

文章编号: 1001-4721 (2013)04-0010-04

以梅花鹿 P21 基因为模板比较相对和绝对荧光定量 PCR 的准确性

王大涛, 郭倩倩, 朱宏伟, 刘振, 王桂武, 李春义^{*}

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

摘要: 实时荧光定量 PCR 是具有高度灵敏度和特异性的核酸分析技术, 以 SYBR Green 染料法为基础的相对定量和绝对定量检测方法, 由于操作简单、成本较低而倍受青睐。本试验以梅花鹿 P21 基因为待检测基因, 以 β -actin 作为内参基因, 对不同浓度稀释的模板进行相对实时荧光定量 PCR 检测, 然后分别对 P21 基因和 β -actin 基因进行绝对定量检测。结果表明, 绝对定量的结果比相对定量结果更准确可靠, 相对定量在模板 256 倍稀释后出现较大偏差, 在模板浓度较低(低于 1 000 拷贝)时 2 种方法都会出现较大误差。因此, 建议尽量用绝对定量检测目的基因, 当模板浓度太低时建议对样品进行浓缩处理。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 相对定量; 绝对定量; P21

中图分类号: Q781

文献标识码: A

Comparative Studies between Relative and Absolute PCR Value Using Sika Deer P21 Gene as an Example

WANG Da-tao, GUO Qian-qian, ZHU Hong-wei, LIU Zhen,

WANG Gui-wu, LI Chun-yi^{*}

(Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: Real time fluorescent quantitative PCR is a highly sensitive and specific nucleic acid analysis technique, relative and absolute quantifications using SYBR Green dye are used widely because of simple operation and low cost. In this study, we detected P21 gene of sika deer using qPCR and β -actin gene was used as an internal control. Samples were diluted to different concentrations and the relative and absolute values of P21 and β -actin genes were determined separately. The results showed that overall absolute quantification was more accurate and more reliable compared to the relative quantification, as the relative quantification showed a large deviation at $\times 256$. Both methods showed big deviations when the template concentration was very low (lower than 1 000 copies). Therefore, we suggest that using absolute quantification whenever possible, and concentrating samples when the copies target genes are too low.

Key words: real time fluorescent quantitative PCR; relative quantification; absolute quantification; P21

实时荧光定量 PCR 方法是对基因进行 PCR 扩增、实时荧光信号检测和定量的核酸检测方法, 它的主要依据是在 PCR 扩增过程的指数增长期, 模板的起始浓度与 Ct 值(到达设定荧光信号强度 PCR 的循环数)存在线性关系^[1]。在目的基因 mRNA 水平检测和细菌、病毒粒子浓度检测方面应用广泛^[2]。由于建立在 PCR 基础上, 能精确测量和鉴别非常微量

的特异性核酸, 从而可通过监测值而实现对原始目标基因的含量定量。根据荧光信号的来源不同对荧光定量的方法进行划分, 包括荧光标记探针法、SYBR Green 染料法和最新出现的一种 dsDNA 结合染料 LC Green TM I^[3]。

SYBR Green I 是一种结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。在游离状态

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 973 前期专项(2011CB111515); 国家自然科学基金(31170950); 吉林省自然科学基金(201115129)

作者简介: 王大涛(1984-), 男, 山东临沂人, 硕士, 从事鹿茸生物学研究。

^{*}通讯作者: 李春义, E-mail: chunyi.li@agresearch.co.nz.

