

荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴不同器官 组织中黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因的 mRNA 表达差异的比较

唐东红¹, 叶尤松¹, 李哲丽¹, 彭 波², 李桂珍², 李润萍², 杨光蕊²

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 云南省中医学院, 昆明 650200)

【摘要】 目的 比较荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴体内肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中黄嘌呤脱氢酶氧化酶(*XDH/XO*)的 mRNA 的相对表达量的差异,为改进实验研究方法学提供参考依据。**方法** 提取健康猕猴新鲜肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中总 RNA,使用相同的引物序列及内参基因,分别用荧光定量 PCR 与半定量 PCR 进行相对定量检测,结果做比对分析。**结果** 两种检测方法均能检测到健康猕猴新鲜肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中 *XDH/XO* 的 mRNA 表达,荧光定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 0.4 ng 总 RNA 中的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达,半定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 15.625 ng 总 RNA 中的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达,荧光定量 PCR 较半定量灵敏度高 39 倍。两种方法检测结果均显示猕猴不同组织 *XDH/XO* 的 mRNA 表达在肝脏组织中表达水平最高,对于表达量较低的其他组织,荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测结果存在有一定差异。**结论** 两种方法均可用于检测猕猴体内肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中黄嘌呤氧化脱氢酶(*XDH/XO*)的 mRNA 的相对表达量,荧光实时定量 PCR 灵敏度较高于半定量 PCR 法。

【关键词】 荧光定量 PCR; 半定量 PCR; 黄嘌呤脱氢酶氧化酶; mRNA 表达; 猕猴; 肝; 心; 肾; 睾丸; 皮肤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0047-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.010

Comparison between the quantitative and semi-quantitative fluorescence RT-PCR assays for the detection of *XDH/XO* mRNA expression in different organ tissues of rhesus monkey

TANG Dong-hong¹, YE You-song¹, LI Zhe-li¹, PENG Bo², LI Gui-zhen², LI Run-ping², YANG Guang-rui²

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences /Peking Union Medical College, Kunming 650118, China 2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650118)

【Abstract】 Objective To analyze the differences between the semi-quantitative RT-PCR and real time quantitative fluorescence RT-PCR assays for detecting *XDH/XO* mRNA expression in various organ tissues of rhesus monkey, and provide useful reference in methodology of experimental studies. Total RNA was extracted from the myocardium, kidney, testis, skin, and liver tissues, respectively, for detecting *XDH/XO* mRNA expression in rhesus monkey by semi-quantitative RT-PCR and real time quantitative fluorescence RT-PCR assays. The sensitivity and specificity of the two

assays were compared with each other using the same primer sequences and reference genes. **Results** The expression of *XDH/XO* mRNA in different organ tissues were detected by both the two PCR assays. The sensitivity of quantitative fluorescence real-time RT-PCR for the *XDH/XO* mRNA expression in the liver tissue was 39 times higher than that by semi-quantitative RT-PCR. **Conclusions** Both the quantitative and semi-quantitative fluorescence RT-PCR assays can be used to detect the expression of *XDH/XO* mRNA in different organ tissues of rhesus monkey. The sensitivity of quantitative fluorescence real-time PCR assay is more sensitive than that of the semi-quantitative RT-PCR assay.

【Key words】 Quantitative fluorescence RT-PCR; Semi-quantitative RT-PCR; *XDH/XO*; Expression of mRNA; Rhesus monkey; Liver; Skin; Testis; Heart; Kidney

