文章编号:1000-5404(2010)18-2033-02

技术方法

精确定量肺组织细胞线粒体 DNA 拷贝数方法的建立

戴纪刚,肖颖彬,闵家新,张国强,张在永 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院胸心外科)

【摘要】 目的 建立一种精确定量肺组织细胞线粒体 DNA 拷贝数的方法。**方法** 结合 2 个单独的实时荧光定量 PCR 对待测样本中线粒体 HV1 和核 β-globin 基因分别进行定量。以线粒体 DNA HV1 和核单拷贝基因 β-globin 分别作为线粒体和核 DNA 拷贝数的标记,对肺组织线粒体 DNA 的含量进行了精确定量[拷贝数/细胞,即相对拷贝数/二倍体核基因组(diploid nuclear genome) = 2 × HV1/β-globin]。**结果** 肺组织线粒体 DNA 的平均拷贝数/细胞为(733 ± 196)。**结论** 该技术可对线粒体 DNA 拷贝数进行准确的测定,并计算出线粒体 DNA 拷贝数绝对数量的变化。

【关键词】 线粒体 DNA;肺;拷贝数
【中图法分类号】 R394-33 **【文献标志码】** B

线粒体是真核细胞的重要细胞器,是细胞的"动力工厂"和细胞凋亡调控的关键元件。呼吸链的正常组合和运转需要一个完整和功能性的线粒体基因组,而 mtDNA 功能的完成既依赖于每一个 mtDNA 分子结构的完整性,也同时依赖于细胞中 mtDNA 的拷贝数。许多研究表明,mtDNA 大片段或全基因组的缺失及其量的变化对肿瘤、衰老及某些遗传疾病的发生可能具有重要作用[1-3]。临床方面,拷贝数异常变化已在越来越多线粒体遗传缺陷的患者中被证实。Southern 杂交和比较 PCR 技术是以往检测各种组织中线粒体 DNA 拷贝数的较为常用的方法,但这些方法均为定性或半定量研究。为更准确定量组织中线粒体 mtDNA 拷贝数的改变,探讨其与肿瘤等疾病的相关性,我们结合两个单独的实时荧光定量 PCR,建立了一种精确定量组织 mtDNA 的拷贝数(拷贝数/细胞)的方法。

1 材料与方法

1.1 病例资料

37 例肺组织标本均取自本院 2003 - 2004 年外科手术患者,均为癌旁肺组织标本。癌旁肺组织标本为同一患者病灶远端 5 cm 以上的正常肺组织,均经组织学诊断,证实其没有癌细胞。本组患者男性 28 例,女性 9 例,吸烟及曾经吸烟者 24 例(吸烟者:每天吸烟 10 支以上且吸烟时间超过 1 年。本组中包括曾经吸烟现戒烟 1 年以上者 9 例),不吸烟者 13 例。患者年龄 30 ~ 75 岁,中位年龄为 55 岁。

1.2 组织基因组 DNA 提取

采用酚、氯仿、异戊醇抽提法提取全基因组 DNA(包括 mtDNA)。所得 DNA 溶于 TE buffer (10 mmol/L Tris-Hcl, 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0),并用紫外分光光度计测定其波长 260 nm 时的光密度值[*D*(260)],计算 DNA 浓度,-20 ℃保存备用。

1.3 PCR 引物及 *Taq*Man 探针

所有引物由上海基康生物技术有限公司合成、标记。本实验中应用的荧光检测物质有 FAM (6-Carboxy-fluorescein) 和 TAMRA (6-Carboxy-tetramethy-rhodamine),其中 FAM 作为报告基因(R reporter),标记在 *Taq*Man 探针的 5′端。TAMRA 作为熄灭基因(Q quencdher),标记在 *Taq*Man 探针的 3′端。*Taq*Man 探针与目的基因的结合部位在 2 个引物之间。mtDNA D-loop HV1 (hipervariable region 1, HV1) 上游引物:5′-TTGCACGGTACCATAAATACTTGAC-3′,下游引物:5′-GAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTG-3′, *Taq*Man 探针:5′-CTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAAT-3′,目标片段长度:128 bp。核 β-globin 基因上游引物:5′-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3′,下游引物:5′-CAACTTCATCCACGTTCACC-3′, *Taq*Man 探针:5′-CTCCTGAGGAGAAGTCTGCT-3′,目标片段长度:110 bp。

