

## 青天葵实时荧光定量 PCR 内参基因的选择

黄琼林, 梁凌玲, 何 瑞, 詹若挺, 陈蔚文\*

广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 筛选合适的内参基因用于青天葵实时荧光定量 PCR 分析的校正。方法 以毛唇芋兰 3 个组织(叶片、叶柄和球茎)为材料, 利用实时荧光定量 PCR 技术探讨 18S rRNA、actin、ubiquitin、EF-1 $\alpha$  和  $\beta$ -tubulin 5 个常用内参基因在毛唇芋兰不同组织中表达差异。利用 GeNorm 和 NormFinder 软件比较各内参基因的 Ct 值, 以分析他们在青天葵 3 个组织的表达稳定性。结果 5 个内参基因的表达稳定性各异, GeNorm 软件分析结果表明, 稳定性  $\beta$ -tubulin=EF-1 $\alpha$ >ubiquitin>actin>18S rRNA; NormFinder 软件结果显示  $\beta$ -tubulin 稳定性最好, EF-1 $\alpha$  次之, 18S rRNA 则最差。两个不同软件分析结果一致。结论  $\beta$ -tubulin 可作为毛唇芋兰不同组织中基因表达差异分析的校正内参基因。

**关键词:** 青天葵; 荧光定量 PCR; 内参基因; Ct 值; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1979-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.021

## Selection of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Nervilia Fordii Folium*

HUANG Qiong-lin, LIANG Ling-ling, HE Rui, ZHAN Ruo-ting, CHEN Wei-wen

Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To select an appropriate reference gene for gene expression analysis using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Methods** Using leaf, petiole, and corm tissues of *N. fordii*, five common reference genes (18S rRNA, actin, ubiquitin, EF-1 $\alpha$ , and  $\beta$ -tubulin) were compared. The stability of the candidate reference genes was evaluated by Ct value using GeNorm and NormFinder software. **Results** The stabilities of five reference genes varied from each other in three tissues of *N. fordii*. The analysis of GeNorm and NormFinder exhibited that the stability of  $\beta$ -tubulin was the most stable, followed by EF-1 $\alpha$ , Ubiquitin, actin, and 18S rRNA in order. **Conclusion** The  $\beta$ -tubulin gene could be served as the reference gene for the normalization of gene expression in different tissues of *N. fordii* using qRT-PCR.

**Key words:** *Nervilia Fordii Folium*; real-time fluorescence quantitative PCR; reference gene; Ct value; gene expression

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 技术重复性好、灵敏度高、特异性强和准确度高<sup>[1]</sup>, 已被广泛应用于基因表达分析等研究中。qRT-PCR 数据分析往往会受到 RNA 质量、扩增效率和内参基因的选择等因素的影响<sup>[2]</sup>。在基因表达分析中, 通常需要选择表达稳定的内参基因进行校正, 以减少样本间的误差。因此, 在进行 qRT-PCR 时, 常常需要针对实际实验对象和条件筛选合适的内参基因。目前, 在经济作物和模式植物如花生<sup>[3]</sup>、茶树<sup>[4]</sup>、拟南芥<sup>[5]</sup>等的

qRT-PCR 内参基因筛选已有不少报道。在药用植物方面, 只有丹参<sup>[6]</sup>、地黄<sup>[7]</sup>等少数药材开展了内参基因的选择研究。

青天葵是岭南地区道地药材, 来源于兰科多年生植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. 的全株或叶片, 能润肺止咳、清热解毒、散瘀止痛, 对肺部疾病, 尤其是小儿呼吸道疾病有着显著疗效<sup>[8]</sup>。由于人类过度开采和自身萌发条件苛刻, 青天葵面临着野生资源枯竭和人工栽培繁殖系数低的困境, 导致药材资源严重短缺。青天葵也已被列入《中国

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 教育部博士点基金联合资助项目 (200805720004); 教育部留学回国人员科研项目 (教外司留 [2009] 1001)

作者简介: 黄琼林 (1986—), 男, 博士, 研究方向为创新中药研究与开发。Tel/Fax: (020)39358331 E-mail: perfectql@163.com

