

Synechocystis sp. strain PCC 6803 定量 PCR 模板制备方法的改进

阳桂丹 张巨源 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 为实验菌株,设计改良制备定量 PCR 模板的方法;同时,对 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 总 RNA 的 Trizol 抽提法进行优化。结果显示,利用改良方法抽提得到的 RNA 结构更完整;同时,利用改良方法制备的模板可以用于后续定量 PCR 实验;其中,只有高表达量基因适用于半定量 PCR,低表达量基因则需要实时荧光定量 PCR 检测。

关键词 定量 PCR; *Synechocystis* sp. strain PCC 6803; RNA 抽提; qPCR 模板制备

中图分类号 Q 93-31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0044-08

生物体内基因表达的变化是调控生命活动的关键。对生物体内的基因在不同时期表达量变化的研究是探索和解决生命奥秘的重要内容。定量 PCR 技术是探讨基因转录水平重要、有效而且实用的手段。常用定量 PCR 技术包括半定量 PCR 和实时荧光定量 PCR。

半定量 PCR 技术 (semi quantitative reverse transcription and poly-merase chain reaction, Sq RT-PCR) 是 20 世纪 80 年代末出现的一种相对定量的技术^[1]。其操作简单且成本较低,是实验研究中最为基础和常用的技术,也常作为实时荧光定量 PCR 的“前检测”。利用相同量的 RNA 进行反转录后,以 cDNA 进行 PCR 扩增,将扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳跑胶分离后,根据条带亮度,判断“量”的差异。半定量 PCR 对实验条件要求不高,操作及试剂与普通 PCR 无异,它主要特点是选择一个用于比较的标准作为对照,或称之为 control。样本间用于比较的不是绝对值,而是相对值。为避免由于样本的模板质量和扩增效率的差异而导致最终结果的差异,在 PCR 反应体系中需要引入内对照系统^[2]。在一般情况下,大多选用与靶基因序列无关的管家基因作为内参基因^[1]。将靶基因和内参基因同时扩增(同管或异管),最后以内参基因扩增条带“密度”为标准,计算靶基因扩增条带“密度”。需要注意的是,

在判断最终结果之前,首先应根据各个不同样品内参基因扩增条带的“密度”是否一致,大致估计各样本抽提的效率、质量和扩增效率是否相近,同时,也能帮助确定该内参基因的选取是否合适。最后,通过观察各样本扩增产物的比值,粗略估计靶基因表达量的变化趋势。

实时荧光定量 PCR 技术 (real-time fluorescent quantitative PCR, RT-PCR/q-PCR) 是 20 世纪末推出的一种新的核酸定量技术^[3],与半定量 PCR 相比,虽然操作相对复杂,成本较高,但可以对基因表达水平进行常规和精确的定量。在 PCR 反应体系中加入荧光基团,特异性掺入 DNA 双链,发出荧光信号,这种荧光信号的产生与 PCR 产物的增加完全同步。因此,可利用荧光信号积累,实时监测 PCR 进程,即 PCR 产物变化。实时荧光定量 PCR 具有全封闭单管扩增、简便快速、重复性好、无扩增后处理步骤从而大大减少扩增产物污染的可能性等一系列优势^[4-6]。与半定量 PCR 相比,实时荧光定量 PCR 数据的处理和分析,上升到了一个新高度,不再是简单的测定条带“密度”。实时荧光定量 PCR 数据常用绝对定量和相对定量 2 种方法剖析。实时荧光定量 PCR 技术发明至今,由于其本身的优越性,已被广泛运用于医学诊断、海关检验检疫、国防军事、新型农业、基础研究等诸多领域,是当代科学

收稿日期: 2016-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY003)

阳桂丹, 硕士研究生. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: 498255964@qq.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授. 研究方向: 环境微生物学. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

研究最热门、最常用的技术之一^[7]。

对上述 2 种定量 PCR 技术而言,控制起始模板量至关重要。但在实际操作中,由于反转录过程对不同基因的 RNA 损耗率不同(例如管家基因 RNA 损耗率小于其他基因),实际上基因的量已经被改变,模板不够准确。尤其是检测的目标基因在生物体内不具备特别高且稳定的表达量时,RNA 的降解很可能会极大地影响定量 PCR 的结果。