1.4 线粒体 HV1 和核 β-globin 基因实时荧光定量 PCR 检测

1.4.1 实时荧光定量 PCR 标准品的制备

1.4.1.1 HV1 和 β-globin 基因片段的 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μl,终浓度为:*Taq* 酶 2 U, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, dNTP 各 200 μmol/L,引物 0.5 μmol/L。反应条件:94 ℃预变性 5 min,其余 40 个循环 94 ℃30 s、55 ℃30 s、72 ℃ 1 min,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.4.1.2 PCR 扩增产物的克隆及鉴定 用 TaKaRa 公司的试剂盒对 PCR 样品进行纯化后,分别将 128 bp HV1 和 110 bp β-globin 扩增产物克隆至 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司),筛选含有插入片段的载体,以 JM109 感受态细胞进行转化。用质粒提取试剂盒(Qiagen 公司)提取质粒。将部分所提取的质粒经过 PCR 和序列测定进行鉴定。

1.4.1.3 质粒浓度测定及拷贝数换算 紫外分光光度计检测其 *D*(260)值。质粒浓度(ng/μl) = *D*(260)值 × 50 μg/ml × 稀释终体积(ml) × 1 000/稀释时加入的原始溶液体积(μl)。质粒拷贝数(拷贝/μl) = 质粒浓度(ng/μl) × 6.02 × 1 014/660 × 碱基数。

1.4.1.4 标准品的梯度稀释 以无菌去离子水 10 倍比梯度稀释 HV1 和 β-globin 质粒分别获得浓度为 10^3 ~ 10^7 拷贝/μl 的制备定量 PCR 标准曲线的模板。

1.4.2 定量 PCR 获得 HV1 和 β-globin 标准曲线

将浓度分别为 10^3 ~ 10^7 拷贝/μl 的标准品取样在荧光定量 PCR 仪上行热循环反应。每次检测至少设置 3 个 NTC(No Template Control)。每个样品进行 3 个平行样实验。获得定量 PCR 的动力学曲线并绘制出标准曲线。PCR 反应体系及条件:25 μl 体系中含 ABI *Taq*Man 1 × PCR Master mix, 3.5 mmol/L $MgCl_2$,

【基金项目】 国家自然科学基金(39900173);重庆市自然科学基金(CSTC2009C195)
【通信作者】 张在永,E-mail:691057831@qq.com

200 μmol/L dNTP,引物各0.5 μmol/L,荧光探针50 nmol/L,模板各2.0 μl。50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;然后95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,共50个循环。*Taq*Man PCR Core试剂盒、光学PCR管、7700型PCR仪均为PE公司产品。

1.4.3 线粒体HV1和核β-globin基因定量PCR扩增 在绘制标准曲线的基础之上,分别对待测样本线粒体HV1和核β-globin基因进行实时荧光定量PCR检测。

1.4.4 组织中线粒体DNA的拷贝数 结合2个单独的实时荧光定量PCR对待测样本中线粒体HV1和核β-globin基因分别进行定量。以线粒体DNA HV1和核单拷贝基因β-globin分别作为线粒体和核DNA拷贝数的标记。线粒体DNA的拷贝数,即相对拷贝数/二倍体核基因组(diploid nuclear genome) = 2 × HV1/β-globin[4]。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 11.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 克隆质粒的鉴定

提取经筛选的用于制作标准曲线模板的质粒,经过PCR及序列测定证实,HV1和β-globin基因PCR片段已分别连接至pMD18-T载体上,并用所建立的实时荧光定量PCR检测,可见有明显的荧光信号。

2.2 标准曲线的制备

根据不同浓度的标准品测得的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(threshold cycle,Ct)值绘制标准曲线。不同浓度标准定量的模板与Ct值呈直线相关。HV1和β-globin基因定量PCR标准曲线的相关系数分别为0.998和0.999,斜率分别为-3.159和-3.400。

