PCR 反应中的非特异性扩增或引物二聚体也会产生荧光,通常本底较高,会有假阳性发生。目前产物的非特异性扩增以及引物二聚体的问题可以通过溶解曲线的分析得以解决。因此,根据样品的 Ct 值参照标准曲线,经软件分析处理后可以精确的计算出样品的拷贝数。由于 SYBR Green I 能与所有的双链 DNA 相结合,所以对不同模板的不需要特别定制不同的特异性探针,通用性较好,并且价格相对较低。因此,国内外在科研中使用比较普遍^[4,6]。

荧光定量 PCR 检测方法分为绝对定量和相对定量^[7]。绝对定量适用于标准品和样品性质一样,如 RNA 作标准测定 RNA 病毒载量。相对定量时标准品和样品性质不同,如 cDNA 作标准测定 mRNA 表达。相对定量有两种方法:①标准曲线法,即重组质粒作标准系列稀释,测定样品绝对数量,再与管家基因作比值进行归一。优点是每次作标准品对照使批间结果更为可靠,通过与管家基因的归一化,有效地纠正了 RNA 提取得率和逆转录效率的差异,缺点是费时、费力。②比较 Ct 法,即比较处理组和未处理组基因表达的相对水平,也就是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。优点是不需构建标准品,节省时间、试剂,缺点是必须确定待测基因和看家基因的扩增效率,效率接近时结果才可靠,否则不能用。

本实验采用 SYBR Green I 法成功建立了检测大鼠 bFGF 基因和 GAPDH 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线,扩增曲线的 Ct 值在 16.16~31.87 有很好的线性关系,呈明显的“S”型,而且在平台期几乎重合,说明获得的扩增曲线良好^[8]。溶解曲线分析显示出 bFGF 基因 PCR 产物在 84℃左右有一单一的特异峰,GAPDH 基因 PCR 产物在 85℃左右有一单一的特异峰,峰的形状比较锐利,说明没有引物二聚体及非特异扩增产物,引物的特异性很好。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。本实验的标准曲线的相关系数为 1.00,表明试验的结果可信度高,误差小,斜率可以计算出扩增效率,理想的扩增效率在 $0.8 < E < 1.2$ 范围内,本实验的 E 为 0.96 和 0.98,符合要求。标准曲线的线性范围从 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 说明本实验建立的方法能够在宽广的范围内对目的基因进行检测,从而认为本实验获得的标准曲线是理想的。

本实验建立的大鼠 bFGF 基因荧光定量 PCR 的检测方法具有扩增效率高,特异性强,灵敏度高,Ct 值线性范围广,可重复性好的特点,为下一步研究大鼠 bFGF 基因表达调控的分子机制及其在骨缺损修复中的作用机制奠定了基础。

【参 考 文 献】

- [1] Power RA, Lwaniec UT, Wronski TJ, et al. Changes in gene expression associated with the bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in aged ovariectomized rats. *Bone*, 2002, 31(1):143-148.
- [2] Spector JA, Greenwald JA, Warren SM, et al. Dura mater biology: auto-crine and paracrine effects of fibroblast growth factor 2. *Plast Reconstr Surg*, 2002, 109(2):645-649.
- [3] Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advan Physiol Educ*, 2005, 29:151-150.
- [4] Bustin SA. Quantitation of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Mol Endocrinol*, 2002, 29:23-39.
- [5] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*, 2002, 8:257-260.
- [6] Luu-The V, Paquet N, Calvo E, et al. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques*, 2005, 38:287-293.
- [7] Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Immunological Methods*, 2003, 278:261-269.
- [8] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. *Molecular Endocrinology*, 2005, 34:597-601.

(收稿日期:2007-07-09)