

茶愈伤组织实时定量 PCR 分析中内参基因的选取

史成颖, 李正国, 徐 乾, 宛晓春*

(安徽农业大学农业部、教育部茶叶生物化学和生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 为了选取合适的内参基因来分析培养基中前体物诱导及对照的茶愈伤组织中茶氨酸代谢相关基因的差异表达, 利用 GenBank 上登录的茶树基因序列以及通过构建文库测序所得的基因 (具有完整的阅读框) 共 7 个持家基因设计引物。在分析这些引物的扩增效率和特异性后, 测定了它们在茶愈伤组织生长过程中 (对照和愈伤培养基中添加含氮外源物的情况下) 的表达水平。利用 geNorm 和 NormFinder 软件分析了这些持家基因的稳定性, 确定在该条件下合适的内参基因为 β -actin 和 GAPDH。

关键词: 实时定量 PCR; 内参基因; 基因表达; 茶树

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)06-0905-06

Reference gene selection for real-time PCR normalization in tea callus

SHI Chengying, LI Zhengguo, XU Qian, WAN Xiaochun

(Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Agriculture and Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to obtain suitable reference genes for analysis of the related gene expression in calli of the control and treatment groups, 7 housekeeping genes from the GenBank and ESTs of cDNA library of *Camellia sinensis* young roots (with complete open reading frame) were chosen for primer design. After analysis the amplification efficiency and primers specificity, the expression levels of the 7 housekeeping genes in tea calli of the control and treatment groups at different growth stages were determined, and their stabilities of expressions were analyzed using geNorm and NormFinder softwares. As a result, β -actin and GAPDH are suitable reference genes under this condition.

Key words: real-time PCR; reference gene; gene expression; *Camellia sinensis*

研究植物代谢途径及其机理关键在于研究代谢途径中的相关基因表达量与代谢产物合成的关系。荧光定量 PCR 技术则是近年来发展起来的探讨基因表达变化的有效手段, 该方法就是在 PCR 反应体系中加入荧光染料, 利用荧光信号累积实现了实时监测整个 PCR 进程, 对起始模板进行定量分析的方法^[1]。根据实时定量 PCR 化学发光原理可分为 2 类: 一类为探针类, 包括 TaqMan 探针和分子信标, 利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加; 另一类为非探针类, 如 SYBRgreen I 等通过荧光染料来指示产物的增加。与传统的 mRNA 定量方

法如 Northern blot、半定量 RT-PCR 检测技术相比, 荧光定量 PCR 具有操作简便、快速高效的特点, 而且具有更高的灵敏性和特异性, 能够对 mRNA 进行准确定量^[2]。

荧光定量 PCR 可以分为绝对定量和相对定量。绝对定量是用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线, 在相同的条件下将目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较, 从而得到目的基因的表达量或拷贝数。标准品可以是纯化的质粒 DNA、体外转录的 RNA, 或者是体外合成的 ssDNA。绝对定量方法比较准确、可靠, 但需要克隆目的基因和参照

收稿日期: 2014-10-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31170283), 教育部博士点基金 (20113418130001), 安徽省自然科学基金 (KJ2010A106) 和安徽农业大学稳定人才项目 (wd2011-16) 共同资助。

作者简介: 史成颖, 博士。E-mail: shichengying@ahau.edu.cn

* 通信作者: 宛晓春, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xcwan@ahau.edu.cn

基因的扩增片段, 构建体外转化系统, 增加了实验的难度和复杂度。相对定量主要是分析目的基因在不同样本如不同器官、组织或对照与处理之间表达量的差异, 可以分为比较 Ct 法和其他一些方法。比较 Ct 指的是通过与内参基因 Ct 值之间的相差来计算基因表达差异, 也是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 基因表达研究一般所采用相对定量的方法^[3]。相对定量法必须对样品的目的基因和作为内标的参比基因同时分别进行定量, 然后求出对于参比基因的目的基因相对量。通过对样品间的目的基因的相对量进行比较, 可以对不同样品间的 mRNA 进行表达量分析。参比基因通常选用表达量相对恒定的持家基因, 如 *GAPDH*、 *β -actin*、*EF1 α* 、 *α -tubulin* 及 *Histone* 等。通过同时对参比基因的实时检测, 达到在严格意义上对样品之间的 mRNA 表达量进行分析的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

