

用实时荧光定量 RT-PCR 方法定量绵羊 PrP 基因的表达

韩彩霞 赵德明 吴长德 宁章勇 杨建民 刘美丽 马李颖

(国家动物海绵状脑病实验室, 中国农业大学, 北京 100094)

摘要 为快速、准确定量绵羊 PrP 基因的 mRNA,建立了绵羊 PrP 基因实时荧光定量聚合酶链反应检测方法。根据已报道的绵羊 PrP 基因序列,设计合成引物;采用 RT-PCR 方法扩增目的片段;构建标准重组质粒制备标准曲线,用于样品检测。结果发现,中枢神经系统组织 PrP 基因的表达量(copies/ng 总 RNA,39420)比外周组织(为 7845)的高;在中枢神经系统中,脑干的 PrP 基因的表达量最高(为 67020);外周器官中,淋巴结 PrP 基因的表达量最高(为 29086),肾脏的表达量最低(为 125)。建立绵羊 PrP 基因实时荧光定量 PCR 方法,对 PCR 扩增反应中每一个循环的产物进行定量分析,为进一步研究绵羊组织器官的 PrP 表达在传染性海绵状脑病发生中的作用提供基础数据。

关键词 朊蛋白; RT-PCR; 基因表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 826

文章编号 1007-4333(2006)02-0061-04

文献标识码 A

Quantification of sheep prion gene expression using real-time RT-PCR

Han Caixia, Zhao Deming, Wu Changde, Ning Zhangyong, Yang Jianmin, Liu Meili, Ma Liying

(National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The real-time fluorescent quantitative PCR method was established to quantify the sheep prion gene expression. The PrP target fragment was amplified, and the real-time fluorescent RT-PCR technique was used to construct the standard plasmid and curve to quantify samples. Total RNA was isolated from different regions of the central nervous system (CNS) and peripheral organs to quantify the gene expression after the reverse transcript. The results showed that higher mRNA levels were present in CNS than in peripheral organs and the expression levels of PrP mRNA were 39420 copies and 7845 copies per ng total RNA respectively. The highest expression level was found in Obex with 67020 copies per ng total RNA within all CNS examined. In peripheral organs examined, high and low expression was respectively observed in lymph node and kidney, and the expression levels were 29086 copies and 125 copies per ng total RNA. The real-time fluorescent quantitative PCR is currently considered to be the most precise method for nucleic acid quantification and appeared as a powerful tool for further studies on prion diseases pathogenesis.

Key words prion; RT-PCR; gene expression; real-time quantification PCR

传染性海绵状脑病(TSE)是动物的神经退行性疾病,有绵羊和山羊的痒病(Scrapie)和牛海绵状脑病等^[1-2],传染性海绵状脑病的发生是因机体正常编码的 PrP 基因表达的细胞型朊蛋白(PrP^C)发生构象变化后形成致病型朊蛋白(PrP^{SC})而导致^[3],这种致病型 PrP^{SC}沉积在脑组织中,引起神经系统的病理变化,导致临床症状的出现^[4]。但是,早期的研究表明,在传染性海绵状脑病的亚临床阶段,外周器

官对该病的病因起重要作用^[5-7],并且在淋巴器官内有较高的 PrP 表达^[8]。

研究朊蛋白在神经组织和非神经组织中的表达有助于理解各个组织器官在传染性海绵状脑病中的作用^[2]。目前,PrP 基因表达的机制尚不清楚^[9]。致病型朊蛋白(PrP^{SC})如何从外周器官转移到中枢神经系统的机制尚不清楚,因此,有必要研究免疫系统细胞在 PrP^{SC}的积累和分布过程中的作用^[2]。研

收稿日期: 2005-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371062;30400325);教育部博士点基金资助项目(20020019006)

作者简介: 韩彩霞,博士研究生;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的研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

究显示,不同组织细胞朊蛋白的表达程度差异很大^[10],组织器官中朊蛋白表达的差异提示在朊蛋白表达过程中存在着组织特异性表达。PrP 基因表达量和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^C 向 PrP^{SC} 转变^[4,8],引起 PrP^{SC} 的蓄积,从而引发传染性海绵状脑病的发生。对绵羊外周和中枢神经系统 PrP mRNA 的表达进行定量,有助于探讨各组织器官中 PrP 基因在羊痒病发生过程中的作用。

