

doi: 10.3969/j.issn.1007-2861.2012.04.016

大黄鱼 Hecpidin 基因转录物的相对定量分析

蔡 灵¹, 吴曼丽¹, 范丹青¹, 杨 明²

(1. 厦门大学 近海海洋国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 上海大学 环境与化学工程学院, 上海 200444)

摘要: 以大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)管家基因 18S rRNA 和 β -actin 作为内参基因, 分别比较 2 个内参基因建立的相对定量曲线, 最终确立以 18S rRNA 为参比基因, 定量分析大黄鱼的 Hecpidin 抗菌肽基因. 该相对定量分析方法所得结果与 Northern-blot 方法一致. 应用建立的 Hecpidin 基因的实时荧光相对定量研究方法, 对大黄鱼头肾中的 Hecpidin 基因转录物进行相对定量, 为今后开展鱼体内免疫相关基因的表达特性、诱导机制等工作奠定研究基础. 同时, 克隆得到的大黄鱼 β -actin 基因和 18S rRNA 基因片段已提交基因库, 并获得登录号.

关键词: 大黄鱼; 抗菌肽; 实时荧光定量 PCR; RT-PCR; 管家基因

中图分类号: X 17

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2012)04-0413-06

Relative Quantification of Hecpidin Gene Transcripts in *Pseudosciaena crocea*

CAI Ling¹, WU Man-li¹, FAN Dan-qing¹, YANG Ming²

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China;

2. School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: Two house-keeping genes, 18S rRNA and β -actin, were cloned as endogenous genes for relative quantification of an antimicrobial peptide hepcidin in large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea*) using the real-time RT-PCR. In comparison of the slopes of the relative standard curves between the two endogenous genes and the target gene, a relative quantification method for hepcidin gene using 18S rRNA as the calibrator gene was established. Results obtained with this method were consistent with the results from Northern-blot, suggesting feasibility and effectiveness of the method. This paper provides an effective method to investigate expression patterns and induction profiles of the hepcidin gene in large yellow croakers, and other immunity-related genes in fish bodies. The cloned fragments of 18S rRNA and β -actin genes from the large yellow croaker have been submitted to the GenBank, which have provided accession numbers.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; antimicrobial peptide; real-time quantitative PCR; RT-PCR; house-keeping gene

实时荧光定量 PCR 方法(real-time quantitative PCR)是指在 PCR 指数扩增期间,通过连续监测荧

光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并根据标准曲线定量未知模板的方法.该方法具有准

收稿日期: 2011-02-04

基金项目: 福建省科技计划重点资助项目(200710022); 上海市高校选拔优秀青年教师科研专项基金资助项目(SHU08021); 上海大学创新基金资助项目(A10011109006)

通信作者: 杨 明(1979~),女,助理研究员,博士,研究方向为水生生态毒理学. E-mail: mingyang@shu.edu.cn

确、灵敏和简便等特点,在微生物检测、转基因食品检测和基因表达研究等方面具有重要的应用价值^[1]. 实时定量 PCR 方法分为以检测目的基因自身含量的绝对定量和以内参基因为参比进行的相对定量两类. 相对定量根据参照基因和目的基因的扩增效率是否接近,又分为双标准曲线相对定量法和比较 Ct(cycle threshold) 相对定量法. 在这两个相对定量法中,当目的基因和参照基因的扩增效率接近时,比较 Ct 相对定量法是公认的得到实验结果更为快捷和方便的方法^[2]. 因此,选择合适的内参基因,设计合适的引物,建立合适的 PCR 反应条件是实时定量 PCR 方法建立的重要环节^[3].

持家基因(house-keeping gene) 又称管家基因,是指所有细胞中均要表达的一类基因. 超过 90% 的研究者使用 3-磷酸甘油醛脱氢酶, β -actin, 18S rRNA 和 28S rRNA 作为参照基因进行定量^[4]. 由于这些基因在个体各个生长阶段的大多数,或几乎全部组织中持续表达或变化很小,因此,其表达水平受环境因素的影响较小,只受启动序列或启动子与 RNA 聚合酶相互作用的影响,而不受其他机制的调节. 上述管家基因可作为实时荧光定量的内参基因,通过校正转录效率和起始模板的用量,使不同样本目的基因的比较成为可能^[5-6].

