

鲜切马铃薯实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择

侯志强¹, 王庆国²

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018; 2. 山东省果蔬食用安全工程技术研究中心, 山东济南 251400)

摘要 [目的]选择鲜切马铃薯实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析中合适的内参基因。[方法]以受到高温、光照等胁迫的鲜切马铃薯为材料, 应用 qRT-PCR 技术, 分析 18S rRNA、*GAPDH*、*Actin* 和 *EF1a* 4 个常用内参基因的表达情况。[结果]经 GeNorm 软件分析发现, 当利用 qRT-PCR 分析比较鲜切马铃薯中的基因表达差异时, 可选择 *Actin* 作为校正内参基因。[结论]该研究为进一步开展鲜切马铃薯分子生物学研究奠定了方法学基础。

关键词 鲜切马铃薯; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

中图分类号 S632 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05207-03

Reference Genes Selection for Real-time Fluorescence Quantitative PCR in Fresh-cut Potato

HOU Zhi-qiang et al (College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

Abstract [Objective] The paper was to select suitable reference genes for the real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) in fresh-cut potato. [Method] Using the fresh-cut potatoes under high temperature, illumination and other stress as materials, the expression of four commonly used reference genes 18S rRNA, *GAPDH*, *Actin* and *EF1a* was analyzed by qRT-PCR technology. [Result] Through the analysis of GeNorm software, it found that when the qRT-PCR was used to analyze and compare the gene expression differences of fresh-cut potatoes, the *Actin* could be chosen as the calibration reference gene. [Conclusion] The study laid a methodology foundation for the further development of molecular biological study in fresh-cut potato.

Key words Fresh-cut potato; Real-time fluorescence quantitative PCR; Reference genes

鲜切蔬菜具有 100% 可食、食用方便、新鲜、品质好等特点, 在发达国家已被广泛接受, 今后也是我国蔬菜市场供应的发展方向。蔬菜切割后易褐变, 而褐变是影响鲜切蔬菜品质的主要因素之一。褐变不仅直接影响产品观感品质, 导致商品价值大幅降低, 而且易造成酚类等功能性成分氧化损失和营养品质下降。抑制褐变是保持鲜切产品品质的关键技术。过去抑制酶促褐变的研究集中于化学方法, 但化学试剂对人体健康及地球环境的危害使人们开始研究替代方法。

实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 实现了聚合酶链式反应技术 (polymerase chain reaction, PCR) 从定性到定量的飞跃, 其特点是准确度高、速度快、灵敏性好, 目前已广泛应用于分子生物学中目的基因表达的分析与检测中^[1-5]。实时荧光定量 PCR 技术不仅被应用于转基因研究中^[6], 而且在医学分析等领域中也得到广泛应用^[7-9]。利用实时荧光定量 PCR 技术计算目的基因相对表达量时, 通常需引入一个表达较为稳定的基因作为内参基因 (reference gene)^[10-11]。在植物的不同组织和不同胁迫条件下内参基因转录水平可能发生变化^[12-13]。因此, 选择合适的内参基因对获得准确的定量 PCR 试验结果是非常重要的。

文中以不同胁迫条件下的鲜切马铃薯为材料, 利用 qRT-PCR 技术开展 18S rRNA、*GAPDH*、*Actin* 和 *EF1a* 4 个内参基因的表达量分析, 并利用 GeNorm 分析软件^[14]筛选出表达最稳定的内参基因, 为进一步开展鲜切马铃薯的分子生物学研究奠定方法学基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验选用荷兰七号马铃薯品种为材料, 于 2012 年 4 月 30 日采购于山东省枣庄市。采购后挑选大小均匀 (单个 100 g 左右)、无发芽、无机械伤的马铃薯, 装入纸箱, 运至山东农业大学食品学院果蔬保鲜冷库, 置于 2~4 °C 下贮藏。研究以进行高温、光照胁迫处理后的马铃薯为材料。

