

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00552

基于荧光通用引物的多重定量 RT-PCR 基因表达谱分析平台的构建、优化及其应用

王勤熙, 李凯, 周宇荀, 肖君华

东华大学生物科学与技术研究所, 上海 201620

摘要: 文章建立并优化了一种基于荧光通用引物的多重定量 RT-PCR 技术, 该技术采用了嵌合特异引物引导荧光通用引物的扩增方案, 多个目的基因被一对通用引物等比例扩增, 从而实现多重定量检测。该技术实现了经济可靠的中通量基因表达定量研究, 弥补了基因表达分析平台中 cDNA 芯片定量准确性低和 Real-time quantitative PCR 通量小的缺点, 完善了整个基因表达的分析过程。文章以小鼠 X 染色体上影响性发育启动的 QTL 区段为例, 选择 11 个目的基因进行了技术构建及优化, 确定了该技术的检测灵敏度为 10^2 拷贝, 通用引物与上游嵌合特异引物的比例以 1:1 为佳, 并且验证了该技术的重复性和准确性。降落式(Touchdown)PCR 结合通用引物补加实验表明, 该优化步骤可大大改善低丰度表达基因的扩增。通过对 2 个品系(C3H/HeJ 和 C57BL/6J)15 日龄小鼠的下丘脑和睾丸组织中的 11 个基因的表达分析, 在下丘脑中找到了一个差异表达的基因 *PHF6* 可用于进一步的基因功能研究。

关键词: 通用引物; 多重定量 RT-PCR; 基因表达谱分析; 性发育启动

Development, optimization and application of the expression analysis platform based on multiplex quantitative RT-PCR using fluorescent universal primers

WANG Qin-Xi, LI Kai, ZHOU Yu-Xun, XIAO Jun-Hua

Institute of Biological Science & Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China

Abstract: A multiplex quantitative RT-PCR technology with a universal fluorescent primer was established. This technology employs a chimeric-primer-induced-universal-primer amplification method that ensures target genes amplified in a constant ratio. This technique was cost-effective, moderate-throughput, and reliable in quantification of gene expression. It is complementary to cDNA chip, which has low quantitative accuracy, and Real-time quantitative PCR with low throughput, through improving the entire process of expression profiling analysis. Eleven genes within a QTL segment regulating mouse puberty onset on chromosome X were investigated to construct and optimize the method. The sensitivity of detection (10^2 copies) was determined, the concentration ratio of universal primer and chimeric forward primers (1:1) was optimized, and the accuracy and repeatability were validated. The method of Touchdown PCR with addition of universal primers significantly improved amplification of genes expressed in low abundance. After testing the expression profile of 11 genes in hypothalamus and testis in two mouse strains C3H/HeJ and C57BL/6J at the age of 15 d, one gene named *PHF6* was found

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2009-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30700529)资助

作者简介: 王勤熙(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: wqx457@163.com

通讯作者: 李凯(1978-), 男, 副研究员, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: likai@dhu.edu.cn

differentially expressed for further function analysis.

Keywords: universal primers; multiplex RT-PCR; expression profile analysis; puberty onset

人类复杂性状疾病是当前研究的热点与难点。糖尿病、癌症、早老性痴呆和精神分裂症等疾病的遗传机理和相关效应基因仍未最终揭晓。通过全基因组转录图谱来查找候选基因是复杂性状研究的重要步骤,也对进一步理解人类复杂性状疾病和分子药物的研发提供了帮助^[1]。目前,已有研究将转录图谱用于癌症诊断和疗效比较^[2]、肿瘤分类^[3,4]、预测肿瘤化学治疗的药剂疗效^[5]。虽然哺乳动物细胞约含 3~4 万个基因,平均每个细胞约有 1 万个基因参加表达,但是通常的状况是,10 到 50 个基因表达与一种特定的疾病相关,10 到 50 个基因和一个特定的通路和药物反应相关^[6,7]。

全基因组表达芯片能成功的从各种反应条件下筛选出差异常表达的基因,并被作为候选基因进行假设验证和功能分析^[8]。芯片技术的优势是一次实验所能检测的基因量很大,但同时也存在着定量准确度较低的明显缺陷,而它极高的成本亦限制了其推广应用。基因表达分析中最常用的技术就是实时定量 PCR(Real-time quantitative PCR),它具有Northern blot 等技术所不具有的定量分析能力,如稳定性好、灵敏度高和 7 个数量级的定量线性等优势^[9],因此被广泛的用于基因表达定量分析中,但同时它也存在单管检测通量小、样本处理费时费力成本高等缺点。因此,在cDNA芯片进行大规模基因表达筛选^[10]、Real-time quantitative PCR技术进行表达确认的同时,尚需一种可针对 10 种或数十种基因表达鉴定的技术。此外,考虑到多基因性状 (Multigenic traits) 受到基因-环境相互作用的影响,基因精细定位的研究往往仅能定到几个厘摩 (cM) 内的QTL区域,该区域内尚有上百个基因,此种情形亦表明中等通量的基因表达分析平台亟待开发。

本研究构建并优化了一种基于荧光通用引物的多重定量RT-PCR基因表达谱分析平台,该平台结合了终点PCR法和荧光检测法,实现了中通量、低成本的基因表达分析,并且通过应用该平台技术对已定位QTL区段内候选基因的表达进行分析,以寻找效

