

文章编号: 1004-7271(2005)01-0084-05

·研究简报·

3-磷酸甘油醛脱氢酶、 β -肌动蛋白和 18S rRNA 作为相对定量的内标 在牙鲆发育阶段的稳定性比较

Comparison between ribosomal 18S rRNA ,GAPDH and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in development of flounder *Paralichthys olivaceus*

杨桂梅¹, 鲍宝龙¹, 任大明²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090; 2. 复旦大学遗传学国家重点实验室, 上海 200433)

YANG Gui-mei¹, BAO Bao-long¹, REN Da-ming²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Institute of Genetic, Life Science School, Fudan University, Shanghai 200433, China)

关键词 3-磷酸甘油醛脱氢酶; β -肌动蛋白; 18S rRNA; 内标; 相对定量; RT-PCR; 牙鲆

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; β -actin; 18S rRNA; endogenous standard; relative quantitative RT-PCR; *Paralichthys olivaceus*

中图分类号 S 917 文献标识码: A

定量确定基因表达水平的方法主要有实时定量 PCR 和相对定量检测。一般只有在需要确定基因的拷贝数时,才利用实时定量 PCR 检测。目前大部分的研究中还是选择相对定量的检测。相对定量检测有 Northern blot 和相对定量 PCR 两种检测方法,均需要采用内标来确定目标基因的相对表达量。大多数的内标采用管家基因如 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 β -肌动蛋白基因等^[1,2]。近年来,越来越多的研究者发现 GAPDH、肌动蛋白基因的表达水平并不稳定,利用它们作为内标来定量并不准确^[3-5]。我们在前期的研究中,利用抑制差减技术也克隆到牙鲆 GAPDH 和 β -肌动蛋白基因,表明这两个基因在牙鲆发育过程有可能表达水平上有差异。为了确定 GAPDH 和 β -肌动蛋白基因表达的稳定性,本研究将这两种基因的表达量分别与另一种常被用作内标的 18S rRNA 的表达量作比较。

1 材料和方法

1.1 仔鱼饲养

牙鲆受精卵和 13 d 牙鲆仔鱼购自中国水产科学院北戴河中心实验站。仔鱼饲养在 80 L 的塑料缸

收稿日期 2004-06-01

基金项目 上海市教委发展基金项目(科 2000-104)和上海水产大学校长基金项目(科 2002-43)

作者简介 杨桂梅(1979-)女,江苏高邮人,硕士研究生,专业方向为鱼类发育生物学研究。E-mail: gmyang@shfu.edu.cn

通讯作者 鲍宝龙(1970-)男,浙江临海人,博士研究生,副教授,主要从事鱼类学和发育生物学研究。E-mail: blbao@shfu.edu.cn

中,水温控制在 20 ± 0.5 °C,投喂卤虫无节幼体,密度维持在 5 ind/mL。在胚胎和 13、17、23、26、30、33 d 仔鱼期分别取样,每期取样 20 尾(粒)左右。

1.2 总 RNA 抽提

为了防止肠道内食物基因的污染,只提取仔鱼头部的总 RNA。把胚胎和每天仔鱼的头部分别在加有 1 mL 的 Trizol™ 试剂(Gibco BRL)的匀浆器中冰上匀浆,匀浆液中加入 0.2 mL 氯仿,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液加入 0.5 mL 的异丙醇,室温下放置 10 min 后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,去上清,用 75% 酒精洗涤沉淀后自然凉干,加入适量 0.1% DEPC 去离子水溶解,置于 -70 °C 保存。总 RNA 经过紫外分光光度计(Pharmacia Biotech 公司)确定浓度和纯度。