1.2 总 RNA 的提取 ①组织取材后用灭菌的锡箔纸包好保存于液氮。在液氮中将组织研磨成粉末, 趁液氮未挥发将粉末转移至 EP 管中, 室温 5 000 r/min 离心去上清; ②每 50~100 mg 组织加入 1 ml Trizol; ③向离心管中加入 0.2 ml 氯仿 (提取液体积的 1/5), 振荡 30 s, 室温下静置 5 min; ④12 000 r/min 4 °C 条件下离心 15 min, 分相为 3 层, 上层: RNA (约为提取液的 1/2), 中层: DNA, 下层: 蛋白质; ⑤使用移液器吸取上清液, 转移到另一 EP 管中; ⑥上清液加入约 0.5 ml 异丙醇, 振荡混匀 30 s, 室温下静置 10 min; ⑦12 000 r/min 4 °C 条件下离心 10 min; ⑧RNA 沉淀形成后吸取上清液, 丢弃 (注意不要吸取 RNA 沉淀); ⑨离心管加入 1 ml 预冷的 75% 乙醇 (1 ml Trizol 至少用 1 ml 乙醇清洗 DNA), 振荡混匀 30 s, 使沉淀振荡起来, 室温 12 000 r/min 离心 1~2 min。尽可能吸弃上清液, 防止 RNA 沉淀丢失。重复以上清洗步骤一次; ⑩室温倒置离心管于滤纸上, 干燥 RNA, 但不能完全干燥 (5~10 min)。用 DEPC 水 15 μl 溶解沉淀, 55~60 °C 孵育 10~15 min。

1.3 反转录合成 cDNA 第 1 链 采用天根公司 QuantScript RT Kit cDNA 第 1 链合成试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 将获得的 cDNA 产物直接用于 PCR 或 -20 °C 贮藏备用。

1.4 PCR 引物设计 根据定量 PCR 引物的设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 18S rRNA、*GAPDH*、*Actin* 和 *EF1a* 内参基因的定量 PCR 引物 (表 1), 引物序列由大连宝

生物公司合成。

表1 Real-time RT-PCR 检测中所用 4 个内参基因的引物序列

基因	引物
<i>Actin</i>	F:GCTTCCCAGTGGTCAAGTCA R:GGATTCCAGCTGCTTCCATTC
18S rRNA	F:GGGCATTCTGATTTTCATAGTCAGAG R:CGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT
<i>EF1a</i>	F:ATTGAAACGGATATGCTCCA R:TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>GAPDH</i>	F:ATGAAGGACTGGAGAGGTGG R:GAAAATGCTTGACCTGCTGT

1.5 目的基因片段的普通 PCR 扩增 PCR 反应体系为:2 μ l 10 \times buffer, 1 μ l dNTPs, 0.5 μ l 引物 1, 0.5 μ l 引物 2, 1 μ l 模板, 0.2 μ l *Taq* 酶, 14.8 μ l DDW。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 内参基因的荧光定量 PCR 分析 RT-PCR 反应体系为: TaKaRa PCR Master mix 10 μ l, 引物 1 0.4 μ l, 引物 2 0.4 μ l, cDNA 1.0 μ l, 生物用水 8.2 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 秒, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环。然后进行 55 ~ 95 $^{\circ}$ C 的溶解曲线分析, 荧光波长为 FAM 490 nm。使用的 PCR 仪是 iCycler iQ5 (美国 BIO-RAD 公司), 数据读取由荧光定量 PCR 仪自动完成。

1.7 数据处理和分析 根据 4 个常用内参基因在鲜切马铃薯中计算得到的相对表达量, 利用 GeNorm 软件 (<http://medgen.ugentbe/jvdesomp/genorm>) 对各个管家基因的表达稳定性进行统计学分析, 从而筛选出最优的内参基因。

