

实时定量 PCR 技术及其在水生动物研究中的应用

周优^{1,2}, 岳志芹¹, 孙敏¹, 梁成珠¹, 刘荭³, 邓明俊¹, 汪东风²

(1. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 3. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001)

摘要:多聚酶链反应 (PCR) 研究与应用的飞速发展使其成为分子生物学实验室重要的工具, 实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR) 技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一种新型核酸定量技术, 该技术以其特异性强、灵敏度高、速度快、污染少等优点, 促进了 PCR 技术的发展。实时定量 PCR 技术在水生动物研究中有着广泛的应用, 目前主要集中在病原体检测、定量分析以及基因表达差异等方面。本文对实时定量 PCR 技术的原理、特点及 5 种主要的荧光化学作一介绍, 对其目前在水生动物研究中的应用进行了概述, 并探讨了该技术存在的问题和应用前景。[中国水产科学, 2007, 14(7): 116–122]

关键词:实时定量 PCR; 原理; 荧光化学; 水生动物

中图分类号:Q7 **文献标识码:**A **文章编号:**1005–8737–(2007)07–116–07

多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术发明至今得到了不断的发展, 其中实时定量 PCR (Fluorescent real-time quantitative-PCR, FQ-PCR) 技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 还以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具。实时定量 PCR 技术作为核酸定量检测技术在水生动物研究中逐渐得到了广泛的应用, 目前该技术在水生动物研究中的应用主要集中在病原体含量的检测、定量分析以及基因表达差异等方面。本文就此技术及其在水生动物研究中的应用做一综述, 以期对水生动物病原体的致病机理研究、药物作用机制研究、水生动物病害防治等提供借鉴。

1 实时定量 PCR 简介

1.1 实时定量 PCR 的原理

所谓实时定量 PCR, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术在常规 PCR 基础上添加了荧光染料或荧光探针。荧光染料能特异性插入 DNA 双链, 发出荧光信号, 而不插入双链中的染料分子不发

出荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步。荧光探针法将荧光共振能量传递 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术应用于常规 PCR 中, 在探针的 5'-端标记一个荧光报告基团 (R), 3'-端标记一个淬灭基团 (Q), 两者可构成能量传递结构, 即 5'-端荧光基团所发出的荧光可被淬灭基团吸收或抑制; 当两者距离较远时, 抑制作用消失, 报告基团荧光信号增强, 荧光监测系统可接收到荧光信号。

在实时定量 PCR 中, 对整个 PCR 反应过程进行了实时监测以连续地分析扩增相关的荧光信号。随着反应时间的进行, 监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。在 PCR 反应早期, 产生荧光信号的水平不能与背景明显地区分, 而后荧光的产生进入指数期、线性期和最终的平台期, 因此可以在 PCR 反应处于指数期的某一点上来检测 PCR 产物的量, 并且由此来推断模板最初的含量。为了便于对所检测样本进行比较, 在实时定量 PCR 反应的指数期, 首先需设定一个荧光信号的阈值 (Threshold), 它是以 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号 (Baseline), 荧光阈值的缺省设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。

收稿日期: 2007–07–01; 修订日期: 2007–07–20.

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局基础项目 (2006IK003).

作者简介: 周优 (1982–), 女, 硕士, 主要从事水产动物疾病学研究和基因组研究. E-mail: zhoyou9966@126.com

通讯作者: 岳志芹 (1975–). Tel: 0532–86770618; E-mail: yuezhiqin@126.com

如果检测到的荧光信号超过阈值被认为是真正的信号,它可用于定义样本的阈值循环数(C_t)。 C_t 值的含义是:每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。研究表明,模板的 C_t 值与模板起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多, C_t 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,因此只要获得未知样品的 C_t 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

1.2 实时定量PCR的特点

(1)特异性好,使用特异性探针定量分子进行识别,具有很高的准确性。同时,靶序列由引物和探针双重控制,特异性好、假阳性低。

(2)灵敏度高,实时定量PCR是综合了PCR技术、荧光标记技术、激光技术、数码显象技术为一体的技术,因此它的检测灵敏度很高。

(3)线性关系好、线性范围宽,由于荧光信号的产生和每次扩增产物成一一对应的关系,通过荧光信号的检测可以直接对产物进行定量;定量范围可在 $0\sim 10^{10}$ copy/mL。

