

# 实时荧光定量 PCR 构建奶牛生殖系统 PrP 基因 标准品质粒和标准曲线

张太翔<sup>1</sup> 宁章勇<sup>2</sup> 赵德明<sup>1</sup> 周向梅<sup>1</sup> 杨建民<sup>1</sup> 尹晓敏<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100094; 2. 华南农业大学 动物医学院, 广州 510642)

**摘要** 为阐释 PrP 基因在奶牛生殖系统的正常表达和正常的生理功能, 以及为确定生殖系统在疯牛病垂直传播中的地位和其分子机理奠定基础, 采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法构建了奶牛生殖系统 PrP 基因的标准质粒和标准曲线。对含有目的基因质粒的 EcoR 酶切鉴定表明所插入的片段大小为 302 bp, 与预期的结果一致。所构建的标准曲线的相关系数  $r^2 = 0.999$ , 系统生成的回归方程为  $y = -0.29x + 9.48$ , 说明成功构建了奶牛生殖系统 PrP 基因的标准质粒和标准曲线, 为研究 PrP 基因在奶牛其他组织的定量奠定基础。

**关键词** PrP; RT-PCR; 实时荧光定量 PCR; 标准曲线; 奶牛生殖系统; BSE

中图分类号 S 855.9<sup>+</sup>9

文章编号 1007-4333(2007)02-0001-04

文献标识码 A

## Construction of cow reproductive system PrP gene standard plasmid and curve using real-time RT-PCR

Zhang Taixiang<sup>1</sup>, Ning Zhangyong<sup>2</sup>, Zhao Deming<sup>1</sup>, Zhou Xiangmei<sup>1</sup>, Yang Jianmin<sup>1</sup>, Yi Xiaomin<sup>1</sup>

(1. National Laboratory of Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** The purpose of this study was to elucidate the normal PrP gene expression and its normal physiological functions, confirm the role of the reproductive system in the maternity transmission route of the BSE and establish a good foundation for further molecular studies on BSE spread. Here we report the construction of cow reproductive system PrP gene standard plasmid and curve using real-time RT-PCR. The result of the EcoR to the plasmid including the target gene showed the product was 302 bp, which was according to the expected result. The constructed standard curve had a relative coefficient  $r^2 = 0.999$  and the regressing equation:  $y = -0.29x + 9.48$  suggested it was successful. The constructed calibration curve was used to quantify the unknown samples of cow.

**Key words** PrP; RT-PCR; real-time quantitative PCR; standard curve; cow reproductive system; BSE

传染性海绵状脑病是一类动物和人的神经退行性疾病, 包括羊瘙痒病、牛海绵状脑病、鹿的慢性消耗性疾病、水貂海绵状脑病、猫的疯猫病、人克雅氏病和变异型克雅氏病<sup>[1-4]</sup>。正常朊蛋白 (PrP<sup>c</sup>) 向致病性朊蛋白 (PrP<sup>sc</sup>) 转化是传染性海绵状脑病发生和发展的关键, 正常的朊蛋白含量较多的组织就具有转化为致病性朊蛋白的潜在的危险<sup>[5]</sup>。正常的朊蛋白和异常朊蛋白都是由同一个朊蛋白基因 PrP 基因编码的。在多肽链组成上一致, 但在三维折叠

的结构上有区别。

正常的朊蛋白不能引起神经退行性病变, 虽然目前已经对许多组织的 PrP mRNA 进行了检测, 但是对它的生物学功能还知之甚少, 对 PrP 基因表达的机制尚不清楚<sup>[3]</sup>。研究显示, 不同组织来源的细胞中朊蛋白的表达程度差异很大, 主要出现于神经细胞中<sup>[4-6]</sup>。PrP 基因表达的量 and 随后的翻译在疾病的起始阶段起着重要的作用, PrP 基因在细胞中的高水平表达可促使 PrP<sup>c</sup> 向 PrP<sup>sc</sup> 转变, 引起 PrP<sup>sc</sup>

收稿日期: 2006-07-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571399; 30500371); 教育部博士点基金资助项目 (20050019031)

作者简介: 张太翔, 博士研究生, E-mail: ztx74@cau.edu.cn; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物传染性海绵状脑病研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