荧光定量 PCR 是 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种新技术,它通过在反应体系中加入荧光基团,使 PCR 产物的量与其荧光强度成线性关系,从而得到产物的扩增曲线。荧光通过引物与模板的特异性杂交来鉴别模板,具有很高的准确性,假阳性低,特异性好^[1]。半定量 RT-PCR 是研究基因转录水平的有效手段,因其费用低、普通实验室容易做到而被经常使用,可用来检测基因表达及其变化状况^[2]。黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase, *XDH/XO*) 是一种在嘌呤代谢的氧化过程中的限速酶,并且被认为在一些包括缺血再灌注损伤、病毒性肺炎、肾衰竭的过程中扮演着重要的角色^[3,4]。*XDH/XO* 的分布有物种和组织特异性,狗和小鼠心肌内 *XDH/XO* 活性很高,兔和猪心肌内 *XDH/XO* 活性很低,在人体及灵长类动物体内 *XDH/XO* 主要分布于肝脏组织,其次为小肠^[3,5]。猕猴 (*Macaca mulatta*),又名恒河猴 (rhesus monkey),由于在形态学、生理生化代谢等方面与人类非常相似,是较为理想的实验动物,常用于许多重要的科学研究。本文对照分析荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴体内肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中黄嘌呤氧化脱氢酶 (*XDH/XO*) 的 mRNA 的相对表达量的差异,其结果具有一定的参考价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所需猕猴来源于中国医学科学院医学生物学研究所全国医学灵长类中心,实验动物生产许可证号:【SCXK(滇)2010-0003】,实验动物使用许可证号:【SYXK(滇)2010-0007】。猕猴基本信息:猴号 1204043,雄性,体重 3.1 kg,年龄 1.5 岁,猴号 205001,雄性,体重 2.6 kg,年龄 1.4 岁。数量 2 只。动物实验由中国医学科学院医学生物学研究

所动物实验伦理委员会审查通过,批准号为【2013-003】,同时按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 试剂及仪器

逆转录试剂盒 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 04 897 030 001),Roche 公司产品;实时荧光定量扩增试剂盒,SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa Code No. DRR820A);PCR 试剂 (Premix Taq™, Code No. RR003A),TaKaRa 生物有限公司产品;TRizol 试剂,Invitrogen™ 公司;溴化乙锭 (EB),美国 Bio-Rad 公司;西班牙 Biowest 琼脂糖;DNA 分子量标准 (DL 2000 bp),TakaRa 生物工程有限公司。CFX 96™ real-time system 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;C1000™ Thermal Cycler PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;PowerPac Basic 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析仪,美国 BioRad 公司;ND-1000 紫外分光光度计,美国 DanoDrop 公司;Hitachi CT15RE 冷冻离心机,宝日医学生物技术(北京)有限公司;烘干箱,北京市光明医疗器械厂;超低温保存箱,中国海尔集团;SS-325 高压蒸气灭菌箱,日本 Tomy 公司。

1.3 引物设计与合成

两种方法采用相同的引物,引物设计根据 NCBI 提供的人类 *XDH/XO* 核苷酸序列 (U39487.1) 为参考,利用 Primer 5.0 软件在 CDS 区域进行设计,内参基因为 *GAPDH*。*XDH/XO* 上下游引物分别为 F: 5'-GTTGGAGGGAACATCATCACT-3', R: 5'-GCAGG GTCTTTCTGTAGCCA-3',产物长度为 150 bp;内参基因 *GAPDH* 上下游引物分别为 F: 5'-CAAGAAG GTAGTGAAGCAGGC-3', R: 5'-TGTTGAAGTCGGA GGAGACC-3' 产物长度为 100 bp。

1.4 猕猴各器官组织的取材

猕猴采用大剂量注射氯胺酮进行安死术后,迅速采集其心肌组织,肝脏组织,肾脏组织,睾丸组

织,上皮组织少许,迅速放入液氮中保存备用。

1.5 总 RNA 的提取、浓度测定及完整性检测

分别取液氮中猕猴心肌组织,肝脏组织,肾脏组织,睾丸组织,皮肤组织各 100 mg 按 TRizol 试剂说明书提取不同组织的总 RNA。将所提取的 RNA,分别取 1 μ L 于核酸微量检测仪 (ND-1000) 测定总 RNA 的含量。根据 A 260 /A 280 的比值估计 RNA 的纯度,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,进行完整性检测。

1.6 目的片段基因的特异性鉴定、灵敏度比较

1.6.1 逆转录获得 cDNA 的第一链及 *XDH/XO* 基因及内参基因 *GAPDH* 基因的 PCR 扩增:将得到的猕猴不同组织的总 RNA 浓度稀释统一稀释到 1 000 ng/ μ L 量。根据 Roche 第一链 cDNA 合成试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作取 1 μ L 总 RNA,逆转录后获得 20 μ L 获得 cDNA 第一链。以逆转录所获得的 cDNA 为模板在同一块板上进行以上不同组织的 *XDH/XO* 基因及内参基因 *GAPDH* 的 PCR 扩增,PCR 反应经过优化,优化后反应条件如下:反应体系为 25 μ L,分别加上、下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L)、模板 cDNA 5 μ L (相当于 250 ng 总 RNA)、灭菌去离子水 5.5 μ L、Premix Ex Tag 12.5 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,93 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s、30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6.2 目的片段基因的特异性鉴定、序列测定:扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶影像分析仪用 Quantity One 软件观察所扩增的目的片段,扩增产物与所设计的片段大小相一致时,将 RT-PCR 产物送百泰克生物科技公司直接测序,测序结果使用 ChromasPro 软件进行碱基序列拼接,利用 DNAMAN 软件对目的基因核苷酸进行分析及鉴定。Real-time 荧光定量 PCR 目的片段及内参基因特异性通过绘制出的溶解峰来证实。

