

技术与方法

荧光定量PCR精确检测人胚胎干细胞线粒体DNA 拷贝数方法的建立

孙 懿^{1,2,3} 曾思聪^{1,2,3} 胡 亮^{1,2,3} 卢光琇^{1,2,3} 林 戈^{1,2,3*}¹中南大学生殖与干细胞工程研究所,长沙 410078; ²人类干细胞国家工程研究中心,长沙 410078;³卫生部人类干细胞与生殖工程重点实验室,长沙 410078)

摘要 建立一种精确定量人胚胎干细胞线粒体DNA拷贝数的方法。构建包含线粒体DNA *ND1*和核单拷贝基因 β -*globin*基因序列的重组质粒作为标准品;收集无饲养层培养体系下人胚胎干细胞DNA样本,结合2个单独的Taqman探针实时荧光定量PCR对待测样本中线粒体*ND1*和核 β -*globin*基因分别进行定量,从而对人胚胎干细胞线粒体DNA的含量进行了精确定量。结果提示,人胚胎干细胞线粒体DNA的平均拷贝数/细胞为 $1\ 321\pm 228$ 。研究表明,该技术可对人胚胎干细胞线粒体DNA拷贝数进行准确的测定,为研究培养条件对人胚胎干细胞线粒体DNA拷贝数的影响及优化体外培养条件奠定了基础。

关键词 人胚胎干细胞;线粒体DNA;DNA拷贝数

线粒体是真核细胞内的重要细胞器,它不仅能维持细胞正常的生理功能,为有机体提供ATP,而且在细胞凋亡和死亡中也发挥着重要作用。人线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是全长为16 569 bp的双链闭合环状分子,可以独立于核DNA之外进行复制、转录和翻译,为多拷贝基因组^[1-2],不同的细胞mtDNA的拷贝数不同。线粒体能量代谢的改变与mtDNA拷贝数有着密切的联系^[3]。许多研究表明,mtDNA拷贝数对卵母细胞的受精和早期胚胎发育潜能有重要影响,mtDNA可作为评价卵母细胞质量的重要标志,其含量降低与卵母细胞受精失败密切相关,这也是早期胚胎体外发育阻滞的重要原因之一^[4-5]。临床上,mtDNA拷贝数异常变化已在越来越多线粒体遗传缺陷的患者中得到证实^[6],在大多数实体性肿瘤研究中也发现能量代谢的改变与mtDNA拷贝数和氧化磷酸化相关酶活性的降低有着密切的联系^[7]。Mandal等^[8]报道正常的线粒体功能与人胚胎干细胞增殖、早期多向分化潜能和分化时抑制致瘤型细胞的形成密切相关,抑制线粒体的功能会增强细胞糖酵解的依赖性,并伴随着*Nanog*、*Oct4*和*Sox2*表达的增加。Ramos-Mejia等^[9]在8株人胚胎干细胞系2个不同的培养条件下检测了干细胞

多能与线粒体功能(包括线粒体膜电位, mtDNA含量,调控线粒体复制、转录、发生相关的基因检测)的关系,发现其呈正相关性,首次证实人胚胎干细胞对外不同的无饲养层培养的适应性依赖于线粒体的反应性。因此,本研究旨在建立一种对人胚胎干细胞线粒体中mtDNA的拷贝数进行快捷、精确定量的方法,为研究培养条件对人胚胎干细胞mtDNA拷贝数的影响及优化体外培养条件奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 实验用11株人胚胎干细胞细胞系由中南大学生殖与干细胞工程研究所在人源性饲养层上建立^[10],核型正常。常规培养的P20~P50细胞用于实验。

1.1.2 试剂及仪器 DMEM、F12、替代血清、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、成纤维细

收稿日期:2012-03-16 接受日期:2012-04-05

国家自然科学基金(No.81101510)、湖南省自然科学基金青年基金(No.09JJ4009)、国家高技术研究发展计划(863)(No.2006AA02A102)、高等学校博士学科点专项科研基金新教师基金(No.200805331133)和中央高校基本科研业务费青年教师助推基金(No.201012200219)资助项目

*通讯作者。Tel: 0731-82355100-8428, E-mail: linggf36@yahoo.com.cn

胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、胎牛血清、RPMI1640、DPBS均为Gibco公司产品; Platinum[®] Taq DNA聚合酶为Invitrogen公司产品; DNA抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒为Qiagen公司产品; DNA纯化试剂盒、pMD18-T载体为TaKaRa公司产品; Faststat TaqMan[®] Probe Master(ROX)为Roche公司产品; 实时荧光定量PCR仪LightCycler[®] 480为Roche公司产品; Nanodrop分光光度计为Thermo公司产品。引物和探针合成与标记由Invitrogen公司完成。

