



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102352414 A

(43) 申请公布日 2012.02.15

(21) 申请号 201110316621.7

(22) 申请日 2011.10.18

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所
地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

(72) 发明人 吴沿友 黄华坤 李海涛

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

多参照内标法定量基因表达量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种多参照内标法定量基因表达量的方法,包括以下步骤:(1)形成目标基因扩增产物和看家基因扩增产物;(2)将目标基因扩增产物和看家基因扩增产物以及多个参照内标扩增产物同时电泳,获得凝胶图像;(3)将凝胶图像经图像处理,获得表征图像;(4)将表征图像上的多个参照内标扩增产物的 DNA 图谱的像素点与总 RNA 的倍数拟合成方程: $\log Y = \alpha X + b$; (5)将表征图像上的目标基因扩增产物和看家基因扩增产物的 DNA 图谱的像素点分别带入方程,计算出目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$; (6)目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 的比值为目的基因的相对表达量 $GE_{\text{目标}}$ 。

1. 一种多参照内标法定量基因表达量的方法,其特征在于:它包括以下步骤:(1) 将总 RNA 设置成一系列的倍数,并分别为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以这些互补 DNA 为模板,以看家基因设计出的引物为引物,以常规的统一反应体系进行 PCR 扩增,形成多个参照内标扩增产物;同时,将以稀释到一定倍数的 RNA 为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以此互补 DNA 为模板,分别以被考察的基因设计出的引物和看家基因设计出的引物为引物,以上述常规的统一反应体系进行 PCR 扩增,形成目标基因扩增产物和看家基因扩增产物;(2) 将目标基因扩增产物和看家基因扩增产物以及多个参照内标扩增产物同时电泳,获得凝胶图像;(3) 将凝胶图像处理成灰度图像,经过亮度和对比度的调整,获得表征图像;(4) 将表征图像上的多个参照内标扩增产物的 DNA 图谱的像素点与总 RNA 的倍数拟合方程: $\log Y = aX + b$,这里的 X 为一个参照内标扩增产物的 DNA 图谱区的像素点值, Y 为对应的看家基因的倍数, a, b 分别为方程的常数;(5) 将表征图像上的目标基因扩增产物和看家基因扩增产物的 DNA 图谱的像素点分别带入方程 $\log Y = aX + b$,分别计算出目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$;(6) 目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 的比值,即为目的基因的相对表达量 $GE_{\text{目标}}$ 。

多参照内标法定量基因表达量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多参照内标法定量基因表达量的方法,属于分子生物学领域。

背景技术

[0002] 反转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)(RT-PCR)是指一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增的技术。对基因表达量的检测,有多种方法。有直接测定 RNA 的 Northern Blot 法;有基于反转录聚合酶链式反应的、通过对 PCR 终产物进行监测的凝胶图像分析法;以及基于反转录聚合酶链式反应的、通过对 PCR 过程进行监测的实时定量 RT-PCR。Northern Blot 是用 RNA 探针杂交的方法进行定量,不需要反转录,但需要用 RNA 量较大,制作探针较复杂,而且要得到理想的效果也比较难;实时定量 RT-PCR,程序简单,容易得到好的结果,但仪器较贵,试剂成本大。传统的 RT-PCR 凝胶图像分析法,以 RNA 用量少、操作简单、仪器和试剂相对于实时定量 RT-PCR 便宜,仍然为很多科学研究者用来定量基因表达量。

[0003] 传统的 RT-PCR 凝胶图像分析法,采用图像分析软件来比对凝胶图像上的看家基因和被考察的基因的 DNA 谱带,虽然能得出了相对表达量,但误差极大,甚至出现相反的结论。这是由于图像的像素点并不完全与 DNA 的拷贝数成简单的直线相关,而且被考察的基因的原始拷贝数与看家基因的拷贝数相差甚远,常常相差 4-5 个数量级,因而仅用凝胶图像上的看家基因和被考察的基因的 DNA 谱带的一对图谱中的图像参数进行计算来获得被考察的基因的相对表达量,误差极大。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,提供一种多参照内标法定量基因表达量的方法,以克服传统的 RT-PCR 凝胶图像分析法因参照内标少,对基因表达量定量误差大等缺陷。

