技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0897-03

# 骨髓间充质干细胞 Hey1 基因表达水平荧光定量 RT-PCR 方法的建立

刘 强,翁亚光,唐 敏,罗 敏
(重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立骨髓间充质干细胞中 Notch 信号通路靶基因 Hey1 表达水平的荧光定量 RT-PCR 方法。方法:培养骨髓间充质干细胞($C_2C_{12}$),提取总 RNA,验证内参基因 β-actin 和目的基因 Hey1 的扩增效率,优化 PCR 条件,分析扩增曲线、融解曲线,凝胶电泳验证定量 PCR 产物。结果:内参基因 β-actin 和目的基因 Hey1 扩增效率一致(扩增曲线斜率差 <0.1),提示可以使用比较 Ct 法对 Hey1 进行相对定量分析;扩增曲线、融解曲线及凝胶电泳结果提示 PCR 产物特异性好。结论:本研究所建立的用于 Hey1 基因表达分析的定量 RT-PCR 检测方法,准确可靠,可用于 Bmp9 和 Notch 信号通路的研究。

【关键词】骨髓间充质干细胞;Hey1;荧光定量 RT-PCR
【中国图书分类法分类号】Q254 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-07

# Development of fluorescent quantitative RT-PCR method for detection of Hey1 in bone marrow mesenchymal stem cells

*LIU Qiang, et al*
(*Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop the method of detecting the level of Hey1 expression_the target gene of Notch signaling pathway in bone marrow mesenchymal stem cells, using real-time fluorescence quantitative RT-PCR. *Methods*: The bone marrow mesenchymal stem cells ($C_2C_{12}$) were cultured and the total RNA was extracted. And then the amplification efficiency was verified between the reference gene β-actin and the target gene Hey1. To optimize the PCR conditions and analyse amplification curves and melting curve before validation of quantitatve PCR products with gel electrophoresis. *Results*: The reference gene β-actin and the target gene Hey1 have the same amplification efficiency (slope difference of the amplification curve <0.1), suggesting that you can use the comparative Ct method for analysing relative expression of Hey1. Through analysing the amplification curve, melting curve and gel electrophoresis results we can get that the qPCR product was very specific. *Conclusion*: The real-time quantitative RT-PCR methods established for detecting the expression of Hey1 gene is accurate and reliable, which can be used for studying the relationship of Bmp9 and Notch signaling pathways.

【Key words】Bone marrow mesenchymal stem cells; Hey1; Fluorescent quantitative RT-PCR

Notch 信号通路是多细胞生物中普遍存在的细胞信号作用体系,不仅影响细胞的增殖、分化、凋亡和上皮细胞-间质细胞转变等活动,在胚胎发育、肿瘤形成和血管发生等生理过程中也发挥重要的调节作用[1,2]。Hey1 基因是 Notch 信号通路的重要靶基因,已有研究发现,Hey1 基因与骨髓间充质干细胞的软骨分化[3]、成肌分化[4]、心脏畸形[5]等有关。本课题组前期研究则发现,Hey1 基因参与了 Bmp9 诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化过程。本研究目的是利用实时荧光定量 RT-PCR 技术,建立 Hey1 基因表达水平的测定方法,为进一步研究 Bmp9 与 Nocth 信号通路的相互作用提供实验依据。

作者介绍:刘 强(1985-),男,硕士,
研究方向:Bmp9 信号通路机制研究。
通讯作者:唐 敏,女,副教授,E-mail:catom@126.com。
基金项目:重庆市科委基金(编号:CSTC,2008BB5396)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 $C_2C_{12}$(本实验室保存),DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),青/链霉素(Hyclone 公司),Trizol 试剂(Invitogen 公司),反转录试剂盒(Promega 公司),SYBR Green I (TaKara 公司),凝胶成像仪(BIO-RAD 公司),Rotor Gene 6000 荧光定量 PCR 仪(Corbett Research 公司),核酸微量测定仪(BIO-RAD 公司)。

1.1.2 细胞选择与培养 $C_2C_{12}$ 是小鼠成肌细胞,属于骨髓间充质干细胞,故本研究选择其为研究对象。复苏冻存的 $C_2C_{12}$,

用 10%胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养，长至 90%时，Trizol 处理收集细胞，细胞裂解液 -80℃保存待用。

