

人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用*

罗 凯,黎谢梦丹,石兴源,贾晓婷,王 倩,邓 敏,仇秦威,张志杰,贺智敏

(广州医科大学附属肿瘤医院/广州医科大学肿瘤研究所,广州 510095)

摘要:目的 建立一种人细胞周期蛋白依赖性激酶 14(CDK14)基因表达荧光定量 PCR 检测方法。方法 利用 Trizol 法提取不同人肺癌细胞株中总 RNA,以 β -Actin 和 CDK14 分别为内参和目的基因,分别设计特异性扩增引物,建立人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测系统并评估其检测性能。同时将其应用于不同细胞系 siRNA 干扰前后的 CDK14 基因相对表达水平检测。结果 经电泳分析、熔解曲线、产物测序确认人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测系统已建立,其特异性良好,重复性佳($CV=7.13\%$),线性范围较宽(CDK14 与 β -Actin 分别在 C_t 值范围 22.47~32.96 与 15.14~27.55 间具有良好的相关性, $r^2=0.9844$)。利用该体系检测发现:在 HCC827 D5 和 H1650 细胞中 CDK14 基因高表达;在 1~3 号干扰片段中,1 号片段为有效片段。结论 人 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测方法已成功建立。

关键词:细胞周期蛋白依赖性激酶 14;基因;实时荧光定量 PCR;

中图分类号:Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)02-026-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.007

Establishment and Preliminary Application of the Method for Detecting Expression of Human CDK14 with Real-Time Quantitative PCR

LUO Kai, LI Xie-meng-dan, SHI Xing-yuan, JIA Xiao-ting, WANG Qian, DENG Min, ZHANG Zhi-jie, HE Zhi-min (Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University, Cancer Research Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095, China)

Abstract: **Objective** The method for detecting expression of human CDK14 gene with Real-time quantitative PCR was developed. **Methods** To establish a method for detecting expression of human CDK14 gene with Real-time quantitative PCR by designing and synthesis of the primers of CDK14 target gene and β -Actin reference gene and extracting total RNA from different lung cancer cell lines. Then the specificity, detection range and repeatability of this method were evaluated. At last, the expression level of CDK14 gene in different cell lines, which were with or without siRNA interference, were carried out by using this method. **Results** The method for detecting expression of human CDK14 gene with Real-time quantitative PCR, which had good specificity, good repeatability ($CV=7.3\%$) and wide detection range (C_t value range of CDK14 and β -Actin amplification curve were 22.47~32.96 and 15.14~27.55 respectively, $r^2=0.9844$), was developed and it was verified by electrophoresis analysis, melting curve, PCR product sequencing. And CDK14 gene expression level, which was detected by this method, increased in HCC827 D5, H1650 and number 1 siRNA segment was effective interference segment. **Conclusion**

The method for detecting expression of human CDK14 gene with Real-time quantitative PCR was established successfully.

Keywords: cyclin dependent kinase 14; gene; real-time quantitative PCR

细胞周期蛋白依赖性激酶 14(cyclin dependent kinase 14, CDK14)是 Cdc2 家族的成员之一^[1]。相关研究证明^[2,3,4],CDK14 是一种具有细胞周期调节功能的蛋白,在肝癌、食管癌等多种肿瘤组织中高表达,提示其与肿瘤的发生、发展、转移相关。因此,建立一套简便、快捷、经济的 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测体系对 CDK14 的相

关性研究具有重要的实用价值。

SYBR Green I 荧光定量 PCR 是一种简便、快捷、经济的定量 PCR 方法,但其定量结果的准确性首先取决于 PCR 反应具有良好的特异性,而 PCR 反应特异性的优劣则取决于扩增引物的特异性好坏^[5]。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法是基因相对表达量分析的常用方法,其基于 SYBR 荧光定量 PCR 技术,同

