

# 水稻低丰度表达基因 *OsAMT1;3* 实时荧光定量 PCR 方法的建立及其应用

孙淑斌 李宝珍 胡 江 徐国华\*

(南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095; \*通讯联系人, E-mail: ghxu@njau.edu.cn)

## Establishment and Application of a Real-Time Fluorescence Quantitative PCR for Detecting Transcripts of Low Abundance Gene, *OsAMT1;3*, in Rice

SUN Shu-bin, LI Bao-zhen, HU Jiang, XU Guo-hua\*

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; \*Corresponding author, E-mail: ghxu@njau.edu.cn)

**Abstract:** One of the ammonium transporter genes in rice, *OsAMT1;3*, normally expressed in low abundance, which is difficult to quantify its expression by using traditional methods, such as Northern blot, PCR technique. A technique for real-time quantification of *OsAMT1;3* relative to a housekeeping gene for encoding an *actin* in rice using real-time SYBR Green quantitative PCR (RQ-PCR) with specific primers was established, which showed: the amplification curve had flat baseline, distinct exponential area, large and stable slope; The coefficient of variation of the technique was 0.47%; There was a linear relationship between threshold cycle value at which sample crosses threshold and the logarithmic value of template concentration; The expression of *OsAMT1;3* was enhanced 4-fold by nitrogen starvation in comparison to supply of ammonium as sole source of nitrogen.

**Key words:** real-time fluorescence quantitative PCR; amplification curve; standard curve; ammonium transporter gene; gene expression; methodology

**摘 要:** 采用实时荧光定量 PCR 技术, 通过使用特异引物, 对水稻中的低丰度表达基因 *OsAMT1;3* 进行了转录水平上的定量分析, 成功建立了可检测低丰度表达基因的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台。该方法具有很好的准确性和实用性。获得的荧光定量 PCR 扩增曲线, 基线平整, 指数区明显, 斜率大且固定; 线性范围广, 17~36 个循环都能测出; 稳定性、重复性好, 变异系数仅为 0.47%; 标准曲线表明, 循环阈值与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间有着良好的线性关系, 可对基因表达进行相对定量; 缺氮条件下 *OsAMT1;3* 与纯  $\text{NH}_4^+$  处理相比表达量增加 4 倍以上。

**关键词:** 实时荧光定量 PCR; 扩增曲线; 标准曲线; 铵转运蛋白基因; 基因表达; 研究方法

中图分类号: Q94-336; Q943; Q945.12

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)01-0008-05

植物通过铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)从土壤溶液中吸收  $\text{NH}_4^+$ ; 铵的吸收也主要是通过铵转运蛋白进行调节<sup>[1]</sup>。目前, 编码铵转运蛋白基因已经在几种植物中得到了克隆与鉴定。其中, 高等植物体内第一个铵转运蛋白是从拟南芥中分离得到的<sup>[1]</sup>。克隆到的各种植物  $\text{NH}_4^+$  转运蛋白都由多个基因组成, 每个基因的吸收特征不同, 调控机制也不同<sup>[2,3]</sup>。水稻中铵转运蛋白基因 *OsAMT1;1*、*OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3* (ammonium transporter genes, *OsAMT*) 都属于 AMT1 家族, 都是高亲和铵吸收转运蛋白<sup>[4]</sup>, 都含有 11 个跨膜结构域。Yutaka 等<sup>[5]</sup>对这 3 个铵转运蛋白成员的表达与功能做了较系统详细的研究, 其 Northern blot 结果表明: *OsAMT1;1* mRNA 在根和地上部分都可以明显检测到, *OsAMT1;2* 仅在根中表达, 且受  $\text{NH}_4^+$  处理强烈诱导, 但是 *OsAMT1;3* 的转录没有检测到。为了研究 *OsAMT1;3* 的表达情况, Yuta-

ka 等<sup>[5,6]</sup>又利用传统半定量 reverse transcription-PCR 对相同的 RNA 样品做了扩增, 粗略地检测了样品间的表达差异。

