

研究报告

A Letter

牡丹花芽休眠解除过程中实时定量 PCR 内参基因的选择

张玉喜[✉], 盖树鹏[✉], 刘春英[✉], 穆平[✉], 郑国生[✉]

青岛农业大学生命科学院, 青岛, 266109

✉ 通讯作者: gszheng@qau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第7篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0007

收稿日期: 2010年08月31日

接受日期: 2011年12月26日

发表日期: 2011年01月26日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。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:

张玉喜等, 2011, 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 Vol.9 No.7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0007)

摘要 以牡丹不同低温处理时间的花芽为研究对象, 应用实时定量 PCR 技术, 探讨了 β -actin, b-tubulin, α -tubulin 和 60S-L₁₁ 4 个候选内参基因的表达情况。经 GeNorm 程序分析, 4 个候选内参基因的表达稳定性各异, 四者的稳定性由高到低依次为 β -actin>b-tubulin>60S-L₁₁> α -tubulin, 根据内参基因标准化因子的配对差异分析($V_{n/n+1}$), 判定内参基因的最适数目为 2, 因此可以使用表达相对稳定的 β -actin 和 b-tubulin 作为牡丹实时定量 PCR 中的内参基因。同时, 以筛选的持家基因为内参基因分析牡丹脱水素基因的表达水平, 结果表明, 脱水素基因参与了牡丹内休眠解除的整个过程, 且在休眠解除前期呈上调趋势, 且以两组引物为内参基因引物得到的脱水素基因的表达水平变化趋势是一致的, 因此, 所筛选的内参基因是合适的。

关键词 牡丹; 内参基因; GeNorm 程序; 实时定量 PCR; 脱水素基因

Selection of Control Genes in Real-time qPCR Analysis during Bud Dormancy Release in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*)

Zhang Yuxi[✉], Gai Shupeng[✉], Liu Chunying[✉], Mu Ping[✉], Zheng Guosheng[✉]

Qingdao Agriculture University, College of Life Science, Qingdao, 266109, P.R. China

✉ Corresponding author, gszheng@qau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract The bud controlled by different time at 10 temperature in Tree peony (*Paeonia suffruticosa*) was used as test materials to analyze its expression of four candidate control genes (β -actin, b-tubulin, α -tubulin and 60S-L₁₁) by using real-time quantitative PCR (real-time qPCR). According to the analysis by GeNorm programmer, the expression stability of the four control genes tested was different with the order of β -actin>b-tubulin>60S-L₁₁> α -tubulin. On the basis of the $V_{n/n+1}$ of the normalization factor, β -actin and b-tubulin were assumed to be suitable internal control genes. At the same time, the expression of dehydrin gene was analyzed, and the results indicated that the variation trends of dehydrin gene using β -actin and b-tubulin as control genes were extraordinary consensus during bud dormancy release of tree peony. Therefore, both β -actin and b-tubulin selected as internal control genes were appropriate.

Keywords *Paeonia suffruticosa*; Internal control genes; GeNorm program; Real-time qPCR; Dehydrin gene

研究背景

以荧光定量检测为基础的实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR 或 QPCR) 技术, 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 为样品中靶标序列的精确定量提供了一种便捷的方法。在植物实时荧光定量 PCR 的研究中多用持家基因作为内参基因, 如 18S rRNA, 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH), 转录延伸因子基因(EF-1 α), 多聚泛素酶基因(UBQ), β -肌动蛋白基因(β -actin), 微管蛋白基因 α -tubulin 和 b-tubulin 等(Spinsanti et al., 2006; Pombo-Suarez et

al., 2008; Infante et al., 2008; Yan et al., 2006)。稳定的内参基因对反应进行校正和标准化可以增加该方法的敏感度、重复性和动态范围。但是最近一些研究结果表明, 并不是所有的内参基因基因在不同细胞类型和不同生理状态下的表达恒定不变, 有时甚至差别很大(Suzuki et al., 2000; Bustins A, 2002; Dheda et al., 2004)。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)是中国传统名花之一, 具有极高的观赏价值。牡丹花芽的休眠是典型的内休眠, 每年冬季进入休眠状态花芽, 必须