* 基金项目:广东省中医药局科研项目(No. 20161179),广州市卫计委医药卫生科技项目(No. 20161A011086)。

作者简介:罗 凯(1970—),男,博士研究生,副主任技师,研究方向:肿瘤的靶向治疗耐药机制与分子靶向检测,E-mail:luolainan@126.com。

通讯作者:张志杰(1978—),男,博士研究生,助理研究员,研究方向:肿瘤的发生机制,E-mail:303589586@qq.com。

时检测对照组和实验组的目的基因与对照基因的表达情况,以对照组目的基因与对照基因的相对表达量为基础,即可实现对实验组目的基因表达情况高或低的分析^[6]。

该研究拟以 CDK14 与 β 肌动蛋白(β -Actin) 基因分别为目的基因和对照基因,利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术平台建立 CDK14 基因的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验样本 人肺癌细胞 HCC827, H1650 购自中科院上海细胞所; HCC827 D5, HCC827 B3 细胞为 HCC827 细胞经有限稀释法所获得的单克隆化子细胞。

1.2 试剂和仪器 TRIZOL 购自美国 Thermo 公司; 逆转录试剂盒与 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自大连宝生物公司; BigDye 3.1 试剂盒购自美国 Life 公司; 荧光定量 PCR 仪为美国 BIO-RAD 公司的 C1000; 测序仪为美国 Life 公司的 3130xl。

1.3 方法

1.3.1 引物设计: 以 CDK14 基因 mRNA 参考序列 NM_001287135.1 为模板, 利用 NCBI 网站 Primer-BLAST 设计 CDK14 基因扩增引物, 上游引物: 5'CTAGACCTGCGCGTCGCT3', 下游引物: 5'TGACACATATCTCATCAAAGGTGGT3', 产物长度 275bp。对照基因 β -Actin 扩增引物由广州医科大学肿瘤研究所张志杰博士设计, 上游引物: 5'ATGATGATATCGCCGCGCTC3', 下游引物: 5'CCACCATCACGCCCTGG3', 产物长度 132bp。引物由深圳华大基因合成, 同时分别以 CDK14 的上游扩增引物、 β -Actin 的下游扩增引物作为测序引物。

1.3.2 总 RNA 提取及逆转录: 依说明书步骤提取细胞系总 RNA, 微量分光光度计测定 RNA 浓度, 取 0.5 μ g RNA 加入 2 μ l 逆转录混合体系(5 \times), 补水至 10 μ l。37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。将逆转录后的 cDNA 稀释 5 倍备用。

1.3.3 最佳退火温度的筛选: 将 H1650 细胞 CDK14 及 β -Actin 的 cDNA 在不同退火温度下进行扩增, 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。以两基因 PCR 产物均出现单一、清晰目的扩增条带的退火温度范围为优选退火温度范围, 取优选退火温度范围的上限温度为最终实验退火温度。反应体系: Green Mix 10 μ l, 上下游引物各 1 μ l(10 μ mol/L), H_2O 7 μ l, cDNA 1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, (50, 53, 56, 59, 62, 65) $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 40 循环; 72 $^{\circ}$ C 73 min。

1.3.4 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测体系

的建立: 依据优化退火温度制定最终反应条件, 建立 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测体系, 具体如下: 反应体系: SYBR Mix 10 μ l, 上下游引物各 1 μ l(10 μ mol/L), H_2O 7 μ l, cDNA 1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 40 循环; 熔解曲线分析。将 CDK14 与 β -Actin PCR 产物依相关文献实验步骤测序鉴定^[7]。

1.3.5 性能评估实验

特异性试验: 以 H1650 细胞为阳性对照, 去离子水为阴性对照, 裸鼠、大鼠肺组织为特异对照, 进行特异性试验。

检测范围评估: 将 H1650 细胞 cDNA 按 8 倍进行倍比稀释, 共 7 个梯度, 依次标记为梯度 1~梯度 7。对梯度样品行 CDK14 和 β -Actin 荧光定量 PCR 检测, 以具有良好线性关系的最高至最低样品梯度的扩增曲线的 C_t 值范围作为本检测体系的检测范围。

