

TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数

李 凯, 高宏雷, 高 立, 祁小乐, 高玉龙, 徐延伟, 王笑梅*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽传染病研究室 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘 要: 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶为内参基因, 建立一种快速检测毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法。通过对反应参数进行优化, 建立针对目的基因和内参基因的双标准曲线, 并对重组酵母基因组中外源基因和内参基因的拷贝数进行同时定量检测, 外源基因与内参基因起始模板拷贝数的比值即为外源基因在重组酵母菌株基因组中的拷贝数。结果表明, 2 条标准曲线在 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 具有良好的线性关系, 以及良好的敏感性和重复性。利用该方法对 60 株重组酵母菌株进行荧光定量 PCR 检测, 结果筛选到 38 株单拷贝插入菌株和 22 株多拷贝插入菌株。本研究所建立的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法方便、高效, 可用于重组毕赤酵母基因组中外源基因拷贝数的检测。

关键词: TaqMan 荧光定量 PCR; 毕赤酵母; 基因拷贝数; GAP 基因

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)05-0742-05

Development of a Real-time PCR for Determination of Foreign Gene Copy Number in Genome of *Pichia pastoris*

LI Kai, GAO Hong-lei, GAO Li, QI Xiao-le, GAO Yu-long, XU Yan-wei, WANG Xiao-mei*

(Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: A TaqMan real-time PCR assay for rapid determination of the foreign gene copy number in genome of recombinant *P. pastoris* strains was developed using *gp90* gene of reticuloendotheliosis virus as target gene and Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAP*) gene of *P. pastoris* as reference gene. The double standard curves of reference gene and *gp90* gene were mapped and the genomic DNA of *P. pastoris* transformants containing *gp90* gene was analyzed by real-time PCR, then the *gp90*/reference ratio in the samples was calibrated as the *gp90* gene copy numbers integrated into the genome of *P. pastoris*. Using this method, one copy of the foreign gene integrated into the yeast genome can be detected sensitively and had good reproducibility. Sixty recombinant *P. pastoris* transformants were detected by this real-time PCR method. It was found that 38 recombinant strains contained one copy of *gp90* gene and 22 contained multiple copies. This study suggests that the real-time quantitative PCR is a good tool for detecting of foreign gene copy number in *P. pastoris* transformants and it will be useful for screening of *P. pastoris* transformants with high level productivity.

Key words: TaqMan real-time PCR; *Pichia pastoris*; gene copy number; GAP gene

毕赤酵母表达系统目前已成为应用最广泛的外源蛋白表达系统之一^[1-3]。外源基因能够在酵母基因组的同一位点进行多拷贝插入,而基因拷贝数通常是影响蛋白表达量高低的重要因素^[3-4],可以通过优化外源基因插入拷贝数,筛选得到高效表达的重组酵母菌株^[3-4]。在研究不同启动子对表达量的影响时,也需要对重组酵母菌株中插入的外源基因拷贝数进行精确定量分析。Southern blot 法是鉴定外源基因插入拷贝数的传统方法^[5],但该方法操作复杂,费时费力,给操作带来了很大不便。实时荧光定量 PCR 法具有快速、灵敏、特异性强、高通量等优点,其在克服 Southern blot 定量缺点的同时,已被广泛应用于 DNA 和 RNA 的定量检测^[6]。

本研究以 GAP 为内参基因,采用双标准曲线法,建立了一种快速检测毕赤酵母基因组中外源基因插入拷贝数的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,并利用该方法对 60 株整合有禽网状内皮组织增生病毒(REV)gp90 基因的重组毕赤酵母菌株进行了外源基因拷贝数的检测,结果表明,本研究建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法高效、稳定,可以用于重组酵母菌株中外源基因拷贝数的检测,从而为高表达酵母菌株的筛选提供了有效的技术手段。

表 1 引物与探针

Table 1 Primers and probes used in this study

引物和探针 Primers and probes	序列 Sequences 5'-3'
gp90U	5'-AGCGAATTCATGGACTGTCTCACC-3'
gp90L	5'-AGAGCGGCCGCTTACTTATGACGCCCAGC-3'
gp90RTU	5'-AAGAATCTGTGCGTCAAAG-3'
gp90RTL	5'-TAAGGACCTGGTGAGTAGC-3'
gp90Probe	5'-FAM-CCCCGACCAAGAGGAGTAGAT-BHQ-1-3'
GAPRTU	5'-TCATCACTGCTCCATCCAA-3'
GAPRTL	5'-GAAGCCGTTCTACCACCTC-3'
GAPProbe	5'-FAM-CCACCGTCCACTCCATGACCGCCAC-BHQ-1-3'