集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 作为探究光合作用和其他基本生物学机制的模式菌株之一^[8],研究过程中常需要采用定量 PCR 技术。然而,由于 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 RNA 的不稳定性,制备定量 PCR 模板过程中,常发生不同程度的降解,极可能导致最终定量 PCR 结果可信度降低,给后续研究造成困扰。同时,反转录过程也常出现耗时长、反转录失败或反转录效率不一致等问题。但目前未见针对 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 总 RNA 抽提及制备定量 PCR 模板过程中发生的 RNA 降解、反转录失败等现象改进相关方法的报道。针对反转录过程中经常出现的问题,除了利用更为高效的 DNase I 和反转录试剂盒外,还可以从实验操作和实验方法入手,进行改良。基于此,本研究以 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 为实验菌株,设计改良制备定量 PCR 模板的方法,同时,对 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 总 RNA 的 Trizol 抽提法进行优化。

1 材料与方 法

Trizol 及 RNALater 购于麦克莱博公司, DNase I 购于 invitrogen 公司,反转录试剂盒及 SYBR Green II 购于 TaKaRa 公司,使用 ABI 公司实时荧光定量 PCR 仪,破细胞磁珠购于安特捷公司,所用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,其他各种试剂均为分析纯,购于国药集团。

1.1 实验菌株及培养条件

Synechocystis sp. strain PCC 6803(WT)为实验室保藏菌株。采用 MM 液体培养基,在 30 °C 恒温光照摇床、150 r/min、光强 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下培养至对数期。

1.2 Trizol 法抽提总 RNA

1) 菌体收集。将 PCC 6803 ($D_{580\text{ nm}} \approx 0.5$, 30 mL)于 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加入 250 μL RNALater,悬浮、混匀,放置 10

min 左右,转移至 2 mL 螺口管。

2) 破碎细胞。使用 FastPrep(MP 公司)破碎细胞,6 m/s \times 40 s,2 次。于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清(RNALater),再次离心 1 min,弃上清,将 RNALater 尽量去除干净。

3) Trizol 抽提 RNA。各管中加 1 mL Trizol(事先从冰箱中拿出,达到室温再使用),混匀,漩涡仪震荡 1 min,50 °C 水浴 5 min。加入 250 μL 氯仿,漩涡仪震荡 30 s,室温放置 5 min,于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,加等体积异丙醇,漩涡仪震荡 30 s,共 1 600 μL ,室温静置 10 min 后,于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清,加 500 μL 预冷的 75%乙醇,于 4 °C 下 7 400 r/min 离心 5 min。弃上清,室温干燥 30 min,加入 50 μL DEPC 水溶解 RNA。

1.3 定量 PCR 模板制备方法

将抽提得到的 RNA 用 DEPC 水调至 500 ng/ μL ,首先按以下体系除去基因组总 DNA:2 μL RNA(500 ng/ μL),1 μL DNase I Buffer,0.1 μL DNase I,7.9 μL DEPC 水,反应程序:37 °C 10 min,加 0.1 μL 0.5 mol/L EDTA 后,75 °C 10 min;随后,PCR 扩增 rnpB 检测是否有基因组 DNA 残留,PCR 体系为:1 μL 模板,5 μL 2 \times Mix,1 μL 引物,3 μL DEPC 水,反应程序:95 °C 2 min;94 °C 20 s;58 °C 5 s;72 °C 5 s;72 °C 5 s;25 °C 1 min,扩增 35 个循环;按反转录体系所示,将 RNA 反转录为 cDNA,作为后续 PCR 实验模板^[8-9]。反转录体系为:5 \times Prime Script Buffer 2 μL ,Prime Script RT Enzyme Mix I 0.5 μL ,Randon 6 mers(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL ,RNA(100 ng/ μL) 5.0 μL ,DEPC 水 2.0 μL ;反转录反应程序:37 °C 15 min,85 °C 5 s(使反转录酶失活)。

1.4 半定量 PCR

分别以反转录 cDNA 及未反转录 RNA 为模板,按 PCR 体系进行半定量 PCR,反应程序:88 °C 1 min;88 °C 10 s;55 °C 30 s;72 °C 15 s;25 °C 1 min,扩增 20 个循环,并用 1%琼脂糖凝胶电泳跑胶检测反转录前后残留 DNA 对结果的影响。

1.5 实时荧光定量 PCR

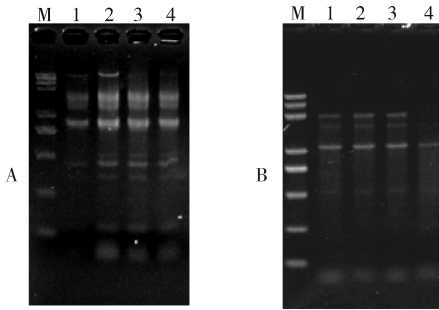
使用 ABI 公司实时荧光定量 PCR 仪及 TaKaRa 公司 SYBR Green II,进行实时荧光定量 PCR,反应体系:3 μL 模板(5 ng/ μL),2 μL 引物(2 $\mu\text{mol}/\text{L}$),5 μL SYBR,反应程序:50 °C 2 min;