应基因。前期的研究通过全基因组扫描和特异区段同类系分析发现在小鼠的X染色体上存在一个与小鼠性发育启动时间相关的QTL区段^[11]。本文在该QTL区段内选择了 11 个目的基因,这些基因的转录调控区、非翻译区或外显子区在定位的两个品系小鼠间(C3H/HeJ和C57BL/6J)存在SNP位点。利用上述平台,对这 2 个品系 15 日龄小鼠的下丘脑和睾丸组织中的所选目的基因进行定量分析,推测该QTL区段内影响性发育启动的候选基因。

1 材料和方法

1.1 平台反应原理

基于荧光通用引物的多重定量 RT-PCR 基因表达谱分析平台的具体反应过程分为三步进行:第一步为逆转录反应阶段,利用下游嵌合特异引物(3 端为一段基因特异序列,5 端为一段通用引物序列)逆转录合成目的基因的 cDNA 第一链;第二步为 PCR 反应阶段,PCR 反应在上游嵌合特异引物和荧光标记通用引物引导下进行,前 3 个 PCR 循环时,上游嵌合特异引物将通用引物序列互补序列加到目的基因 DNA 片段的两端,余下的循环在荧光通用引物引导下完成;第三步为根据荧光标记的 PCR 产物长度、荧光强度的差异,利用测序仪予以检测定量(图 1)。

1.2 小鼠饲养与取样

实验选用 C3H/HeJ 和 C57BL/6J 两个内交系小鼠,饲养于中国科学院上海实验动物中心,各取 15 日龄的小鼠,解剖取其下丘脑和睾丸组织经液氮速冻后置-70℃保存备用。

1.3 引物设计

通用引物序列为 5'-Fam-cgggctacgctatctacgac-3' (上游,引物 5 端用 Fam 荧光素标记)与 5'-cgggcagtagtaccgtgt-3' (下游),经 GenBank 检索与小鼠基因组无特异性匹配。

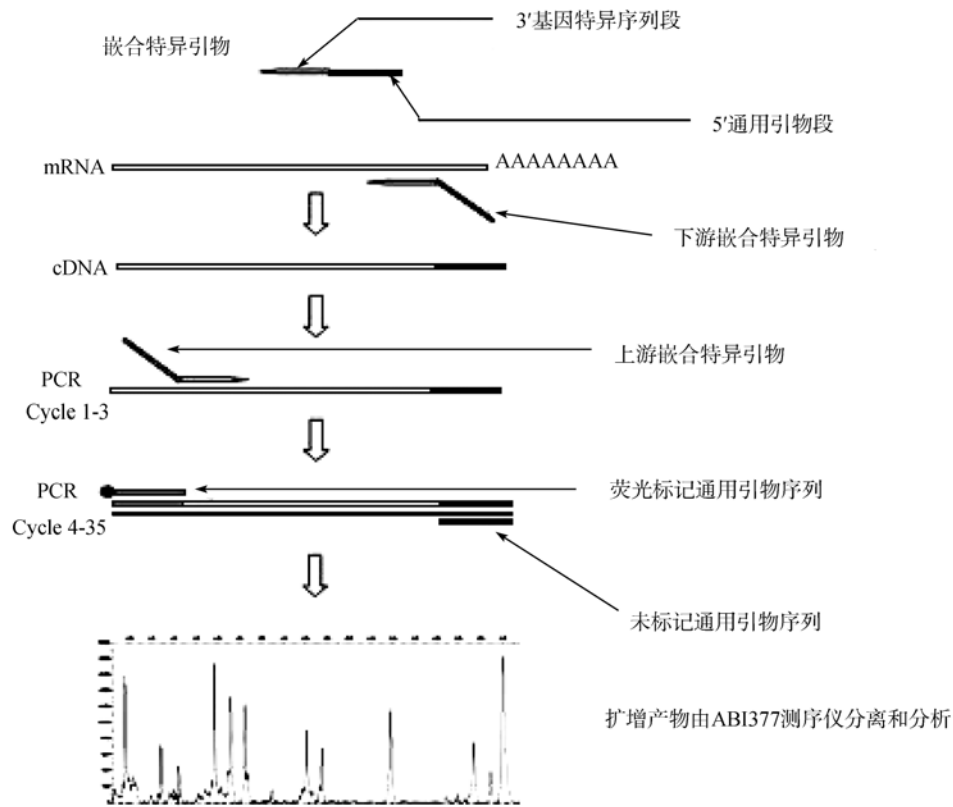


图 1 反应流程图

图中仅表示了单个基因的反应过程。

如表 1 所示, 本研究利用 GenBank 数据库信息, 设计了 14 对 18 bp 长的序列作为嵌合特异引物 3 端的特异引物序列段, 每条引物 5 端加上通用引物序列, 用以扩增 11 个小鼠目的基因和 3 个看家基因。扩增产物长度控制在 100~400 bp, 相邻片段差异最小为 5~7 bp。

1.4 RNA 制备

总 RNA 抽提采用 TRIzol 法^[12]。微量分光光度计 (U-008OD, Hitachi) 控制抽提 RNA 的 $OD_{260/280}$ 在 1.7~2.0 间, 浓度调整到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。用 DNase (Invitrogen) 消化 TRIzol 抽提的总 RNA 中的少量 DNA 污染。DNase 消化反应体系为 RNA 1 μL 、10 \times Reaction buffer 1 μL 、DNase (1 U/ μL) 1 μL , 补水至 10 μL 。反应过程为 20 15 min, 然后加 1 μL EDTA (25 mmol/L), 65 10 min 使 Dnase 失活。反应后的 RNA 浓度是 100 ng/ μL 。