1.4 阳性质粒标准品的制备

以实验室构建的 pMD18T-gp90 质粒为模板,利用引物 gp90RTU 和 gp90RTL 进行常规 PCR,扩增得到 146 bp 的目的基因 gp90 片段;以 GS115 菌株基因组为模板,利用引物 GAPRTU 和 GAPRTL 扩增得到 249 bp 的内参基因 GAP 片段。将 gp90 和 GAP 片段分别克隆至 pMD18-T 载体,测序验证后作为荧光定量 PCR 的质粒标准品。用紫外分光光度计测其 OD_{260 nm},换算成摩尔浓度后,稀释至 10⁸ 拷贝·μL⁻¹, -20℃ 保存,用前稀释作为阳性质

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli TOP10F' 由本实验室保存, *P. pastoris* GS115 宿主菌、pPIC9k 载体购自 Invitrogen 公司, pMD18T-gp90 质粒由本实验室保存,其上克隆有 REV (HLJR0901 毒株) gp90 基因。

1.2 仪器与试剂

LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司,紫外分光光度计购自 GE 公司;质粒提取试剂盒、酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司;Hot Start ExTaq HS 酶, pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司, Geneticin (G418) 购自 Invitrogen 公司。

1.3 引物和探针的设计与合成

根据 GenBank 中 REV 基因组序列及毕赤酵母 GAP 基因序列 (U62648) 设计 2 对分别针对目的基因 gp90 及内参基因 GAP 的上下游引物和特异性 TaqMan 探针,如表 1 所示。目的基因 gp90 扩增片段长度为 146 bp,内参基因 GAP 扩增长度为 249 bp,引物和探针均由 Invitrogen 公司合成。

粒标准品。

1.5 Real-time PCR 反应条件的优化

以阳性质粒标准品为模板,在不同退火温度下进行常规 PCR 反应,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析,确定最佳的引物退火温度。然后在 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪上应用矩阵法对荧光定量 PCR 的引物、探针和 Mg²⁺ 浓度进行优化,以得到最佳的反应体系和反应参数。

1.6 标准曲线的建立

将目的基因及内参基因质粒标准品分别 10 倍

梯度稀释至浓度范围为 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。以稀释的质粒标准品为模板,每个稀释度设 3 个重复,利用 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪,在同一次试验、同一反应条件下对上述 2 种基因进行同时检测。反应完毕后,利用软件分析得到目的基因和内参基因的标准曲线。

1.7 敏感性试验

将目的基因及内参基因的阳性质粒标准品分别 10 倍梯度稀释至最低浓度为每微升几个拷贝,每个梯度做 3 个重复,进行荧光定量 PCR 反应,确定检测的灵敏度。

1.8 重复性试验

目的基因和内参基因分别取 5 个浓度滴度的质粒标准品进行批间和批内重复试验,并进行统计学分析。批内重复:将上述 5 个质粒标准品分别设立 3 个重复,在同一反应条件下同时检测,计算其批内变异系数;批间重复:以上述 5 个质粒标准品为模板,在同一反应条件下进行 3 次独立的荧光定量 PCR 检测,计算其批间变异系数。

1.9 重组酵母菌株的构建及外源基因拷贝数的检测

以实验室构建的 pMD18T-gp90 质粒为模板, gp90U 和 gp90L(表 1)为上下游引物,经 PCR 扩增得到 REV gp90 基因。目的片段经回收、酶切后插入 pPIC9k 载体的 *EcoR* I / *Not* I 位点之间。阳性重组质粒 pPIC9k/gp90 经 *Sac* I 线性化后电转化 GS115 感受态细胞,涂布于 G418 抗性 YPDS 平板上,30 ℃ 培养 5~7 d 待菌落长出。挑取若干毕赤酵母菌落提取基因组,用 AOX1 通用引物进行 PCR 鉴定,确定阳性重组菌株。选取 60 株阳性重组菌株进行荧光定量 PCR 检测,确定 gp90 基因在酵母基因组中的插入拷贝数。每个菌株进行 3 次独立的基因组提取和荧光定量 PCR 检测,每次每个样品分别进行 3 个重复,在同一次试验、相同反应条件下对初始模板中目的基因和内参基因的拷贝数进行检测。目的基因 gp90 与内参基因 GAP 起始模板拷贝数(表征酵母基因组拷贝数)的比值即为 gp90 基因在重组酵母菌株基因组中的插入拷贝数。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 反应条件的优化