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 是我国沿海重要的经济鱼类,但因酷渔滥捕,现今渔汛消失,野生大黄鱼濒临绝迹. 目前市售的大黄鱼均以人工养殖为主,但由于其在养殖过程中较易受病害影响,因而导致养殖风险和成本较高,市售价格昂贵. 开展大黄鱼体内免疫功能相关基因的研究,对人工养殖大黄鱼的病害防治具有重要的理论意义和广阔的应用前景. 本研究克隆了内参基因的序列,建立了大黄鱼抗菌肽 Hecpudin 基因(pc-hepc) 的实时相对定量分析方法,完成了大黄鱼免疫器官中 Hecpudin 基因转录物的相对定量分析. 该工作不仅为开展 Hecpudin 抗菌肽基因表达特性等的研究奠定了基础,而且为开

展其他鱼类中免疫相关基因体内表达机制的研究提供了参照.

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

大黄鱼取自福建福州罗源湾养殖场,平均体重为 40 g.

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), Sigma 公司; Trizol 试剂盒, Invitrogen 公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit 反转录试剂盒、TaKaRa PMDT-18 质粒连接试剂盒、DNA Marker, 大连宝生物公司; Qiaquick Gel Extraction Kit, QIAGEN 公司; Power SYBR Green PCR Master Mix 荧光定量试剂, Applied Biosystem 公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche 公司; 所有引物由上海生物工程有限公司合成; 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 组织样本采集及其 RNA 提取

攻毒组(A 组) 大黄鱼腹腔注射 800 μ g LPS, 对照组(B 组) 注射等体积生理盐水, 48 h 后采集样品(样品数量 $n = 3$). 现场解剖, 取头肾组织样品迅速放入液氮中, -80°C 冰箱保存. 使用 Trizol 试剂盒抽提 RNA. 核酸蛋白含量测定仪(GE 公司) 检测 RNA 的浓度和质量.

1.2.2 内参基因(18S rRNA 和 β -actin) 序列的获得

根据 GenBank 中黑鲷 Hecpudin 基因的序列设计 18S rRNA 和 β -actin 基因的引物, 如表 1 所示. 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 进行反转录, 并在 PTC-200 型 PCR 仪(MJ Research 公司) 上进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94°C 变性 3 min; 随后进行 30 个循环的 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 40 s 和 72°C 延伸 1 min; 最后, 72°C 延伸 5 min. PCR 产物经 Qiaquick Gel Extraction Kit 回收纯化后, 使用 TaKaRa PMDT-18 载体连接试剂盒连接转化, 并由上海生工生物工程公司测序.

表 1 用于序列扩增和实时定量 PCR 的引物

Table 1 Primers for sequence amplifications and real-time PCR

| 引物(5'-3') | 用途 | GenBank 登录号 |
|---|--|-------------|
| 18SF: ACAAAGGGCAGGGACTTAATCA 18SR: TCCCATGAACGAGGAATTCC | 18S rRNA 序列扩增和 Real-time PCR | AB259837 |
| β -actinF: TCGTCGGTCCGTCAGGCATCAG β -actinR: ATGGCGTGGGGCAGAGCGTAACC | β -actin 序列扩增和 Real-time PCR | AY491380 |
| hepF: TTTGCTGCCGTTGCTGCTCCTAGAATGAG hepR: CAACCTGGGATCTCCACAACAC | Hecpudin 序列 Real-time PCR 和 Northern-blot 探针合成 | EF156401 |

1.2.3 实时荧光定量 RT-PCR

取 500 ng 大黄鱼头肾 RNA 进行反转录. 经优化 PCR 条件后,按 1 ng RNA 转录为 1 ng cDNA 计算,取 2 ng 稀释后的反转录产物加入 20 μ L 反应体系中,同时加入浓度为 10 μ M 的上、下游引物各 1 μ L. 使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂进行实时荧光定量 PCR. PCR 反应条件为: 60 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 随后进行 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,并在 60 $^{\circ}$ C 采集荧光信号. PCR 程序结束后,对 PCR 反应产物进行溶解曲线的测定,反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s.