1.3 相对定量 RT-PCR

牙鲆 GAPDH 和 β -肌动蛋白基因的特异引物根据前期研究中差减文库内的基因序列来设计,该序列经过 BLASTN 和 BLASTX 在 GENBANK 中证明是高度同源的(结果另文发表)。18S rRNA 引物和 18S rRNA 竞争性引物采用的是 Ambion 公司的专利设计,PCR 产物长度预计为 315 bp。为了便于比较 GAPDH、 β -肌动蛋白和 18S rRNA 表达的稳定性,本实验中 GAPDH 和 β -肌动蛋白的 PCR 产物长度也设计为 234 bp 和 296 bp。为了保证目标基因的 PCR 扩增在线性增长范围,同时,由于 18S rRNA 在总 RNA 中的丰度很高,需要加入一定比例的竞争性的 18S rRNA 引物,以保证目标基因能成功扩增。所以,正式试验前需作一系列预备实验以确定循环数,以及 18S rRNA 和 18S rRNA 竞争性引物的比例。

总 RNA 的量均为 1 μ g,采用随机引物通过 M-MLV 逆转录酶合成第一条链。GAPDH 和 β -肌动蛋白基因的 PCR 反应体系(50 μ L):1 μ L 单链的 cDNA,5 μ L 10 \times PCR buffer,4 μ L 2.5 mmol/L dNTP,各 2 μ L 的正向引物和反向引物,4 μ L 比例为 3:7 的 18S rRNA 引物和 18S rRNA 竞争性引物,0.25 U Taq_q。GAPDH 基因的 RT-PCR 反应条件:95 °C 5 min,23 个循环中 94 °C 1 min、64 °C 1 min、72 °C 1 min。 β -肌动蛋白基因的 RT-PCR 反应条件:95 °C 5 min,24 个循环中 94 °C 1 min、64 °C 1 min、72 °C 1 min。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,所有 PCR 产物的上样体积为 15 μ L,相同厚度的凝胶,相同的曝光时间拍照。

GAPDH 基因的正向引物 5'-CATCTCCGTCTTCCAGTCTATGAAGCC-3'

反向引物 5'-GCATTACTGACGATGGTCATGGAGGAG-3'

β -肌动蛋白基因的正向引物 5'-CACCGCAAGTGCTTCTAGAGGAAGAAAG-3'

反向引物 5'-CGAAGTTCTACCACCACACAGTTCAGGTC-3'

2 结果

2.1 总 RNA 的纯度和浓度检测

除了胚胎和 17 d 仔鱼阶段总 RNA 的 A260/A280 值略超过 2.0(表 1),其余的为 1.8~2.0,表明总 RNA 纯度较高。

表 1 各发育阶段的总 RNA 的纯度和浓度检测

Tab.1 Concentration and purity of total RNA in different development stages

发育阶段	A260nm	A280nm	A260/A280	浓度(μ g/mL)
胚胎	2.582	1.267	2.038	5.164
13 d	0.56	0.29	1.931	1.12
17 d	2.582	1.267	2.038	5.164
23 d	1.652	0.844	1.957	3.304
26 d	1.172	0.597	1.963	2.344
30 d	2.822	1.417	1.992	5.644
33 d	3.442	1.777	1.937	6.884

从图 1 可以看出,牙鲆仔鱼头部总 RNA 经电泳出现 18S、28S、5.8S rRNA 三条条带,而且 28S rRNA 条带的亮度相对强于 18S rRNA 的,表明所抽提的总 RNA 完整性较好。mRNA 主要分布在 18S 和 28S RNA 条带之间。

2.2 相对定量 RT-PCR 结果

图 2 和图 3 分别为 GAPDH、β-肌动蛋白基因相对于 18S rRNA 半定量 RT-PCR 结果。由图 2 可以看出 GAPDH 基因表达量出现比较大的波动:胚胎时期几乎不表达,从变态开始一直到变态中期(26 d)逐渐增加到最大,到变态后期有所下降,而从 β-肌动蛋白基因(图 3)的表达情况来看,波动并不大,而且也没有 GAPDH 基因的表达规律性,图 2 和图 3 均清楚地表明了 18S rRNA 的表达水平非常稳定。因此,可以认为三者的稳定性强弱为 18S rRNA > β-肌动蛋白 > GAPDH。