1.5 RT-PCR

逆转录反应体系为 5 \times Reaction buffer 4 μL 、

MgCl₂ (25 mmol/L) 4.8 μL 、dNTP Mix (2 mmol/L) 1 μL 、ImProm- Reverse Transcriptase (Promega) (1 U/ μL) 1 μL 、下游嵌合引物 (总浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 2 μL 、RNA 模板 (100 ng/ μL) 2~3 μL , 补水至 20 μL 。反应过程为 25 5 min, 42 60 min, 70 15 min。

PCR 反应体系为 10 \times PCR buffer 1 μL 、MgCl₂ (25 mmol/L) 0.6 μL 、dNTP Mix (2 mmol/L) 1 μL 、5 \times Q-Solution 2 μL 、DNA Polymerase (Qiagen) (5 U/ μL) 0.1 μL 、cDNA 模板 (10~15 ng/ μL) 1 μL 、上游嵌合特异引物对 (总浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL 、通用上下游引物对 (总浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , 补水至 10 μL 。反应过程为 95 15 min; 94 30 s, 55 90 s, 72 1 min, 循环 35 次; 72 10 min。

1.6 测序仪分型定量

各取 PCR 反应产物 1 μL 、DNA 分子标准 1 μL 、3 \times 上样缓冲液 1 μL 混匀。上述混合物经 95 变性 3 min, 迅速置于冰浴 2 min, 立即上 377 测序仪 (Applied Biosystems Inc.) 检测, 电泳条件为电压 3 kV,

表 1 多重 RT-PCR 中所用的基因及引物序列

基因名称	嵌合特异引物序列 (5' 3', 通用引物序列用小写字母表示)	产物长度(bp)	产物代号
PHF6	F: cgggctacgctatctacgacCGCAAAGGAAGACCGAGA R: cgggcagtaagtaccgttgTGGACCTGCTGTCTTCTGG	98	A
PLAC1	F: cgggctacgctatctacgacATCCGCATCAAGGCTGTC R: cgggcagtaagtaccgttgGATGAGCCCTTGGAAGCA	114	B
TMEM32	F: cgggctacgctatctacgacCCCACGAGCATGAACACA R: cgggcagtaagtaccgttgAGGCGGGGTTCCTATCAA	122	C
USP26	F: cgggctacgctatctacgacATGCCCAGACACAGCACA R: cgggcagtaagtaccgttgTGACACCGAACCATTCCA	138	D
DDX26B	F: cgggctacgctatctacgacACGTGGCATTGAGGGAAA R: cgggcagtaagtaccgttgTCATGGAGGCGGACGTAT	145	E
PPIA	F: cgggctacgctatctacgacACGCCACTGTCGCTTTTC R: cgggcagtaagtaccgttgTGCAAACAGCTCGAAGGA	152	h1
MOSPD1	F: cgggctacgctatctacgacTTCCGAGGAGCCAGTGTT R: cgggcagtaagtaccgttgTGGCACTGGATCCCCTT	164	F
HSBST2	F: cgggctacgctatctacgacTTCGGCCAGGTTTGTACC R: cgggcagtaagtaccgttgAGGTGACGGCCAAAAGTG	178	G
GM773	F: cgggctacgctatctacgacAACACATCACGGCAGGT R: cgggcagtaagtaccgttgTCCAGGAAAGCCATTGTC	187	H
MBNL3	F: cgggctacgctatctacgacTGGGCGTGAGACAGTTT R: cgggcagtaagtaccgttgGGCCTGACTTTTGCCAGA	197	I
GAPDH	F: cgggctacgctatctacgacCAATGTGTCCGTCTGGA R: cgggcagtaagtaccgttgGGCATCGAAGGTGGAAGA	218	h2
FH11	F: cgggctacgctatctacgacCAGGTGCAAAGGGTGCTT R: cgggcagtaagtaccgttgTGGCCTTGTTGCACTTCA	249	J
CXX1B/CXX1A	F: cgggctacgctatctacgacATGGCGAGATGGACAAGC R: cgggcagtaagtaccgttgCGAACACCCGCTTCATCT	256	K
BETA-ACTIN	F: cgggctacgctatctacgacCAACTGGGACGACATGgA R: cgggcagtaagtaccgttgCCATCACAATGCCTGTGG	270	h3

电泳时间 2.5 h。电泳结果经 GeneScan 和 GeneMapper ID 软件分析获得产物大小、峰高、峰面积等数据。产物大小由 DNA 分子标准得出，峰高用来预判目的基因的表达强度，峰面积(即 PCR 产物条带荧光强度)用于计算目的基因的相对表达量，公式如下：

目的基因的相对表达量 (Relative expression level) =目的基因峰面积 ÷ 看家基因峰面积的几何平均数

1.7 灵敏度

灵敏度检测利用合成的两个阳性 DNA 单链模板(表 2)，保持其中一个模板 T3 用量为 10⁷(拷贝数)不变，另一模板 T1 做梯度稀释从 10⁷~10¹，两模板依次组成 7 个浓度组合 (10¹: 10⁷, 10²: 10⁷, 10³: 10⁷,

10⁴: 10⁷, 10⁵: 10⁷, 10⁶: 10⁷, 10⁷: 10⁷) 进行 PCR 反应。反应的引物组合为通用引物对和 14 条上游嵌合特异引物混合物。

1.8 平台优化实验

通用引物与上游嵌合特异引物比例优化实验针对合成的 3 个阳性 DNA 模板(T1、T2 和 T3)进行。通用引物对的用量保持 10 μmol/L，上游嵌合特异引物混合物的用量从 10 μmol/L 进行 5 倍浓度梯度稀释 (2 μmol/L、0.4 μmol/L、0.08 μmol/L 和 0.016 μmol/L)。PCR 反应的阳性模板浓度分别为 10³ 和 10² 拷贝。