1.2.4 Northern-blot 实验

采用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒标记 Hecpudin 探针. 等量混合 A 组和 B 组各 3 条鱼的头肾 RNA, 并取 40 μ g 总 RNA 进行甲醛变性凝胶电泳,按试剂盒说明书进行 Northern-blot 实验. 扫描 Northern-blot 实验结果,并使用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件对 Northern-blot 结果图中的条带进行光强度分析,以确定各条带的光强度及其占总光强度的比例.

1.2.5 数据统计与分析

以 50 ng cDNA 为起始量进行 10 倍梯度稀释,获得扩增效率标准曲线. 扩增效率标准曲线使用 Origin 7.0 软件绘制,横坐标为稀释倍数的 lg 值,纵坐标为荧光定量分析的 Ct 值.

使用比较 Ct 法分析实时荧光定量 PCR 数据时,要求内参基因和目标基因的扩增效率一致. 当满足上述条件时,取一个样品的荧光值,用 Δ Ct (即目标基因与内参基因 Ct 值的差值) 进行标准化. 比较不同的样品相对量时,用标准化后的值,即不同样品的 Δ Ct 的差值进行比较,即 $\Delta(\Delta$ Ct) = Δ Ct₁ - Δ Ct₂. 最后,当转化成 RNA 水平实际变化倍数时,结果为 $Y = 2^{-\Delta(\Delta$ Ct)} [4]. 本实验的相对定量数据以 18S rRNA 基因片段为内参,采用 B 组第一条鱼的 Hecpudin 表达量进行数据归一化,采用 $2^{-\Delta(\Delta$ Ct)} 方法进行计算.

2 实验结果

2.1 大黄鱼头肾总 RNA 的提取

紫外分光光度计测定总 RNA 的吸光值 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,证明了所提取的 RNA 纯度较高,无蛋白和 DNA 污染. 取微量总 RNA 提取液进行 1%

琼脂糖凝胶电泳,结果显示, rRNA 具有完整带型,证明提取的 RNA 较完整,无降解.

2.2 大黄鱼 18S rRNA 和 β -actin 片段的 cDNA 序列及序列的同源性分析

经过序列相似性比对分析,本实验首次扩增出了大黄鱼的 18S rRNA 和 β -actin 的 cDNA 序列片段,并已登录 GenBank 获得了登录号,结果如表 2 所示.

表 2 大黄鱼 18S rRNA 和 β -actin 片段的序列相似性分析
Table 2 Similarity analysis of 18S rRNA and β -actin fragments

| 大黄鱼基因 | 长度/bp | GenBank 登录号 | 相似性比对基因 | 相似性/% |
|----------------|-------|-------------|--|-------|
| 18S rRNA | 74 | EU443734 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> 18S rRNA (EZ914340) | 100 |
| β -actin | 420 | EU443733 | <i>Acanthopagrus schlegelii</i> β -actin mRNA (AY491380) | 97 |

2.3 大黄鱼 3 种基因的扩增和溶解曲线

图 1 为多次重复的实时荧光定量 PCR 产物溶解曲线图,其中凝胶电泳图代表普通 PCR 扩增产物,溶解曲线图代表实时荧光定量 PCR 扩增产物; M1 为 100 bp ladder DNA Marker, M2 为 DL2000 DNA Marker. 可以看出,利用所设计的引物扩增出的 Hecpudin, 18S rRNA 和 β -actin 等目的基因片段,都具有各自单一的溶解温度,分别为 80, 78 和 84 $^{\circ}$ C; PCR 反应产物特异,并且琼脂糖凝胶电泳也证明了其 PCR 产物单一,没有二聚体的产生.