经过优化,使得 gp90 基因和 GAP 基因荧光定量 PCR 的各反应参数均达到相同,反应体系:10 × ExTaq Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 2

μL , MgCl₂ (25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 3 μL , gp90RTU 和 gp90RTL(或 GAPRTU 和 GAPRTL)各 1 μL (10 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$), gp90Probe (或 GAPprobe) (10 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Ex Taq HS 1 U,模板 1 μL ,用 ddH₂O 补足 25 μL 。反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,40 个循环,延伸时检测荧光信号。

2.2 标准曲线的建立

通过对荧光定量 PCR 反应条件进行优化,获得了检测 gp90 基因和 GAP 基因的的动力学曲线和标准曲线(图 1),标准品浓度从 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 具有良好的线性关系,Error 值均小于 0.2(“Error”值为用于拟合线性回归时的单个数据点的平均方差,它代表定量结果的准确性,可以接受的误差值应小于 0.2),扩增效率分别为 1.998 和 1.996。图 1B 为数据分析后仪器自动生成的标准曲线,y 轴为循环阈值,x 轴为质粒标准品拷贝数的对数值。gp90 基因标准曲线的直线方程为 $y = -3.202 \lg x + 38.51$,GAP 基因为 $y = -3.16 \lg x + 40$ 。

2.3 敏感性试验

将目的基因和内参基因标准质粒分别作 10 倍梯度稀释,进行荧光定量 PCR 检测,所能检出的模板最低浓度均为 1.0×10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 1A),表明所建立的荧光定量 PCR 具有良好的敏感性。

2.4 重复性试验

目的基因 gp90 和内参基因 GAP 分别取 5 个浓度滴度的质粒标准品进行批间和批内重复试验,并进行统计学分析。检测结果如表 2 所示,批间和批内变异系数均小于 2%,表明该方法重复性良好。

2.5 重组酵母菌株中 gp90 基因拷贝数的检测

选取 60 株经 PCR 鉴定正确的重组酵母菌株,提取酵母基因组,利用所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法检测酵母菌株基因组中 gp90 基因和 GAP 基因的拷贝数,gp90 基因与 GAP 基因起始模板拷贝数的比值,即为 gp90 基因在重组酵母菌株基因组中的插入拷贝数。检测结果表明,60 株重组酵母菌株中共有 38 株单拷贝插入菌株和 22 株多拷贝插入菌株,且所有菌株中 gp90 基因和 GAP 基因 Ct 值的批间和批内变异系数均小于 2%,表明其重复性良好,图 2 为 2 株含有 2 个拷贝和 5 个拷贝 gp90 基因的重组酵母菌株的扩增曲线,表 3 列出了部分代表菌株 gp90 基因和 GAP 基因的详细检测结果。