针对看家基因浓度过高的问题，对半稀释看家基因的上游嵌合特异引物，提高目的基因产物的荧光检测信号。

表 2 阳性模板序列

阳性模板代号	序列(5' 3', 下游通用引物序列段用小写字母表示)	产物长度(bp)
T1	cgggcagtaagtaccgtgtCGACATCTGGAGAGACAGCCTTGATGCGGAT	71 *
T2	cgggcagtaagtaccgtgtAGTTTAACACAAGTAATGTGTTTCATGCTCGTGGG	74**
T3	cgggcagtaagtaccgtgtGCATTTTGCAATCTCAGCAACACTGGCTCCTCGGAA	77 ***

注: 产物由 3 个目的基因的上游嵌合特异引物和上下游通用引物反应生成。*: *PLAC1*, **: *TMEM32*, ***: *MOSPD1*。

考虑到部分低丰度基因的表达检测, 平台检测中的 PCR 反应采用上游嵌合特异引物降落式 (Touchdown, TD)PCR 扩增后补加荧光通用引物来提高产物检测信号。该方案的 PCR 反应过程分为两个阶段: 第一个阶段为前 11 个循环的 TD-PCR 循环, 复性温度为 60 ~50, 每循环降低 1; 第二个阶段为通用引物补加, 并进行 30 个循环的 PCR 扩增。

1.9 重复性实验

取 4 周龄大的 C57BL/6J 小鼠的下丘脑组织并抽提其 RNA, 针对 10 个目的基因(*CXX1B/CXX1A* 除外)和 3 个看家基因共 13 个基因进行平台检测。通过比较 3 次重复实验间基因的相对表达量来评估平台的检测重复性。

1.10 样本检测及方法比较

取 15 日龄的 C57BL/6J 和 C3H/HeJ 小鼠的下丘脑和睾丸组织, 利用上述的平台标准方法, 检测 11 个目的基因在两品系相同组织间的表达情况。随后, 挑选品系间差异表达的基因用 Real-time PCR 技术进行 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 [13] 相对定量比较验证。模板为平台的特异引物逆转录成的 cDNA, Real-Time PCR 所用的试剂盒为 RealMasterMix (SYBR Green) (Tiangen Biotech), 反应体系为 2.5× RealMasterMix/20×SYBR solution 4.5 μL、上下游引物 (2 μmol/L) 各 1 μL、cDNA 模板 0.5 μL, 补水至 10 μL。反应过程为 95 2 min; 94 20 s, 57 30 s, 68 1 min, 循环 35 次; 68 10 min。

2 结果与分析

2.1 平台灵敏度

图 2 所示, 当阳性模板在混合模板中比例低于 10^{-5} 时, 相对表达量不再与模板量成线性, 表明混合模板中目的基因间的含量不可大于 5 个数量级, 而平台的最低检测灵敏度为 10^2 的模板拷贝数。

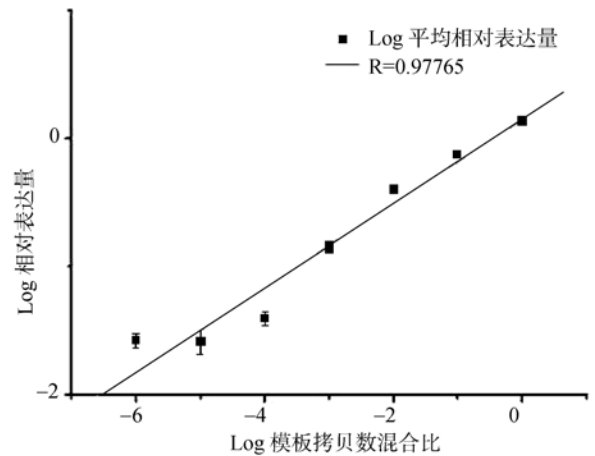


图 2 灵敏度测试

横坐标为 T1 模板拷贝数与 T3 模板拷贝数比值的对数值。纵坐标为 T1 模板对于 T3 模板的相对表达量的对数值。图中 7 个点表示 7 个浓度组合。每个点为 3 次重复实验的平均值 (Mean ± SE)。

2.2 引物优化

图 3 所示, 在通用引物浓度保持一致的情况下, 上游嵌合特异引物的浓度应随着模板数的增多而降低, 在模板数为 10^3 拷贝时, 最优通用引物和上游嵌合特异引物的浓度比为 25:1, 而模板数为 10^2 拷贝时为 1:1。因此, 上游嵌合特异引物应随待测目的基因模板量的增加而减少。由于难以估计样本 RNA 中各个目的基因的实际拷贝数, 并且各个目的基因的表达量差异很大, 通用引物和上游嵌合特异引物的浓度比需根据不同的 RNA 样本进行优化。该平台检测的 11 个目的基因经优化得到在通用引物和上游嵌合特异引物的用量比为 1:1 时得到最佳检测结果 (图 4)。

当看家基因和目的基因的上游嵌合特异引物的浓度相同时, 目的基因的扩增被高浓度的看家基因产物所抑制 (图 5a)。当看家基因的引物浓度稀释一半时, 可有效扩增目的基因产物 (图 5b)。

因 15 日龄小鼠下丘脑组织 RNA 含量低, 导致检测灵敏度不高 (图 5c)。故设计了上游嵌合特异引物 TD-PCR 结合荧光通用引物补加方案。图 5d 所示, 上述方案能明显的提高各个待测目的基因的产物量。