(4)操作简单、安全、自动化程度高、防污染。扩增和检测在同一管内进行,不需要开盖,不易污染;同时扩增和检测一步完成,不需要后期处理,不必担心放射性污染。

(5)速度快、高通量,可在2~3 h完成96个样品的定量分析。

2 实时定量PCR方法的类型

实时定量PCR所使用的荧光化学标记可分为两种:荧光探针和荧光染料^[1]。下面为几种常见实时定量PCR方法。

2.1 荧光染料(SYBR Green I)

SYBR Green I实时定量PCR是不依赖探针的检测系统^[2]。SYBR Green I是一种结合于所有ds-DNA双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。在PCR反应体系中,加入过量SYBR荧光染料,SYBR荧光染料插入DNA双链,与dsDNA结合,受到激发荧光信号会大大增强,发射绿色荧光信号。而不插入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。

荧光染料的优势在于它能监测任何dsDNA序列的扩增,不需要设计探针,使检测方法简便,同时也降低了检测的成本。然而正是由于荧光染料能和

任何dsDNA结合,所以特异性差,易产生假阳性信号。引物二聚体问题目前可以使用带有熔解曲线(Melting curve)分析的软件加以解决。

2.2 水解探针(Taqman)

TaqMan实时定量PCR应用1段寡核苷酸探针,使之与扩增DNA片段内部的一段序列相结合;这种寡核苷酸探针通常长度为20~24 bp,探针的5'-末端标记荧光报告基团,在它的3'-末端标记淬灭基团。这种标记的寡核苷酸探针加入到含有引物的PCR反应管中,一起进行靶序列的扩增。在荧光基团和淬灭基团紧密地结合在一个完整的杂交探针上时,荧光物质发出的荧光正好被荧光淬灭物质吸收;PCR扩增时,Taq酶在引物的指导下扩增模板DNA,当合成到探针结合处,Taq酶继续发挥其聚合酶作用向前合成DNA,同时又发挥其5'→3'的DNA外切酶作用(此活性是双链特异性的,游离的单链探针不受影响)将探针水解。当探针被水解后,荧光基团不再靠近淬灭基团,荧光信号就不会被淬灭基团吸收,开始发出荧光;荧光的强度直接与PCR过程中合成的靶DNA浓度成正比。由于模板DNA的扩增和探针的水解相耦连,所以模板DNA扩增越多,被水解的探针就越多,荧光信号也就越强。

2.3 分子信标探针

分子信标(Molecular beacon, MB)由Tyagi等^[3]提出,并在实验中取得成功。分子信标是一种设计巧妙的荧光标记的核酸探针。该探针为单链DNA,呈茎环结构,环部与靶DNA序列互补,为15~35 bp;茎部核苷酸互补,但与靶DNA无序列同源性,约8 bp。探针的5'-端和3'-端分别标记报告荧光基团(F)和淬灭荧光基团(Q)。游离状态下,分子信标由一端报告荧光基团和另一端淬灭荧光基团紧密相邻,发生荧光共振能量转移(FRET),发出的荧光被淬灭;在PCR变性后复性阶段,探针的环部核苷酸序列与互补的靶序列结合,形成更稳定的杂交,破坏了茎环结构产生的FRET,淬灭作用被解除,产生荧光信号。

2.4 利用FRET原理设计的双探针

FRET探针由两条相邻探针组成,上游寡聚探针(在3'-末端)标记3'-供体荧光基团(通常为荧光素,Fluorescein),下游探针(在5'-末端)标记受体荧光基团(通常为Light Cycler Red 640或Red 650),当两个寡聚探针都杂交时,这两个荧光基团彼此相邻。当探针与目标核酸序列结合时,供体荧光基团

