技术方法 文章编号:0253-3626(2009)05-0593-04

实时荧光定量 PCR 检测大鼠组织 Angptl3 表达的标准曲线构建

王继红,黄家利,程 梅,曾建涛,王 欣
(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:采用实时荧光定量 PCR(染料法)建立检测 SD 大鼠组织血管生成素样蛋白 3(Angiopoietin-related protein 3, Angptl3)表达量的标准曲线。方法:以 SD 大鼠肝组织总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 获得目的 DNA 片段,用 T-A 克隆方法将其装载到质粒 pUCm-T 上,经过转化、质粒提取获得标准品,并以此为模板梯度稀释进行 Real-time PCR 反应,建立该方法的标准曲线。结果:Angptl3 标准曲线相关系数为 0.997 6,相关性较好;斜率为 0.862 3,扩增效率适中。结论:成功构建了用 Real-time PCR 方法检测 SD 大鼠肝组织 Angptl3 表达量的标准曲线。

【关键词】荧光定量 PCR;Angptl3;标准曲线;SD 大鼠
【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-25

作者介绍:王继红(1955-),女,副教授,
研究方向:临床酶学、蛋白质组学。
基金项目:重庆医科大学创新基金 CX200528。

雌激素和肠动力障碍的关系有重要意义。

参 考 文 献

[1] Beckett EA, McCloskey C, O'Kane N, et al. Effects of female steroid hormones on A-type K^+ currents in murine colon [J]. J Physiol, 2006, 573 (Pt 2): 453-468.

[2] Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(3): G602-611.

[3] Li CX, Liu BH, Tong WD, et al. Dissociation, culture and morphologic changes of interstitial cells of Cajal in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(18): 2838-2840.

[4] Pietras RJ, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action [J]. Nature, 1975, 253(5490): 357-359.

[5] Pietras R J, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells[J]. Nature, 1977, 265(5589): 69-72.

[6] Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase [J]. Nature, 2000, 407(6803): 538-541.

[7] Yue W, Wang JP, Conaway M, et al. Activation of the MAPK pathway enhances sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to the mitogenic effect of estradiol[J]. Endocrinology, 2002, 143(9): 3221-3229.

[8] Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, et al. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal [J]. Am J Physiol, 1999, 277(2 Pt 1): G409-423.

[9] Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach[J]. J Physiol, 1999, 518 (Pt 1) 257-269.

[10] Zheng J, Ali A, Ramirez VD. Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites[J]. J Psychiatry Neurosci, 1996, 21(3): 187-197.

[11] 张广军,刘宝华,童工东. 雌雄素受体 β 在大鼠结肠的表达及其对 Cajal 间质细胞,结肠肌电影响的实验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37 (9): 942-943.

[12] Cao S, Hudnall SD, Kohen F, et al. Measurement of estrogen receptors in intact cells by flow cytometry [J]. Cytometry, 2000, 41 (2): 109-114.

[13] Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, et al. Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry [J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3805-3814.

[14] Everson GT. Gastrointestinal motility in pregnancy[J]. Gastroenterol Clin North Am, 1992, 21(4): 751-776.

[15] Baron TH, Ramirez B, Richter JE. Gastrointestinal motility disorders during pregnancy[J]. Ann Intern Med, 1993, 118(5): 366-375.

[16] Jung HK, Kim DY, Moon IH. Effects of gender and menstrual cycle on colonic transit time in healthy subjects[J]. Korean J Intern Med, 2003, 18(3): 181-186.

(责任编辑:关蕴良)

Construction of the standard curve for Real-time PCR detecting the expression of Angptl3 in rats

WANG Ji-hong, et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the standard curve for real-time PCR detecting the tissue expression level of Angptl3 in SD rat. *Methods*:The total RNA of the SD rat's liver was the template.We got lots of the Angptl3 partial DNA sequence by RT-PCR.The products were cloned into the pUCm-T vector,Then we diluted the solution of plasmid and used real-time PCR (SYBR Green Ⅰ) to construct the standard curve. *Results*:The correlation coefficient of the standard curve was 0.997 6. The reaction efficiency was 0.862 3. The correlation and the amplify efficiency were good. *Conclusion*:It is successful to construct the standard curve for real-time PCR detecting the tissue expression level of Angptl3 in SD rat.