下发出微弱的荧光,但一旦与双链 DNA 结合后,荧光大大增强。与其他标记方法相比,SYBR Green I 染料法操作方便、成本低、应用广泛。荧光定量依据定量的标准分成绝对定量和相对定量。绝对定量指用已知的标准曲线来推算未知的样本量;相对定量指通过内参基因比较不同样品中目的基因的差异^[4],通常选作内参的是 β -actin、GAPDH 等管家基因^[5],它们在细胞中表达量比较恒定,受外界影响较小。本试验分别利用绝对定量和相对定量测定同种模板的同种基因,并对模板进行梯度稀释,对2种方法测定的结果进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

梅花鹿角柄骨膜细胞(本实验室保存);DMEM、FBS(Gibco 公司);RNA 提取试剂盒离心柱型、RT-PCR Kit(宝生物工程大连有限公司);SYBR Green QPCR Kit(Qiagen 公司)。

1.2 细胞培养、RNA 提取与反转录

复苏冻存的角柄骨膜细胞^[6],37℃迅速融化后,加入含有 10mL DMEM 的离心管中,1 000r/min 离心 5min。弃上清后,用 10mL 完全培养基(10% FBS, 100mg/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素)悬浮后移入 10cm 细胞培养皿中,37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。根据试剂盒提供的操作手册提取角柄骨膜细胞总 RNA。利用紫外分光光度计测定样品 RNA 在 OD_{260/280nm} 处的吸光度,计算总 RNA 浓度。

1.3 cDNA 合成

配制 40 μ L 反转录体系,包含 Oligo dT 2 μ L、dNTP Mixture 2 μ L、总 RNA 2 μ g、加 RNase Free H₂O 至 20 μ L,PCR 65℃变性 5min,4℃保存。继续加入 5 $\times$ PrimeScrip Buffer 8 μ L、RNase Inhibitor 1 μ L、RTase 1 μ L、RNase Free H₂O 至 40 μ L。PCR 42℃ 20min,95℃ 5min,4℃保存。

1.4 相对定量

根据荧光定量引物设计法则设计 β -actin 和 P21 引物:

上游 P21 5'-GACCACTTGGACCTGTGCT-3'

下游 P21 5'-GGGTTAGGGCTTCTCTTGG-3'

上游 β -actin 5'-GCGTGACATCAAGGAGAAGC-3'

下游 β -actin 5'-GGAAGACGGCTGAAGA-3'

反转录所得的 cDNA 进行梯度 $\times 4$ 、 $\times 16$ 、 $\times 64$

和 $\times 256$ 稀释。配制荧光定量 PCR 反应体系,同样的模板分别设有内参组和样品组,每个样品设置 3 个重复。上、下游引物各 1 μ L,模板 1 μ L,2 $\times$ QuantiTect SYBR PCR Mix 25 μ L, RNase Free H₂O 22 μ L。荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应,热激活 95℃ 15min,循环 40 次,变性 94℃ 15s,退火 50~60℃ 30s,延伸 72℃ 32s。添加溶解曲线,默认设定为 95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s,60℃ 15s。利用仪器自带的软件对结果进行分析。

1.5 绝对定量

以 cDNA 为模板进行普通 PCR 扩增,分别扩增 β -actin 和 P21,凝胶电泳回收 150~200bp 条带,紫外分光光度计测定回收的 DNA 浓度,根据片段大小计算模板数量,一次稀释到 10⁸/mL、10⁷/mL、10⁶/mL、10⁵/mL、10⁴/mL、10³/mL,以这些稀释的 DNA 为模板,配制荧光定量 PCR 反应体系(同“1.4”项),每个浓度设置 3 个重复,制作标准曲线^[7]。以梯度稀释的 cDNA 模板为待检测样品进行绝对定量,反应体系配制同上。