选取了龙门抗愈伤组织, 在培养基中添加 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的茶氨酸合成前体物盐酸乙胺, 0 d、3 d、6 d、12 d 和 24 d 取样, 用滤纸吸去愈伤组织表面的培养基后, 速放置到 -70°C 冰箱中, 用于 RNA 提

取。

1.2 主要试剂与仪器

RNA 纯化试剂盒购于天根生化科技有限公司, RNA 反转录试剂盒及 Real time PCR Power SYBR Green 试剂盒、实时定量 PCR 八连管购于美国伯乐公司 (Bio-rad), 其他各种化学试剂购于美国 Sigma 公司或国内公司, 均为分析纯; PCR 引物由上海生物工程公司合成 (质谱检测纯度); RNA 质量用 Thermo 公司的核酸定量仪进行检测; 离心和涡旋使用迷你离心机及 IKA 涡旋仪。

1.3 RNA 提取

RNA 提取方法见参考文献[4]。为了避免 RNA 中可能的 DNA 等污染, 用天根 RNA 纯化试剂盒进一步纯化提取的 RNA, 以满足实时定量 PCR 对 RNA 高质量的要求。

1.4 持家基因的特异引物设计

越来越多的研究表明, 生物体内的持家基因的表达并不是绝对不变的, 也会随着外界条件或生长阶段的不同而产生一定的变化。为了选取愈伤组织在氮素压力下的内参基因, 根据 GenBank 登录序列及通过构建文库测序所得的持家基因序列^[5-6]设计引物, 具体的引物序列及扩增产物长度如表 1。

表 1 选取的持家基因引物及扩增长度
Table 1 List of primers and amplified lengths of reference genes under investigation

编号 Code	名称 Putative function	引物 Primer	长度/bp Length
Contig594	<i>EF 1α</i>	F: 5'-TTCCAAGGATGGGCAGAC-3' R: 5'-TGGGACGAAGGGGATTTT-3'	196
Contig663	<i>Ubi</i>	F: 5'-GGAAGGACTTTGGCTGACTA-3' R: 5'-GACCCATATCCCCAGAACAC-3'	98
FJ355923.1	<i>β-actin</i>	F: 5'-GCCATCTTTGATTGGAATGG-3' R: 5'-GGTGCCACAACCTTGATCTT-3'	207
Contig646	<i>GAPDH</i>	F: 5'-TTGGCATCGTTGAGGGTCT-3' R: 5'-CAGTGGGAACACGGAAGC-3'	210
DQ340766.2	<i>α-tubulin</i>	F: 5'-TGGGTTCAAGTGTGGAATCA-3' R: 5'-TCCATACCCTCCCCAACATA-3'	195
AY787658.1	<i>His</i>	F: 5'-CCGAAAGTACCAGAAATCC-3' R: 5'-TTCAAACAGTCCAACAAGG-3'	163
DQ904327	<i>Cyc</i>	F: 5'-CTCACTCAGGCGAAGAAATC-3' R: 5'-GACCCATGACATACGACCAG-3'	104

Note: *Ubi*, ubiquitin; *His*, histone; *Cyc*, cyclophilin; *EF1 α* , elongation factor 1 α ; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase.

1.5 cDNA 第 1 链的合成、实时定量 PCR 扩增效率与特异性分析

提取 RNA 后取 $1 \mu\text{g}$ 的各个样品, 按 Bio-Rad iscript TM cDNA synthesis kit 反转录。具体如下:

$5\times$ iscript reaction mix, $4 \mu\text{L}$; Iscript reverse transcriptase, $1 \mu\text{L}$; RNA template, $1 \mu\text{g}$; Nuclease free water 补至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 25°C , 5 min; 42°C , 30 min; 85°C , 5 min。结束后, 4°C 保存。

