

红花种子不同发育时期内参基因表达稳定性分析

杨 晶^{1,2*}, 卢玉彬^{1,2#}, 迟孟涵², 王清曼², 刘伟灿¹, 强卫东², 张晓美², 胡会龙², 邓思楠²

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

摘要: **目的** 通过 qRT-PCR 分析对比红花开花后不同发育时期的种子中内参基因的表达稳定性, 筛选出红花种子成熟过程中最稳定的内参基因。 **方法** 应用实时荧光定量 PCR 技术, 分析 6 个传统内参基因 ACT、EF1 α 、GAPDH、UBI、TUA、TUB 在红花种子不同发育时期的 mRNA 表达差异情况; 利用 GeNorm 和 Normfinder 软件评价上述内参基因在红花开花后不同发育阶段的种子中的表达稳定性。 **结果** 荧光定量及 GeNorm 软件分析结果显示, 6 种内参基因的表达性各异, 但表达最为稳定的内参基因是 EF1 α , 表达最稳定的内参组合是 EF1 α 和 TUB。为了数据的真实可靠又选用了 Normfinder 软件分析, 结果显示 UBI 基因表达不太稳定, EF1 α 、ACT、TUB、TUA 和 GAPDH 内参的表达稳定性都小于 0.15, 相对比较稳定。 **结论** 为红花开花后不同发育时期种子的荧光定量 PCR 分析提供了详尽的内参基因参考。

关键词: 红花; 种子; 不同发育时期; 荧光定量 PCR; 内参基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1845-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.023

Analysis on stability of reference genes in different developmental stages of seeds from *Carthamus tinctorius*

YANG Jing^{1,2}, LU YU-bin^{1,2}, CHI Meng-han², WANG Qing-man², LIU Wei-can¹, QIANG Wei-dong², ZHANG Xiao-mei², HU Hui-long², DENG Si-nan²

1. Bioreactor and Drug Development Research Center, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To select the appropriate reference genes for qRT-PCR by analyzing the stability of housekeeping genes as reference genes in different developmental stages of safflower. **Methods** Six housekeeping genes such as ACT, EF1 α , GAPDH, UBI, TUA, and TUB were selected as candidate reference genes to analyze their expression levels in safflower seeds under different developmental stages by qRT-PCR. The expression stability was evaluated by GeNorm and NormFinder softwares. **Results** The expression levels of six reference genes were different, but the best was EF1 α and the best combination reference genes were EF1 α , TUB, and ACT. Normfinder software was applied to the verification of analysis result by GeNorm software. The Normfinder software results showed that UBI gene was not stable, and other genes were stable. **Conclusion** This study provides a detailed reference of housekeeping gene for qRT-PCR in different developmental stages of safflower.

Key words: *Carthamus tinctorius*; seeds; different developmental stages; qRT-PCR; reference gene

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 具有灵敏度高、特异性强、重复性好及高通量等特点, 已成为植物领域中进行基因组研究的常用技术之一^[1], 在 qRT-PCR 检测基因表达变化过程中, qRT-PCR 结果的可靠性

取决于内参基因的稳定性^[2-3]。正是由于在 qRT-PCR 分析过程中, RNA 的质量和产量、反转录效率的差异等因素会影响表达分析结果的准确性, 因此需要选择适当的内参基因进行校正和标准化, 以减少检测样本间的 cDNA 差异^[4]。理想的内参应该在不同

收稿日期: 2016-11-19

基金项目: 吉林省科技计划-优秀青年人才基金项目 (20170520035JH); 吉林省教育厅项目 (2016179, 2016180); 大学生科技创新项目 (201707)

*通信作者 杨 晶 (1981—), 女, 吉林市人, 副研究员, 主要从事药用植物代谢与生物反应器研究。

Tel: (0431)84533428 E-mail: yangjing5122010@163.com

#并列第一作者 卢玉彬 (1991—), 女, 长春市人, 主要从事红花油脂代谢研究。E-mail: 741545624@qq.com

的组织中或者在各个组织的不同发育时期都能稳定表达。然而,近年来许多研究表明,任何一种内参基因在所有的实验条件下都不是恒定表达的,在植物不同组织部位,不同发育阶段及不同条件处理下,内参基因的表达水平差异很大,不是恒定不变的^[5-8]。因此,在基因表达分析研究中,首先进行了基因内参的筛选,利用筛选所得的可以在不同组织或各组织不同发育时期都可以稳定表达的内参基因或者内参基因的组合定量目的基因,以期获得较为真实可靠的结果。