经过一定的低温积累量才能彻底解除休眠。Xin Huang等(2008)利用RT-PCR方法, 以转录延伸因子基因EF作为内参基因, 研究了牡丹内休眠解除过程中相关基因的相对表达差异。目前国内尚无牡丹基因表达分析中有关内参基因的选择的相关报道。本研究从本实验室自建牡丹cDNA文库中选择 β -actin, b-tubulin, α -tubulin和60S-L₁₁ 4个管家基因, 通过实时定量PCR技术分析其在牡丹内休眠解除过程的表达水平, 利用GeNorm程序分许其表达稳定度。并且利用所筛选出的内参基因, 对牡丹的脱水素基因(psDHN)基因在花芽休眠解除前后进行了表达分析研究, 旨在选择一个或几个适合牡丹花芽内休眠解除过程的内参基因, 这对于研究牡丹特定基因的表达水平, 揭示牡丹花芽内休眠机理具有重要的理论意义和实践价值。

1 结果与分析

1.1 内参基因的表达稳定性分析和最适数目的选择

在定量PCR分析中, 针对特定的生理过程和样品类型选择合适的内参基因进行标准化对于得到准确的基因表达结果至关重要。本研究选择了b-tubulin, 60S-L₁₁, α -tubulin和 β -actin 4个候选的内参基因, 以牡丹花芽T₀ (已经进入休眠状态)的cDNA为模板, 均扩增出了特异条带(图1), 说明4个候选的内参基因在牡丹花芽T₀中均有表达。同时进行了实时定量PCR, 4个内参基因的平均值M均小于1.5, 因此用GeNorm程序分析内参基因表达的稳定度并进一步排序, 得到基因的表达稳定度依次为0.477、0.486、0.519和0.438 (图2), 即四者的稳定性由高到低依次为 β -actin>b-tubulin>60S-L₁₁> α -tubulin。GeNorm程序默认的V值为0.15, 如果 $V_{n/n+1}$ 大于0.15, 则有必要引入第n+1个基因, 反之, 则不必引入新的内参基因。本实验中 $V_{2/3}=0.113<0.15$, 因此可以使用表达相对稳定的 β -actin和b-tubulin作为牡丹实时定量PCR中的内参基因(图3)。

1.2 牡丹脱水素基因表达的实时定量PCR分析

脱水素基因属于L EA蛋白(胚胎发育晚期丰富蛋白)家族, 它是一种广泛存在于高等植物的干旱诱导蛋白, 在胚胎发生晚期产生, 与植物耐脱水性密切相关。脱水素起分子伴侣和亲水性溶质作用, 在水分胁迫时稳定和保持蛋白质的结构及功能, 对低