1.6.3 半定量 PCR 灵敏度检测:分别将逆转录所得的肝脏 cDNA 进行对倍稀释至 RNA 浓度 5 μ L 中含量依次为 250 ng、125 ng、62.5 ng、31.25 ng、15.625 ng,然后进行 RT-PCR 反应的灵敏度检测,反应参数同上。

1.6.4 Real-Time 荧光定量 PCR 优化及标准曲线的建立:将逆转录后得到的模板 cDNA 稀释。以稀释因子为 5 进行 5 倍倍比稀释,将模板稀释为 $5^0 \sim 5^{-4}$ 倍 cDNA 原液,即相当于 5 μ L 中含量依次为 250

ng、50 ng、10 ng、2 ng、0.4 ng 的总 RNA 浓度的稀释液,各取 5 μ L 作为反应模板分别以 *XDH/XO* 引物及内参基因引物 *GAPDH* 进行荧光定量 PCR,同时以 RNA 为反应模板,做阴性实验对照,以验证有无基因组 DNA,反应条件参数如下:在 25 μ L 体系中加入下列试剂:上、下游引物各 1 μ L (10 pmol/L), RNase-free dH₂O μ L,2 $\times$ SYBR premixture 10 μ L,模板 cDNA 5 μ L。在 CFX 96TM Real-Time System 荧光定量 PCR 仪上进行反应,反应条件为:94.0 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,95.0 $^{\circ}$ C 10 sec 变性,62.0 $^{\circ}$ C 30 s 复性 30 个循环,延伸 72.0 $^{\circ}$ C 1 min,72.0 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min,插入曲熔曲线,荧光采集 55.0 $^{\circ}$ C ~ 95.0 $^{\circ}$ C、0.5 $^{\circ}$ C、0.05 s。

反应结束后根据荧光信号的数据,通过 CFX Manager 软件,建立标准曲线,得到基因扩增效率,斜率及 R^2 值,当目的基因及内参基因扩增效率在 80% 至 120 之间,同时 R^2 接近 1,说明结果可信度较高,符合荧光定量 PCR 要求。可进一步进行待检样品检测。

1.7 半定量 PCR 及荧光定量 PCR 相对定量检测

1.7.1 *XDH/XO* 基因及内参基因 *GAPDH* 同步扩增的半定量 PCR 相对表达值的计算:以反转录后的 cDNA 作为模板,采用同批异管对目的基因及内参基因进行 PCR 扩增,每个样品做复孔,扩增后进行琼脂糖电泳,对猕猴不同组织的 *XDH/XO* 基因及内参基因用 Bio-Rad 公司成像系统进行成像,对所得到的条带用 Quantity one 软件进行灰度值 IOD 值测定,以 *XDH/XO* 与 *GAPDH* 比值为基因的相对表达量。

1.7.2 荧光定量 PCR 反应及相对表达值的获得:采用 SYBR-green 法,将猕猴不同器官组织所获得的 cDNA 作为模板进行 real-time PCR 反应,反应参数同上,每个样品重复两次,同时以 RNA 为反应模板,做阴性实验对照。反应结束后由 CFX Manager 软件将 qRT-PCR 结果进行基因表达的相对定量分析,CFX Manager 软件内部公式计算得出校正的相对定量标准偏差数据。本实验采用两只猕猴的不同器官组织进行荧光定量实验,代入标准曲线所获得的 *GAPDH* 和 *XDH/XO* 的扩增效率,总结两次实验的数据取平均值,以心肌 *XDH/XO* 基因表达水平作为 1,其他各组织 *XDH/XO* 基因表达水平以相对于心的倍数来表示,得到猕猴相同器官组织中相对平均表达量。