所激发的能量通过荧光共振能量传递作用 (FRET), 传递给受体荧光基团, 后者所释放的荧光信号可被荧光检测系统检测出来。

2.5 LUX 引物

LUX (Light upon extention) 引物是利用荧光标记的引物实现定量的一项新技术。用荧光报告基团标记目标特异的引物对中的一个引物 3'-端。在没有单链模板的情况下, 该引物自身配对, 形成发夹结构, 使荧光淬灭。在有目标片段的时候, 引物与模板

配对, 发夹结构打开, 产生特异的荧光信号。与 Taqman 探针和分子信标相比, LUX 引物通过二级结构实现淬灭, 不需要荧光淬灭基团, 也不需要设计特异的探针序列。LUX 引物是一个相对较新的技术, 其应用还有待实践的检验。

能用于实时 PCR 定量的方法很多, 各有优缺点, 应根据实验的需要和当前的实验条件选择适合自己的方法。各种定量 PCR 方法的特点和它们之间的比较见表 1。

表 1 各种定量方法的比较
Tab.1 Comparison of various quantitative methods

项目 Item	荧光染料 SYBR Green	FRET 探针 FRET Probes	水解探针 Taqman	分子信标 Molecular beacon
性质 Property	可逆荧光	可逆荧光	积累荧光	积累荧光
熔点分析 Melting point analysis	能	能	不能	不能
特异性 Specificity	引物 (非特异性扩增或引物二聚体有影响)	引物+2 探针	引物+ 探针	引物+ 探针
探针 Probe	不需要	需要	需要	需要
通用性 Universality	通用	专用	专用	专用

3 实时定量 PCR 在水生动物研究中的应用

实时荧光定量 PCR 技术是 DNA 定量技术的一次飞跃。运用该项技术, 可以对 DNA、RNA 样品进行定量和定性分析。定量分析包括绝对定量分析和相对定量分析。前者可以得到某个样品中基因的拷贝数和浓度; 后者可以对不同方式处理的两个样本中的基因表达水平进行比较。除此之外还可以对 PCR 产物或样品进行定性分析: 例如利用熔解曲线分析识别扩增产物和引物二聚体, 以区分非特异扩增; 利用特异性探针进行基因型分析及 SNP 检测等。实时定量 PCR 技术在水生动物研究中的应用主要集中在以下几方面。

3.1 实时定量 PCR 在病原体检测方面的应用

3.1.1 在细菌病原体检测中的应用 关于对虾弧菌病的研究至今还比较少, Cyrille 等^[4]采用 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法对该病病原体进行了检测和定量。结果表明该法特异性强, 仅对对虾弧菌基因组 DNA 的 AM101 和 KH1T 链产生扩增, 而对非对虾弧菌或非弧菌属细菌都不产生扩增, 且熔解曲线没有引物二聚体或非特异性产物形成; 时间短, 整个过程 (包括样品处理、DNA 抽提和实时定量 PCR 扩增) 在 4 h 内完成; 费用少, 由于不必合成荧

光探针而更经济适用。Linda 等^[5]将多重实时定量 PCR 运用于贝类的副溶血性弧菌的检测, 4 套特异性引物和探针可以检测总的和病原性的副溶血性弧菌, 其目标序列为热稳定直接溶血素基因 (*tdh*)、*tdh* 相关溶血素基因 (*trh*)、抗菌素 *f237* 的 ORF8 基因和不耐热性溶血素基因 (*tlh*)。该多重 Taqman PCR 的灵敏度为 200 pg 和 10⁴ CFU /mL, 用于天然牡蛎检测的结果为: 17 /33 的 *tlh* 阳性和 4 /33 的 *tdh* 阳性, 表明该方法对总的和病原性的副溶血性弧菌的检测特异性强、灵敏度高。

3.1.2 在病毒病原体检测中的应用 Overturf 等^[6]将 Taqman 实时定量 RT-PCR 方法用于鲑鱼传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 的检测和定量, 并以常规 RT-PCR 方法作为比较。结果表明该法速度快、灵敏度高, 将病毒粒子稀释到 100 拷贝 /反应管时仍有极显著的阳性信号, 而常规 RT-PCR 的检测限为 10⁶拷贝。对于虾的传染性皮下及造血器官坏死病毒 (IHHNV) 的定量检测, Yue 等^[7]建立了 Taqman 实时定量 PCR 检测方法, 检测灵敏度为 9 个拷贝, 且能检出所有常规 PCR 检测呈阳性的样品, 检测特异性强, 不与虾基因组 DNA 或其他的虾病毒 (如 WSSV、MBV 和 HPV) 发生交叉反应。王忠发等^[8]建立了 Taqman 实时定量 PCR 方法来检