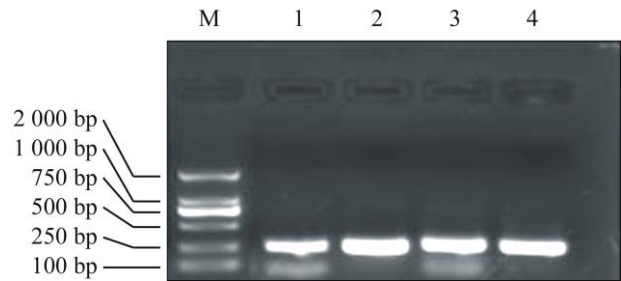


图1 4个内参基因引物的PCR结果

注: M: DL2000; 1: β -actin; 2: b-tubulin; 3: α -tubulin; 4: 60S-L₁₁

Figure 1 The PCR results of 4 control genes in the peony flower bud

Note: M: DL2000; 1: β -actin; 2: b-tubulin; 3: α -tubulin; 4: 60S-L₁₁

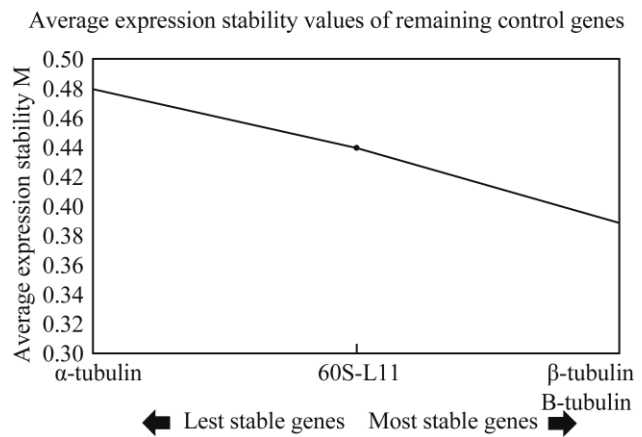


图2 4个内参基因表达的稳定度差异

Figure 2 Comparison on stabilities of four control genes

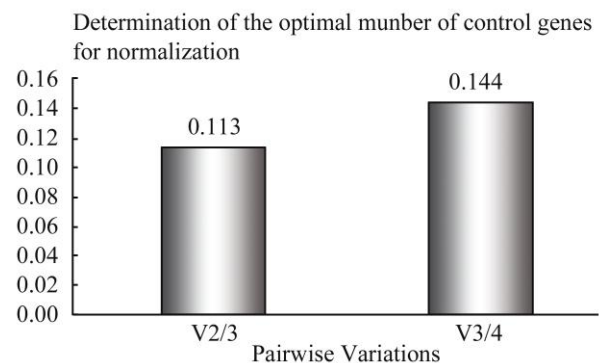


图3 内参基因的最适数目的判定

Figure 3 Determine of optimal number of four control genes

温和外源ABA产生反应。牡丹花芽属典型的内休眠, 需要有效低温为0-10℃的长时间的处理才能解除休眠萌动开花展叶。本实验取5个时间的低温处理的牡丹花芽, 分别以 β -actin和b-tubulin为内参基因来分析脱水素基因的表达水平, 结果如图4。以两组引物做为内参基因的引物分析脱水素基因的表达水平, 其变化趋势高度相似, 脱水素基因在0 d低温处理时表达水平最高, 在低温处理5天后表达量急剧下降, 随着低温处理时间的延长, 在休眠解除前期呈上调表达趋势。当低温处理时间为20天时, 即休眠完全解除后, 表达水平又急剧下降。

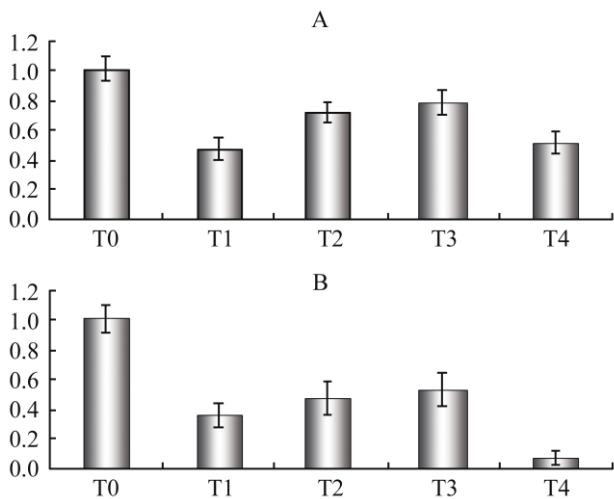


图4 牡丹脱水素基因的表达水平分析

注: A: 以 β -actin为内参基因; B: 以b-tubulin为内参基因

Figure 4 Expression analysis of dehydrin gene in tree peony

Note: A: Using β -actin as control gene; B: Using b-tubulin as control gene

2讨论

一个理想的内参应该在各种不同的细胞类型、不同发育阶段、采用不同处理方法时都能稳定表达, 而内参的稳定表达正是确定目标基因在某一生理发育时期相对表达水平的前提和基础。 β -actin在维持细胞形态、促进细胞运动和收缩等细胞生理活动方面发挥着重要的作用(Thellin et al., 1999; Ohdan et al., 2005)。本研究中选用了牡丹cDNA文库中的4个看家基因 β -actin、b-tubulin、 α -tubulin和60S-L₁₁作为候选内参, 其中b-tubulin、 α -tubulin和 β -actin为常用的看家基因。结果表明, 肌动蛋白基因 β -actin表达相对稳定, 这与Reid等人报道, 肌动蛋白基因是葡萄浆果发育过程中最稳定的内对照

