

应用实时荧光定量PCR检测外源基因拷贝数的新方法

万艳, 李丽玲, 陈小佳

(暨南大学生物工程研究所, 广东广州510632)

[摘要] 介绍一种采用实时荧光定量PCR法鉴定重组细胞株基因组中外源基因拷贝数的方法。首先根据研究对象建立标准品,以拟检测的外源基因设计特定的引物,得出标准曲线,然后在不同重组细胞株中对外源基因进行Real-Time PCR鉴定,根据结果与标准品比得出实际的拷贝数。结果表明:以转染sPDGFR α 基因的重组CHO-K1细胞为例,采用该方法,利用标准品制备的标准曲线具有较高的扩增效率和良好的线性关系,并且具有较大的线性范围($10^1 - 10^5$ 拷贝);测得各重组细胞株外源基因拷贝数不同,3次独立实验表明结果一致。与传统杂交技术鉴定转基因拷贝数相比,该方法具有高效省时、更稳定、高通量和低成本等优点。

[关键词] 外源基因; 拷贝数; 实时定量PCR

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)03-0310-04

A new method to determine the copy numbers of exogenous gene by absolute quantitative Real-Time PCR assay

WAN Yan, LI Li-ling, CHEN Xiao-jia

(Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] To explore a new method to determine the copy numbers of exogenous gene cloned in mammal cell genome by using the absolute quantitative Real-Time PCR. Firstly, with specific primers to amplify the target gene, the standard samples were set up. Then, to amplify the exogenous gene in recombinant mammal cell genome by Real-Time PCR. Compare to standard samples, their copy numbers were determined. The results show that to take exogenous sPDGFR α as example, its copy numbers in CHO-K1 genome were determined. In Real-time PCR results, standard curve showed a very good linear relationship between threshold cycle (C_t) and starting quantity of copy number. The detection range was from 10^1 to 10^5 copies per reaction. Different recombinant CHO-K1 cell lines have different exogenous sPDGFR α copy numbers. Furthermore, the results indicated a high stability and reproducibility of examples according to three independent experiments. Compare with traditional hybridization assays such as southern blot, it is a more efficient and convenient method to estimate copy numbers in genome.

[Key words] exogenous gene; copy number; Real-Time PCR

哺乳动物细胞表达外源蛋白是基因工程制药研究中的一个重要内容,一般而言,重组细胞株的获得

需经过重组表达载体的设计构建,转染,筛选和鉴定等一系列步骤。目前鉴定工作主要集中在测定外源

[收稿日期] 2008-12-31

[基金项目] 广东省科技攻关项目(200813030301349)

[作者简介] 万艳(1982-),女,硕士研究生,研究方向:基因工程制药

通讯作者:陈小佳, Tel: 020-85220220; 电子邮件: Carolcxj@msn.cn

基因的表达水平,寻找高效表达的重组细胞株。由于在转染过程中,外源DNA被随机插入宿主细胞基因组内,插入的拷贝数和位点都不固定。文献表明,当外源基因以低拷贝数(1或2个)插入时能较好的表达,而多拷贝数插入的外源基因表达不稳定甚至出现基因沉默现象^[1-2],因此,作为筛选高效又稳定的重组细胞株的一种方法,检测外源基因的拷贝数和基因表达水平,选择既高表达又低拷贝重组细胞株是一种简单有效的方法。

Southern blot法是鉴定转基因拷贝数的传统方法,近年来,比较基因组杂交,多重扩增探针杂交及芯片杂交技术也应用于拷贝数的分析^[3],但上述分子杂交方法的共同缺点是高度操作依赖性,试剂昂贵,费时,费力,并需要大量的基因组DNA^[4]。实时定量PCR法是近年来迅速发展的定量技术,在克服Southern blot定量缺点的同时,已被广泛应用于DNA和RNA的定量检测,如鉴定转基因植物中外源基因的拷贝数,监测肿瘤标志基因的拷贝数,基于检测基因拷贝数来诊断由于基因组的缺失或重复导致的相关疾病,研究由细菌引起人类疾病的病理原因而展开的细菌相关基因拷贝数检测等^[5-10]。