测对虾白斑综合症病毒(WSSV),并与标准方法(核酸探针点杂交)进行比对,结果显示该法与标准方法的特异性符合率为100%,灵敏度超过标准方法的10 000~100 000倍,检测时间为标准方法的1/24,重现性良好,并能准确定量。James等^[9]将实时定量PCR方法与Shrimple[®]试剂盒检测法作比较,用于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)白斑综合症病毒(WSSV)感染的早期检测:健康对虾接种病毒后分别于1、2、4、8、12、16、20、24和32 h取样检测,实时定量PCR检测阳性率为100%,而Shrimple[®]试剂盒检测阳性率为34.7%,后者对感染病毒12 h以内的对虾的检测均成阴性,显示了实时定量PCR的高的检测灵敏度和检测效率。在泰国,几种以PCR为基础的方法都被用作对虾白斑综合症病毒(WSSV)的检测^[10],其中实时定量PCR的检测限为5个拷贝,常规一步法PCR的检测限为1 000拷贝,常规单管巢式PCR(1N-PCR)为50拷贝,两种双管巢式PCR(2N-PCR)分别为100和1 000拷贝。这些方法检测灵敏度高、特异性也强,都可用作对虾WSSV的检测,而实时定量PCR被确定为这些方法中的黄金标准。Thales等^[11]建立了Taqman实时定量RT-PCR方法检测凡纳滨对虾的传染性肌肉坏死病毒(IMNV),阈值循环(C_T)和RNA数量间显示了强烈的线性相关($r^2=0.986$)。检测特异性强,对YHV、TSV、IHHNV、WSSV和NHPB的检测均呈阴性。灵敏度高,实时定量RT-PCR检测限为10个拷贝,作为对照的巢式RT-PCR检测限为1 000个拷贝,而对感染IMNV的30个对虾样品实时定量RT-PCR检出率为100%,巢式RT-PCR仅检出了其中的23个,实时定量RT-PCR的定量结果显示这7个未被检出的对虾的病毒载量较另23个低(均为1 500以下)。通过注射或摄取的方法使凡纳滨对虾感染桃拉综合症病毒(TSV)后,Nunan等^[12]采用实时定量RT-PCR对虾体6个组织的病毒量进行了分析,发现注射组身体各部分的病毒拷贝数没有显著差异,而摄取组存在统计学差异;平均病毒拷贝数/ng RNA($\bar{x}$ cn/ng RNA)在注射组为 $1.4 \times 10^5 \sim 2.3 \times 10^5$,在摄取组为 $2.5 \times 10^4 \sim 4.3 \times 10^5$;平均病毒拷贝数/g组织($\bar{x}$ cn/g tissue)在注射组为 $1.2 \times 10^9 \sim 7.4 \times 10^9$,在摄取组为 $1.7 \times 10^8 \sim 1.7 \times 10^{10}$;总之,不管何种处理方法,实时定量RT-PCR对感染TSV的对虾的身体各部分都能检测出病毒的存在。

3.1.3 在寄生虫病原体检测中的应用 牡蛎包拉米原虫是一种细胞内单孢子寄生虫,可导致欧洲扁牡蛎(*Ostrea edulis*)极高的死亡率,2004年在加拿大西部养殖牡蛎中首次被发现。为了调查该地区牡蛎包拉米原虫的分布及患病率,2005年从3个养殖场采集了607份牡蛎样本,并用组织病理学和实时定量PCR方法^[13]检测,结果3个养殖场均检出有包拉米原虫病,患病率为0.5%~11.1%,实时定量PCR的检测灵敏度始终比组织病理分析法高,且4份由组织病理分析呈阴性的石蜡包埋组织经实时定量PCR检测后证实为牡蛎包拉米原虫阳性。