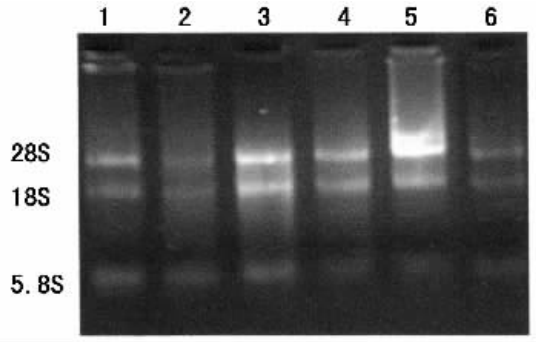


图 1 总 RNA 的抽提

Fig.1 Extraction of total RNA

1 为 13 d 仔鱼, 2 为 17 d 仔鱼, 3 为 23 d 仔鱼, 4 为 26 d 仔鱼, 5 为 30 d 仔鱼, 6 为 33 d 仔鱼

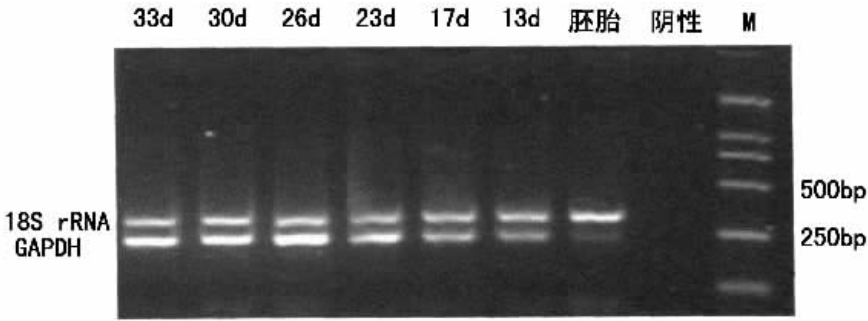


图 2 牙鲆各发育阶段 GAPDH 基因和 18S rRNA 的半定量 RT-PCR 电泳检测

Fig.2 Electrophoresis of relative quantitative RT-PCR of GAPDH and 18S rRNA genes fragments in developmental flounder

为了更加确切地对结果进行说明,计算了每条电泳带的光密度值(因为电泳带的光密度值代表了基因的表达量)。将 18S rRNA 对应的各条带光密度值均记为 1.000,再分别计算对应的 GAPDH、β-肌动蛋白各条电泳条带的相对光密度值即基因的相对表达量。利用统计软件 SPSS 的 Error-bar 作均值相关区间图,结果如图 4 所示。图 4 同样表明了 GAPDH 的表达水平在变态发育阶段波动较大并表现出一定的规律性:随着仔鱼的发育逐渐增加,到牙鲆变态中期达到高峰,然后开始有所下降。这提示 GAPDH 可能与牙鲆变态有关,而 β-肌动蛋白基因表达量在发育各期变化幅度不大,相对较稳定,表现出管家基因的特点。

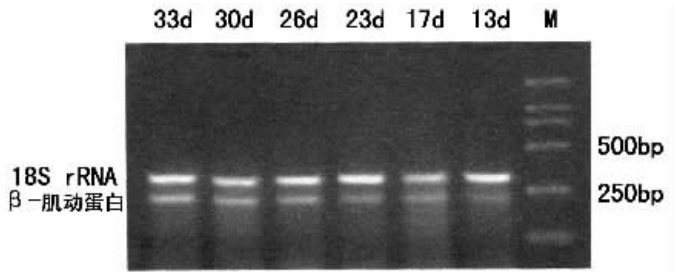


图 3 牙鲆各发育阶段 β-肌动蛋白基因和 18S rRNA 的半定量 RT-PCR 电泳检测

Fig.3 Electrophoresis of relative quantitative RT-PCR of beta-actin and 18S rRNA genes fragments in developmental flounder

