

## 关于定量 PCR 技术中模板使用浓度的研究

周婷婷<sup>1)</sup>, 杨延磊<sup>1, 2)</sup>, 笪金<sup>1)</sup>, 李力燕<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学神经科学研究所, 云南昆明 650500; 2) 红河州第一人民医院神经内分泌科, 云南蒙自 661000)

**[摘要]** **目的** 研究定量 PCR 模板使用浓度对产物量的影响, 对如何改善定量 PCR 技术进行一些探讨. **方法** 分别用 1× 浓度和 1/10× 浓度逆转录产物 (cDNA) 进行递增量的梯度 PCR 反应 (0.5 μL、1 μL、2 μL、4 μL), 观察其不同量之间变化的灵敏性; 进一步增大样本量, 来观察这两个浓度级别分辨两倍量差距 (1 μL 和 2 μL) 的能力. **结果** 在梯度实验中, 1/10× 浓度的模板表现出了明显的线性关系 ( $R^2 = 0.9105$ ), 即产物量随模板使用量的增加而增加, 而 1× 浓度的模板却没有表现出来 ( $R^2 = 0.2488$ ). 此外, 1/10× 浓度的模板有效的区分出了两倍量的差距 (1 μL 组和 2 μL 组之间,  $t = 3.329$ ,  $P < 0.05$ ) 而 1× 浓度的模板却没有. **结论** 进行定量 PCR 时, 不同的模板浓度对 PCR 产物量有一定影响的; 选择适当的模板浓度是十分必要.

**[关键词]** 定量 PCR; 琼脂糖凝胶电泳; mRNA 定量

**[中图分类号]** R318 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0015 - 03

## Study on the Template Concentration in PCR Technology

ZHOU Ting ting<sup>1)</sup>, YANG Yan lei<sup>1,2)</sup>, RU Jin<sup>1)</sup>, LI Li - yan<sup>1)</sup>

(1) Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Neuroendocrine Branch of the First People's Hospital of Honghe Prefecture, Mengzi Yunnan 661000, China)

**[Abstract]** **Objective** Put forward some suggestions for improving the technology of quantitative PCR, by the research on effect of quantitative PCR template concentration on the product. **Methods** Respectively, using the 1× concentration and 1/10× concentration of reverse transcription product (cDNA) to conduct gradient PCR reaction by gradient increments (0.5 μL, 1 μL, 2 μL, 4 μL) and observe the sensitivity varies between the different amounts. Further increasing the sample size, observed the two concentration levels' abilities of distinguish the twice amount of the gap (1 μL and 2 μL). **Results** 1/10× template concentration gradient experiment showed a significant linear relationship ( $R^2 = 0.9105$ ), as the amount of product increases with the increased use of templates. And 1× concentration of the template did not show out ( $R^2 = 0.2488$ ). In addition, 1/10× template concentration effectively distinguished the twice amount of gap (between 1ul group and 2ul group,  $t = 3.329$ ,  $P < 0.05$ ), but the 1x template concentration did not. **Conclusion** The template concentrations affect the amount of the PCR product. Therefore, it is very necessary to select the appropriate template concentration.

**[Key words]** Quantitative PCR; Agarose gel electrophoresis; mRNA quantification

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 即逆转录 PCR, 是将 RNA 的逆转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链式扩增反应 (PCR) 相结合的技术. RT-PCR 技术灵敏而且用途广泛, 在

神经生物学<sup>[1]</sup>的研究中, 使用逆转录 PCR 进行 mRNA 定量是一个常用的方法, 通常是通过琼脂糖凝胶电泳<sup>[2]</sup>、实时荧光<sup>[3-5]</sup>、荧光探针<sup>[6]</sup>等方法来进行定量. 虽然实时荧光和荧光探针比琼脂糖凝

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30960156, 31260253); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项重点项目 (2012FB002) .