重复性评估: 对上述梯度样品行 3 次 CDK14 和 β -Actin 荧光定量 PCR 检测, 每次实验每个样品设置 3 个重复管, 观察实验的重复性。另以未稀释前的样品为对照样品, 观察各梯度样品检出的 CDK14 基因相对表达量。

1.3.6 应用试验

利用已建立的检测体系测定 HCC827, HCC827 D5 和 H1650 细胞的 CDK14 基因相对表达情况。另分别检测已转染阴性对照和 CDK14 siRNA 的 HCC827 D5, HCC827 B3 和 H1650 细胞的 CDK14 基因相对表达情况, 观察该体系可否用于 CDK14 siRNA 干扰效果的评估。

1.4 统计学分析 对呈正态分布的计量资料做离群值分析时, 采用超过平均值正负两个标准差范围的数值即判为离群值的标准; 对标准曲线数据采用相关与回归分析; 计量资料用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测体系的初步建立 CDK14 与 β -Actin 之 PCR 扩增体系的适宜退火温度范围分别为 56~65 $^{\circ}$ C 与 50~65 $^{\circ}$ C, 选择 65 $^{\circ}$ C 为最佳退火温度。CDK14 及 β -Actin 的荧光定量 PCR 均可见阳性扩增曲线及相应的单一熔解曲线峰, 产物电泳见 275 bp 与 132 bp 单一目的扩增条带, 测序结果显示 PCR 产物的基因序列与拟扩增目的片段序列完全相符。以上结果显示, CDK14 基因表达荧光定量 PCR 检测体系已初步建立。

2.2 性能评估实验结果 特异性试验: 阳性对照可见阳性扩增曲线, 阴性对照与非人源性组织样品

均未见阳性扩增曲线,表明该检测特异度良好。

检测范围:CDK14 与 β -Actin 的荧光定量 PCR 体系分别在 C_t 值 22.47~32.96 和 15.14~27.55 范围内具有良好的线性关系,且溶解曲线单一而特异,其标准曲线的回归方程分别为 $Y = -2.639X + 35.659$ ($r^2 = 0.9998$) 和 $Y = -2.1537X + 28.431$ ($r^2 = 0.9467$),其中 Y 为 C_t 值, X 为浓度的对数值。另两组 C_t 值间也具有良好相关性 ($r^2 = 0.9844$)。以上数据显示两荧光定量 PCR 体系具有良好的相关性和相似的扩增效率。

重复性试验:CDK14 荧光定量 PCR 体系 C_t 值的批内变异系数为 0.21%~1.86%,批间变异系数为:2.37%~4.40%; β -Actin 荧光定量 PCR 体系 C_t 值的批内变异系数为 0.12%~0.88%,批间变异系数分别为 0.15%~5.13%。在梯度 1~5 范围内,CDK14 相对表达量分别为 1.00, 0.89, 0.85, 0.95, 1.00 ($CV = 7.13\%$),无离群值。

2.3 应用实验结果 HCC827, HCC827 D5 和 H1650 细胞的 CDK14 基因相对表达量分别为 1.00, 36.16, 21.55。利用 CDK14 siRNA 干扰 HCC827 D5, HCC827 B3 和 H1650 细胞后的 CDK14 基因相对表达量检测结果见表 1。

3 讨论 CDK14 是近年来发现的一个很有潜力的肿瘤相关基因,进一步探究该基因的生物学功能将为肿瘤的发生、发展研究提供新的视角,同时 CDK14 也有望成为肿瘤治疗的新靶点。简便、快捷、经济、准确的检测 CDK14 基因相对表达水平是开展相关生物学功能研究的重要实验基础。