将 cDNA 模板按 5 倍或 10 倍稀释成一系列浓度做实时定量 PCR 制作标准曲线。使用 Bio-rad 实时定量 PCR 仪, 反应体系如下 ($20 \mu\text{L}$): $2\times$ SYBR Green Mastermix, $10 \mu\text{L}$; 上游引物, $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 下游引物, $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; cDNA 模板, $2.0 \mu\text{L}$; ddH₂O, $7.4 \mu\text{L}$, 总体积共 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 95°C 2 min, 95°C 15 s; 58°C 退火 30 s, 共 40 个 cycles; 72°C 延伸 30 s; 读板—收集荧光信号。结束后, 以每 10

s 上升 0.5 度的速率从 55 升值 95℃, 连续采集样品的荧光信号以获得溶解曲线。

从溶解曲线中可以分析是否出现引物二聚体和非特异性的扩增产物。出现单一峰和琼脂糖凝胶电泳为单一条带时可确定 PCR 产物的特异性。

1.6 持家基因表达稳定性分析及合适内参基因选取

将 7 个持家基因在不同生长时间的对照和处理愈伤组织中的荧光定量 PCR 所得到的 Ct 值 (每个样品 3 个重复) 转化为相对定量数据, 用 geNorm 程序分析选取的持家基因的表达稳定性, 同时利用 NormFinder 程序选出最稳定基因, 二者结合确定合适的内参基因用于后续试验中对目的基因校正。

2 结果与分析

2.1 RNA 浓度测定及质量鉴定

将提取的愈伤组织 RNA 取 2 μL 用于核酸定量仪上分析试样的浓度与纯度。结果显示, 测定 RNA 的 $A_{260/280}$ 在 1.9~2.1 之间, $A_{260/230}$ 基本大于 2.0。说明 RNA 的纯度较高, 没有蛋白质、DNA 及酚和离子的污染, 具体见表 2。

表 2 对照和 ZtNH₂·HCl 诱导的愈伤组织中提取的 RNA 质量检测

Table 2 Qualities of RNA extracted from tea calli of control and those induced with ZtNH₂·HCl with different growth time

样品 Sample	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	RNA 浓度/ng·μL ⁻¹ Concentration of RNA
0 d 对照 ck	2.08	2.10	508.6
3 d 对照 ck	2.09	2.19	677.8
3 d 处理 tr	2.02	2.01	413.0
6 d 对照 ck	2.11	2.15	793.2
6 d 处理 tr	2.06	2.30	977.5
12 d 对照 ck	2.06	1.97	307.8
12 d 处理 tr	2.01	1.94	466.5
24 d 对照 ck	2.06	1.99	255.0
24 d 处理 tr	2.11	2.01	460.4

将 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。从图中可以看出, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 且 28S rRNA 的条带明显亮于 18S, 说明 RNA 没有降解。

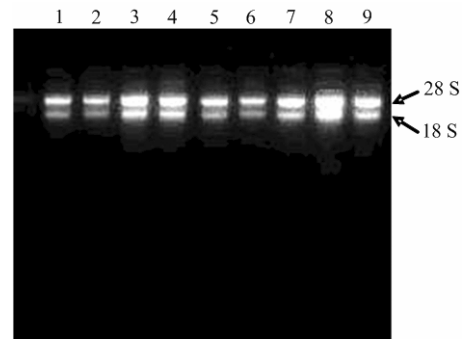
综合核酸定量结果检测结果和琼脂糖凝胶电泳结果可说明提取的 RNA 质量高, 可以用于实时定量 PCR 分析。

2.2 持家基因引物扩增效率与特异性

通过梯度稀释 cDNA 样本作为模板进行 PCR 扩增后得到每个持家基因的标准曲线、溶解曲线和

扩增曲线, 结果如表 3 和图 2。

从表 3 和图 2 中可以看出, 所选取的持家基因片段扩增效率良好, 扩增效率在 89~110% 之间, 大部分为 90% 多, 其中 β -actin 基因的扩增效率近似 100%, 线性相关系数 R^2 基本在 0.99 以上, 特异性扩增产物在溶解峰中表现出具有相同的峰值, 重复性好, 无引物二聚体等引起的非特异性峰的存在, 说明引物特异性好。