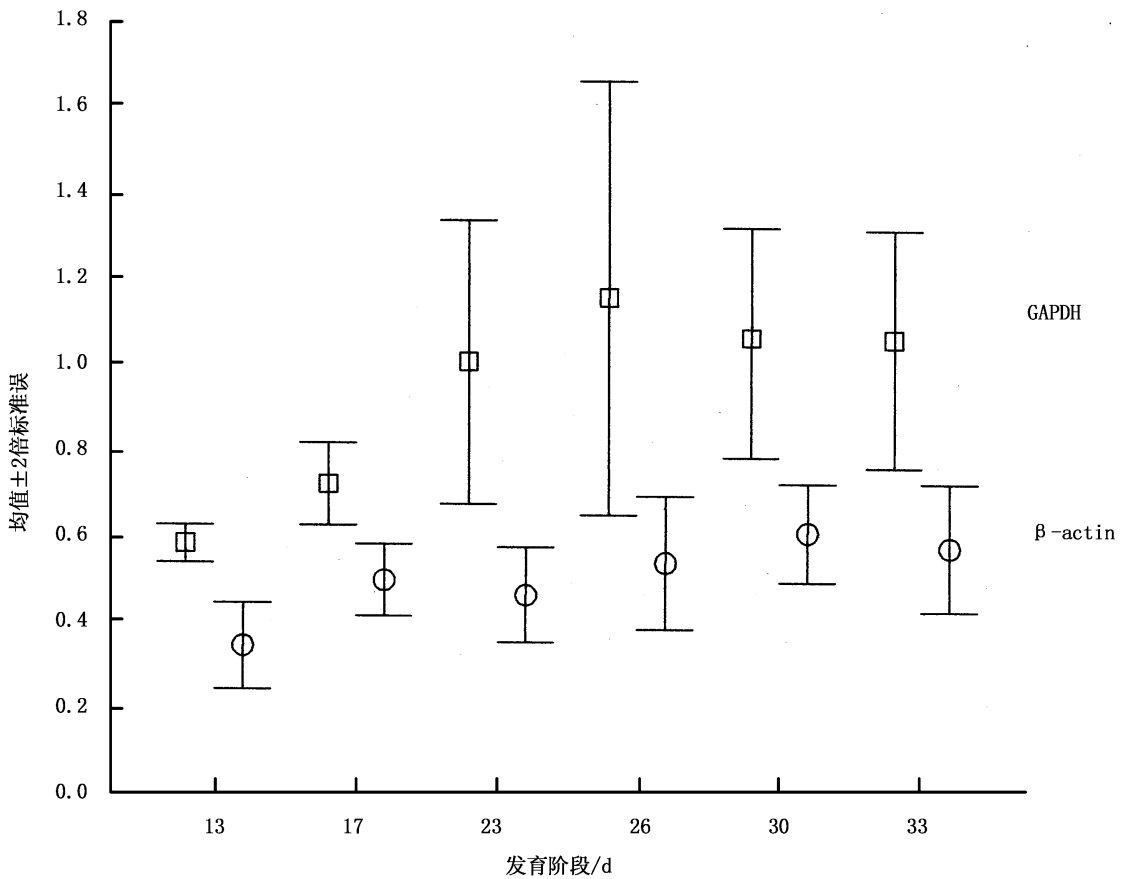


图 4 β -肌动蛋白和 GAPDH 基因在牙鲆发育阶段相对于 18S rRNA 表达量的均值 \pm 两倍标准误差区间的比较

Fig.4 Comparison of the block of standard error of mean for the relative quantitative of GAPDH and β -actin gene to 18S rRNA in developmental flounder
平行实验的次数各为 3 次

