

建鲤内参基因 *EF-1 α* 的实时荧光定量 PCR 方法的建立

唐永凯^{1,2}, 俞菊华², 徐跑^{1,2*}, 李建林², 李红霞², 董在杰², 夏正龙¹

(1.南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2.中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 真核生物延伸因子基因 (*EF-1 α*) 在蛋白质翻译过程中起着重要的作用, 其序列具有高度的保守性, 常作为内参基因应用于 real time PCR 中。通过 RT-PCR 克隆出建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)*EF-1 α* 的部分 cDNA 序列, 其长度为 425 bp, 翻译成 140 个氨基酸, Blast 结果显示与其它鱼类 leptin 的相似性为 98%。同时也克隆出建鲤 *EF-1 α* 相应的 DNA 序列, 共 506 bp。cDNA 和 DNA 的序列比对显示克隆出的建鲤 *EF-1 α* 含有 1 个相位为 0 的内含子, 在此基础上设计一对跨越内含子的引物, 采用 SYBR Green I 染料建立了 real time PCR 方法。以肝脏 cDNA 为标准品, 建立了标准曲线, 并进行了融解曲线分析。结果表明, 所建立的方法具有特异性强、相关系数高、线性范围广等优点, 可应用于建鲤的功能基因表达研究。

关键词: 建鲤; 内参基因; *EF-1 α* ; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S965.116 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0580-05

Establishment of a Real Time PCR Assay for *Cyprinus carpio* var. *jian* *EF-1 α* As a Reference Gene

TANG Yong-kai^{1,2}, YU Ju-hua², XU Pao^{1,2*}, LI Jian-lin², LI Hong-xia²,
DONG Zai-jie², XIA Zheng-long¹

(1.Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081,China;2.Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences,Wuxi 214081,China)

Abstract: Eukaryotic elongation factor 1 α (*EF-1 α*) plays an important role in translation and its sequence is highly conservative as a housekeeping gene in real time PCR. The partial cDNA encoding *EF-1 α* in *Cyprinus carpio* var. *jian* was isolated using RT-PCR. The sequence of cDNA was 425 bp in length encoding 140 amino acids residues, and the homology was about 98% between *C. carpio* var. *jian* and other fish using the Blast program. The DNA sequence of *C. carpio* var. *jian* *EF-1 α* consisting of 506 bp was also cloned. Comparing the partial cDNA to its genomic sequence revealed that *C. carpio* var. *jian* *EF-1 α* gene consisted of a phase 0 intron. A pair of real time PCR primers cross intron was designed according to the intron sequence of *EF-1 α* and a real time PCR method by SYBR Green I was established. The standard curve was established with liver cDNA as the standard template and the melting analysis was also carried out. The results showed that the real time PCR method for *EF-1 α* had the advantages of high specificity, good correlation coefficients and wide linear range, which supplied useful information for studying function gene expression.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *jian*, housekeeping gene, *EF-1 α* , real time PCR

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-29

基金项目: 农业部公益性行业专项 (200903045)、基本科研业务费专项资金 (2011JBFA13) 和现代农业产业技术体系 (nycytx-49)

作者简介: 唐永凯(1978—), 男, 助理研究员, 博士生, 主要从事鱼类遗传育种研究, E-mail: tangyk@ffrc.cn; * 通讯作者: 徐跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn。

在 real time RT-PCR 中,通常需选择一个内参基因,然后通过内参基因的均一化来获得目的基因的相对表达量。理想的内参基因应该在不同的组织中表达量恒定,而且不受实验处理条件的影响^[1]。大量的研究表明,常用的内参基因均不符合这一条件,最适合的内参基因就是在所研究的样品中它的表达量变化较小^[2-4]。真核生物延伸因子 EF-1 α (elongation factor1 α) 是参与真核翻译的真核延伸因子之一,是一种多聚体核糖体蛋白质,其序列高度保守,在各种细胞内大量表达,具有内参基因的特性^[5-6]。它与 EF-1 β 、EF-1 γ 共同组成真核生物延伸因子复合物 (EF-1 complex),在 GTP 的作用下,EF-1 α 促进氨酰-tRNA 结合核糖体受位,EF-1 β /1 γ 则催化 GDP 的磷酸化^[7-9]。

