

人参 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立

侯双利, 韩 梅, 刘翠晶, 杨利民*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 建立人参 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 的方法。方法 根据 GenBank 上其他高等植物 β -actin 基因保守区域设计一对特异性引物, 将从人参中 PCR 扩增得到的 β -actin 基因克隆到 pMD20-T 载体上构建重组质粒, 经 1/10 梯度稀释后用于制定标准曲线, 并进行反应的灵敏性、特异性和重复性试验。结果 该方法检测 β -actin 基因的最低拷贝数为 43 拷贝/ μ L, 在较广的范围内 ($43 \sim 4.3 \times 10^7$ 拷贝/ μ L) 有良好的线性关系 ($R^2 = 0.9953$); 溶解曲线分析显示扩增产物为特异性单峰, 其 T_m 值为 $(84.51 \pm 0.01)^\circ\text{C}$; 5 个不同浓度对照品组内试验变异系数为 0.58%~2.79%, 组间试验变异系数为 2.61%~4.41%。结论 该方法具有快速、灵敏、特异、高通量及重复性强等优点, 为 β -actin 基因作为内参基因进行人参功能基因表达的定量分析提供了方法学基础。

关键词: 人参; 内参基因; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; SYBR Green I

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)17-2530-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.020

Development of real-time fluorescence quantitative RT-PCR assay for β -actin gene of *Panax ginseng*

HOU Shuang-li, HAN Mei, LIU Cui-jing, YANG Li-min

College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To construct a real-time fluorescence quantitative RT-PCR method for the β -actin gene of *Panax ginseng*. **Methods** According to the β -actin gene of other higher plants available in Genbank, A pair of primers weredesigned and the amplified fragment of β -actin gene was linked with pMD20-T vector to construct recombinant plasmids. Then the positive plasmids were diluted and the standard curve was established. The sensitivity, specificity, and repeatability were detected. **Results** The results showed that the lowest copy number for detection of β -actin gene with this method was 43.0 copies/ μ L, and there was a good linear relationship in a wide range from 43 to 4.3×10^7 copies/ μ L ($R^2 = 0.9953$). The melting curve showed a single peak with the temperature of $(84.51 \pm 0.01)^\circ\text{C}$. The coefficient of variation (CV) of five different concentration of positive plasmids was 0.58% to 2.79% and 2.61% to 4.41% in intra-assay and inter-assay, respectively. **Conclusion** The method established in this paper has the advantage of rapidity, sensitivity, specificity, high throughput, and good repeatability, which provides a methodological basis for the quantitative analysis on the functional genes of *P. ginseng* when β -actin gene is taken as a reference gene.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; reference gene; gene cloning; real-time fluorescence quantitative PCR; SYBR Green I

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR) 是 20 世纪 90 年代兴起的一种准确、快速的核酸定量分析技术^[1], 是定量研究基因表达最为有效的方法之一^[2-4]。它是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知浓度的样品进行定量分析^[5]。它分为相对定量和绝

对定量, 在相对定量检测中, 对来自不同样本中特定基因的 mRNA 表达量进行比较分析时, 理想的条件是不同样品之间的起始细胞数目、RNA 提取效率及目的基因扩增效率等都相同, 但实际上这些条件不可能同时得到满足^[6]。因此, 需要同时对不同样本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。内参基因通常是指在不同发育

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270371); 国家科技支撑计划项目 (2011 BA I03B01-02); 吉林省科技成果转化项目 (20125068)

作者简介: 侯双利 (1989—), 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生态学。

*通信作者 杨利民 Tel: (0431)84533276 E-mail: ylmh777@126.com

阶段和不同组织细胞中均恒定表达的管家基因,常用的内参基因有 β -actin、GAPDH、UBC、Tub、TBP 及 ABL 基因等。其中, β -actin 基因作为内参基因被广泛使用,它是构成细胞骨架的主要组成成分,具有基因序列高度保守、mRNA 表达量高且稳定的特点^[7-11]。人参 β -actin 基因作为人参实时荧光定量 PCR 的内参基因尚未见报道,本研究根据 GenBank 中其他高等植物的 β -actin 基因保守区域设计一对引物,建立了人参 β -actin 基因的实时荧光定量 PCR 方法,为以 β -actin 基因作为内参基因进行人参功能基因的表达差异研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

五年生人参取自吉林省抚松县抚南林场(42°03'06" N、127°33'21" E),经吉林农业大学中药材学院杨利民教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer。实验所用部位为人参主根。