表 1 siRNA 干扰后各细胞 CDK14 基因相对表达量

细胞名称	对照 siRNA	1 号 siRNA	2 号 siRNA	3 号 siRNA
HCC827D5	1.00	0.58	1.26	1.00
HCC827B3	1.00	0.54	1.11	1.07
H1650	1.00	0.56	1.15	0.71

注:1 号 siRNA 组与对照 siRNA 组间的 CDK14 基因表达差异有统计学意义 ($t = 38.11, P < 0.05$)

目前在信使 RNA 层面的基因表达水平检测主要采用实时荧光定量 PCR 方法,其包括荧光标记探针法和荧光染料法两个子类。使用荧光标记探针的实时荧光定量 PCR 具有特异性强、灵敏度高、成本高的优点,但也有成本高、技术复杂的不足。而使用荧光染料的实时荧光定量 PCR 因无需设计探针且简便、经济的特点成为基因表达水平检测最常用的方法。该研究出于简便、经济的考虑采用了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法。SYBR Green I 是一种最常用的实时荧光定量 PCR 荧光

染料,可特异性与双链 DNA 结合并发出荧光。当在 PCR 反应体系中加入 SYBR Green I 后,随着 PCR 的进行,结合双链 PCR 产物的 SYBR Green I 也同步增多,荧光信号同步增强,通过对荧光信号的实时监测,可实现对待测样品中特定 DNA 序列的定量分析^[5]。此方法虽具简便、经济等优点,但 PCR 扩增的特异性和定量结果的准确性均取决于引物是否特异,因此设计和筛选高特异性的扩增引物十分关键。

真核生物的结构基因为断裂基因,当其转录生成 mRNA 时,会剪切去除内含子序列,因此 mRNA 的序列不包含内含子序列^[8]。当利用 TRIzol 法提取细胞或组织总 RNA 时,可能存在微量的 DNA 残留,而残留的 DNA 可能会导致非特异性扩增的出现。故在设计检测 mRNA 表达水平的 PCR 扩增引物时必须排除基因组 DNA 的影响。在该研究中,CDK14 扩增引物的设计采取了将一条引物横跨在两个外显子上和在扩增产物范围内必须包含内含子的设计策略以期保证引物的特异性。首先,CDK14 下游引物横跨了两个相邻的外显子,即使有基因组 DNA 混杂,由于下游引物并不能与基因组 DNA 稳定结合,故不会产生非特异性扩增。其次,该研究所设计的 CDK14 扩增子包含了一个内含子(长度:7 499 bp)剪切位点,即使有基因组 DNA 混杂,由于非特异性扩增子的长度大大增加而难以有效扩增,故也不会产生非特异性扩增,进一步保证了 PCR 反应的特异性。经电泳鉴定、溶解曲线分析、产物测序实验证明该引物具有良好的特异性,实现了相应设计要求。

基于 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法是基因相对表达量检测的常用方法,但要实现准确的相对定量检测必须满足几个基本条件:其一是必须选定一个在不同的检测样品中表达水平相对稳定的对照基因,目前多选择管家基因作为对照基因;其二是用于检测对照基因与目的基因的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 体系需要具有高特异性且扩增效率接近^[6,9]。该研究选择了常用管家基因 β -Actin 基因作为对照基因,其不同待检样品中均呈稳定的高表达状态,因此满足条件一的要求。另该研究自引物设计和实验结果两个层面验证了 CDK14 与 β -Actin 基因 PCR 扩增体系具有良好的特异性,同时扩增标准曲线显示在检测范围内两扩增体系具有相似的扩增效率,因此也满足了条件二的要求。

在该研究中,通过对检测范围内的系列 cDNA 稀释样品进行 CDK14 基因相对表达量的检测发现结果一致性良好,变异系数仅为 7.13%,与相关

报道接近^[9,10]。另将该检测系统应用于不同样品的 CDK14 基因相对表达量分析和干扰片段干扰效果评估时,该体系也显示了良好的检测效能。

综上所述,该研究成功建立了 CDK14 基因相对定量检测系统,其具有特异性高、重复性好、线性检测范围较宽等优点,可应用于样品间的 CDK14 基因表达差异分析、CDK14 基因干扰效果评估等方面,具有良好的实用价值。