2.4 实时荧光相对定量 PCR 方法检测大黄鱼 Hecpudin 基因方法的建立

2.4.1 扩增效率标准曲线

图 2 为大黄鱼 3 种基因实时荧光定量 PCR 的扩增效率标准曲线,其中 x 为模板基因的稀释倍数. 由图 2(a) 可见, 18S rRNA 基因扩增曲线的斜率与 Hecpudin 基因斜率相差 (Δk) 仅为 0.08, 线性回归系数差值 (ΔR^2) 小于 0.005, 符合比较 Ct 法分析的要求. 在图 2(b) 中, β -actin 基因扩增曲线的斜率与 Hecpudin 基因斜率差为 0.22, ΔR^2 也小于 0.005. 比较而言, 18S rRNA 更接近 Hecpudin 基因的扩增效率, 因此, 更适合用于比较 Ct 法分析的实时定量 PCR.

2.4.2 与 Northern-blot 结果的比较

为了验证大黄鱼内参基因 18S rRNA 用于实时荧光定量方法的可行性和有效性, 将 PCR 的实验结

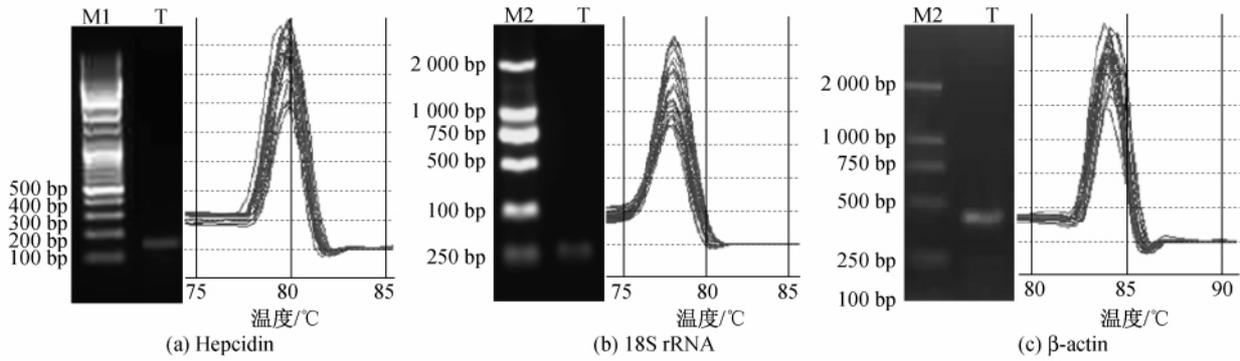


图 1 普通 PCR 扩增产物电泳图和实时荧光定量 PCR 产物溶解曲线

Fig. 1 Agrose gel analysis and melting curve anlysis of the PCR products

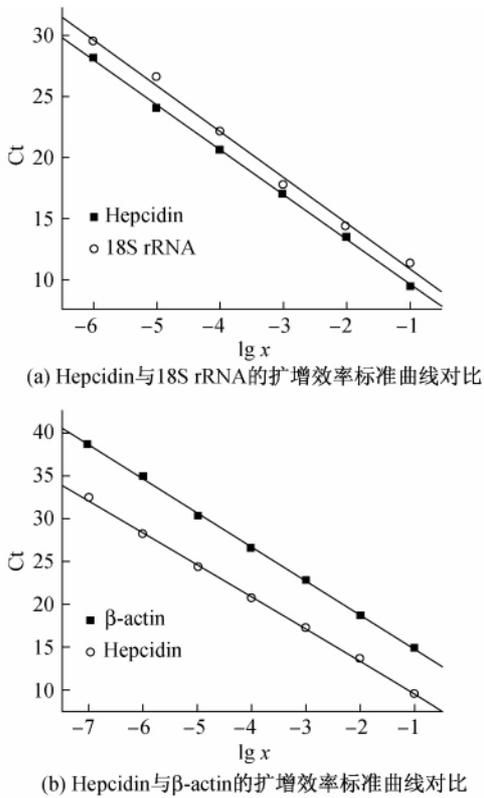
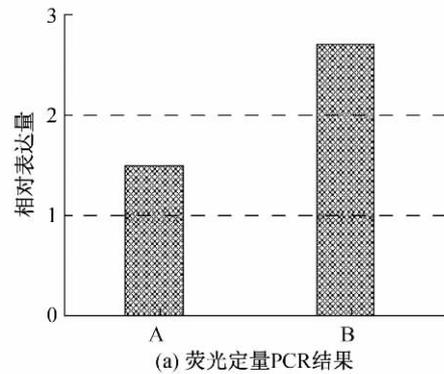


