

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.003

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190626.1650.034.html(2019-06-27)

荧光定量 PCR 对 FEN1 敲低细胞株转录组测序结果的验证*

苏倩, 吴洁[#], 杜佳慧, 杨凡, 袁濮玉, 刘松柏[△], 邱秀芹[▲]

(苏州卫生职业技术学院苏州检验医学生物技术重点实验室, 苏州 215009)

[摘要] **目的** 探讨 DNA 分枝结构特异性内切酶-1(FEN1)基因敲低细胞株及对照细胞株的差异表达基因,用实时荧光定量 PCR 方法进行结果验证。**方法** 从 293T 野生型及 293T FEN1 敲低细胞株中提取 RNAs,并反转录成 cDNA;挑选 10 个转录组测序中差异表达的基因,设计引物,利用 SYBR Green 染料法,定量检测挑选基因的表达情况。**结果** 挑选的 10 个差异表达基因中,成功扩增了其中 7 个基因;通过实时荧光定量 PCR 方法对两组细胞的 7 个基因进行定量检测发现,与转录组测序结果相比较,其中有 2 个没有明显差异,另外 5 个基因荧光定量方法的检测结果与转录组测序结果一致。**结论** 在细胞内基因表达水平检测中,为提高转录组测序结果的可靠性,还需通过实时荧光定量 PCR 方法对其结果进一步验证。

[关键词] 荧光定量 PCR;FEN1;RNA,信使;转录组;测序;基因敲低技术

[中图分类号] R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)15-2528-04

Verification of transcriptome sequencing of FEN1 knockdown cell line by real-time quantitative PCR*

SU Qian, WU Jie[#], DU Jiahui, YANG Fan, YUAN Puyu, LIU Songbai[△], QIU Xiuqin[▲]

(Suzhou Key Laboratory of Medical Biotechnology, Suzhou Vocational Health College, Suzhou, Jiangsu 215009, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the differentially expressed genes of DNA branching structure-specific endonuclease-1 (FEN1) gene knockdown cell line and control cell line, and verify the results by using the real-time fluorescent quantitative PCR. **Methods** The cDNA fragments were transcribed from the RNAs of 293T wild type and FEN1 knockdown cell lines, ten pairs of primers were designed for the ten selected genes, and the expression of selected genes was quantitatively detected by using the SYBR Green dye method. **Results** Among the 10 differentially expressed genes, seven of them were successfully amplified. And the seven genes of FEN1 gene knockdown cell line and control cell line were detected by using the real-time quantitative PCR, which revealed that there was no significant difference in two of the determination results compared with the mRNA-sequencing data, and the determination results of the other five genes detected by using the real-time quantitative PCR were consistent with the mRNA-sequencing data. **Conclusion** In the detection of intracellular gene expression levels, in order to improve the reliability of transcriptome sequencing results, the results need to be further verified by using the real-time quantitative PCR.

[Key words] real-time quantitative PCR; FEN1; RNA, messenger; transcriptome; sequencing; gene knockdown techniques

DNA 分枝结构特异性内切酶-1(flapp endonuclease 1, FEN1)作为一个结构特异性核酸酶,除在 DNA 复制中起着至关重要的作用外,在 DNA 损伤修复过程中也起着重要作用^[1-4]。目前阐述得较清楚的是在碱基错配修复(base excision repair, BER)及 Pol α 合成错配修复通路(α-segment error editing, AEE)中的功能^[1-5]。前期研究结果显示, FEN1 纯合敲除小鼠胚胎致死,说明 FEN1 功能的重要性^[6]。为研究 FEN1

在细胞代谢过程中的具体功能,研究人员往往采用转染外源 FEN1 表达质粒或干扰 RNA 进入细胞,通过升高或降低 FEN1 表达的方式研究 FEN1 在不同条件下的具体功能^[7-9]。

转录组测序技术又称 RNA 测序(RNA-sequencing, RNA-Seq),是指利用高通量测序技术,快速全方位地获取在某一种条件下某一物种特定组织及器官几乎全部转录本,目前广泛应用于针对不同条件下细胞