参考文献:

- [1] 朱 军,岳文涛. 肿瘤相关基因 PFTK1[J]. 国际肿瘤学杂志,2013,40(2):100-102.
Zhu J, Yue WT. Tumor associated gene PFTK1[J]. Journal of International Oncology, 2013, 40(2): 100-102.
- [2] Zhang W, Liu R, Tang C, et al. PFTK1 regulates cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Biol Macromol, 2016(85): 405-416.
- [3] Yang L, Zhu J, Huang H, et al. PFTK1 promotes gastric cancer progression by regulating proliferation, migration and invasion[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140451.
- [4] Gu X, Wang Y, Wang H, et al. Upregulated PFTK1 promotes tumor cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer[J]. Med Oncol, 2015, 32(7): 1-13.
- [5] 何维娜, 吕东月, 刘和录, 等. 乙型肝炎病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立及临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(3): 98-101.
He WN, Lü DY, Liu HL, et al. Establishment and application of SYBR green I real-time PCR assay for rapid detection of hepatitis B virus DNA[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(3): 98-101.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene

expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

- [7] 王 倩, 罗 凯. 一种 EGFR 基因突变检测方法的建立及初步应用[J]. 重庆医学, 2014, 43(11): 1351-1353, 1356.
Wang Q, Luo K. Establishment of a method for detecting EGFR gene mutations and its preliminary application[J]. Chongqing Medicine, 2014, 43(11): 1351-1353, 1356.
- [8] 党万太, 周京国, 谢文光. 基因转录剪接体: 潜在的病变位点[J/OL]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(23): 10846-10849.
Dang WT, Zhou JG, Xie WG. Gene transcript variant: potential lesion site[J/OL]. Chinese Journal of Clinicians(Electronic Edition), 2013, 7(23): 10846-10849.
- [9] 舒剑波, 张 瑞, 董 茵, 等. 大鼠 bFGF 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(1): 1-4.
Shu JB, Zhang R, Dong Y, et al. Establishment of the method for detecting rat bFGF mRNA with fluorescence quantitative polymerase chain reaction[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2008, 14(1): 1-4.
- [10] 李明珠, 麦康森, 何 良, 等. 实时荧光定量 PCR 检测皱纹盘鲍 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因表达方法的建立及应用[J]. 水生生物学报, 2014, 38(2): 328-334.
Li MZ, Mai KS, He G, et al. Establishment and application of Real-Time quantitative PCR reaction system for study in gene expression of $\Delta 5$ fatty acyl desaturase in abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(2): 328-334.

收稿日期: 2016-04-03

修回日期: 2016-09-07

(上接 25 页)

- [8] Hu H, Wang C, Jin Y, et al. Alpha-lipoic acid defends homocysteine-induced endoplasmic reticulum and oxidative stress in HAECs[J]. Biomed Pharmacother, 2016(80): 63-72.
- [9] Xiao Y, Su X, Huang W, et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2015(67): 158-166.
- [10] Huo Y, Qin X, Wang J, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: new insight

from a meta-analysis[J]. Int J Clin Pract, 2012, 66(6): 544-551.

- [11] 林丽红, 段 凯, 胡 毅, 等. 64 层螺旋 CT 头颈 CT-A 联合脑 CTP 对诊断急性缺血性脑血管病的临床应用价值[J]. 河北医学, 2014, 20(9): 1485-1488.
Lin LH, Duan K, Hu Y, et al. The diagnosis value of 64 layers spiral CT of head and neck CTA joint brain CTP for acute ischemic cerebrovascular disease [J]. Hebei Medicine, 2014, 20(9): 1485-1488.

收稿日期: 2016-12-09

修回日期: 2017-01-13