

文章编号: 1674-7054(2019)02-0178-06

# CHRNA7 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立

刘益巧 孙志华 钱江 长孙东亭 罗素兰

(海南大学 海洋学院/海南大学热带生物资源教育部重点实验室/海口市海洋药物重点实验室,海口 570228)

**摘要:** 为了检测烟碱型乙酰胆碱受体(nicotine acetylcholine receptors, nAChRs)  $\alpha 7$  亚基基因(CHRNA7)的表达,笔者根据人源 CHRNA7 基因序列设计引物,PCR 扩增 CHRNA7 基因,亚克隆到 pMD-18T 载体中后,测序鉴定并制备重组质粒,以梯度稀释的重组质粒为模板,进行荧光定量 PCR 来绘制标准曲线,并进行灵敏度和重复性实验,成功建立了检测 CHRNA7 基因的荧光定量 PCR 方法。该方法最低可检测  $10^1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,且重复性良好,在  $10^4, 10^5, 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时 5 次重复的变异系数分别是 1.22%、1.90%、2.63%。此外,还对人宫颈癌细胞 SiHa 和人正常宫颈细胞 Ect1/E6E7 中  $\alpha 7$  nAChR 亚基基因表达量进行检测,结果显示,  $\alpha 7$  nAChR 亚基在 SiHa 细胞系的表达明显低于其在 Ect1/E6E7 细胞系中的表达( $P=0.015$ )。

**关键词:**  $\alpha 7$  nAChR; 宫颈癌; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.013

烟碱型乙酰胆碱受体(nAChRs)是五聚体离子通道,由  $\alpha$ ( $\alpha 1 \sim \alpha 10$ )和  $\beta$ ( $\beta 1 \sim \beta 4$ )亚基组合构建,一般形成异源五聚体,也有一些亚基可以形成同源五聚体( $\alpha 7, \alpha 9$ )<sup>[1]</sup>。nAChRs 广泛表达于各种肿瘤细胞中,参与细胞增殖、血管生成、凋亡、迁移、侵袭和分泌的调节<sup>[2-3]</sup>。 $\alpha 7$  nAChR 是研究最多的亚型,它是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性信号通路(如 PKA, PKC, PI3K/Akt 和 MAPK 等)的重要通道<sup>[4]</sup>。研究表明,  $\alpha 7$  nAChR 在肺癌、膀胱癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌和胆管癌等多种肿瘤细胞中表达,与这些癌症密切相关<sup>[5-10]</sup>。但  $\alpha 7$  nAChR 在宫颈癌中的表达情况研究甚少。CALLEJA-MACIAS<sup>[11]</sup>等人也仅通过常规的 RT-PCR 方法,对人宫颈癌细胞系中  $\alpha 7$  nAChR 亚基的 mRNA 水平进行了检测,但未进行定量检测。若要对  $\alpha 7$  nAChR 亚基在宫颈(癌)细胞中 mRNA 水平的表达进行定量检测,从而进一步研究该亚基在宫颈癌中的作用,就需要一种能准确定量的检测方法。荧光定量 PCR 检测方法简便准确,已广泛用于多种基因如癌基因和免疫调节基因的检测与表达分析<sup>[12-13]</sup>。因此,笔者根据人源 CHRNA7 基因序列设计引物,PCR 扩增 CHRNA7 基因,亚克隆到 pMD-18T 载体中后,测序鉴定并制备重组质粒,试图建立一套标准的荧光定量 PCR 方法,旨在为进一步研究  $\alpha 7$  nAChR 在宫颈癌中的作用机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与试剂** 人宫颈癌细胞系 SiHa 和人正常宫颈细胞系 Ect1/E6E7 购自 ATCC 细胞库。胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司,细胞培养皿、DMEM 培养基、 $1 \times$  PBS 缓冲液、 $100 \times$  青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶细胞消化液、4S Red Plus 核酸染色剂( $10\,000 \times$  水溶液)购自上海生工生物工程股份有限公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 购自美国 Thermo Scientific 公司; Easy Taq DNA Polymerase 购自北京全式金生物公司; SYBR Green I Master 购自瑞士 ROCHE 公司; 胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 克隆载体 pMD-18T 购自 TaKaRa; 琼脂糖购自

收稿日期: 2019-03-25

修回日期: 2019-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872794)