Lane 1, 0 d ck; lane 2, 3 d ck; lane 3, 3 d Tr; lane 4, 6 d ck; lane 5, 6 d Tr; lane 6, 12 d ck; lane 7, 12 d Tr; lane 8, 24 d ck; lane 9, 24 d Tr

图 1 不同生长阶段的对照和盐酸乙胺诱导愈伤组织中提取 RNA 的凝胶电泳

Figure 1 Electrophoresis of RNA extracted from tea calli of control and ZtNH₂·HCl added groups at different growth stages

表 3 持家基因引物扩增参数

Table 3 Selected candidate control genes, and different parameters derived from qRT-PCR analysis

基因名称 Gene's symbol	斜率 Slope	PCR 扩增效率/% PCR efficiency	相关系数 R^2 Correlation coefficient
β -actin	-3.305	100.7	0.997
Cyc	-3.112	109.6	0.998
EF1a	-3.503	93.0	0.991
His	-3.569	90.6	0.989
Ubi	-3.477	93.9	0.995
GAPDH	-3.085	110.9	0.999
α -tubulin	-3.616	89.0	0.991

进一步将扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 3。从图中可以看出, 条带单一, 引物特异性强。

2.3 持家基因的稳定性评价

在前基因组时代, 人们一直认为持家基因为细胞结构维持和基本代谢所必需, 应该在所有细胞和生理状态下都较稳定地表达。但是, 最近一些研究表明, 在不同细胞类型和不同生理状态下很多持家基因表达并不是恒定不变的, 随着环境改变其表达也有所改变。持家基因在某些组织器官、发育时期

或生理状态一般是稳定表达的，而当实验条件改变时它们的表达也会发生变化，而且不同类型样品(如不同器官间的比较)持家基因的表达也不一样。如果考虑不到内参基因表达的变化就会导致 qRT-PCR 的结果准确性降低甚至得到相反或错误的结论。

为了寻找愈伤组织中茶氨酸合成前体物诱导后

能稳定表达的内参基因，利用构建的 cDNA 文库^[5-6]结合 GenBank 中登录的持家基因序列，选取了 *β-actin*、*α-tubulin*、*GAPDH*、*Histone*、*Cyclophilin*、*Ubiquitin* 及 *EF 1a* 7 个持家基因，分析它们在愈伤组织生长过程中（对照和愈伤培养基中添加外源氮的情况下）的表达稳定性，结果如图 4。