1.2 人胚胎干细胞的培养

人类胚胎干细胞按照常规方法培养在丝裂霉素处理的小鼠成纤维细胞(P3)制备的饲养层上, 培养基采用DMEM/F12添加15%的替代血清、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%非必需氨基酸以及4 ng/mL bFGF。将制备好的鼠饲养层细胞取出, DPBS洗一次, 每孔添加2 mL新鲜人胚胎干细胞培养基。用机械切割的方法将人胚胎干细胞在体式镜下切割成小块, 用移液枪将人胚胎干细胞轻轻吹起, 按适当比例传到新制备的饲养层细胞上。传代后第一天不换液, 加1 mL新鲜培养基。以后每天换2.5 mL新鲜培养基, 每隔6 d传代一次。收集人类胚胎干细胞前, 细胞按适当比例传到Matrigel铺皿的培养板中, 培养基采用小鼠成纤维细胞(P3)制备的条件培养基并添加8 ng/mL bFGF, 第6天收集细胞抽提DNA。

1.3 DNA抽提

DNA抽提试剂盒提取全基因组DNA(包括mtDNA)。所得DNA溶于TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0), 并用Nanodrop分光光度计测定DNA浓度, 确定DNA的浓度在(50~300) ng/mL。-20 °C保存备用。

1.4 PCR引物及TaqMan探针

*MT-ND1*基因荧光定量PCR上游引物: 5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-3', 下游引物: 5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3', 目标片段长度为69 bp; *MT-ND1* TaqMan探针: 5'-CCA TCA CCC TCT ACA TCA CCG CCC-3', 探针用荧光基团FAM(6-carboxyfluorescein)和猝灭剂TAMRA(tetramethylrhodamine)分别标记在TaqMan探针的5'与3'端; *MT-ND1*标准品上游引物: 5'-CAG CCG CTA TTA AAG GTT CG-3', 下游引物: 5'-AGA GTG CGT CAT ATG TTG TTC-3', 标准品长度为1 040 bp^[11-13]。核 β -globin

基因荧光定量PCR上游引物: 5'-AAA GGT GCC CTT GAG GTT GTC-3', 下游引物: 5'-TGA AGG CTC ATG GCA AGA AA-3', 目标片段长度为77 bp^[14-15]; β -globin TaqMan探针: 5'-CCA GGC CAT CAC TAA AGG CAC CGA-3'^[14-15]; Primer 3.0软件设计合成 β -globin标准品上游引物: 5'-CAT CAA GCG TCC CAT AGA CTC-3', 下游引物: 5'-ACG TGG ATG AAG TTG GTG GT-3', 标准品长度为410 bp。

1.5 实时荧光定量PCR标准品的制备

*MT-ND1*和 β -globin基因标准品片段的PCR扩增采用Platinum[®] Taq DNA聚合酶。PCR反应体系为50 μ L, 各反应物的终浓度为: Platinum[®] Taq DNA聚合酶1 U, PCR缓冲液1 \times , MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP各200 μ mol/L, 引物0.2 μ mol/L。反应条件为: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 重复28个循环。含1 040 bp *MT-ND1*和410 bp β -globin的PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 分别克隆至pMD18-T载体(2 692 bp)中, 转化感受态细胞并克隆扩增后, PCR和DNA测序鉴定, 筛选出含有插入片段的质粒。质粒抽提试剂盒提取质粒, Nanodrop分光光度计测定DNA浓度, 计算质粒拷贝数(拷贝/ μ L)= $6.02 \times 10^{14} \times$ 质粒浓度(ng/ μ L)/(重组质粒碱基数 $\times 660$)。

1.6 实时荧光定量PCR

以无菌去离子水10倍比梯度稀释*MT-ND1*和 β -globin质粒, 制备浓度为 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μ L的荧光定量PCR标准曲线的模板。LightCycler[®] 480荧光定量PCR仪上同时进行不同梯度浓度的标准品与待测样品*MT-ND1*以及 β -globin基因定量PCR扩增, 绘制标准曲线, 20 μ L反应体系包括1 μ L DNA, 1 \times Faststat TaqMan[®] Probe Master(ROX), 300 nmol/L PCR上、下游引物, 100 nmol/L TaqMan探针。荧光PCR仪反应条件为95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C延伸1 min, 重复45个循环。实验结果自动以Ct值给出, 绘制*MT-ND1*和核 β -globin扩增标准曲线。参照标准曲线计算出人胚胎干细胞*MT-ND1*和核 β -globin的基因拷贝数。以*MT-ND1*和核单拷贝基因 β -globin分别作为线粒体和核DNA拷贝数的标记。每二倍体核基因组mtDNA的拷贝数= $2 \times ND1/\beta$ -globin^[4]。实验至少重复3次。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 11.0统计软件