【Key words】Real-time PCR; Angptl3; Standard curve; SD rat

血管生成素样蛋白 3(Angiopoietin-related protein 3,Angptl3)是一种多功能分泌因子[1],主要在肝脏表达。目前的研究[2-4]表明,Angptl3 的主要生物学作用是调节脂质代谢,提高血浆三酰甘油水平,与心脑血管疾病的发生有关。Koishi 等[5]提出人 Angptl3 与小鼠 Angptl3 有 75%的结构同源性。国外对Angptl3 的研究几乎仅限于小鼠,尚未见有关大鼠组织Angptl3 表达量的报道。Real-time PCR 检测技术已成为国际上基因表达数量检测通用的方法,我们选择该方法进行大鼠组织 Angptl3 表达量分析。Real-time PCR 定量检测的前提是构建标准品质粒和标准曲线,因此,构建正确、可靠的 Angptl3 基因表达标准品质粒和标准曲线是实验成功的关键,它将为进一步测定 SD 大鼠组织 Angptl3 表达量奠定基础,提供保障。

1 材料与方法

1.1 实验动物和菌株

健康成年 SD 雄性大鼠(体重≥400 g),由重庆医科大学实验动物中心提供。DH5α 菌株由重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室保存。

1.2 主要试剂及仪器

M-MLV 逆转录试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix Plus (TOYOBO 公司);Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶(*Pst* Ⅰ)(TAKARA 公司);PCR 产物纯化及克隆试剂盒、质粒抽提试剂盒 (BBI 公司);UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)。DYY-2C 电泳仪(北京六一仪器厂);Quantity One 凝胶成像系统、My CyckerTM thermal cycler(Bio-Rad 公司);Aplied Biosystems 7500 (ABI 公司);3K18 台式高速冷冻离心机(德国 Sigama 公司);TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-7504 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 组织 RNA 提取及鉴定 断颈处死 SD 大鼠,取其肝组织液氮保存。取约 30 mg 冻存肝组织研磨成粉,按常规方法提取 RNA、并分装,-70℃保存备用。取 10 μl RNA 溶液,加入 990 μl pH8.0 的 TE 后,分别在 260 nm、280 nm、230 nm处检测 RNA 的吸收值,计算 A_{260}/A_{280}、A_{260}/A_{230} 比值,根据 RNA 浓度(μg/ml)=(A_{260} × 稀释倍数)/(0.024 × L)公式计算 RNA 的浓度,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.3.2 组织总 RNA 的 RT-PCR 根据 genebank 提供的相关基因序列设计引物:Angptl3 引物(136 bp)FP5'-CAAGATGATCTGCCTGCTGACT-3',RP5'-ATGTCCGTGGAGTGCCTGA-3'。以≤1 μg 总 RNA 为模板进行逆转录(10 μl 反应体系), 条件为:42℃ 30 min;99℃ 5 min;4℃ 10 min。取 cDNA 2 μl 为模板、上下游引物(10 μmol/L) 各 2 μl,设计 50 μl PCR 反应体系。Angptl3 的反应条件:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 30 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。2.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.3.3 重组标准品质粒制备 切下含目的片段的琼脂糖凝胶电泳条,按 DNA 胶回收试剂盒回收 DNA 片段,分装后-20℃保存。将回收 DNA 进行 2.5%琼脂糖凝胶电泳,计算回收效率。依据 Insert DNA 使用数(ng)=nmol 数 × 660 × Insert DNA 的 bp 数公式计算 0.3 pmol PCR 产物所对应的 ng 数,建立标准 10 μl 连接反应体系:10 × 连接缓冲液 1 μl、50%聚乙二醇 1 μl、pUCm-T 载体 1 μl、纯化后的 PCR 产物 X μl、灭菌水(6-X)μl 、T4 DNA 聚合酶 1 μl,充分混匀,16℃过夜。

用"氯化钙制备感受态大肠杆菌"方法[6]制备 DH5α 感受态细胞,分装保存于液氮中。取感受态大肠杆菌DH5α 100 μl 冰上溶解后混匀,加连接液 5 μl 混匀,冰上放置 30 min。

42℃水浴 60 s，冰上放置 2 min。加 LB 培养液 400 μl，37℃ 50 r/min 温和摇动培养 1 h。4 000 r/min 离心 5 min，弃上清后，将细菌涂在预先用 100 mmol/L 的 IPTG7 μl 和 20 mg/ml 的 X-gal 40 μl 涂布的氨苄青霉素平板上。平板在 37℃正向放置 1 h，倒置培养过夜。当菌落长至直径近 1 mm 时，放入 4℃保存 4~6 h。挑选数个白色菌落，采用菌落 PCR 方法[7]鉴定插入片段。

按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒，取 5 μl 提取液加入 995 μl TE，用光谱分析方法测定 260 nm、280 nm 吸光值，计算质粒 DNA 浓度（方法同前），1.5%琼脂糖凝胶电泳观察结果。质粒 DNA 用 *Pst* Ⅰ酶切后 37℃反应 2 h，2.5%琼脂糖凝胶电泳观察结果。进行 PCR 反应（方法同前），再 2.5%琼脂糖凝胶电泳观察。以上鉴定完成后将质粒送重庆医科大学感染病重点实验室测序，鉴定质粒构建效果。