\*通信作者 陈蔚文 Tel: (020)39358066 E-mail: chenww@gzucm.edu.cn

南部石灰岩稀有濒危植物名录》和《濒危动植物物种国际贸易公约》<sup>[9]</sup>。通过植物基因工程进行器官大小相关功能基因调控,以增大植物叶片或整体的大小来提高药材产量,是缓解当前青天葵资源严重匮乏现状的可行途径之一。但是,青天葵目前缺乏功能基因 qRT-PCR 分析中稳定表达的内参基因。本研究以青天葵 3 个组织(叶片、叶柄和球茎)为材料,采用 qRT-PCR 分析 5 个常用内参基因 18S rRNA、actin、ubiquitin、EF-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -tubulin 的表达稳定性,筛选合适的内参基因,为利用 qRT-PCR 探讨青天葵的基因表达分析奠定基础。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

青天葵植株采自广西南宁市马山县,由广西中医药大学黄云峰和广州中医药大学詹若挺研究员鉴定为毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.。分别取毛唇芋兰叶片、叶柄和球茎于液氮中速冻后, -70 °C 保存待用。

### 1.2 试剂

RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfectql Real Time) Kit、Ex Taq DNA

聚合酶、DNA Markers 购自 Takara 公司; SsoAdvanced SYBRGreen Supermix 购自美国 Bio-Rad 公司。引物合成和测序由北京六合华大基因科技股份有限公司广州分公司完成。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

参照 RNAiso Plus 试剂说明书,提取毛唇芋兰不同组织的总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其完整性、浓度和纯度。参考 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒操作方法,将毛唇芋兰不同组织部位的总 RNA 反转录合成 cDNA 第 1 链。获得的 cDNA 产物直接用于 PCR 或 -20 °C 分装保存。

### 2.2 引物设计

根据 qRT-PCR 引物的设计要求,利用 DNAMAN 软件,分别设计 5 个常用内参基因 18S rRNA、actin、ubiquitin、EF-1 $\alpha$  和  $\beta$ -tubulin 的 qRT-PCR 引物(表 1)。

### 2.3 内参基因的普通 PCR 检测

以内参基因的普通 PCR 扩增效果初步验证引物的可行性。PCR 反应体系总体积为 25  $\mu$ L,其中

表 1 用于 qRT-PCR 检测的内参基因引物

Table 1 Primers of reference genes detected by qRT-PCR

内参基因	基因描述	引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 / °C	扩增产物长度 / bp
18S rRNA	18S 核糖体 RNA	q18S-F	GATACCGTCCTAGTCTCAAC	55.4	220
		q18S-R	CTATGTCTGGACCTGGTAAG		
actin	肌动蛋白基因	qActin-F	CGTTACCGCATGCTATTCTC	55.4	235
		qActin-R	GATGACTTGGCCATCAGGAA		
ubiquitin	泛素基因	qUBI-F	GCAATGCAGATTGTTGTGA	52.0	100
		qUBI-R	CTTCCTTGTCTGAATCT		
EF-1 $\alpha$	延长因子 1 $\alpha$	qEF1 $\alpha$ -F	CCCTTCAGGATGTCTACAAG	55.4	160
		qEF1 $\alpha$ -R	CAATGCTTCGTGGTGCATCT		
$\beta$ -tubulin	微管蛋白基因	qBeta-F	GTGACACCACTCATTGTAGCAG	58.0	150
		qBeta-R	CCCTTCCGTTTCATCAGCTTGT		

注: 引物名称最后字母“F”、“R”分别表示上游和下游引物

Note: Primers with letters F and R were used for upstream and downstream, respectively

Premix ex Taq 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L、cDNA 适量、灭菌蒸馏水补足体积。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 52~58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。用 4.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

### 2.4 qRT-PCR 反应

以毛唇芋兰不同组织的 cDNA 为模板进行内参

基因的 qRT-PCR 分析。反应体系总体积为 20  $\mu$ L,其中 SsoAdvanced SYBRGreen Supermix 10  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L、cDNA 0.5  $\mu$ L、灭菌蒸馏水补足体积。反应程序: 95 °C、30 s, 95 °C、3 s, 55.4 °C、5 s, 40 个循环。扩增完毕后进行 55~95 °C 溶解曲线分析。每个组织部位进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

### 2.5 数据分析

根据公式  $Q = E^{\Delta Ct}$ , 对每个样品的扩增循环阈值即扩增产物达到设定的荧光检测界限所需的循环数 (cycle threshold, Ct) 计算各内参基因的相对表达量  $Q$ 。其中  $E$  为基因扩增效率 (一般情况基因扩增效率在 90%~105% 时,  $E$  默认为 2),  $\Delta Ct = Ct_{\min} - Ct_{\text{样品}}$  ( $Ct_{\min}$  为所有样品中的 Ct 最小值,  $Ct_{\text{样品}}$  为每个样品的 Ct 值)。