进行分析。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

PCR鉴定阳性的质粒进行测序, 测序结果与预期序列完全相同, 如图1所示, 说明1 040 bp *MT-ND1*和410 bp β -*globin*基因的PCR片段已分别连接到PMD18-T载体上。

2.2 构建荧光定量PCR的标准曲线

提取经测序证实的用于制作标准曲线模板的

质粒, 制备 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μL 标准品。如图2所示: 进行荧光定量PCR得到系列曲线, 每个梯度(包括平行孔)均有特征性扩增曲线, 呈明显的S型; 根据 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μL 标准品测得的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(Ct)值绘制标准曲线。不同浓度标准品测得的模板与Ct值呈直线相关, *MT-ND1*标准曲线回归方程为 $y = -3.458x + 41.491$, 其中y为Ct值, x为质粒模板拷贝数以10为底的对数, 相关系数为0.999, 不同批次实验斜率的变异系数为1.69%。 β -*globin*基因标准曲线回归方程为 $y = -3.695x + 42.222$, 相关系数为

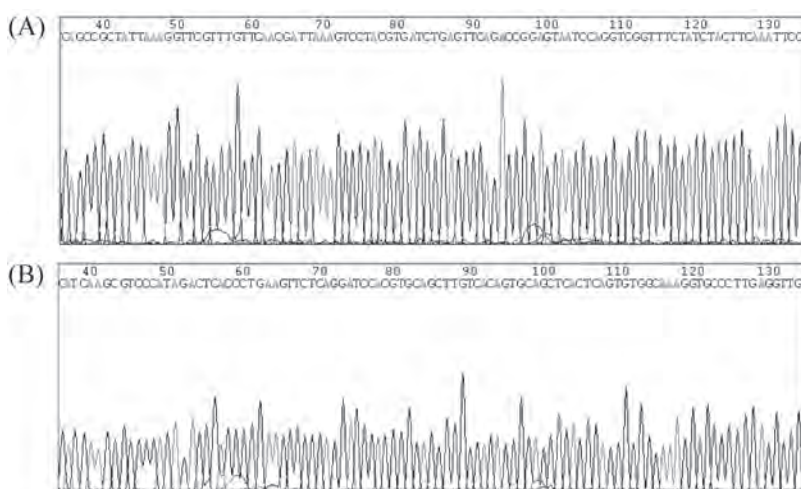


图1 *MT-ND1*和 β -*globin*重组质粒部分测序图谱

Fig.1 Partial sequencing results of recombinant plasmid of *MT-ND1* and β -*globin* genes

