

实时定量 RT-PCR 在微生物分子特性研究中的应用*

代洪亮 严人 王普 黄金**

(浙江工业大学药学院 浙江杭州 310032)

摘要 实时定量 RT-PCR 是一种高效检测低丰度 mRNA 的方法,该方法具有易操作、高通量、敏感度高和特异性强的特点。本文对实时定量 RT-PCR 在真核生物中的原生动物和真菌、细菌以及非细胞类病毒三大微生物类群中的研究进展加以简要综述,同时对实时定量 RT-PCR 在微生物分子特性研究中的应用作了展望。

关键词 实时定量 RT-PCR 微生物 分子特性 基因表达谱 转录组学

中国图书分类号:Q93 文献标识码:A

随着分子生物学的迅猛发展,单凭核酸定性检测已不能满足理论基础研究和临床诊断需要,而实时定量 RT-PCR (real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction) 作为一项能够高效检测目的基因表达量的技术应运而生。实时定量 RT-PCR 是在反转录和定量 PCR 基础上发展起来的,在反转录酶的作用下以 mRNA 为模板合成 cDNA 第 1 条链,然后在 DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增,扩增期间通过连续监测荧光信号的强弱测定特异性产物的含量,然后根据标准曲线计算 mRNA 的含量^[1]。实时定量 RT-PCR 技术较以终点法进行定量的 PCR 技术具有显著优势,其不仅操作简便、快速高效、敏感性高、特异性强,而且扩增是在封闭体系中完成并进行实时测定,大大降低了被污染的可能性且无须在扩增后进行后续操作。鉴于以上优点,目前实时定量 RT-PCR 技术已被广泛应用到基因检测、病毒荷载量测定、临床诊断等分子生物学研究的各个领域^[2-4]。

1 实时定量 RT-PCR 的原理及发展

实时定量 RT-PCR 是在实时定量 PCR 的基础上通过一步反转录实现的,即一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增。实时定量 PCR 最早是由日本科学家 Higuchi 于 1992 年提出,最初目的是观察 PCR 反应的整个过程。为实现实时可视化,该方法用 EB (溴化乙锭) 作为染料,EB 可以插入双链核酸中,当受紫外线照射时产生荧光。随后 2 个重要的发

现加速了实时定量 PCR 技术的发展,一是利用能量荧光传递技术 (fluorescence resonance energy transfer technology, FRET) 构建双标记寡核苷酸探针,即 TaqMan 探针;二是发现 DNAtaq 酶有 5' 核酸外切酶的活性,它能有效降解与双链核酸结合的特异性荧光标记探针,使间接检测 PCR 产物成为可能。随后相继出现了分子信标定量、Roche 杂交探针定量,虽然这些探针不依靠 DNAtaq 酶的 5' 核酸外切酶活性,但都利用了 FRET 原理,使其直接或间接产生特定波长的荧光,最后又出现了能与双链 DNA 非特异性结合而发荧光的染料 SYBR Green 1。在 PCR 反应过程中这些探针及染料能与扩增的核酸结合,在 DNAtaq 酶和 FRET 原理的作用下,其发出的荧光信号可以被检测器即时捕获,经电脑软件分析荧光强度得出 ΔR 的值,即 PCR 产物的值。以 ΔR 的值对循环数作曲线,选择一个荧光阈值,荧光达到荧光阈值的循环数称为阈值循环数 (Threshold cycle, Ct),而 Ct 值随着起始模板量的增加而线性降低,从而可以通过 Ct 值结合标准曲线计算起始模板的拷贝数^[5]。实时定量 PCR 技术比以终点产物定量的 PCR 技术更为准确,且 Ct 值重现性较好。

2 微生物的分类

微生物是所有肉眼看不见或看不清的微小生物的总称,它主要包括真核生物中的原生动物和真菌、原核生物细菌以及非细胞结构的病毒三大类。体积小,面积大;吸收多,转化快;生长旺,繁殖

* 基金项目:浙江省自然科学基金(LQ12B06005),浙江省教育厅科研项目一般项目(Y201226056)