作者简介: 刘益巧(1994-),女,海南大学海洋学院 2016 级硕士研究生, E-mail: 576494486@qq.com

通信作者: 罗素兰(1969-),女,教授,博导,研究方向: 海洋药物与生物技术, E-mail: luosulan2003@163.com

德国 BioFROXX 公司; DNA Marker 购自北京天根生化科技有限公司; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  由笔者所在实验室保存 其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验仪器 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱( SANYO); 多功能微量高速冷冻离心机( HITACHI); Nanodrop 2000 ( Thermal Scientific); PCR 扩增仪( Applied Biosystems); 电泳槽( Bio-Rad); 凝胶成像仪( Alpha); qTOWER<sup>3</sup>G 荧光定量 PCR 仪( Analtikjena)。

1.3 引物设计 根据在 GenBank 中搜索到的人源 *CHRNA7* 基因序列设计引物,即上游引物: 5'-CCAC-CAACATTTGGCTGCAA-3',下游引物: 5'-TATGCCTGGAGGCAGGTACT-3'。预期扩增目的片段的长度为 218 bp 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 细胞培养 将 SiHa 和 Ect1/E6E7 细胞复苏于 6 cm 的培养皿中,在 37 °C  $\varphi = 5\%$  的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 培养液为  $w = 10\%$  FBS 的 DMEM。在倒置显微镜下,每日观察细胞的形态及其生长状态 待细胞处于对数生长期时,用胰酶消化细胞进行传代。

1.5 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 待细胞处于对数生长期时 吸弃旧培养液,用 1 × PBS 缓冲液润洗细胞 3 次后,使用 Trizol 试剂裂解细胞并按照说明书提取细胞总 RNA。Nanodrop 2000 测定总 RNA 浓度、 $OD_{260/280}$  以及  $OD_{260/230}$  的值,通过  $w = 1\%$  的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳确定提取的总 RNA 的完整性。将纯度较高、完整性较好的总 RNA 反转录成 cDNA,反转录体系为 20  $\mu$ L: 10 × RT Buffer 2  $\mu$ L 25 × dNTP Mix( 100 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.8  $\mu$ L 10 × RT Random Primers 2  $\mu$ L MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 1  $\mu$ L RNase Inhibitor 1  $\mu$ L Nuclease-free H<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L 混匀 加入上述提取的总 RNA 10  $\mu$ L( 400 mg · L<sup>-1</sup>)。PCR 反应条件: 25 °C 10 min 37 °C 120 min 85 °C 5 min。产物保存于 -20 °C 备用。

1.6 目的片段的扩增及回收 以合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *CHRNA7* 基因。PCR 反应体系( 25  $\mu$ L): 模板 1  $\mu$ L,上游和下游引物( 10  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5  $\mu$ L,10 × Easy Taq Buffer 2.5  $\mu$ L,Easy Taq DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 2  $\mu$ L, Nuclease-free Water 18  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 预变性 94 °C 5 min; 然后 94 °C 30 s 58 °C 30 s 72 °C 40 s 35 个循环; 最终延伸 72 °C 7 min。PCR 产物经  $w = 1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒回收目的片段。

1.7 标准品的制备 将回收的目的片段连接到 pMD18-T 载体上,连接体系为: 目的片段 4.5  $\mu$ L, Solution I 5  $\mu$ L, pMD-18T 载体 0.5  $\mu$ L 4 °C 连接过夜。将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态,在含有 AMP( 50 mg · L<sup>-1</sup>) 的 LB 平板上筛选阳性克隆。经菌液 PCR 鉴定后,将阳性克隆的菌液送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。测序鉴定正确后,提取质粒, Nanodrop 2000 测定质粒的浓度,计算质粒的拷贝数( 质粒拷贝数( copies ·  $\mu$ L<sup>-1</sup>) =  $6.02 \times 10^{23} \times$  质粒浓度 / [( 质粒相对分子质量 + 插入片段相对分子质量) × 660 ] )。

1.8 荧光定量 PCR 反应条件的优化 以 10<sup>5</sup> copies ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> 质粒标准品为模板,设立 10  $\mu$ L 的初始反应体系: 上、下游引物各 0.2  $\mu$ L SYBR Green I 5  $\mu$ L 模板 1  $\mu$ L, Nuclease-free H<sub>2</sub>O 3.6  $\mu$ L。初始反应条件为: 95 °C 5 min( 1 个循环); 95 °C 10 s 60 °C 30 s( 40 个循环)。

