

代红军, 秦晨亮, 徐伟荣. 赤霞珠葡萄发育后期 RT-PCR 内参基因的筛选和验证[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 668-673.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.028

赤霞珠葡萄发育后期 RT-PCR 内参基因的筛选和验证

代红军^{1,2}, 秦晨亮^{1,2}, 徐伟荣^{1,2}

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学教育部葡萄与葡萄酒工程中心, 宁夏 银川 750021)

摘要: 葡萄果实发育后期基因表达水平的变化对果实品质的形成具有重要影响, 选择合适的内参基因是提高实时荧光定量 PCR 分析准确性的首要条件。本试验以赤霞珠葡萄发育后期不同取样时间的果皮为材料, 通过 qRT-PCR 分析了常用候选内参基因 β -actin、EF-1 α 、GAPDH 和 SAND 的表达变化, 借助 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 程序筛选出在葡萄发育后期 qRT-PCR 分析的理想内参基因。结果表明, β -actin 的稳定性最好, 其次是 SAND, 而 GAPDH 和 EF-1 α 的稳定性相对较低; 同时, 用筛选的内参基因 β -actin 和 SAND 分析葡萄白藜芦醇合成途径中二苯乙烯合酶基因的表达水平, 其表达规律一致。说明, β -actin 和 SAND 是研究赤霞珠葡萄发育后期基因表达的理想内参基因。

关键词: 赤霞珠葡萄; 内参基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0668-06

Screening and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR during grape berry development of Cabernet Sauvignon

DAI Hong-jun^{1,2}, QIN Chen-liang^{1,2}, XU Wei-rong^{1,2}

(1. School of Agriculture, Yinchuan 750021, China; 2. Grape and Wine Engineering Research Center of Ningxia University, Ministry of Education, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The change of gene expression level during berry ripening is crucial for the formation of grape fruit quality. The selection of a suitable reference gene is an important factor for accurate gene expression analysis by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). In this study, the pericarp of wine grape (Cabernet Sauvignon) was taken as material at different time during berry ripening to detect the expression levels of four commonly used housekeeping genes β -actin, EF-1 α , GAPDH and SAND by qRT-PCR, so as to select reliable reference genes using softwares geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The stability was found to the best in β -actin, followed by SAND. The expression of STS gene in the pathway of grape resveratrol anthocyanin biosynthesis was analyzed, and the results indicated that the variation dynamics of STS using β -actin as reference gene was exactly consistent with that using SAND as reference gene. Therefore, β -actin and SAND are ideal reference genes for gene expression level analysis during grape berry development.

Key words: Cabernet Sauvignon grape; reference gene; qRT-PCR

20 世纪 90 年代末期美国 Applied Biosystems 公司

收稿日期: 2015-10-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260456)

作者简介: 代红军 (1967-), 女, 宁夏银川人, 博士, 教授, 研究方向为葡萄栽培生理。(Tel) 13139589616; (E-mail) dai_hj@nxu.edu.cn

推出了实时荧光定量 PCR 技术, 即利用带荧光检测的 PCR 仪对整个 PCR 过程中扩增 DNA 的累积速率绘制动态变化图, 从而消除了测定终端产物丰度时有较大变异系数的问题^[1-2]。qRT-PCR 主要有两类目的基因定量策略: 绝对定量和相对定量^[3]。在相对定量中, 由于起始 RNA 的质量和数量、cDNA 合成效率以及

PCR 的扩增效率在不同处理样品间存在差异,可能导致结果产生偏差^[4]。为了得到更准确的数据,需用内参基因对实时定量 PCR 数据进行均一化处理。理想的看家基因在不同的组织、不同的发育阶段及不同的试验条件下都具有稳定的表达模式。目前许多实时荧光定量研究中,人们普遍根据已发表的文献选取内参基因。但也有研究结果表明看家基因的表达水平在不同的细胞类型及试验体系中变化很大,许多经典的看家基因并不适合广泛应用^[5]。因此,针对不同试验体系,有必要筛选出最合适的内参基因。筛选内参基因的研究已有诸多报道^[6-13]。关于葡萄发育期间内参基因的筛选仅见半定量 RT-PCR 内参基因优选报道^[14],有关实时荧光定量 PCR 内参基因筛选尚未见报道。