95 °C 1 min; 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 25 s; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s, 扩增 40 个循环。分别以反转录前 RNA 及 cDNA 为模板, *rnpB* 为内参, 采用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)^[11-14] 分析。

2 结果与分析

2.1 传统方法制备定量 PCR 模板

1) RNA 用 DNase I 处理后降解情况。采用传统方法制备定量 PCR 模板, 需要先将 RNA 用 DNase I 处理, 直至确保将残留基因组 DNA 完全去除。但这一过程常会对 RNA 造成不同程度的降解, 对结果产生影响。图 1 为将 RNA 用 DNase I 处理前后结果。



M: Marker; 泳道 1~4 分别为 6803-WT-0、6803-WT-2、6803-WT-5、6803-WT-10; 上样量均为 5 μ L。M: Marker; Lanes 1 to 4 in A, B show 6803-WT-0, 6803-WT-2, 6803-WT-5 and 6803-WT-10; each lane is 5 μ L.

图 1 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNase I 处理前(A)后(B)结果

Fig.1 1% agarose gel electrophoresis analysis of DNase I processing before(A) and after(B)

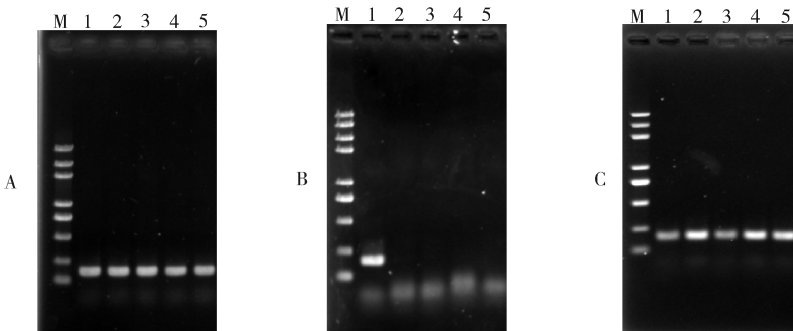
2) 反转录过程中常出现的问题。采用 DNase I 处理 RNA, 必须保证 DNA 完全被去除, 但实验过程中, 常发生 DNA 残留情况(图 2A), 同时, 用自带去除 DNA 试剂的反转录试剂盒(即不需要单独用 DNase I 处理), 容易出现反转录失败(图 2B), 或反转录效率不一致的情况(图 2C)。图 2 所示, 均扩增 *rnpB*。

以上结果显示, 用 DNase I 处理 RNA 后, RNA 浓度降低; 同时, 运用传统方法反转录 RNA, 常面临以下几方面挑战: (1) RNA 经过 DNase I 处理, 常发生不同程度的降解; (2) PCR 检查发现残留 DNA 去除不完全, 需要重新去除 DNA, 增加实验步骤, 耗时长, 且 RNA 放置时间变长, 增加降解风险; (3) DNase I 处理后的 RNA 反转录效率可能会降低, 甚至反转录失败。故本研究尝试采用不除 DNA、直接反转录抽提所得总 RNA 的方法制备模板, 避免因 DNase I 的作用导致实验结果可信度降低; 另外, 还可以缩短反转录的时间。要想实现这一改良方案, 前提是拥有高质量且 DNA 残留较低的 RNA。

而运用传统 Trizol 法抽提 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 总 RNA, 常出现基因组 DNA 残留过多、RNA 质量不高等问题。因此, 本研究首先尝试改进 RNA 抽提方法。

2.2 Trizol 法抽提 RNA

基于传统 Trizol 法抽提 RNA 的实验步骤, 在第 1 次氯仿作用后, 增加使用酚仿(1:1)与氯仿, 再次去除 DNA、蛋白及其他杂质; 同时, 经过 2 次 75% 的乙醇洗涤, 可大大减少 RNA 中盐离子等小分子残留, 更利于 RNA 的后续使用。利用



A. DNA 未去除完全; B. 未反转录成功; C. 反转录效率差别较大; 泳道 1~5: 6803 总 DNA、6803-WT-0、6803-WT-2、6803-WT-5、6803-WT-10; M: Marker, 上样量均为 5 μ L。A. DNA removed incompletely; B. Reverse transcription failing; C. The difference of reverse transcription efficiency. Lanes 1 to 5 show 6803 total DNA, 6803-WT-0, 6803-WT-2, 6803-WT-5 and 6803-WT-10, Marker(M), each lane is 5 μ L.

