

可用于实时荧光定量 PCR 标准化的白桦内参基因

尹静¹, 任春林¹, 詹亚光^{1,*}, 滕文华², 陈秀福¹, 王玉成³, 孙红冉¹

东北林业大学¹生命学院; ²帽儿山实验林场, ³林学院, 哈尔滨 150040

摘要: 为了快速、准确的对白桦多个样品进行基因表达分析, 本研究应用荧光定量PCR技术, 对白桦持家基因微管蛋白基因(*Tu*)和泛素基因(*UbQ*)在不同处理的细胞及不同树龄或不同生长季节白桦植株各部位表达的稳定性进行检测。结果表明, 对于茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)处理的白桦细胞和不同生长季节白桦植株的基因定量表达分析, 可同时使用*Tu*和*UbQ*平衡化qRT-PCR数据; 而针对不同树龄白桦茎皮中基因表达研究时, 单独使用*UbQ*基因作为内参对照即可获得精确的表达数据。

关键词: 白桦; 实时定量PCR; 持家基因

Selection of Internal Control Genes for Real-Time RT-PCR Normalization in White Birch (*Betula platyphylla* Suk.)

YIN Jing¹, REN Chun-Lin¹, ZHAN Ya-Guang^{1,*}, TENG Wen-Hua², CHEN Xiu-Fu¹, WANG Yu-Cheng³, SUN Hong-Ran¹

¹College of Life Sciences, ²Maoershan Experimental Forestry Center, ³College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In order to facilitate rapid and accurate gene expression analysis of multiple samples from birch, the expression stability of housekeeping genes such as genes coding micro-tube protein (*Tu*) and ubiquitin (*UbQ*) were assessed by qRT-PCR using a set of cDNAs from different birch samples including cells after different treatments and different parts of birch plants in different ages or different growing seasons. The results suggested that the *Tu* and *UbQ* genes could provided superior transcript normalization in birch cells treated with different elicitors (MeJA and SA), and birch plants in different growing seasons, while *UbQ* gene was the recommended reference gene for gene expression studies using cDNAs from white birch bark in defferent years.

Key words: birch; real-time RT-PCR; housekeeping gene

实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)因为快速、灵敏和定量的特点, 已经成为分析基因转录水平及进行芯片和微点阵数据验证的常用手段, 这种方法比传统的Northern杂交更安全和精确, 并且所需起始材料的量较少。但是实验过程会因为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(Vandesompele等2002)。为了得到更精确的数据, 通常需要一个和多个内对照基因来平衡化qRT-PCR数据。目前一般选择持家基因(housekeeping gene)作为内对照, 持家基因编码的蛋白是维持细胞结构和基本代谢所必需, 所以其表达水平在各种环境下基本保持一致。持家基因包括泛素(ubiquitin, UbQ)、肌动蛋白(actin)、微管蛋白(tubulin, Tu)、组蛋白(histone)、18S rRNA以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

GAPDH)等基因。然而, 很多持家基因的表达水平随着环境的改变和组织部位的不同而发生变化(Thellin等1999; Lee等2002; Czechowski等2005), 如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(Reid等2006), 但在某些实验中肌动蛋白则表现不稳定(涂礼莉等2007)。Nicot等(2005)研究表明, 在马铃薯应对生物胁迫(晚疫病)和非生物胁迫(冷和盐害)过程中, 内参基因选择因处理不同而差异显著。因此, 选择合适的持家基因作为qRT-PCR内参非常必要。

收稿 2010-05-13 修定 2010-07-30

资助 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD200918)和中央高校基本科研业务费专项资金(DL09BA14)。

* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0451-82191752)。

白桦的树叶和树皮中富含三萜类化合物,药用价值广泛,加之其生长迅速,材质优良,是重要的经济树种。本实验以白桦细胞和白桦植株为试材,对持家基因 *UbQ* 和 *Tu* 在白桦细胞悬浮培养过程及白桦植株不同组织表达水平的稳定性进行了检测,以期在白桦中重要基因的定量表达研究提供更为准确的数据。

材料与方法

1 实验材料

1.1 白桦细胞来源及处理 白桦(*Betula platyphylla* Suk.)母树取自本校白桦强化种子园,5~7年生嫁接优树(接穗30年生)诱导的组培苗。

以白桦组培苗茎段为外植体,NT为基本培养基,附加激素 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA,诱导愈伤组织。稳定继代3次后,取3 g (FW)愈伤组织转移到含有100 mL相同液体培养基的250 mL三角瓶。悬浮培养第7天进行水杨酸(SA)诱导处理,同时设立对照组(等量的0.5%乙醇水溶液)。SA的终浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,处理后0 h、2 h、12 h、1 d、3 d、5 d和7 d分别收获细胞。处理重复3次,每次均按如上取样。细胞于液氮速冻, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,待提取RNA。