循环数的优化: 通过查阅文献,将循环数分别设置为 35 40 45 进行荧光定量 PCR 反应,选择 *Ct* 值最低且熔解曲线为单峰时的循环数作为最终循环数。

退火温度的优化: 根据所设计引物的 *T<sub>m</sub>* 值,在 55 ~ 65 °C 范围内根据梯度确定合适的退火温度,荧光定量 PCR 仪在该范围自动设置温度梯度为 55.0 55.9 57.0 58.2 59.4 60.6 61.8 63.0 64.1 65 °C,以这些温度为退火温度进行荧光定量 PCR 反应,选择 *Ct* 值最低且熔解曲线为单峰时的退火温度作为最终退火温度。

1.9 荧光定量 PCR 标准曲线的建立及灵敏度试验 为了建立标准曲线并确定检测方法能检测到的最小拷贝数,用经灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 将质粒进行 10 倍稀释,分别以 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> copies ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> 的质粒标准品为模板,按照 1.8 优化后的条件进行荧光定量 PCR 反应。以拷贝数的对数值为横坐标,循环阈值( *Ct*) 为纵坐标建立标准曲线。

1.10 重复性试验 连续以 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> copies ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> 的质粒标准品为模板作 5 次重复的荧光定量 PCR 反应,按照公式计算变异系数( 变异系数 = 标准偏差 / 平均数) 以判断检测体系稳定性。

1.11 样品检测 用上述建立的荧光定量 PCR 方法对 SiHa 和 Ect1/E6E7 细胞进行检测。以各细胞 4  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应 2 株细胞各重复 3 次实验。

## 2 结果与分析

2.1  $\alpha 7$  nAChR 亚基的 PCR 扩增及验证 提取总 RNA 后经 Nanodrop 2000 测定,每株细胞的  $OD_{260/280}$  以及  $OD_{260/230}$  的比值约为 2,表明提取的总 RNA 纯度较高,多酚和碳水化合物含量低。经  $w = 1\%$  甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步检测后,观察到 28 s,18 s,5 s 条带,总 RNA 虽有降解,但不严重,对后续 PCR 扩增检测影响较小(图 1)。将此总 RNA 反转录成 cDNA,用 *CHRNA7* 基因引物对其进行 PCR 扩增,经  $w = 1.5\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像仪显示,有特异性条带出现,位置与预期大小 218 bp 相符(图 2)。菌液 PCR 及测序验证该扩增产物确为目的片段。

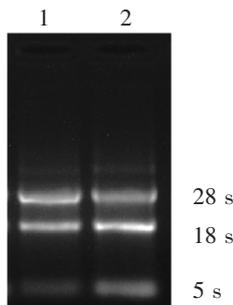


图 1 细胞总 RNA 电泳图

1. 人宫颈癌细胞系 SiHa;
  2. 人正常宫颈细胞系 Ect1/E6E7
- Fig.1 Detection of total RNA in cells

1. Human cervical cancer cell line SiHa;

2. Human normal ectocervical cell line Ect1/E6E7

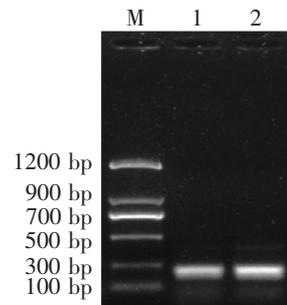


图 2 PCR 扩增 *CHRNA7* 基因

M. DNA 相对分子质量标准 1200;

1. 人宫颈癌细胞系 SiHa 的 PCR 产物;
2. 人正常宫颈细胞系 Ect1/E6E7 的 PCR 产物

Fig.2 PCR amplification of *CHRNA7* gene

1. PCR product of human cervical cancer cell line SiHa;

2. PCR product of human normal ectocervical cell line Ect1/E6E7

2.2 反应条件的优化 荧光定量 PCR 的循环数与反应的灵敏度有关( $C_t$  值小灵敏度高)。从表 1 可知,循环数为 45 时,其熔解曲线为单峰, $C_t$  值最小,故最优循环数为 45。

