

实时荧光定量 PCR 检测三七 SS 基因表达的初步实践

朱 华¹, 吴耀生²

(1. 桂林医学院 生物化学与分子生物学教研室, 广西 桂林 541004; 2. 广西
医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 南宁 530021)

摘 要: 运用含有 SYBR Green I 的 Real Time RT-PCR 法分析 SS 基因在一年生三七根、茎、芦头 3 个部位中
转录水平的相对表达差异。统计分析表明 SS 基因在根中的表达量最高。本研究取得了特异性高、重复性好的
结果, 标准曲线斜率均在 -3.33~ -4 范围内, 扩增效率均在 95%~100% 之间, 熔解曲线分析显示产物特异性的
单一峰, 为 Real Time RT-PCR 技术用于三七植物基因的差异表达分析建立了相应的技术平台。

关键词: Real Time RT-PCR; 三七; SS 基因; 表达差异

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)05-0703-05

Initial practice of Real Time PCR for the expression of SS gene in *Panax notoginseng*

ZHU Hua¹, WU Yao-Sheng²

(1. Department of Biochemistry, Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 2. Department of
Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: The total RNA was isolated from root, stem and rootstock of one-year-old *Panax notoginseng* respectively.
Then, the transcripts of SS gene in the three tissues were assayed by SYBR Green I Real Time RT-PCR. The results
revealed that SS gene is highest expressed in root. In this research, the results showed high specificity and stability
with the standard curve slope between -3.33 and -4; the PCR efficiency between 95% - 100%; and the exclusive peak
in melting curve. All these would make the technique goes smoothly in the analyzing of the differential expression in
P. notoginseng.

Key words: Real Time RT-PCR; *Panax notoginseng*; SS gene; differential expression

实时荧光定量 PCR 技术是近两年来迅速得到
广泛应用的一项 PCR 实时检测技术。该技术具有
效率高、灵敏度大、可实现高通量及进行多重 PCR
等优点, 已在多个领域得到相当广泛的应用, 如基因
组 DNA 的定量、基因表达的研究、基因芯片分析结
果的复证、转基因品种中外源基因拷贝数的检测等。

鲨烯合酶(Squalene Synthase, EC 2.5.1.21, 简
称 SS)催化两分子的法呢基焦磷酸(*Farnesyl pyro-*

phosphate, 简称 FPP) 缩合产生鲨烯(SQ), 后者是
生物合成三萜、甾醇、胆固醇等萜烯类重要物质的共
同前体(Jennings 等, 1991; 李季伦等, 1993)。有学
者指出, 鲨烯合酶催化了萜烯类物质生物合成的第
一个关键步骤(Braga 等, 2004; Seo 等, 2005)。因
而, 鲨烯合酶的研究倍受重视, 本文采用实时荧光定
量 PCR 技术研究三七 SS 基因在不同器官的表达差
异, 为进一步从转录水平上揭示该基因的表达与三

收稿日期: 2007-07-23 修回日期: 2007-12-30

基金项目: 广西科学基金(0575065)[Supported by Provincial Science Foundation of Guangxi(0575065)]

作者简介: 朱华(1979-), 女, 广西桂林人, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学, (E-mail) zhuBaoBao1213@126.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: wuyaosheng03@sina.com)

七三萜皂甙合成的关系提供依据,同时也为该技术三七研究中的使用构建了相应的技术平台。

1 材料与仪器

1.1 材料

自广西靖西县采集一年生的三七,用清水洗净,滤纸吸干水分。分离根、茎、芦头,以 5 株混合为 1 份(每组 5 份),将植物器官切成约 0.1 cm 的块状,小袋分装,迅速冻存于液氮中。

1.2 试剂与仪器

SYBR Green I 染料购于上海开放科技有限公司,RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas)、DNA Marker(MBI)、引物、Taq DNA 聚合酶(carresy)购于上海生工生物工程技术公司,dNTP 购于宝生物工程有限公司,质粒提取试剂盒购于上海华舜生物技术有限公司,其它试剂为国产

分析纯。Real time detection system(Icycler IQ)为美国 BIO-RAD 公司产品。

2 方法

2.1 样品总 RNA 的制备及 cDNA 的合成

用改进的异硫氰酸胍法(陈莉等,2005)提取各组根、茎、芦头总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,紫外分光光度计测其纯度和浓度。各样品均取 2.5 μg 总 RNA 用于反转录反应,操作按反转录说明书进行,各样品均得到 20 μL cDNA,用前稀释 5 倍,取 1 μL 做为模板。

