

RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因 转录水平方法的建立^{*}

王陈芸¹ 李哲丽¹ 叶尤松¹ 蔡发晶² 肖 涵² 谢季平³ 唐东红¹

(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)

(3. 昆明市科学技术情报研究所, 昆明 650600)

摘要:目的 建立实时荧光定量 (RT-qPCR) 检测 Wistar 大鼠黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (*XDH/XO*) 基因转录水平的方法, 以在转录水平上对 *XDH/XO* 基因进行定量检测。方法 提取 Wistar 大鼠肝脏组织中总 RNA, 经逆转录得到 cDNA, 以 10 倍为稀释因子稀释为 5 个浓度梯度, 使用设计的引物序列和内参基因进行 RT-qPCR 检测, 得到 *XDH/XO* 基因表达的标准曲线。进而检测 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。结果 RT-qPCR 法检测得到的 *XDH/XO* 基因标准曲线溶解峰单一, R^2 接近 1, 能检测出高尿酸动物模型中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。结论 RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的方法具有定量准确, 重复性好的特点, 可应用于高尿酸血症的发病机理、新药研究等方面。

关键词: 实时荧光定量 (RT-qPCR); 嘌呤脱氢酶/氧化酶 (*XDH/XO*); Wistar 大鼠; 肝脏; mRNA

中图分类号: Q95-336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0026-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.006

黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase, *XDH/XO*) 是一种嘌呤代谢的氧化过程中的限速酶, 在嘌呤代谢过程中催化嘌呤代谢的最后两步, 即催化次黄嘌呤和黄嘌呤形成尿酸。*XDH/XO* 基因的分布具有物种和组织特异性, 在人体中主要存在于肝脏、小肠和脑血管中, 其基因定位于 2 号染色体断臂上。灵长类体内尿酸氧化酶失活, 尿酸成为嘌呤代谢的终产物^[1-3]。当体内 *XDH/XO* 基因活性异常增高时, 则会生成大量尿酸造成尿酸的沉积, 导致血清尿酸浓度升高。女性血尿酸浓度 > 6.0 mg/dL, 男性血尿酸浓度 > 7.0 mg/dL, 即可诊断为高尿酸血症^[4]。高尿酸血症不仅是痛风的发病基础, 还可造成多种心血管疾病和代谢相关疾病, 且其发病率逐年上升, 因此备受关注。研究高尿酸血症就要研究其发病机理, 所以对 *XDH/XO* 基因的研究极其重要, 目前多有其组织分布, 活性等的研究^[5-6]。

实时荧光定量 PCR (real-time quantitative

polymerase chain reaction, real-time, RT-qPCR) 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, RT-qPCR 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 而且与普通 PCR 相比, 它具有特异性更强、重复性好、灵敏度高、定量准确、全封闭反应、自动化程度高等优点成为分子生物学研究中的重要工具, 目前已得到广泛应用^[7]。Wistar 大鼠是实验大鼠 (*Rattus norvegicus*, *rat*) 的一个常用品系, 其繁殖力强、生长发育快、性情温顺、对传染病的抵抗力较强, 是生物医学方面研究的常用实验动物, 是目前高尿酸血症动物模型研究中最常用的实验动物。为研究高尿酸血症模型 Wistar 大鼠肝脏中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化, 本文采集 Wistar 大鼠肝脏总 RNA, 逆转录为 DNA, 设计引物进行 RT-qPCR 扩增, 建立标准曲线, 以在转录水平上对 *XDH/XO* 基因进行定量检测。本方法的建立可用于研究高尿酸血症的发病机理以及药物筛选。

收稿日期: 2018-06-10

^{*} 基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (No. 2016-I2M-2-006)

作者简介: 王陈芸 (1990—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型. E-mail: 1034121466@qq.com

通信作者: 唐东红 (1966—), 女, 主任技师, 研究方向: 人类疾病动物模型. E-mail: tdh@imbcams.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 12 只,雌雄各半,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部提供,其生产许可证号:SCXK(滇)K2014-0002。使用许可证号:SYXK(滇)K2014-0007。实验程序符合中国医学科学院医学生物学研究所动物实验伦理委员会的要求,并遵守国际惯例,按照实验动物使用的 3R 原则给以关怀。