2 结果

2.1 相对定量结果

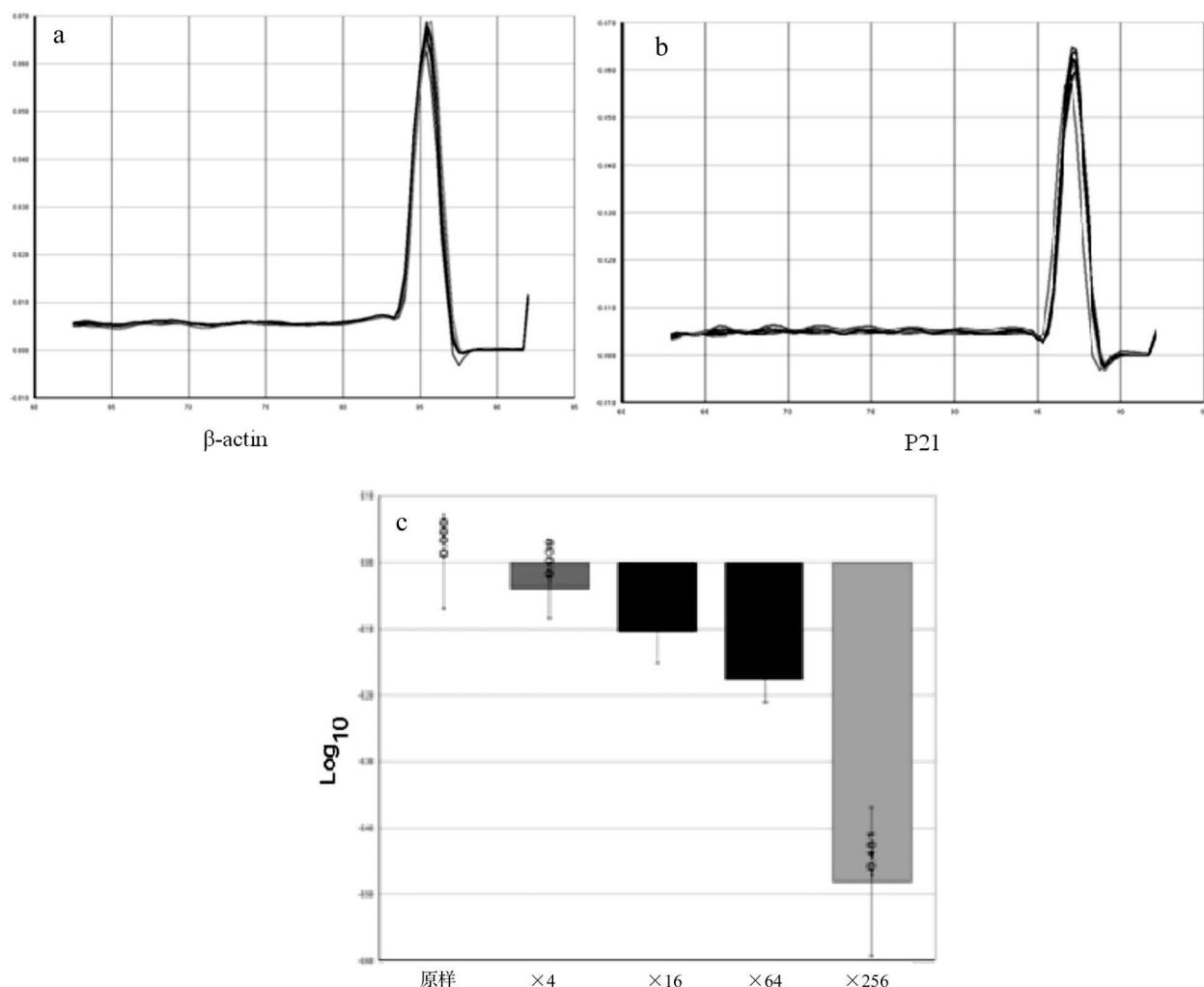
由溶解曲线可以看出,2 种引物的特异性比较好,P21 扩增产物的 T_m 值为 87.6, β -actin 扩增产物的 T_m 值为 85.9,扩增条带均为单一峰(图 1-a,图 1-b)。相对定量值随着模板浓度的稀释而逐渐降低(图 1-c)。