基因之一的结论一致, 而涂礼莉等(2007)在棉花纤维发育过程中实时定量PCR内对照基因的筛选的研究中发现肌动蛋白基因在非纤维系列表达水平是最不稳定的。另外微管蛋白不同家族成员间的差异较大, b-tubulin比 α -tubulin稳定性大, 而Brunner等(2004)在杨树的不同发育时期分析了10个传统的内参基因, 结果表明 α -tubulin在不同的样品间变异系数最小, 表达最为稳定; Jian等(2008)在大豆中也发现 α -tubulin在大豆的不同发育时期的样品中稳定性最好。本研究首次采用60S核糖体蛋白质L₁₁作为候选基因, 结果表明60S-L₁₁在4个候选内参基因中表达水平较 α -tubulin稳定, 这在以往的文献中未见有相关报道。GeNorm程序是专门用于分析内参基因稳定性的程序, 本文运用GeNorm程序计算所选的4个内参基因稳定度的平均值M结果发现在对照的牡丹花芽中即刚刚进入休眠的牡丹花芽中都有表达, 当经历不同的低温时间处理后表达的稳定性表现出一定的差异, 最终筛选到两个相对稳定的持家基因(β -actin和b-tubulin)作为内参。选择两个或两个以上的内参基因作参照有助于得到更可靠的表达结果, 这在大豆(Gutierrez et al., 2008)、马铃薯(Expsito-Rodriguez et al., 2008)、葡萄(Reid et al., 2006)和杨树(Gutierrez et al., 2008)中已有过相关报道。

牡丹具有深休眠的特性, 适量的低温是打破花芽休眠的有效途径(Aoki N, 1992a; 1992b)。有效的低温积累量在牡丹花芽内休眠的解除过程中起质的作用。低温作为一种环境信号因子, 能够诱导许多相关抗性基因的表达。在北方秋末(10月下旬)利用自然低温(0-10℃) 30-50 d可解除花芽休眠。本研究采用人工控温(10℃)处理, 设了五组处理, 低温处理15天时, 牡丹花芽少数已经基本可以萌动, 低温处理20天牡丹花芽多数萌动。牡丹花芽内休眠的解除是个复杂的生理过程, 是多基因共同作用的结果, 脱水素基因就是其中的一种(Xin Huang et al., 2008)。脱水素(dehydrin, DHN)是一种广泛存在于高等植物的干旱诱导蛋白, 对低温和外源ABA产生反应, 或在干旱、盐及胞外结冰的脱水胁迫植株中积累。本实验结果表明, 利用筛选出的两个候选基因作为内参, PsDHN的表达趋势高度相同, 即PsDHN在花芽进入内休眠期后的休眠解除前期呈上调趋势, 与刚刚进入休眠的T₀阶段相比表达水平有所降

低, 这与前人的研究结果一致(Yakovlev et al., 2008), 同时也说明本实验所筛选出的内参基因是合适的。两对引物获得的结果高度一致, 那么采用其中的一对引物同样可以对目标基因在牡丹花芽内休眠解除过程的表达数据进行标准化。

3材料与方法

3.1材料

牡丹品种引自山东菏泽牡丹基地4年生“鲁荷红”, 由青岛农业大学生命科学院植物生理实验室提供。

3.2方法

3.2.1牡丹材料处理

将“鲁荷红”起苗, 单株栽植于盆内。根据(Uath)模型, 打破休眠的有效低温为0-10℃, 待日最低气温达10℃时, 此时低温处理0天, 取花芽作为对照, 立刻取适量花芽投入液氮固定, 于-80℃冰箱中保存备用; 另外, 每隔5天选取一定数量的健壮植株转移至18-25℃的温室中, 并取样, 一共5个不同低温处理(0 d, 5 d, 10 d, 15 d, 23 d), 分别命名为T₀-T₄, 基本包括了牡丹花芽进入休眠和休眠解除的整个过程(郑国生等, 2009)。

