

研究报告

Research report

利用实时定量 PCR 技术研究盐胁迫下 107 杨持家基因表达稳定性

周祥明[✉], 宋建[✉], 王姝[✉]

天津市农业生物技术研究中, 天津, 300384

✉ 通讯作者: mittonzhou@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第56篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0056

收稿日期: 2012年08月26日

接受日期: 2012年10月07日

发表日期: 2012年12月14日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周祥明等, 2012, 利用实时定量 PCR 技术研究盐胁迫下 107 杨持家基因表达稳定性, 分子植物育种(online) Vol.10 No.56 pp.1408-1413 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0056)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Gene Expression Stability of Housekeeping Genes in Poplar Clone 107 under Salt Stress by Real Time PCR, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.56 pp.1408-1413 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0056)

摘要 以 107 杨盐胁迫不同时间和对照为试材, 利用实时定量 PCR 技术研究 9 个杨树持家基因在盐胁迫和对照条件下的表达稳定性, 通过 geNorm 软件分析选择最佳内参基因。结果表明: 6 个持家基因的扩增效率在 89.93%~104.68%之间, 且线性回归拟合度 R^2 在 0.987 6~0.999 9 之间; 另外, 经 geNorm 软件分析, 盐胁迫条件下, 持家基因表达稳定性为 $EIF\ 4B=UBQ>CYP>ACT\ II>UBQL>TUB$, $EIF\ 4B$ 和 UBQ 适合作为内参基因; 对照条件下, 持家基因表达稳定性为 $EIF\ 4B=UBQL>ACT\ II>CYP>UBQ>TUB$, $EIF\ 4B$ 和 $UBQL$ 适合作为内参基因。

关键词 旱树; 盐胁迫; 实时定量 PCR; 游离脯氨酸含量; 持家基因; 基因表达

Gene Expression Stability of Housekeeping Genes in Poplar Clone 107 under Salt Stress by Real Time PCR

Zhou Xiangming[✉], Song Jian[✉], Wang Shu[✉]

Tianjin Research Center of Agricultural Biotechnology, Tianjin, 300384 P.R. China

✉ Corresponding author, mittonzhou@163.com ✉ Authors

Abstract Gene expression stabilities of nine housekeeping genes in Poplar Clone 107 (*Populus × euramericana* 'Neva') under different durations of salt stress treatments and control were detected by Real-time PCR; the best reference genes were screened through the geNorm program. The results indicated that amplification efficiency of six housekeeping genes were from 89.93% to 104.68%, and fitting degree of linear regression (R^2) were from 0.987 6 to 0.999 9. Under the conditions of the salt stresses, the order of 6 housekeeping genes expression stabilities from high to low were $EIF\ 4B=UBQ>CYP>ACT\ II>UBQL>TUB$, and the genes, $EIF\ 4B$ and UBQ , should be suitable as reference genes. Whereas under the control condition, the order of six housekeeping genes expression stabilities were $EIF\ 4B=UBQL>ACT\ II>CYP>UBQ>TUB$, and $EIF\ 4B$ and $UBQL$ could be used as reference genes

Keywords Upland rice; Drought resistance; Root trait; Free proline content; SOD activity

随目前, 关于植物胁迫机制的研究多数是通过基因表达分析(Bezier et al., 2002; Dean et al., 2002), 其有助于更好地了解植物胁迫响应机制。基因表达分析需要具有敏感、精确、可重复测量特异mRNA的方法。与Northern blot、RNA酶保护分析、原位杂交和半定量RT-PCR等传统的转录分析方法比较, 实时定量PCR (quantitative real time PCR)为目前检测基因表达最可靠的方法(Bustin, 2000)。该方法具有以下优点:

(1)高度敏感、无PCR后处理及动态范围广, 在表达丰度差异大的基因间可直接进行比较; (2)使用方便, 无需放射性同位素; (3)所需材料起始量少 (Jian et al., 2008)。

但是, qRT-PCR整个实验过程会因RNA的质量和数量、cDNA合成效率以及PCR扩增的差异而导致结果严重偏差(涂礼莉等, 2007, 科学通报, 52(20): 2379-2385)。为避免偏差, qRT-PCR需要内对照基因 (Internal control gene)为参考基因(Reference gene)