2.2 引物设计

分别以三七 SS 基因的全长序列(文章另发表)和 GAPDH 基因(内对照基因)的部分序列(朱华等,2006)为模板,按表 1 设计用于扩增各自特异片段的引物。

表 1 荧光定量所用引物
Table 1 Sequence of FQ-PCR primers

基因 Gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	产物片段长度 Length of product
SS	TTACCAGGAGGCAATAGAAG	GACAACCCTAATCCAACAAG	138bp
GAPDH	CTGTTCACCTATCACTGCCACTC	GCTTTCCTCTGACTCCTCC	279bp

2.3 标准品的制备

本实验分别采用含有 SS 基因全长 cDNA 片段的质粒和 GAPDH 基因部分 cDNA 片段的质粒做为标准品。提取高浓度的质粒 DNA,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存原液,用前进行一系列 10 倍梯度稀释,共 6 个梯度,用于制作各自的标准曲线。

2.4 实时荧光定量 PCR 反应

对反应体系及反应条件做单因素的优化,最后选定 25 μL PCR 反应体系的组成为:2.5 μL 10 \times PCR 反应缓冲液;3 mol/L MgCl_2 ;400 $\mu\text{mol/L}$ dNTP;0.4 $\mu\text{mol/L}$ SS 基因特异引物;0.08 $\mu\text{mol/L}$ GAPDH 基因特异引物;0.8 \times SYBR Green I;1U Taq 酶;1 μL Template(5 倍稀释反转录产物或各浓度的质粒 DNA)。除模板外先将其它所有组分混匀,分装到 PCR 管中,最后加入模板混匀,空白对照管加入等量的灭菌水,体系的配制在冰上完成。每一份样品均同时检测 SS 基因和 GAPDH 基因的表达,PCR 反应在不同的反应管中进行。体系配置好后将反应管放入荧光定量 PCR 仪中,按优化的条件进行反应,重复检测 4 次。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变

性 4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 20 s,78 $^{\circ}\text{C}$ 读板 20 s,共进行 40 次循环;熔解曲线分析:在 60~95 $^{\circ}\text{C}$ 区间内进行,每上升 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读板 1 次,每次读板时间为 5 s。

2.5 数据的处理和分析

运用 Icyler IQ3.1 软件分别计算每个样品 SS 基因和 GAPDH 基因的定量结果,以 GAPDH 基因的定量结果求出每个样品总 RNA 加样量的误差,用 SS 基因的定量结果除以总 RNA 加样量的误差得到校正后的定量结果,求出 4 次定量结果的平均值,对 3 组(根、茎、芦头)结果进行统计分析。

3 结果

3.1 标准品的扩增结果

以含有 SS 基因全长 cDNA 的质粒和 GAPDH 基因部分 cDNA 片段的质粒的系列浓度梯度 10 倍稀释样品为标准品,共做 6 个梯度的检测。GAPDH 基因及 SS 基因各梯度的标准品均得到一条平滑的扩增曲线,且倾斜度较大,表明扩增曲线较理

想。假定浓度最稀的标准品的起始模板拷贝数为 1, 则相应的其它 5 个 10 倍递增梯度的标准品的起始模板拷贝数分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 , 用起始模板拷贝数的对数和相应的 CT 值作图即得到标准曲线。如图 1、2, GAPDH 基因及 SS 基因标准曲线的回归系数均大于 0.98 (4 次检测结果均 >0.98), 说明线性关系很强; 斜率均在 $-3.33 \sim -4$ 范围内, 说明标准曲线的可信度高; 4 次检测结果显示 GAPDH 基因及 SS 基因的扩增效率均在 95%~100% 之间。