图 2 DNA 去除不完全及反转录失败(1% 琼脂糖凝胶电泳)

Fig.2 The failing of DNA removed completely or reverse transcription (1% agarose gel electrophoresis)

改进后的方法抽提得到的 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 的总 RNA, 结构更为完整, 实验可重复性更好。传统方法与改进后操作的结果对比如图 3 所示。

另外, 为便于后续 PCR 验证, 本研究选取常用氧胁迫试剂——甲基紫精(methyl violet, MV), 用 0、2.5、10 $\mu\text{mol/L}$ MV 分别处理 6803-WT 20 min 后, 按改进后的 Trizol 抽提法抽提 RNA, 结果见图 4。

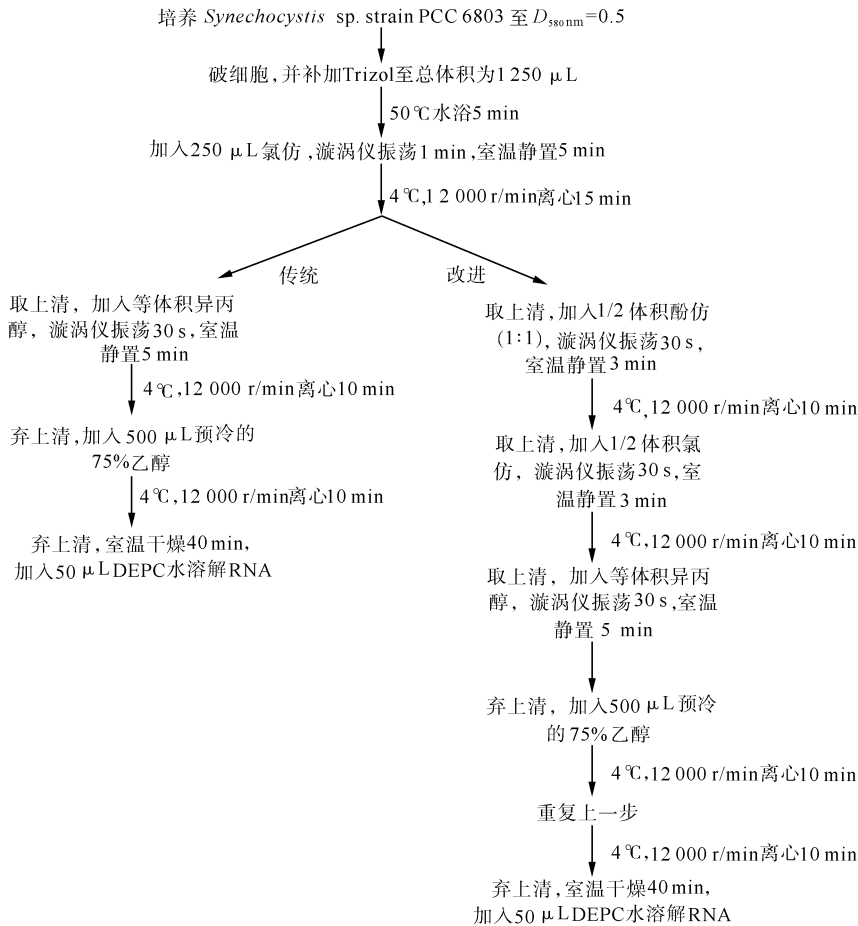
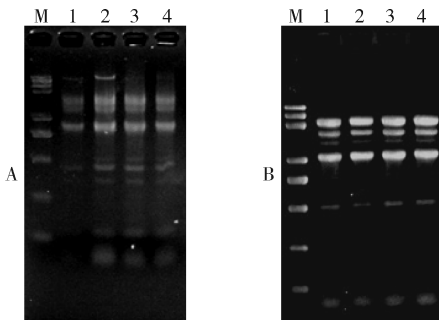


图 3 传统法与改良的 Trizol 法抽提 RNA 操作流程

Fig.3 The comparison between normal and modified Trizol method of RNA extraction



A.改进前; B.改进后。M: Marker; 泳道 1~4 分别为: 6803-WT-0、6803-WT-2、6803-WT-5、6803-WT-10, 上样量均为 5 μL 。A.Un-modified; B.Modified; M: Marker; Lanes 1 to 4 for 6803-WT-0, 6803-WT-2, 6803-WT-5 and 6803-WT-10; each lane is 5 μL 。

图 4 1% 琼脂糖凝胶电泳检测传统法与改良法抽提的 RNA
Fig.4 1% agarose gel electrophoresis analysis of total RNA isolated by the method of un-modified(A) and modified (B)