根据 5 个内参基因在毛唇芋兰不同样品中计算得到的  $Q$ , 利用 GeNorm 和 NormFinder 软件评价各内参基因的稳定性, 筛选最优的内参基因。

## 3 结果与分析

### 3.1 总 RNA 的提取效果

毛唇芋兰 3 个部位 (叶片、叶柄、球茎) 均获得比较明显的 RNA 主带, 即 28S、18S、5.8S, 而且 28S 与 18S 条带的亮度比值在 2:1 左右, 见图 1。采用紫外分光光度计法进行纯度检测,  $A_{260}/A_{280}$  值均在 1.8~2.0, 表明 RNA 纯度较好, 可用于后续实验。

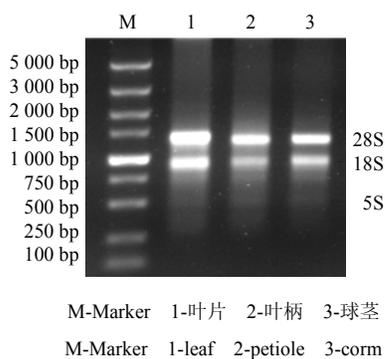


图 1 毛唇芋兰不同组织总 RNA 提取效果

Fig. 1 RNA extracted from different tissues of *N. fordii*

### 3.2 内参基因的普通 PCR 扩增

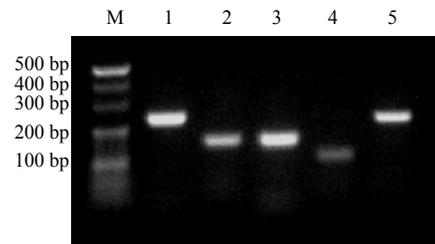
以叶片 cDNA 为模板扩增各内参基因片段, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 2) 显示, 扩增出各内参基因 100~250 bp 清晰单一的特异性片段, 与预期结果一致。表明扩增反应具有较高的专一性, 设计的引物可用于 qRT-PCR 分析。

### 3.3 内参基因的 qRT-PCR 分析

以毛唇芋兰不同组织部位的 cDNA 为模板, 进行内参基因的 qRT-PCR 分析。5 个内参基因在不同组织中的 Ct 值均有一定的变化, 变化趋势也有所不同 (图 3)。其中以 18S rRNA 的 Ct 值最低, 说明其表达丰度最高; 其他 4 个内参基因的 Ct 值均在 24~28, actin、ubiquitin 在毛唇芋兰叶片、叶柄和球茎

呈现 Ct 值依次上升, EF-1 $\alpha$  和  $\beta$ -tubulin 则在叶柄出现最大 Ct 值。

各内参基因的扩增效率均在 90%~105%, 相关性良好 (表 2)。如图 4 所示, 5 个候选内参基因的熔解曲线均显示单一峰, 无引物二聚体或非特异性扩增。结果表明, 建立的 qRT-PCR 扩增体系可靠性较高。



M-Marker 1-actin 2- $\beta$ -tubulin 3-EF-1 $\alpha$  4-ubiquitin 5-18S rRNA

图 2 内参基因片段的普通 PCR 扩增

Fig. 2 Normal PCR amplification of reference gene segment

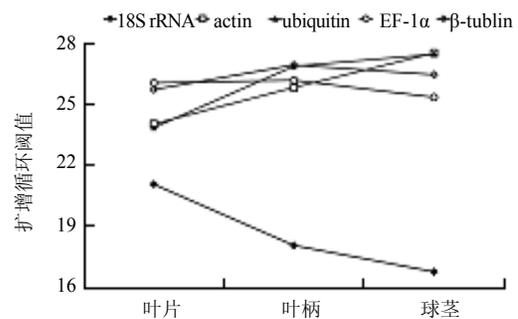


图 3 内参基因在毛唇芋兰不同组织中的 Ct 值

Fig. 3 Ct values of reference genes in different tissues of *N. fordii*

表 2 各个内参基因的扩增效率和相关系数

Table 2 Amplification efficiencies and correlation coefficients of each reference gene

内参基因	扩增效率 / %	相关系数 $R^2$
actin	90.1	0.997
$\beta$ -tubulin	90.1	0.999
EF-1 $\alpha$	97.0	0.998
ubiquitin	98.1	0.996
18S rRNA	90.6	0.998