传统 PCR 可对特定核苷酸片段进行指数级扩增。在扩增反应结束之后, 可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行定性分析, 也可以通过对光密度扫描来进行半定量分析。但是无论定性还是半定量分析, 分析的都是 PCR 终产物, 不能确保 PCR 产物信号与初始模板的拷贝数成比例。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR) 是在传统 PCR 技术基础上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术, 它有效地解决了传统定量只能终点

收稿日期: 2005-05-23; 修改稿收到日期: 2005-09-29。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471037); 国家 973 计划资助项目(2005cb120903)。

第一作者简介: 孙淑斌(1962-), 女, 博士, 副教授。

检测的局限,测得未经 PCR 信号放大之前的起始模板量。其反应体系中,引入了一种荧光化学物质,随着 PCR 反应的进行,PCR 反应产物不断累加,荧光信号强度也等比例增加。这样就可以根据指数扩增期的产物荧光强度来推算初始模板的量。与传统 PCR 方法相比,它具有定量准确可靠、灵敏度高、重复性好,而且操作简便、安全、快速等特点<sup>[7]</sup>。

实时荧光定量 PCR 从原理上有两大类荧光模式<sup>[8]</sup>。一是荧光杂交探针,二是双链 DNA 内插染料。前一种方法特异性好,除需要合成序列特异引物外,还需要合成高成本的荧光探针,成本较高;后一种方法经济,使用方便,只需合成序列特异引物,没有序列特异性,可以用于不同的模板。但正是由于荧光染料可以和任何的双链 DNA 结合,因此 DNA 引物二聚体或其他非特异扩增产物可以对结果产生干扰。我们通过摸索优化反应条件和荧光捕捉点、建立简单实用的标准曲线、用溶解曲线和凝胶电泳证实等手段,解决或弥补 DNA 结合染色的不足,成功建成了可检测 DNA 和 mRNA 的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台。它已经成为我们实验室一种特异性、高敏感性的定量检测基因表达的有效方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

水稻武运 7 号发芽后移栽,全营养液培养 10 d,缺氮处理 7 d,分别进行铵态氮( $\text{NH}_4^+$ )和继续缺氮处理,4 d 后取样。

### 1.2 主要试剂和仪器

Trizol Reagent、逆转录试剂盒、DNase 均购自美国 Invitrogen 公司,PCR 试剂购自南京生兴生物有限公司,引物由上海博亚生物技术有限公司合成,其他各种化学试剂均为进口或国产分析纯。采用 BIO-RAD iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 组织总 RNA 制备

取冻存根系组织 100 mg,匀浆后加入 Trizol Reagent 1 mL,加入 0.2 mL 氯仿,离心后吸取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,离心沉淀后弃上清,用 70%乙醇洗沉淀,DNase 酶解可能残余的基因组 DNA,RNA 溶于 DEPC 水,用甲醛变性凝胶电泳和分光光度计检测浓度和纯度。

#### 1.3.2 cDNA 合成

每个总 RNA 样品取 2  $\mu\text{g}$ ,加入 50  $\mu\text{mol/L}$

Oligo (dT),加无 RNase 水补足 10  $\mu\text{L}$ ,70  $^\circ\text{C}$  下加热 5 min,室温放置 5 min 后,依次加入 RNase inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ ,5  $\times$  RT buffer 5  $\mu\text{L}$ ,5 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu\text{L}$ ,M-MLV RT 1  $\mu\text{L}$ ,用无 RNase 水补足 25  $\mu\text{L}$ ,42  $^\circ\text{C}$  下反应 60 min,70  $^\circ\text{C}$  下加热 10 min 中止反应。

#### 1.3.3 定量 PCR

根据水稻的 *OsAMT1;3* (AK107204) 和 *actin* (NM\_197297) 的 cDNA 序列,按照标准荧光定量 PCR 引物原则设计 PCR 引物:*actin* 的正向引物为 5' TTA TGG TTG GGA TGG GACA 3',反向引物为 5' AGC ACG GCT TGA ATA GCG 3',产物长度为 292 bp;*OsAMT1;3* 的正向引物为 5' GCG AAC GCG ACG GAC TA 3',反向引物为 5' GAC CTG TGG GAC CTG CTTG 3',产物长度为 294 bp。