已发表文献中,内参基因的选择基本都是以植物的营养器官为材料完成的,而且一些常用做内参的看家基因可能会因为受到各种因素的影响而出现表达水平的明显变化^[15],为了更好地研究葡萄果实发育后期的基因表达水平与调控,本研究对 4 个常用看家基因在葡萄果实发育后期的表达进行了探索,通过实时荧光定量 PCR 技术对葡萄不同发育阶段看家基因的转录水平进行检测,采用 geNorm^[4]、NormFinder^[16] 和 BestKeeper^[17] 软件对检测结果进行分析,以期筛选出葡萄发育后期最佳内参基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为赤霞珠葡萄不同发育时期的果实,来自宁夏大学教育部葡萄与葡萄酒工程中心玉

泉营试验基地,2014—2015 年分别于花后 50 d、65 d、80 d 和 95 d 采样。样品采集后,在低温冷藏条件下运回实验室,去除种子和果肉后,液氮速冻,−80 ℃ 低温冰箱贮藏备用。

1.2 总 RNA 的提取

按照 OMEGA Plant RNA Kit 试剂盒操作说明进行葡萄总 RNA 提取。从提取的 RNA 中各取 3 μl 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,通过观察 28 S、18 S 条带亮度对 RNA 完整性进行分析。并通过紫外分光光度计对 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 值及浓度进行重复检测,得到 RNA 浓度信息及质量检测结果。

1.3 反转录及 cDNA 的合成

以不含 RNase 的 DNase 进行 RNA 纯化处理,用微量紫外分光光度计 (ND-1000, 美国 NanoDrop 公司) 测定 RNA 浓度。按照 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMIX 试剂盒操作方法,将各样品总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,−20 ℃ 贮藏备用。

1.4 候选内参基因的选择及其引物的设计与验证

根据文献及本课题组前期的研究结果,本次试验选择了 4 个候选基因,并通过 qRT-PCR 的方法对所选的内参基因进行稳定性分析。4 个候选基因分别为 β -Actin、EF-1 α 、SAND、GAPDH,找出各自的开放阅读框后,通过 Primer 5.0 软件设计特异性引物,由上海生物工程技术公司合成,内参基因引物序列见表 1。在 qRT-PCR 中,通过熔解曲线判断引物的特异性。

表 1 qRT-PCR 中内参基因的引物序列

Table 1 The primer sequences for the reference gene in qRT-PCR

基因	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
β -actin	TCCTGTGGACAATGGATGGA	CTTGCATCCCTCAGCACCTT
EF-1 α	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	GAACTGGGTGCTTGATAGGC
GAPDH	CCACAGACTTCATCGGTGACA	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA
SAND	GCATTTGATCCACTTGCGAGATAAG	CAACATCCTTTACCCATTGACAGA

1.5 实时荧光定量 PCR

所有操作在冰上进行,配置反应体系为 20.0 μl: 2×TransStart TipTop Green qPCR SuperMix (北京全式金生物技术有限公司) 10.0 μl, 上游引物 0.4 μl, 下游引物 0.4 μl, ddH₂O 8.2 μl 及 cDNA

1.0 μl。在 qTOWER 2.2 定量分析仪 (Analytik Jena) 上进行反应,条件为: 94 ℃ 30 s, 94 ℃ 5 s, 58 ℃ 15 s, 45 个循环,每个处理 3 个生物学重复,同时每个样品设置 3 个技术重复,并设阴性对照。

1.6 数据处理与分析

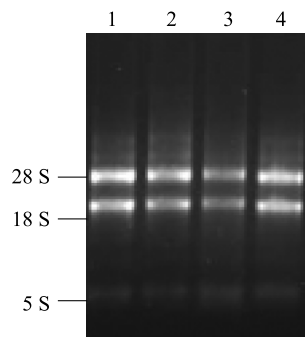
使用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 3 个软件分析看家基因在葡萄赤霞珠果实发育过程中的表达稳定性指数。其中 geNorm 和 Normfinder 程序需要将 CT 值转化成 Q 值后,方可进行分析。转化公式为 $Q = E^{CT_{\min} - CT_{\text{sample}}}$ (E 为基因的扩增效率。当扩增效率接近 100% 时, E 通常默认为 2。 CT_{sample} 为该基因在各个组织中的 CT 值, CT_{\min} 为该基因在所有组织中最小的 CT 值)。BestKeeper 软件可以直接对各看家基因的 CT 值进行分析。