3.2.2 RNA提取和cDNA合成

根据EASY spin植物RNA快速提取试剂盒(原平皓生物公司, 天津)的操作说明, 提取牡丹花芽总RNA, 电泳检测RNA的完整性。用核酸蛋白分析仪(BioRad, 美国)检测RNA的纯度和浓度。采用SYBR Primix DimerEraser™ RT reagent Kit和SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 大连)分别进行cDNA的合成和qPCR反应。

3.3内参引物的设计和表达稳定性分析

根据本实验室建立的牡丹品种“凤丹”的cDNA文库中的EST序列分别设计4对内参基因, 脱水素基因的引物根据本实验室建立的牡丹品种“鲁荷红”SSH文库设计(Xin Huang, et al., 2008), 引物序列如下表1。10 μL的反转录体系: 2 μL的5×Primer-Script™ Buffer, 0.5 μL 50 μmol/L Oligo dT primer, 0.5 μL 100 μmol/L random 6 mers, 0.5 μL PrimerScript RT enzyme mix, 500 ng total RNA, 用Rnase free H₂O补足10 μL。反转录反应条件为: 37℃ 15 min; 85℃ 5s。

表1 内参基因和脱水素基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for control genes and dehydrin gene		
引物名称 Primer	引物序列 primer Sequence	产物长度 Length of products
60S-L ₁₁	5'-ATCGGTCGGTGAAAGTGGAG-3' 5'-TACCAAAGCCAAAGCAGCCA-3'	253
b-tubulin	5'-TACAATGAGGCAAGTGGAGGG-3' 5'-GTGAATGGCAAACCTGAAACC-3'	264
α-tubulin	5'-AACCTACACGAACCTCAACCG-3' 5'-ATGGATGAAGGCTCAAACGCA-3'	236
β-actin	5'-GAGAGATTCCGTTGCCCTGA-3' 5'-CTCAGGAGGAGCAACCACC-3'	227
PsDHN	5'-GGAATAAGGGAGCGGTGGACAA-3' 5'-CCAACGCCTGGAATCTTCTGCT-3'	231

反转录cDNA产物用EASY dilution 10倍稀释作为实时定量PCR分析的模板。

利用Bio-Rad Chromo4™ Real-Time PCR仪进行扩增。PCR反应体系为: 2×SYBR Premix Dimer Eraser™ 12.5 μL, 10 μM的上下游引物各0.75 μL, cDNA模板2 μL, 无菌水补齐到25 μL。每个样品重复3次。反应条件为: 95℃ 30s; 95℃ 5s、57℃ 30s、72℃ 30s, 共35个循环。设置在延伸收集荧光信号。经Opticon Monitor3.0程序分析可得到各内参在样本的循环阈值(C_t值), 并用GeNorm (Vandesompele et al., 2002)程序进行转换和分析。利用筛选到的内参基因, 采用相同的定量PCR反应体系和程序, 进行牡丹脱水素基因的表达水平分析。

3.4数据处理和分析

实时定量PCR反应结束后, 数据用Excel 2003软件初步处理, 再采用GeNorm程序分析。在Excel中将不同样品中某一内参基因C_t值最小者对应样品的表达量定义为1, 其他样品此内参基因的相对表达量为2^{-ΔC_t}, 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并进行排序(M值越小, 表达越稳定), 最后根据内参基因标准化因子的配对差异分析(V_{n/n+1}), 判定内参基因的最适数

目(Vandesompele et al., 2002)。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(30871728)、山东省自然科学基金项目(ZR2009DM002)和青岛农业大学高层次人才启动基金(630703)共同资助。