本研究根据P Song等人^[11]提出的采用实时定量PCR法检测基因拷贝数方案(该方案已被证实获得的数据和Southern blot的结果相当一致),建立了绝对定量PCR鉴定sPDGFR α 基因拷贝数的方法,为重组稳定细胞株的筛选提供另一种判断依据。现以表达sPDGFR α 基因的CHO-K1重组细胞株为例进行详细介绍。

1 材料和方法

1.1 材料

(1)重组质粒和细胞株 含外源基因的重组表达载体pIRES-Neo3-sPDGFR α 含sPDGFR α 外源基因的CHO-K1重组细胞株(6株)均为本所冻存。

(2)生化试剂 RNA抽提试剂Trizol购自美国Invitrogen公司;基因组DNA提取试剂盒购自天根生化;逆转录酶,RNAase抑制剂,SYBR Green Real-Time PCR mix均购自日本TOYOBA公司。

(3)寡核苷酸引物 根据已知的人sPDGFR α 序列,利用生物软件Primer Primer 5.0设计引物,上游引物:5'-AGCTGATCCGTGCTAAGGAA-3',下游引物:5'-TCCACTCAACATCAGGAAGC-3',扩增长度为167 bp。

1.2 方法

(1)RT-PCR Trizol法提取总RNA。逆转录反

应条件为:65℃ 5 min,30℃ 10 min,42℃ 60 min,72℃ 10 min。PCR反应条件为预变性95℃ 5 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 20 s,32个循环;72℃延伸10 min。体积分数为0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定目的条带。

(2)提取基因组DNA和重组质粒 按说明书操作,提取各重组细胞株和CHO-K1基因组DNA和重组质粒pIRES-Neo3-sPDGFR α ,用核酸蛋白分析仪检测提取的DNA质量及浓度。

(3)标准品构建 按照P Song^[11]构建标准品的方法,计算含有10¹、10²、10³、10⁴、10⁵个外源基因拷贝数所需表达载体质量,CHO-K1基因组质量取10 ng,公式如下:

$$\frac{\text{拷贝数} \times \text{含转基因表达载体大小}(6\,832\text{ bp})}{\text{仓鼠基因组DNA单倍体大小}(3 \times 10^9\text{ bp})} = \frac{\text{含转基因表达载体质量}}{\text{CHO-K1基因组质量}}$$

将不同质量的表达载体(代表不同拷贝数)与CHO-K1基因组DNA(10 ng)混合,构建标准品。

(4)实时定量PCR体系和程序设定 反应体系为:模板2 μL ,上游引物(10 pmol \cdot L⁻¹)0.8 μL ,下游引物(10 pmol \cdot L⁻¹)0.8 μL ,SYBR Green Real-Time PCR Mix 10 μL ,双蒸水6.4 μL 。反应条件为:95℃ 10 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,32个循环。熔解曲线分析:温度55℃~95℃,每分钟读一次。每个样设置3个平行样,取均值。

2 结果

2.1 各重组细胞株表达sPDGFR α 外源基因的鉴定

将各重组细胞株复苏培养,提取RNA,RT-PCR扩增sPDGFR α 基因,产物经体积分数为0.8%琼脂糖凝胶电泳,在100至200 bp处有一阳性条带(见图1),与预期理论值167 bp相符,阴性对照(水对照)无特异条带,鉴定各重组细胞株均表达sPDGFR α 外源基因。