2 结果

2.1 RNA 的提取及样品质量检测

对提取的花后 50 d、65 d、80 d 和 95 d 的果皮总 RNA 分别取 3.0 μl 与 2.0 μl 的 6 \times Loading Buffer 混匀后,进行琼脂糖凝胶电泳,从电泳图(图 1)可以看出,4 个样品提取的总 RNA 的 28 S、18 S 带型整齐,无拖尾,说明 RNA 降解少,提取质量较高,可用于后续的分子生物学分析;对总 RNA 分别进行 DNase 处理纯化后,所有样品 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值都为 1.9~2.0。花后 50 d 的总 RNA 质量浓度平均为 148 ng/ μl ,花后 65 d 的总 RNA 质量浓度平均为 165 ng/ μl ,花后 80 d 的总 RNA 质量浓度平均为 141 ng/ μl ,花后 95 d 的总 RNA 质量浓度平均为 109

ng/ μl 。4 个样品的总 RNA 质量和质量浓度都符合反转录的要求。



1:花后 50 d;2:花后 65 d;3:花后 80 d;4:花后 95 d。

图 1 赤霞珠葡萄花后 50 d、65 d、80 d、95 d 果皮总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RNA extracted from Cabernet Sauvignon pericarp 50 d, 65 d, 80 d and 95 d after flower

2.2 内参基因 qRT-PCR 的熔解曲线分析

以赤霞珠葡萄不同发育时期的 cDNA 第一链为模板,进行 qRT-PCR 分析。结果表明,4 个内参基因的熔解曲线都有很明显的单一峰,不存在引物二聚体(图 2)。说明每个内参基因的引物均有很好的特异性,引物设计合理,达到了优化要求,反应的专一性高,结果准确可靠,符合 qRT-PCR 的标准,可进行后续试验。

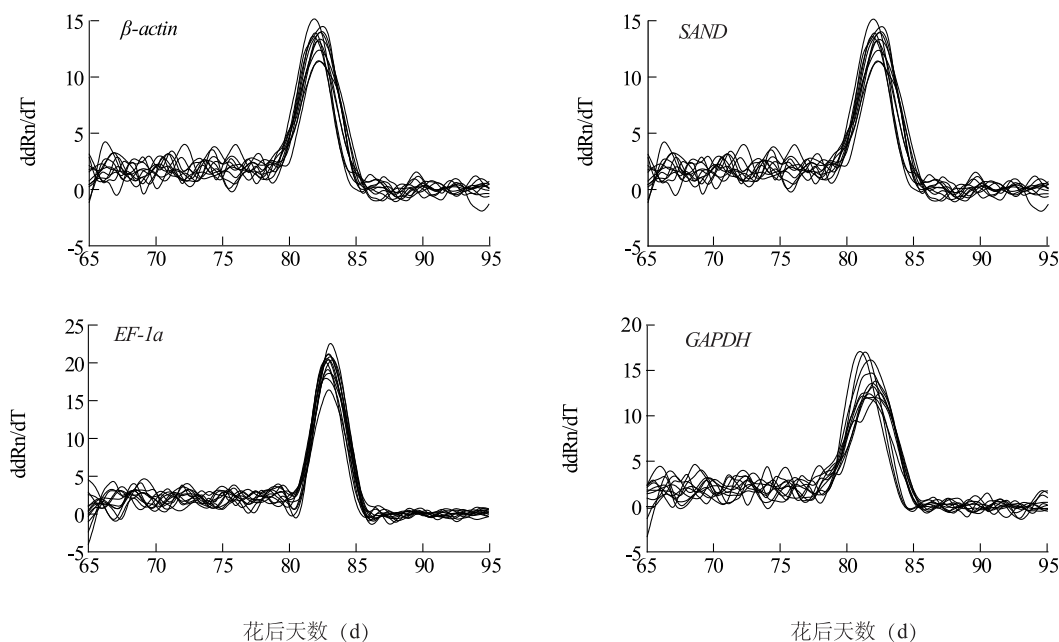


图 2 4 个内参基因的熔解曲线

Fig.2 Melting curves of four reference genes

2.3 不同内参基因的稳定性分析

2.3.1 geNorm 分析 geNorm 软件根据平均表达稳定指数 M 值确定最稳定的看家基因。 M 值越大,基因的稳定性越低,反之则越高。以 $M=1.5$ 为上限,只有 M 值小于 1.5 的才被认为相对较为稳定。由图 3 可知,4 个内参基因表达稳定性的排列顺序为 β -actin (1.136) > SAND (1.181) > GAPDH (1.233) > EF-1 α (1.996)。geNorm 分析结果表明,除 EF-1 α 外,其余 3 个候选基因的 M 值都小于 geNorm 程序的默认值 1.5。说明这 3 个看家基因都较为稳定。在 4 个看家基因中, β -actin 的 M 值最低,说明它的稳定性较好; EF-1 α 的 M 值最高,稳定性也是所选看家基因中最差的。