**[作者简介]** 周婷婷 (1986~), 女, 吉林长春市人, 医学硕士, 主要从事人体解剖与组织胚胎学方面的研究.

**[通讯作者]** 李力燕. E-mail:kmllyanhi@163.com

胶电泳更可靠,更有优势,但是用琼脂糖凝胶电泳检测的造价低,且简便易于操作.因此,条件有限的实验室大多用琼脂糖凝胶电泳来检测 PCR 产物,如何充分发挥它的优势,避开它的缺陷变得非常重要.本文主要探讨模板的使用浓度对 PCR 产物量的影响,期得对该技术的改善提供数据支持.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 昆明小鼠,雄性,体重 30~40 g,由昆明医科大学动物科提供.

**1.1.2 主要仪器及试剂** 要实验仪器 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),电泳仪电源(北京市六一仪器厂),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司).

主要实验试剂 Trizol(美国 invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas),PCR 试剂盒(Fermentas).

### 1.2 实验步骤

**提取总 RNA:** 3.6%水合氯醛麻醉小鼠,在冰上迅速剥离出海马组织.提取海马总 RNA.

**逆转录:** 逆转录体系为 20  $\mu$ L.反应条件:42  $^{\circ}$ C 孵育 60 min,70  $^{\circ}$ C 孵育 5 min.

**PCR 扩增:** PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L. PCR 扩增条件:预变性 95  $^{\circ}$ C 3 min,变性 95  $^{\circ}$ C 30 s,退火 52  $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72  $^{\circ}$ C 1 min,32 个循环,最后延伸 72  $^{\circ}$ C 5 min.其中 TrkB 上游引物为 5' TGTCCCCAGGAGGTGTATG 3',下游引物为 5' CGTCAAAGGCAGGAATACA 3',产物大小 583 bp.

**模板递增量梯度实验:** 分别用 1  $\times$  浓度和 1/10  $\times$  浓度逆转录产物(cDNA)进行递增量的梯度 PCR 反应(0.5  $\mu$ L、1  $\mu$ L、2  $\mu$ L、4  $\mu$ L),观察其不同量之间变化的灵敏性.

**两倍差距分辨实验:** 将不同的 6 个样本随机分两组(1  $\mu$ L 组和 2  $\mu$ L 组),别使用 1  $\times$  浓度和 1/10  $\times$  浓度进行 PCR 扩增,观察其两倍差距的分辨能力.

### 1.3 统计学处理

梯度实验结果使用 Microsoft office excel 2007 进行线性回归分析.两倍量的差距使用统计软件 SPSS 进行方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 模板递增量梯度实验结果

所得 TrkB PCR 产物均出现在约 583 bp 处,与引物设计预想得到的片段相同.经线性回归分析,1/10  $\times$  浓度的模板表现出了明显的线性关系,即产物随模板量的增加而增加,而 1  $\times$  的却没有表现出来(图 1).

### 2.2 2 倍差距分辨实验

将不同的 6 个样本随机分为两组,1  $\mu$ L 组和 2  $\mu$ L 组,分别使用 1  $\times$  浓度和 1/10  $\times$  浓度进行 PCR 实验.结果表明,使用 1/10  $\times$  浓度的模板很好的区分出了 1  $\mu$ L 和 2  $\mu$ L 模板量的差别,而 1  $\times$  的却没有(图 2).