以白桦无菌苗茎段为外植体,IS为基本培养基,附加激素 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 诱导愈伤组织,稳定继代3次后,取3 g (FW)愈伤组织转移到250 mL三角瓶中进行悬浮培养,其中含有100 mL B₅液体培养基,添加激素 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ,然后在悬浮培养的第7天分别进行 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)及 $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 布洛芬(IBU,即MeJA合成专一性抑制剂)3种处理,同时设立对照组(0.5%乙醇水溶液),每种处理重复3次。MeJA和IBU处理后0 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d分别收获细胞。细胞于液氮速冻, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,待提取RNA。

NT和B₅液体培养基均添加 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、pH值为6.0~6.5,以 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌20 min,培养温度为 $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度为 $40 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间为 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,湿度为65%左右,摇床转速为 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2 白桦植株来源及取样 不同树龄(一年生、四

年生、六年生、八年生)白桦植株来自东北林业大学白桦强化种子园,除一年生白桦苗在2008年5月~10月期间每月取样外,其余树龄均于6月中旬一次取样。样品包括不同树龄叶片、根皮和茎皮部分。液氮速冻后, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,待提取RNA。

2 实验方法

2.1 RNA 抽提及 cDNA 合成 RNA提取采用 Tris-CTAB 法,不同样品总RNA用DNase I (Promega)处理, RNA完整性通过1.4% (W/V)琼脂糖胶电泳检测。用Eppendorf DU800分光光度计(Eppendorf AG)分析核酸浓度。取 A_{260}/A_{280} 在1.9~2.1之间及 A_{260}/A_{230} 大于2.0的RNA进行cDNA合成。

cDNA的合成操作参照 TaKaRa PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,以500 ng总RNA为起始材料,合成cDNA第一链。反应结束后,加180 μL 去离子水稀释,于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 实时荧光定量PCR反应体系及程序 选择白桦微管蛋白基因(α -tubulin, *Tu*, GenBank号为FG067376)和泛素基因(Ubiquitin, *UbQ*, GenBank号为FG065618)2个持家基因,根据已知基因序列,同时依据real-time RT-PCR引物设计原则,利用Primer Premier 5.0软件进行引物设计。引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR使用的持家基因引物序列

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

基因	5' → 3'
<i>UbQ</i> (R)	GATTGAGGGGAGGGATGCTG
<i>UbQ</i> (L)	GGAGGACAAGGTGGAGGGTG
<i>Tu</i> (R)	TCAACCGCCTTGTCTCTCAGG
<i>Tu</i> (L)	TGGCTCGAATGACTGTTGG

实时荧光定量PCR所用试剂盒为TOYOBO公司(日本)生产的SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus- (code No.QPK-212T)。PCR反应体系含有3.1 μL 蒸馏水、10 μL SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus-, 2 μL Plus solution、1.2 μL 引物R ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.2 μL 引物L ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2.5 μL 稀释的cDNA模板。所有试验样品均重复3次。PCR反应在OPTION II (MJ Research公司)荧光定量PCR仪上完成。PCR反应程序为: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$

预变性 30 s; 94 °C 变性 12 s; 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 40 s; 82 °C, 1 s; 读板。45 次循环。每 0.5 °C 进行熔解曲线(melting curve)扫描, 温度范围 55~99 °C。

结果与讨论

1 SA 处理下白桦细胞中持家基因表达变化

设定 0.01 为荧光定量 PCR 的阈值, *Tu* 和 *UbQ* 这 2 个持家基因的熔解曲线均为单一峰值, 熔解温度分别为 84 °C 和 86 °C, 确定产物单一。结合 PCR 测序结果, 与已知白桦基因 *Tu* 和 *UbQ* 序列同源性达 99%, 1 个碱基的差异可能是荧光产物测序过程

中造成的误差。

在 NT 培养基上进行愈伤组织诱导和悬浮培养的白桦细胞, 悬浮培养的第 7 天, 50 mg·L⁻¹ 的 SA 处理后不同时间点取样, 结果表明, 除 *Tu* 基因在 SA 及对照处理早期(2 h)基因表达量略低(C_t 值略高于其他处理)和 *UbQ* 基因在 SA 处理 2 h 时表现表达量显著高于其他处理外, 其他处理下, 2 个持家基因表达量表现稳定(图 1)。 *Tu*、*UbQ* 和 *Tu+UbQ* 在各处理间变异系数分别为 0.083、0.068 和 0.061 (表 2), 可以确定 *Tu+UbQ* 组合在使用 NT 培养基培养的白桦细胞基因定量表达分析时作为内参比单独使用 *Tu* 或 *UbQ* 基因效果更佳。