建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 是中国水产科学研究院淡水渔业研究中心培育出的遗传性状稳定的鲤鱼新品种,具有生长快、体型佳、肉质好等优良的经济性状,已遍及我国 27 个省^[10]。围绕建鲤分子标记育种课题,对生长相关的功能基因也展开了大量的研究^[11-13]。本文通过克隆建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) *EF-1 α* 的 cDNA 和 DNA 序列,分析其序列特征,明确外显子,内含子。同时设计一对跨越内含子的定量 PCR 引物,建立基于 SYBR Green I 染料技术的建鲤 *EF-1 α* real time PCR 方法,从而为 *EF-1 α* 作为内参基因,在利用 real time PCR 对建鲤功能基因的研究中提供有用的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验场。

1.1.2 试剂 Trizol Reagent 购自 Promega; M-MLV、Taq 酶、胶回收试剂盒、pUCm-T 载体、SYBR Premix EX TaqTM、EASY Dilution 等购自宝生物工程(大连)有限公司,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 仪器 PCR 仪为 eppendorf Mastercycler personal。Real time PCR 仪为 BIO-RAD 的 MJ MiniOpticon 型。

1.1.4 引物 根据斑马鱼 (*Danio rerio*, AB020734) 的 *EF-1 α* 的 DNA 序列设计能扩增出内含子的一对引物,其序列为 P₁: 5' -GTC GGT CGT GTT GAG ACT GGT ATC CT-3' ; P₂: 5' -ATC AGT TTG ACA ATG GCG GCA TCT-3'。获得建鲤 *EF-1 α* 的 DNA 和 cDNA 序列后,设计一对跨越含子的定量 PCR 引物,其序列为 P₃: 5' -GTCAAGTCCGTTGAGATGCACC-3' ; P₄: 5' -GGATGATGACCTGAGCATTGAAGC-3' ,引物由上海博尚生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取建鲤成鱼 (约 500 g) 肝脏约 100 mg,参照说明书,用 Trizol Reagent Trizol 抽提总 RNA。采用核酸蛋白分析仪测定 RNA 质量和浓度。以 OD_{260/280} 值为 1.9~2.2 作为后续实验可用的 RNA。

1.2.2 部分 cDNA 序列的扩增 取 5 μ g 从总 RNA,以 OligodT-AP[5' -CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C(T)16 -3']为引物,使用 M-MLV 进行 RT 反应。然后用 10% 的 RT 液,使用引物 P₁ 和 P₂ 扩增 EF-1 α 400 bp 左右的序列。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 然后 30 个循环,94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 部分 DNA 序列的扩增 在建鲤尾静脉处采血液 1 mL,酚氯仿法提取 DNA,以此 DNA 为模板,以引物 P₁, P₂ 进行扩增,PCR 条件同 1.2.2。

1.2.4 PCR 产物的连接与转化 PCR 产物用 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分离,切下目的条带,用胶回收试剂盒纯化,用 pUCm-T 载体连接经纯化产物,连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞后,涂布于含 IPiG 和 X-Gal 的 LB 固体培养基 (AMP⁺)。挑白斑,抽提质粒, EcoRI 和 Hind III 双酶切质粒。

1.2.5 测序和序列分析 将阳性质粒送上海博尚生物工程有限公司测序。用 Dnastar 软件包分析建鲤 *EF-1 α* 序列。

1.2.6 Real time PCR 用 1 μ g 总 RNA,以 Oigo dT Primer 和 Random 6 mers 为引物,根据 M-MLV 使用说明进行 RT 反应,反应总体积为 10 μ L,然后以此 RT 液为模板进行 real time PCR,引物为 P₃ 和 P₄,荧光染料为 SYBR Green I。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 40 个循环 94 $^{\circ}$ C 5 s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 3 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。为检验反应的特异性,在 PCR 后进行融解曲线分析,以确定得到的产物是否为目的产物。扩增温度以 0.2 $^{\circ}$ C 的增幅从 65 $^{\circ}$ C 缓慢递增至 95 $^{\circ}$ C,连续测定样品的荧光强度以获取融解曲线。最后,扩增产物用 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.7 标准曲线的建立 以反转录的建鲤肝脏 cDNA 为标准品,用 Easy Dilution 以 10 倍稀释度进行倍比稀释,分别稀释至 1/10, 1/100, 1/1 000, 1/10 000, 1/100 000。然后以此 6 个浓度的标准品($10^0\sim 10^{-5}$)进行 real time PCR 反应,反应条件同 1.2.6。