1.2 试剂及仪器

逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time), RT-qPCR 扩增试剂盒 (SYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)、RNA 提取液 (Tripure),均购自 Roche 公司;氧嗪酸钾 (oxonic acid potassium salt, OA),购自美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 97\%$;别嘌呤醇 (allopurinol, ALLO),购自南京都莱生物有限公司,纯度 $\geq 98\%$;羧甲基纤维素钠 (Carboxy methyl cellulose sodium, CMC),购自昆明诚悦科技公司;Biowest 琼脂糖;DNA 分子量标准 (DL 2000 bp),购自 TakaRa 生物工程有限公司。CFX 96 TM real-time system 荧光定量 PCR 仪,购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析仪,美国 BioRad 公司;Power Pac Basic 电泳仪,购自北京六一生物工程有限公司;ND-1000 紫外分光光度计,购自美国 Dano Drop 公司;高速冷冻离心机,购自 Sigma 公司;SCIENTZ-48 高通量组织研磨器,购于宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计及合成

引物设计以 NCBI 提供的大鼠 XDH/XO 核苷酸序列(017008.3)为参考,利用 Primer5.0 软件在 CDS 区域进行设计。管家基因 *GAPDH*:上游片段 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' 下游片段 5'-ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA-3',基因片段大小为 143 bp;目的基因 *XDH/XO*:上游片段 5'-ATGCGGACCCTGAAACAACA-3' 下游片段 5'-TGTTCTGAAGACGCTCATACTTGA-3',基因片段大小为 114 bp,均由宝生物 TaKaRa 生物有限公司合成。

1.4 RNA 提取

脱颈处死 Wistar 大鼠,酒精棉球消毒腹部,迅速取出肝脏组织 0.1 g 于装有 1 mL tripure 的 5 mL EP 管中,放入适合大小钢珠,放入高速组织研磨器中充分研磨;静置 5 min,液体转移至 1.5 mL EP 管中静置

5 min,加入 200 μL $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的氯仿,漩涡震荡充分,静置 15 min 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 000 $\times g$ 离心 25 min,吸取上清液 450 μL 于另一只 1.5 mL EP 管中,等体积加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,充分混匀静置 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,12 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清液,待管内壁稍干,加 1 mL $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,7 500 $\times g$ 离心 5 min,弃上清液,待管内壁稍干,加入 30 μL DEPC 水溶解沉淀,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,得总 RNA 样品。

1.5 RNA 完整性及纯度检测

移取总 RNA 样品 2 μL 于 1.5%琼脂糖凝胶孔中,在 90 V,400 mA 的条件下电泳 20 min,于凝胶成像分析系统下观察 28S、18S 和 5S RNA 条带,分析 RNA 的完整性;再取 1 μL 于 ND-1000 紫外分光光度计测定 RNA 浓度。

1.6 RNA 逆转录

测定浓度后每管按比例加 DEPC 水稀释至 1 000 ng/ μL ;总 RNA 按照逆转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明操作,每 10 μL 体系中依次加入 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 μL ,PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μL ,Oligo dT Primer 0.5 μL ,Random 6 mers 0.5 μL ,总 RNA 1 μL ,RNaseFree dH_2O 5.5 μL ,逆转录条件为:37 $^{\circ}\text{C}$,15 min,85 $^{\circ}\text{C}$,5 s; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,10 min,逆转录得到 cDNA。

1.7 Wistar 大鼠 *GAPDH* 基因及 *XDH/XO* 基因标准曲线的建立

以 Esidilution 为溶剂梯度稀释 mRNA,分别稀释为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 倍浓度,以原始 cDNA 及稀释后的 cDNA 为模板,各做 2 个平行样进行 RT-qPCR 检测:反应体系为 25 μL 。分别加 *XDH/XO* 基因及 *GAPDH* 基因上、下游引物各 1 μL (10p) 再分别加 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 12.5 μL 及灭菌去离子水 9.5 μL 、cDNA 1 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环,59 $^{\circ}\text{C}$ 到 94 $^{\circ}\text{C}$ 每 5s 采集一次荧光。反应完成后根据荧光信号的数据,使用 CFXManager 软件,制作标准曲线,得到基因扩增效率,斜率及 R^2 值,当 *XDH/XO* 基因及内参基因 *GAPDH* 基因扩增效率在 80%至 120%之间, R^2 值接近 1,说明结果可信度较高,符合荧光定量 PCR 要求。

1.8 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* mRNA 转录水平检测

6 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组,2 只/组,第一组腹腔注射 300 mg/kg 剂量 37.5 mg/mL 浓度的 OA,