** 通讯作者

快;适应强,易变异;分布广,种类多这五大特性决定了微生物与人类和其他物种之间有着紧密的联系。微生物对人类的危害之一是其可导致传染病的流行,70%的人类疾病是由微生物引起的。但是微生物也有对人类有益的用途,如一些微生物不但可以被广泛应用到工业发酵中用于制备药物、食品及各种酶制剂,而且还能降解塑料、处理废水废气等。由于微生物在人类生活中起着举足轻重的作用,因此研究微生物的生理生化特性具有深远意义。微生物个体微小,常常以群落形态共生,虽然显微镜的发明是人类在认识微生物形态特征上的巨大飞跃,但其形态多样性和表观易变性给微生物研究工作带来诸多困难。微生物的各种特性(表型)本质是由遗传物质决定的,通过研究微生物遗传物质的分子特性可以使人类更加深入地了解微生物,从而选择对人类有利的方面指导科研和生产实践。微生物遗传物质分子特性研究方面的迅猛发展始于PCR技术在基础科学研究中的广泛应用。自美国科学家Kary Mullis发明PCR技术以来,在短短20多年中PCR技术发展迅速,其中常规PCR、反向PCR、锚定PCR、反转录PCR、巢式PCR、易错PCR、实时定量PCR、实时定量RT-PCR等10多种PCR技术相继出现,尽管这些PCR技术的原理和反应条件不尽相同,但均在微生物遗传物质分子特性的研究中发挥了重要的作用。

3 实时定量RT-PCR在微生物分子特性研究中的应用

随着分子生物学的发展,研究者认识到,遗传信息决定了生物体的生命特征,而基因组正是这些遗传信息的携带者,因此阐明生物体基因组携带的遗传信息有助于揭示生命的起源和奥秘。随着微生物后基因组时代的到来,转录组学及蛋白质组学技术已经成为2种比较成熟的方法,并广泛应用于微生物表征以及功能机理的研究。以实时定量RT-PCR技术为基础的转录组学是近年来科学研究的热点之一。它是以细胞为整体,研究在某一细胞性能(吸附性、产酶量、毒力等)或状态(温度、pH、压力等)下所含mRNA的类型与拷贝数,搜寻与细胞性能状态变化紧密相关的重要基因群。从宏观上,对整个功能基因群体进行研究并阐明其中的相互协调关系,比单独研究一个功能

基因更为科学、严谨。以基因表达谱技术从mRNA水平阐释基因的功能和基因表达调控机制,建立微生物基因表达谱分析技术平台,已成为目前研究者倾向的研究方式之一。

3.1 实时定量RT-PCR技术在原生动物和真菌研究中的应用 原生动物和真菌都属于真核生物,具有完整的细胞结构。原生动物是动物界最低等的一类真核单细胞动物,个体由单个细胞组成。原生动物个体一般微小,绝大多数直径为2~5 mm。真菌是一种真核生物。最常见的真菌是各类蕈类、霉菌和酵母。真核生物的mRNA一般以单顺反子的形式存在,半衰期较长,如胚胎中的mRNA半衰期可达数日,在5'端有帽子结构和3'端Poly(A)。在运用实时定量RT-PCR对其mRNA水平定量时可用专一性较高的Oligo-d(T)引物进行反转录合成cDNA的第1条链,为后续的定性及定量带来便利。

Li^[6]等通过SYBR Green I结合的实时定量RT-PCR技术研究了新型药物和疫苗对致病原生动物马来亚丝虫调节基因的影响,发现雌、雄丝虫的调节基因变化相同,但是与生长复制有关的调节基因的mRNA拷贝量都有大幅下降。Fang^[7]等研究调节绿僵菌生长基因与其宿主发病机理之间的关系,结果发现绿僵菌的毒力基因、*pr1*基因、G蛋白调节基因、*cag8*基因以及疏水蛋白基因在宿主发病早期均不被检测到,*nrr*基因在宿主发病的整个阶段表达平稳。绿僵菌*cag8*基因在宿主发病阶段大量表达,而*pr1*基因则只能在宿主尸体中检测到。Yan^[8]等运用实时定量RT-PCR技术研究疫霉菌内源控制基因,从18个看家基因中选出最可靠的内源控制基因。结果发现,在疫霉菌生长周期,通常被用于内参基因的 β -actin和翻译延长因子1 α (eEF1A)不是最好的选择,而泛素结合蛋白(Ubc),WS21,维管蛋白(Tub-b)在疫霉菌宿主发病不同阶段表达量非常稳定。由此可见,以实时定量RT-PCR技术为研究基础的全局性分析方法可有效揭示原生动物、大量宿主与病原微生物(真菌)间的相互作用以及在特定时空条件下,环境对其胁迫过程中某种基因和各种相关功能基因的表达量及其调控机制。

3.2 实时定量RT-PCR技术在细菌研究中的应用 细菌指一大类细胞核无核膜包裹,只存在称作拟核区(nuclear region)(或拟核)的裸露DNA

的原始单细胞生物。由于原核生物细菌 mRNA 具有含量少、半衰期短、3'端无 Poly(A) 序列等基本特征,使得 mRNA 在众多 tRNA 和 rRNA 存在的情况下难以分离和选择性标记 mRNA。实时定量 RT-PCR 以其独特的敏感性和特异性较好地解决了原核生物中 mRNA 定量的难题。