[0005] 本发明为实现上述目的,采用的技术方案包括以下步骤:(1)将总 RNA 设置成一系列的倍数,并分别为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以这些互补 DNA 为模板,以看家基因设计出的引物为引物,以常规的统一反应体系进行 PCR 扩增,形成多个参照内标扩增产物;同时,将以稀释到一定倍数的 RNA 为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以此互补 DNA 为模板,分别以被考察的基因设计出的引物和看家基因设计出的引物为引物,以上述常规的统一反应体系进行 PCR 扩增,形成目标基因扩增产物和看家基因扩增产物;(2)将目标基因扩增产物和看家基因扩增产物以及多个参照内标扩增产物同时电泳,获得凝胶图像;(3)将凝胶图像处理成灰度图像,经过亮度和对比度的调整,获得表征图像;(4)将表征图像上的多个参照内标扩增产物的 DNA 图谱的像素点与总 RNA 的倍数拟合方程: $\log Y = aX + b$,这里的 X 为一个参照内标扩增产物的 DNA 图谱区的像素点值, Y 为对应的看家基因的倍数, a, b 分别为方程的常数;(5)将表征图像上的目标基因扩增产物和看家基因扩增产物的 DNA 图谱的像素点分别带入方程 $\log Y = aX + b$, 分别计算出目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$;(6)目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 的

比值,即为目的基因的相对表达量 $GE_{\text{目标}}$ 。

[0006] 本发明的优点为:本发明采用多参照内标同时扩增,根据凝胶图像上的多参照内标扩增产物制定标准曲线,来反演看家基因和被考察的基因的份额,从而来获取被考察基因的表达量。测定出的基因表达量数据具有很高的可靠性和精度,且操作简单、仪器和试剂相对便宜。

具体实施方式

[0007] 本发明的实施例:步骤一、将常规方法提取的待测生物样本的总 RNA 设置成一一系列的倍数,如 1.00、0.1、0.01、0.001 以及 0.0001。分别以各种倍数的总 RNA 为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以这些互补 DNA 为模板,以看家基因设计出的引物为引物,以常规的统一反应体系进行 PCR 扩增,形成多个参照内标扩增产物。与此同时,将以稀释到一定倍数,如 0.1 倍的总 RNA 为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以此互补 DNA 为模板分别以被考察的基因设计出的引物和看家基因设计出的引物为引物,以上述常规的统一反应体系,进行 PCR 扩增,形成目标基因扩增产物和看家基因扩增产物。

[0008] 步骤二、将目标基因扩增产物和看家基因扩增产物以及多个参照内标扩增产物同时电泳,获得凝胶图像。

[0009] 步骤三、将凝胶图像处理成灰度图像,经过亮度和对比度的调整,获得表征图像。

[0010] 步骤四、将表征图像上的多个参照内标扩增产物的 DNA 图谱的像素点与总 RNA 的倍数拟合成方程: $\log Y = aX + b$, 这里的 X 为一个参照内标扩增产物的 DNA 图谱区的像素点值, Y 为对应的看家基因的倍数, a, b 为方程的常数。

[0011] 步骤五、将表征图像上的目标基因扩增产物和看家基因扩增产物的 DNA 图谱的像素点分别带入上述方程 $\log Y = aX + b$, 分别计算出目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 。

[0012] 步骤六、目标基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 的比值,即为目的基因的相对表达量 $GE_{\text{目标}}$ 。

[0013] 以下提供本发明具体应用的实施例:棉花黑斑病侵染棉花过程中的棉花多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因 (*Ghpgip1*) 的表达量的监测。

[0014] 分别种植和培养棉花以及棉花轮纹菌 (*Alternaria macrospora*)。棉花在温室培养 45 天后开始轮纹菌的感染。感染采取喷雾的方式,将处在生长对数期的轮纹菌喷在健康的植株叶片上,放于温室内培养,温度,湿度,光照时间分别设置为 29°C, 60% 和 15 小时,用干净的塑料袋将整株罩住,培养一周,每隔一天取材。对照组取的是健康的植株喷上蒸馏水,用洁净的塑料罩住,同样的条件培养。被感染及对照组棉花总 RNA 的提取以及棉花多聚半乳糖醛酸酶基因的 RT-PCR 采用常规方法(黄华坤, 吴沿友, 许文祥, 周秋月, 棉花多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因克隆、序列及表达谱分析, 河南农业科学, 2008 年第 6 期, 31-35)。看家基因为 Actin。