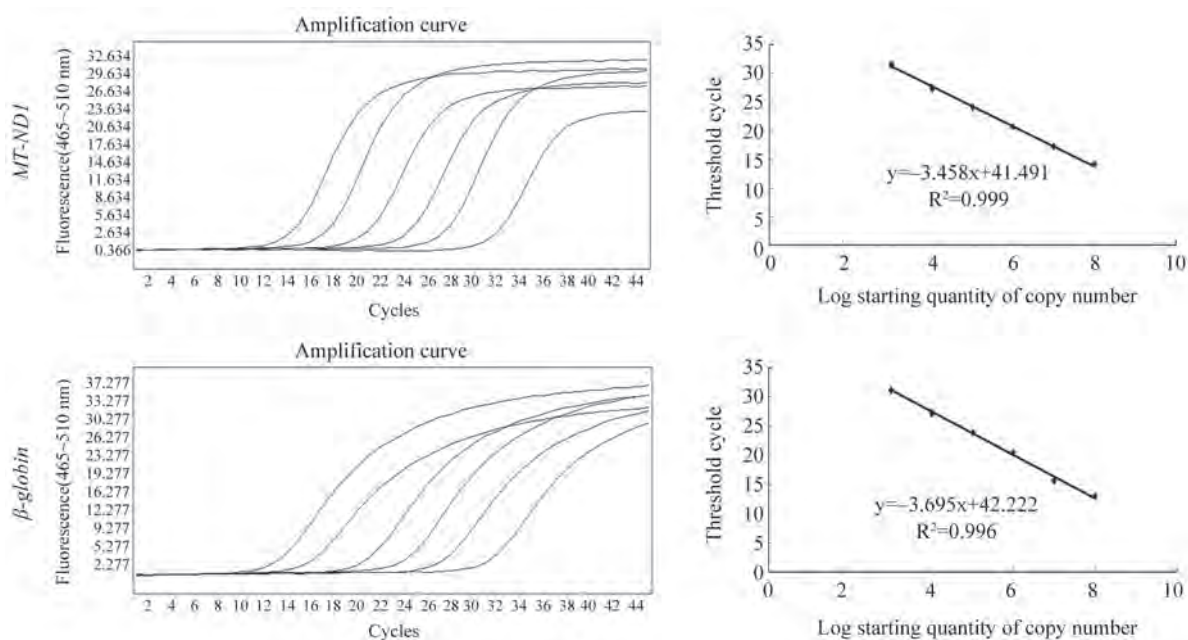


图2 *MT-ND1*和 β -*globin*荧光定量PCR的标准曲线

Fig.2 Standard curves of fluorescence quantitative PCR of *MT-ND1* and β -*globin*

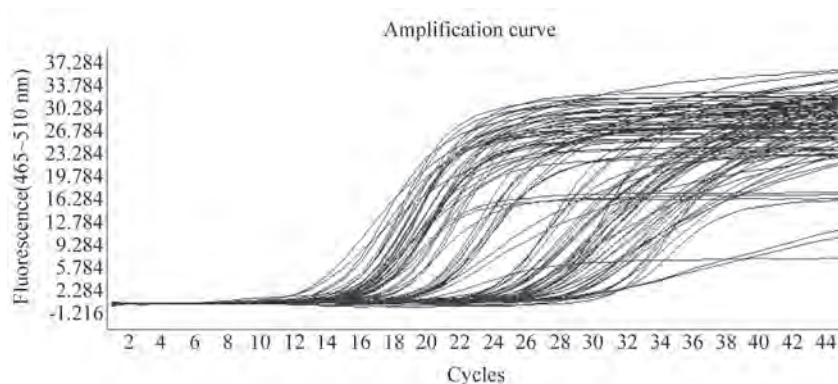


图3 *MT-ND1*和 β -globin荧光定量PCR的扩增曲线

Fig.3 Standard curves of fluorescence quantitative PCR of *MT-ND1* and β -globin

0.996, 不同批次实验斜率的变异系数为3.5%。

2.3 人胚胎干细胞中线粒体DNA的拷贝数

本实验中,我们构建了人*MT-ND1*以及核单拷贝基因 β -globin的质粒作为阳性标准品,采用Taqman荧光定量PCR方法,精确定量检测了人胚胎干细胞中的mtDNA(拷贝数/细胞)。图3所示为单次实验96个反应孔(包括标准品以及样品)的*MT-ND1*和 β -globin扩增曲线,呈明显的S型。结果显示,11株正常人胚胎干细胞中mtDNA平均拷贝数/细胞为 $1\ 321 \pm 228$,线粒体的含量比较丰富,与文献报道较一致^[16]。反应体系具有较高的检测敏感性,模板浓度在 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μ L反应时,反应体系具有良好的重复性和特异性,结果可靠。

3 讨论

本实验通过构建人mtDNA以及核单拷贝基因 β -globin的质粒作为标准品,采用Taqman荧光定量PCR方法进行绝对定量,精确定量检测了11株人胚胎干细胞中的mtDNA拷贝数(拷贝数/细胞)为 $1\ 321 \pm 228$,反应体系具有良好的重复性和特异性。目前,常用的检测人胚胎干细胞mtDNA拷贝数的方法有SYBR[®] Green荧光定量PCR^[17]、Taqman荧光定量PCR法^[9]、DNA印迹法Southern杂交检测^[18]等,但大都为定性或半定量研究,且Southern杂交检测所需DNA标本量大、实验周期长。Craven等^[13]研究了mtDNA拷贝数绝对定量,但是不能反映细胞中平均mtDNA的拷贝数(拷贝数/细胞)。Turksen^[17]在《人胚胎干细胞操作手册》中描述了用总DNA制备标准曲线,SYBR[®] Green荧光定量PCR检测人胚胎干细胞mtDNA绝对拷贝数的方法;Birket等^[16]也采取了与Turksen类似的方法。