1~6:各重组细胞株关于sPDGFR α 的RT-PCR产物;7:阴性对照;M:100 bp DNA Marker

图1 各重组细胞株表达sPDGFR α 外源基因鉴定

2.2 Real-Time PCR 绝对定量标准曲线

(1)扩增曲线及评价 标准品的扩增曲线(图 2a)显示了一组间距相等的平行曲线,10⁵ 个拷贝数的标准品从第 5 个循环开始出现荧光信号,10 个拷贝数的标准品从第 20 个循环开始出现荧光信号,表明实时定量 PCR 检测基因拷贝数有良好的线性范围. 软件进一步分析显示,标准曲线的直线回归相关系数 $r = 0.998\ 31$,所有标准品的 C_t 值基本在一条直线上,没有任何一个标准品出现大的偏差,表明标准品的制备成功. 为了评估反应的特异性,对熔解曲线分析(图 2b),约在 88 ℃ 附近有且只有一个单峰,表明引物扩增的特异性非常好.

(2)标准曲线制作 以拷贝数的自然对数($\lg N$)为纵坐标,以 C_t 值为横坐标,制作定量标准曲线,并获得定量方程式 $Y = -0.244\ 5X + 5.731\ 3$.

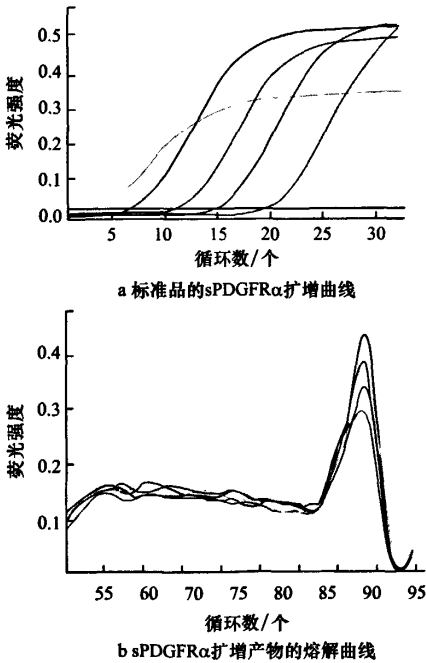


图 2 实时定量 PCR 检测标准品拷贝数

2.3 重组细胞株外源基因 sPDGFRα 拷贝数鉴定

提取各重组细胞株基因组,经体积分数为 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(图 3),显示基因组无蛋白质和 RNA 污染. 分别取 10 ng 进行实时定量 PCR,扩增 sPDGFRα 基因(图 4),并 3 次独立重复实验. 表 1 所示,各重组细胞株关于 sPDGFRα 基因 3 次定量检测的 C_t 值标准差小,实验重复性好. 拷贝数的计算依照公式 $Y = -0.244\ 5X + 5.731\ 3$ 计算得出.

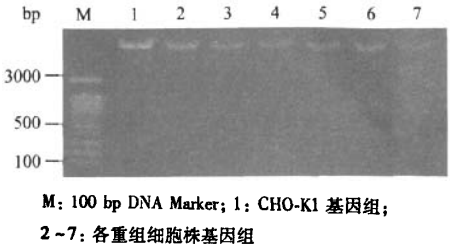


图 3 基因组凝胶电泳图

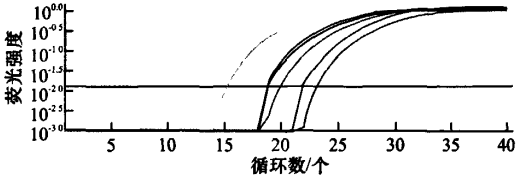


表 1 实时定量 PCR 检测重组细胞株拷贝数的稳定性和重复性

重组细胞株编号	C _t 值			平均值 ± 标准差	拷贝数
	1	2	3		
1	18.74	18.61	18.69	18.68 ± 0.06	14.4
2	15.21	15.10	15.17	15.16 ± 0.05	104.7
3	18.85	18.98	18.76	18.86 ± 0.11	13.2
4	23.06	23.14	23.12	23.11 ± 0.04	1.2
5	21.81	21.86	21.92	21.86 ± 0.05	2.4
6	19.90	19.82	19.88	19.87 ± 0.04	7.4