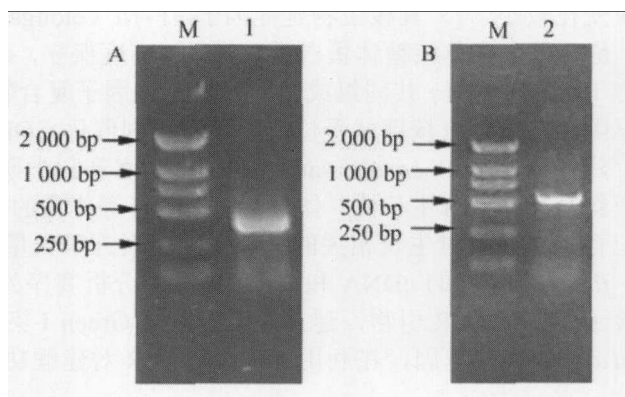
2 结果分析

2.1 建鲤 *EF-1 α* 的分离

取建鲤肝脏 RNA,进行 RT-PCR,用引物 P₁ 和 P₂ 扩增得到 400 bp 左右的条带(图 1A),克隆后测序,得到 424 bp 片段。取建鲤血液 DNA,用引物 P₁ 和 P₂ 扩增得到 510 bp 片段(图 1B)。

2.2 序列拼接与分析

将建鲤 *EF-1 α* 的 cDNA 和 DNA 序列提交到 GenBank,两条序列的登陆号分别为 JQ619776, JQ619777。其中 cDNA 编码 140 个氨基酸,预测的蛋白质分子量为 14.9 ku,理论等电点(pI)为 7.4,含疏水氨基酸 47 个,极性氨基酸 31 个,酸性氨基酸 17 个,碱性氨基酸 17 个。cDNA 和 DNA 的序列比对显示建鲤 *EF-1 α* 含有 1 个内含子,为 0 位内含子,而且内含子的 5' 端为 GT,3' 端为 AG,符合真核生物基因的剪接位点 GT-AG 规律(图 2)。应用 NCBI 在线 Blast 程序,结果显示建鲤 *EF-1 α* 的氨基酸序列与其它鱼类 *EF-1 α* 的氨基酸序列相似性约为 98%。



M:DL2000 DNA 分子量标准; 1:以 cDNA 为模板扩增条带; 2:以 DNA 为模板扩增条带。

M:DL2000 Marker; 1:Product of amplification as cDNA template; 2:Product of amplification as DNA template.

图 1 PCR 扩增产物图

Fig.1 The results of PCR amplification

应用 NCBI 在线 Blast 程序,结果显示建鲤 *EF-1 α* 的氨基酸序列与其它鱼类 *EF-1 α* 的氨基酸序列相似性约为 98%。

```

1 GTC GGT CGT GTT GAG ACT GGT ATC CTT AAG CCA GGT ATG GTT GTG ACC TTT GCC CCT GCC 60
1 V G R V E T G I L K P G M V V T F A P A 20
61 AAC CTG ACC ACT GAG GTC AAG TCC GTT GAG ATG CAC CAC GAG TCT CTT GCT GAG GCC ACT 120
21 N L T T E V K S V E M H H E S L A E A T 40
121 CCT GGT GAC AAC GTT GGC TTC AAC GTT AAG AAT GTG TCT GTC AAG GAC ATC CGC CGT GGT 180
41 P G D N V G F N V K N V S V K D I R R G 60
181 AAC GTG GCT GGA GAC AGC AAG AAC GAC CCC CCT ATG GAG GCC GGC AGC TTC AAT GCT CAG 240
61 N V A G D S K N D P P M E A G S F N A Q 80
gtaggctttccattatcatcttggtcacaaagtcacttgaattccagggttggtatgtgtactaacttgtgtttt
gttcttag
241 GTC ATC ATC CTG AAC CAC CCT GGT CAG ATC TCT CAG GGC TAT GCC CCA GTG CTG GAC TGC 300
81 V I I L N H P G Q I S Q G Y A P V L D C 100
301 CAC ACT GCT CAC ATC GCC TGC AAG TTT GCT GAG CTC AAG GAG AAG ATC GAC CGT CGT TCT 360
101 H T A H I A C K F A E L K E K I D R R S 120
361 GGC AAG AAG CTT GAG GAC AAC CCC AAG GCT CTC AAA TCT GGA GAT GCC GCC ATT TCA AAC 420
121 G K K L E D N P K A L K S G D A A I S N 140
421 TGA T 424
141 *

```

大写字母为外显子序列,小写字母表示内含子序列,终止子以*号表示。

Exon and intron regions were shown in capital and lower case respectively, and stop code was shown in asterisk.