3 讨论

理论上,一个理想的内标应该在各种不同的细胞类型、不同发育阶段、采用不同处理方法时都能稳定表达,一个稳定的内标是确定目标基因相对表达量的基础。本实验中,被研究者经常采用的管家基因 GAPDH 和 β -肌动蛋白的表达水平出现波动,尤其是 GAPDH 基因表达的差异非常明显,已经不符合作为一个内标的要求,这种现象在大鼠的肝、脾脏和脑^[3],癌细胞浸润和没有癌细胞浸润的人黑色素细胞^[4],出生后不同天数的兔子巩膜中^[5]都已发现。所以,在检测牙鲆仔鱼各期的基因表达水平时,不能选择 GAPDH 基因作为内标。本实验中,已发现 18S rRNA 在牙鲆各发育期的表达十分稳定,是三者之中最理想的内标。但选用 18S rRNA 作内标还要加入竞争性的 18S rRNA 内标以抑制 18S rRNA 的过度扩增,操作上稍显麻烦。建议在检测牙鲆早期发育阶段基因相对表达水平检测时,也可采用 β -肌动蛋白基因作内标。

GAPDH 常被认为是高表达的管家基因。人类和兔的 GAPDH 首先被发现能与 tRNA 直接结合^[6],后来发现 GAPDH 能结合 mRNA 的 3' 末端富含 AU 的区域^[7],锤头核酸酶^[8],病毒 RNA 顺式作用调节元件^[9],说明 GAPDH 具有调节 RNA 的作用。GAPDH 的 NAD 结合域已被证明也是一个 RNA 识别模序^[10]。最近发现 GAPDH 还具有剪切 RNA 的作用^[11],这些发现表明 GAPDH 具有目前人们还没有深入了解的

功能,其作用并不局限与糖酵解途径。在牙鲆发育过程中 GAPDH 基因表达水平出现了有意思的变化,暗示我们 GAPDH 可能参与牙鲆的发育进程,相关的研究需要今后进一步深入开展。

参考文献:

- [1] Saur D , Vanderwinden J M , Seidler B , *et al.* Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis[J]. *Proc Natl Acad Sci* , 2004 , 101(6) : 1662 - 1667 .
- [2] Deane E E , Kelly S P , Luk J C , *et al.* Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream[J]. *Mar Biotechnol* (NY) , 2002 , 4(2) : 193 - 205 .
- [3] Slagboom P E , de Leeuw W J , Vijg J . Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver , spleen and brain in relation to aging[J]. *Mech Ageing Dev* , 1990 , 53(3) : 243 - 257 .
- [4] Goidin D , Mamessier A , Staquet M J , *et al.* Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations[J]. *Anal Biochem* , 2001 , 293(1) : 17 - 21 .
- [5] Thu K Moe , Ji Ziliang , Amutha Barathi , *et al.* Differential expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) , β -actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in postnatal rabbit sclera[J]. *Current Eye Research* , 2001 , 23(1) : 44 - 50 .
- [6] Singh R , Green M R . Sequence-specific binding of tRNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Science* , 1993 , 259 , 365 - 368 .
- [7] Nagy E , Rigby W F . Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD⁺-binding region (Rossamann fold) [J]. *J Biol Chem* , 1995 , 270 , 2755 - 2763 .
- [8] Sioud M , Jespersen L . Enhancement of hammerhead ribozyme catalysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *J Mo Biol* , 1996 , 257 , 775 - 789 .
- [9] De B P , Gupta S , Zhao H , *et al.* Specific interaction *in Vitro* and *in Vivo* of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3[J]. *J Biol Chem* , 1996 , 271 , 24728 - 24735 .
- [10] Nagy E , Henics T , Eckert M , *et al.* Identification of the NAD⁺-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain[J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 , 275 , 253 - 260 .
- [11] Evguenieva-Hackenberg E , Schiltz E , Klug G . Dehydrogenases from all three domains of life cleave RNA[J]. *J Biol Chem* , 2002 , 277(48) : 46145 - 46150 .