2 实验结果

2.1 猕猴各器官组织 RNA 提取

所提取的总 RNA 样品经 Nanodrop-1000 超微量核酸测定仪测定, A260 nm/A280 nm 值介于 1.8 ~ 2.0 之间时, 总 RNA 琼脂糖电泳结果可观察到见 28 s、18 s、5 s 3 条带, 见图 1, 说明所提取的总 RNA 无降解, 可进一步用于后续实验。

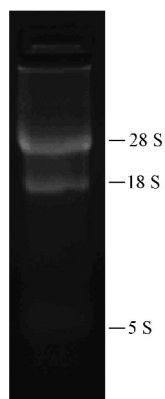


图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 Results of total RNA electrophoresis

2.2 目的基因片段 RT-PCR 的特异性鉴定、序列测定

所扩增出的目的条带, 通过测序及序列比对得到鉴定。

2.3 灵敏度、特异性比较

实时定量 PCR 灵敏度优于半定量 RT-PCR 灵敏度。半定量灵敏度实验显示: 目的基因在总 RNA 含量为 15.625 ng 时, 仍可见条带较弱的阳性扩增,

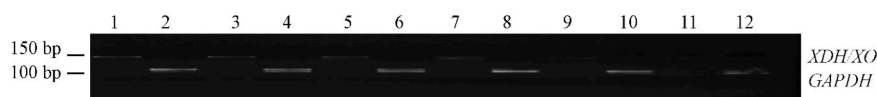


图 2 RT-PCR 灵敏度实验

Note. M: DL2000 DNA marker; 1, 3, 5, 7, 9, 11: 150 bp fragment of *XDH/XO* gene; 2, 4, 6, 8, 10: 100 bp fragment of *GAPDH* gene. 1, 2: 250 ng; 3, 4: 125 ng; 5, 6: 62.5 ng; 7, 8: 31.25 ng; 9, 10: 15.625 ng; 11, 12: 7.81 ng.

Fig. 2 Sensitivity of the RT-PCR assay

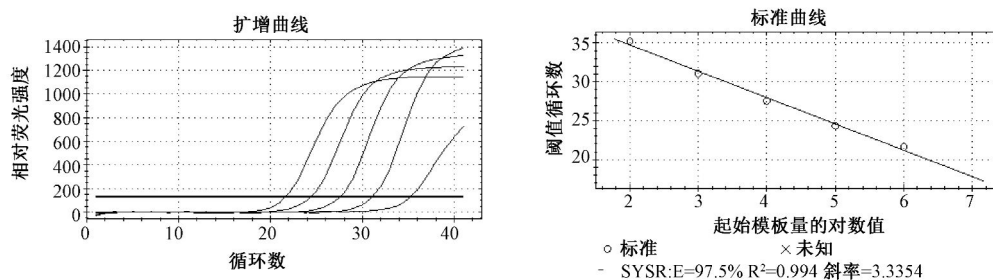


图 3 猕猴 *XDH/XO* real-time RT-PCR 反应扩增曲线及标准曲线

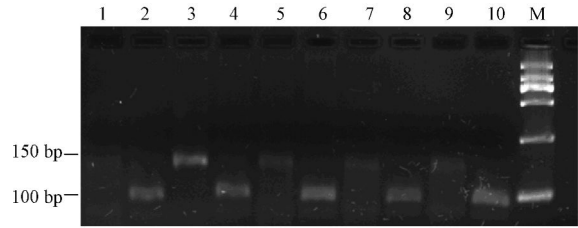
Fig. 3 The standard real-time RT-PCR curves of *XDH/XO* of the rhesus monkeys

见图 2。荧光定量 PCR 在稀释度 $5^0, 5^{-1}, 5^{-2}, 5^{-3}, 5^{-4}$ 均有阳性扩增曲线, 灵敏度检测下限为稀释度 5^{-4} , 即总 RNA 含量 0.4 ng 可检出目的基因的表达, 见图 3。荧光定量 PCR 灵敏度比半定量 RT-PCR 灵敏度高 39 倍。两种方法特异性可从电泳图及熔解曲线反应, 见图 4 及图 5。