进行标准化,其目的是校正实验过程中与各步骤相关的变异,如材料起始量、RNA完整性、cDNA合成效率等。

在理想状态下,内对照基因(主要为持家基因)表达不受实验条件影响(Schmittgen et al., 2000),因而多数研究者以持家基因为内对照基因进行基因表达分析。但多数研究表明,内对照基因受实验条件影响变化较大(刘莉铭等, 2012; 张玉喜等, 2011; Mallona, 2010; Gutierrez et al., 2008; Jian et al., 2008; Jain et al., 2006; Nicot et al., 2005)。因此,能否正确选择持家基因为参考基因,直接影响基因表达结果,甚至产生错误结论。

杨树是世界上栽培最为广泛的林木之一,也是林木基因组学的模式植物。但是,在研究其基因表达方面,极少数研究者根据不同实验条件而进行内对照基因的稳定性分析。目前,仅见Brunner等(2004)以三角叶杨(cottonwood hybrid, *Populus trichocarpa* × *P. deltoides*)为材料(Brunner et al., 2004),对10个常用持家基因(*ACT11*, *ACT2*, *CYP*, *TUA*, *TUB*, *UBQ*, *UBQ-L*, *EIF4B-L*, *EF1β*和*18S*)在不同发育时期进行基因表达稳定性研究。

本研究以盐胁迫(0.6% NaCl)不同时期(0, 3 h, 6 h, 9 h及胁迫9 h后恢复12 h)的107杨叶片为试材,分析除*ACT2*外9个常用持家基因在叶中的表达稳定性,以期筛选出不同盐胁迫时期表达最稳定的持家基因作为内对照基因。

1 结果与分析

1.1 107杨叶片总RNA质量分析

从图1中可判断28S条带与18S带亮度之比约为2:1,紫外可见分光光度计NanoDrop ND1000(美国)测得OD_{260/280}在1.8~2.1之间。

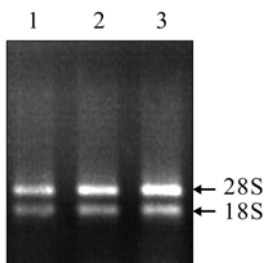


图1 盐胁迫处理的107杨叶片总RNA电泳
注: 1~3 泳道分别为盐胁迫3 h, 6 h和 9 h的总RNA
Figure 1 Agarose electrophoresis of total RNA from the leaves of poplar 107 under salt stress
Note: Lane 1~3 Total RNA from leaves in the stress durations on 3 h, 6 h and 9 h, respectively

结果表明所提取的总RNA样品未降解,完全满足后续实验要求。利用持家基因*ACT II*引物对反转录产物进行PCR扩增,获得了与预期大小的目的片段(图2),说明所提取的RNA可成功反转录。

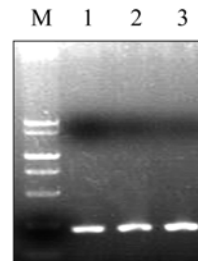


图2 杨树*ACT II*基因的RT-PCR产物
注: 1~3泳道分别为盐胁迫3 h, 6 h和 9 h的总RNA反转录PCR产物
Figure 2 RT-PCR products of poplar *ACT II* gene
Note: Lane 1~3 RT-PCR products from leaves in the stress durations on 3 h, 6 h and 9 h, respectively

1.2 9个持家基因的Real time PCR 扩增效率分析

选择已报道的9个常用持家基因用于本实验。其中,*EF1β*和*18S*持家基因引物进行Real time PCR时,结果未出现“S”形扩增曲线,不适合用于本实验;另外,*TUA*持家基因引物扩增效率大大超出了有效扩增效率范围(表1),也不适合进行后续研究。其他6个持家基因引物扩增效率在89.93%~104.68%之间,且拟合度R²值在0.987 6~0.999 9之间,说明标准曲线线性关系好,确保了Real time PCR结果准确,因此利用这6个持家基因进行后续相关研究。