1.2 主要试剂与仪器

植物 RNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司,反转录试剂盒、2×Power Taq PCR Mastermix、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒等均购自北京百泰克生物科技有限公司,SYBR Premix ex Taq 试剂盒、LB 培养基购自宝生物工程(大连)有限公司, JM109 感受态菌株购自北京鼎国生物技术有限公司。

荧光定量 PCR 仪(Mx3000P, 美国);凝胶成像系统[Tanon Gis 2010, 天能科技(上海)有限公司];普通 PCR 扩增仪(Gene Amp 9700, 西班牙);核酸蛋白质检测仪 DU800(Beckman, 美国);MDF-382E 超低温冰箱(Sanyo, 日本)。

2 方法

2.1 引物设计与合成

通过对刺五加(KC469585)、陆地棉(AY305726)、葡萄(FQ383380)、桦树(FJ410442)、芍药(JX310002)、白杨(EF418792)、油桐(JQ680035)等几种植物的 β -actin 基因核苷酸序列进行同源性比较,找出高度保守区的片段,根据引物设计原则,利用 DANMAN 和 Primer 5.0 生物软件设计一对特异性定量 PCR 引物 F、R,用于扩增人参 β -actin 基因片段,推测目的片段的长度为 140 bp 左右。引物由生工生物工程上海有限公司合成,正向:5'-GGCATCACACTTTCTACAACG-3',反向:5'-GGCAGGAACATTAAAGGTTTC-3'。

2.2 总 RNA 提取与反转录

人参根部总 RNA 提取方法按照试剂盒说明书操作,并以提取的总 RNA 为模板,以 Oligo-dT 为引物,将 RNA 反转录合成 cDNA,保存于-20℃。

2.3 β -actin 基因目的片段扩增、克隆及鉴定

2.3.1 目的片段 PCR 扩增 以反转录合成的 β -actin cDNA 为模板,进行普通 PCR 扩增。反应体系为 20 μ L: ddH₂O 8 μ L, 2×Taq PCR Mastermix 10 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 反转录产物 1 μ L。PCR 反应程序: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 15 s, 进行 33 个循环,最后 72℃延伸 10 min。取 5 μ L 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶电泳上检测,目的片段回收和纯化按照回收试剂盒说明书操作。

2.3.2 克隆与转化 将纯化产物与 pMD20-T Vector 连接,体系为 10 μ L: 目的片段 3 μ L, pMD20-T Vector 1 μ L, ddH₂O 1 μ L, Solution I 5 μ L, 16℃反应 30 min。将连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,涂布于含 X-gal 和 IPTG 且具氨苄青霉素(Amp)抗性的 LB 琼脂平板培养基上,37℃倒置培养 13~16 h 至平皿上长出蓝白菌落。

2.3.3 阳性克隆的 PCR 鉴定及测序 挑取白色菌落接种于 LB(Amp)液体培养基中,37℃振荡培养过夜,以菌液为模板进行 PCR 扩增鉴定,并将 PCR 检测为阳性克隆的菌液送生工生物工程上海有限公司进行测序。

2.4 SYBR Green I RT-PCR 方法的建立

2.4.1 阳性对照品的制备 含目的片段的重组质粒经 PCR 扩增和测序鉴定后,采用质粒提取试剂盒提取质粒,用核酸蛋白质检测仪检测并准确定量,换算出单位体积的拷贝数,即为 β -actin 阳性的对照品。

2.4.2 反应体系的优化 采用 SYBR Green I 染料法,在 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析,以得到最小 C_t 值和最大的荧光值(ΔR_n)为标准,分别对退火温度、引物浓度、循环条件(2步法和 3步法)进行优化,确定最佳扩增条件。优化后的反应体系为 25 μ L: 去离子水 9.5 μ L, SYBR Premix ex Taq 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, Rox Reference Dye II 0.5 μ L, cDNA 2 μ L; 反应条件: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 15 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 15 s, 进行 40 个循环。

2.4.3 熔解曲线分析 为排除引物二聚体及非特异性扩增产物对 RT-PCR 结果的影响,在 PCR 后进行熔

解曲线分析以确定得到的产物是否为目的产物,温度以 0.5 °C/10 s 的速率从 55 °C 缓慢递增至 95 °C,连续测定样品的荧光强度以获取熔解曲线。

2.4.4 标准曲线的建立 以定量的阳性对照品进行 10 倍系列稀释作为模板,采用优化好的条件进行 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR。