### 3.4 内参基因的选择

利用 GeNorm 软件对各内参基因的  $Q$  进行统计分析, 通过计算基因的表达稳定值 ( $M$ ) 评价基因的表达稳定性。基因的  $M$  越小, 表达越稳定。

软件默认当  $M \leq 1.5$  时,可认为是较稳定的内参基因。结果如图 5-A 所示,各个内参基因稳定性依次是  $\beta$ -tubulin = EF-1 $\alpha$  > ubiquitin > actin > 18S rRNA, 其中  $\beta$ -tubulin 和 EF-1 $\alpha$   $M$  值低于 1.5。同样, NormFinder 软件计算结果表明(图 5-B),  $\beta$ -tubulin 表达最稳定, EF-1 $\alpha$  次之, 18S rRNA 稳定性最差。不同方法获得的结果一致。因此, 选用  $\beta$ -tubulin 作为内参基因用于校正 qRT-PCR 分析毛唇芋兰不同部位的基因  $Q$  的差异。

#### 4 讨论

理想的内参基因应具有以下特点: 一是在所有组织和细胞类型中均能表达, 构成了细胞基本的转录组成分, 维持细胞基本的功能; 二是在所有的环境和实验条件下稳定表达, 不受任何外源和内源因素的影响; 还有是具有与目标基因相似的稳定表达水平<sup>[7]</sup>。然而, 任何一种内参基因所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞、细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定, 并非绝对的稳定表达<sup>[10-11]</sup>。在本研