Fusco^[9]等利用实时定量 RT-PCR 特异性检测牛奶中金黄色葡萄球菌的数量,该法用时短、特异性强、灵敏度高,为奶液检测提供了新途径。酒球菌的乳酸耐受性在乳酸发酵中至关重要,通过 RT-PCR 定量检测酒球菌 13 种在乳酸发酵中起着重要作用的基因,定量测定结果揭示其 mRNA 在低 pH 下耐受性的变化规律,以此优化酒球菌合适的生长条件^[10]。Yang^[11]等利用实时定量 RT-PCR 检测受感染猪血液中链球菌的数量,通过对链球菌谷氨酸脱氢酶(GDH)基因保守序列设计出的特异性引物,建立了 TaqMan 实时定量 RT-PCR,结果表明,初始检测到 10 GDH 基因拷贝,而感染 24 h 后 GDH 拷贝量达到 10 415 拷贝。研究结果显示 TaqMan 实时定量 RT-PCR 检测方法具有较高的特异性和灵敏性,其对临床诊断具有重要意义。

从理论上来说,细菌是单细胞原核生物,易受外界环境条件变化的影响。细菌为适应不同细胞内、外环境的变化必须开启和关闭某些特定基因的表达,基因的这种适应性调节可能发生在从 DNA、mRNA 到蛋白质过程的任何一个环节。由于细菌的基因转录和翻译同时进行,在转录水平上的 mRNA 调节在细菌适应性调节过程中显得尤为重要。因此结合细菌的遗传特性,采用特异性强、灵敏度高的实时定量 RT-PCR 技术研究细菌大量表达谱以探究在不同条件下基因的定性定量,将为基因表达特征与表型特征间建立联系提供理论基础。

3.3 实时定量 RT-PCR 技术在病毒研究中的应用 病毒(Virus)是由一个核酸分子(DNA 或 RNA)与蛋白质构成的非细胞形态的营寄生生活的生命体。从遗传物质上可以分为 DNA 病毒、RNA 病毒、蛋白质病毒。病毒划分为七大群:(双链)ds DNA,有包膜;(双链)ds DNA,无包膜;(单链)ss DNA,无包膜;(双链)ds RNA,有包膜;(双链)ds RNA,无包膜;(单链)ss RNA,有包膜;(单

链)ss RNA,无包膜。正因为病毒种类繁多、遗传物质简单且多样易变异,因此极有可能对人类健康构成威胁。在病毒研究领域,实时定量 RT-PCR 技术通常作为一种高效、灵敏、特异性强的检测手段,广泛应用于临床诊断以及病毒荷载体量测定中,对人类健康做出了巨大的贡献。

Gibellini^[12]等运用基于荧光染料 SYBR 的实时定量 RT-PCR 技术和 b-DNA 技术对感染 HIV-1 的患者(血清阳性反应)血液进行检测,平行定量分析 HIV-1 阳性样本,结果显示 2 种方法具有很高的相关性($r=0.908$),证实实时定量 RT-PCR 技术是一种较好的病毒荷载体量测定方法。同时,在呼吸道合胞体病毒(BRSV)检测方面,Achenbach^[13]等比较了实时定量 RT-PCR、竞争性 RT-PCR 和病毒滴度测定 3 种方法,结果显示实时定量 RT-PCR 和竞争性 RT-PCR 检测数据相似,但是实时定量 RT-PCR 比竞争性 RT-PCR 更快速、灵敏、特异、高效。Cook^[14]等在研究导致老鼠 AIDS 的逆转录病毒时,通过对其定量检测,对造成老鼠 AIDS 病毒的成分加以确定,为后续 AIDS 病理的研究提供了基础。而基于实时定量 RT-PCR 技术在麻疹病毒、乙型肝炎病毒、猪流感病毒等方面的研究也已有相关报道。

4 展望

实时定量 RT-PCR 技术操作简便、快速高效、灵敏性高、特异性强。目前,已被广泛地应用于基因检测、病毒荷载体量测定、基因突变点检测等分子生物学的各个领域。以往的核酸定量方法依赖于 PCR 的后处理过程,最常见的是电泳检测,这增加了交叉污染和假阳性出现的概率;另外染色剂溴化乙锭是强致癌物,会对人体及环境造成危害。而实时定量 RT-PCR 技术克服了上述缺点,尤其是荧光探针增加了检测的特异性,而且实时监测系统可检测到每一个循环,提高了检测的准确率。