结果显示, 采用改进后方法抽提得到的 RNA, 没有 DNA 残留条带, 且 16S 及 23S 2 条剪切带更清晰, 没有明显拖带现象。

2.3 半定量 PCR 结果

运用改进后 Trizol 法抽提的 RNA, DNA 残留很低, 故将其直接反转录为 cDNA, 作为后续实验模板。PCR 模板制备改良前后的操作如图 5 所示。

按本文“1.4”半定量 PCR 实验方法, 检测 *rpmB*、*slr0610*、*slr0896*(图 6) 及 *rbcL*(图 7) 4 个基因表达变化。

半定量结果显示, 当 PCR 循环数较低时 (<25), 以 RNA 为模板 4 个基因扩增量都很小, 几乎看不见条带, 与 cDNA 为模板扩增结果相差很大。*rpmB* 表达量较为稳定, cDNA 定量较好。*slr0610* 和

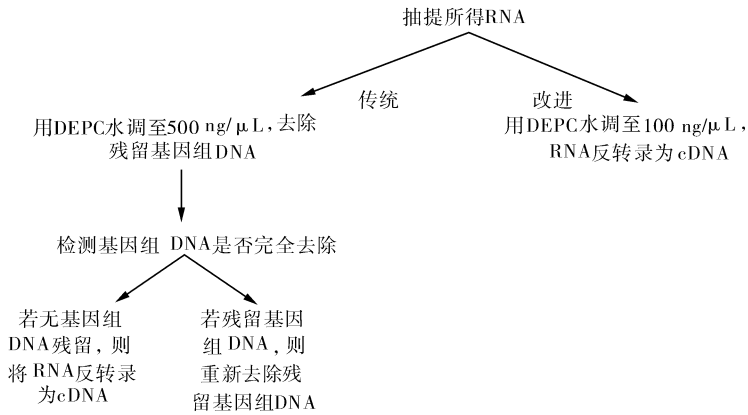
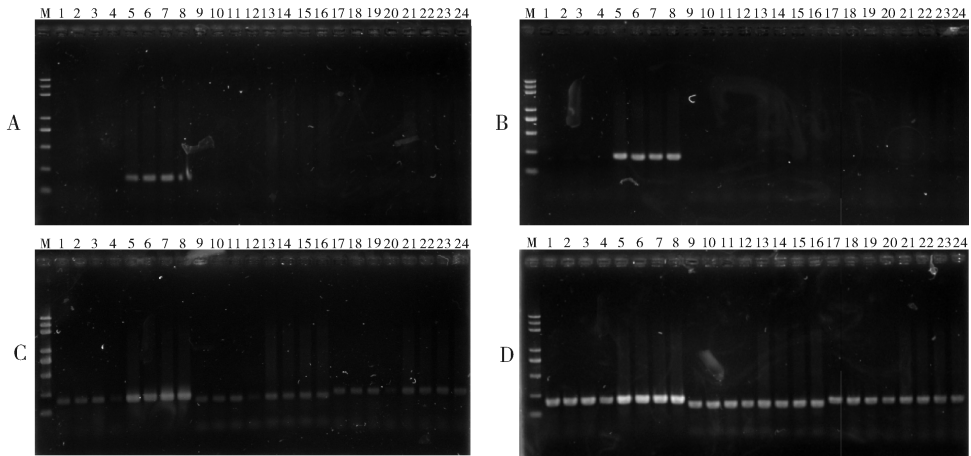


图 5 改良前后 PCR 模板制备操作流程

Fig.5 The operation of PCR template preparation by modified and normal method



rnpB、*slr0610* 及 *slr0896* 扩增 15 (A)、20(B)、25 (C) 及 30 个(D) 循环; 1~8: *rnpB*; 9~16: *slr0610*; 17~24: *slr0896*; 1~8, 9~16 和 17~24 上样顺序一致, 依次为 RNA-6803-WT-0、RNA-6803-WT-2、RNA-6803-WT-5、RNA-6803-WT-10、cDNA-6803-WT-0、cDNA-6803-WT-2、cDNA-6803-WT-5、cDNA-6803-WT-10; M: Marker, 上样量均为 5 μ L。 *rnpB*、*slr0610* 和 *slr0896* amplification cycles in 15 (A), 20(B), 25 (C) and 30(D). *rnpB* (lanes 1 to 8), *slr0610* (lanes 9 to 16) and *slr0896* (lanes 17 to 24), lanes 1 to 8, 9 to 16 and 17 to 24; RNA-6803-WT-0, RNA-6803-WT-2, RNA-6803-WT-5, RNA-6803-WT-10, cDNA-6803-WT-0, cDNA-6803-WT-2, cDNA-6803-WT-5 and cDNA-6803-WT-10; M: Marker; each lane is 5 μ L.