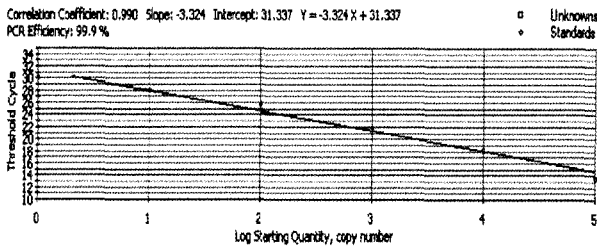


图 1 GAPDH 的标准曲线
Fig. 1 The standard curve of GAPDH

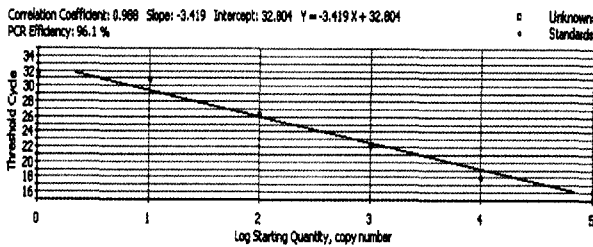


图 2 SS 的标准曲线
Fig. 2 The standard curve of SS

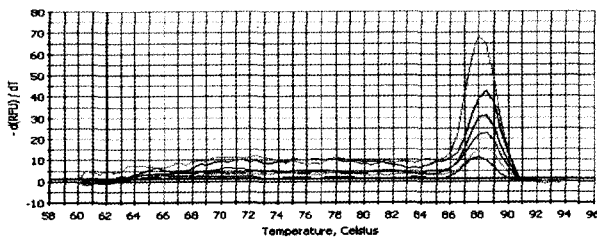


图 3 GAPDH 标准品的溶解曲线
Fig. 3 The melting curve of GAPDH standard

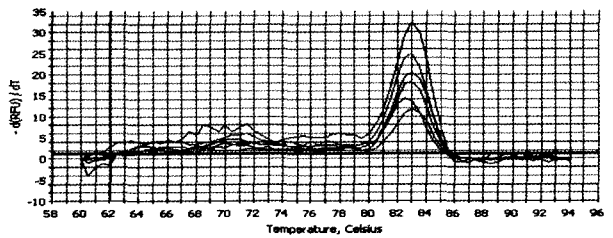


图 4 SS 标准品的溶解曲线
Fig. 4 The melting curve of SS standard

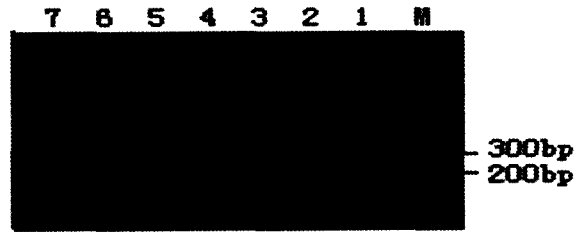


图 5 GAPDH 基因标准品电泳图
Fig. 5 The agarose gel electrophoresis of GAPDH standard
1-6; 105~100 浓度的标准品, 7; 空白对照。下同。
1-6; 105-100 concentration of standard, 7; Blank control; M; Marker. The same below.

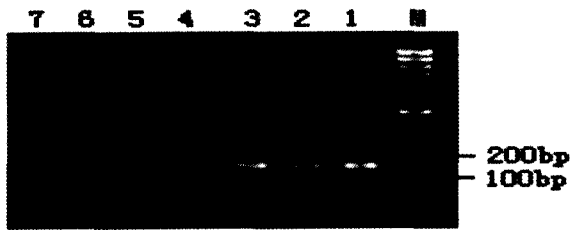


图 6 SS 基因标准品电泳图
Fig. 6 The agarose gel electrophoresis of SS standard

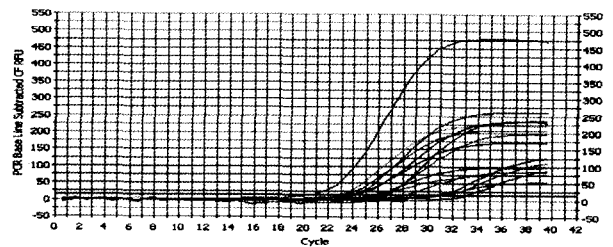


图 7 各样品 GAPDH 基因的扩增曲线
Fig. 7 The reaction curve of GAPDH gene of all samples
亦表明特异扩增了 SS 基因。

3.2 标准品特异扩增产物的确定

荧光定量 PCR 产物的特异性通过两种方法来确定。第一种方法为溶解曲线的分析, 如图 3, GAPDH 基因各梯度标准品的溶解曲线分析显示在 88.5 °C 时有一个单一的峰, 表明特异扩增了 GAPDH 基因。同样, 图 4 的 SS 基因各梯度标准品的溶解曲线分析显示在 82.5~83 °C 时有一个单一的峰,

第二种方法是通过凝胶电泳分析 PCR 产物, 如图 5、6 所示 GAPDH 基因和 SS 基因的每一个标准品都仅有一个电泳条带, 表明除了个别标准品有少量二聚体外, 均特异性扩增到目的产物。