在植物的 qRT-PCR 分析实验中,选择的内参基因通常是管家基因,常用的内参基因主要包括肌动蛋白基因(ACT)、18 S 核糖体 RNA(18 S rRNA)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)、转录延伸因子基因(EF1 α)、多聚泛素酶基因(UBQ)、 α 微管蛋白基因(TUA)和 β 微管蛋白基因(TUB)^[6]。在众多的内参基因中,根据其在实验体系内的表达稳定性选择适当的内参基因是进行标准化的关键,因此越来越多的研究者对植物内参基因的稳定性的评价。

红花为菊科属红花 *Carthamus tinctorius* L. 1~2 年生草本植物,是近年来国内外发展较快的新型油料作物之一。红花籽油作为一种多功能食用油,色泽光润,呈淡黄色,含有丰富的不饱和脂肪酸,在国际上被作为“绿色食品”。由于红花籽油的油脂品质优良,营养丰富,具有很好的药用价值,且在我国医药、食品、工业等行业有极其广泛的用途。目前,国内外学者通过高通量测序技术,已完成了红花不同组织器官转录组和表达谱测序^[9]。但是,对于红花不同组织器官及种子不同发育时期的目的基因表达分析所涉及的内参基因的选择并没有系统的筛选。因此,本实验选择了 6 个看家基因(Housekeeping genes, HKGs)即 ACT、EF1 α 、GAPDH、UBI、TUA、TUB 作为候选内参基因,考察其在红花开花后不同发育时期种子表达的稳定性。利用 GeNorm 和 NormFinder 程序筛选了适合红花开花后不同发育时期的种子中校准 qRT-PCR 检测结果的参考基因。为准确检测红花开花后不同发育时期的种子中基因表达提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品经笔者鉴定为吉红一号红花 *Carthamus*

tinctorius L. 品种,购自新疆红花缘科技有限公司,在吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心试验基地种植,每年 4 月末进行播种,红花开花后每隔 2~5 d 取一次样,分别取红花开花后 4、8、12、16、20、24、28、32 d 的种子,将所取红花样品放于液氮中速冻,之后将样品在-80 °C 超低温冰箱中冻存备用。

1.2 RNA 的提取

取 100 mg 开花后不同发育时期的种子(含种壳),在预冷的研钵中用液氮研成粉末,然后转入 1.5 mL 离心管中;适量的植物组织加入 RNAiso plus 匀浆(1 mL, Takara 公司),室温静置 5 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 弃沉淀,留上清,转移到 tube 中,加入 1/5 RNAiso plus 等体积的氯仿,震荡摇匀,室温静置 5 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 将上清转移到新的 EP 管中,加入与上清液等体积的异丙醇,室温静置 10 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃上清,沉淀中加入 1 mL 75%乙醇清洗, 12 000 r/min 4 °C 离心 5 min, 弃上清,留沉淀,干燥,溶解于适量 DEPC 水中。

1.3 总 RNA 的检测

将质量>500 μ g 的 Total RNA 沉淀,重悬于 100 μ L 的 DEPC 水中;取新的 50 mL 离心管,其他步骤参照 FastTrack[®] 2.0 Kit 说明书进行,使用 Nanodrop2000 对 RNA 浓度和质量进行检测,利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.4 反转录 cDNA

样品反转录采用 Takara 公司的 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser-Perfect Real Time 试剂盒(Code No. RR047A)。反应体系如下: Reaction solution 10.0 μ L, 5 $\times$ PrimeScript buffer 10.0 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ L, RT primer mix 1.0 μ L, Rnase free dH₂O 4.0 μ L, 总体积 20 μ L; 反应程序为 37 °C、15 min; 85 °C、5 s; 将得到的 cDNA 在-20 °C 保存。