的蓄积,从而引发传染性海绵状脑病的发生。

因此,对奶牛生殖系统 *PrP* mRNA 的表达进行定量,有助于探讨生殖系统在疯牛病发生过程中的作用。

以往的研究中,主要使用原位杂交或 Northern-Blot 分析对 *PrP* mRNA 进行检测,这些方法不能对 mRNA 进行定量,只能对 mRNA 的表达进行定性研究。而实时 RT-PCR 方法的建立解决了这些问题,并且已应用于 *PrP* mRNA 定量分析<sup>[7]</sup>。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 精确定量的前提是构建标准品质粒和标准曲线,这样才能对未知模板进行准确的定量分析<sup>[8]</sup>。

鉴于 *PrP* 基因在奶牛生殖系统的表达和表达量的研究对于疯牛病发生具有重要意义,本研究构建了实时荧光定量 PCR 检测奶牛生殖系统 *PrP* 基因表达标准品质粒和标准曲线,为阐释 *PrP* 基因在奶牛生殖系统的正常表达和正常的生理功能以及生殖系统在疯牛病垂直传播中的地位和作用的分子机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

试验动物来自通州屠宰场健康的中国黑白花奶牛。采集的母畜生殖器官包括:卵巢、输卵管、子宫、子宫阜、阴道;公畜的生殖器官包括:睾丸、附睾、输精管、精囊腺、前列腺、尿道球腺、阴茎。*E. coli* DH<sub>5</sub> 株由本实验室保存。TRIZOL RNA 提取试剂盒(Gibco 公司)、dNTPs(TaKaRa 公司)、Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司)、M2MLV 逆转录酶(Promega 公司)、DEPC(Promega 公司)、RNASEOUT Ribonuclease(Promega 公司)、SYBR Green PCR Kit(FINNZYMES 公司)、*EcoR* (TaKaRa 公司)、质粒快速提取试剂盒(博大泰克公司)、PGEM-TEasy Vector Systems(Promega 公司)、E. Z. N. A Gel Extraction Kit(Promega 公司)、PCR 仪(PTC2150 型, MJ Research 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(OPTICON2 型, MJ Research 公司)。

### 1.2 组织内总 RNA 的提取

核酸提取过程中所用试剂均用 0.1% (体积分数,下同) DEPC 处理水配制,塑料制品均用 0.1% DEPC 水 37℃ 浸泡 2 h,高压灭活 DEPC 毒性。取液氮保存组织置于含液氮的组织研钵中迅速研磨成粉末状,取 50~100 mg 的组织转移入含有 1 mL

RNA-Solv 试剂(Omega Bio-tek 公司)的 Eppendorf 管中,混匀;每 1 mL RNA-Solv 试剂中加入 0.2 mL 的氯仿(4℃ 保存),置冰上 10 min,12 000 g 离心 20 min;取约 80% 上层水相移入一新的 Eppendorf 管中,加约 500 μL 异丙醇(4℃ 保存),置冰上 10 min,12 000 g 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 75% (体积分数)乙醇(4℃ 保存),7 500 g 离心 5 min;弃乙醇,室温干燥 10~20 min,加入 30~50 μL DEPC 处理的水溶解 RNA,-86℃ 保存<sup>[10-11]</sup>。

### 1.3 组织 RNA 的 RT-PCR

按照已经发表的中国奶牛 *PrP* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号为 AY247262),分析并选择其保守序列区段,利用 Primer Primer5.0 软件,设计并选出一对引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(美国 PE 公司 3900 型 DNA 自动合成仪)。序列如下:*PrP* 引物,上游:5'-GCTACATGCTGGG-AAGTG-3',下游:5'-TTGGTAATAAGCCTGGGAT-3',扩增产物为 302 bp。先在 0.2 mL 的薄壁扩增管内加入以下试剂:primer (T18) 1 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,RNA (0.5 μg/μL) 5 μL,DEPC 水 7 μL。65℃ 变性 5 min。取出扩增管立即置于冰盒上,然后加入以下试剂:5×buffer 4 μL,RNA 酶抑制剂 1 μL,M-MLV 逆转录酶 1 μL。总反应体系为 20 μL,37℃,1 h;70℃,15 min,进行反转录。cDNA -20℃ 保存。利用获得的反转录模板进行目的基因和内参基因的 PCR 反应,总体积 25 μL,体系成分为:10×buffer 2.5 μL,dNTPs 2 μL,*PrP* 上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL,Ex Taq 酶 0.2 μL,cDNA 2 μL、灭菌三蒸水 17.3 μL。目的基因的反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,51℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 36 个循环;72℃ 延伸 8 min。