参考文献

- Aoki N., 1992a, Influences of pre-chilling on the growth and development of flower buds and cut-flower quality of forced tree peony, *J Japan Soc Hort Sei*, 61(1): 151-157
- Aoki N., 1992b, Effects of pre-chilling and pre-and pest-budbreak temperature on the subsequent growth and cut-flower quality of forced tree peony, *J. Japan Soc Hort Sci.*, 61(1): 127-133
- Brunner A.M., Yakovlev I.A., and Strauss S.H., 2004, Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies, *BMC Plant Biol*, 4: 14-20
- Bustins A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems, *J. Mol. Endocrinol*, 29: 23-29
- Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., and Zumla A., 2004, Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *Biotechniques*, 37: 112-119
- Exposito R.M., Borges A.A., Borges P.A., and Perez J.A., 2008, Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process, *BMC Plant Biol*, 8: 131-142
- Gutierrez L., Mauriat M., Guenin S., Pelloux J., Lefebvre J.F., Louvet R., Rusterucci C., Moritz T., Guerineau F., Bellini C., and Wuytswinkel O.V., 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: 609-618
- Infante C., Matsuoka M.P., Asensio E., Canavate J.P., Reith M., and Manchado M., 2008, Selection of house keeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, (9): 28
- Jian B., Liu B., and Bi Y., 2008, Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR, *BMC Mol. Biol.*, 9: 59
- Ohdan T., Francisco P.B., and Sawada T., 2005, Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice, *Journal of Experimental Botany*, 56(422): 3329-3244
- Pombo S.M., Calaza M., Gomez-Reino J.J., and Gonzalez A., 2008, Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage, *BMC Mol. Biol.*, (9): 17
- Reid K.E., Olssen N., Schlosser J., Peng F., and Lund S.T., 2006, An optimized grapevine RNA isolation procedure, and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development, *BMC Plant Biol.*, 6: 1-11
- Ruibo H., Chengming F., and Yongfu F., 2009, Reference Gene Selection in Plant Real-time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR), *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11(6): 30-36 (胡瑞波, 范成明, 傅永福, 2009, 植物实时荧光定量PCR内参基因的选择, 中国农业科技导报, 11(6): 30-36)
- Spinsanti G., Panti C., Lazzeri E., Marsili L., Casini S., Frati F., and Fossi C.M., 2006, Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies, *BMC Mol. Biol.*, 19(7): 32
- Suzuki T., Higgins P.J., and Crawford D., 2000, Control selection for RNA quantitation, *Biotechniques*, 29: 332-337
- Tu L.L., Zhang X.L., Liu D.Q., Jin S.X., Cao J.L., Zhu L.F., Deng F.L., Tan J.F., and Zhang C.B., 2007, Chinese Science Bulletin, 52(20): 2379-2385 (涂礼莉, 张献龙, 刘迪秋, 金双侠, 曹景林, 朱龙付, 邓锋林, 谭家福, 张存斌, 2007, 棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量PCR内对照基因的筛选, 科学通报, 52(20): 2379-2385)
- Vandesompele L., De Preter K., and Pattyn 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
- Xin H., Guo S.Z., Si L.D., and Shu P.G., 2008, Identification of differentially expressed genes associated with bud dormancy release in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) by suppression subtractive hybridization, *Forestry Studies in China*, 10(2): 88-94
- Yakovlev I.A., Asante D.K.A., Fossdal C.G., Partanen J., Junttila O., and Johnsen Ø., 2008, Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce, *Planta*, 228: 459-472
- Yan H.Z., and Liou R.F., 2006, Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*, *Fungal Genet Biol.*, 43: 430-438
- Zheng G.S., Gai S.P., and Gai W.L., 2009, Changes of Endogenous Hormones during Dormancy Release by Chilling in Tree Peony, *Scientia Silvae Sinicae*, 45(2): 48-52 (郑国生, 盖树鹏, 盖伟玲, 2009, 低温解除牡丹芽休眠进程中内源激素的变化, 林业科学, 45(2): 48-52)