2 结果与分析

2.1 内参基因标准曲线的制作 从理论上来说, 一系列稀释样品的扩增曲线之间应该有均匀的间距。如果产物在每一个循环都加倍, 荧光曲线之间的间距由等式“2ⁿ = 稀释倍数”决定, n 是阈值线上扩增曲线之间的循环数 (又称为 *C_q* 的差异)。例如, 10 倍稀释的 DNA 样品, 2ⁿ = 10, 因此, n = 3.32, *C_q* 值相差 3.32 个循环, 由均匀间距的扩增曲线可产生一个线性的标准曲线。标准曲线的 *R*² 值显示试验数据衰减的线性程度, 即数据的线性程度。线性是用来衡量重复样品数据是否一致和不同拷贝初始模板是否具有相同的扩增效率。如果重复样品的 *C_q* 值明显不同, *R*² 值会变得很低, 此时就应优化反应条件, 保证 qPCR 反应的 *R*² > 0.980。从图 1 ~ 4 中标准曲线趋势线可得, 标准曲线的线性可信度 *R*² 均大于 0.980, 从而保证了高的扩增效率^[15]。

2.2 内参基因的选择 合适内参基因的选择对获得准确的基因表达分析结果至关重要, 而理想的内参基因应是在不同胁迫和试验条件作用下, 在不同类型的组织或同一组织不同的细胞中恒定或相对稳定表达。所以需要对内参基因的表达稳定性进行分析和检测, 目前常用的内参基因分析软件有 GeNorm、Normfinder、Bestkeeper、 Δ Ct approach、stability index

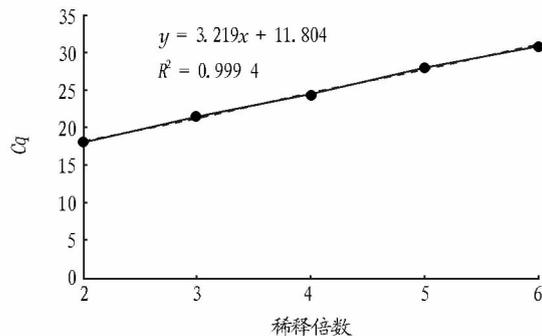


图1 *EF1a* 标准曲线

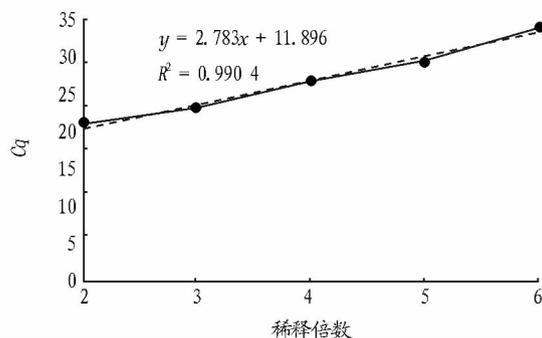


图2 *GAPDH* 标准曲线

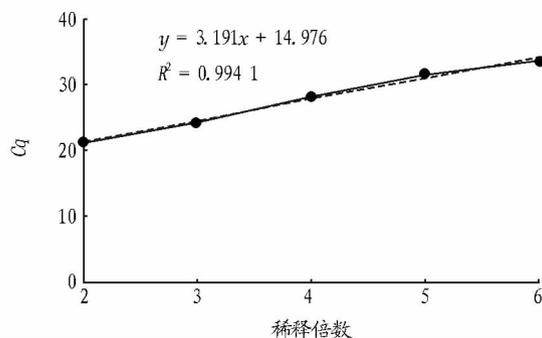


图3 18S rRNA 标准曲线

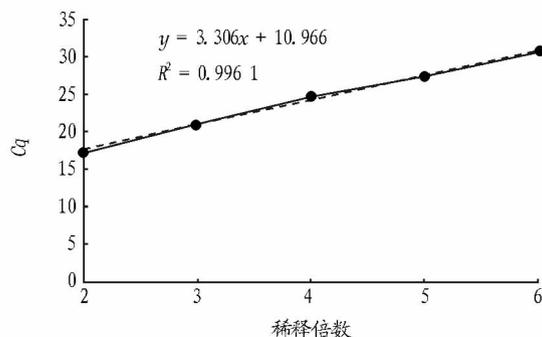


图4 *Actin* 标准曲线

等^[16]。该研究应用 GeNorm 分析了植物学研究中常用的 4 个内参基因。GeNorm 软件通过 *C_t* 值来计算各内参基因的 *M* 值, 如果内参基因的 *M* 值越小, 说明该内参基因表达越稳定。