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31701198);江苏省自然科学基金项目(BK20170386);江苏省高层次卫生人才“六个一工程”拔尖人才科研项目(LGY2018087);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(17KJB180013);江苏省教育厅大学生实践创新训练项目(201712688006Y);苏州卫生职业技术学院科技创新团队项目(SZWZYTD201804);江苏高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养项目(2017);苏州卫生职业技术学院课题(SZWZY201804)。
作者简介:苏倩(1998-),在读本科,主要从事基因检测方面的研究。 [#] 共同第一作者:吴洁(1997-),在读本科,主要从事蛋白纯化方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: liusongbai@126.com。 [▲] 共同通信作者, E-mail: xqiu@szhct.edu.cn。

内基因表达水平差异的检测,从而研究条件改变引起基因表达改变的群簇,为从分子机制上阐明细胞表型改变的内在驱动力提供依据^[10]。荧光定量 PCR 技术自开发应用以来,因为灵敏、准确、高效、特异等特点一直被作为对特定组织细胞中特定基因数量进行定量的金标准,同时经常被用来验证转录组测序的结果^[11]。为全面研究 FEN1 在细胞中的具体功能,本研究从前期 FEN1 基因敲低细胞株及对照细胞株的转录组测序结果中筛选若干个差异表达的基因,设计引物,利用荧光定量 PCR 技术进行结果验证,为进一步具体分析研究转录组测序数据奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肾上皮细胞系 293T 细胞和本实验构建的 FEN1 敲低细胞 SG67。

1.1.2 主要仪器与试剂 DMEM(高糖)培养基、胎牛血清、胰酶均购自美国 HyClone 公司;RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;FEN1 鼠源一抗、羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自美国 Genetex 公司;反转录试剂盒购自日本 TakaRa 公司;SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂购自瑞士罗氏公司;PCR 引物由上海生工生物工程有限公司进行合成。ABI Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293T 细胞和 SG67 细胞常规复苏后,接种于 50 mL 培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。80% 细胞融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 总 RNA 的提取 取对数生长期细胞,弃培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,用 PBS 吹细胞,收到 1.5 mL EP 管中,3 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,置于一 80 °C 冰箱中或者立即实验。加入适量的 Trizol 试剂,使细胞充分裂解;室温静置 5 min 后,转移到 1.5 mL 离心管中;振荡器剧烈混匀 15 s,室温放置 3 min;再在 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 15 min;提取上清液,在装有上清液的 EP 管中加入等体积异丙醇溶液,充分混匀,室温静置 15~20 min;在 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 10 min,离心后管底絮状沉淀即为 RNA。用无 RNase 水溶解稀释 RNA 样品,紫外吸收法测定总 RNA 的浓度及纯度,样品 RNA 260 nm 与 280 nm 处吸光度(A)值比值(A₂₆₀/A₂₈₀)为 1.8~2.1 之间。变性琼脂糖凝胶电泳评估总 RNA 的完整性。

1.2.3 反转录合成 cDNA 根据反转录试剂盒说明先配制 10 μL 体系:Oligo dT 2 μL、dNTP 2 μL、RNA 4 μL、无 RNase 双蒸水(ddH₂O) 12 μL。65 °C, 5 min,冰上急冷 2 min;取上述溶液 20 μL,加入 5× primer script buffer 8 μL、RNase inhibifor 1 μL、

Primer script 2 μL、无 RNase ddH₂O 9 μL,配成总体系 40 μL。PCR 仪上设计程序:30 °C 30 min,42 °C 30 min,70 °C 15 min,4 °C 10 min。所得溶液置于一 20 °C 保存。

1.2.4 荧光定量 PCR 表达验证

1.2.4.1 转录组测序 通过 Illumina Hiseq 2500 高通量测序平台测序,在 RNA 序列分析中,可将定位到基因组区域的序列数量作为计算基因的表达水平。为了解 293T(Ctrl)和 293T 的 FEN1 敲低细胞(FEN1KD)中基因表达差异情况,本研究采用 RSEM 软件计算基因表达水平,衡量基因表达水平的标准为 FPKM 值。在构建 cDNA 文库时,FPKM 值将随机打断的片段作为分析单位,并把 FPKM 值作为基因在细胞中的表达水平。3 次独立重复实验,根据转录组测序结果找出差异表达的基因。

1.2.4.2 引物设计 根据高通量测序结果,筛选出 10 个预测有表达差异基因序列,利用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计,并经上海生工生物工程有限公司进行合成。通过常规 PCR 反应对目的片段进行扩增,并摸索反应最适条件。具体实验过程根据 Takara PCR 试剂盒的说明书进行操作。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物信息