3.2 实时定量PCR在基因表达方面的应用

3.2.1 病原体感染后相关基因的表达 格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)是罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的一种病原菌,可导致虾体肌肉和肝胰腺的坏死,Winton等^[14]采用SYBR Green I实时定量RT-PCR研究罗氏沼虾注射格氏乳球菌后肝胰腺和血细胞中线粒体锰超氧化物歧化酶(mtMnSOD)表达水平的变化,并以注射生理盐水组作为对照,结果表明,注射后3~24 h,实验组和对照组mtMnSOD转录水平没有显著差异,揭示了格氏乳球菌引起的肝胰腺坏死导致了cytMn-SOD表达的减少^[15],而对mtMnSOD的表达没有影响。爱德华氏菌为鲑鱼肠道败血症(ESC)的病原体,蓝色鲑鱼(*Ictalurus furcatus*)对其为抵抗型而斑点叉尾鲑(*I. punctatus*)为易感染型。Puttharat等^[16]采用实时定量PCR方法比较感染了爱德华氏菌的蓝色鲑鱼和斑点叉尾鲑鱼体内CXC趋化因子表达水平的变化,结果显示,CXC趋化因子在斑点叉尾鲑鱼体内的表达被极大地诱导(60~200倍),而在蓝色鲑鱼体内的诱导不明显(3倍),揭示了ESC病在蓝色鲑鱼和斑点叉尾鲑鱼体内的进展极其不同,CXC趋化因子与抗病机制无关而可以作为对该病抵抗型的分子指示器。Oyvind等^[17]使用实时定量RT-PCR研究大西洋鲑(*Salmo salar*)感染传染性鲑贫血病毒(ISAV)后I型干扰素系统中I型IFN、Mx和ISG15等关键基因的表达。研究表明,ISAV能强有力地诱导Mx和ISG15的表达,这种作用出现在感染早期,而IFN的转录较Mx和ISG15更晚,说明感染早期Mx和ISG15的诱导是非IFN依赖型的。对于鲤鱼感染小瓜虫后体表和全血中免疫相关基因实时表达水平的测量,Santiago等^[18]建立了实时定量PCR方法。目标基因有趋化因子CXCa和CX-

Cb, 趋化因子受体 CXCR1 和 CXCR2, IL-1 β , TNF- α , iNOS 和精氨酸酶 2 基因。暴露于小瓜虫幼虫 36~48 h 间, IL-1 β , CXCR1 和 iNOS 在体表呈现最强的上调作用, CXCR2 和 TNF- α 也有显著的上调; 血液中, CXCR2, IL-1 β , CXCR1 和 iNOS 的表达同样也有上调, 与体表相比表达水平的增加更适中且表达峰出现得更早; 此外, CXCR2 和精氨酸酶 2 基因在血液中被特异性地诱导。