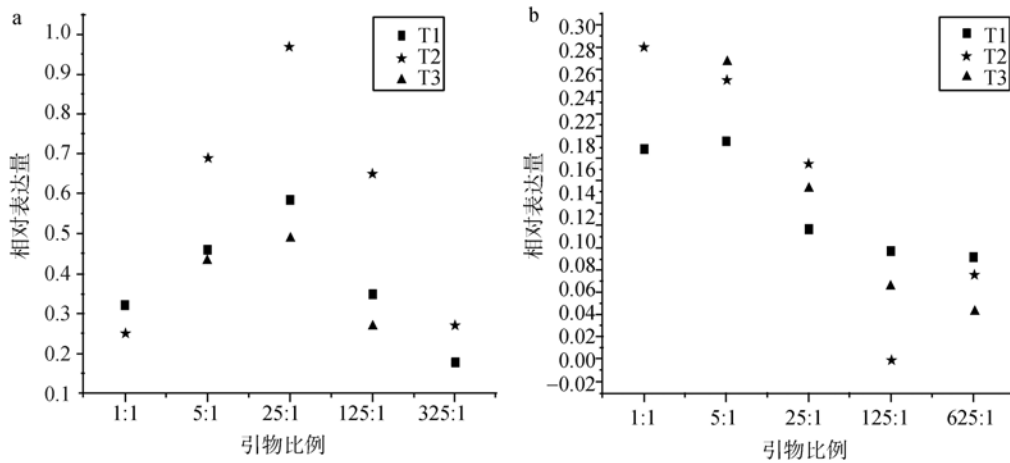


图3 通用引物和上游嵌合特异引物的用量比例优化——阳性模板

横坐标为通用引物和上游嵌合特异引物的比例, 纵坐标为3个阳性模板相对于分子标准的相对表达量。(a): 阳性模板为 10^3 拷贝数; (b): 阳性模板为 10^2 拷贝数。

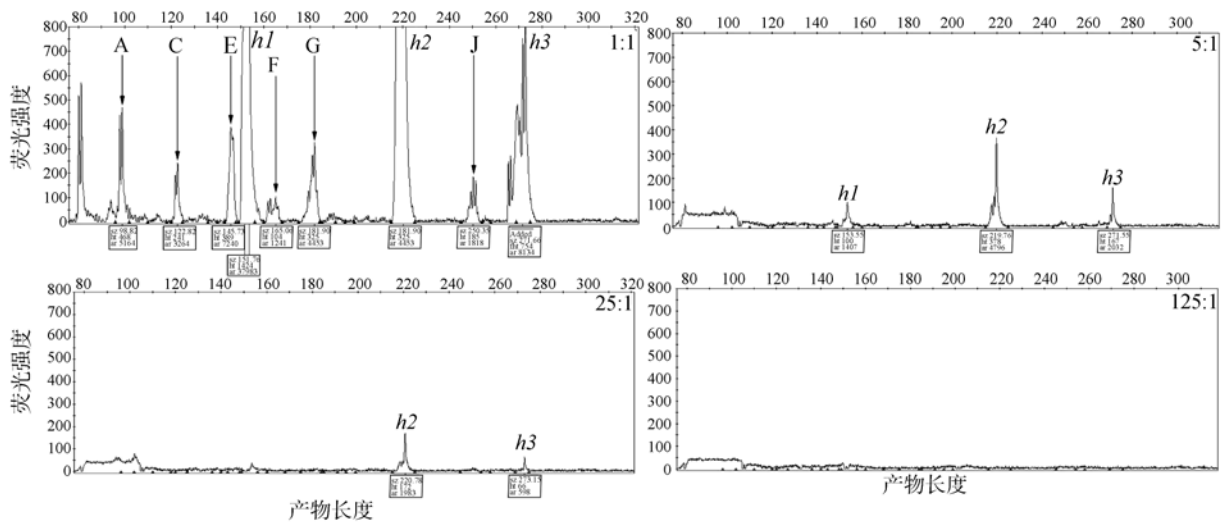


图4 通用引物和上游嵌合特异引物的用量比例优化——样本

4张图的通用引物与目的基因上游嵌合特异引物的浓度比分别为1:1, 5:1, 25:1, 125:1。样本为15日龄B6小鼠下丘脑组织。

2.4 平台重复性实验

3次重复实验(图6)表明, 表达的目的基因在不同重复间相对表达量差异很小, 意味着平台的重复性良好。

2.5 样本检测与比较

图7为平台标准方案检测结果, 下丘脑组织中基因 *PHF6* 在两个品系小鼠间表达存在差异, 而在睾丸组织中目的基因表达无明显差异, 并且下丘脑中目的基因的表达量普遍没有睾丸中的高, 超过检测背景阈值的目的基因也没睾丸中的多。

同样的样本, 用 Real-time PCR 的 2^{-C_t} 法进行相对定量比较。选取 *PHF6* 为目的基因, *PPIA* 作为看家

基因, 引物序列为, *PHF6*: 5'-catgaactggagccctcatc-3 (上游), 5'-tggaactgtgtcttctgg-3 (下游); *PPIA*: 5'-acgcagtcgcttttc-3 (上游), 5'-tgcaaacagctcgaagga-3 (下游)。

比较结果显示, 平台检测 *PHF6* 在 B6 下丘脑中的表达量是在 C3 下丘脑中的 4.99 倍, 而用 TD-PCR 结合通用引物补加优化方案得到 *PHF6* 在 B6 下丘脑中的表达量是 C3 下丘脑中的 3.82 倍。Real-time PCR 检测 *PHF6* 在 B6 下丘脑中的表达量是 C3 下丘脑中的表达量的 1.53 倍。3种检测方案的检测结果趋势是一致的。平台方案和 TD-PCR 通用引物补加方案的检测的 *PHF6* 的相对表达倍数相近, 而 Real-time PCR 检测的 *PHF6* 的相对表达倍数则较小。