合适的退火温度会增加荧光定量 PCR 反应的特异性,使所得结果更准确。从图 3 可知,除 65  $^{\circ}\text{C}$  外(其  $C_t$  值太低未检测到),各温度所产生的熔解曲线都为单峰, $T_m$  值都均一,且在 59.4  $^{\circ}\text{C}$  和 60.6  $^{\circ}\text{C}$  时,其  $C_t$  值较小,故最优的退火温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ 。

经过对反应条件的优化,最终确定的反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min(1 个循环);95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s(45 个循环)。

表 1 *CHRNA7* 基因荧光定量 PCR 检测方法循环数的优化

Tab.1 Optimization of cycle number of real-time PCR detection of *CHRNA7* gene

循环数 Cycles	$C_t$ 值	熔解温度 $T_m / ^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
35	20.27	78.58
40	19.57	78.65
45	17.7	78.75

2.3 标准曲线的建立及灵敏度 Nanodrop 2000 测定得到质粒标准品质量浓度为 152.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,按照 1.7 公式计算其拷贝数为  $(4.79\text{E} + 10)$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,将其稀释成  $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,用上述优化的反应条件进行荧光定量 PCR。以  $\alpha 7$  nAChR-Ect1/E6E7 拷贝数的对数值作为横坐标, $C_t$  值作为纵坐标建立标准曲线。建立的标准曲线回归方程为: $y = -3.6834x + 37.272$ ,  $R^2 = 0.9951$ ,表明在  $(10^1 \sim 10^6)$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  范围内具有良好的线性关系。当拷贝数为最低值  $10^1$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时,反应有荧光信号, $C_t$  值为 33.49。故此方法最低可以定量  $10^1$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的目的基因(图 4)。

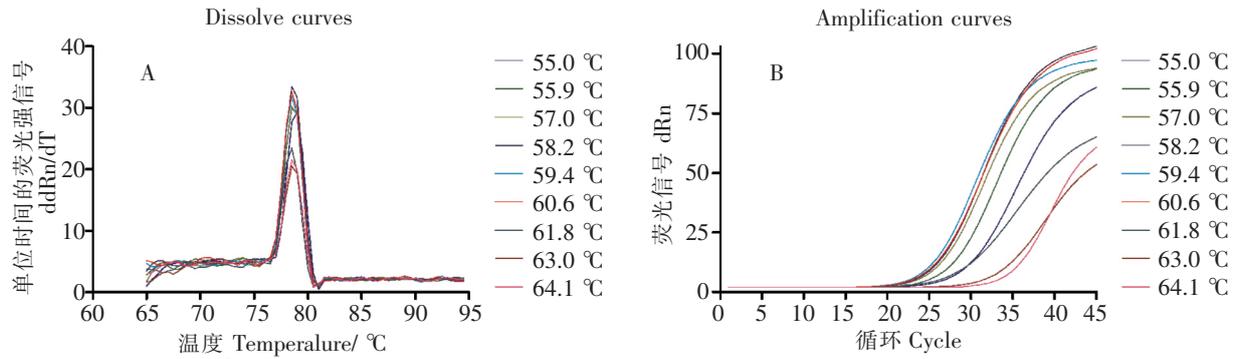


图 3 *CHRNA7* 基因荧光定量 PCR 检测方法之退火温度的优化

A. *CHRNA7* 基因荧光定量 PCR 各温度的溶解曲线; B. *CHRNA7* 基因荧光定量 PCR 各温度的扩增曲线

Fig.3 Optimization of annealing temperature for detection of *CHRNA7* gene by qPCR

A. Dissolve curves of qPCR for *CHRNA7* gene at different annealing temperatures; B. Amplification curves of qPCR for *CHRNA7* gene at different annealing temperatures

2.4 重复性试验 对  $10^4, 10^5, 10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的质粒标准品连续进行 5 次荧光定量 PCR 反应, 所得的 *Ct* 平均值分别为 23.01, 18.46, 14.46, 变异系数分别为 1.22%, 1.90%, 2.63%。3 个拷贝数的变异系数均小于 5%, 说明所建立的方法重复性较好(表 2)