图 2 建鲤 *EF-1 α* 基因及其推导的氨基酸序列

Fig.2 The DNA and deduced amino acid sequences of *C. carpio* var. *jian EF-1 α*

2.3 标准品的制备及标准曲线的建立

总 RNA 经反转录成 cDNA 后,进行常规 PCR 扩增,得到 175 bp 片段,电泳结果显示扩增产物只有一条带,无引物二聚体以及非特异性产物,与预期结果一致,即如果扩增出 cDNA 样品中的 DNA 片段,则电泳图上会有 261 bp 的条带,如图 3。

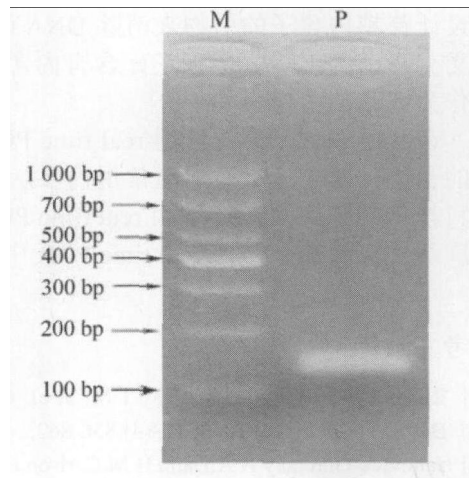
以此反转录的 cDNA 为模板,进行 10 倍系列稀释,选取 $10^0\sim 10^{-5}$ 共 6 个浓度梯度进行 real time PCR。以 C_t 值为坐标,以稀释倍数的对数为纵坐标,获得相对定量标准曲线。结果显示, C_t 值范围为 12.50~26.45,如图 4A;标准曲线方程为 $y=-0.3606x+9.56$,其相关系数为 $r^2=1$,如图 4B。

2.4 溶解曲线分析

溶解曲线结果见图 5。结果显示,其 T_m 温度为 86.4 $^{\circ}C$,只有一个特异峰,表明无引物二聚体以及非特异性产物扩增,和图 3 电泳的结果正好一致,表明设计的一对跨越内含子的引物特异性强,扩增效率高,反转录的 cDNA 产物中含有的 DNA 未被扩增,消除了样品中的 DNA 污染,real time PCR 条件得到了较好的优化。

3 讨论

真核生物延伸因子 EF-1 α 广泛存在各种细胞内,是细胞内含量第二多的蛋白,占正常生长细胞所有蛋白的



M:DL1000 DNA 分子量标准; P:以 cDNA 为模板扩增条带。

M:DL1000 Marker; P:Product of amplification as cDNA template

图 3 PCR 扩增产物图

Fig.3 The results of PCR amplification

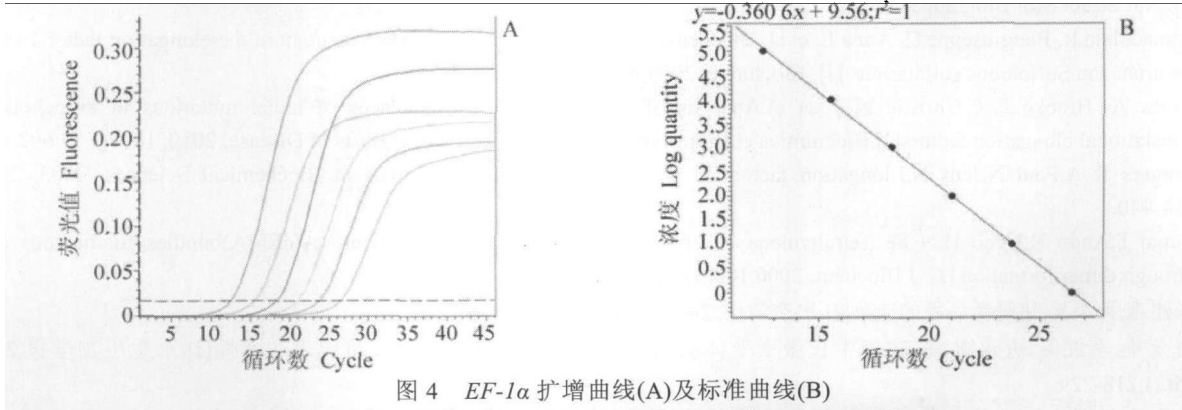


图 4 *EF-1 α* 扩增曲线(A)及标准曲线(B)

Fig.4 The amplification curve (A) and standard curve(B) of *EF-1 α*

1%~2%,在不同的物种中它的基因及其表达调控高度保守,而且表达量变化较小,因此常作为内参基因应用于基因表达的研究。本文克隆出的建鲤内参基因 *EF-1 α* 与银鲫的相似性为 98%,这与刘军等研究银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) *EF-1 α* 的结果相似。银鲫与金鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼的 *EF-1 α* 氨基酸序列同源性分别高达 99%和 98%,与人 (*Homo sapiens*)和鼠 (*Mus musculus*)*EF-1 α* 的一致性均为 90%^[14]。序列比对显示建鲤 *EF-1 α* 含有 1 个内含子,为 0 位内含子,这与奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)、斑马鱼、银鲫等鱼类的内含子相位一致,这从另一方面也说明了 *EF-1 α* 在物种间的高度保守性。