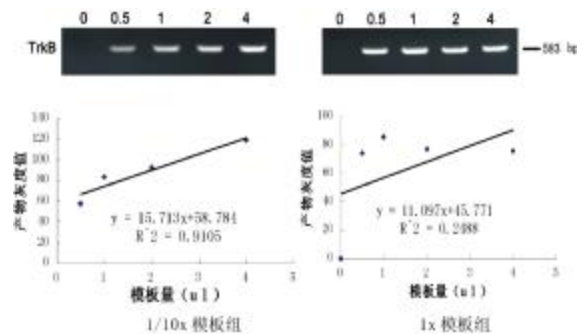


图 1 电泳结果和线性回归分析结果

Fig. 1 Results of electrophoresis and linear regression analysis

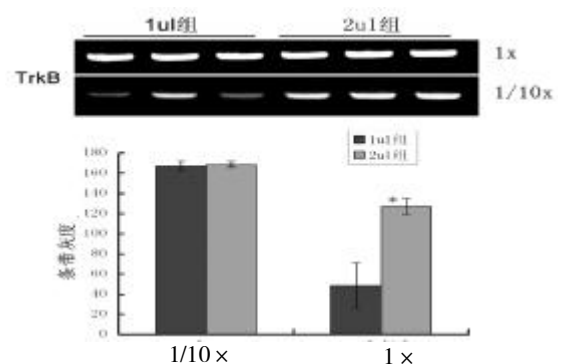


图 2 电泳结果和统计直方图结果

Fig. 2 Results of electrophoresis and statistics

## 3 讨论

逆转录 PCR 是分子克隆<sup>[7]</sup>中必不可少的技术,

后来随着一些定量技术的发明和完善,使其也成为核酸定量的工具,比较常用的有实时荧光定量、荧光探针定量、琼脂糖凝胶电泳定量等,尽管前二者较后者更为先进、可靠,国外很多学者用这两种定量方法研究核酸表达水平<sup>[8-10]</sup>,但是成本相对较高,在条件有限的实验室,琼脂糖凝胶电泳还广泛存在,因此进一步完善这一方法非常有意义.本研究通过实验证明不同的模板浓度对PCR产物量是有影响的,进行逆转录PCR定量时,选择适当的模板浓度是十分必要的.

由于通常PCR反应是在一个局限的环境中进行,超过一定的循环次数以后,模板、聚合酶、反应原料的浓度会发生很大的变化,致使反应到达一个平台期,即再增加循环数,产物不会再有明显的增加.因此,在使用PCR技术定量的过程中,在到达反应平台期之前终止反应才能得到可靠的结果,而平台期的到达时间跟模板的初始浓度有很大的关系,模板量越大,达到平台期的时间就越快.因此,在固定的循环次数中,摸索最佳的模板浓度是不可或缺的.尽管如此,由于PCR反应的复杂性以及在定量方面的不成熟性使得这一技术在科研和临床应用中很难有统一的标准,再加上国内很多实验室没有机会享有国际上较高端的PCR仪器,使得由此技术得出的结果重复性很差,假阳性结果频现,更不要说去发现更细微的差别.笔者也证实了不同的模板浓度导致了不同的结果,再一次证实摸索初始模板浓度的必要性.在定量PCR反应中,不同初始浓度的模板会影响PCR反应的产量.因此,摸索最佳的模板浓度是必不可少的.

#### [参考文献]

[1] 张惊宇,赵节绪. 腺相关病毒介导的脑源性神经营养

因子基因对大鼠海马神经元树突生长的影响[J]. 中国脑血管杂志,2009,6(2):84-87.

[2] 鄢黎,周晓雯,周星,等. 大黄酒酸对体外大鼠皮质神经元突起长度及微管相关蛋白2mRNA表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2012,26(1):52-56.

[3] 李欣,程纯,赵剑,等. 大鼠发育过程中脊髓组织CAPON与Dexras1 mRNA表达的实验研究[J]. 神经解剖学杂志,2007,23(4):349-354.

[4] JIN ZHE,ZHAO CHENGHAI,HAN XIAORUI,et al. Wnt5a promotes ewing sarcoma cell migration through upregulating CXCR4 expression[J]. MC Cancer,2012,12:480.

[5] CRONPIRIN,TTENCOMNAO. Dithranol downregulates expression of Id1 mRNA in human keratinocytes in vitro[J]. Genetics and Molecular Research,2012,11(3):3290-3297.

[6] 徐志伟,孙琪,敖海清,等. 逍遥散对慢性应激状态下大鼠海马神经细胞天冬氨酸受体各亚基mRNA表达的影响[J]. 广州中医药大学学报,2011,1:36-42.

[7] 孙树汉,王俊霞,陈蕊. 囊虫病诊断用抗原编码cDNA的分子克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1997,15(1):15-20.

[8] JOSHUA J,BUCHMAN,OMER DURAK,et al. ASPM regulates Wnt signaling pathway activity in the developing brain [J]. GENES & DEVELOPMENT,2011,25():1909-1914.

[9] CAMILLE ROBINET,LUC PELLERIN. Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,2010,30:286-298.

[10] TATIANA LVANOVA,CORDIAN BEYER. Pre- and postnatal expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA/protein and tyrosine protein kinase receptor B mRNA in the mouse hippocampus [J]. Neuroscience Letters,2001,307:21-24.

(2013-01-21 收稿)