图 2 大黄鱼 3 种基因实时荧光定量 PCR 的扩增效率标准曲线

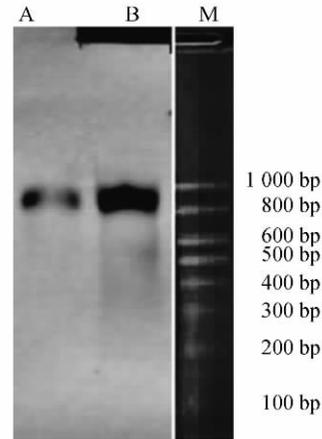
Fig.2 Relative standard curves of the hepcidin, 18S rRNA and β-actin genes from the large yellow croaker using real-time PCR

果与 Northern-blot 的实验结果进行了比较,结果如图 3 所示,其中 A 为对照组样品,B 为攻毒组样品, M 为 RNA Marker 1000. 结果表明,利用实时荧光定量 PCR 方法分析,攻毒组大黄鱼经 LPS 诱导,头肾中的 Hepcidin 基因被诱导并升高至对照组的 1.80 倍;而利用 Northern-blot 方法分析,攻毒组大黄鱼头

肾中的 Hepcidin 基因被诱导至对照组的 2.11 倍,证明两种方法所得的结果基本一致.



(a) 荧光定量 PCR 结果



(b) Northern-blot 结果

图 3 Hepcidin 基因实时荧光定量 PCR 结果与 Northern-blot 结果比对

Fig.3 Comparison of the hepcidin gene quantity obtained from real-time PCR and Northern-blot

3 讨论

本研究建立了大黄鱼 Hepcidin 抗菌肽基因实时

荧光相对定量分析方法,与传统的 Northern-blot 半定量基因表达方法相比,本方法利用了内参基因进行校正,使结果更加准确可靠.由于 Northern-blot 实验直接操作 RNA 进行电泳,而 RNA 又极易在实验中降解,因此,对实验者的实验技能和对实验过程的控制要求较严格.同时,Northern-blot 的每个样品的 RNA 用量,如本实验中的 40 μg 总 RNA 上样量,远大于荧光定量 PCR 的 500 ng 总 RNA 初始量.因此,在操作大量基因的表达检测时,实时荧光定量 PCR 相比传统的 Northern-blot 方法,优势非常明显.

抗菌肽 Hepsidin 是一种重要的先天性免疫因子,于 2000 年由 Krause 从人类血浆中分离出来.由于抗菌肽在肝脏表达,因此,被命名为 Hepsidin 或 LEAP-1 (liver expressed antimicrobial peptide)^[7]. 随后,在小鼠、猪、狗等多个哺乳动物物种中均发现了这一抗菌肽的存在^[8-40]. 2002 年,Shike 等^[11]在细菌诱导的杂交斑纹鲈鱼 (*Morone saxatilis* \times *Morone chrysops*) 鳃中发现了鱼类中的第一个 Hepsidin 抗菌肽.此后,在大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)^[12]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[13]、黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)^[14-16]等多种鱼类中也发现了这一抗菌肽的存在.Hepsidin 家族的抗菌肽是一种保守的富含半胱氨酸,具有二硫键结构的抗菌肽.研究表明,Hepsidin 抗菌肽在人体等哺乳动物中是一种调节体内铁稳态的关键物质和一种极为重要的铁代谢调激素^[7-40].在鱼类中,Hepsidin 抗菌肽在先天免疫相关方面发挥着更为广泛的作用.鱼类体内存在多个 Hepsidin 抗菌肽变体,细菌、致炎物质等均可影响 Hepsidin 在鱼体内各器官组织中的表达合成^[16].研究发现,Hepsidin 的不同变体不仅可以诱发免疫相关基因的表达合成,同时具有抑制肿瘤细胞的活性,并在病毒感染细胞后起到保护细胞抵抗病毒侵染的作用^[17-48].这些研究进一步证实了 Hepsidin 抗菌肽对鱼类先天免疫作用的重要性.