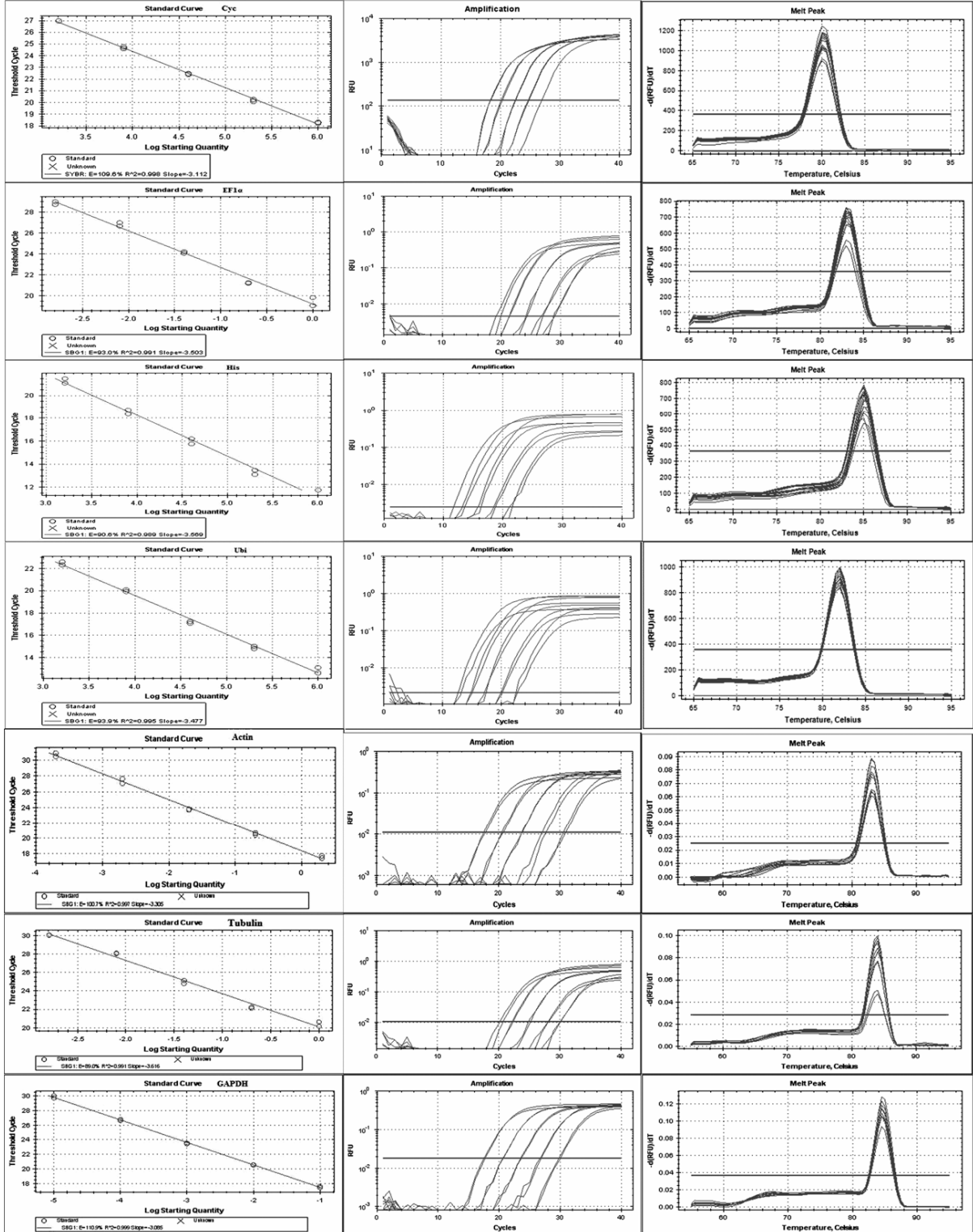
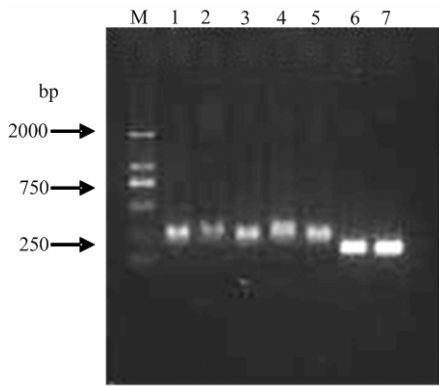


图 2 选取的 7 个持家基因的标准曲线、扩增曲线及熔解峰

Figure 2 Standard curves, amplification curves and melting peaks of 7 control genes under investigation



M: Marker 2000; 1, β -actin; 2, GAPDH; 3, EF1 α ; 4, His; 5, α -tubulin; 6, Ubi; 7, Cyc

图 3 扩增产物 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 3 Analysis of PCR products using 1.2% agarose gel electrophoresis

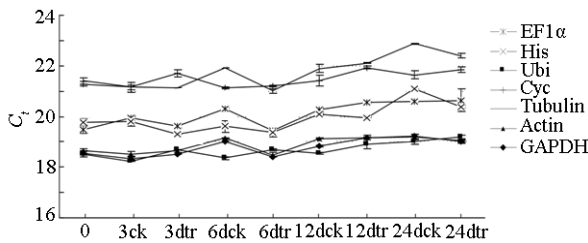


图 4 对照和 ZtNH₂HCl 处理愈伤组织在不同生长时间的持家基因表达水平(C_t 值)

Figure 4 Expression levels of chosen control genes in tea callus of control and those induced with ZtNH₂HCl at different growth stages