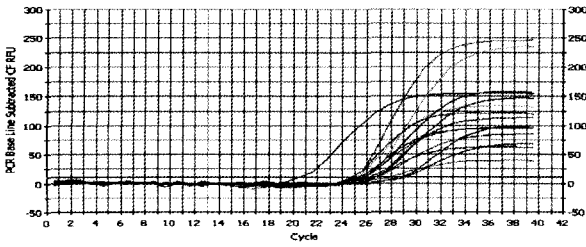


图 8 各样品 SS 基因的扩增曲线

Fig. 8 The reaction curve of SS gene of all samples

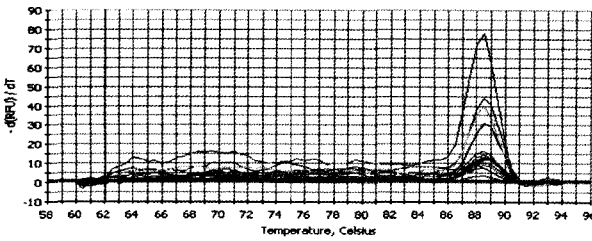


图 9 各样品 GAPDH 基因扩增的熔解曲线

Fig. 9 The melting curve of GAPDH gene of all samples

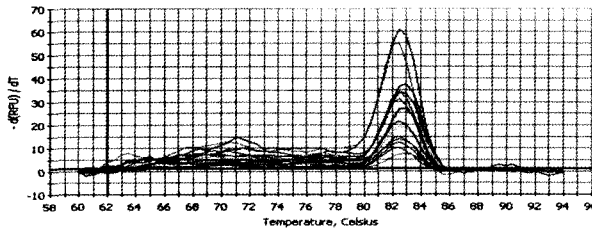


图 10 各样品 SS 基因扩增的熔解曲线

Fig. 10 The melting curve of SS gene of all samples

3.3 样品扩增结果

图 7、8 为 3 组根、茎、芦头(共 15 份样品)GAPDH 基因和 SS 基因的扩增曲线,表明各样品均检测出 GAPDH 基因和 SS 基因的表达。

3.4 样品特异扩增产物的确定

如图 9、10 所示,各样品的熔解曲线在 88.5 °C 和 82.5~83 °C 时有一个单一的峰,表明各样品均特异性扩增到 GAPDH 基因和 SS 基因的目的产物。对各组结果进行凝胶电泳,证明扩增所得条带均为特异性条带。

3.5 定量结果

3.5.1 定量结果的数据处理 反应结束后,输入标准品的拷贝数,Icycler IQ3.1 软件自动生成各基因扩增的标准曲线并根据样品扩增检测得到的 CT 值计算出各样品的定量结果。此结果还不能直接用于统计分析,需进一步计算出各样品校正后的定量结

果。表 2 以根、茎、芦头的一例样品为例演示具体的计算过程:①从 GAPDH 基因(内参)的定量结果,求出 RNA 量的误差(表 2 是对于根的相对值)②将目的基因 SS 的定量结果,用①求得的误差校正(定量结果除以①得到的相对值)。

3.5.2 定量结果的统计学分析 重复检测 4 次,并计算出各样品 4 次校正后定量结果的均值(表 3)。用秩和检验(Kruskal-Wallis Test)对 3 组结果进行统计分析(表 4);两两比较结果见表 5。统计结果显示根和茎比较、根和芦头比较的 P 值均小于 0.05,说明根与茎、根与芦头的差异有统计学意义。茎和芦头比较 P>0.05,说明茎与芦头的差别无统计学意义。因此,结合平均秩次可以说 SS 基因在根的表达量最高,高于在茎和芦头的表达量。

表 2 校正后的定量结果计算表

Table 1 The calculation of correct quantitative result

组别 Group	GAPDH		SS	
	定量结果 ¹⁾ Quantitative result	相对值(X) Relative value	定量结果 ¹⁾ (Y) Quantitative result	校正后的定量结果(Y/X) Correct quantitative result
根 Root	2.09	1	57.60	57.60
茎 Stem	376.00	179.90	39.90	0.22
芦头 Rootstock	165.00	78.95	58.30	0.74

¹⁾标准曲线制作时,输入的标准品拷贝数不是绝对值,而是相对值,所以此处得到的定量结果也不是绝对值,是相对值。

²⁾The inputting copies of each standard were not absolute value but relative value as the standard curve was made, so the quantitative value here are also relative value.