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
SLC7A3	上游:TTGGTCTCTGGGTTCTGTC	343
	下游:AGTAAGGCATCATCAGGGT	
MAGEB2	上游:AGGACCCGAGCGAGTGTA	255
	下游:GAATGCCAGCAGCAGGAG	
HBE1	上游:TGTGGAGCAAGATGAATGT	316
	下游:CCAAAGTGAGTAGCCAGAAT	
SLC6A11	上游:CTGCTGATCCTCTGATAACGA	246
	下游:GAAGCTGGTGCCGCTGTT	
KRTAP19	上游:ATCCATTCTATTCGCTTCA	125
	下游:GATTTACAGGTGACGGACT	
GYPC	上游:GCTGACGCCAGGAATGT	364
	下游:TCTTGAGGGCAGGGTCT	
ITPKB	上游:TGGTGGATGTGCTGAGGC	454
	下游:CGATAGGCGATCAGGATGTT	
SPINT1	上游:AATACACGAGTGGCTTTGACG	354
	下游:TGAAGAAGCAGTAAACCAAGAT	
EVA1C	上游:CACCTATGCTGTGATGG	249
	下游:GGTCGCAGAGTAGATGTTG	
TAL1	上游:GCACCTGGTCTCTGTAACG	369
	下游:AAGAACCCGCTGCCGAGA	

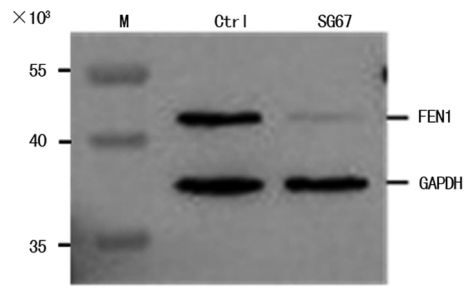
1.2.4.3 荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法进行荧光定量 PCR,验证转录组测序结果的准确性。以反转录产物 cDNA 为模板,严格按照罗氏荧光定量反

应试剂盒说明书进行实验操作。每个模板设置 3 个复孔,每个基因设置 3 个阴性对照,总反应体系为 20 μ L,反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。独立 3 次重复实验。荧光定量 PCR 扩增挑选基因所用引物与表 1 引物序列相同。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。荧光定量 PCR 结果用 GraphPad Prism 软件作图。采用 $\Delta\Delta$ Ct 法计算基因相对表达水平,基因的相对表达水平以 $\bar{x}\pm s$ 表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FEN1 敲低细胞系验证 通过蛋白质印迹法(Western blot)检测 293T 细胞和 SG67 细胞表达 FEN1 蛋白情况,结果显示与对照 293T 细胞相比,SG67 细胞的 FEN1 蛋白表达水平明显下降,见图 1。



M:蛋白标记物

图 1 FEN1 敲低细胞株 SG67 的 FEN1 蛋白表达

2.2 转录组结果与分析 通过 Illumina Hiseq 2500 高通量测序平台对 293T(Ctrl)和 293T 的 FEN1 敲低细胞(FEN1KD)进行转录组测序,并从转录组测序结果中筛选出 10 个差异表达的基因,其表达水平见表 2。

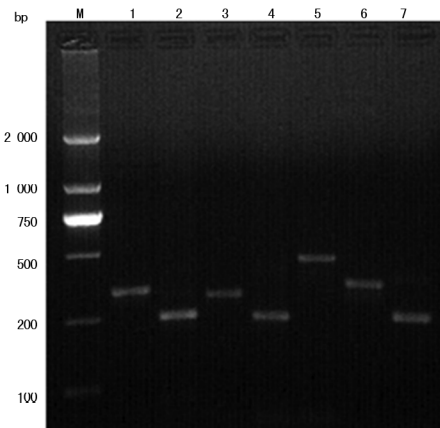
表 2 转录组测序预测的基因表达水平

细胞	SLC7A3	MAGEB2	HBE1	SLC6A11	KRTAP19
Ctrl	0.949 165 \pm 0.089 447	1.122 850 \pm 0.143 561	1.064 990 \pm 0.332 312	2.930 460 \pm 0.098 501	4.789 950 \pm 0.998 726
FEN1KD	0	0	0	0	0
P	5.00 \times 10 ⁻⁵	5.00 \times 10 ⁻⁵	5.00 \times 10 ⁻⁵	5.00 \times 10 ⁻⁵	5.00 \times 10 ⁻⁵