一般而言, 以 GeNorm 软件分析内参基因的稳定性时, *M* 值低于 1.0 的候选基因才符合基因表达分析数据归一化处理的要求。该研究中, *EF1a*、*Actin*、*GAPDH*、18S rRNA 的 *M* 值

都小于 1.0, 稳定性排序是 *Actin* > 18S rRNA > *GAPDH* > *EF1a*。

该研究表明, 将 *EF1a*、*Actin*、*GAPDH*、18S rRNA 同时用于基因表达分析的数据归一化处理可得到更精确的结果。然而, 内参基因越多意味着工作量和试验成本的增加, 加上多内参基因限制了每次分析的样品数。因此, 使用单内参基因 *Actin* 更易被普遍接受。

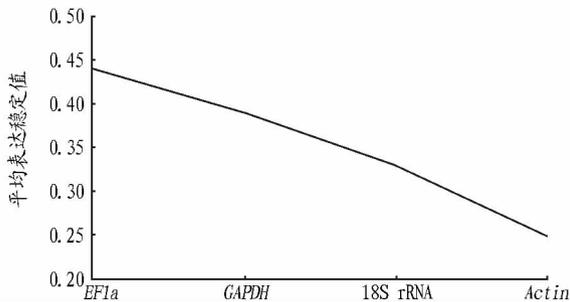


图5 GeNorm 软件分析获得的各内参基因在鲜切马铃薯中的表达稳定值 (*M*)

3 讨论

选择合适的内参基因对获得准确的基因表达结果是至关重要的。选择植物中基因表达分析适当内参基因的研究目前尚不多见。过去这样的研究大多集中于医学研究。这些研究中 18s rRNA 和 *GAPDH* 的使用频率非常高, *Actin* 基因家族也经常用到。同一内参基因在不同试验条件下表达稳定性也不相同。而且同一基因家族的不同基因在同一试验条件下也不相同。例如, *Actin 2/7* 在大豆组织中比 *Actin 11* 更稳定^[17]。研究选择适当的内参基因用于 RT-PCR 在鲜切马铃薯尚不多见。

从文中对不同胁迫条件下鲜切马铃薯中 4 个常用内参基因的表达分析可看出, *Actin* 基因表达相对稳定。该研究为进一步开展鲜切马铃薯分子生物学研究奠定了方法学基础。

参考文献

[1] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986 - 994.

(上接第 5206 页)

[37] DIMARTINO D, GIUFFR G, STAITI N. Laser micro dissection and DNA typing of cells from single hair follicles [J]. *Forensic Sci Int*, 2004, 146 (S1): 155 - 157.

[38] SUBRAMANIAN S, KARTHIK T, VIJAYARAAGHAVAN M N. Single nucleotide polymorphism for animal fiber identification [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(2): 153 - 158.

[39] 金美菊, 阮勇, 石东亮, 等. 单核苷酸多态性技术在羊绒、羊毛纤维鉴别中的应用[J]. *毛纺科技*, 2007(11): 10 - 14.

[40] PRUSAK B, GRZYBOWSKI T, BEDNAREK J. Cytochrome b gene (cytb) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostics and animal conservation [J]. *Animal Science Papers and Reports*, 2005, 23(4): 229 - 236.

[41] 黄如琳, 黄群, 周用武, 等. DNA12sRNA 基因序列测定在野生动物毛发样本鉴定中的应用[J]. *四川动物*, 2006, 25(3): 478 - 480.