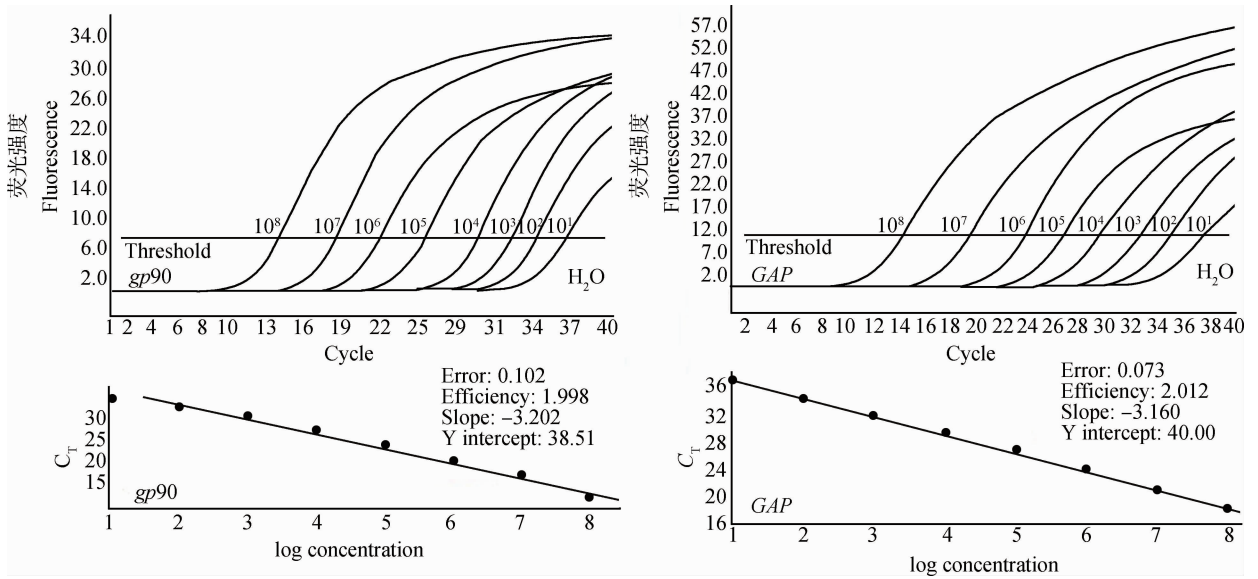


图 1 荧光定量 PCR 动力学曲线 (A) 和标准曲线 (B)
 Fig. 1 Dynamic curve (A) and Standard curve (B) of fluorescent quantitative PCR

表 2 荧光定量 PCR 的重复性试验

Table 2 The reproducibility of the fluorescent quantitative PCR

	<i>gp90</i> 基因 <i>gp90</i> gene		<i>GAP</i> 基因 <i>GAP</i> gene		标准品浓度/(拷贝 · μL ⁻¹) Concentration of the standard (copies · μL ⁻¹)
	$\bar{x}_{Ct} \pm s$	变异系数/% CV%	$\bar{x}_{Ct} \pm s$	变异系数/% CV%	
批内重复 Intra-assay reproducibility	24.14 ± 0.15	0.61	24.21 ± 0.19	0.78	1.0 × 10 ⁵
	27.24 ± 0.09	0.33	27.32 ± 0.11	0.40	1.0 × 10 ⁴
	30.58 ± 0.18	0.58	31.08 ± 0.22	0.71	1.0 × 10 ³
	34.42 ± 0.21	0.61	34.95 ± 0.16	0.46	1.0 × 10 ²
	36.97 ± 0.19	0.51	37.18 ± 0.25	0.67	1.0 × 10
批间重复 Inter-assay reproducibility	24.38 ± 0.23	0.94	24.97 ± 0.13	0.52	1.0 × 10 ⁵
	27.15 ± 0.21	0.77	27.46 ± 0.17	0.62	1.0 × 10 ⁴
	30.94 ± 0.31	0.37	31.65 ± 0.16	0.51	1.0 × 10 ³
	34.51 ± 0.13	0.38	35.07 ± 0.25	0.71	1.0 × 10 ²
	36.84 ± 0.26	0.71	36.71 ± 0.15	0.41	1.0 × 10

表 3 代表菌株荧光定量 PCR 检测结果

Table 3 Representative examples of Real-time PCR analysis for recombinant strains

菌株 Strain	<i>gp90</i> 基因 <i>gp90</i> gene		<i>GAP</i> 基因 <i>GAP</i> gene		<i>gp90</i> 插入拷贝数 <i>gp90</i> copy numbers integrated into yeast genome
	$\bar{x}_{Ct} \pm s$	拷贝数 Copy number	$\bar{x}_{Ct} \pm s$	拷贝数 Copy number	
1	17.29 ± 0.11	3.00 × 10 ⁶	17.34 ± 0.13	2.89 × 10 ⁶	1.038
2	16.99 ± 0.09	3.71 × 10 ⁶	18.03 ± 0.16	1.76 × 10 ⁶	2.106
3	16.45 ± 0.10	5.50 × 10 ⁶	17.98 ± 0.24	1.81 × 10 ⁶	3.036
4	15.68 ± 0.12	9.57 × 10 ⁶	17.61 ± 0.17	2.38 × 10 ⁶	4.021
5	15.71 ± 0.21	9.27 × 10 ⁶	17.95 ± 0.16	1.85 × 10 ⁶	5.011
6	15.42 ± 0.06	1.15 × 10 ⁷	17.92 ± 0.22	1.90 × 10 ⁶	6.061
7	15.25 ± 0.13	1.30 × 10 ⁷	17.95 ± 0.25	1.85 × 10 ⁶	7.037
8	14.81 ± 0.19	1.78 × 10 ⁷	17.71 ± 0.10	2.21 × 10 ⁶	8.071