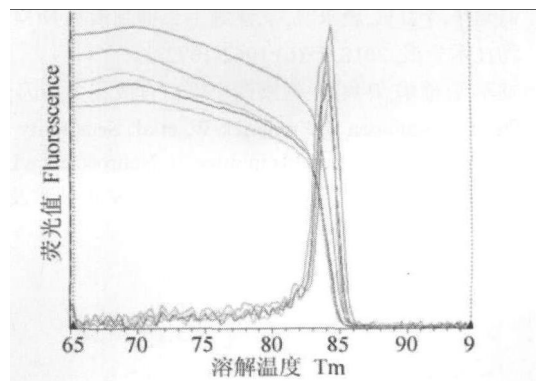


图 5 *EF-1 α* 溶解曲线分析

Fig.5 The analysis of melting curve of *EF-1 α*

在用 Trizol 提取的 RNA 样品中,不可避免的会有少量的 DNA 残留,反转录后,cDNA 中还是含

有 DNA, 而 DNA 同样会作为模板和 cDNA 一起被扩增, 这必然会影响到扩增效率, 从而影响到实验结果的准确性。为了消除 DNA 的污染, 通常需要将 RNA 样品进行 DNase 酶处理, 但这会增加样品被染污的机率, 同时也会减少 RNA 的得率, 导致表达量很低的基因甚至无法检测出。最直接的方法就是通过设计跨越内含子的引物来消除 DNA 的污染, 优化反应条件, 使样品中的大片段 DNA 不能被扩增^[15]。本文克隆出的 *EF-1 α* 基因正好含有内含子, 设计出的定量 PCR 引物只扩增出 cDNA 部分, 且特异性好, 可作为建鲤的内标引物。

在水产领域, 广泛应用 real time PCR 技术研究不同组织及不同个体基因表达水平的差异, 在计算目的基因相对表达量时, 通常用内参基因为参照物来消除系统误差^[16]。本文建立了基于 SYBR Green I 染料技术的建鲤 *EF-1 α* 基因 real time PCR 方法, 结果表明该方法具有特异性好、相关系数强、线性范围广等优点, 适合作为 real time PCR 中的建鲤功能基因定量表达分析。

参考文献:

- [1] Radonic A, Thulke S, Mackay I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real time PCR[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004, 313(4):856-862.
- [2] Janovick-Guretzky N A, Dann H M, Carlson D B, et al. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(5):2246-2252.
- [3] Raffaella C, Maria C P, Lorenza V, et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish [J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(3/4):271-276.
- [4] Zheng W J, Li S. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2):638-645.
- [5] Gross S R, Kinzy T G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(9): 772-778.
- [6] Immacolata R, Piergiuseppe C, Anna L, et al. Biochemical characterisation of the D60A mutant of the elongation factor 1 α from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* [J]. *Biochimie*, 2009, 91(7): 835-842.
- [7] Kenta A, Brooke E C, Christie N J, et al. Analysis of the functional consequences of lethal mutations in mitochondrial translational elongation factors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010, 1802(7/8):692-698.
- [8] Gregers R A, Poul N, Jens N. Elongation factors in protein biosynthesis [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(8): 434-440.
- [9] Bunai F, Ando K, Ueno H, et al. Tetrahymena eukaryotic translation elongation factor 1A(eEF1A) bundles filamentous actin through dimer formation [J]. *J Biochem*, 2006, 140(3):393-399.
- [10] 张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育[J]. *水产学报*, 2007, 31(3):287-292.
- [11] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长激素受体基因分离、转录子多态性以及组织表达特性[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2):218-229.
- [12] 陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 *GHR* 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(4):1-8.
- [13] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长抑制素基 N(MSTN) 的分离、表达及多态性与体型、平均日增重相关性研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6):1062-1072.
- [14] 刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 银鲫两个蛋白合成相关基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(5):512-520.
- [15] Dyan S, Kathleen S, Frederick W, et al. Sensitivity of housekeeping genes in the hypothalamus to mismatch in diets between pre- and postnatal periods in mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 47(1):54-57.
- [16] 唐永凯, 俞菊华, 徐跑, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在水产上的应用[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(21):422-426.