1.1.3　荧光定量 RT-PCR 引物设计与合成　引物根据 GenBank 中小鼠 Hey1 基因（NM_010423.2）和 β-actin 基因（NM_007393.3）序列，运用 primer3（http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi）设计，由 TaKaRa 公司合成。Hey1 基因上游引物 5'-GGCCTGCTTGGCTTTTCT-3'，下游引物 5'-CCAAGTGCAGGCAAGGTC-3'，扩增片段长度 120 bp；β-actin 基因上游引物 5'-CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3'，下游引物 5'TAGAGGTCTTTACGGATGTC 3'，扩增片段长度 110 bp。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 的提取　在上述细胞裂解液中加入 1/5 体积的氯仿离心取上清液，加入等体积的异丙醇离心去除上清液，用 DEPC 水配制的 75%乙醇清洗 2 次，去除残余酒精，最后用 30 μl DEPC 水溶解。用核酸微量测定仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量鉴定。

1.2.2　骨髓间充质干细胞中 Hey1 基因表达水平荧光定量 RT-PCR 测定方法建立 实时荧光定量染料法（SYBR Green I）是利用 PCR 过程中荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环产物量的变化。阈值循环数（Ct 值—Threshold Cycle）是指 PCR 扩增过程中，每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。通过分析 Ct 值，能够对起始模板量进行分析。定量方法又分为绝对定量和相对定量，其中比较 Ct 值法（ΔΔCt 法）是基因表达调控研究中最常用的相对定量方法之一。本研究拟采用 ΔΔCt 法检测 Hey1 基因表达，即由目的基因与内参基因 Ct 之间的差值来反映。

1.2.2.1　cDNA 的合成　经过条件优化，确定如下反应体系（25 μl）：总 RNA 量 2 μg、random primer 0.5 μl、DEPC 水补齐至 15 μl，70℃ 5 min；取出后加 M-MLV 5 × Reaction buffer 5 μl、dNTP 1.25 μl、Ribonuclease inhibitor 1.0 μl、M-MLV RT 1.0 μl、DEPC 水补齐至 25 μl，37℃ 60 min、70℃ 10 min。合成的 cDNA 置于 -80℃保存备用。

1.2.2.2　荧光定量 PCR 反应条件　经条件优化，荧光定量 PCR 反应体系为 20 μl，SYBR Green I 10 μl、cDNA 1 μl、上下游引物混合物（10 pmol/μl）1 μl、ddH2O 8 μl；反应参数设置如下：预变性 94℃ 2 min；（92℃ 20 s；68℃ 30 s 每循环降 2℃；72℃ 20 s）6 个循环；（92℃ 20 s；57℃ 30 s；72℃ 20 s 延伸末尾采集荧光）40 个循环；融解分析（50℃~99℃）。

1.2.2.3　Hey1 基因和 β-actin 基因扩增效率的验证　因荧光定量 PCR 相对定量的前提是靶基因和内参基因的扩增效率要一致。故进行 Hey1 基因和 β-actin 基因扩增效率的验证。将 cDNA 按 10 倍比稀释 4 个浓度梯度 $1\times10^{-1}$、$1\times10^{-2}$、$1\times10^{-3}$、$1\times10^{-4}$（假设其 DNA 拷贝数为 10 000、1 000、100、10），以此为模版分别检测 Hey1 基因和 β-actin 基因的表达水平。每个样本浓度设 3 个平行管，验证 2 个基因扩增效率是否一致。

1.2.2.4　荧光定量 PCR 产物鉴定　荧光定量 PCR 反应后，进行融解曲线分析并把产物跑 1.5%琼脂糖凝聚电泳，进一步验证其特异性和片段大小。

## 2　结　果

2.1　总 RNA 提取结果

核酸微量测定仪检测总 RNA，结果为 $OD_{260}/OD_{280}$ 比值为 1.98，浓度为 386 ng/μl。取 5 μl RNA 加入到 1%琼脂糖凝胶点样孔中，其电泳图上可见条带 28S，18S 和 5S，并且 28S 条带亮度是 18S 的两倍以上，证明总 RNA 在提取过程中降解的很少，能满足后续实验要求（图 1）。