1.5 内参基因的选择和引物设计

根据之前文献中报道过的候选内参基因^[10-11]选择了 EF1A、GAPDH、ACT、UBI、TUA 和 TUB 6 个候选基因作为红花不同发育时期的内参基因。传统基因的引物设计可参经常规荧光定量引物的设计原则,所有引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 6 个候选基因引物序列及相关数据

Table 1 Primer sequences and related data of six reference gene candidates

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	扩增产物 长度/bp	基因功能	数据库基因 序列号
ACT	TACCGAATGGTTAAGGCTGG	CATCCTTTGGCCCATTCCT	116	细胞骨架结构蛋白	gi 657600550
EF1 α	TCAGCATTGTCGTCATCGGA	ACGTTTCGATCACACGCTTGTC	101	转录延伸	gi 657600544
GAPDH	TGTTCCGACCGTGGATGTTT	GCTTGCCTTCTGATTCTCCTT	107	糖酵解、糖异生和光合作用， 碳固定循环过程中的关键酶	gi 657600542
UBI	TGCAGATCTTCGTGAAAACCT	TTCCTTGTCTGGATCTTGGC	101	蛋白修饰	gi 657600548
TUA	GTCCATACCCGAGAATCCACT	TTGGTGATCTCGGCAACTGAG	101	细胞骨架结构蛋白	gi 657600538
TUB	TGATGACCTTTTCCGTGTTTCC	CATCAGCATTCTCGACAAGCTG	102	细胞生长，参与光刺激反应	gi 657600536

1.6 荧光定量 PCR

本实验采用 Takara 公司的 SYBR Premix EX TaqTM (Tli RNaseH Plus) 试剂盒，其定量部分操作均在 Mx3000PTM Real time PCR 仪上操作。其操作系统为 Stratagene (Mx3000P)。每个样品设置 3 个重复和阴性对照。经优化后反应体系为：总体积 15 μ L，SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$) 7.5 μ L，ROX Reference Primer (10 μ m) 0.3 μ L，PCR 正向引物 (10 μ m) 0.3 μ L；PCR 反向引物 (10 μ m) 0.3 μ L；DEPC 水 5.1 μ L，cDNA 1.5 μ L。2 步法 PCR 扩增标准程序：预变性 95 $^{\circ}$ C、30 s；PCR 反应 95 $^{\circ}$ C、5 s；62 $^{\circ}$ C、20 s；40 个循环；溶解曲线 95 $^{\circ}$ C，20 s；60 $^{\circ}$ C，30 s；95 $^{\circ}$ C，20 s。

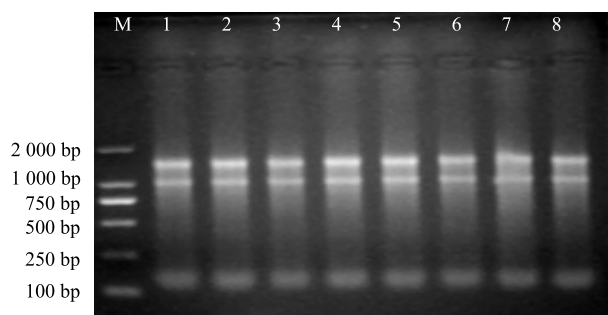
1.7 数据分析

引物的扩增效率 (E) 和相关系数 (R^2) 可由 Mx3000p 系统对样本稀释曲线各稀释点的测定结果自动计算得出。候选内参基因的表达稳定性分析采用 GeNorm 和 Normfinder 软件。GeNorm 软件可以显示逐步去除最不稳定候选内参基因后的各内参基因的平均表达稳定值 (M)， M 值越小，基因表达越稳定；同时可给出内参基因的配对变异数 ($V_{n/n+1}$) 柱形图，该图显示了准确量化时需要选择的内参基因数目。选择阈值为 0.15，当 $V_{n/n+1} > 0.15$ ，表明需选择 n 个以上的基因组合作为量化标准； $V_{n/n+1} < 0.15$ ，表明只需选择 n 个内参基因作为量化标准。NormFinder 软件是 Andersen 等编写的用于选择合适内参基因的程序，其基于方差分析评价内参基因在不同样品中的表达稳定性。NormFinder 的运行原理与 GeNorm 程序类似，也是通过计算基因表达稳定值，然后根据稳定值的大小排序，值越大稳定性越差；反之，具有最小稳定值的基因为最稳定的基因^[12]。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测