续表 2 转录组测序预测的基因表达水平

细胞	GYPC	ITPKB	SPINT1	EVA1C	TAL1
Ctrl	3.491 400 \pm 0.275 887	0.069 211 \pm 0.016 159	0.080 048 \pm 0.056 791	0.116 691 \pm 0.080 734	0.122 371 \pm 0.072 396
FEN1KD	0	0.880 637 \pm 0.229 150	1.831 670 \pm 0.063 303	0.758 406 \pm 0.179 421	0.888 121 \pm 0.105 156
P	5.00 \times 10 ⁻⁵	5.00 \times 10 ⁻⁵	0.000 2	0.000 8	5.00 \times 10 ⁻⁵

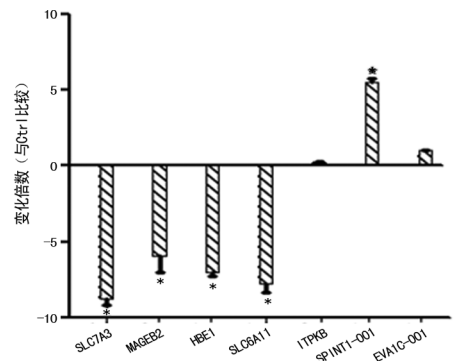
2.3 筛选基因 PCR 扩增结果 选取 293T 细胞的 cDNA 经普通 PCR 扩增 10 个基因,程序设定:95 $^{\circ}$ C 15 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环。琼脂糖凝胶电泳结果显示,LC7A3、MAGEB2、HBE1、SLC6A11、ITPKB、SPINT 和 EVA1C 等 7 个基因都有表达,且条带单一,见图 2。



M:DL 2000;1:SLC7A3;2:MAGEB2;3:HBE1;4:SLC6A11;5:ITPKB;6:SPINT1;7:EVA1C

图 2 293T 细胞中差异表达基因的 PCR 产物电泳图

2.4 筛选基因荧光定量检测结果 根据转录组测序及普通 PCR 结果,选取在两种细胞中差异表达并经普通 PCR 扩增的条带单一的 7 个基因,通过荧光定量 PCR 检测这 7 个基因分别在 293T 和 SG67 细胞中的表达情况,每个基因的扩增进行了 3 次实验重复。荧光定量 PCR 结果显示与转录组测序结果基本一致。利用定量 PCR 检测方法发现 ITPKB 与 EVA1C 基因在两种细胞株中表达虽然有差异,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3、图 3。



*: $P<0.05$,与 Ctrl 比较

图 3 与 Ctrl 比较 FEN1KD 荧光定量数据分析结果

表 3 与 Ctrl 比较 FEN1KD 荧光定量数据分析结果

基因	变化倍数	t	P
SLC7A3	-8.80	18.00	<0.01
MAGEB2	-6.00	12.00	<0.01
HBE1	-7.00	14.00	<0.01
SLC6A11	-7.80	15.00	<0.01
ITPKB	0.23	0.47	>0.05
SPINT1-001	5.50	11.00	<0.01
EVA1C-001	1.00	2.00	>0.05

3 讨论

基因组 DNA 携带着生命近乎完整的信息,却时刻面临着各种的损伤危险。这些致使 DNA 损伤的因素包括来自内源的代谢产物与来自体外环境来源的持续攻击^[12-13]。FEN1 作为分枝结构特异性核酸酶,在 DNA 复制冈崎片段成熟过程中起着不可替代的作用。同时,FEN1 在 DNA 修复通路中也具有重要作用。FEN1 纯合敲除小鼠模型胚胎致死。因此,为研究 FEN1 在低表达情况下细胞内基因的表达差异,以及所影响的细胞内代谢通路改变情况,本课题组前期构建了 FEN1 敲低细胞株 SG67,并利用转录组测序方法对 SG67 及野生型对照细胞进行了转录组水平基因差异表达比较,获取了大量的基因表达差异数据。