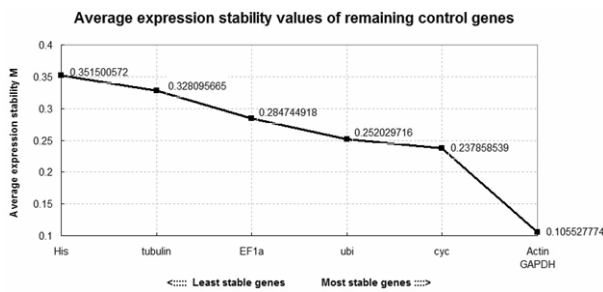


图 5 利用 geNorm 分析选取的持家基因的表达稳定值

Figure 5 Gene expression stability M of candidate reference genes calculated by geNorm

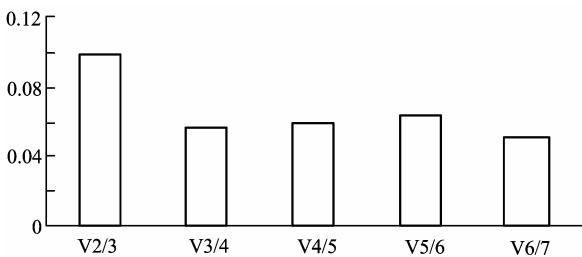


图 6 geNorm 软件分析数据均一化所需要的内参基因个数

Figure 6 Determination of the optimal number of reference genes for data normalization by geNorm

从图 4 中可以看出, 在愈伤组织的 (对照和处理组) 生长过程中, 持家基因的表达量不是绝对不变的, 也存在一定的变化, 因此利用 geNorm 及 NormFinder 等软件进一步分析选取的持家基因的表达稳定性。geNorm 程序^[7]通过计算基因的表达稳定值 M 对基因的表达稳定性进行排序, 并且通过标准化因子配对差异分析 $V_{n/n+1}$ 来确定所需内参基因的最合适数目。基因的表达稳定值 M 值越大, 稳定性越低; 反之, M 值越小, 稳定性越高。由图 5 可以得到候选的 7 个持家基因的表达稳定性排列顺序为 His (0.3515) < α -tubulin (0.3281) < EF1 α (0.2848) < Ubi (0.2520) < Cyc (0.2379) < β -actin/GAPDH (0.1055), β -actin 和 GAPDH 在此过程中是最稳定的基因, 而 His 是相对最不稳定的基因; 同时候选的 7 个看家基因的 M 值都小于程序所推荐值 1.5, 其中最稳定的基因是 Actin/GAPDH, 可以作为 real-time qPCR 分析中的内参基因。

在基因表达分析中, 有时使用单一的内参基因校正不符合试验的要求, 因此需要 2 个或 2 个以上的内参基因对目的基因进行校正以减少试验误差, 从而得到更加准确的结果。geNorm 程序分析结果显示所有的 $V_{n/n+1}$ 值都小于程序所推荐值 0.15 (图 6), 而且 $V_{2/3}$ 值为 0.0998, 说明无需加入第 3 个基因进行校正, 最合适的内参基因数目是 2 个, 分别是表达最为稳定的 β -actin 和 GAPDH。

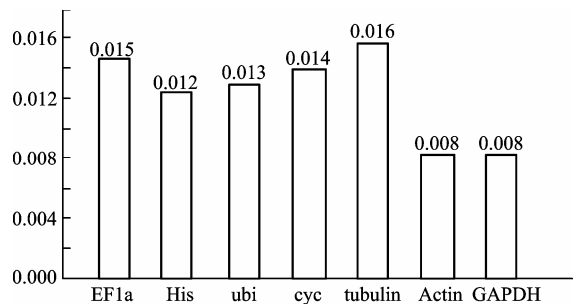


图 7 NormFinder 软件分析候选基因的表达稳定性

Figure 7 Determination of the most stable reference gene using NormFinder

与此同时, 我们应用 NormFinder 软件分析了 7 个候选持家基因的表达稳定性。NormFinder 程序是通过分析组内和组间的变异并将其结合起来评价所有候选参考基因表达稳定性的方法^[8]。与 geNorm 程序一样, NormFinder 也是一种比较常用的分析软件。根据稳定值的大小排序, 具有最小稳定值的基因是最为稳定的基因。通过 NormFinder 程序分析会得到每个基因的表达稳定值, 同时还提供当使用此基因校正时所引用的系统误差值, 图 7 显示了