2.4 比较不同组织 *XDH/XO* 基因的半定量与荧光定量 PCR 相对表达值

由表 1, 表 2 可知: 两种检测方法均能检出猕猴不同组织 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 荧光定量 PCR 较半定量 PCR 灵敏度高, 两种检测方法均能检测到健康猕猴新鲜肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 荧光定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 0.4 ng 总 RNA 的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 半定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 15.625 ng 总 RNA 的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 荧光定量 PCR 较半定量灵敏度高 39 倍。

两种方法检测结果均显示猕猴不同组织 *XDH/XO* 的 mRNA 表达在肝脏组织中表达水平最高, 对于表达量较低的其他组织, 荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测结果存在有一定差异。其中半定量 PCR 结果显示: 肝脏组织中 *XDH/XO* 的 mRNA 相对表达值最高, 是心肌的 1.3 倍, 是皮肤的 2.2 倍、睾丸的 2.1 倍、是肾脏的 1.57 倍。荧光定量 PCR 结果显示: 肝脏中 *XDH/XO* 的相对表达值也是最高, 分别是心肌的 133.8 倍, 是皮肤的 16.5 倍、睾丸 29.57 倍, 是肾脏的 343 倍。



注: 1: 心肌 *XDH/XO* 2: 心肌 *GAPDH* 3: 肝脏 *XDH/XO* 4: 肝脏 *GAPDH* 5: 肾脏 *XDH/XO* 6: 肾脏 *GAPDH* 7: 睾丸 *XDH/XO* 8: 睾丸 *GAPDH* 9 皮肤 *XDH/XO* 10 皮肤: *GAPDH* M: DL2000 marker

图 4 猕猴不同组织内的 *XDH/XO* 基因半定量 PCR 检测电泳图

Note. 1: *XDH/XO* in the myocardial tissue; 2: *GAPDH* in the myocardial tissue, 3: *XDH/XO* in the liver tissue; 4: *GAPDH* in the liver tissue; 5: *XDH/XO* in the kidney tissue; 6: *GAPDH* in the kidney tissue; 7: *XDH/XO* in the testis tissue; 8 *GAPDH* in the testis tissue s 9: *XDH/XO* in the skin tissue; 10: *GAPDH* in the skin tissue; M: DL2000 DNA marker.

Fig. 4 Results of electrophoresis of semi-quantitative RT- PCR of the *XDH/XO* mRNA in some tissues of the rhesus monkeys

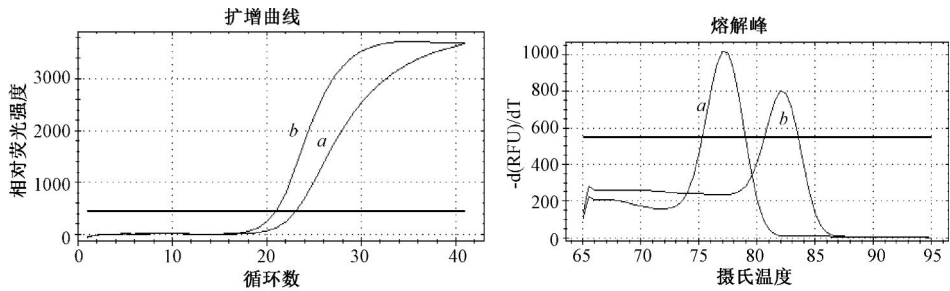


图 5 *XDH/XO* (a) 、*GAPDH* (b) 基因 real-time RT-PCR 反应溶解曲线及反应扩增曲线

Fig. 5 The melting curves and reaction curves of *XDH/XO* (a) and *GAPDH* (b) real-time RT-PCR amplification

表 1 半定量 RT-PCR 检测不同猕猴器官组织 *XDH/XO* mRNA 相对表达值

项目 Items		灰度值 Gray scale value(IOD)				
		心肌 Myocardium	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	睾丸 Testis	皮肤 Skin
<i>XDH/XO</i>	1	11461. 69	16658. 23	15320. 03	9877. 83	10219. 3
<i>XDH/XO</i>	2	11456. 89	16657. 3	15332. 6	9865. 3	10217. 3
<i>GAPDH</i>	1	16479. 56	18379. 09	26390. 19	23789. 65	23980. 3
<i>GAPDH</i>	2	16478. 3	18376. 3	26401. 19	23756. 65	23981. 6
相对表达值 Relative expression value						
<i>XDH/XO</i> / <i>GAPDH</i>	1	0. 7	0. 91	0. 58	0. 42	0. 43
<i>XDH/XO</i> / <i>GAPDH</i>	2	0. 69	0. 906	0. 58	0. 41	0. 426
平均值 Mean		0. 695	0. 91	0. 58	0. 42	0. 43
差异 Deviate		0. 7	0. 01	0	0. 01	0