为验证转录组测序结果的可靠性,本研究采用了目前相对灵敏、准确的荧光定量 PCR 方法。从选择的 10 个差异基因中,成功设计了其中 7 个基因的扩增引物,并得到了单一可靠的 DNA 条带。荧光定量分析结果与转录组测序结果相比较,7 个基因的表达差异性均为一致。然而,ITPKB 与 EVA1C 两个基因利用荧光定量 PCR 方法在两种细胞株中检测到表达有差异,但差异无统计学意义($P>0.05$),反映转录组学数据后续定量 PCR 检验的必要性。另外检测的 5 个基因中,SLC7A3 及 SLC6A11 均属于可溶性载体蛋白家族,对氨基酸的转运具有重要作用^[14]。MAGEB2 基因属于黑色素瘤超级家族成员,在肿瘤的发生过程中起重要作用^[15]。HBE1 基因为血红蛋白的一个亚基,连同以上几个基因均在 FEN1 敲低细胞株中表达下降,说明 FEN1 的下降导致蛋白转运功能受阻,肿瘤发生等相关基因的表达发生改变。在 FEN1 敲低细胞株中表达上调的 SPINT1 基因属于细胞生长因子激活物的抑制剂,具体调控机制还有待进一步的研究^[16]。

综上所述,本研究为进一步开发、分析转录组测序结果的可行性奠定了基础,为进一步研究 FEN1 在细胞内的代谢通路情况奠定了基础。

参考文献

[1] LIU S, LU G, ALI S, et al. Okazaki fragment maturation involves alpha-segment error editing by the mammalian FEN1/MutSalpa functional complex[J]. EMBO J, 2015, 34(13):1829-1843.

[2] GUO Z, KANJANAPANGKA J, LIU N, et al. Sequential posttranslational modifications program FEN1 degradation during cell-cycle progression[J]. Mol Cell, 2012, 47(3):444-456.

[3] BALAKRISHNAN L, BAMBARA R A. Flap endonuclease 1[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82:119-138.

[4] ZAHER M S, RASHID F, SONG B, et al. Missed cleavage opportunities by FEN1 lead to Okazaki fragment maturation via the long-flap pathway[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(6):2956-2974.

[5] SUN H, HE L, WU H, et al. The FEN1 L209P mutation interferes with long-patch base excision repair and induces cellular transformation[J]. Oncogene, 2017, 36(2):194-207.

[6] HARRINGTON J J, LIEBER M R. The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease[J]. EMBO J, 1994, 13(5):1235-1246.

[7] ZOU J, ZHU L, JIANG X, et al. Curcumin increases breast cancer cell sensitivity to cisplatin by decreasing FEN1 expression[J]. Oncotarget, 2018, 9(13):11268-11278.

[8] ZENG X, CHE X, LIU Y P, et al. FEN1 knockdown improves trastuzumab sensitivity in human epidermal growth factor 2-positive breast cancer cells[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4):3265-3272.

[9] ZHANG Y, WEN C, LIU S, et al. Shade avoidance 6 encodes an Arabidopsis flap endonuclease required for maintenance of genome integrity and development[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(3):1271-1284.

[10] COSTA-SILVA J, DOMINGUES D, LOPES F M. RNA-Seq differential expression analysis: an extended review and a software tool[J]. PLoS One, 2017, 12(12):e0190152.

[11] MOREIRA O C, YADON Z E, CUPOLILLO E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: current status and perspectives[J]. Acta Trop, 2018, 184:29-37.

[12] AGUILERA A, GARCIA-MUSE T. Causes of genome instability[J]. Annu Rev Genet, 2013, 47:1-32.

[13] DA SILVA J. DNA damage induced by occupational and environmental exposure to miscellaneous chemicals[J]. Mutat Res, 2016, 770(Pt A):170-182.

[14] LOWMAN X H, HANSE E A, YANG Y, et al. p53 promotes cancer cell adaptation to glutamine deprivation by upregulating Slc7a3 to increase arginine uptake[J]. Cell reports, 2019, 26(11):3051-3060.

[15] NOBEYAMA Y, NAKAGAWA H. Aberrant demethylation and expression of MAGEB2 in a subset of malignant peripheral nerve sheath tumors from neurofibromatosis type 1[J]. J Dermatol Sci, 2016, 81(2):118-123.

[16] PARK S Y, LEE S J, CHO H J, et al. Epsilon-globin HBE1 enhances radiotherapy resistance by down-regulating BCL11A in colorectal cancer cells[J]. Cancers, 2019, 11(4):1-17.