

用荧光定量 PCR 方法检测转染细胞中外源基因的拷贝数

李 影, 何蕴韶, 程 刚, 李 虎

(中山医科大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510089)

摘 要: 【目的】探讨采用荧光定量 PCR 技术检测脑源性神经营养因子(BDNF)基因转染细胞(PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO)中 BDNF 的拷贝数。【方法】分别以同等质量的 PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO, PcDNA3.1(+)/CHO(空载体转染细胞)及 CHO 细胞的 DNA 为模板, 在 PE5700PCR 仪上进行荧光定量 PCR 分析。每个样本共检测 30 次, 结果采用 q 检验分析。【结果】PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO 细胞、PcDNA3.1(+)/CHO 和 CHO 细胞株中 BDNF 的拷贝数分别为 $95\ 164 \pm 12$, $31\ 622 \pm 10$, $31\ 622 \pm 11$ 。 q 检验结果显示前者与后两者之间有统计学意义, $P < 0.05$, 而后两者之间无统计学意义, 即 $P > 0.05$ 。PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO 细胞株中 BDNF 的拷贝数是后二者的 3 倍, 而后两者的拷贝数相同。【结论】BDNF 转染细胞株中外源 BDNF 基因是以 2 个拷贝的比例整合到宿主细胞基因组中去的。

关键词: 聚合酶链反应; 转染; 拷贝数

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0008-03

Detection of the Copy Numbers of Exogenous Gene of Transfected Cells by Fluorescent Quantitative Polymerase Chain Reaction

LI Ying, HE Yun-shao, CHENG Gang, LI Hu

(Da'an Gene Diagnostic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To detect the copy numbers of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in BDNF transfected PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO cells with fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). 【Methods】BDNF DNA were amplified by GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System with equal quantitative genomic DNA of PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO, PcDNA3.1(+)/CHO and CHO cells as templates respectively. The process was repeated 30 times for every samples. The results were analyzed using q test. 【Results】The copy numbers of BDNF of PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO cells and PcDNA3.1(+)/CHO and CHO cells were $95\ 164 \pm 12$, $31\ 622 \pm 10$, $31\ 622 \pm 11$ respectively. The copy numbers of BDNF of PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO cells were as three times as those of the PcDNA3.1(+)/CHO and CHO cells. The copy numbers of the two latter were the same. 【Conclusion】The results clearly show that the PcDNA3.1(+)/BDNF/CHO cells harbor two BDNF DNA copies.

Key words: polymerase chain reaction; transfection; copy numbers

通过基因转染技术, 将外源 DNA 整合到宿主细胞的染色体上是外源蛋白质得以稳定表达的前提。这种外源基因的整合是单拷贝或多拷贝的, 而整合的拷贝数将影响重组蛋白的表达, 为此有必要对整合效率进行检测。传统上关于定量细胞中某

一特定基因拷贝数的方法有 Southern blot^[1]、毛细管电泳等^[2]多种方法, 但操作繁琐, 只能做到半定量。虽然 Pan 等^[3]采用了竞争的定量荧光 PCR (quantitative competitive fluorescent PCR) 技术, 大大地提高了定量的准确性, 但该方法为终点定量

收稿日期: 2000-06-28

基金项目: 国家技术创新项目(国经贸技 1998-345)

作者简介: 李 影(1972-), 辽宁锦州人, 硕士, 助理研究员。

(end-point assay)法,也并不十分准确。本实验采用荧光定量PCR技术,实时(real-time)检测PCR扩增过程的动力学变化,精确定量PCR扩增的起始拷贝数,从而准确得出外源基因在宿主细胞中的整合情况。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株 CHO 细胞株购至上海生化所细胞库, PcDNA3. 1(+)/BDNF/CHO 细胞株及 PcDNA3. 1(+)/CHO 细胞株由本室构建。