2.2 绝对定量结果

2 个基因的扩增效率接近 P21 为 99.2%, β -actin 为 98.5%。P21 几乎所有的浓度都体现在标准曲线上,相关系数 R 为 99.6%(图 2-a); β -actin 的标准曲线的可信度达到 98.9%,也可以满足实验要求(图 2-b)。绝对定量结果显示,P21 基因的表达量大约相当于 β -actin 的一半,随着模板浓度的稀释,2 个基因的表达量也呈梯度下降(图 2-c,图 2-d)。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术广泛地应用于分子生物学和医学研究领域。本试验分别利用绝对定量和相对定量 2 种荧光定量方式对梅花鹿 P21 基因进行测定。绝对定量随着模板浓度的稀释,无论是 P21 基因还是 β -actin 基因均呈梯度下降,与已知的稀释倍数相近,符合实验预期;相对定量的测定结果也



a. β -actin 溶解曲线; b. P21 溶解曲线; c. 相对定量数据

a. dissolutional curve of β -actin; b. dissolution of P21; c. Value of relative quantification

图 1 相对定量结果

Fig. 1 Results of relative quantification

随着模板浓度的稀释有所下降, 而根据相对定量的计算原理, 同一个样品, 待测基因相对于内参基因的比值是不应该因为样品稀释而改变的, 但是我的测定结果却呈下降趋势, 稀释倍数越大偏离得越多, 特别在稀释到 256 倍时, 测定浓度是样品浓度的 31.8%。推测可能随着模板数的减少, PCR 反应的循环数相应地增加, 原本就存在于内参基因和待测基因之间的扩增效率差异被不断放大, 造成测定值的偏离。相对定量是在默认内参基因和待测基因扩增效率一致的基础上的^[8], 这就要求筛选引物时应尽量保持扩增效率的一致, 以避免因此带来的误差。

比较这 2 种定量方式, 得出绝对定量的结果更准确可靠。这一结论与朱振洪^[9]利用 2 种方法检测大

鼠缺氧后 Caspase-3 基因的结论一致。但是绝对定量需要首先获得已知浓度的标准品, 本试验首先利用普通 PCR 扩增, 通过电泳和切胶回收目的片段作为标准品, 应用效果很好。绝对定量相比于相对定量操作比较繁琐, 为了获得一条比较准确的标准曲线, 可能需要重复多次, 但是能否提供一个可靠的实验结果应该是衡量一种检测方法优劣最重要的标准。

参考文献

- [1] Fernandez M, del Rio B, Linares DM, et al. Real-Time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production[J]. Journal of dairy science, 2006, 89(10): 3763-3769.