表 2 *CHRNA7* 基因荧光定量 PCR 检测方法重复性分析

Tab.2 Repeatability analysis of real-time PCR detection of *CHRNA7* gene

起始拷贝数 Initial copies / ( $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	<i>Ct</i> 1	<i>Ct</i> 2	<i>Ct</i> 3	<i>Ct</i> 4	<i>Ct</i> 5	<i>Ct</i> 平均值	标准差 <i>SD</i>	变异系数 <i>CV</i> /%
$10^4$	23.31	22.84	23.1	23.17	22.62	23.01	0.28	1.22
$10^5$	18.47	18.42	18.75	18.74	17.9	18.46	0.35	1.90
$10^6$	14.22	14.46	14.82	14.85	13.96	14.46	0.38	2.63

2.5 样品检测 对 SiHa 细胞系和 Ect1/E6E7 细胞系进行荧光定量 PCR 的检测结果显示, 与 Ect1/E6E7 细胞系相比  $\alpha 7$  nAChR 亚基在 SiHa 细胞系中的表达明显低 ( $P = 0.015$ ) (图 5)。SiHa 细胞系和 Ect1/E6E7 细胞系的平均起始拷贝数分别为  $15\ 618.53 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  和  $27\ 236.9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (表 3)。

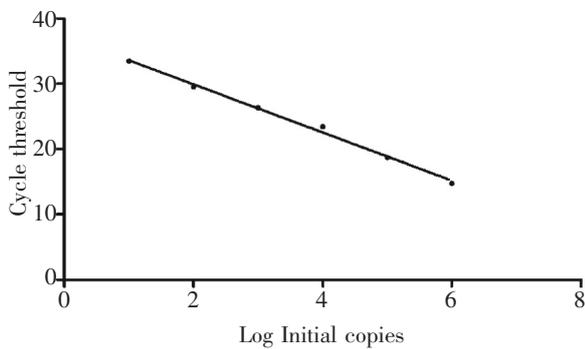


图 4 荧光定量 PCR 灵敏度及标准曲线

Fig.4 The sensitivity and standard curve of the real-time PCR

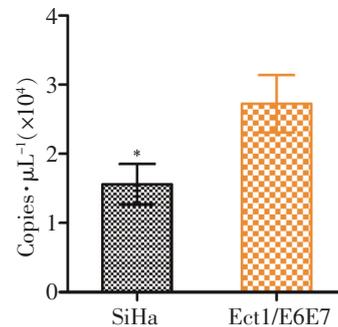


图 5 *CHRNA7* 基因在宫颈(癌)细胞系中的表达情况

\* 与正常宫颈细胞系相比,  $P < 0.05$

Fig.5 Expression of *CHRNA7* gene in cervical (cancer) cell lines

\* Compared with human normal cervical cell line,  $P < 0.05$

表 3 *CHRNA7* 基因表达的起始拷贝数

Tab.3 Initial copies of *CHRNA7* gene

细胞系 Cell line	<i>Ct</i> 值	起始拷贝数 / ( $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) Initial copies
SiHa	$21.89 \pm 0.33$	$15\ 618.53 \pm 2\ 934.08$
Ect1/E6E7	$20.97 \pm 0.23$	$27\ 236.90 \pm 4\ 150.30$

### 3 讨论

nAChRs 是经典的配体门控离子通道,广泛表达于神经肌肉接头、中枢和外周神经系统以及非神经性组织和细胞中,在机体内发挥着重要作用。 $\alpha 7$  nAChR 作为 nAChRs 中的一种特殊亚型,具有通道开放概率低、浓度依赖性快速脱敏和钙通透性高的特点<sup>[14-15]</sup>。越来越多的研究表明, $\alpha 7$  nAChR 是多种癌症的潜在治疗靶点<sup>[16-17]</sup>。研究  $\alpha 7$  nAChR 在宫颈癌细胞与正常宫颈细胞的表达并分析表达差异有助于了解  $\alpha 7$  nAChR 与宫颈癌的关系。

基因 mRNA 水平表达的检测方法主要有 PCR、Northern blot、基因芯片和荧光定量 PCR<sup>[11,18-20]</sup>。在这几种方法中,PCR 常用作定性检测,Northern blot 虽然可定量检测,但操作复杂且整个过程持续时间长,基因芯片主要用于 mRNA 表达谱检测,而荧光定量 PCR 作为一种经典的分子生物学定量检测方法,在医学、微生物学、兽医学、农业、药理学和毒理学等领域广泛应用<sup>[21]</sup>。荧光定量 PCR 是通过测量荧光染料与 PCR 产物结合引起的荧光增加,在反应过程中连续测定扩增产物的积累来实现对模板的定量,具有精确度高、动态范围高和特异性强的优点,整个反应过程一步完成,无对反应产物进行后期处理的过程,大大避免了后期污染和假阳性的发生<sup>[22-23]</sup>。