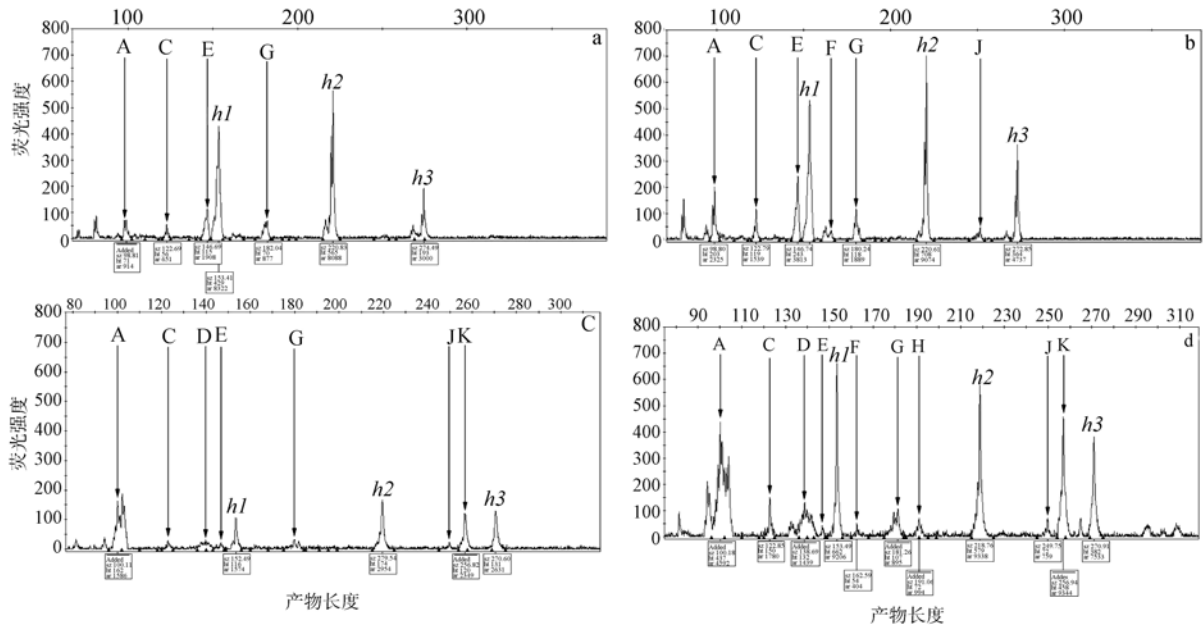


图 5 看家基因引物浓度优化和 Touchdown PCR 结合通用引物补加方案优化

a: 看家基因的上游嵌合特异引物浓度和目的基因相同; b: 看家基因的上游嵌合特异引物浓度减半。(a)(b)样本为 4 周龄 B6 小鼠下丘脑组织。c: 为原方案扩增; d: 为上游嵌合特异引物降落式(Touchdown)PCR 结合荧光通用引物补加方案扩增。(c)(d)样本为 15 日龄 B6 小鼠下丘脑组织。

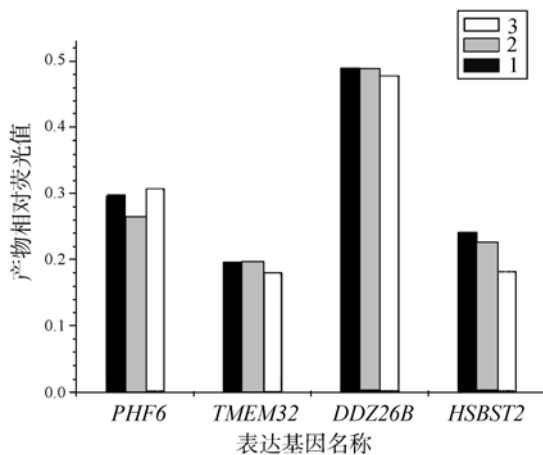


图 6 重复性验证

目的基因 3 次重复实验的相对表达量及其相互间的比较。

3 讨论

3.1 平台优化与影响因素

使各个目的基因的扩增效率保持一致是本平台得以实施的关键。目的基因的扩增效率主要与引物及产物长度有关, 已有研究证明引物序列和产物长度相同时, 扩增效率是一致的^[14-16]。本研究所用的扩增方案分为, 前几个循环的上游嵌合特异引物线性扩增反应, 使目的基因待扩序列的两端加上了通

用引物序列; 余下循环的高浓度通用引物指数扩增反应, 完成整个 PCR 反应。各目的基因用同一对通用引物进行扩增, 并且通过同 3 个等间距不同产物长度的看家基因扩增产物的比较, 消除了长度对扩增效率的影响, 实现了多个目的基因的等效率扩增。

在平台的检测能力范围之内, 阳性模板的相对表达量应随着模板量成线性关系。当阳性模板在混合模板中比例低于 10^{-5} 时, 相对表达量不再与模板量成线性。本研究利用合成的 DNA 单链作为阳性模板来模拟平台检测 cDNA 的情况, 虽然损失了对逆转录效率差异的评估, 但避免 RNA 标准品制备的繁琐过程。此外有研究表明, 逆转录反应阶段的效率差异远远小于 PCR 反应阶段的效率差异^[17]。