选择开花后 4、8、12、16、20、24、28、32 d 的种子，利用 RNAiso plus (Takara 公司) 方法提取上述样本中的总 RNA，并用 Nanodrop 2000 对提取得到的总 RNA 的浓度和质量进行检测，260 nm 与 280 nm 吸光度比值 (A_{260}/A_{280}) 均为 1.9~2.0，最后对提取的 RNA 进行了 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (Maker)，条带清晰，质量完整，无明显降解 (图 1)。可以用于后续的反转录及实时荧光定量 PCR，将其稀释至 500 ng/ μ L，放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存备用。



M-Marker 1~8 红花开花后 4、8、12、16、20、24、28、32 d 提取的 RNA

M-Marker 1—8-RNA extracted from 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 day after flowering of safflower

图 1 红花总 RNA 样品的电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of safflower total RNA

2.2 内参基因引物 PCR 扩增效率、表达丰度及特异性验证

为了荧光定量分析的准确性，本实验对 qRT-PCR 反应条件进行了优化处理，以确保各候选内参基因的扩增效率尽量在 95%~110%，稀释曲线 $R^2 > 0.990$ ，这样就可以符合 qRT-PCR 对引物扩增效率的要求。分析结果从表 2 可以看出，6 个内参基因均表现出良好的扩增效率， $R^2 > 0.990$ ，说明定量结

果准确可靠。本实验对扩增产物进行了 1.0% 琼脂糖凝胶电泳来保证 6 个候选内参基因的引物特异性, 结果显示扩增产物与目的片段大小一致, 没有出现引物二聚体 (图 2); 同时 6 个候选内参基因的熔解曲线, 也都只出现单一峰 (图 3)。因此, 各内参基因引物的扩增特性均符合 qRT-PCR 的要求。从图 4 中可以看出, 6 个内参基因在红花种子不同发育时期的表达水平种都有一定的变化, 其中 GAPDH 基因表达丰度 (C_t) 相对较高, TUA、TUB、UBI、ACT 内参基因的 C_t 值居中, EF1 α 内参基因的表达丰度则较低。

表 2 候选内参基因引物的扩增特性

Table 2 Primer amplicon characteristics for each candidate reference gene

基因	E/%	R^2
EF1 α	95.8	0.990
GAPDH	99.9	0.991
TUA	100.2	0.999
TUB	129.8	0.997
UBI	112.7	0.992
ACT	97.0	0.996

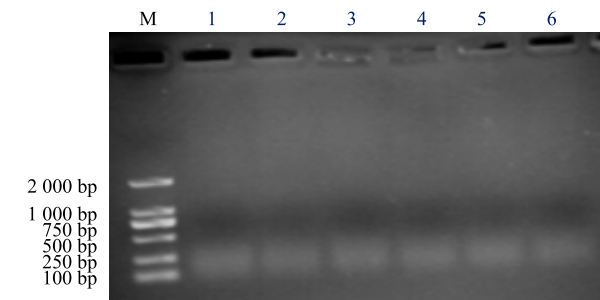


图 2 6 对引物的荧光定量扩增产物电泳图

Fig. 2 Fluorescence quantitative PCR products electrophoresis of six pairs of primers

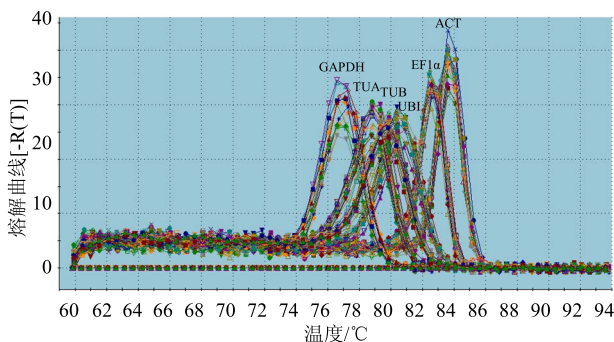


图 3 6 个候选内参引物特异性扩增的熔解曲线

Fig. 3 Dissolution profiles of six candidates for specific amplification primers internal reference