[42] 冯慧, 冯成利, 刘晓农, 等. 林麝毛发 DNA 的提取及系统发育分析[J]. *西北农业学报*, 2012, 21(8): 14 - 18.

[43] 刘辉, 吴晓兵. 根据 12S rRNA 和 Cytb 基因部分序列鉴定药用猴骨样

[2] HALLER F, KULLE B, SCHWAGER S, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; confirmation of reference genes suitable for normalization [J]. *Anal Biochem*, 2004, 335: 1 - 9.

[3] RANSBOTYN V, REUSCH T B H. Housekeeping gene selection for quantitative real-time PCR assays in the seagrass *Zostera marina* subjected to heat stress [J]. *Limnol Oceanogr Methods*, 2006, 4: 367 - 373.

[4] YOO W G, KIM T I, LI S, et al. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR [J]. *Parasitol Res*, 2009, 104: 321 - 328.

[5] LIU Y G, LIU K F, SUN X Y, et al. Cloning of broad-spectrum antidisease NPR1 gene with RT-PCR and construction of its protein expression vector [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(6): 852 - 854, 930.

[6] LIBAULT M, THIBIVILLIERS S, BILGIN D D, et al. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization [J]. *Plant Genome*, 2008, 7: 44 - 54.

[7] BOXUS M, LETELLIER C, KERKHOFS P. Real time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus [J]. *J Virol Methods*, 2005, 125: 125 - 130.

[8] CHAIN J L, JOACHIMS M L, HOOKER S W, et al. Real-time PCR method for the quantitative analysis of human T-cell receptor γ and β gene rearrangements [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 300: 12 - 23.

[9] ETSCHMANN B, WILCKEN B, STOEVESSAND K, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm [J]. *Vet Pathol*, 2006, 43: 934 - 942.

[10] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. *植物学报*, 2010, 45(5): 579 - 587.

[11] 孙美莲. 茶叶茶素生物合成相关基因表达的实时荧光定量 PCR 分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.

[12] 张晓晴. 中国水仙遗传转化体系研究及 NTFYF 基因在花芽分化过程中的表达 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.

[13] 孟雪娇. 黄瓜苯丙烷类代谢关键酶活性及基因表达的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2011.

[14] 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 Biol*, 2002, 3: 1 - 12.

[15] 严佳文. 柑橘内参基因筛选及转 pthA 基因甜橙的表达分析 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.

[16] 马飞. 极大节旋藻实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.

[17] JIAN B, LIU B, BI Y, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative realtime PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9: 59.

[18] 田文轲, 李节法, 王彩虹, 等. 梨茎尖中 PpKO 基因表达量的实时荧光定量 PCR 分析 [J]. *华北农学报*, 2012(3): 62 - 66.

[19] 陈林波, 夏丽飞, 梁名志, 等. 茶树 CsPL1 基因的荧光定量 PCR 分析 [J]. *西南农业学报*, 2011(6): 2082 - 2085.

品 [J]. *激光生物学报*, 2006, 15(2): 184 - 190.

[44] BELLIS C, ASHTON K J, FRENEY L, et al. A molecular genetic approach for forensic animal species identification [J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 134(2/3): 99 - 108.

[45] 王闯, 张林, 周斌, 等. 扩增 TP53 内含子 8 用于生物检材的种属鉴定 [J]. *法医学杂志*, 2005, 21(3): 195 - 199.

[46] 安丽萍. 东亚部分马群体线粒体 Cytb 基因序列及分子系统学研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.

[47] BENSASSON D. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced [J]. *Trends Ecol Evol*, 2001, 16: 314 - 321.

[48] 曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 等. 多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 139 - 146.

[49] 石丰运. 石丰运应用基因芯片技术鉴别检测动物源性成分 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.

[50] 纺织工业标准化研究所. GBPT14593 - 1993 山羊绒、绵羊毛及其混合纤维定量分析方法, 基础标准与方法标准卷(二) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 426 - 433.