4 结束语

开展大黄鱼体内 Hepsidin 基因的研究,利用本实验建立的实时荧光定量分析方法对其基因进行定量检测,可以更加深入地了解大黄鱼抗菌肽的表达情况,为进一步开展大黄鱼的先天免疫机制研究奠定了基础.Hepsidin 抗菌肽在大黄鱼中的研究不仅

对减少大黄鱼养殖病害有所助益,同时也对其他养殖鱼类的病害防治具有普遍的意义.

参考文献:

- [1] 王宇,刘景晶.核酸的定量技术研究进展[J].药学进展,2006,30(9):385-390.
- [2] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [3] DUNCAN A, DYLAN N C, FIONA S, et al. Expression stability of commonly used reference genes in canine articular connective tissues [J]. BMC Vet Res, 2007, 3:7.
- [4] TRICARICO C, PPINZANI P, BIANCHI S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies [J]. Anal Biochem, 2002, 309(2):293-300.
- [5] BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. Mol Endocrinol, 2002, 29(1):23-39.
- [6] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations [J]. Genes Immun, 2005, 6:279-284.
- [7] KRAUSE A, NEITZ S, MAGERT A S, et al. LEAP-1, a novel highly disulfidebonded human peptide, exhibits antimicrobial activity [J]. FEBS Lett, 2000, 480:147-150.
- [8] PIGEON C, ILYIN G, COURSELAUD B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepsidin, is overexpressed during iron overload [J]. Biol Chem, 2001, 276:7811-7819.
- [9] ZHANG A S, XIONG S, TSUKAMOTO H, et al. Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes [J]. Blood, 2004, 103:1509-1514.
- [10] SANG Y, RAMANATHAN B, MINTON J E, et al. Porcine liver-expressed antimicrobial peptides, hepsidin and LEAP-2: cloning and induction by bacterial infection [J]. Dev Comp Immun, 2006, 30:357-366.
- [11] SHIKE H, LAUTH X, WESTERMAN M E, et al. Bass hepsidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge [J]. Eur J Biochem, 2002, 269:

- 2232-2237.
- [12] SUSAN E D, JEFFREY W G, LIEBSCHER R S, et al. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish [J]. *Dev Comp Immun*, 2003, 27: 589-601.
- [13] REN H L, WANG K J, ZHOU H L, et al. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2006, 21(3): 221-227.
- [14] YANG M, WANG K J, CHEN J H, et al. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B) [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2007, 23(5): 1060-1071.
- [15] 蔡晶晶, 杨明, 蔡灵, 等. 黑鲷抗菌肽 hepcidin 在毕赤酵母中的表达及其抗菌活性 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(5): 838-743.
- [16] YANG M, CHEN B, CAI J J, et al. Molecular characterization of hepcidin AS-hepc2 and AS-hepc6 in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): expression pattern responded to bacterial challenge and in vitro antimicrobial activity [J]. *Comp Biochem Phys B*, 2011, 158(2): 155-163.
- [17] CHEN J Y, PAN C Y, CHEN J Y. Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2010, 29(3): 430-439.
- [18] CHEN J Y, VENUGOPAL R. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in *Chinook salmon* embryo (CHSE) -214 cells [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2011, 30(1): 39-44.