1.3 持家基因表达稳定性分析

geNorm通过分析持家基因在不同发育时期或不同胁迫处理样品的表达稳定性(M)来筛选最稳定表达的持家基因的软件,该软件默认M=0.5为取舍值,内参基因的M值小于0.5,则认为可以考虑作为内参基因, M值越大越不稳定(刘莉铭等, 2012; 王忠伟等, 2012; 侯维海等, 2011)。根据geNorm软件计算结果,盐胁迫处理条件下,持家基因表达稳定性为*EIF 4B*>*UBQ*>*CYP*>*ACT II*>*UBQL*>*TUB*(图3);非盐胁迫对照条件下,持家基因表达稳定性为*EIF 4B*>*UBQL*>*ACT II*>*CYP*>*UBQ*>*TUB*(图4)。在这两种条件下,除*TUB*基因外(M>0.5),其余持家基因均可做为内参基因。

geNorm软件通过分析内参基因的配对差异值V_{n/n+1}来确定在某种条件下所需内参基因最适数目,

表1 7个持家基因的标准曲线方程、回归系数及扩增效率

Table 1 Standard curve equation, regression coefficient and PCR efficiency of 7 housekeeping genes

基因 Gene names	标准曲线方程 Standard curve equation	斜率 Slope	扩增效率(%) PCR efficiency (%)	回归系数 Regression coefficient (R ²)
<i>ACT II</i>	$y = -3.4479x + 20.954$	-3.4479	95.00	0.995 9
<i>CYP</i>	$y = -3.3164x + 19.098$	-3.3164	100.23	0.992 7
<i>EIF 4B</i>	$y = -3.3735x + 21.988$	-3.3735	97.89	0.987 6
<i>TUA</i>	$y = -2.3750x + 28.540$	-2.3750	163.67	0.952 7
<i>TUB</i>	$y = -3.4594x + 19.428$	-3.4594	94.57	0.999 9
<i>UBQ</i>	$y = -3.2147x + 16.130$	-3.2147	104.68	0.995 2
<i>UBQL</i>	$y = -3.5896x + 20.044$	-3.5896	89.93	0.998 9

该程序默认值 $V=0.15$, 若 $V_{n/n+1} < 0.15$, 则没必要引入第 $n+1$ 个内参基因(刘莉铭等, 2012; 王忠伟等, 2012; 张玉喜等, 2011)。图5、图6可知, 在盐胁迫和对照条件下, $V_{2/3}$ 分别为0.119和0.095, 均小于0.15, 故无需引入第3个内参基因。结果表明, 107杨在盐胁迫和对照条件下, 叶片器官为材料进行的基因表达分析内参基因最适数目是2个。

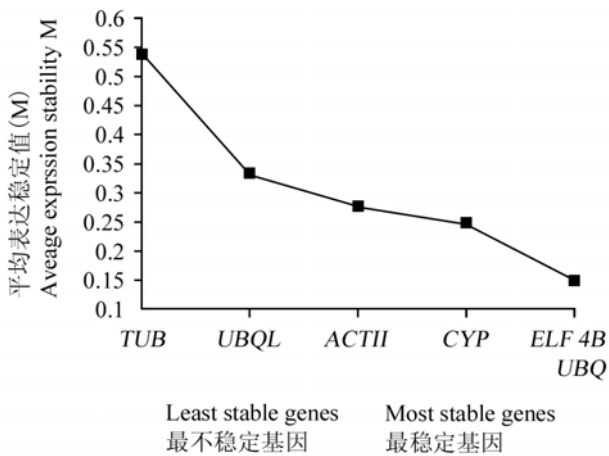


图3 不同盐胁迫时间下持家基因的表达稳定性
Figure 3 Expression stability of the housekeeping genes in various salt stress durations

2讨论

Real time PCR具灵敏、特异、精确、重复性等优点, 是研究基因表达方面的重要工具(李钱峰等, 2008; Bustin, 2000)。但通过Real time PCR进行基因表达分析时, 选择合适的持家基因作为内参基因是获得可靠结果的关键因素。近年来, 越来越多的实验证明了持家基因的表达并非稳定(Shen et al., 2010; Mallona et al., 2010)。因此, 进行Real time PCR 进行基因表达分析时, 需针对不同实验条件分析内参