NormFinder 分析结果。可以看出,其中最稳定的基因为 β -actin 和 GAPDH,这和 geNorm 程序分析所到的结果是一致的。

3 小结与讨论

为了选取茶愈伤组织在茶氨酸合成前体物诱导及对照材料中相关基因表达时合适的内参基因,我们利用 GenBank 上登录的及通过构建文库测序^[5-6]所获得的 7 个常规的持家基因设计引物,在检测这些引物的扩增效率和特异性后,分析了它们在愈伤组织生长过程中(对照和愈伤培养基中添加外源氮的情况下)的表达稳定性,并利用 geNorm 和 NormFinder 软件分析了这些持家基因的稳定性的稳定性,确定在该条件下合适的内参基因为 β -actin 和 GAPDH。

近些年,由于实时定量 PCR 技术具有灵敏、快速和检测所需样品微量等优点而广泛应用于科学研究的各个领域。同时,越来越多的学者也发现在 qRT-PCR 整个实验过程中对实验技术的要求也较高,实验结果会因为 RNA 的质量和数量、cDNA 合成效率以及 PCR 扩增效率的差异、内参基因的选择等而导致结果严重偏差^[9]。因此从材料的保存、RNA 提取方法、反转录 cDNA、扩增效率、内参基因选取等方面都要认真做好每一步的工作,使实验结果准确可靠。下面就简要叙述一下各步骤的注意事项。

尽量选取新鲜的材料并用液氮速冻后, -70°C 保存,以免 mRNA 降解,这是保证实时定量 PCR 结果准确性的前提条件;

提取的 RNA 质量对实时定量 PCR 的结果至关重要,特别是在采用实时荧光定量 PCR 方法的时候, RNA 质量不合格可能会导致错误甚至完全相反的结论。RNA 质量包括 RNA 的纯度、完整性。要求 28S rRNA 的亮度是 18S rRNA 的 2 倍左右,测定的 A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.1 之间,无蛋白质和 DNA 污染,同时 A_{260}/A_{230} 的值大于 2.0 以避免多酚和离子的干扰;

在反转录 cDNA 时,通过测定的 RNA 浓度计算 RNA 的量,尽可能的保证不同样品使用相近的 RNA 量进行反转录,并且进行同批次反转录以获得相近浓度的 cDNA;

引物的设计。选择合适的引物设计软件设计引物,并在引物合成之后,首先进行普通 PCR,琼脂糖凝胶电泳后确定为单一条带后,再进行实时定量

PCR,并通过制作标准曲线评估扩增效率及熔解峰的状况来评价引物的特异性。

内参基因的确定。一般来说,在基因表达定量检测中所检测到的差异主要有两种来源:一种是真正的生物体本身内在的差异,另一种则是由于实验误差导致的。而选择合适的内参基因对目标基因表达量进行校正,可以摒除实验误差的干扰从而获得真实可靠的结果。大量的研究表明,任何一种持家基因的所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定,在其他类型的细胞中或实验因素作用下则是变化的,因此在特定的实验中根据样本类型及实验要求进行合适的内参基因筛选就显得尤为必要。

实验操作时尽量设立专区,以防交叉污染而影响结果的准确性。

参考文献:

- [1] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74-76.
- [2] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations [J]. Genes and Immunity, 2005, 6(4): 279-284.
- [3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta\text{CT}]$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] 史成颖,宛晓春,江昌俊,等. 提取高质量茶树总 RNA 的方法研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 360-363.
- [5] 史成颖,宛晓春,江昌俊,等. 茶树嫩根 cDNA 文库的构建及 ESTs 分析[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 126-130.
- [6] Shi C Y, Yang H, Wei C L, et al. Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 131.
- [7] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biology, 2002, 3(7): research0034.
- [8] Andersen C L, Jensen J L, Rntoft T F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. Cancer Research, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [9] 胡瑞波,范成明,傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6): 30-36.