第二组腹腔注射 300 mg/kg 剂量 OA 和 22 mg/kg 剂量的 ALLO,第三组腹腔注射 1%的 CMC-Na 作为对照,于给药 1.5 h 后脱颈处死动物,各组取肝脏 0.1 g,放入已加 1 mL tripure 的 5 mL EP 管中。提取 RNA,逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板,做两个平行样进行实时荧光定量检测,得到 *XDH/XO* mRNA 转录水平变化。

2 结果

2.1 RNA 完整性及纯度

Wistar 大鼠肝脏组织提取总 RNA 进行电泳,可观察到 28S、18S、5S 三条带,见图 1,说明所提取的总 RNA 无降解,可进一步用于后续实验。所提取的总 RNA 样品经 Nanodrop-1000 超微量核酸测定仪测定波长 260/280 nm 的吸光度 A 值, A_{260}/A_{280} 值均介于 1.8~2.0 之间时,说明纯度较高。

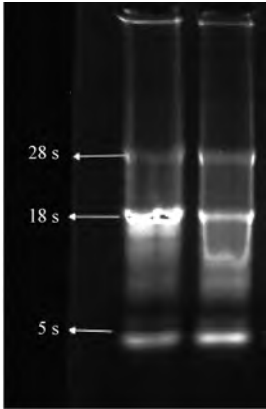


图 1 大鼠肝脏组织总 RNA 电泳图

Fig.1 The electrophoresis of total RNA from the liver tissue of rates

2.2 目的基因电泳结果

Wistar 大鼠肝脏组织 *XDH/XO* 基因 RT-qPCR 产物经 1.5%的琼脂糖电泳,结果扩增出的目的条带,与所设计的片段大小一致,且条带较亮,表明扩增效率高,可用于后续实验,见图 2。

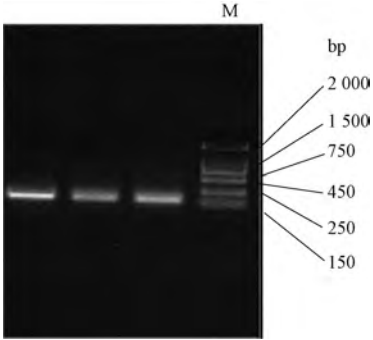


图 2 *XDH/XO* mRNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 The electrophoresis result of RT-PCR of *XDH/XO* mRNA from the liver tissue of rates

2.3 Wistar 大鼠肝脏 *GAPDH* 及 *XDH/XO* 基因标准曲线及溶解峰

由溶解峰图可知大鼠 *GAPDH* 及 *XDH/XO* 基因纯度较高,由标准曲线 ct 值得各稀释梯度 cDNA 的拷贝数,其中 R^2 均接近 1,说明以此标准曲线进行相对定量较准确,由于荧光强度均较强,故能保证荧光强度的增加与 PCR 的扩增相对同步,能准确检测 PCR 的表达,见图 3、4。

2.4 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化

以 *GAPDH* 为内源控制物,得到 *XDH/XO* 基因转录水平的变化,Wistar 大鼠腹腔注射 300 mg/kg

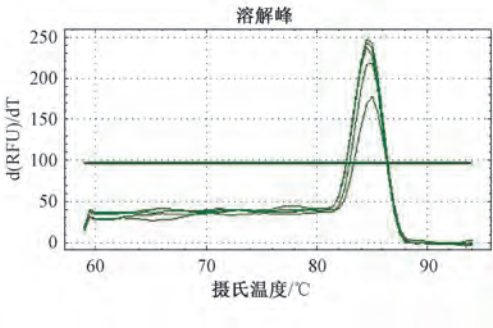
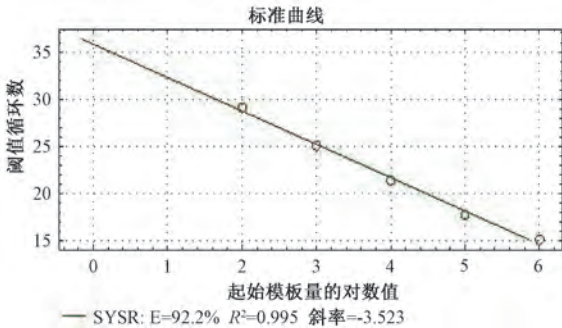