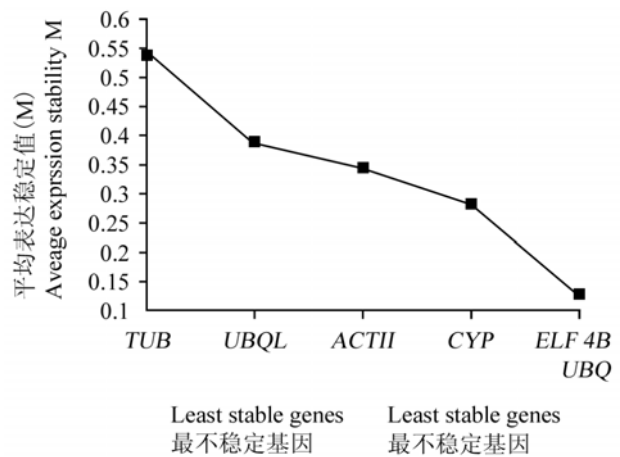


图4 对照条件下持家基因的表达稳定性
Figure 4 Expression stability of housekeeping genes in the control condition

基因的表达稳定性。

本研究通过geNorm软件分析可看出, 在盐胁迫和对照条件下, 6个持家基因表达稳定度分别为 $EIF\ 4B = UBQ > CYP > ACT\ II > UBQL > TUB$ 和 $EIF\ 4B = UBQL > ACT\ II > CYP > UBQ > TUB$, 结合 $V_{n/n+1}$ 值, 最终确定 $EIF\ 4B$ 和 UBQ 作为盐胁迫处理的内参基因, $EIF\ 4B$ 和 $UBQL$ 作为对照条件下的内参基因。与Brunner等(2004)所报道的持家基因 UBQ 表达最为稳定相符合, 而其他持家基因稳定性不一致。本研究中 TUA 持家基因的表达丰度与Brunner等(2004)报道基本一致, 但其扩增效率大大超出有效扩增范围, 故淘汰其后续的研究; Jian等(2008)以大豆为试材, 分析 TUA 持家基因在不同发育时期表达最稳定; Brunner等(2004)认为 TUA 持家基因表达是第二稳定的。 $EF1\beta$ 和 $18S$ 持家基因在本实验中无法扩增出“S”形曲线, 无法进行后续研究。在早期研究中, 常把

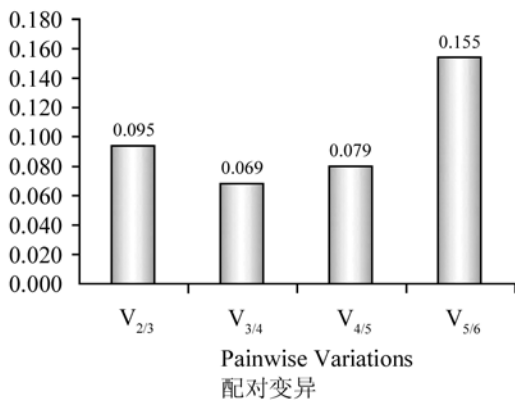


图5 不同盐胁迫时间内参基因标准化最适数目确定
Figure 5 Determination of the optimal number of reference genes for normalization in various salt stress durations

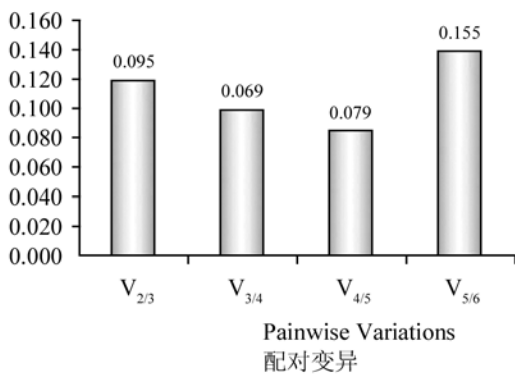


图6 对照条件下内参基因标准化最适数目确定
Figure 6 Determination of the optimal number of reference genes for normalization in control condition

18S持家基因作为内参基因进行研究,有报道指出18S持家基因不适合用于内参基因,主要是18S持家基因无法利用oligo-dT引物进行反转录(Jian et al., 2008)。综上所述说明不同实验条件、不同材料、不同组织器官中,持家基因表达并非稳定。