3.2.2 异源物作用下相关基因的表达 Baskaralingam 等^[19]将 SYBR Green I 实时定量 PCR 用于锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 血细胞硫酸酯 $\alpha 2$ 巨球蛋白 ($\alpha 2$ -M) 基因表达的研究, 结果显示 $\alpha 2$ -M mRNA 转录在脂多糖 (LPS) 注射后 24 h 和 48 h 出现显著增加。Trine 等^[20]采用实时定量 PCR 方法定量注射雌激素化合物 E₂ 或 α -ZEA 后的虹鳟肝脏中诱导的放线带基因 (ZR) 和卵黄蛋白原基因 (VTG)。实时定量 PCR 和间接 ELISA 分别检测的结果表明单独注射 E₂ 或 α -ZEA, ZR 和 VTG 在肝脏和等离子区都有诱导, 而实时定量 PCR 比 ELISA 灵敏度更高。温度应力是硬骨鱼胚胎发育过程中的一个致畸因素, 热休克蛋白 (HSP) 在保护胚胎发育免受温度变化引起的损害中起着重要作用, Harald 等^[21]采用实时定量 RT-PCR 方法研究在热与冷刺激下大西洋鲑胚胎发育过程中 HSP70mRNA 表达水平的变化, 结果表明 HSP70mRNA 的表达与胚胎的发育期呈相关性, 在原肠胚期、第 9 期、第 15 期、第 20 期和第 45 体节期呈现表达上调, 其中第 45 期最明显, 热与冷刺激下分别为 12 倍和 4 倍的增长, 揭示了这几期为大西洋鲑胚胎发育的敏感阶段。细胞色素 P450 1A (CYP1A) 蛋白具有生物转化和解毒作用, 许多环境污染物可诱导鱼体中 CYP1A 的表达, 因而 CYP1A 被作为水体污染的指示剂; p53 的产物在细胞周期阻滞、凋亡、DNA 修复中起着重要的作用, p53 是分析环境毒物引起的致癌性及 DNA 修复的关键的生物标志物; 卵黄蛋白原 (VTG) 的诱导则是接触雌激素及雌激素类化合物的一个指示剂。双氯酚酸是一种抗炎药, 废水处理厂排出的水中双氯酚酸的含量在 ng/L~mg/L 的范围内, 而关于双氯酚酸对水生动物的不利影响的研究却较少。Han 等^[22]采用实时定量 PCR 对双氯酚酸污染的水中生活的日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 体内 CYP1A、p53 及 VTG 的表达进行了定量, 实验浓度设为 8 mg/L 和 1 μ g/L, 结果两组实验中 CYP1A、p53 及 VTG 都有

高水平的表达, 揭示了双氯酚酸可能导致细胞毒性、p53 相关的遗传毒性及雌激素效应, 甚至在环境容许浓度 1 μ g/L 下也能产生, 这就要引起重视了。

3.2.3 杂交后相关基因的表达 Sheila 等^[23]采用实时定量 RT-PCR 方法研究剑尾鱼亲本及其种间杂交荷瘤子代体内 DNA 聚合酶 β (*Xiph Pol β*) mRNA 表达水平的差异。结果表明, 亲本与子代间 *Pol β* mRNA 表达水平存在显著不同, 揭示了种间杂交可导致 *Pol β* 表达的调节障碍, 从而引起 DNA 修复能力的调变和对潜伏的肿瘤的感染。Sheila 等^[24]用实时定量 RT-PCR 分析剑尾鱼属内杂交子一代体内碱基切除修复 (Base excision repair, BER) 基因表达水平的变化, 花斑剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*) 与红剑尾鱼 (*X. helleri*) 杂交子一代 *Sp-helleri* 体内 BER 基因的表达比其父母本都有显著增加, 与此相反, 花斑剑尾鱼 (*X. maculatus*) 与安氏剑尾鱼 (*X. andersi*) 杂交子一代 *Sp-andersi* 体内 BER 基因的表达比其父母本都有减少, 揭示了属内杂交可能产生多基因途径的调变, 这种调变可能影响下游的肿瘤形成。

3.2.4 用药后相关基因的表达 大西洋鲑在接种油性辅剂的疫苗后在注射部位都会出现炎症反应, 而这其中的机制却研究得较少, Øyvind 等^[25]用实时定量 RT-PCR 研究免疫后大西洋鲑体内 IL-1 β 、Mx、 β_2 微球蛋白变体 (β_2 m) 和 MHC II β 表达水平的变化, 结果显示接种后 2 d 内与新陈代谢及细胞信号传导相关的基因 (IL-1 β 、Mx) 出现表达上调, 在 3~8 d 主要为炎症相关基因 (β_2 m、MHC II β) 的表达上调, 之后直到第 19 天, 主要为免疫相关基因 (免疫球蛋白、T 细胞受体) 的上调表达, 显示出实时定量 RT-PCR 在确认炎症反应及免疫反应关键基因中的有效性。转移生长因子- β (TGF- β) 是许多细胞功能的一个强有力的调节者, 对患有溃疡性皮肤病变的大西洋鲑注射抗炎药物曲安奈德后, 通过对 TGF- β 、血液学、等离子体化学等健康指标的综合研究可考察药物的疗效。Johnson 等^[26]用实时定量 RT-PCR 方法对患病鲑鱼用药后脾单核细胞 TGF- β mRNA 转录进行定量, 并以健康鱼作为对照, 结果显示用药后 TGF- β mRNA 表达呈现抑制, 48 h 时达到最低值, 96 h 时又恢复至健康鱼水平, 揭示了该方法可用于考核临床患病鱼的免疫状况。