表 2 实时定量 RT-PCR 检测猕猴 *XDH/XO* 基因 mRNA 在不同器官组织中的相对表达

猴号 Monkey ID		心肌 Myocardium	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	睾丸 Testis	皮肤 Skin
1204043		1. 00	130. 24	0. 24	2. 97	7. 50
205001		1. 00	137. 80	0. 54	6. 08	8. 7
平均值 Mean		1. 00	133. 81	0. 39	4. 525	8. 1
差异 Deviate		0	3. 99	0. 15 -	1. 56	0. 6

3 讨论

本实验从猕猴各新鲜组织中提取总 RNA, 然后进行逆转录获得 cDNA, 用获得的 cDNA 进行 RT-PCR, 产物用于 *XDH/XO* 基因测序和灵敏度检测, 建立了检测体内各组织 *XDH/XO* 基因 mRNA 表达的半定量 RT-PCR 检测方法; 荧光定量 PCR 通过梯度稀释 cDNA, 以优化的反应条件进行荧光定量 PCR, 获得其扩增效率, 目的基因及内参基因扩增效率分别是 97.5%, 111.5% 为, 在 80% 至 120 之间, R^2 分别是 0.997、0.996, R^2 接近 1, 说明结果可信度较高, 符合荧光定量 PCR 要求, 建立了检测体内各组织 *XDH/XO* 基因 mRNA 表达的实时荧光定量 PCR 检测方法。通过对相同的实验材料, 不同的检测方法对照分析荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴体内肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织中黄嘌呤氧化脱氢酶 (*XDH/XO*) 的 mRNA 的相对表达值, 为实验室检测提供方法学选择依据。

实验结果显示两种检测方法均检测到猕猴不同组织肝脏组织、上皮组织、睾丸组织、心肌组织、肾脏组织 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 其中, 肝脏组织中表达水平最高, 其他组织具有不同水平的微量表达, 与文献报道的相一致^[5], 对于表达量较低的其他组织, 荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测结果有一定差异, 其中半定量 PCR 结果显示: 肝脏组织中 *XDH/XO* 的 mRNA 相对表达值最高, 是心肌的 1.3 倍, 是皮肤的 2.2 倍、睾丸的 2.1 倍、是肾脏的 1.57 倍, 荧光定量 PCR 结果显示: 肝脏中 *XDH/XO* 的相对表达值也是最高, 分别是心肌的 133.8 倍, 是皮肤的 16.5 倍、睾丸 29.57 倍, 是肾脏的 343 倍。灵敏度试验结果提示荧光定量 PCR 较半定量 RT-PCR 检测的灵敏性高, 荧光定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 0.4 ng 总 RNA 中的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 半定量 PCR 灵敏度可检测到肝脏组织 15.625 ng 总 RNA 中的 *XDH/XO* 的 mRNA 表达, 荧光定量 PCR 较半定量灵敏度高 39 倍。半定量 RT-PCR 可作为研究基因转录水平的手段之一, 可用来检测基因表达及其变化状况大致趋势, 两种方法检测结果均显示猕猴不同组织 *XDH/XO* 的 mRNA 表达在肝脏组织中表达水平最高, 由于灵敏度相差较大, 对于表达量较低的其他组织, 荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测结果存在有一定差异。

目前已有许多改进的检测方法和技术用于定

量分析 mRNA 表达量, 荧光定量 PCR 较半定量 RT-PCR 检测的灵敏性高^[1], 但在研究不同实验目的下特异基因表达水平的差异时, 半定量 RT-PCR 因其方便、费用低、普通实验室容易做到而被经常使用^[2]。如果只想看看基因表达及其变化状况大致趋势, 半定量不失为一种快速的, 简便方法。现在一些相对高级别的刊物上也有半定量的结果, 如 Plant J、Proc Natl Acad Sci U S A、Carcinogenesis 等^[6-11], 当然半定量 RT-PCR 法只是一种粗略地估计基因表达的相对变化的方法, 它存在一些自身缺点, 诸如非同管扩增, 难以保证扩增效率一致, 对于表达较低的基因, 电泳易看不到目的条带, 误判为基因缺失, 因此它并不能准确测定不同样品间基因表达相差的倍数, 若要精确地分析基因表达的差异还需利用荧光实时定量 PCR 等技术^[1], 半定量 PCR 法不能完全替代荧光定量 PCR 法检测, 准确测定不同样品间基因表达相差的倍数, 荧光实时定量 PCR 优于半定量 PCR 法。