2.3 组织中线粒体DNA的拷贝数

结果发现:正常肺组织线粒体DNA的平均拷贝数/细胞为(733 ± 196)。

3 讨论

哺乳动物线粒体DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)是1个全长为16.5 kb左右的双链闭环分子。它含有37个基因和1个非编码区(控制区),非编码区又称之为D环(displace loop,D-loop),其内有控制线粒体DNA转录和翻译的调节序列。与核不同的是,线粒体基因组为多拷贝基因组。体细胞中平均含有100~500个线粒体,而每一个线粒体中又含有1~15个mtDNA分子。不同类型的组织细胞中,线粒体DNA的含量(即拷贝数)各不相同,而且在细胞分化、激素治疗和锻炼等过程中,线粒体DNA的拷贝数也会发生显著变化[5-7]。Southern杂交和比较PCR技术是以往检测各种组织中线粒体DNA拷贝数的较为常用的方法,但这些方法均为定性或半定量研究。Masuyama等[8]利用杂交技术对小鼠各种组织中mtDNA的含量进行了比较,结果发现,各种组织中(15个月大的小鼠)mtDNA的含量由低到高依次为:骨髓、脾脏、肺、肝脏、脑、肾脏、骨骼肌和心脏。在本研究中,我们结合两个单独的实时荧光定量PCR,对组织细胞中线粒体DNA含量进行了精确定量(拷贝数/细胞)。在这一定量方法中,核DNA被选择作为定量mtDNA拷贝数的内对照。β-globin基因是一个已知序列的核单拷贝基因,因此本实验选择其作为二倍体核基因组含量的标记[9]。通过这一方法我们发现,正常肺组织mtDNA平均拷贝数/细胞为(733 ± 196),这是通过实时荧光定量PCR获得的首个肺组织线粒体DNA平均拷贝数的数据。因几乎没有肺组织细胞mtDNA拷贝数定量研究的其它文献报道,我们无法做相对应的比较。这一数值略高于外周血单核细胞中的(409 ± 148)[10],而低于骨骼肌细胞中的(1 811 ± 546)[11]和心肌细胞中的(6 970 ± 920)[1]拷贝数/细胞。不同类型的组织细胞线粒体的数量和mtDNA拷贝数依赖于其能量代谢和有氧ATP生产的需求。我们的结果与肺组织细胞能量代谢和有氧ATP生产的需求低于骨骼肌和心肌细胞的特点是一致的,结果可靠。精确定量组织中mtDNA拷贝数方法的建立,为进一步探讨线粒体DNA拷贝数改变与肿瘤等疾病的相关性提供了条件。

参考文献:

[1] 戴纪刚,肖颖彬,闵家新,等. 高低转移小鼠肝癌细胞线粒体DNA遗传变异的研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(20):2030-2032.

[2] 戴纪刚,肖颖彬,闵家新,等. 非小细胞肺癌线粒体基因组大片段缺失突变研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(21):2123-2126.

[3] 戴纪刚,肖颖彬,闵家新,等. 肺癌组织中线粒体基因组4977bp大片段缺失状况分析[J]. 中华病理学杂志,2005,34(12):804-805.

[4] Miller F J, Rosenfeldt F L, Zhang C, *et al*. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(11): e61.

[5] Robin, E D, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells[J]. J Cell Physiol, 1988, 136(3): 507-513.

[6] Renis M, Cantatore P, Loguercio-Polosa P, *et al*. Content of mitochondrial DNA and of three mitochondrial RNAs in developing and adult rat cerebellum[J]. J Neurochem, 1989, 52(3): 750-754.

[7] Williams R S, Salmons S, Newsholme E A, *et al*. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle[J]. J Biol Chem, 1986, 261(1): 376-380.

[8] Masuyama M, Iida R, Takatsuka H, *et al*. Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1723(1/3): 302-308.

[9] Lawn R M, Efstratiadis A, OConnell C, *et al*. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene[J]. Cell, 1980, 21(3): 647-651.

[10] Gahan M E, Miller F, Lewin S R, *et al*. Quantification of mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous fat using real-time polymerase chain reaction[J]. J Clin Virol, 2001, 22(3): 241-247.

[11] Barthelemy C, Ogier-de-Baulny H, Diaz J, *et al*. Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions, and compensation[J]. Ann Neurol, 2001, 49(5): 607-617.

(收稿 2010-04-01 修回 2010-05-09)

(编辑 吴培红)