3材料与方法

3.1植物材料

以107杨一年生木质化的枝条为试材,选取生长基本一致的枝条并剪成长约20 cm的穗段插入盛有自来水的水培箱中,置于人工气候室内,光周期16 h,昼夜温度分别为28℃和22℃。待根长约5 cm后,选择生长基本一致的扦插苗置于含0.6% NaCl (102.7 mmol/L)的Hoagland营养液中胁迫处理,处理时间分别为0, 3 h, 6 h, 9 h及胁迫9 h后恢复至无NaCl的Hoagland营养液中12 h。置于无NaCl的Hoag-

land营养液中培养的材料作为对照。分别在这些时间点进行盐处理及相应对照的取材工作。用去离子水将材料迅速洗净,液氮速冻后放入-80℃冰箱保存备用。

3.2总RNA抽提及cDNA合成

总RNA提取方法见已发表文章(周祥明等, 2012)。核酸浓度测定在紫外可见分光光度计Nano-Drop ND1000 (美国)上进行。取OD_{260/280}在1.8~2.1之间及OD_{260/A230}大于2.0的RNA进行下一步分析。cDNA的合成步骤为:取2 μg总RNA, 1 μL 1 μg/μL Oligo-dT(15)引物(鼎国), 1.25 μL 10 mmol/L dNTP加DEPC处理水混合至总体积为15 μL;然后70℃变性10 min迅速置于冰上冷却;再加入5 μL 5×RT缓冲液, 20 U RNA酶抑制剂(Ribonuclease Inhibitor, TaKaRa)和200 U反转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase, Promega)的混合液, 42℃温浴1 h合成第一链;每份cDNA稀释到100 μL后于-20℃冰箱保存待用。

3.3内参基因的选择及引物序列

本实验所使用的内参基因及序列参见Brunner (Brunner et al., 2004)。

3.4实时定量PCR反应条件

qPCR反应在LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics)荧光定量PCR上运行。反应体系为20 μL, 其中2×SYBROR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 10 μL, 引物(10 μmol/L) 1.0 μL, cDNA模板1 μL, 补去离子水至20 μL。反应条件为: 94℃预变性30 s, 94℃变性5 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 40个循环, 延伸阶段收集信号。从60℃到95℃, 每个循环增加0.5℃, 持续0.05 s获得解链温度, 收集融解曲线荧光信号。

3.5数据处理和分析

实时荧光定量PCR反应结束后,利用Excel软件初步处理所获得的数据,如平均值,再利用geNorm程序进行数据分析。首先在Excel的横栏和纵列中分别输入不同持家基因名称和处理,然后输入相应的Ct平均值;然后选择每个基因在不同处理中表达量最高(最小Ct值)的样品作为参照并将其表达量设为1,再利用ΔCt法将其余样品中该基因的表达量转换成相对于该样品的相对表达量(李钱峰等, 2008; Vandesompele et al., 2002)。相对表达量的计算公式为 $Q = E^{-\Delta Ct}$, 其中E为基因扩增效率、ΔCt=最小的

Ct-各样品相对应的Ct值, 将这些数据导入geNorm程序, 在进行数据转换后, 计算基因表达稳定度M和配对变异度V (张玉喜等, 2011; 李钱峰等, 2008; Vandesompele et al., 2002)。

作者贡献

周祥明是项目的构思者及负责人, 同时指导实验设计, 数据分析, 论文初稿的写作与修改; 宋建负责材料的水培、处理、取样、RNA提取检测; 王姝进行试验结果分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究天津市应用基础及前沿技术研究计划(10JCYB-JC09500)、天津市科技计划项目(12ZCDZNC04700)、国际科技合作项目(2011DFA30990)和北京林业大学林木育种国家工程实验室开放课题项目(FOP2010-13); 作者感谢天津市农业科学院质标所兰青阔在RNA检测方面给予的帮助, 《天津农业科学》编辑部梁凤莲在论文撰写中给予的宝贵建议。

参考文献

- Bezier A., Lambert B., and Baillieux F., 2002, Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*, *Eur. J. Plant. Pathol.*, 108 (2): 111-120 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015061108045>
- Brunner A.M., Yakovlev I.A., and Strauss S.H., 2004, Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies, *BMC Plant Biol.*, 4: 1-7 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-4-14> PMID:15317655 PMCID:515301
- Bustin S.A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J. Mol. Endocrinol.*, 25(2): 169-193 <http://dx.doi.org/10.1677/jme.0.0250169> PMID:11013345
- Dean J.D., Goodwin P.H., and Hsiang T., 2002, Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*, *Plant Mol Biol Rep.*, 20: 347-356 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02772122>
- Gutierrez L., Mauriat M., Guénin S., Pelloux J., Lefebvre J.F., Louvet R., Rusterucci C., Moritz T., Guerineau F., Bellini C., and Van Wuytswinkel O., 2008, The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants, *Plant, Biotechnol. J.*, 6(6): 609-618 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00346.x> PMID:18433420