由于猕猴是较为珍贵的实验动物, 实验材料的获取较为困难, 本研究利用获得的 2 只猕猴不同器官组织, 虽然实验动物的数量有限, 但实验结果及实验数据也具有一定的参考性, 其结果具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, et al. Towards a systematic validation of references in real-time rt-PCR [J]. Plant Cell, 2008, 20(7): 1734-1735.
- [2] 高海波, 张栓林, 陈燕红. 半定量 RT-PCR 在基因表达方面的应用 [J]. 畜禽业, 2008, (02): 34-37.
- [3] 秦尤文. 黄嘌呤脱氢酶研究进展 [J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册), 2002, (04): 218-219, 22.
- [4] Wright RM, Vaitaitis GM, Wilson CM, et al. cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90(22): 10690-10694.
- [5] Sumi S, Wada Y. [Xanthine oxidase (xanthine dehydrogenase)] [J]. Nihon Rinsho Jap J Clin Med, 1996, 54(12): 3226-3229.
- [6] Crouser ED, Culver DA, Knox KS, et al. Gene expression profiling identifies MMP-12 and ADAMDEC1 as potential pathogenic mediators of pulmonary sarcoidosis [J]. Am J Resp Crit Care Med, 2009, 179(10): 929-938.
- [7] Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, et al. Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 alpha [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(7): 3843

-3848.

[8] Bijl J, van Oostveen JW, Kreike M, et al. Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue [J]. Blood, 1996, 87(5): 1737 - 1745.

[9] Picca A, Pesce V, Fracasso F, et al. A comparison among the tissue-specific effects of aging and calorie restriction on TFAM amount and TFAM-binding activity to mtDNA in rat [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(7): 2184 - 2191.

[10] Wang Y, Li Y, Xue H, et al. Reactive oxygen species-provoked mitochondria-dependent cell death during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds [J]. Plant J Cell Molec Biol, 2015, 81(3): 438 - 4352.

[11] Avery-Kiejda KA, Morten B, Wong-Brown MW, et al. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(3): 586 - 596.

[修回日期] 2015 - 09 - 30



改良简易双人操作家兔灌胃法

陈雷雷¹, 洪郭驹², 陈晓波²

(1. 广州中医药大学第一附属医院关节骨科, 广州 510000; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 515000)

1. 准备物品: 高脚椅、保护披巾、注射器、组配式灌胃管(直径 5 mm 儿童尿管、100 mL 去针头针管)、开口器、清水 50 mL。

2. 抓持: 助手取坐位于高脚椅上, 将保护披巾披放于双腿上。操作者抓持家兔颈提至助手胸前, 家兔背向助手, 四肢朝外, 并使家兔全身松弛, 下肢下垂。助手用双膝部内侧用力夹紧家兔双髁部, 双手同时固定头部及前肢。其中食指和拇指配合固定上提上肢, 拇指指腹按压家兔颈后, 其余三指托住其下颌部向下轻压其头部, 使头部持平, 并依据头部大小择指用力固定。控制家兔上身前倾, 目的是使本来呈 S 型曲线的口 - 咽 - 食道部尽可能变直, 以利于灌胃管的深入, 且能避免误插气管。

3. 灌胃: 操作者取半蹲位, 将开口器横于家兔口中, 后压开口器并逐渐使上缘向咽部旋转, 使兔舌压于开口器下, 露出咽部开口。左手固定开口器, 右手持预置的组配式灌胃管, 从外侧呈 45 度角向上斜插入从开口器中央孔入口内, 循循进入食道至胃内。进管长度约 15 ~ 20 cm。途中若遇阻碍, 可轻度左右旋转进入。插入完毕后, 将导尿管外端放入清水中, 随家兔呼吸若无气泡出现, 可进行灌药。灌药时, 单手将注射器接入灌胃管, 匀速打入。期间由助手观察家兔神志及肌力反应, 操作者观察家兔呼吸反应。