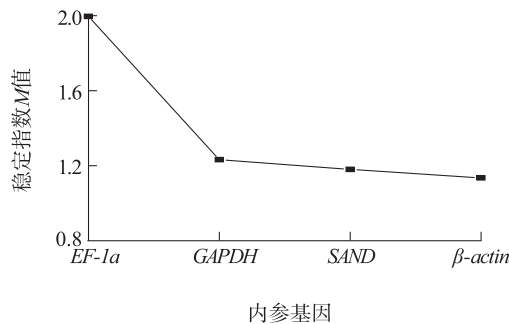


图 3 内参基因表达稳定度

Fig.3 The stabilities of candidate reference genes

2.3.2 NormFinder 分析 NormFinder 程序用 Excel 软件计算基因的稳定性 M 。 M 值越低,则该基因越稳定。经计算获得 4 个看家基因的 M 值。如表 2 所示, β -actin 的 M 值最低,说明它是所选看家基因中稳定性最好的。 EF-1 α 的 M 值最高,说明它的稳定性最差。4 个看家基因按照稳定性从高到低排序依次为: β -actin > SAND > GAPDH > EF-1 α 。

表 2 用 NormFinder 软件分析看家基因的表达稳定性

Table 2 Expression stability of housekeeping genes analyzed by NormFinder

基因名称	M 值	稳定性排序
β -actin	0.024	1
SAND	0.034	2
EF-1 α	0.090	4
GAPDH	0.037	3

2.3.3 BestKeeper 分析 BestKeeper 程序依据看家基因的 CT 值用 Ecel 软件计算标准偏差 SD 。 SD 值越小,基因的稳定性越好。若 $SD>1$,则认为该基因不稳定。分析结果(表 3)显示, 4 个看家基因中 SAND 的 SD 值小于 1,说明其稳定性最好。按照稳定性从高到低排序依次 SAND > β -actin > GAPDH > EF-1 α 。

表 3 用 BestKeeper 软件分析看家基因的表达稳定性

Table 3 Expression stability of housekeeping genes analyzed by BestKeeper

参数	基因			
	β -actin	SAND	EF-1 α	GAPDH
Geo 均值	18.17	22.71	17.86	17.43
AR 均值	18.22	22.73	17.99	17.49
最小值	15.96	21.11	15.42	15.49
最大值	21.17	24.16	25.85	21.37
标准差	1.04	0.82	1.55	1.07
变异系数(%)	5.70	3.61	8.63	6.14
x-fold 最小值	-4.63	-3.03	-5.42	-3.86
x-fold 最大值	7.99	2.74	253.76	15.31
x-fold 标准差	2.05	1.77	2.93	2.10
稳定性排序	2	1	4	3

2.4 内参基因稳定性验证

用内参基因 β -actin 和 SAND 基因对葡萄白藜芦醇生物合成途径的关键结构基因 STS 的表达水平进行分析,从而验证这 2 个内参基因对 qRT-PCR 分析基因表达的影响。由图 4 可知,以它们为内参基因分析葡萄发育后期 STS 基因的表达水平,其表达规律基本一致, STS 基因在花后 50 d,即转色初期表达水平较高。之后,表达量缓慢下降。但是在花后 95 d 表达水平急剧上升,用 β -actin 为内参基因时,花后 95 d STS 基因的表达水平是花后 80 d 的 27.2 倍,用 SAND 为内参基因时,花后 95 d STS 基因的表达水平是花后 80 d 的 23.5 倍。这说明采用 β -actin 和 SAND 内参基因进行校正分析葡萄发育后期相关基因表达水平时,相对定量结果比较一致,这 2 个内参基因适合进行葡萄发育后期基因表达的研究。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 因其快速性、精确性和灵敏

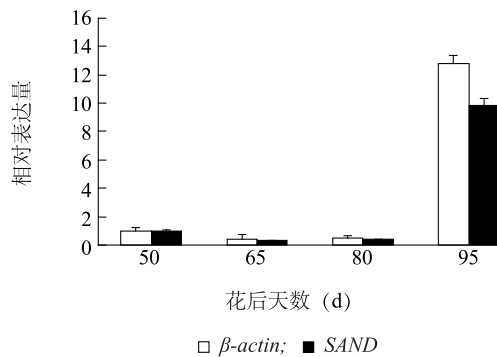


图4 不同发育时期赤霞珠葡萄 STS 的表达水平

Fig. 4 Expression levels of STS in different developmental stages of Cabernet Sauvignon using β -actin or SAND as reference gene