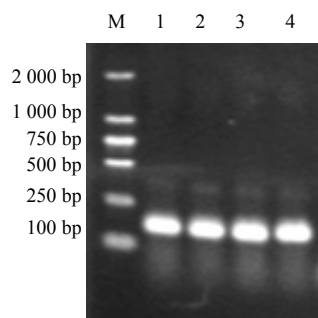
2.5 可重复性评价

分别对 5 个不同浓度的阳性对照品及 2 个阴性对照品(以水为模板)在同一次扩增中进行 4 次重复测定,计算每个样品各反应管之间的批内变异系数;对上述样品分别进行 4 次测定(各相隔 1 周),计算同一样品每次测定结果之间的组间变异系数。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增

人参根部总 RNA 经反转录合成 cDNA 后,进行常规 PCR 后,得到约 140 bp 大小的目的片段,与预期结果一致(图 1)。



M-Marker 1~4-目的片段
M-Marker 1~4-target fragment

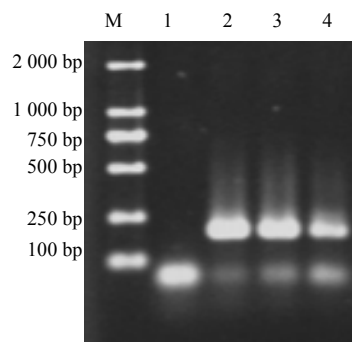
图 1 β -actin 基因的 RT-PCR 结果
Fig. 1 RT-PCR of β -actin gene

3.2 目的片段的克隆与鉴定

回收目的片段进行 T-A 克隆,经转化大肠杆菌 JM109,然后对阳性克隆菌液进行 PCR 扩增鉴定,电泳结果得到约 140 bp 左右的条带,与预期结果一致(图 2)。对 β -actin 基因阳性克隆进行测序,发现阳性克隆中含 137 bp 的外源碱基,经序列比对,证实与其他高等植物 β -actin 基因核苷酸序列同源性达到 92%,说明重组质粒构建正确,可作为建立荧光定量 RT-PCR 方法的阳性对照品。

3.3 熔解曲线分析

将荧光定量 RT-PCR 产物进行熔解曲线分析(图 3), β -actin 基因片段在 $T_m = (84.51 \pm 0.01) ^\circ\text{C}$



M-Marker 1-阴性对照 2~4-阳性克隆
M-Marker 1-negative control 2~4-target fragment

图 2 菌液 PCR 鉴定结果

Fig. 2 PCR identification of bacteria liquid

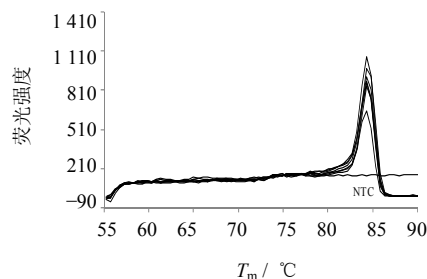


图 3 β -actin 基因的熔解曲线

Fig. 3 Melting curve of β -actin gene

处显示特异性单峰,说明扩增产物无引物二聚体及非特异性扩增,证实了引物设计的合理性和特异性。

3.4 标准曲线的建立

本实验 β -actin 阳性对照品原始质量浓度为 14.14 $\mu\text{g/mL}$,换算成拷贝数即 4.3×10^9 拷贝/ μL 。将定量的阳性对照品进行 10 倍系列稀释,以优化好的条件进行荧光定量 RT-PCR 扩增,得到的扩增曲线(图 4)和标准曲线结果显示。以 C_t 值为纵坐标(Y),以稀释倍数的对数为横坐标(X)建立相对定量标准曲线,回归方程为 $Y = -3.3398X + 30.989$ 。该方法检测的 β -actin 最低拷贝数为 43 拷贝/ μL ,在 $43 \sim 4.3 \times 10^7$ 拷贝/ μL 有良好的线性关系($R^2 = 0.9953$),扩增效率为 99.3%。

3.5 可重复性评价

对线性范围内的 5 个不同质量浓度进行了批内检测和批间检测,计算出组内变异系数和组间变异系数。结果显示, β -actin 阳性对照质粒组内试验变异系数为 0.58%~2.79%,组间试验变异系数为 2.61%~4.41%,表明该方法具有良好的重复性。