3.2.5 其他 由甲状旁腺激素 2 型受体 (PTH2R) 和 TIP39/38 组成的 PTH2R-TIP39/38 系统在哺乳动物

中与伤害性反应和垂体调节有关,而在鱼类中的研究却较少。Justin 等^[27]采用实时定量 RT-PCR 对罗非鱼各组织器官中 TIP38 的表达进行了研究,淡水中生长的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 其肾中的表达水平最高,而皮肤和鳃中的表达水平最低;广盐性的莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) 分别进行盐水驯化和淡水驯化,结果盐水驯化的个体比淡水驯化的个体体内的 TIP38 的表达水平更高;揭示了 PTH2R-TIP39/38 系统的表达具有组织特异性,而且可能与罗非鱼的渗透调节有关。

3.3 基因组大小的评估

对基因组大小的评估,传统的方法是基于 DNA 骨架中磷酸盐含量的分析或高分子量基因组 DNA 的复性式动力学 (C_0t 分析),现代的技术是将 DNA 特异性荧光染料应用于流式细胞光度计分析、镜象分析或吸收细胞光度计分析。Jochen 等^[28]建立了实时定量 PCR 方法来评估基因组大小,该方法是基于已知数量基因组 DNA 中遗传元素的绝对定量,该法研究花斑剑尾的基因组大小为 550 Mb,显示出快速性、高的精确度和可靠性。

4 存在的问题及应用前景

实时定量 PCR 具有很多优点,目前已成为病原学研究的常规手段之一,其应用广度和深度都在不断增加,但还有许多问题尚待解决。首先,在利用标准曲线进行绝对定量的研究中,目前还缺乏标准化的标准品,由于标准品的不统一,就导致定量结果只在同一体系内具有良好的重复性,不同体系之间的定量结果常有不小的差异,致使实验结果缺乏可比性;其次是如何建立完善的质量控制程序和质评体系。定量 PCR 反应涉及到如何保证高效率、高质量地从不同来源的样本中提取核酸,然后采用高效试剂进行反转录、PCR,最后还要进行严谨的数据解析。这一系列过程都需要有完善的质量控制程序和质评体系。如何建立合适的标准品,建立完善的质量控制程序和质评体系,对于定量 PCR 数据的阐释以及增加实验室间实验的可比性至关重要。

随着定量 PCR 仪器的发展和完善,荧光染料和探针的种类更丰富,特异性更高,标准化质控程序的建立以及标准化试剂的使用,实时定量 PCR 正向着快速、高通量、自动化的方向发展,上述问题也将会逐渐得到解决。

目前实时定量 PCR 在水生动物研究中的应用

主要集中在病原体含量的检测、定量分析以及基因表达差异方面。可以预见的是,随着该技术的不断完善以及水生动物研究的不断深入,实时定量 PCR 在水生动物病原体的多重 PCR 检测方面、基因分型如 SNP 检测,甲基化检测方面、等位基因鉴别以及水生动物病原体的致病机理研究等方面,必将有更广阔的应用空间。

参考文献:

- [1] Rasmussen R, Morbronn T, Hermann M, et al. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye[J]. *Biochemistry*, 1998, 2: 8-9.
- [2] Speel E J M, Hopman A H N, Komminoth P. Amplification Methods to Increase the Sensitivity of In Situ Hybridization: Play CARD (S) [J]. *J Histochem Cytochem*, 1999, 47: 281-288.
- [3] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes fluoresce upon hybridization [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303-308.
- [4] Goarant C, Merien F. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry [J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 67: 27-35.
- [5] Ward L N, Bej A K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (3): 2031-2042.
- [6] Overturf K, Lapatra S, Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids [J]. *J Fish Dis*, 2001, 24: 325-333.
- [7] Yue Z Q, Liu H, Wang W J, et al. Development of real-time PCR assay for the quantitative detection of IHNV from shrimps with Taqman probe [J]. *J AOAC Int*, 2005, 89: 240-244.
- [8] 王忠发, 邵俊斌, 沃建儿, 等. Taqman 实时荧光定量 PCR 快速检测白斑综合症病毒的方法研究 [J]. *中国卫生检疫杂志*, 2005, 15 (6): 663-665.
- [9] Powell J W B, Burge E J, Browdy C L, et al. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple® an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR [J]. *Aquaculture*, 2006, 257: 167-172.
- [10] Sritunyalucksana K, Srisala J, McColl K, et al. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 95-104.
- [11] Andrade T P D, Srisuvan T, Tang K F J, et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV) [J]. *Aquaculture*, 2007, 264: 9-15.
- [12] Nunan L M, Tang-Nelson K, Lightner D V. Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experi-

- mentally infected with Taura syndrome virus [J]. *Aquaculture*, 2004, 229: 1–10.
- [13] Marty G D, Bower S M, Clarke K R, et al. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada [J]. *Aquaculture*, 2006, 261: 33–42.
- [14] Cheng W, Tung Y H, Chiou T T, et al. Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish and Shellfish Immunol*, 2006, 21: 453–466.
- [15] Cheng W, Tung Y H, Liu CH, et al. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20: 438–449.
- [16] Baoprasertikul P, Peatman E, Chen L, et al. Sequence analysis and expression of a CXC chemokine in resistant and susceptible catfish after infection of *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 769–780.
- [17] Kileng O, Brundtland M I, Robertsen B. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 1–12.
- [18] Gonzalez S F, Buchmann K, Nielsen M E. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22: 641–650.
- [19] Vaseeharan B, Lin Y, Ko C, et al. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22: 115–130.
- [20] Celius T, Matthews J B, Giesy J P, et al. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after in vivo treatment with estradiol-17 β or α -zearalenol [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 75: 109–119.
- [21] Takle H, Baeverfjord G, Lunde M, et al. The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 249: 515–524.
- [22] Han N H, Han N K, Kyeong S P, et al. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR [J]. *Chemosphere*, 2007, 67: 2 115–2 121.
- [23] Heater S J, Oehlers Jr L P, Rains J D, et al. DNA polymerase β mRNA and protein expression in *Xiphophorus* fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2004, 138: 325–334.
- [24] Heater S J, Rains J D, Wells M C, et al. Perturbation of DNA repair gene expression due to interspecies hybridization [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 145: 156–163.
- [25] Øyvind H, Jacob T, Mohasina S, et al. Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 5 488–5 499.
- [26] Johnson A K, Harms C A, Levine J F, et al. A quantitative real-time RT-PCR assay to measure TGF- β mRNA and its correlation with hematologic, plasma chemistry and organo-somatic indices responses in triamcinolone-treated Atlantic menhaden: *Brevoortia tyrannus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2006, 30: 473–484.
- [27] Shoemaker J M, Riley L G, Hirano T, et al. Differential expression of tuberoinfundibular peptide 38 and glucose-6-phosphatase in tilapia [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 146: 186–194.
- [28] Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31 (10): 1–6.

Real-time quantitative PCR and its application in aquatic animal study

ZHOU You^{1,2}, YUE Zhi-qin¹, SUN Min¹, LIANG Cheng-zhu¹, LIU Hong³, DENG Ming-jun¹, WANG Dong-feng²

(1. Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Life Science and Technology Department, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China)

Abstract: With the rapid development of polymerase chain reaction, it has become an important tool in molecular biological laboratory. Real-time quantitative PCR technology with high specificity, good sensitivity, high rate and few pollution lead to great progress in PCR. In the paper, the principle, features and five main fluorescence chemistry of real-time quantitative PCR are introduced, the applications in aquatic animal study are summarized, and also the problems existed and future prospects are discussed. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (7): 116–122]

Key words: real-time quantitative PCR technology; principle; fluorescence chemistry; aquatic animal

Corresponding author: YUE Zhi-qin. E-mail: yuezhiqin@126.com