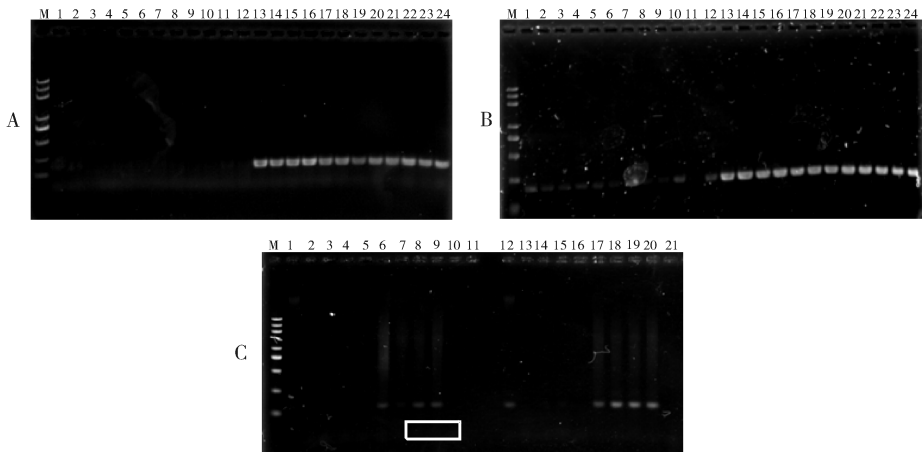
图 6 半定量 PCR 检测反转录前后 *rnpB*、*slr0610* 及 *slr0896* 表达(1% 琼脂糖凝胶电泳)Fig.6 The semi quantitative PCR analysis *rnpB*, *slr0610*, and *slr0896* with or without reverse transcription (1% agarose gel electrophoresis)

slr0896 在生物体内表达量较低, 以 cDNA 为模板 PCR, 不同样本间表达量没有明显差异, 推测受残留 DNA 影响较大。 *rbcL* 在生物体内表达量较高, 扩增 22 个循环即可看见表达量的明显变化(图 7C 方框标出), 而此时以 RNA 中残留 DNA 为模板扩增没有条带, 将 *rbcL* 扩增 27 个循环, 残留 DNA 扩出条带, cDNA 扩增条带没有明显差异, 推测是由于 PCR 为指数扩增, 随着循环数增加, 扩增产量大幅度提高, 弥补了样本间的差异。

因此, 采用改进的 Trizol 法抽提 RNA 后, 利用改良的方法制备得到的模板, 可以利用半定量 PCR 在扩增较低循环数(<25)的条件下, 直接检测体内表达量较高的基因变化。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

由于在半定量 PCR 实验中均未观察到 *slr0610* 和 *slr0896* 变化, 无法确定是基因表达量自身没有变化还是变化幅度小。按模板制备新方法和本文“1.5”实时荧光定量 PCR 实验方法, 检测 *rbcL* 及



rnpB 扩增 22(A) 及 27 个(B)循环; 1~4,5~8,9~12 依次为 RNA-6803-WT-0, RNA-6803-WT-2, RNA-6803-WT-5, RNA-6803-WT-10(3 次重复); 13~16, 17~20, 21~24 依次为 cDNA-6803-WT-0, cDNA-6803-WT-2, cDNA-6803-WT-5, cDNA-6803-WT-10(3 次重复); C. *rbcL* 扩增 22(泳道 2 至 9)及 27 个(泳道 12~20)循环表达量, 1 和 11 为 6803 总 DNA, 10 和 21 为负对照。2~9 和 12~20 上样顺序一致, 依次为 RNA-6803-WT-0, RNA-6803-WT-2, RNA-6803-WT-5, RNA-6803-WT-10, cDNA-6803-WT-0, cDNA-6803-WT-2, cDNA-6803-WT-5, cDNA-6803-WT-10; M: Marker, 上样量均为 5 μ L。方框显示 *rbcL* 变化情况。 *rnpB* amplification cycles in 22 (A) and 27(B). Lanes 1 to 4, 5 to 8 and 9 to 12: RNA-6803-WT-0, RNA-6803-WT-2, RNA-6803-WT-5, RNA-6803-WT-10 (three experiments), lanes 13 to 16, 17 to 20 and 21 to 24: cDNA-6803-WT-0, cDNA-6803-WT-2, cDNA-6803-WT-5 and cDNA-6803-WT-10 (three experiments); *rbcL* amplification cycles(c) in 22(lanes 2 to 9) and 27(lanes 12 to 20), lanes 1 and 11: 6803 total DNA, 10 and 21: negative control, 2 to 9 and 12 to 20: RNA-6803-WT-0, RNA-6803-WT-2, RNA-6803-WT-5, RNA-6803-WT-10, cDNA-6803-WT-0, cDNA-6803-WT-2, cDNA-6803-WT-5, cDNA-6803-WT-10; M: Marker; each lane is 5 μ L. The frame is change of *rbcL*.