以实时定量 RT-PCR 技术为基本检测手段构建微生物的基因表达谱是现在乃至未来相当长一段时间微生物分子特性研究的热点。通过定性、定量分析功能 mRNA 群体组成,从而描绘特定细胞或组织在特定状态下的基因表达种类和丰度信息,构建基因表达谱(gene expression profile),从 mRNA 水平反映出细胞特异性或组织特异性、表

型和表达方式,通过比较基因表达谱,筛选出细胞特异性或发育阶段特异性的基因。这种方法从宏观上对整个功能基因群体进行研究,探明各功能基因间的相互关系,比研究单一功能基因表达更为科学、严谨。

主要参考文献

- 1 Carmela Tricarico, Pamela Pinzani, Simonetta Bianchi *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 2002, 309: 293—300.
- 2 Franck Housseau, Kimberly R. Lindsey, Samuel D. Oberholzer *et al.* Quantitative real-time RT-PCR as a method for monitoring T lymphocyte reactivity to full-length tyrosinase protein in vaccinated melanoma patients. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 266: 87—103.
- 3 Iain R. Peters, Chris R. Helps, Roger M. Batt *et al.* Quantitative real-time RT-PCR measurement of mRNA encoding alpha-chain, pIgR and J-chain from canine duodenal mucosa. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 275: 213—222.
- 4 Almajhdi F. N., Amer. H. M. Development of a SYBR Green I based real-time RT-PCR assay for detection and quantification of bovine coronavirus. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25: 101—107.
- 5 Annapaula Giulietti, Lut Overbergh, Dirk Valckx *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: application to quantify cytokin gene expression. *Methods*, 2001, 25: 4—18.
- 6 Benwen Li, Amy C Rush, Jie Tan *et al.* Quantitative analysis of gender-regulated transcripts in the filarial nematode *Brugia malayi* by real-time RT-PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004, 137: 329—337.
- 7 Fang Weiguo, Michael J. Bidochka. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*, 2006, 110: 1165—1171.
- 8 Yan Haozhi, Liou Rueyfen. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43: 430—438.
- 9 Vincenzina Fusco, Grazia Marina Quero, Maria Morea *et al.* Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 144: 528—537.
- 10 Charlotte Beltramo, Nicolas Desroche, Raphaël Ile Tourdot-Maréchal *et al.* Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology*, 2006, 157: 267—274.
- 11 Yang Weijun, Cai Xuehui, Hao Yongqing *et al.* Characterization of *Streptococcus suis* serotype 2 blood infections using RT-qPCR to quantify glutamate dehydrogenase copy numbers. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 83: 326—329.
- 12 Davide Gibellini, Francesca Vitone, Elisa Gori *et al.* Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *Journal of Virological Methods*, 2004, 115: 183—189.
- 13 Jenna E. Achenbach, Christina L. Topliff, Ventsislav B. Vassilev *et al.* Detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus using real-time quantitative RT-PCR and quantitative competitive RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 2004, 121: 1—6.
- 14 Cook W. James, Kathy A. Green, Joshua J. Obar *et al.* Quantitative analysis of LP-BM5 murine leukemia retrovirus RNA using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 2003, 108: 49—58.

(E-mail: huangjin979@zjut.edu.cn)

● 封面说明 ● 科莫多巨蜥

科莫多巨蜥 (*Varanus komodoensis* Ouwens), 又称科莫多龙。1910年12月, 时任爪哇岛茂物动物博物馆和植物园执行官的欧文斯 (P.A.Ouwens) 在弗洛雷斯岛民事官等人的陪同下, 前往科莫多岛, 在当地猎人的帮助下, 获得几件珍贵的标本。1912年, 欧文斯在《荷属东印度农工商部公告》中发表论文, 将这种巨型蜥蜴正式命名为科莫多巨蜥。

科莫多龙是目前现生种类中体形最大的蜥蜴, 成年巨蜥的体长通常为 2~3 m, 体重约 70 kg; 其最高记录为长 3.13 m, 重 166 kg。科莫多龙长有锋利的爪子, 有助于撕裂猎物的皮肤, 强壮的尾

巴又是进攻的有力武器, 身上粗厚的“铠甲”还是防御蛇类袭击的必要手段。近年来的研究显示, 科莫多龙会分泌一种类似蛇毒的毒液, 使得猎物血液无法凝固, 迅速失血过多而死, 因此, 它们也是世界上最大的有毒动物。

据科学家估计, 现存科莫多龙有 6 000 头左右, 仅分布在印尼的小巽他群岛的科莫多岛、林卡岛、莫堂岛和弗洛雷斯岛的部分地区, 是印度尼西亚最有代表性的野生动物之一。

本照片摄于印度尼西亚科莫多国家公园林卡岛。

(摄影及撰文 张巍巍)