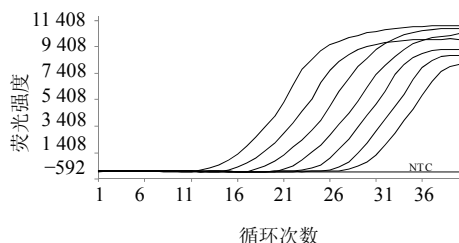


图4 β -actin 基因的扩增曲线

Fig. 4 Amplification curve of β -actin gene

4 讨论

RT-PCR 技术是分析目的基因转录水平最为敏感的方法,与传统的定量方法如 Northern blotting、竞争性 PCR、RT-PCR 半定量检测相比,具有重复性好、灵敏度高、定量准确、速度快等优点,能对 mRNA 进行准确定量^[12]。SYBR Green I 是一种 DNA 结合染料,能非特异性地掺入到双链 DNA 中去,在游离状态下,SYBR Green I 不发出荧光,但结合到双链 DNA 中以后,便可以发出荧光^[13]。然而,由于其能与任意 DNA 双链结合,并可用于任意反应体系中,所以一旦反应体系中出现非特异性扩增,就会影响到定量结果的准确性与稳定性^[14]。因此对引物的设计和反应体系的优化显得尤为重要。

RT-PCR 分为绝对定量和相对定量,绝对定量是根据已知标准曲线来检测未知样品的精确拷贝数^[15];相对定量只比较不同样本之间基因表达差异,不对基因表达水平进行精确的拷贝数计算。相对定量通常需要内参基因作为对照,以此对目的基因进行校正和标准化,进而减少不同样本间 RNA 提取效率、逆转录及扩增效率的差异对定量结果带来的误差,提高相对定量结果的可靠性和重复性。因此,内参基因在荧光定量 RT-PCR 技术对目的基因进行相对定量和定性分析中起着至关重要的作用。

β -actin 基因常作为内参基因对定量结果进行校正,但目前尚未见到有关人参 β -actin 基因用于荧光定量 PCR 分析的报道。近年来,随着对人参各种功能基因的克隆和测序的完成,对这些基因在不同种组织细胞及不同个体中表达水平的定量分析,有助于阐明这些基因的功能及其与参药效成分含量的关系,进而有利于选育优良品种,增加人们对参主要药效成分生物合成途径的分子机制的认识。因此,为了给人参基因表达的定量分析提供必要的方法手段,本研究建立了基于 SYBR Green I 染料技术的人参 β -actin 基因 RT-PCR 方法。实验结果表明,

所建立的方法具有用时短、高通量、扩增效率高、线性范围广及重复性强等优点,为 β -actin 作为内参基因对人参相关基因 mRNA 水平的荧光定量 PCR 分析提供了有力的方法学基础。

参考文献

- [1] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(4): 413-417.
- [2] Dussault A A, Poullot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR [J]. *Biol Proced*, 2006, 8(1): 1-10.
- [3] Budhia S, Haring L F, Mcconnell I, *et al.* Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 309(1/2): 160-172.
- [4] Dallas P B, Gottardo N G, Firth M J, *et al.* Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR-how well do they correlate [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6(1): 59.
- [5] Montgomery R A, Dallman M J. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic ontogeny [J]. *Cytokine*, 1997, 9(10): 717-726.
- [6] Radonic A, Thulke S, Mackay I M, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 856-862.
- [7] 贺淹才. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2002, 22(3): 248-250.
- [8] Neuvians T P, Gashaw I, Sauer C G, *et al.* Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis [J]. *J Biotechnol*, 2005, 117(2): 163-171.
- [9] Dominguez R, Holmes K C. Actin structure and function [J]. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 169-186.
- [10] 范丙友, 李芳, 张文婷, 等. 芍药肌动蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2136-2142.
- [11] 邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 等. 刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1819-1822.
- [12] Haller F, Kulle B, Schwager S, *et al.* Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization [J]. *Anal Biochem*, 2004, 335: 1-9.
- [13] Woo T H, Patel B K, Cinco M, *et al.* Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 35: 23-30.
- [14] Chris H, Philippa L, Severine T, *et al.* Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR [J]. *J Virol Methods*, 2002, 106: 241-244.
- [15] Dhanasekaran S, Doherty T M, Kenneth J, *et al.* Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification [J]. *J Immunol Method* 2010, 354(1/2): 34-39.