3 讨论

检测外源基因拷贝数,荧光定量 PCR 技术较 Southern blot 等分子杂交方法简便快捷,所需样品少,不进行放射性检测,成本低(1 个 20 μL 反应体系试剂成本为 2~3 元人民币),通量高(1 次反应可检测 96 个样品)等优点,但是这一方法最理想的是要获得一套好的标准品,此标准品应该是已插入外源基因的植物或动物基因组 DNA,并且用 Southern blot 准确测得插入外源基因拷贝数. 但在实际工作中证明,由于插入宿主细胞的不同,如物种、来源、生长特性等原因,很难得到这样一套标准品. 综合文献和技术背景,再按照 P Song 等^[11]提出的代替方案,我们根据外源基因拷贝数和动物细胞基因组 DNA 的大小,按一定浓度比率混合制成一套标准品,实现了实时荧光定量 PCR 方法在测定外源基因拷贝数领域的顺利应用.

该方法对于筛选高效稳定的重组细胞株有重要的意义,由于哺乳动物表达外源蛋白具有完善的翻

译后修饰优点,保证了外源蛋白更好的生物活性,体内稳定性和免疫原性^[12],但与大肠杆菌相比,哺乳动物细胞表达水平低,是基因工程药物研究和生产的瓶颈。要得到高效稳定表达外源蛋白的细胞株,除了对表达载体和高表达工程细胞株改造^[13],后续的筛选也尤为重要。而筛选的标准是外源基因高的表达水平和低的拷贝数,此情况下,外源基因可能插入到基因组转录热点区(Hot spot),得到高效表达,而非被沉默^[14-15]。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术对重组细胞株关于外源基因拷贝数进行检测,方法稳定灵敏,为获得高效稳定重组细胞株提供重要依据。

[参考文献]

- [1] FLAVELL R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 3490-3496.
- [2] VAUCHERET H, BÉCLIN C, ELMAYAN T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants[J]. Plant J, 1998, 16(6): 651-659.
- [3] YANG L, DING J, ZHANG C, et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23(10-11): 759-763.
- [4] MASON G, PROVERO P, VAIRA A M, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[J]. BMC Biotechnol, 2002, 24(2): 20.
- [5] MALAKHO S G, KORSHUNOV A, STROGANOVA A M, et al. Fast detection of MYCN copy number alterations in brain neuronal tumors by real-time PCR[J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(2): 123-130.
- [6] WILKE K, DUMAN B, HORST J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR[J]. Hum Mutat, 2000, 16(5): 431-436.
- [7] CANDELA M, VITALI B, MATTEUZZI D, et al. Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR[J]. Lett Appl Microbiol, 2004, 38(3): 229-232.
- [8] OMAR A A, GRAHAM J H, GROSSER J W. Estimation of transgene copy number in transformed citrus plants by quantitative multiplex real-time PCR[J]. Biotechnol. Prog, 2008, 24(6): 1241-1248.
- [9] MORILLO J M, LAU L, SANZ M, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens[J]. J Clin Periodontol, 2004, 31(12): 1054-1060.
- [10] ANHUF D, EGGERMANN T, ZERRES K, et al. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using Taq-Man™ technology[J]. Hum Mutat, 2003, 22(1): 74-78.
- [11] SONG P, CAI C Q, SKOKUT M, et al. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERSTM-derived transgenic maize[J]. Plant Cell Rep, 2002, 20(10): 948-954.
- [12] CUMMING D A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications[J]. Glycobiology, 1991, 1: 115.
- [13] 张国强, 刘志刚, 俞炜源. 哺乳动物细胞高效表达系统研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 56-59.
- [14] KIM S J, LEE G M. Cytogenetic analysis of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, 64(6): 741-749.
- [15] KODURI R K, MILLER J T, THAMMANA P. An efficient homologous recombination vector pTV(I) contains a hot spot for increased recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells[J]. Gene, 2001, 280(1-2): 87-95.

[责任编辑:黄建军]