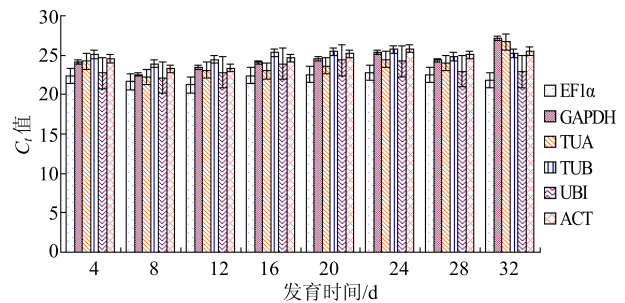


图 4 6 个内参基因在红花种子不同发育时期的 C_t 值变化

Fig. 4 C_t values for six candidate reference genes in different development stages of safflower seeds

2.3 内参基因表达稳定性分析

为了筛选在种子不同发育时期均能稳定表达的内参基因, 本实验利用 GeNorm 和 Normfinder 软件分别对开花后 4、8、12、16、20、24、28、32 d 的种子进行筛选, 对 6 个候选内参基因的稳定性进行了分析。GeNorm 分析结果显示, 在种子不同发育时期中候选的内参基因表达稳定有所差异, 但是表达稳定性根据 M 值大小排序 (M 值越小越稳定), 由高到低依次为 EF1 α (0.382)/TUB (0.257 46) > UBI (0.473 9) > ACT (0.542 6) > GAPDH (0.768 5) > TUA (0.855 9) (图 5)。GeNorm 柱形图分析结果显示当选择 3 个内参组合时 $V_{n/n+1}$ 值小于程序所推荐值 0.15 (图 6), 且 $V_{2/3}$ 的值为 0.138, 最合适的内参组合基因数目是 2 个。红花种子不同发育时期表达最稳定的基因组合是 EF1 α 和 TUB。同时 Normfinder 分析结果显示, UBI 基因的稳定性值 > 0.15, 其余 5 个内参基因表达稳定性值 < 0.15, 也就是说, UBI 内参基因不稳定, EF1 α 、TUB、ACT、GAPDH、TUA 都符合定量目的基因的要求 (表 3)。GeNorm 软件不能从统计上区分表达模式类似的基因, NormFinder 软件主要基于方差分析的结果对候选内参基因表达稳定性进行分析, 并根据其稳定性对内参的稳定性进行排序。因此, NormFinder 软件可以有效地避免 GeNorm 不利的分析结果。尽管 2 种软件部分基因排序稍有不同, 但这种差异经证实^[13-19]是由这 2 种软件计算方法不同引起的。

3 讨论

qRT-PCR 是一个十分可行的定量技术, 为了确保实验结果的准确性和可靠性, qRT-PCR 需要选用合适的内参基因作为基因表达分析时用于衡量目的基因表达量的参照标准, 来消除不同样品间可能

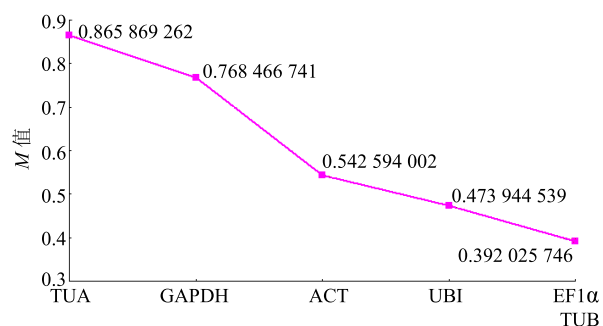


图 5 GeNorm 软件分析红花种子不同发育时期内参基因的表达稳定值排序

Fig. 5 Ranking of expression stability of candidate reference genes in different developmental stages of safflower seeds by GeNorm