各 cDNA 样品分别以 *OsAMT1;3* 和 *actin* 引物进行定量 PCR 反应。反应在 96 孔 PCR 板中进行。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : iQ SYBR Primix Ex Taq<sup>TM</sup> (2  $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,5 和 3 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,无菌水 7  $\mu\text{L}$ 。配制混合物充分混匀后平均分配至 96 孔 PCR 板中。反应条件如下:95  $^\circ\text{C}$  下 30 s,94  $^\circ\text{C}$  下变性 10 s、54  $^\circ\text{C}$  下退火 25 s、72  $^\circ\text{C}$  下延伸 30 s,40 次循环,72  $^\circ\text{C}$  下延伸 5 min。设定在每个循环的变性期结束后,程序自动记录上一循环最后 10%时间的平均荧光值。荧光种类选择 SYBR Green 490,程序将按照设定的激发和发射光谱选择滤镜组。所有设定保存后运行程序,输入正确的 PCR 体系的体积后开始运行。反应完成后,得到含所有标本的所有记录点曲线,默认分析模式称为 background substrated,选择 PCR base line substrated 模式进行数据分析和修正。在调整 baseline cycles 和计算 threshold value (阈值)后,得出 cycle threshold ( $C_t$  值)。

#### 1.3.4 标准曲线的制定与结果计算

在样品扩增的同时,以实验中不同处理的 cDNA 模板混合样进行系列稀释制作标准曲线<sup>[9]</sup>。本实验以  $\text{NH}_4^+$  和缺氮处理的混合 cDNA 模板进行 10 倍梯度稀释,以 *OsAMT1;3* 和 *actin* 特异引物进行扩增来获得标准曲线,纵坐标为临界循环值  $C_t$ ,横坐标为稀释浓度的对数值。根据标准曲线所得的线性计算公式,将样品的  $C_t$  值代入公式,得到其相对浓度。同一模板中目的基因和持家基因的相对浓度的比值即可作为目的基因相对表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 纯度和完整性分析

所提取总 RNA 经分光光度计检测,比值均大于 1.90,经凝胶变性电泳鉴定,28S、18S 条带清晰可见,无明显降解(结果未列出)。

### 2.2 标准曲线的建立

*OsAMT1;3* 的表达量是相对于 *actin* 参照物的量而言的。系列浓度稀释的 cDNA 标准模板与 *Ct* 值的关系曲线见图 1。*OsAMT1;3* 和 *actin* 标准曲线的斜率分别为 -3.945 和 -2.965,线性相关系数分别为 0.9997 和 0.9958。

### 2.3 检测基因表达的准确性

样品在 BIO-RAD iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪上进行实时定量扩增,最后得到了一条反映核酸扩增过程的 S 形荧光定量动力学曲线(图 2)。用循环阈值 (cycle threshold, *Ct*) 作为临界点,该点位于 PCR 产物消除荧光背景后进入指数增长期的始点。从图 2 可以看出,荧光定量动力学曲线基线平整;NTC 因为没有模板,也不产生引物二聚体,一直是水平线;指数区较明显,斜率大且固定(平行线);线性范围广,17~36 个循环都能测出,为理想的扩增曲线。

### 2.4 检测基因表达的重复性

为了验证建立的方法技术的重复性 (precision),我们对同一处理同一浓度的 cDNA 样品重复检测 *OsAMT1;3* 含量 5 次,得到的 *Ct* 值分别为 26.32、26.30、26.08、26.19、26.05,其平均值 ( $\bar{x} \pm s$ ) 为  $26.20 \pm 0.13$ ,变异系数为 0.47%。