1.1.2 主要试剂及仪器 QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司。荧光定量 PCR 反应试剂、Gene Amp 5700 序列检测系统为美国 PE 公司产品。UVP-GDS7600 紫外凝胶分析系统为英国 Ultra-Violet 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 提取细胞 DNA 分别取培养的 PcDNA3. 1(+)/BDNF/CHO 细胞, PcDNA3. 1(+)/CHO 细胞及 CHO 细胞,用 0.25g/mL 的胰酶消化, PBS 洗涤 1 次,进行 DNA 的抽提。抽提方法按参考文献[4]进行。紫外分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} 值,计算 DNA 含量。

1.2.2 PCR 扩增 ①引物设计:根据文献[5]及查阅 genbank,自行设计一对引物,上游引物序列:5' CCAAGCTTATGACCATCCTTTTCCTTAC3', 下游引物序列:5' CCGGATCCTATCTTCCCCTTTTAAGC3'由上海申工合成。②分别以相同质量的 3 组细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系:10× PCR buffer 5 μ L, dNTPs 200 μ mol/L, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, 模板各 0.2 μ g, Taq DNA 聚合酶 3 U, 加水至 50 μ L。③反应条件:93 $^{\circ}$ C 3 min, 93 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 反应在 PE9600 PCR 仪上进行。扩增产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳。UVP-GDS7600 凝胶成像系统分析结果。以上实验每个样本重复 30 次。

1.2.3 荧光定量 PCR(FQ-PCR) ①标准曲线模板制备:将 BDNF DNA 的 PCR 扩增产物用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化,紫外分光光度计定量,倍比稀释成浓度梯度作为标准曲线模板。② PCR 反应体系:10× SYBR Green PCR buffer 5 μ L,

dNTPs 200 μ mol/L, 上下游引物 0.4 μ mol/L, Mg-Cl₂ 5 mmol/L, 模板 DNA 各 0.2 μ g, AmpliTaq Gold 2 U, 加 ddH₂O 至 50 μ L。③反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。在 Gene Amp 5700 序列检测仪上进行反应。反应结束后,设制标准曲线,根据标准曲线仪器自动分析结果。同样实验重复 30 次。

1.2.4 统计学分析 结果采用 q 检验分析。

2 结 果

2.1 常规 PCR 扩增结果

抽提细胞的基因组 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 含量。各取 0.2 μ g DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增产物在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,结果表明, PcDNA3. 1(+)/BDNF/CHO 细胞的条带和 PcDNA3. 1(+)/CHO 及 CHO 细胞的亮度一致。在 UVP-GDS7600 凝胶成像系统进行分析,结果表明 3 组的 volume 值分别为 $2\ 571 \pm 22$ 、 $2\ 569 \pm 20$ 、 $2\ 570 \pm 19$, 差别无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 荧光定量 PCR 扩增结果

将 PCR 扩增产物纯化、定量,倍比稀释,使每个 FQ-PCR 反应体系中起始模板拷贝数分别为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 。反应结束后,以起始拷贝数的自然对数(\lg Concentration of starting templates $\lg Co$)为横坐标,以循环阈值(cycle threshold, Ct)为纵坐标,可以得出该次反应的 FQ-PCR 定量标准曲线(图 1),该曲线的斜率(slope)为 -3.4, 相关系数(correlation)为 0.99,符合要求。3 组细胞 FQ-PCR 扩增的结果经 q 检验分析显示 PcDNA3. 1(+)/BDNF/CHO、PcDNA3. 1(+)/CHO 和 CHO 细胞中 BDNF 的起始拷贝数分别为 $95\ 164 \pm 12$ 、 $31\ 622 \pm 10$ 、 $31\ 622 \pm 11$ 。前者与后两者比较 $P < 0.05$,而后两者之间比较 $P > 0.05$ 。