- Hou W. H., Sun P., Chen Q.J., Li X.E., 2011, Selection of the reference genes for gene expression studies in *Rehmannia glutinosa* by Real-time Quantitative PCR *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 27(17): 76-82 (侯维海, 孙鹏, 陈全家, 李先恩, 2011, 地黄实时定量PCR内参基因的筛选, *中国农学通报*, 27 (17): 76-82)
- Jain M., Nijhawan A., Tyagi A.K., and Khurana J.P., 2006, Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative realtime PCR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345(2): 646-651 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140> PMID: 166-90022
- Jian B., Liu B., Bi Y.R., Hou W., Wu C., and Han T., 2008, Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR, *BMC Mol Biol.*, 9: 1-14 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-9-59> PMID:185-73215 PMCID:2443375
- Li Q.F., Jiang M.Y., Yu H.X., Samuel S.M.S., Gu M.H., and Liu Q.Q., 2008, Selection of internal reference genes for quantitative RT-PCR analysis of total RNA from endosperm of rice (*Oryza sativa* L.), *Yangzhou Daxue Xuebao (Nongye Yushengming Kexueban) Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 29(2): 61-66 (李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀, 辛世文, 顾铭洪, 刘巧泉, 2008, 水稻胚乳RNA定量RT-PCR分析中参照基因选择, *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 29(2): 61-66)
- Liu L.M., Liu H.Y., and Tian B.M., 2012, Selection of Reference Genes from Sesame Infected by *Macrophomina phaseolina*, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 38 (3): 471-478 (刘莉铭, 刘红彦, 田保明, 2012, 茎点枯病菌诱导下芝麻内参基因的筛选. *作物学报*, 38(3): 471-478.
- Mallona I., Lischewski S., Weiss J., Hause B., and Egea-Cortines M., 2010, Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*, *BMC Plant Biol.*, 10: 4 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-10-4> PMID:20056000 PMCID:2827423
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., and Evers D., 2005, Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, *J. Exp. Bot.*, 56(421): 2907-2914 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eri285> PMID:16188960
- Schmittgen T.D., and Zakrajsek B.A., 2000, Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR, *J. Biochem. Bi-*

- ophys. Methods., 46(1-2): 69-81 [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9)
- Shen G.M., Jiang H.B., Wang X.N., and Wang J.J., 2010, Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), BMC Plant Biol., 11: 76
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., and Speleman F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, Genome Biol., 3(7): 1-12 <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Wang Z. W., Guo J. R., Wang J. F., Zang L., Guo S., Yang H M., Validation of reference genes for gene expression analysis in neonatal Zi goose tissues using quantitative real-time PCR, Zhongguo Shouyi Xuebao (Chinese Journal of Veterinary Science), 2012, 32(3): 427-431 王忠伟, 郭景茹, 王建发, 臧琳, 郭爽, 杨焕民. 新生籽鹅组织qRT-PCR分析中内参基因的选择, 中国兽医学报, 2012, 32(3): 427-431
- Zhang Y.X., Gai S.P., Liu C.Y., Mu P., and Zheng G.S., 2011, Selection of control genes in Real-time qPCR analysis during Bud dormancy release in tree Peony (*Paeonia suffruticosa*), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 9: 1052-1056 (张玉喜, 盖树鹏, 刘春英, 穆平, 郑国生, 牡丹花芽:休眠解除过程中实时定量PCR内参基因的选择, 分子植物育种(online), 9: 1052-1056)
- Zhou X.M., Song J., Wang S., and Hao Z.Y., 2012, Study on the extraction methods of total RNA from salt stressed Poplar, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 10: 1214-1217 (周祥明, 宋建, 王姝 郝志愚, 盐胁迫处理的杨树RNA提取方法研究, 分子植物育种(online), 10: 1214-1217)