1.3.4 Angptl3 标准曲线的建立 根据紫外光吸收法分析获得质粒浓度，按照 1/10 等比例稀释成 100 pg/μl、10 pg/μl、1 pg/μl、100 fg/μl、10 fg/μl、1 fg/μl 浓度梯度进行 Real-time PCR 反应。反应体系总体积 20 μl：上游引物（10 μmol/l）0.5 μl、下游引物（10 μmol/l）0.5 μl、模板 DNA1 μl、2×Master Mix10 μl、灭菌水 8 μl。Angptl3 反应条件：94℃预变性 2 min；94℃变性 20 s、55℃退火 20 s、72℃延伸 40 s，共 40 个循环。反应结束后，通过样品的 Ct 值与起始模板浓度的对数值制作标准曲线。PCR 反应后进行溶解曲线分析，确认反应的特异性；取 5 μl PCR 产物进行 2.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结 果

2.1 提取 RNA 的光谱分析与电泳

检测肝组织总 RNA 的 OD_{260}、OD_{280}、OD_{230} 分别为 0.216、0.106、0.105，OD_{260}/OD_{280}、OD_{260}/OD_{230} 比值均在 2.0 左右，说明提取的总 RNA 质量和纯度符合要求，RNA 浓度为 0.864 μg/μl。电泳结果可见 28 S、18 S、5.8 S 三条特征性条带，且 28 S 的亮度较 18 S 强（图 1），说明 RNA 完整。

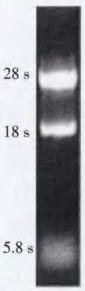
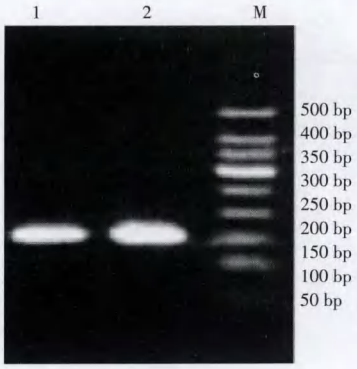
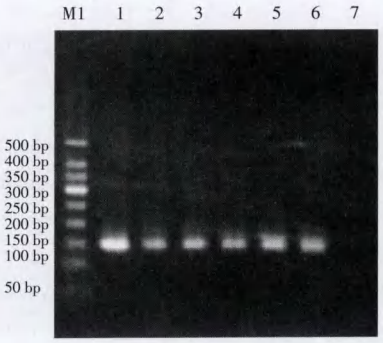


图 1 大鼠肝组织总 RNA 电泳图



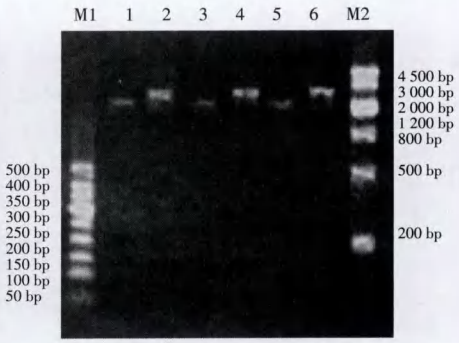
1，2. Angptl3；M. 50 bp DNA 分子量标准

图 2 RT-PCR 产物及纯化后电泳结果



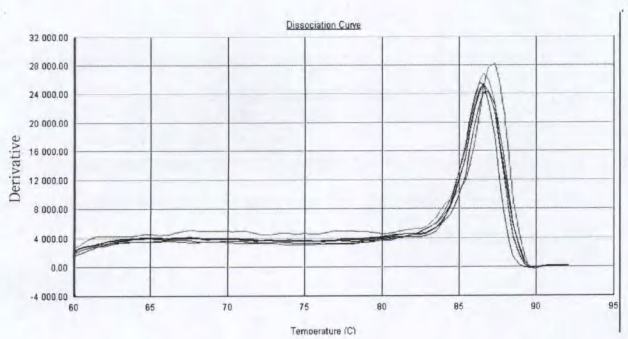
M. 50 bp 梯度 DNA 分子量标准；1~3. Angptl3；4~6. pUCm-ANG；7. 对照

图 3 Angptl3 及重组质粒 pUCm-ANG 电泳图



M1. 50 bp 梯度 DNA 分子量标准；M2. Marker Ⅲ 1，3，5. 质粒 DNA；2，4，6. *Pst* Ⅰ限制性内切酶酶切后的质粒 DNA

图 4 *Pst* Ⅰ限制性内切酶酶切后的质粒电泳图



溶解曲线　　标准曲线（R=0.997 6）

图 5 Angptl3 的溶解曲线和标准曲线

2.2 Angptl3 目的片段的扩增与纯化

大鼠肝总 RNA 在 RT-PCR 后电泳结果显示，在 150 bp 前方出现单一特异性带，与预期条带大小 136 bp 基本一致。纯化产物与未纯化样品电泳条带亮度基本不变，显示纯化效率较高(图 2)。