目前,实时荧光定量 PCR 技术已经广泛用于检测基因的表达水平,实时荧光定量 PCR 技术可以非常可靠、高灵敏度的对 mRNA 的表达进行绝对定量^[11-12],用质粒 DNA 构建标准曲线,以标准曲线对样品 mRNA 的表达进行可靠性很高的检测^[2,8,13]。组织器官中 PrP 基因表达的定量有助于进一步研究朊蛋白的转化和 PrP^{SC} 的积累过程,同时,组织特异性表达模式也是对朊蛋白在组织器官内的基本功能认识的有效途径^[8]。以往的研究中,大多数是用原位杂交或 Northern Blot 分析对 PrP mRNA 进行检测,这种方法不能对 mRNA 进行绝对定量^[2],只是一种半定量方法。本实验采用敏感的实时荧光定量 RT-PCR 方法对绵羊 PrP 基因 mRNA 的表达进行绝对定量,为进一步阐释羊痒病发生的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

绵羊,购自内蒙古北方地区;JM109 感受态细胞由本实验室保存。

1.2 方法

1) 组织 RNA 提取。

解剖绵羊后,迅速取各组织器官。样品经液氮速冻转入 -80℃ 冰箱。取冻存组织 100 mg,加入 TRIZOL 试剂 1 mL,匀浆后加 0.2 mL 氯仿,离心后吸取上清,加入 0.5 mL 预冷异丙醇,离心沉淀后弃上清,80% (体积分数) DEPC 乙醇洗沉淀, DNase 酶解可能残余的基因组 DNA。提取的 RNA 用 DEPC 处理的灭菌三蒸水溶解, -80℃ 保存备用。

2) 组织总 RNA 的 RT-PCR。

a. 引物设计。按照已经发表的绵羊 PrP 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号为 AY585240),分析并设计一对特异性引物。上游引物为 P1: 5'-GGT CAA GGT GGT AGC CAC AGT CAG TGG AAC-

3',下游引物为 P2: 5'-AGC CTG GGA TTC TCT CTG GTA CTG GGT GAT-3',扩增片段长度为 402 bp (278 ~ 680 bp)。

b. RT-PCR。用 M-MLV 反转录酶 (Promega) 反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s、57℃ 退火 40 s、72℃ 延伸 40 s,共 36 个循环;72℃ 延伸 8 min。

3) 重组标准品质粒制备。

PCR 产物经 0.1 g/10mL 的琼脂糖凝胶电泳,切下目的条带,试剂盒回收,与 pGEM-T 载体连接,转化到 JM109 感受态细胞中,筛选白色菌落并划线培养,质粒提取,PCR、酶切和测序鉴定。

4) 实时荧光定量 RT-PCR。

实时荧光定量 PCR 对样品的 cDNA 和阴性对照进行定量。反应体系为 25 μL,反应组分为: Mix12.5 μL、P1 和 P2 (25 pmol/L) 各 0.2 μL、重组质粒 DNA 2 μL、灭菌三蒸水 10.1 μL,反应条件同上。在反应条件中加入熔解曲线的制备。

2 结果

2.1 定量标准曲线的构建

经鉴定重组质粒构建成功,测重组标准品质粒 OD 值,对之 10 倍系列稀释,进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应结束后系统自动生成起始模板数扩增反应的动力学曲线,由构建的标准曲线看出,起始模板浓度与循环数 (Ct 值) 之间呈良好的线性关系 (图 1)。

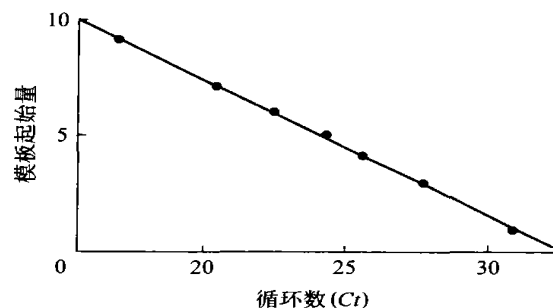


图 1 实时荧光定量标准曲线

Fig. 1 A representative standard curve obtained by plotting the starting copy numbers of recombinant plasmid against their cycle numbers

2.2 扩增产物特异性

扩增产物经 0.1 g/10mL 琼脂糖凝胶电泳发现无引物二聚体,其长度为预期的 400 bp。熔解曲线

结果显示为单峰,且峰值单一,说明产物特异(图 2)。

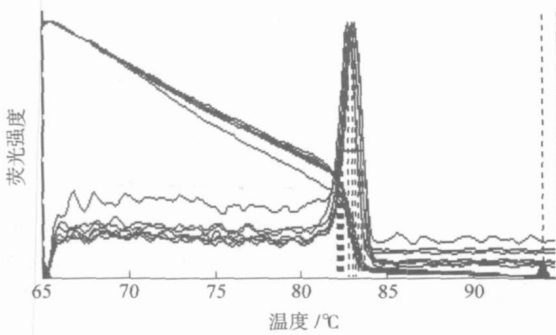


图 2 实时荧光定量溶解曲线

Fig. 2 A representative set of melting curves obtained by plotting fluorescence data against their cycle numbers