本研究重点考察了通用引物和上游嵌合特异引物的浓度比例对扩增效率的影响。结果表明, 目的基因的模板数和其对应的上游嵌合特异引物成反比关系, 存在一种较为矛盾的状态。在 PCR 反应的前 3 个循环中, 待测目的基因的模板数越少就需要越多的上游嵌合特异引物来引导, 以线性扩增足量的模板数供通用引物扩增, 同时又要保证后面的反应中无多余的上游嵌合特异引物残留产生干扰, 而不同样本中各目的基因表达状态不同, 并且表达目的基因 mRNA

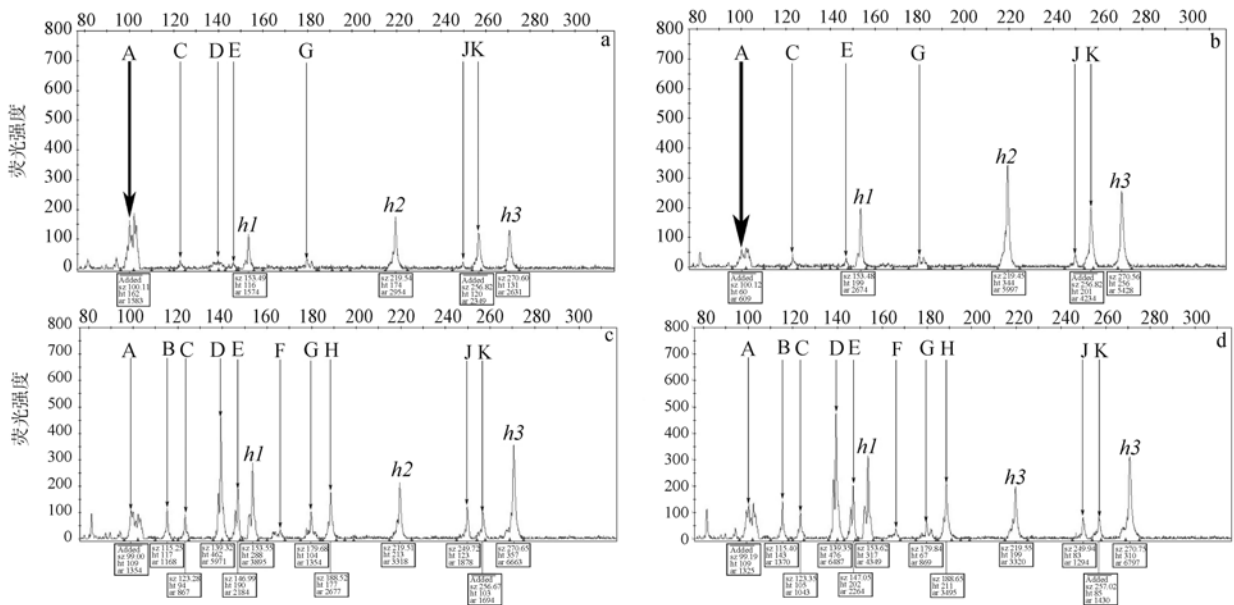


图7 样本检测实验

11个目的基因和3个看家基因在15日龄小鼠的下丘脑和睾丸中的表达情况。(a): C57BL/6J的下丘脑; (b): C3H/HeJ的下丘脑; (c): C57BL/6J的睾丸; (d): C3H/HeJ的睾丸。*PHF6*(粗箭头)在(a)(b)中表达有差异。

间的浓度差异也很大, 因此, 在利用本平台检测时应首先评估有效的通用引物与上游嵌合特异引物比例, 我们的建议是从1:1梯度到25:1进行优化。

本研究结果表明, 适当降低高丰度表达基因的引物浓度有利于低表达目的基因的扩增。其原因是高表达基因产物量过多而抑制了其它基因的扩增。如当检测4周龄的B6小鼠下丘脑组织时, 发现看家基因的产物量过多, 对半稀释其上游嵌合特异引物后, 显著提高了其他基因的产物量。

上游嵌合特异引物TD-PCR结合荧光通用引物补加方案是对平台反应方案的一个完善。在样本待测目的基因mRNA浓度很低的情况下, 该方案通过TD-PCR过程使每个待测目的基因的上游嵌合特异引物都能最优退火^[18], 同时通用引物通过补加也克服了反应初期的引物二聚体的影响, 在通用引物取代扩增前, 各个待测目的基因模板都能被线性扩增放大, 模板间的浓度比例也近似保持一致。实验证明这个优化方案并不影响实验结果, 并且提高了平台对低表达组织的检测灵敏度。而平台的重复性验证实验证明在优化的反应条件下, 各个目的基因的检测结果波动很小, 平台的检测稳定性良好。

3.2 样本检测与比较

基因表达的多重定量检测方法很多, 从原理上可分为基于多重PCR的、基于杂交的、基于液态分析

的和基于测序技术的, 每种方法都各有利弊, 使用途径不同, 侧重点也不同, 难以一以概之^[19]。本文中所用的基因通用引物的多重RT-PCR表达分析方法的目的是中通量的基因表达筛查, 可用于特定通路的基因表达分析、芯片数据的验证, 构建了芯片初筛候选基因和Real-time PCR定量比较间的桥梁。

利用 Real-time PCR 对平台检出差异表达目的基因 *PHF6* 进行 2^{-C_t} 法的相对定量比较, 3个实验方案的检测结果分别为平台方案4.99倍、TD-PCR通用引物补加方案3.82倍、Real-time PCR 1.53倍。*PHF6* 相对表达倍数的不同是由于3个实验方案的系统误差所造成, 方法间在实际结果数值上的可比性不大, 平台及其优化方案更关注的是多候选基因的表达筛查, 而 Real-time PCR 的单基因定量结果则更能被接受, 但三者的趋势是一致的, 从而证明了平台检测结果是合理可靠的。由于相关的荧光PCR产物均在测序仪中检出分子量与荧光强度, 亦扩大了测序仪的应用面。