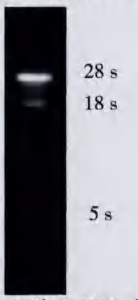



图 1　$C_2C_{12}$ 细胞总 RNA 电泳图

2.2　Hey1 基因和 β-actin 基因扩增效率的验证结果

结果所示，平行管之间 Ct 值存在较小差异，通过取平均值可以进一步减小这种误差（图 2）。由软件根据 Ct 值和给定的拷贝数生成内参基因 β-actin 和 Hey1 基因的标准曲线，曲线斜率 M 值分别为 3.362、3.322，差值 <0.1 说明二者扩增效率一致。相关系数 R2 都在 0.99 以上，说明与统计假设相一致的数据占 99%以上（图 3）。因此可以采用 ΔΔCt 法检测不同情况下骨髓间充质干细胞中 Hey1 基因相对表达情况。

2.3　实时荧光定量 PCR 扩增曲线分析

设置 3 个平行管，使用实时荧光定量 PCR 分别检测 β-actin 基因和 Hey1 基因，各平行管扩增曲线重叠在一起呈 S 型，精密度很高（图 4），证明本次 PCR 反应得出的数据可靠。

2.4　实时荧光定量 PCR 产物鉴定

2.4.1　定量 PCR 融解曲线分析　融解曲线显示只有内参基因 β-actin 和目的基因 Hey1 的融解峰，扩增产物分别在 83℃和 85℃时出现单一峰，无引物二聚体峰和其它非特异峰出现（图 5），提示该 PCR 反应特异性很高。

2.4.2　定量 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析　在 1.5%琼脂糖凝胶电泳图中可见，4 管定量 PCR 产物全部都只有 1 个特异性条带，片段都在 100~200 bp 之间（与内参基因 β-actin 和靶基因 Hey1 的扩增片段 110 bp 和 120 bp 吻合），提示引物、定量 PCR 反应体系和参数设置适用（图 6）。

## 3　讨　论

传统的检查基因表达情况的方法中，RT-PCR、原位杂交和 Northern blot 等仅对 mRNA 进行定性或半定量，不能进行较准确的定量分析。实时荧光定量 RT-PCR 通过在反应体系中加入荧光基团。利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 过程，解决传统方法 RT-PCR 只能进行终点检测的缺点（本研究采用染料法，其荧光染料能特异性掺入 DNA 双链，发出荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步，能够对目的基因进行较为准确的定量分析[6]），提高了检测的准确性。ΔΔCt 法是相对定量分析中常用的方法之一，

| 序号 | 颜色 | 名称 | 类型 | 阈值 | 给定拷贝数 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | β-actin-1 | Standard | 10.13 | 10 000 |
| 2 | | β-actin-1 | Standard | 10.07 | 10 000 |
| 3 | | β-actin-1 | Standard | 10.07 | 10 000 |
| 4 | | β-actin-2 | Standard | 13.11 | 1 000 |
| 5 | | β-actin-2 | Standard | 13.06 | 1 000 |
| 6 | | β-actin-2 | Standard | 13.03 | 1 000 |
| 7 | | β-actin-3 | Standard | 16.70 | 100 |
| 8 | | β-actin-3 | Standard | 16.66 | 100 |
| 9 | | β-actin-3 | Standard | 16.06 | 100 |
| 10 | | β-actin-4 | Standard | 19.77 | 10 |
| 11 | | β-actin-4 | Standard | 19.78 | 10 |
| 12 | | β-actin-4 | Standard | 19.81 | 10 |

| 序号 | 颜色 | 名称 | 类型 | 阈值 | 给定拷贝数 |
|---|---|---|---|---|---|
| 13 | | hey1-1 | Standard | 16.81 | 10 000 |
| 14 | | hey1-1 | Standard | 16.80 | 10 000 |
| 15 | | hey1-1 | Standard | 16.80 | 10 000 |
| 16 | | hey1-2 | Standard | 19.96 | 1 000 |
| 17 | | hey1-2 | Standard | 19.86 | 1 000 |
| 18 | | hey1-2 | Standard | 19.85 | 1 000 |
| 19 | | hey1-3 | Standard | 22.93 | 100 |
| 20 | | hey1-3 | Standard | 23.44 | 100 |
| 21 | | hey1-3 | Standard | 22.96 | 100 |
| 22 | | hey1-4 | Standard | 25.61 | 10 |
| 23 | | hey1-4 | Standard | 25.66 | 10 |
| 24 | | hey1-4 | Standard | 27.30 | 10 |