### 1.4 重组标准质粒制备

按照 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的操作说明对 PCR 产物进行纯化、回收。按照 PGEM-TEasy Vector Systems 试剂盒的说明书将纯化产物与 PGEM-TEasy 载体连接,连接体系为 10 μL,其反应组分为:PGEM-TEasy Vector (50 ng) 5 μL,PCR 产物 1.5 μL,T4DNA 连接酶 1 μL、灭菌三蒸水 1.5 μL,同时设定阴性和阳性对照。将连接体系置于 4℃ 水浴中过夜后加入到 200 μL 感受态大肠杆菌 DH<sub>5</sub> 中,热击转化后,加入 Amp<sup>r</sup> LB 液体培养基活化 1 h,低速离心后涂于 Amp<sup>r</sup>、X-Gal 和 IPTG 处理的 LB 琼脂平板上,37℃ 过夜培养后置 4℃ 冰箱中 4

h. 挑取单菌落白斑, 在含有 Amp 的 LB 液体培养基 37 °C、200 r/min 振荡过夜培养。按照质粒快速提取试剂盒的操作要求提取质粒, 并进行质粒 PCR、酶切和测序鉴定。

### 1.5 实时荧光定量 RT-PCR

对目的基因的质粒测定  $A_{260}$  光吸收值, 计算质粒的量。然后用荧光定量 RT-PCR 在 OPTICON<sup>2</sup> 型实时荧光 PCR 仪上对样品反转录 cDNA 6 个标准质粒模板进行定量。反应总体积 20  $\mu$ L, 反应条件同常规 PCR, 在反应过程中加入了与荧光数据读取和分析, 即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 °C 范围内, 每 0.2 °C 读板 1 次、停留 1 s) 步骤。由 Opticon analysis software (version 2.01) 荧光分析软件显示自动计算模板的拷贝数。

## 2 结果

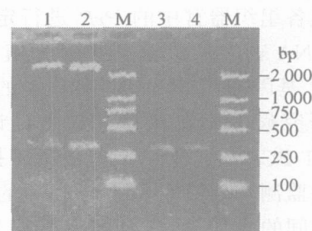
### 2.1 组织 RNA 提取和目的基因片段的扩增

组织提取的总 RNA 紫外分光  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8 ~ 2.0, 电泳结果表明 RNA 分子保持完整。

### 2.2 目的基因标准模板的鉴定

对提取的质粒进行 *EcoR* 酶切, 在 p GEM-T-Easy 载体插入片段的两侧均有 *EcoR* 酶切位点,

经酶切后, 目的基因含插入片段的大小为 302 bp (图 1)。对质粒 DNA 进行序列测定后, 插入 DNA 片段的序列经 Pubmed blast 过程分析和原始序列片段的同源为 100%。说明质粒连接、转化成功, 标准质粒构建成功。



M: Marker DL-2000; 1, 2 *EcoR* 酶切; 3, 4 质粒 PCR 扩增结果

图 1 重组 PrP 质粒酶切鉴定和质粒 PCR 扩增

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *PrP* recombinant T-easy vectors following digestion and product of PCR using the plasmid as template

### 2.3 标准曲线

通过反应模板为  $10^8 \sim 10^2$  个拷贝的标准重组质粒制备标准曲线, 对其动力学曲线的分析, 发现在本反应体系和反应条件下, 该标准曲线检测的灵敏度为  $10^2$  个模板; 通过对其回归曲线进行分析, 发现其相关性良好, 相关系数  $r^2 = 0.999$ , 系统生成的回归方程为:  $y = -0.29x + 9.48$ 。(图 2)