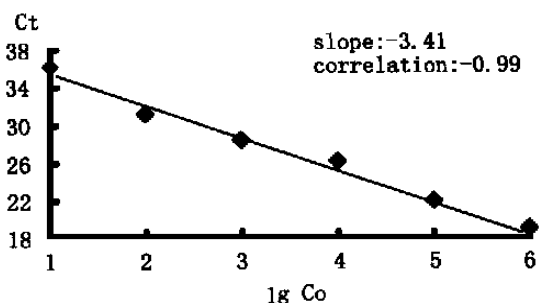


图 1 荧光定量 PCR 标准样品曲线

Fig. 1 The standard curve of FQ-PCR

3 讨 论

外源基因在哺乳动物细胞中的表达易受诸多因素的影响,如细胞的培养条件,该基因整合至宿主细胞染色体上的位点,整合的数量等^[6]。因此,对于重组蛋白的生产,外源基因在宿主细胞中的拷贝数是一个非常重要的参数。那么该如何准确测定外源基因在宿主细胞中的整合效率?目前,一些测定方法包括杂交方法、物理方法等均存在定量不准确、操作繁琐等弊病。

考虑到鼠与人的 BDNF 基因有 90% 的同源性^[7],用人源 BDNF 序列设计的引物也能扩增出鼠的 BDNF 片段。常规 PCR 反应中加入 3 组细胞相同质量的 DNA 模板,产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示无差别。从技术上讲,常规 PCR 不能区分仅相差几倍拷贝数的起始模板量。我们采用了最新发展的荧光定量 PCR 技术,该技术运用了 SYBR 荧光染料具有结合双链 DNA 的特性,用荧光强度曲线代表了 PCR 扩增的动力学变化,真正地实现了实时定量(real-time quantitation)^[8]。FQ-PCR 的原理^[9]:SYBR 绿色荧光染料(green fluorescence dye)具有结合双链 DNA 的特性。在 PCR 过程中,加入该染料,随着 DNA 双链数量的增加,其荧光值亦随之增加。荧光强度曲线代表了 PCR 扩增的动力学变化,将 PCR 扩增进入指数增长期时的循环数定义为域循环值(Ct),同时用已知量的靶基因 DNA 为模板做标准,则 Ct 值与反应体系中靶基因 DNA 的起始拷贝数的自然对数值(lgCo)之间呈线性关系。PCR 结束后,设定标准样品的曲线,经计算机的自动分析,根据未知样品的 Ct 值及标准曲线就可以准确得出未知样品中靶基因的起始拷贝数。FQ-PCR 可以得出样品中靶基因的起始拷贝数。由于荧光标记的高灵敏性,可以区分出起始模板拷贝数的细微差别,结果清楚地表明了外源基因在宿主细胞中的整合情况。为了消除操作误差,每个样本均扩增 30 管,取其平均值作为最终结果。统计学分析的结果表明,用 FQ-PCR 检测外源基因的整合效率具有较好的准确性。

虽然采用 FQ-PCR 方法极大地增加了测定的准确性,但也存在一些缺点如操作误差等。当然,这些缺点也是其他检测方法所共有的。相信随着分子生物学技术的快速发展,这些问题将会得以解决。

参考文献:

- [1] Hinnebusch J, Barbour A G. Linear and circular plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi* [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(16): 5251.
- [2] Huang M, Liu S, Murray B K, *et al.* High resolution separation and quantitation of ribonucleotides using capillary electrophoresis [J]. *Anal Biochem*, 1992, 207(2): 231.
- [3] Pan D, Shankar R, Stroncek D. Preclinical studies toward hematopoietic stem cell gene therapy for mucopolysaccharidosis type I [J]. *Am J Hum Genet*, 1996, 59(6): 1172.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1995. 464 ~ 467.
- [5] Jones K R, Reichardt I F. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(20): 8060.
- [6] Rosenthal A, Goeddel D, Nguyen T, *et al.* Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor [J]. *Endocrinology*, 1991, 129(3): 1289.
- [7] Morrison T B, Wesis J J, Wittwer C T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification [J]. *Biotechniques*, 1998, 24(6): 954.
- [8] Wirth M, Bode J, Zettlmeissl G, *et al.* Isolation of over-producing recombinant mammalian cell lines by a fast and simple selection procedure [J]. *Gene*, 1988, 73(2): 419.
- [9] Nakao M, Janssen J W, Flohr T, *et al.* Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and T-cell receptor loci by LightCycler technology [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(12): 3281.

(编辑 刘清海)