2.3 样品的定量检测

被检测组织的总 RNA 有显著差异。不同样品的反转录产物 cDNA 的定量差异在 5% ($n = 10$) 以内,同一样品在同一次实时荧光定量结果的差异在 2% 以内。同一组织的不同反转录模板之间的定量无显著差异。进行统计分析时不考虑动物之间的差异。

总体上,中枢神经系统组织 PrP 基因的表达水平比外周组织的高,而且每 ng 总 RNA 中 PrP 基因 mRNA 的拷贝数差异显著。在中枢神经系统中,脑干的 PrP 基因 mRNA 的表达量最高;外周器官中,淋巴结 PrP 基因 mRNA 的表达量最高,肾脏的表达量最低。

3 讨论

利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对基因 mRNA 的表达水平进行研究非常可靠^[2],研究结果具有可比性和重复性。本实验中,用 SYBR Green I 作为荧光染料对绵羊的中枢神经系统和外周器官的 PrP 基因的表达进行定量。SYBR Green I 在 PCR 反应中结合到双链 DNA 上,避免使用昂贵的特异性探针。但是,该染料既能与特异性产物结合也能与非特异性产物结合^[14]。在实验中,我们通过优化退火温度,引物浓度及 C_t 值等分析产物的溶解曲线,有效的避免了该情况的发生。同时,溶解曲线分析降低了凝胶电泳分析的肉眼观察误差。本研究中运用实时荧光定量 RT-PCR 技术制定的标准曲线具有很高的线性相关性、敏感性和重复性,使得实验结果更精确并具有很高的可靠性。我们采用每 ng

总 RNA 中 PrP 基因 mRNA 的拷贝数对 PrP 基因定量,这样可以进一步了解不同组织中 PrP 基因表达的潜能。

我们检测到每种器官中 PrP 基因表达水平有所不同。中枢神经系统器官比外周器官的 PrP 表达水平高。本实验研究结果与 Ales Tichopad 等^[2]和宁章勇等^[15]分别采用实时荧光定量 PCR 对牛和金黄地鼠的 PrP 基因定量检测结果一致,同时也印证了 Harris 等的原位杂交和 Northern Blot 结果^[16-17]。而与 Robakis 等的结果有很大差异,Robakis 等用原位杂交在脾脏中没有检测到 PrP^[18],但是原位杂交和 Northern Blot 检测方法都是一种半定量方法,无论精确性和可靠性均低于荧光定量检测。由本实验看出,实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度高于常规的 PCR 法、原位杂交及 Northern Blot 方法,此法操作更为简便、快速,因此,实时荧光定量 PCR 技术有很好的应用前景和研究价值。

参 考 文 献

- [1] Francoise Dandoy, Louisa Benboujema, Frederic Guillo, et al. Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain [J]. *Molecular Brain Research*, 2000, 76:173-179
- [2] Ales Tichopad, Michael W Pfaffl, Andrea Didier. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 17:5-10
- [3] Prusiner S B. Prions [J]. *Proc Natl Acta Sci USA*, 1998, 95: 13363-13383
- [4] 孙宪锋,董小平,周伟,等.人朊蛋白基因外显子 I 及其上游序列具有启动子样活性 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, 14(4):305-308
- [5] Kimberlin R H, Walker C A. Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes [J]. *J Comp Pathol*, 1979, 89:551-562
- [6] Kimberlin R H, Walker C A. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly [J]. *J Comp Pathol*, 1986, 67:255-263
- [7] Kimberlin R H, Walker C A. Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69:2953-2960

- [8] 宁章勇,赵德明,杨建民,等. 金黄地鼠 PrP 基因组织特异性表达的研究[J]. 中国病毒学,2005,20(2):184-188
- [9] Marina Kniazeva, Rena Orman, Victor P. Terranova. Expression of PrP mRNA is regulated by a fragment of MRP8 in Human fibroblasts [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1997, 234:59-63
- [10] Baybutt H, Manson J. Characterization of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neural cells [J]. Gene, 1997, 184:125-131
- [11] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. J Mol Endocrinol, 2000, 25:169-193
- [12] Morrison T, Weis J J, Wittwer C T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification [J]. BioTechniques, 1998, 24:954-962
- [13] Pfaffl M W, Hageleit M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23:275-282
- [14] David G Ginzinger. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream [J]. Experimental Hematology, 2002, 30:503-512
- [15] Ning Z Y, Zhao D M, Liu H X, 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
- [16] Harris D A, Lele P, Snider W D. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:4309-4313
- [17] Harris D A, Falls D L, Johnson F A, et al. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:7664-7668
- [18] Robakis N K, Sawh P R, Wolfe G C, et al. Isolation of a cDNA clone encoding the leader peptide of prion protein and expression of the homologous gene in various tissues [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:6377-6381