性,在研究基因表达水平方面得到广泛应用,然而适合、稳定的内参基因的正确选择是保证其结果可靠性的前提条件^[18-20]。在植物基因表达研究中常用的内参基因主要是经典的看家基因,包括 *Actin*、*18S rRNA*、*EF-1 α* 、*GAPDH*、*MDH* (*Malate dehydrogenase*)、*SAND*、*Tubulin* 和 *UBQ* (*Ubiquitin*) 等。但大量的研究表明,看家基因表达并非恒定,其表达量随着细胞和组织类型、生理状况、发育期等的不同而表现差异^[21-25],不适合的内参基因的选择极有可能导致实时定量 PCR 试验最终结果的误差。因此,在进行实时定量 PCR 内参基因选择时,仅参考文献报道的内参基因远远不够,应进行仔细分析和评价所选内参基因在特定试验条件下的稳定性。

鉴于此,本研究选择 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 3 个程序对候选内参基因进行评估,并通过试验对其做了进一步的筛选验证,以期为赤霞珠葡萄不同发育时期的基因表达分析中内参基因的选择提供依据。结果表明,在赤霞珠葡萄发育后期, β -actin 和 SAND 具有良好的稳定性,是赤霞珠葡萄基因表达定量 PCR 分析中合适的内参基因。这与 Reid 等^[26]研究结果基本一致。在此基础上,通过使用内参基因 β -actin 和 SAND 计算葡萄 STS 基因表达水平,来验证所选内参基因的可靠性。计算结果表明,经不同内参基因校正,STS 基因表达水平一致,说明 β -actin 和 SAND 适合进行葡萄发育后期基因表达的研究。

参考文献:

[1] 朱玉贤,李毅,郑晓峰. 现代分子生物学 [M]. 北京: 高等教

育出版社, 2007.

- [2] 刘博,孔婷婷,刘限,等. 玉米纹枯病菌 γ -谷氨酰转肽酶基因克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 39-41.
- [3] WONG M L, MEDRANO J F. Real-time PCR for mRNA quantitation[J]. Biotechniques, 2005, 39(1): 75-85.
- [4] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometrical averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): 341-344.
- [5] ALEKSANDAR R, STEFANIE T, MACKAY I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 313(4): 856-862.
- [6] 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]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(421): 2907-2914.
- [7] HONG S M, BAHN S C, LYU A, et al. Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in Arabidopsis[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(10): 1694-1706.
- [8] KIM B R, NAM H Y, KIM S U, et al. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(21): 1869-1872.
- [9] HU R, FAN C, LI H, et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR[J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10(1): 93.
- [10] BRUNNER A M, YAKOVLEV I A, STRAUSS S H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4(1): 14.
- [11] LOVDAL T, LILLO C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 387(2): 238-242.
- [12] ZHANG Z, HU J. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR[J]. Toxicological Sciences, 2007, 95(2): 356-368.
- [13] CICINNATI V R, SHEN Q, SOTIROPOULOS G C, et al. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR[J]. BMC Cancer, 2008, 8(1): 350.
- [14] 赵晓,马会勤,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.
- [15] THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 75(2): 291-295.
- [16] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT 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 Research*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [17] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509-515.
- [18] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(3): 597-601.
- [19] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR[J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227-230.
- [20] VANGUILDER H D, VRANA K E, FREEMAN W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 619.
- [21] LEE P D, SLADEK R, GREENWOOD C M T, et al. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies [J]. *Genome Research*, 2002, 12(2): 292-297.
- [22] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4): 279-284.
- [23] RADONIC A, THULKE S, MACKAY I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(4): 856-862.
- [24] 吴家红,程金芝,孙宇,等. 白纹伊蚊基因表达定量 PCR 内参基因的选择 [J]. *中国人兽共患学报*, 2011, 27(5): 432-435.
- [25] 李俊,卫恒习,李燕,等. 猪囊胚 microRNA 定量 PCR 分析中适宜内参基因的选择 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42(3): 203-208.
- [26] REID K E, OLSSON N, SCHLOSSER J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6(1): 27.

(责任编辑:陈海霞)