[0015] 总 RNA 被稀释到 1.00、0.1、0.01、0.001 以及 0.0001 倍。分别以各种倍数的总 RNA 为模板,逆转录成为相应的互补 DNA,再以这些互补 DNA 为模板,以 Actin 基因设计出的引物为引物,以常规的统一反应体系进行 PCR 扩增(黄华坤, 吴沿友, 许文祥, 周秋月, 棉花多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因克隆、序列及表达谱分析, 河南农业科学, 2008 年第 6 期,

31-35),形成多个参照内标扩增产物。与此同时,将以稀释到0.1倍的总RNA为模板,逆转录成为相应的互补DNA,再以此互补DNA为模板分别以*Ghpgip1*基因设计出的引物和看家基因Actin设计出的引物为引物,以上述常规的统一反应体系,进行PCR扩增,形成*Ghpgip1*基因扩增产物和看家基因Actin扩增产物。将*Ghpgip1*基因扩增产物和看家基因Actin扩增产物以及多个参照内标扩增产物同时电泳,获得凝胶图像。将凝胶图像处理成灰度图像,经过亮度和对比度的调整,获得了表征图像。将表征图像上的多个参照内标扩增产物的DNA图谱的像素点与总RNA的倍数的方程为: $\log Y = 0.000091X - 4.937575$, $R^2=0.98755$,这里的 R^2 为决定系数的平方。随后,再将表征图像上的*Ghpgip1*基因扩增产物和看家基因Actin扩增产物的DNA图谱的像素点分别带入上述方程 $\log Y = 0.000091X - 4.937575$,分别计算出*Ghpgip1*基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因Actin扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 。*Ghpgip1*基因扩增份额 $Y_{\text{目标}}$ 和看家基因Actin扩增份额 $Y_{\text{看家}}$ 的比值,即为*Ghpgip1*基因的相对表达量 $GE_{\text{目标}}$ 。

[0016] 应用本发明分别对感染株与健康株的*Ghpgip1*基因表达进行检测,结果如表1。

[0017] 表1 应用本发明和传统传统的RT-PCR凝胶图像分析法获得的*Ghpgip1*基因相对表达量和感染株相对于健康株*Ghpgip1*基因表达量

感染的时间 (天)	本发明		传统的 RT-PCR 凝胶图像分析法	
	<i>Ghpgip1</i> 基因相对表达量 $GE_{\text{目标}}$	感染株相对于健康株 <i>Ghpgip1</i> 基因表达量	<i>Ghpgip1</i> 基因相对表达量 $GE_{\text{目标}}$	感染株相对于健康株 <i>Ghpgip1</i> 基因表达量
0	63.63	1.00	1.85	1.00
1	103.94	1.63	1.71	0.91
2	504.92	7.93	1.96	1.05
3	226.06	3.55	1.88	1.01
4	574.96	9.04	1.71	0.91
5	322.31	5.07	1.76	0.94
6	37.15	0.58	1.33	0.71
7	3.86	0.06	1.10	0.59

从表1中可以看出,应用传统的RT-PCR凝胶图像分析法获得的*Ghpgip1*基因相对表达量的范围为1.10-1.96,感染株相对于健康株*Ghpgip1*基因表达量的范围为0.59-1.05,明显看不出感染株*Ghpgip1*基因的表达量的差异,这是与实际情况不符的,因为,从机理上来说,健康植株也不可能与感染植株的表达量接近,尤其是1-5天的感染株与健康植株的*Ghpgip1*基因相对表达量无显著差异。但本发明能明显地反映轮纹菌感染棉花后,棉花的防御机制的作用。轮纹菌感染棉花24小时后,感染株相对于健康株的*Ghpgip1*基因表达量就为1.63倍,当轮纹菌感染棉花2、3、4、5天后,感染株相对于健康株的*Ghpgip1*基因表达量分别为7.93、3.55、9.04和5.07倍,表现出棉花被感染后,立即启动“防御”机制,*Ghpgip1*基因大量表达,多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIG)能够高效、专一的结合病原体侵染时分

泌的多聚半乳糖醛酸酶，抑制其活性。这样有效地抵御轮纹菌对棉花的侵害。但是第五天之后 *Ghpgip1* 表达量急剧下降，也就意味着轮纹菌侵染棉花已经成功，预示着棉花的轮纹菌侵染的病症即将出现。这与实际情况极为一致。由此可以看出，应用本发明监测棉花黑斑病侵染棉花过程中的棉花多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白基因 (*Ghpgip1*) 的表达量的结果，具有可信性。