图 2　β-actin 和 hey1 不同稀释浓度时定量 PCR 结果

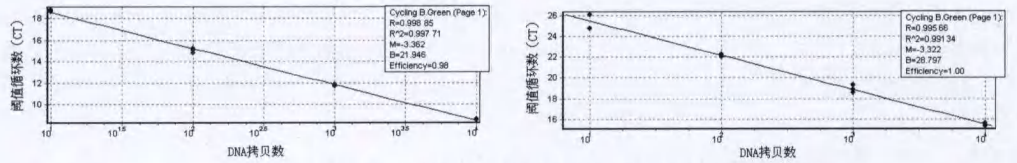



图 3　β-actin 基因（左）和 Hey1 基因（右）的标准曲线

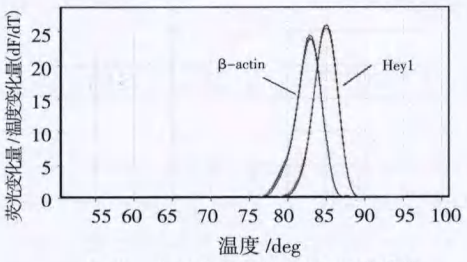



图 4　实时荧光定量 PCR 扩增曲线

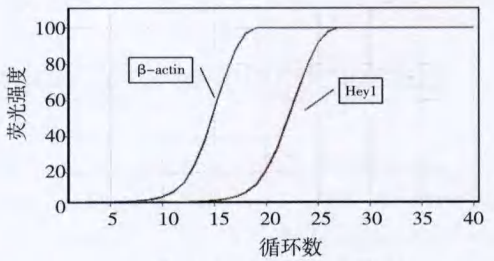
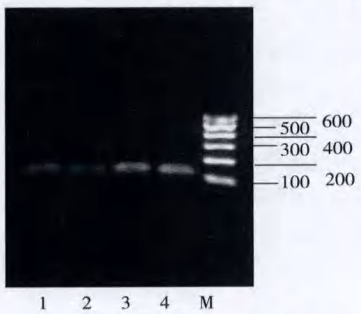



图 5　定量 PCR 融解曲线




M.代表 marker I (100~600 bp)；1、2.代表 β-actin；3、4.代表 Hey1

图 6　定量 PCR 产物电泳图

其使用前提是基于目的基因和内参基因扩增效率的一致性[7,8]。本研究弥补大多定量 RT-PCR 研究中，对扩增效率的忽略，在验证扩增效率的一致性基础上，建立了特异灵敏的检测体系，可用于不同情况下骨髓间充质干细胞中 Hey1 基因的相对表达情况研究。

本课题组前期研究中基因芯片等结果提示：Notch 信号途径的经典靶基因 Hey1 参与了 Bmp9 诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化，这与 Susa Mir[3]等人的研究结果 Hey1 下调 Bmp2 诱导的成骨分化不同。为了进一步探讨 Hey1 乃至 Notch 信号通路在 Bmp9 介导的骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用，本研究成功建立起了检测 Hey1 表达的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法，可以为今后研究在不同处理条件下检测 Hey1 表达情况提供快速、可靠的途径，为明确 Bmp9 和 Notch 信号通路相互关系提供分子生物学基础。

## 参 考 文 献

[1] Kevin G L, Aly K. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis[J]. Blood, 2006, 107(6): 2223-2233.

[2] 杨　军，贾延劼，杨　琴，等. Notch-1 在骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的作用[J].重庆医科大学学报，2005，30(6)：781-786.

[3] Susa M, Zamurovic N, Cappellen D, et al.Hey1, a direct Notch target gene, is up-regulated by BMP-2 and reduces osteoblast matrix mineralization and Cbfa1/Runx2 transcriptional activity[J].FASEB Journal, 2004, 18(8): C158.

[4] Hulleman E, Quarto M, Vernell R, et al. A role for the transcription factor hey1 in glioblastoma[J].Jorunal of Cellular and Molecular Medicine, 2009, 13(1): 136-146.

[5] Fischer A, Steidl C, Wagner T, et al. Combined loss of hey1 and heyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchyma transetion[J]. Circulation Research, 2007, 100(6): 856-863.

[6] 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(1): 5-10.

[7] Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills AG, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods[J].Anal biochem, 2000, 285(2): 194-204.

[8] Livak K J, Schittgen T D.Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT)method[J].Methods, 2001, 25(4): 402-408.

（责任编辑：冉明会）