从图 3 可以看出,曲线的重复效果、稳定性很好。在扩增前期,特别是在 threshold (荧光临界

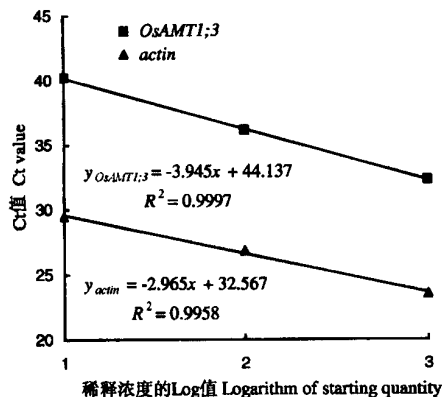


图 1 *actin* 和 *OsAMT1;3* 的标准曲线

Fig. 1. Standard curves for *actin* and *OsAMT1;3*.

值)附近,同一样品的曲线基本上是重叠的。扩增后期由于影响因素太多,曲线分散,但是符合 S 型,不影响定量。

### 2.5 不同氮处理 *OsAMT1;3* 基因表达的定量检测

采用以上建立的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术,对水稻不同氮处理 *OsAMT1;3* 基因表达定量分析的最后结果如图 4 所示。在 2 个处理中,缺氮条件下 *OsAMT1;3* 的表达量比纯  $\text{NH}_4^+$  处理明显增加,达 4 倍以上。

## 3 讨论

水稻全基因组序列数据分析结果表明,水稻全基因组共存在 10 个基因编码  $\text{AMT}^{[10]}$ 。其中 *OsAMT1;1*、*OsAMT1;2*、*OsAMT1;3* 和 *OsAMT2;1* 吸收转运铵离子的功能已经通过酵母细胞异源表达系统被证实。水稻中  $\text{AMT1}$  家族 *OsAMT1;1*、*OsAMT1;2*、*OsAMT1;3* 这 3 个成员都为功能  $\text{NH}_4^+$  转运蛋白,并且各自具有明显的表达模式<sup>[5]</sup>。*OsAMT1;1* 为组成型表达,在根和地上部分都可以明

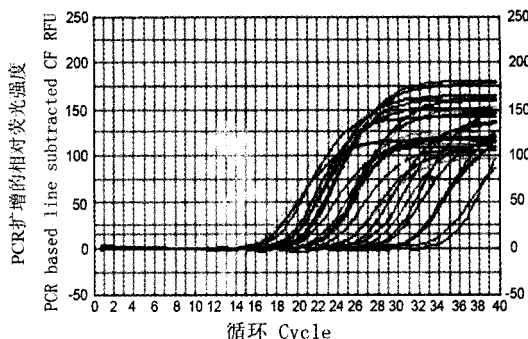


图 2 S 形荧光定量动力学曲线

Fig. 2. Real-time fluorescence quantitative amplification curve with flat baseline, distinct exponential area, large and stable slope.

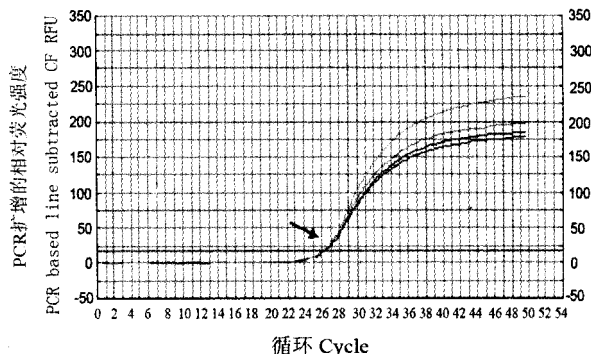


图 3 *OsAMT1;3* 基因检测的重复性

Fig. 3. Precision of the established method for detecting *OsAMT1;3*.