业已表明, 利用基因表达谱分析可成功地定位克隆效应基因^[20, 21]。本研究以15日龄C57BL/6J和C3H/HeJ小鼠的下丘脑和睾丸组织为样本, 利用本技术检测了11个目的基因的表达情况。结果发现目的基因在下丘脑组织中的表达数少于睾丸中表达数。此外, 在下丘脑组织中发现了一个差异表达的基因 *PHF6*, 而睾丸组织中无差异表达的基因。*PHF6*

的全称为锌指蛋白 6 (PHD finger protein 6/(plant homeodomain)), 是一种核内 DNA 依赖的转录调控因子, 提示它可能参与了性发育起始相关基因的表达调控。本研究中的 QTL 长度为 5~6 cM, 其间包含许多未被注释的序列区段, 同时两品系小鼠间的 SNP 位点众多, 在选择目的基因的过程中无法避免的会产生遗漏, 并且利用基因表达谱帮助 QTL 定位效应基因存在缺陷^[22], 因此, *PHF6* 是否就是该 QTL 区段中的效应基因需要进一步基因功能验证。

参考文献(References):

- [1] Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S, Wong KCC, Taylor J, Burnett E, Gut I, Farrall M, Lathrop GM, Abecasis GR, Cookson WOC. A genome-wide association study of global gene expression. *Nature Genetics*, 2007, 39(10): 1202–1207. [\[DOI\]](#)
- [2] Bigler D, Gulding KM, Dann R, Sheabar FZ, Conaway MR, Theodorescu D. Gene profiling and promoter reporter assays: Novel tools for comparing the biological effects of botanical extracts on human prostate cancer cells and understanding their mechanisms of action. *Oncogene*, 2003, 22(8): 1261–1272. [\[DOI\]](#)
- [3] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286(5439): 531–537. [\[DOI\]](#)
- [4] Watson MA, Perry A, Budhjara V, Hicks C, Shannon WD, Rich KM. Gene expression profiling with oligonucleotide microarrays distinguishes world health organization grade of oligodendrogliomas. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1825–1829.
- [5] Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucke SL, Kuerer HM, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA. Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2002, 94(12): 3107–3114. [\[DOI\]](#)
- [6] Slonim DK. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat Genet*, 2002, 32 (Suppl.): 502–508. [\[DOI\]](#)
- [7] Ghazalpour A, Doss S, Sheth SS, Ingram-Drake LA, Schadt EE, Lusis AJ, Drake TA. Genomic analysis of metabolic pathway gene expression in mice. *Genome Biol*, 2005, 6(7): R59. [\[DOI\]](#)
- [8] Conway T, Schoolnik GK. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol*, 2003, 47(4): 879–89. [\[DOI\]](#)
- [9] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTech*, 2005, 39(1): 75–85. [\[DOI\]](#)
- [10] Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays—a technology review. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): 190–195. [\[DOI\]](#)
- [11] Zhu W, Fan Z, Zhang C, Guo Z, Zhao Y, Zhou Y, Li K, Xing Z, Chen G, Liang Y, Jin L, Xiao J. A dominant X-linked QTL regulating pubertal timing in mice found by whole genome scanning and modified interval-specific congenic strain analysis. *PLoS ONE*, 2008, 3(8): e3021. [\[DOI\]](#)
- [12] Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 1993, 15(4): 99–102.
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Method*, 2001, 25(4): 402–408. [\[DOI\]](#)
- [14] McCulloch K, Choong CS, Hurley DM. An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl*, 1995, 4(4): 219–226.
- [15] Kobayashi H, Takemura Y, Kawai Y, Miyachi H, Kawabata M, Matsumura T, Yamashita T, Mori S, Furihata K, Shimodaira S, Motoyoshi K, Hotta T, Sekiguchi S, Ando Y, Watanabe K. Quantitative analysis of human multidrug resistance 1 (*MDR1*) gene expression by nonisotopic competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Lab Clin Med*, 1998, 11(5): 258–266.
- [16] Sestini R, Orlando C, Zentilin L, Lami D, Gelmini S, Pinzani P, Giacca M, Pazzagli M. Gene amplification for c-erbB-2, c-myc, epidermal growth factor receptor, int-2, and N-myc measured by quantitative PCR with a multiple competitor template. *Clin Chem*, 1995, 41(6): 826–832.
- [17] Watzinger F, Hörth E, Lion T. Quantification of mRNA expression by competitive PCR using non-homologous competitors containing a shifted restriction site. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(11): e52. [\[DOI\]](#)
- [18] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(14): 4008. [\[DOI\]](#)
- [19] Bonetta L. Gene expression: one size does not fit all. *Nat Methods*, 2006, 3(5): 401–408. [\[DOI\]](#)
- [20] Karp CL, Grupe A, Schadt E, Ewart SL, Moore MK, Cuomo PJ, Köhl Jörg, Larry W, Kuperman D, Germer S, Aud D, Peltz G, Karp MW. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol*, 2000, 1(3): 221–226. [\[DOI\]](#)
- [21] Oliver F, Christians JK, Liu X, Rhind S, Verma V, Davison C, Brown SDM, Denny P, Keightley PD. Regulatory variation at glypican-3 underlies a major growth QTL in mice. *PLoS Biol*, 2005, 3(5): e135. [\[DOI\]](#)
- [22] Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(4): 271–286. [\[DOI\]](#)