与他们的的方法相比,本实验通过制备质粒标准品、Taqman探针荧光定量PCR的方法能更为精准地检测人胚胎干细胞mtDNA的拷贝数。因此,我们结合两个单独的实时荧光定量PCR更准确地定量了mtDNA拷贝数的改变,建立了一种精确定量mtDNA拷贝数(拷贝数/细胞)的方法,为进一步探讨mtDNA拷贝数的改变与人胚胎干细胞体外培养环境的监测和优化的关系提供了实验基础,也为未来的临床应用提供了应用前景。

参考文献 (References)

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290(5806): 457-65.
- Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, *et al.* The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011; 146(4): 645-58.
- Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; 37(3): 222-32.
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006; 85(3): 584-91.
- Zeng HT, Ren Z, Yeung WS, Shu YM, Xu YW, Zhuang GL, *et al.* Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in *in vitro* matured human oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1681-6.
- Liu CS, Cheng WL, Lee CF, Ma YS, Lin CY, Huang CC, *et al.* Alteration in the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Acta Neurol Scand* 2006; 113(5): 334-41.
- Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallini G, Haugen BR, Yeung SC, *et al.* Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer* 2005; 116(6): 920-4.
- Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic. *Stem Cells* 2011; 29(3): 486-95.
- Ramos-Mejia V, Bueno C, Roldan M, Sanchez L, Ligerio G, Me-

- nendez P, *et al.* The adaptation of human embryonic stem cells to different feeder-free culture conditions is accompanied by a mitochondrial response. *Stem Cells Dev* 2012; 21(7): 1145-55.
- 10 Lin G, Xie Y, Ouyang Q, Qian X, Xie P, Zhou X, *et al.* HLA matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5): 461-5.
- 11 He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, *et al.* Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14): e68.
- 12 Krishnan KJ, Bender A, Taylor RW, Turnbull DM. A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Anal Biochem* 2007; 370(1): 127-9.
- 13 Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, *et al.* Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 2010; 465(7294): 82-5.
- 14 Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C, Linnane AW, Nagley P. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: Lack of change of copy number with age. *Nucleic Acid Res* 2003; 31(11): e61.
- 15 Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(1): 8-14.
- 16 Birket MJ, Orr AL, Gerencser AA, Madden DT, Vitelli C, Swistowski A. A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt3): 348-58.
- 17 Turksen K. *Methods in molecular biology: Human embryonic stem cell protocols*. Ontario: Human Press, 2006, 347-74.
- 18 Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8): 2539-48.

A New Method for Precise Determination of Mitochondrial DNA Copies in Human Embryonic Stem Cells with Real-time PCR

Sun Yi^{1,2,3}, Zeng Sicong^{1,2,3}, Hu Liang^{1,2,3}, Lu Guangxiu^{1,2,3}, Lin Ge^{1,2,3*}

(¹*Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha 410078, China;*

²*National Research and Engineering Center of Human Stem Cells, Changsha 410078, China;*

³*Key Laboratory of Human Stem Cells and Reproductive Engineering, Ministry of Health, Changsha 410078, China)*

Abstract In this paper, we introduced a precise assay that determined mtDNA levels in human embryonic stem cells using Real-time PCR-based procedure. Human embryonic stem cells were cultured on feeder free system. Quantification was performed by reference to a single recombinant plasmid standard containing a copy of each target DNA sequence including mitochondrial *MT-NDI* gene and single copy *β-globin* gene of nuclear. Copy number of mtDNA was determined by amplifying a short region of the *MT-NDI* gene, and nuclear DNA content was determined by amplification of a segment of the single copy *β-globin* gene separately. Results showed that the copy number of mtDNA per diploid nuclear genome in human embryonic stem cells was $1\ 321 \pm 228$. This study shows that PCR-based assay enables accurate determination of mtDNA relative to nuclear DNA, which lays the foundation for the study of culture conditions effect on mitochondrial DNA copies number in human embryonic stem cells and for the optimized culture conditions *in vitro*.

Key words human embryonic stem cell; mitochondrial DNA; DNA copy number

Received: March 16, 2012 Accepted: April 5, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81101510), the Natural Science Foundation of Hunan Province (No.09JJ4009), the National High Technology Research and Development Program of China (No.2006AA02A102), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No.200805331133) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.201012200219)

*Corresponding author. Tel: 86-731-2355100-8428, E-mail: linggf36@yahoo.com.cn