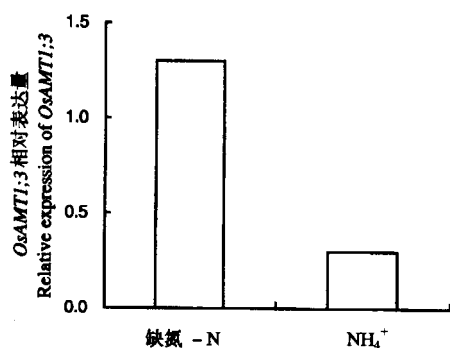
图4 不同氮处理下 *OsAMT1;3* 的相对表达差异

Fig. 4. Relative expression amount of *OsAMT1;3* under different nitrogen treatments.

显检测到;*OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3* 只在根中诱导表达<sup>[5]</sup>。本研究利用我们建立的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术,对后者(*OsAMT1;3*)在不同氮处理条件下的表达做了定量鉴定。*OsAMT1;3* 为低丰度表达基因,PCR 经过 33 个循环才获得荧光信号(与此对比的看家基因 *actin* 只需 26 个循环);在缺氮条件下 *OsAMT1;3* 的表达量与纯  $\text{NH}_4^+$  处理相比明显增加(图4)。这一结果验证了本课题组段英华等的生理结果<sup>[11]</sup>。Yutaka 等人虽然也有类似的报道,但他们是利用传统 PCR 检测获得的结果<sup>[5]</sup>。而传统 PCR 检测的是 PCR 终产物,不能确保 PCR 产物信号与初始模板的拷贝数成比例。也就是说,传统 PCR 不能准确检测各样品间真实差异。*OsAMT1;2* 的调节模式与 *OsAMT1;3* 相反,它在氮缺乏时表达较低, $\text{NH}_4^+$  处理时大幅度诱导表达<sup>[5]</sup>。

实时荧光定量 PCR 是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。这种方法实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度,并记录在电脑软件之中,达到对整个 PCR 进程的实时监测。此外,实时荧光 PCR 采用闭管分析,无需电泳等 PCR 后处理步骤,有效地消除了核酸的交叉污染<sup>[12]</sup>。在 PCR 循环中,荧光信号由本底开始进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数,也就是产生可被检测到的荧光信号所需的最小循环数为一个  $C_t$  值(cycle threshold)。实时荧光 PCR 循环在到达  $C_t$  值所在的循环数时,刚刚进入真正的指数扩增期(对数期),此时微小误差尚未放大, $C_t$  值的重现性极好, $C_t$  值与起始模板的对数存在线性关系<sup>[13]</sup>,因此通常用不同浓度的标准

样品的  $C_t$  值来产生标准曲线,然后计算相对方程式,从而实现定量。本研究获得的方程式的斜率大,为最佳标准曲线。曲线的线性回归分析后的相关系数  $R^2$  在 0.99 以上,故实验的过程和数据是可信的。使用这个方程式可以计算出未知样本的相对初始模板量。

在实时荧光定量 PCR 中,模板定量有两种策略:相对定量和绝对定量。虽然一般认为定量 PCR 可以测定基因的绝对数量,但事实上,无论进行如何仔细的检测,都没有办法精确地知道在某个样品中到底真正存在多少拷贝的目的基因。本研究是采用相对标准曲线进行定量分析。在一定样本中目的序列相对于另一参照样本量的变化,量的表达是相对于某个参照物的量而言的,因此相对定量的标准曲线就比较容易制备,对于所用的标准品只要知道其相对稀释度即可。

在定量 RT-PCR 研究 mRNA 时,由于不同的样品在逆转录过程中的效率存在一定的差别,因此除了要制作标准品曲线来进行定量外,还需要设计表达水平相对较为稳定的内参基因来对结果进行标准化。合理地选择不受实验条件影响的内源控制物是保证实验结果可靠性的关键。本研究采用水稻内源 *actin* 看家基因作为内源特异参照基因,并取得预期效果。