SYBR Green 法和 Taqman 探针法是荧光定量 PCR 常用的 2 种方法,其中,SYBR Green 法应用简便且成本低,然而任何种类的双链 DNA 都能与它结合,导致引物二聚体产生的几率增加<sup>[24]</sup>。引物二聚体能与 SYBR Green 结合并且产生荧光信号,这会降低检测方法的敏感性,故要避免引物二聚体的出现。本研究建立的宫颈癌中  $\alpha 7$  nAChR 亚基的荧光定量 PCR 方法,通过对循环数、退火温度进行优化,扩增产生的熔解曲线为单峰且  $T_m$  值比较平均,有效地避免了引物非特异性扩增的出现。此外,该方法敏感性高,检测限最低检测量为 10 拷贝数的目的基因。标准曲线回归方程的  $R^2 = 0.9951$ ,所检测的范围为  $(10^1 \sim 10^6)$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,通过将测得的  $C_t$  值代入标准曲线回归方程能准确地计算出目的基因的起始拷贝数,可以用于  $\alpha 7$  nAChR 亚基的定量检测。对 SiHa 和 Ect1/E6E7 细胞系的检测结果显示, SiHa 细胞系的平均起始拷贝数为 15 618.53 copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ , Ect1/E6E7 细胞系的平均起始拷贝数为 27 236.9 copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,统计学分析结果表明两者存在差异, $\alpha 7$  nAChR 在癌细胞 SiHa 中的表达显著低于其在正常细胞 Ect1/E6E7 中的表达。

综上所述,笔者所建立的  $\alpha 7$  nAChR 亚基的荧光定量 PCR 方法,其操作方便快捷、敏感性高、检测结果准确,可以用于 *CHRNA7* 基因的表达检测。

### 参考文献:

- [1] KALAMIDA D, POULAS K, AVRAMOPOULOU V, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity [J]. FEBS J., 2007, 274(15): 3799-3845.
- [2] EGLETON R D, BROWN K C, DASGUPTA P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis [J]. Trends Pharmacol Sci., 2008, 29(3): 151-158.
- [3] DANG N, MENG X, SONG H. Nicotinic acetylcholine receptors and cancer [J]. Biomed Rep., 2016, 4(5): 515-518.
- [4] SUZUKI T, HIDE I, MATSUBARA A, et al. Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role [J]. J. Neurosci Res., 2006, 83(8): 1461-1470.
- [5] MEI D, ZHAO L, CHEN B, et al.  $\alpha$ -Conotoxin ImI-modified polymeric micelles as potential nanocarriers for targeted docetaxel delivery to alpha7-nAChR overexpressed non-small cell lung cancer [J]. Drug Deliv., 2018, 25(1): 493-503.
- [6] CHEN R J, HO Y S, GUO H R, et al. Rapid Activation of Stat3 and ERK1/2 by Nicotine Modulates Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells [J]. Toxicological Sciences, 2007, 104(2): 283-293.
- [7] WEI P L, CHANG Y J, HO Y S, et al. Tobacco-specific carcinogen enhances colon cancer cell migration through alpha7-nicotinic acetylcholine receptor [J]. Ann Surg., 2009, 249(6): 978-985.
- [8] WANG W, CHIN-SHENG H, KUO L J, et al. NNK enhances cell migration through alpha7-nicotinic acetylcholine receptor accompanied by increased of fibronectin expression in gastric cancer [J]. Ann Surg Oncol., 2012, 19(S3): 580-S588.
- [9] JIN T, HAO J, FAN D. Nicotine induces aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic epithelial ductal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun., 2018, 499(4): 934-940.
- [10] MARTINEZ A K, JENSEN K, HALL C, et al. Nicotine promotes cholangiocarcinoma growth in xenograft mice [J]. Am J.