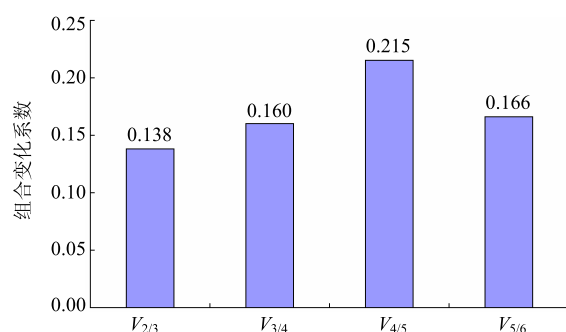


图 6 GeNorm 软件分析确定红花种子不同发育时期用于标准化的最适内参基因的数目

Fig. 6 Optimum number of reference genes for normalization in different development stages of safflower by GeNorm

表 3 NormFinder 软件分析红花不同发育时期种子内参基因的表达稳定值

Table 3 Expression stability of candidate reference genes in different development stages of safflower by NormFinder

基因	表达稳定值
EF1α	0.046
GAPDH	0.102
TUA	0.082
TUB	0.108
UBI	0.238
ACT	0.055

存在的差异,通常选用的内参基因是表达较为稳定的看家基因^[18]。但是,近年来大量的研究结果表明^[19],并没有绝对稳定表达的基因,任何一种内参基因的稳定只是在一定实验条件下的相对稳定。因此,需要在定量目的基因表达量之前确定合适的内参基因。

本实验选用了 6 个传统的管家基因进行内参基

因的筛选,利用 Genorm 和 Normfinder 软件分析了它们在红花不同开花时期以及成熟种子时期的表达稳定性。分析结果表明,在种子的不同发育时期中表达最稳定的单一基因是 TUB 和 EF1α 基因,最优秀的内参组合是 2 个内参。

综上所述,TUB 和 EF1α 基因作为在红花不同时期种子中表达最稳定的看家基因为以后在红花不同发育时期种子中定量目的基因 qRT-PCR 分析奠定了基础,同时,本实验也为其他荧光定量相关实验提供了理论依据和数据支持。另外,继续探索和发现新的内参基因对目的基因的定量分析具有重要意义。

参考文献

- [1] 袁伟,万红建,杨悦俭.植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择[J].植物学报,2012,47(4): 427-436.
- [2] 孟玉平,曹秋芬,孙海峰.枣树内参基因 ZjH3 的克隆与筛选[J].生物技术通报,2010(11): 101-107.
- [3] 李钱峰,蒋美艳,于恒秀,等.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): 61-69.
- [4] 涂礼莉,张献龙,刘迪秋,等.棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量 PCR 内参基因的筛选[J].科学通报,2007,52(20): 2379-2385.
- [5] 阚友雄,许丽萍,徐景生,等.甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择[J].热带作物学报,2009,30(3): 274-278.
- [6] 周兰,张利义,张彩霞,等.苹果实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J].果树学报,2012,29(6): 965-970.
- [7] Die J V, Rowland L J. Superior cross-species reference genes: A blueberry case study[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73354.
- [8] Hai Y L, Yuan Y D, Jing Y, et al. De nove transcriptome of safflower and identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids[J]. PLoS One, 2012, 7(2): 1-10.
- [9] 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.
- [10] Die J V, Roman B, Nadal S, et al. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions[J]. Planta, 2010, 232(1): 145-153.
- [11] 赵晓,马会勒,陈尚武,等.葡萄果实发育后期半定量 RT-PCR 内参基因的优选[J].中国农业大学学报,

- 2010, 15(3): 7-14.
- [12] Viviani J M, Roberta R C, Antônio A B V, *et al.* Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6: 196-203.
- [13] Dheda K, Huggett J F, Bustin S A, *et al.* Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(37): 112-119.
- [14] De Oliveira L A, Breton M C, Bastolla F M, *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(2): 405-422.
- [15] Franceli R K, Francimar C M, Alexandre L N, *et al.* The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean [J]. *Analy Biochem*, 2010, 406(2): 185-192.
- [16] 尹 静, 任春林, 詹亚光, 等. 可用于实时荧光定量 PCR 标准化的白桦内参基因 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(10): 1061-1066.
- [17] Zhang Q, Li H, Fan C, *et al.* Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10(1): 1-12.
- [18] 蔡嘉洛, 朱贻霖, 谢舒平, 等. 灰毡毛忍冬内参基因筛选和 Mads-box 家族基因 AGL15 的时空表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2727-2733.
- [19] 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, 421(56): 2907-2914.