SYBR Green 实时荧光定量 PCR 为非特异性检测方法,其分子基础是荧光染料 SYBR Green 可以与双链 DNA 结合,掺入 DNA 双链后其荧光强度是游离状态下的 10~100 倍,可以被仪器检测到。这个方法优势在于它能监测任何 dsDNA 序列的扩增,不需要探针的设计,使检测方法变得简便,同时也降低了检测的成本。但特异性相对较差,受引物二聚体的影响<sup>[14]</sup>。如何消除引物二聚体并提高灵敏度?理想情况是引物设计非常完美,各种试剂的使用量恰到好处,温度变化与“变性、退火、延伸”完全吻合,使得 PCR 过程中产生极少引物二聚体,极少有偏差的延伸,极少非目的模板的扩增。本课题组就此问题做了大量的摸索研究工作,得出的结论是,做到以下几个方面可获得理想结果:1)设计适合 real time PCR 的引物。最好用专门设计 real time PCR 引物的软件,如 Primer Press 来设计引物。一些常见的基因引物序列可以借鉴其他成功研究者的引物。2)除了寻找合适的引物序列,还可以改变退火温度,限制引物的浓度。3)减少配试剂到开始反应之间的非特异扩增(缩短时间+冰上操作)。

实时荧光定量 PCR 技术虽然已经较广泛地应用于核酸的定量,但是从目前的应用情况来看,绝大多数用于医学或动物研究上<sup>[8,14-19]</sup>,而在植物上的应用研究非常少<sup>[12]</sup>。我们通过对各种条件的优化探索,成功建立这种准确、简单易行的方法,将为下一步水稻乃至其他植物基因的定量研究打下坚实基础。

#### 参考文献:

- [1] Ninnemann O, Jauniaux J C, Frommer W B. Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. *EMBO J*, 1994, 13: 3464-3471.
- [2] Suenga A, Moriya K, Sonoda Y, et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(2): 206-211.
- [3] Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A. Differential regulation of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: Relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J*, 2001, 26: 143-155.
- [4] Kumar A, Silim S N, Okamoto M, et al. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*. *Plant Cell Environ*, 2003, 26(6): 907-914.
- [5] Yutaka S, Akira I, Satomi S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-3*) in rice. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(7): 726-734.
- [6] Yutaka S, Akira I, Satomi S, et al. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(12): 1396-1402.
- [7] Zarlenga D S, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol*, 2001, 101: 215-230.
- [8] 蔡霞. 定量 PCR 技术及其应用现状. 现代诊断与治疗, 2005, 16(2): 112-115.
- [9] Mathilde Orsel A K, Francoise D V. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*: Structure and gene expression. *Plant Physiol*, 2002, 129: 886-896.
- [10] Loque D, von Wiren N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot*, 2004, 55(401): 1293-1305.
- [11] 段英华, 张亚丽, 沈其荣. 增硝营养对不同基因型水稻苗期吸铵和生长的影响. 土壤学报, 2005, 42(2): 260-265.
- [12] 曹际娟, 朱水芳, 曹远银. GA21 转基因玉米实时荧光 PCR 检测方法的建立. 中国生物工程杂志, 2003, 23(8): 87-95.
- [13] 陈颖, 徐宝梁, 苏宁. 实时荧光定量 PCR 技术检测转基因大豆方法的建立. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 65-69, 13.
- [14] 陈英剑, 胡成进, 赵苗青. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台的建立. 实用医药杂志, 2004, 21(11): 997-999.
- [15] 孔晓飞, 张欣欣, 张申英, 等. 干扰素信号传导相关蛋白和基因检测方法的初步建立和应用. 诊断学理论与实践, 2004, 3(1): 12-16.
- [16] 张晓红, 叶铁真, 胡斌, 等. 人类 ermap 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(1): 154-157.
- [17] 沈红强, 汤永民, 杨世隆, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 检测白血病细胞 WT1 mRNA 方法的建立. 实用肿瘤杂志, 2003, 18(5): 371-374.
- [18] Bell A S, Ranford-Cartwright L C. A real-time PCR assay for quantifying *Plasmodium falciparum* infections in the mosquito vector. *Int J Parasitol*, 2004, 34: 795-802.
- [19] Luo H, Yousef A E, Wang H H. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39: 376-382.