- Pathol ,2017 ,187( 5) : 1093 – 1105.
- [11] CALLEJA-MACIAS I E , KALANTARI M , BERNARD H U. Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: an explanation for the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? [J]. Int. J. Cancer ,2009 ,124( 5) : 1090 – 1096.
- [12] 王晓楠,程民,胡世莲. 鳞状细胞癌抗原 1 mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法建立与应用[J]. 中华肿瘤防治杂志,2018 ,25( 7) : 471 – 475.
- [13] 张敬梅,顾亦韧,李江凌,等. 乌金猪、青峪猪和成华猪免疫器官多种免疫调节基因表达的比较[J]. 畜牧与兽医,2018 ,50( 10) : 43 – 48.
- [14] PAPKE R L , PORTER PAPKE J K. Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis[J]. Br. J. Pharmacol ,2002 ,137( 1) : 49 – 61.
- [15] UTESHEV V V. alpha7 nicotinic ACh receptors as a ligand-gated source of  $Ca^{2+}$  ions: the search for a  $Ca^{2+}$  optimum[J]. Adv Exp. Med. Biol. ,2012 ,740: 603 – 638.
- [16] GRANDO S A. Connections of nicotine to cancer[J]. Nat. Rev. Cancer ,2014 ,14( 6) : 419 – 429.
- [17] ZHAO Y. The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors [J]. J. Oncol ,2016( 2) . doi: 10.1155/2016/9650481.
- [18] CUI H , LAN X , LU S , et al. Preparation of monoclonal antibody against human KIAA0100 protein and Northern blot analysis of human KIAA0100 gene [J]. J. Pharm Anal ,2017 ,7( 3) : 190 – 195.
- [19] GUO Y , XIE X , GUO C , et al. Effect of electro-acupuncture on gene expression in heart of rats with stress-induced pre-hypertension based on gene chip technology [J]. J. Tradit Chin Med ,2015 ,35( 3) : 285 – 294.
- [20] LI W F , DAI H , OU Q , et al. Overexpression of microRNA-30a-5p inhibits liver cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting MTDH/PTEEN/AKT pathway [J]. Tumour Biol. ,2016 ,37( 5) : 5885 – 5895.
- [21] NAVARRO E , SERRANO-HERAS G , CASTANO M J , et al. Real-time PCR detection chemistry [J]. Clin Chim Acta ,2015 ,439: 231 – 250.
- [22] RODRIGUEZ A , RODRIGUEZ M , CORDOBA J J , et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods [J]. Methods Mol Biol. ,2015 ,1275: 31 – 56.
- [23] MALANDRAKI I , BERIS D , ISAIIOGLOU I , et al. Simultaneous detection of three pome fruit tree viruses by one-step multiplex quantitative RT-PCR [J]. Plos One 2017 ,12( 7) : 1 – 14.
- [24] SINGH A , PANDEY G K. Primer design using Primer Express( R) for SYBR Green-based quantitative PCR [J]. Methods Mol Biol. ,2015 ,1275: 153 – 164.

## Establishment of Real-time PCR for Detection of *CHRNA7* Gene

LIU Yiqiao , SUN Zhihua , QIAN Jiang , ZHANGSUN Dongting , LUO Sulan

( College of Marine , Hainan University / Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education / Key Lab for Marine Drugs of Haikou , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

**Abstract:** In order to detect the expression of  $\alpha 7$  nicotine acetylcholine receptor ( nAChR) subunit gene ( *CHRNA7* ) , the primers were designed according to the sequence of human *CHRNA7* gene , and then *CHRNA7* gene was amplified by PCR. After being cloned into pMD-18T vector , the recombinant plasmid was sequenced and prepared. The recombinant plasmids were gradient diluted and used as templates to establish standard curves for real-time PCR. The sensitivity and repeatability of the real-time PCR were carried out. A real-time PCR method for detecting *CHRNA7* was successfully established. With this method *CHRNA7* gene was detected  $10 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  at the lowest. The variation coefficients of five replications of the three templates at  $10^4$  ,  $10^5$  and  $10^6 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  were 1.22% , 1.90% and 2.63% , respectively , which indicated the real-time PCR detection had a good repeatability. Furthermore , the detection of  $\alpha 7$  nAChR subunit gene expression in human cervical cancer cell line SiHa and human normal cervical cell line Ect1/E6E7 showed that the expression of  $\alpha 7$  nAChR subunit in SiHa cells was significantly lower than that in Ect1/E6E7 cells (  $P = 0.015$  ).

**Keywords:**  $\alpha 7$  nAChR; cervical cancer; real-time PCR

( 责任编辑:潘学峰)