图 3 *GAPDH* 基因标准曲线及溶解峰

Fig. 3 The standard curves and melting curves of *GAPDH* gene

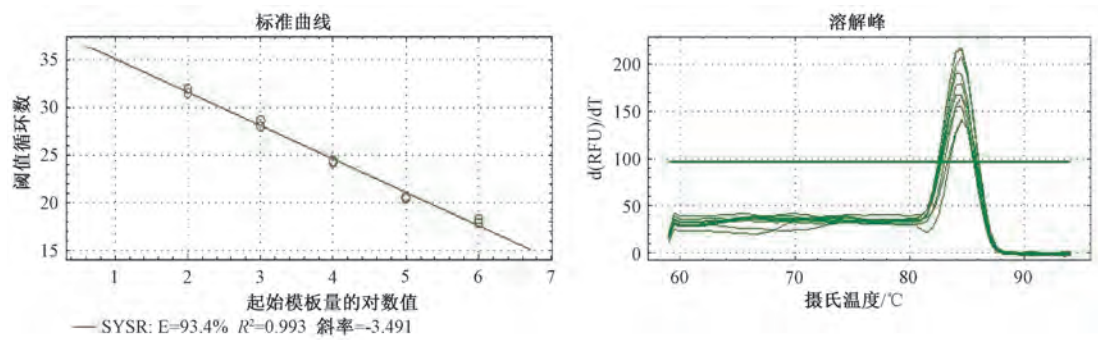


图 4 *XDH/XO* 基因标准曲线及溶解峰

Fig.4 The standard curves and melting curves of *XDH/XO* gene

剂量的 OA 组,肝脏组织 *XDH/XO* 基因转录水平较对照组上调;同时注射 300 mg/kg 剂量 OA 和 22 mg/kg剂量的 ALLO 组,肝脏组织 *XDH/XO* 基因转录水平较 300 mg/kg 剂量的 OA 组下调,见图 5。实验结果表明本文所建立方法能灵敏地检测出 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。

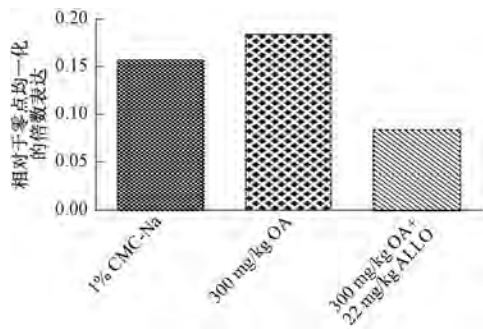


图 5 OA 致 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的变化

Fig.5 The change of stranscriptional-level of *XDH/XO* gene in Wistar rats after administration OA

3 讨论与结论

RT-qPCR 法是在 PCR 反应中可以结合于双链 DNA 的小沟处并释放出荧光信号。随着反应的进行,靶基因的载量和荧光信号强度相对应,二者成一定的线性关系。所以通过收集荧光信号的强度,就可以间接来定量实验中的双链 DNA 的拷贝数^[8-9],具有操作简单,造价便宜等优点,且荧光信号与 PCR 产物有相应的线性关系,所以可以实现实时监控、定量检测目的基因的目的,目前广泛用于基因方面研究,但也存在非特异性信号的干扰,所以选择合适的样品建立标准曲线对于检测基因的表达尤为重要,当标准曲线的扩增效率在 80%至 120%之间, R^2

值接近 1 时,结果可信度较高,符合 RT-qPCR 要求^[10]。本实验从健康 Wistar 大鼠新鲜肝脏组织中提取总 RNA,经逆转录获得 cDNA,梯度稀释后进行 RT-qPCR 扩增,建立 Wistar 大鼠 *GAPDH* 基因和 *XDH/XO* 基因的标准曲线,实验结果显示,*GAPDH* 基因和 *XDH/XO* 基因扩增效率分别为 92.2%和 93.4%,在 80%至 120%之间; R^2 值分别为 0.995 和 0.993,接近 1;且溶解峰曲线单一无杂峰,可有效地排除非特异性型号的干扰,说明标准曲线可信度较高,符合 RT-qPCR 要求,表明我们成功地建立了 RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的 RT-qPCR 检测方法。

自 Johnson 等成功地用 OA 诱导大鼠高尿酸血症模型以来,因其灵敏、简便、重复性好等特点成为了国内外高尿酸血症造模的主要方法^[11-13]。所以本实验选用 OA 造模,诱导 Wistar 大鼠高尿酸血症模型。目前对 OA 诱导动物高尿酸血症模型的研究大多是代谢组学方面的研究^[14-15],本实验利用所建立方法对 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化进行了研究,实验结果表明 OA 会影响 *XDH/XO* 基因的转录水平,模型组的转录水平升高,与预期相符,同时也验证了我们所建立的 RT-qPCR 法测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的方法是可行的,其可在转录水平上对高尿酸血症动物模型的 *XDH/XO* 基因进行分析。