2.3 重组质粒的鉴定

电泳鉴定菌落 PCR 反应液显示大部分扩增产物正确。抽提阳性克隆的质粒，分别以抽提质粒和插入的 DNA 片段为模板，PCR 结果经 2.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定两者扩增产物完全一致(图 3)。抽提质粒酶切后，电泳可见一条约 2 700 bp 清晰片段，200 bp 片段隐约可见(图 4)。测序结果证实质粒连接、转化成功。

2.4 Angptl3 标准曲线

Angptl3 标准曲线(图 5 右)的相关系数为 0.997 6，非常接近于 1。根据公式计算出 Angptl3 的反应效率分别为：0.862 3。每轮 PCR 后溶解曲线(图 5 左)都是只有单一峰型的曲线，表明无引物二聚体等非特异性扩增出现，显示反应的特异性良好。

3 讨 论

Real-Time PCR 已成为基因表达定量分析的必要手段，它特异性强、灵敏度高，同时克服了普通 PCR 不能准确定量、容易污染等不足，扩展了 PCR 技术的应用范畴。

目前已知 Angptl3 的生理功能与脂类代谢密切相关[2,3]，其表达增加可引起脂代谢紊乱，增加患心脑血管疾病的危险性[9]。Hatsuda 等[10]研究发现，Angptl3 与血管生成、动脉壁厚度、造血功能等也存在密切关系。了解 Angptl3 在哺乳动物体内的组织分布特异性、表达的数量，有助于深入研究 Angptl3 的生物学功能，对研究高脂血症的发病机理，预防心脑血管疾病有重要意义。我们用 SYBR Green Ⅰ染料法实施 Real-time PCR，对大鼠肝组织 Angptl3 表达量进行测定，并选用了稳定、且易于保存的 pUCm-T 质粒作为标准品。以 SD 大鼠肝总 RNA 为模板，通过 RT-PCR 方法获得内参及含目的基因的 DNA 片段，用 T-A 克隆方法将其装载到质粒上获得标准品，并以此为模板梯度稀释，通过 Real-time PCR 检测，建立了 Angptl3 标准曲线。

评价标准曲线优劣有两个指标：相关系数和斜率。相关系数反映标准曲线的直线性，理想值应大于 0.98，越接近 1 说明直线性越好，用于定量越准确。斜率反映 PCR 扩增效率(E)，理想的扩增效率应为 0.8~1.2。本实验所得 Angptl3 标准曲线的相关系数为 0.997 6，直线性较好；斜率为：0.862 3，扩增效率适中。溶解曲线只有单一峰型，说明没有出现引物二聚体等非特异性扩增，显示反应特异性好。该标准曲线可用、可靠，是用 Real-time PCR 检测大鼠组织 Angptl3 表达量首要的一步，为下一步对 SD 大鼠各组织 Angptl3 表达量的检测奠定了基础，提供了方法和技术保障。

参 考 文 献

[1] Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, et al. Indentification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specially in liver[J]. Genomics, 1999, 62(3):477-482.

[2] Shimamura M, Matsuda M, Kobayashi S, et al. Angiopoietin-like protein3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2):604-609.

[3] Mitsuru Shimamura, Morihiro Matsuda, Hiroaki Yasumo, et al. Angiopoietin-Like Protein3 Regulates Plasma HDL Cholesterol Through Suppression of Endothelial Lipase[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(2):366-372.

[4] 李丙蓉，郑宏庭. ANGPTL3 研究进展[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(5):461-463.

[5] Koishi R, Ando Y, Ono M, et al. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice[J]. Nat Genet, 2002, 30(2):151-157.

[6] 卢圣栋，现代分子生物学实验技术第二版[M]. 北京：中国协和医科大学出社，2004, 278-279.

[7] 唐哗盛，李 英，朱静洁，等. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展，2002, 29(2):316-318.

[8] 王 欣，王继红，黄家利，等. Angpt13 基因在大鼠高脂模型中组织表达及其与血脂的关系[J]. 第三军医大学学报，2008, 30(120):1167-1169.

[9] Ginsberg HN. New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism[J]. Circulation, 2002, 106(16):2137-2142.

[10] Hatsuda S, Shoji T, Shinohara K, et al. Association between plasma angiopoietin-like protein 3 and arterial wall thickness in healthy subjects [J]. J Vasc Res, 2007, 44(1):61-66.

(责任编辑：关蕴良)