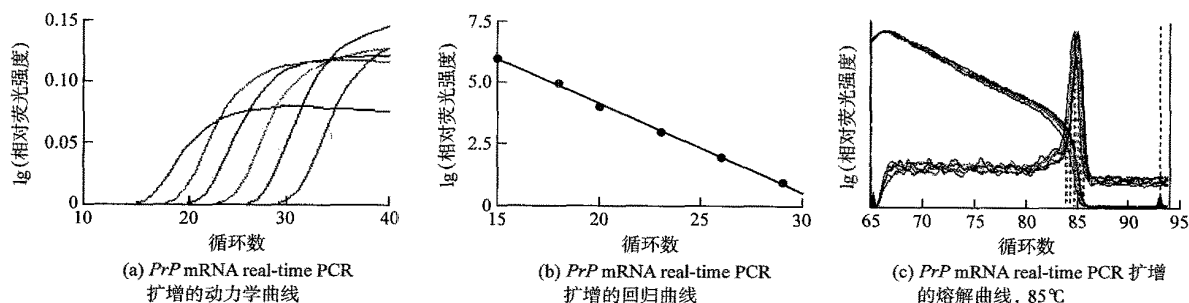


图 2 PrP mRNA 实时荧光 RT-PCR 定量

Fig. 2 Example of real-time PCR for quantification of *PrP* mRNA

### 2.4 扩增产物特异性

对标准重组质粒和样品的扩增产物进行了 65 ~ 95 °C 每 0.2 °C 读板 1 次的溶解曲线分析, 发现溶解曲线都为单峰, 且峰值单一, 说明反应特异 (图 2 (c))。经 1% (体积分数) 的琼脂糖凝胶电泳发现其长度为预期的 302 bp, 无引物二聚体出现。

## 3 讨论

传统的 RT-PCR 方法常被用于 mRNA 转录的

检测, 但此方法是非定量<sup>[10]</sup>。近年来出现的实时荧光定量 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<sup>[9, 11-12]</sup>。实时荧光定量 PCR 准确检测样品的前提是构建重组标准品质粒和制定标准曲线。本研究采用奶牛生殖系统组织的 mRNA 经 RT-PCR 扩增后, 将扩增产物回收纯化,

用 T4DNA 连接酶与 PGEM-T 载体连接,将连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5,挑取单个白色菌落,提取质粒 DNA,经质粒 PCR 扩增、酶切和测序鉴定证实重组质粒构建成功。成功构建的标准品质粒和标准曲线是 mRNA 表达水平定量的基础,对奶牛生殖系统各组织器官中的 *PrP* 进行定量,进而确定 *PrP* mRNA 表达的水平,为阐明生殖系统各组织器官中 *PrP* 基因在疯牛病发生过程中的作用,而且可以对于研究疯牛病垂直传播提供理论依据。在 real-time RT-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 值为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<sup>[11]</sup>。

本研究中的 Ct 值相对固定,重复性好,以不同浓度标准品质粒 DNA 分别进行荧光定量 PCR 扩增,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。本研究中,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 0.999,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。

### 参 考 文 献

- [1] Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie[J]. Science, 1982, 216:136~144
- [2] Stahl N, Borchelt D R, Hsiao K, et al. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid [J]. Cell, 1987, 51:229~240
- [3] Prusiner S B. Prions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:13363~83
- [4] Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 250:187~190
- [5] Bruce, M E, Chree A, McConnell I, et al. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1994, 343, 405~411
- [6] Skretting G, Espenes A, Ulvund M J, et al. cDNA representational difference analysis of ileal Peyer's patches in lambs after oral inoculation with scrapie[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 316: 272~279
- [7] Safar J, Roller P R, Gajdusek D C, et al Conformational transitions, dissociation and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein [J]. J Biol Chem, 1993, 268:20276~20284
- [8] Walker N J. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism based toxicology[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2001, 15(3):121~127
- [9] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR [J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 278: 261~269
- [10] Tichopad A, Pfaffl M W, Didier A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR [J]. Molecular and Cellular Probes, 2003, 17:5~10
- [11] Ning Zhanyong, Zhao Deming, Liu Hongxiang, et al. Quantification of prion gene expression in brain and peripheral organs of golden hamster by real-time RT-PCR [J]. Animal Biotechnology, 2005, 16:1~11
- [12] Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills A G, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 285:194~204