本实验成功地建立了 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的 RT-qPCR 检测法,该方法特异性强,灵敏度高,具有很好的重复性,可用于 *XDH/XO* 基因的定性和定量检测,为高尿酸血症动物模型的研究和高尿酸血症发病机理以及新药开发提供了可靠的手段。

致谢

感谢中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部提供实验动物及动物实验饲养场地以及饲养动物。

参考文献

- [1] 王成华,邢新会.黄嘌呤氧化酶的研究进展及其发展前景[J]. 广西科学,2017,**24**(1):15-24.
- [2] 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,**9**(4):218-219.
- [3] 唐东红,叶尤松,李哲丽,等.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[J]. 中国比较医学杂志,2015,**25**(12):47-53.
- [4] 王凯,夏德萌,郝晓伟,等.氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠血清代谢组学研究[J]. 药学服务与研究,2015,**15**(6):416-421.
- [5] 张罕,吕喆,李冬妹,等.实时定量 PCR 分析小鼠树突状细胞 TLR4 mRNA 表达及地塞米松的调节[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,(3):221-224.
- [6] 李哲丽,叶尤松,彭波,等.猕猴不同组织器官中黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因的 mRNA 表达的半定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 实验动物科学,2015,**32**(3):33-37.
- [7] 张培,苗志敏,李长贵,等.慢性高尿酸血症大鼠模型建立方法的探讨[J]. 青岛大学医学院学报,2010,**46**(3):219-221.
- [8] 展鹏,刘涛,刘新泳.以黄嘌呤氧化酶为靶点的新型非嘌呤类抗痛风及高尿酸血症药物研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2012,**22**(5):403-415.
- [9] 杜江涛,宋晓明,周莎桑,等.小鼠腺病毒荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 实验动物科学,2017,**34**(3):49-54+65.
- [10] 张燕,马菱蔓.高脂高嘌呤饮食联合氧嗪酸钾诱导鸚鵡糖脂代谢紊乱及其并发症[J]. 中国比较医学杂志,2016,**26**(1):58-64.
- [11] Deodhar A. Update in rheumatology: evidence published in 2012 [J]. Ann Intern Med,2013,**158**(12):903-906.
- [12] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions [J]. Biotechnology,1993,**11**(9):1026-1030.
- [13] Johnson W J, Stavric B, Chartrand A. Uricase inhibition in the rat by s-triazines: an animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria [J]. Proc Soc Exp Biol Med,1969,**131**(1):8-12.
- [14] 冯育芳,邢进,王吉,等.应用实时荧光定量 PCR 方法检测实验用猫巴尔通体的感染[J]. 实验动物科学,2018,**35**(4):56-60.
- [15] 王丽平,朱以良,陈芳,等.痛风模型动物的选择[J]. 实验动物科学,2017,**34**(5):70-72.

Establishment of Real-time Fluorescence Quantitative PCR for Detecting Stranscriptional-level of *XDH/XO* Gene in Wistar Rats

WANG Chenyun¹, LI Zheli¹, YE Yousong¹, CAI Fajin², XIAO Han², XIE Jiping³, TANG Donghong¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science/Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

(2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, China)

(3. Kunming institute of science and technology intelligence, Kunming 650600, China)

Abstract: Objective To establish Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) method for detecting the transcription level of xanthine dehydrogenase/oxidase (*XDH/XO*) gene in Wistar rats, to quantitatively detect *XDH/XO* gene at the transcriptional level. **Method** Total RNA was extracted from the liver tissue of Wistar rats. The cDNA was obtained by reverse transcription, and diluted to 5 concentration gradients with 10 dilution factors. RT-qPCR was performed using the designed primer sequences and reference genes to obtain *XDH/XO* gene standard curve. Furthermore, changes in the transcription level of *XDH/XO* gene in the animal model of hyperuricemia in Wistar rats were examined. **Result** The *XDH/XO* gene standard curve obtained by RT-qPCR method has a single dissolution peak and R^2 is close to 1. It can detect the change of *XDH/XO* gene transcription level in animal model of high uric acid. **Conclusion** RT-qPCR is a quantitative and accurate method for detecting the *XDH/XO* gene transcription level in Wistar rats. It can be applied to the pathogenesis of hyperuricemia and new drug research.

Key words: Real-time fluorescence quantitative PCR; *XDH/XO*; Wistar rats; liver; mRNA