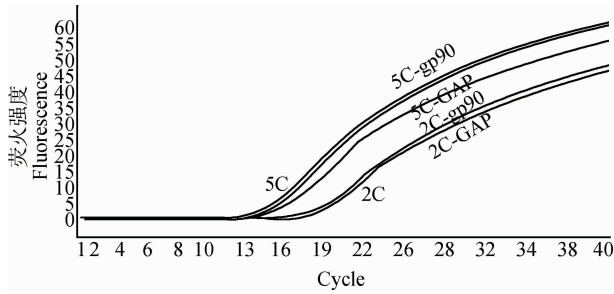


图2 含2个拷贝(2C)和5个拷贝(5C) *gp90* 基因重组酵母菌株的扩增曲线

Fig. 2 Representative example of Real-time PCR analysis for recombinant strains which have integrated 2 copies (2C) and 5 copies (5C) *gp90* gene

3 讨论

Han 等^[8]、Abdelmoula-Souissi 等^[9]、Hadiji-Abbes 等^[10]曾利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法检测重组酵母菌株中的外源基因拷贝数,其中 Han、Abdelmoula-Souissi 等^[8-9]只对目的基因拷贝数进行了荧光定量 PCR 检测,并未检测内参基因,酵母基因组的拷贝数是用紫外分光光度计测定其 OD_{260 nm} 换算而来,其准确性较差; Hadiji-Abbes 等^[10]以 *βactin* 为内参基因进行酵母基因组拷贝数的定量,实现了对目的基因和酵母基因组的双重定量,然而 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 均可结合,而与特定的 DNA 序列无关,即使与非特异性片段结合也能产生荧光,因此由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性,造成试验数据的偏差。

GAP 基因在毕赤酵母基因组中以单拷贝形式存在^[7],可以用 *GAP* 基因拷贝数来表征酵母基因组拷贝数。本研究采用双标准曲线法,以 *GAP* 为内参基因,建立了一种快速准确检测酵母基因组中外源基因插入拷贝数的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,实现了对目的基因和酵母基因组拷贝数的双重定量,目的基因与 *GAP* 基因起始模板拷贝数的比值即为目的基因在重组酵母菌株中的拷贝数。与 SYBR Green I 荧光定量 PCR 相比, TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法具有引物和探针的双重特异性,因而减少了假阳性的发生,提高了定量的特异性和准确性。本研究通过引物、探针设计和反应条件的优化,使得内参基因和目的基因拷贝数的检测可以在相同反应条件下进行,从而进一步降低了系统误差,提高了检测的精确性。

4 结论

本研究采用双标准曲线法,以 *GAP* 为内参基因,建立了一种快速准确检测毕赤酵母基因组中外源基因插入拷贝数的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,该方法方便、高效,并具有良好的敏感性和重复性,可以用于重组酵母菌株中外源基因拷贝数的检测,这为高表达重组酵母菌株的筛选提供了有效的技术手段。

参考文献:

- [1] DALY R, HEARN M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *J Mol Recognit*, 2005, 18: 119-138.
- [2] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24: 45-66.
- [3] MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA M L, MCNEIL B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *Yeast*, 2005, 22: 249-270.
- [4] 郭美锦,朱泰承,张明. 重组毕赤酵母甲醇利用表型与基因拷贝数对外源基因表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 7-11.
- [5] CREGG J M, HIGGINS D R. *Pichia* Protocols [M]. New Jersey: Humana Press, 1998: 59.
- [6] YANG L, DING J, ZHANG C, et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23 (10-11): 759-763.
- [7] WATERHAM H R, DIGAN M E, KOUTZ P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter [J]. *Gene*, 1997, 186(1): 37-44.
- [8] HAN X, YE L B, LI B Z, et al. Expression, purification and characterization of the Hepatitis B virus entire envelope large protein in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2006, 49(2): 168-175.
- [9] ABDELMOULA-SOUISSI S, REKIK L, GARGOURI A, et al. High-level expression of human tumour suppressor P53 in the methylotrophic yeast: *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 54: 283-288.
- [10] HADIJI-ABBES N, BORCHANI-CHABCHOUB I, TRIKI H, et al. Expression of HBsAg and preS2-S protein in different yeast based system: A comparative analysis [J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 66: 131-137.