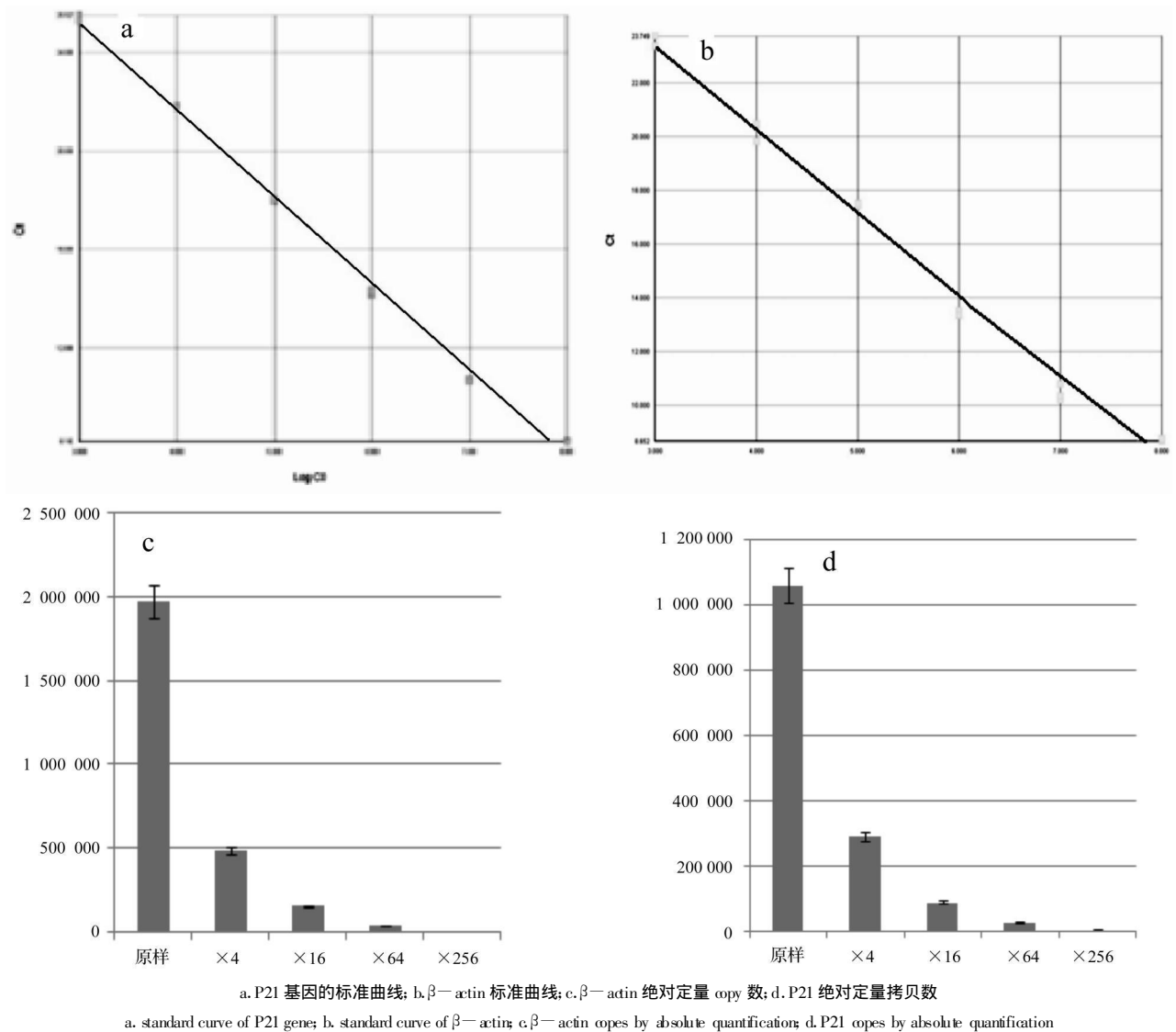


图 2 绝对定量结果

Fig 2 Results of the absolute quantification

- [2] Baigent SJ, Petherbridge LJ, Howes K, et al. Absolute quantitation of maret's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR[J]. Journal of virological methods, 2005, 123(1): 53- 64.
- [3] 赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16 (4): 6.
- [4] Zimmernann B, Holzgreve W, Wenzel F, et al. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21[J]. Clinical chemistry, 2002, 48(2): 362- 363.
- [5] Tsuji N, Kamagata G, Funaya M, et al. Selection of an internal control gene for quantitation of mrna in colonic tissues[J]. Anti-cancer research, 2002, 22(6): 4173- 4178.
- [6] 孙红梅, 邢秀梅, 丛波, 等. 鹿茸干细胞体外培养技术的研究[J]. 经济动物学报, 2007, 11(1): 4.
- [7] Kuhne BS, Oschmann P. Quantitative Real-time Rti- Pcr using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis[J]. BioTechniques 2002, 33(5): 1078- 1080- 1072, 1084.
- [8] 李敏, 汪洋, 李银萍, 等. Taqman 探针与 SYBR- Green 实时定量 pcr 法检测转基因植物外源基因拷贝数的差异分析[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(4): 3.
- [9] 朱振洪, 李金辉, 万海同. 不同荧光定量 pcr 分析方法检测大鼠脑缺血再灌注损伤中 caspas- 3 基因的表达研究[J]. 激光生物学报, 2011, 20(3): 7.