表 3 各样品 4 次检测校正后定量结果的平均值

Table 3 The average correct result of all samples

样品列数 Line No. of samples	根 Root	茎 Stem	芦头 Root stock
1	0.18	0.18	0.97
2	9.44	0.15	0.27
3	14.11	0.25	0.96
4	3.30	0.11	0.05
平均 Average	19.39	0.08	0.16

4 讨论

实时荧光定量包括绝对定量分析和相对定量分析。前者可以得到某个样本中基因的拷贝数和浓度;后者可以对不同方式处理或不同状态下两个样本中的基因表达水平进行比较。理论上,PCR 过程中每增加一个循环,扩增产物增加 1 倍,所以进行表

定量比较时,只要通过 CT 值的差求出 2 的乘方就可以了。然而实际上并非如此,因为不同的样品即便使用相同的引物扩增,其扩增效率也未必相同,所以必须引入扩增效率的校正,才可以进行样品之间的比较。反映扩增效率的标准即标准曲线。在进行相对定量分析时,可以不必求出标准品的实际拷贝数,只需将标准品梯度稀释就可以了,但要调整标准品的稀释程度,使待定量样品的 CT 值落在标准曲线上。为了获得良好的标准曲线,本研究采取现稀释现配的方法,即各浓度梯度的标准品均在 PCR 体系配制时稀释。这样可以避免各浓度的标准品在储存过程中发生不同程度的降解而致使浓度梯度不够准确。实验结果表明,标准曲线制作的效果较好,线性关系很强(回归系数均大于 0.98),可信度高(斜率均在 -3.33~ -4 范围内)。

表 4 定量结果的统计分析

Table 4 The Kruskal-Wallis Test of quantitative result

组别 Group	份数 Samples of each group	平均秩次 ¹⁾ Average rank
根 Root	5	12.00
茎 Stem	5	4.80
芦头 Rootstock	5	7.20

¹⁾ $P=0.035$

表 5 三组定量结果的两两比较

Table 5 The multiple comparison of three groups

对比样本名 Group names	两样本秩和差 Dispersion of two groups	P
根与茎 Root and stem	37.00	<0.05
根与芦头 Root and rootstock	24.50	<0.05
茎与芦头 Stem and rootstock	12.50	>0.05

本研究选用的荧光信号物质为 SYBR Green I, 与双链 DNA 结合后,其荧光大大增强,因而灵敏度很高。也正是由于这一特性,由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性将会影响定量的精确性。由解链曲线分析产物的均一性有助于分析由 SYBR Green I 得到定量结果。由溶解曲线图可知,每一个标准品或样品均只有单一的峰,且琼脂糖凝胶电泳结果也证实各 PCR 反应产物均只有一条带,没有非特异带。部分产物有少量二聚体,但实验中将摄取荧光信号的温度升高到 78 °C,能较好降低少量二聚体对定量结果的影响。因而,所摄

取到的荧光信号应为特异产物与 SYBR Green I 结合的结果,非特异产物的影响基本可排除。

为尽量减少实验操作造成的误差,在配制 PCR 反应体系时采用先将其余所有组分(除模板外)混匀,分装到 PCR 管中,最后再加入模板的原则,以此将 PCR 反应体系各组加样误差对结果的影响减小到最低限度。同时,由于整个 PCR 体系的配制过程较为繁琐,耗时较长,因此反应体系均须在冰上配制,尽可能避免上机前的非特异扩增。

结果的处理引入了两个层次的校正(即标准曲线的校正和内参基因的校正):首先各样品的目的基因和内参基因按各自的标准曲线求出定量的结果,然后各样品目的基因的定量结果用内参基因的定量结果进行均一化处理,最后得到各样品目的基因校正后的定量结果,这样的结果才有可比性。

目前,Real Time RT-PCR 技术用于植物基因相对表达量的研究仍较少。我们首次运用该技术对一年生三七根、茎、芦头 SS 基因在转录水平上的相对表达量进行分析,明确了该基因在根的表达量最高,为进一步探讨 SS 基因的功能提供相关依据。经过对实验条件和实验方法不断的摸索和改进,建立了一套成熟的实验方案,为这项技术在三七研究中的应用建立了较为完备的技术平台。

参考文献:

- 李季伦,张伟心,杨启瑞,等. 1993. 微生物生理学[M]. 北京:北京农业大学出版社;227-231
- Jennings SM, Tsay YH, Fisch TM, et al. 1991. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**:6 038-6 042
- Braga MV, Urbina JA, de Souza W. 2004. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, **24**(1):72-78
- Chen L(陈莉), Zhu H(朱华), Li S(李珅), et al. 2005. The contrast test of methods of extracting total RNA from *Panax pseudoginseng* var. *notoginseng* (三七总 RNA 提取方法的对比研究) [J]. *Letters in Biotech* (生物技术通讯), **16**(5):528-530
- Seo JW, Jeong JH, Shin CG, et al. 2005. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, **66**(8):869-877
- Zhu H(朱华), Li S(李珅), Zhao RQ(赵瑞强), et al. 2006. Cloning and sequencing of *Panax notoginseng* GAPDH(三七植物 GAPDH 基因克隆及序列分析) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **26**(7):1 316-1 319