图 7 半定量 PCR 检测反转录前后 *rnpB* 及 *rbcL* 表达量(1% 琼脂糖凝胶电泳)

Fig.7 The semi quantitative PCR analysis *rnpB* and *rbcL* with or without reverse transcription (1% agarose gel electrophoresis)

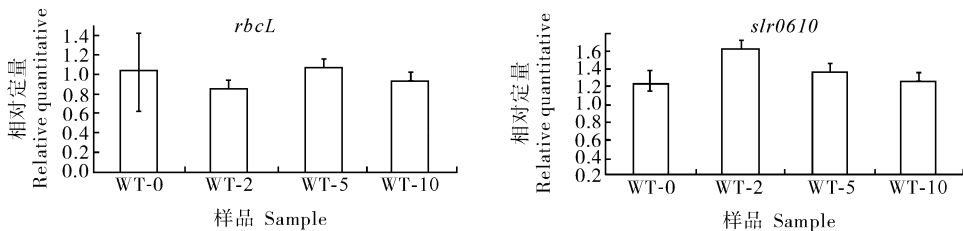


图 8 反转录后 *rbcL* 及 *slr0610* 实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig.8 The real-time fluorescent quantitative PCR analysis for *rbcL* and *slr0610* with reverse transcription

slr0610(图 8)基因表达变化。

另外,为了确定使用改良方法制备的模板是否能够用于实时荧光定量 PCR,分别以总 RNA 和 cDNA 为模板,检测了 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 中多个基因(包括表达量较高和较低的基因)表达情况,用 Ct 值反映两者之间的差异(图 9)。

实时荧光定量 PCR 检测到 *rnpB* 变化趋势与半定量结果相近,验证了半定量 PCR 的可信度,同时检测到 *slr0610* 表达量发生了变化,表明对于体内表达量较低的基因,利用改良的方法制备得到的模板,可以用实时荧光定量 PCR 检测该基因的变化。

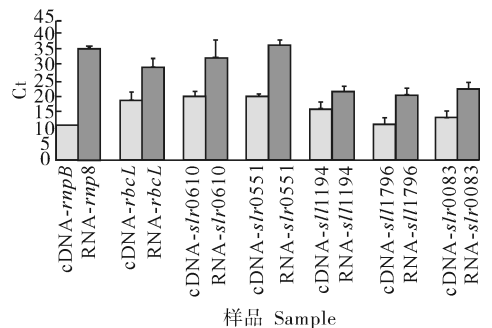


图 9 2 种模板扩增基因的 Ct 值

Fig.9 The Ct obtained by real-time fluorescent quantitative PCR with two templates respectively

2 种模板(直接抽提得到的 RNA 与反转录后 cDNA)扩增 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 同一基因, Ct 值均有差异, 不同基因的 Ct 差值从 7~20 不等。

体内该基因表达量越高, 差异越大, 而差异越大, 越适用于荧光定量 PCR 检测。

总体来说, 利用改进后的制备方法得到的模板, 可以用于后续的实时荧光定量 PCR 实验。

3 讨 论

定量 PCR 是基础科学研究中不可或缺的实验手段。虽然有关半定量 PCR 或实时荧光定量 PCR 技术应用比较成熟, 但对于很多菌种, 如蓝细菌, “公式化”的实验流程并不适用, 反而容易将实验引入误区。尽管有文献提到对定量 PCR 技术的改良包括改进操作和分析手段^[7]等, 对不同菌种的不同基因做定量检测也会摸索相应条件, 但都没有对制备模板时由于 DNase I 引起的 RNA 降解所造成的影响提出解决方案, 而这个问题却极有可能影响后续实验结果的真实性以及可重复性。