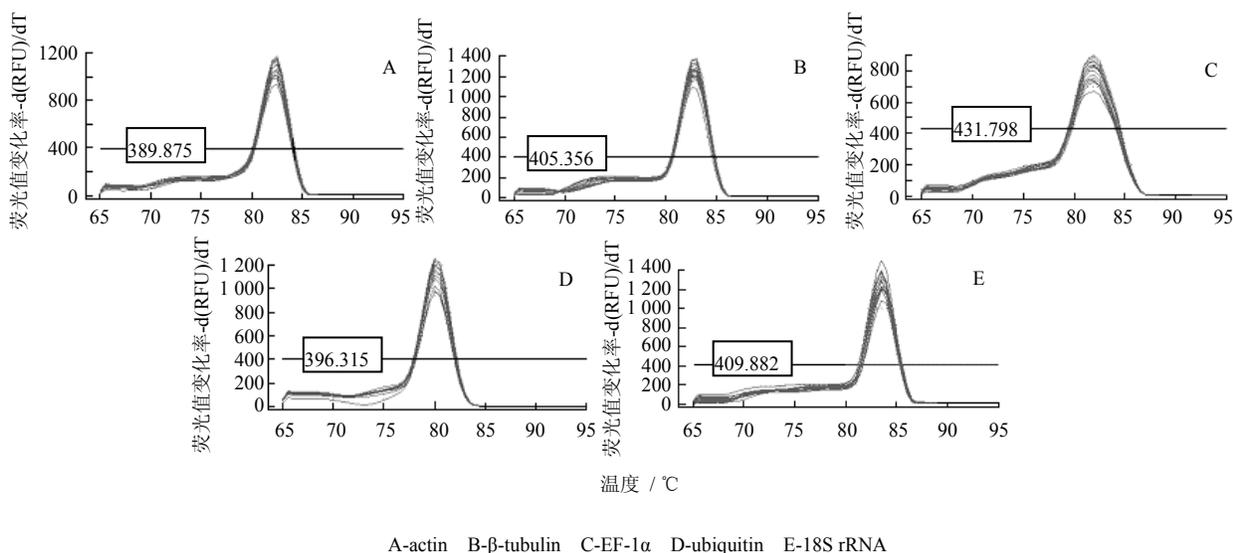


图 4 内参基因的溶解曲线

Fig. 4 Melting curves of reference genes

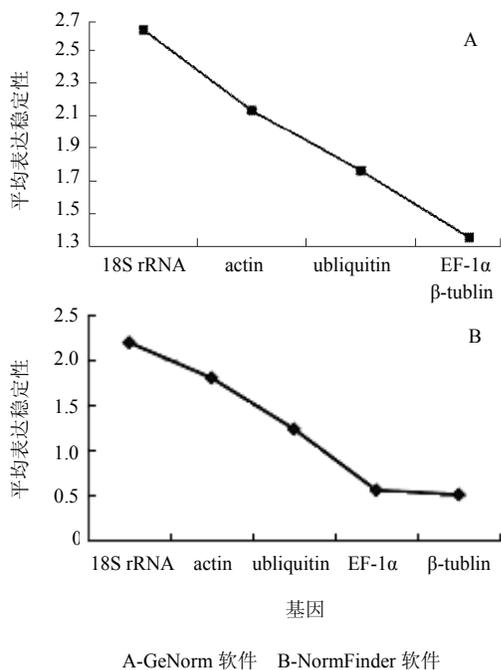


图 5 内参基因的表达稳定性评价

Fig. 5 Expression stabilities of reference genes

究中, 5 个常用的内参基因在不同组织中的表达丰度均有一定的变化, 这可能与它们所参与的细胞代谢和所处细胞类型有关<sup>[12]</sup>。GeNorm 和 NormFinder 结果显示  $\beta$ -tubulin 在 5 个候选基因中稳定性最好, 达到作为内参基因的的稳定水平, 可在毛唇芋兰表达分析用于校正。18S rRNA 在毛唇芋兰高丰度表达, 远远高于其他基因 mRNA 水平, 在定量 PCR 数据分析时难于扣除基线, 不适合用作毛唇芋兰基因表达的校正和标准化。Actin 在水稻种子萌发和不同组织中均能稳定表达<sup>[13]</sup>, 但在同是单子叶植物的毛唇芋兰的不同组织中稳定性不好。泛素基因 ubiquitin 作为常用的内参基因之一, 有研究表明其在拟南芥<sup>[14]</sup>中最稳定, 但其在毛唇芋兰不同组织中的稳定性并不好。EF-1 $\alpha$  在水稻<sup>[15]</sup>、马铃薯<sup>[16]</sup>等多个物种的基因表达分析中被选为内参基因, 本研究也发现它在毛唇芋兰不同组织中稳定表达, 稳定值分别小于 1.5 和 0.5, 符合内参基因的标准, 但稳定性稍不及  $\beta$ -tubulin。

毛唇芋兰以球茎为繁殖器官, 每个球茎只萌发

一片叶子,极少见到开花者<sup>[17]</sup>,本研究以球茎、叶柄和叶片为研究对象,具有显著的代表性。本研究中,利用 Genbank 上兰科物种的内参基因序列设计简并引物,成功扩增获得毛唇芋兰 5 个内参基因片段序列。再以毛唇芋兰内参基因序列设计用于荧光定量 PCR 的引物,尽量保证引物的特异性和反应体系的可靠性。为了避免反应体系配制时间过长而导致样品的降解和上机前的非特异扩增,应先将模板外的所有组分配制成混合液,分装至 PCR 管中,再依次加入模板。而且反应体系要冰浴配制。

本研究探讨了 5 个常见内参基因在毛唇芋兰不同组织中的稳定性,获得在毛唇芋兰不同组织中稳定表达的内参基因,为毛唇芋兰的基因表达 qRT-PCR 分析奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] Bustin S A, Benes V, Garson J A, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, 55: 611-622.
- [2] Pfaffl M W, Ales T, Christian P, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 509-515.
- [3] Chi X, Hu R, Yang Q, *et al.* Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287: 167-176.
- [4] 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.
- [5] Hong S M, Bahn S C, Yuan D Y, *et al.* Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 1694-1706.
- [6] Yang Y F, Hou S, Cui G H, *et al.* Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 507-513.
- [7] 侯维海, 孙 鹏, 陈全家, 等. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(17): 76-82.
- [8] 陈蔚文. 岭南本草 (二) [M]. 广州: 广东科技出版社, 2010.
- [9] 文和群, 许兆然. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录 [J]. *广西植物*, 1993, 13(2): 110-127.
- [10] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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 Res*, 2004, 64: 5245-5250.
- [11] 张艳君, 朱志峰, 陆 融. 基因表达转录分析中内参基因的选择 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(5): 546-550.
- [12] Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, *et al.* Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions specific validation of references [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60: 487-493.
- [13] Li Q F, Sun Sumeul S M, Lyu A, *et al.* Validation of candidate reference genes for the accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data in rice during seed development [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(1): 49-57.
- [14] Czechowski T, Stütt M, Altmann T, *et al.* Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 5-17.
- [15] 李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀. 水稻胚乳 RNA 定量 RT-PCR 分析中参照基因选择 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2008, 29(2): 61-66.
- [16] Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, *et al.* Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 2907-2914.
- [17] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 18 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2009.