本研究中使用 *Synechocystis* sp. PCC 6803 作为材料, 利用常用的氧胁迫试剂甲基紫精(MV)作用于细菌, 以确保细菌体内发生基因表达改变, 并通过参考文献, 确定检测基因 *rbcl*、*slr0610* 和 *slr0896*^[15-16]; 同时, 还运用实时荧光定量 PCR 检测了正常培养条件下 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 体内其他基因。结果表明: 对于 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, 在既定的氧胁迫条件下, 能够直接用半定量 PCR 检测到高表达量基因的改变, 也能用实时荧光定量 PCR 检测到较低表达量基因的改变; 并且, 在正常条件下检测的其他 5 个基因, 反转录前后扩增的 Ct 值有较大差异。因此, 在 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 中利用改良的方法制备定量 PCR 模板是可行的; 同时, 可以肯定的是, 残留 DNA 引起的误差较小, 尤其是表达量较高的基因。

本研究通过改进 RNA 抽提条件, 减少残留 DNA 含量, 省去 DNase I 的使用, 直接反转录 RNA 为 cDNA, 作为定量 PCR 模板, 该方法减少从 RNA 抽提得到定量 PCR 结果的时间, 提高了实验成功率。利用 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 做验证实验时发现, 对于在生物体内表达量较高、变化较大的基因, 可以利用该方法制备模板后, 直接通过半

定量 PCR, 即可检测到基因变化情况; 而对于在生物体内表达量较低的基因, 利用该方法制备模板后, 需要通过实时荧光定量 PCR, 才能较好检测到基因的变化。但需要注意的是, 利用这一方法有一个先决条件, 即“抽提的 RNA 中 DNA 残留较少”: (1)RNA 电泳图没有 DNA 条带; (2)半定量 PCR 中可以参考低循环数(<25)RNA 扩增内参基因的表达情况, 若没有明显条带, 即可认为“DNA 残留较少”。

本研究虽然只在 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 中做了验证, 实验结果也可以作为其他菌株的参考。文中的实验方法以及主要结论, 可为改进定量 PCR 提供一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] 金凤媚, 薛俊, 郑艳红, 等. 半定量 RT-PCR 技术的研究及应用[J]. 天津农业科学, 2008, 14(1): 10-13.
- [2] 高海波, 张拴林, 陈燕红. 半定量 RT-PCR 在基因表达方面的应用[J]. 畜牧业, 2008(2): 34-37.
- [3] 杨怡姝, 孙晓娜, 王小利, 等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(7): 15-19.
- [4] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 598-600.
- [5] 赵文静, 徐洁, 包秋华, 等. 实时荧光定量 PCR 中内参基因的选择[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1825-1829.
- [6] VALASEK M A, REPA J J. The power of real-time PCR[J]. Advan Physiol Edu, 2005, 29(3): 151-159.
- [7] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 148-155.
- [8] ANDERSON S, MCINTOSH L. Light-active heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process[J]. Journal of bacteriology, 1991, 173(9): 2761-2767.
- [9] 王荣, 李红菊. 半定量 RT-PCR 法在检测基因表达水平中的应用[J]. 阜阳师范学院学报, 2007, 24(1): 49-52.
- [10] MATHIAS C, MARTIN E B, ANNE V C. A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels with in *Botrytis cinerea* multigenic families *in vitro* and in planta [J]. Curr Genet, 2003, 43(1): 303-309.
- [11] CHENG D, HE Q. PfsR is a key regulator of iron homeostasis in *Synechocystis* PCC 6803 [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101743.
- [12] PFAFFL M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9): 2002-2007.
- [13] WANG Y, ZHU W, LEVY D. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR [J]. Methods, 2006, 39(4): 356-362.

- [14] YOSHITAKA N. Oxidative stress inhibits the repair of photo-damage to the photosynthetic machinery [J]. *EMBO*, 2001, 20 (20): 5587-5594.
- [15] BANDITA P. Methyl viologen responsive proteome dynamics of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Proteomics*, 2014, 14(16): 1895-1904.

Improving methods for preparing quantitative PCR template from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803

YANG Guidan ZHANG Juyuan CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is one of the most important models for studying photosynthesis and ecology. Real-time fluorescent quantitative PCR and semi-quantitative PCR are extensively exploited to investigate the gene expression of this cyanobacterium. The quality of quantitative PCR template has a decisive influence on final data and the experimental results. When preparing *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 RNA for quantitative PCR, degradation occurs frequently, leading to unreliable results. Methods for preparing quantitative PCR template from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 were improved. Results showed that the RNA isolated with the improved method was more intact and can be directly reverse-transcribed to the cDNA template for quantitative PCR. Using the cDNA template obtained, detecting genes with high expression can be performed simply by semi-quantitative PCR, while detection of those genes with low expression requires real-time fluorescent quantitative PCR.

Keywords quantitative PCR; *Synechocystis* sp. strain PCC 6803; RNA extraction; PCR template preparation

(责任编辑:张志钰)