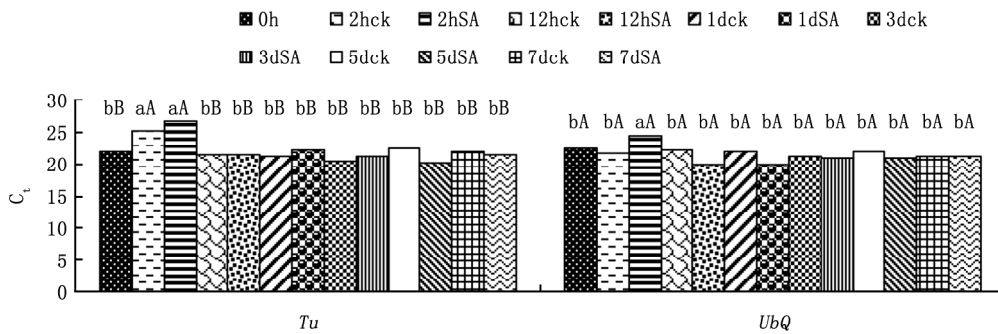


图 1 水杨酸(50 mg·L⁻¹)处理的白桦细胞中持家基因 *Tu* 和 *UbQ* 的 C_t 检测值

Fig.1 The C_t value of housekeeping genes *Tu* and *UbQ* in birch cells treated with 50 mg·L⁻¹ salicylic acid

0 h: 处理前; 2hck: 对照处理 2 h; 2hSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 2 h; 12hck: 对照处理 12 h; 12hSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 12 h; 1dck: 对照处理 1 d; 1dSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 1 d; 3dck: 对照处理 3 d; 3dSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 3 d; 5dck: 对照处理 5 d; 5dSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 5 d; 7dck: 对照处理 7 d; 7dSA: 50 mg·L⁻¹ SA 处理 7 d。图中不同大小写字母分别表示同一持家基因处理间 C_t 值在 0.01 和 0.05 水平差异显著, 下同。

表 2 不同处理下白桦细胞及白桦植株各部位中持家基因 C_t 值变异系数

Table 2 The coefficient of variation of C_t value of housekeeping gene in different cells under different treatments and in different parts of birch trees

材料	持家基因	最大值	最小值	平均值	标准差(SD)	变异系数(CV)
MeJA 处理白桦细胞	<i>Tu</i>	22.408	17.043	18.780	1.410	0.075
	<i>UbQ</i>	19.984	15.238	17.812	1.250	0.070
	<i>Tu+UbQ</i>	20.455	17.377	18.295	0.980	0.054
SA 处理白桦细胞	<i>Tu</i>	26.625	20.069	22.186	2.054	0.083
	<i>UbQ</i>	24.542	19.841	21.765	1.820	0.068
	<i>Tu+UbQ</i>	25.583	20.550	21.905	1.738	0.061
不同季节白桦植株各部位	<i>Tu</i>	28.669	18.978	22.218	2.034	0.092
	<i>UbQ</i>	22.288	17.341	20.277	1.675	0.083
	<i>Tu+UbQ</i>	25.203	19.422	21.247	1.490	0.070
不同树龄植株	<i>Tu</i>	28.669	20.143	20.759	3.560	0.150
	<i>UbQ</i>	22.288	20.108	21.195	0.996	0.047
	<i>Tu+UbQ</i>	25.203	20.125	22.477	2.117	0.094

2 MeJA处理的白桦细胞中持家基因表达变化

由图2表明, 经过IS培养基诱导愈伤组织, 再在B₅培养基中进行悬浮培养的白桦细胞, 在培养中期(第7天)加入不同浓度(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) MeJA 或 MeJA 合成的专一性抑制剂IBU (500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后不同时间取样, 结果表明, *Tu* 基因在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 分别处理 12 h 及 IBU 处理 1 d 时, C_t 值极显著高于其他处理; *UbQ* 基因

在 IBU 处理 6 h、12 h、2 d 时, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 2 d 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 6 h, C_t 值显著低于其他处理; 而 *Tu+UbQ* 的 C_t 值也仅在 IBU 处理 1 d 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 12 h 和 1 d 时, 极显著高于其他处理外, 其他处理间 *Tu*、*UbQ* 和 *Tu+UbQ* 的 C_t 值均基本表现稳定, 结合 *Tu*、*UbQ* 和 *Tu+UbQ* 的 C_t 值的变异系数分别为 0.075, 0.070 和 0.054 (表 2), 可以确定 *Tu*、*UbQ* 和 *Tu+UbQ* 在各处理间表

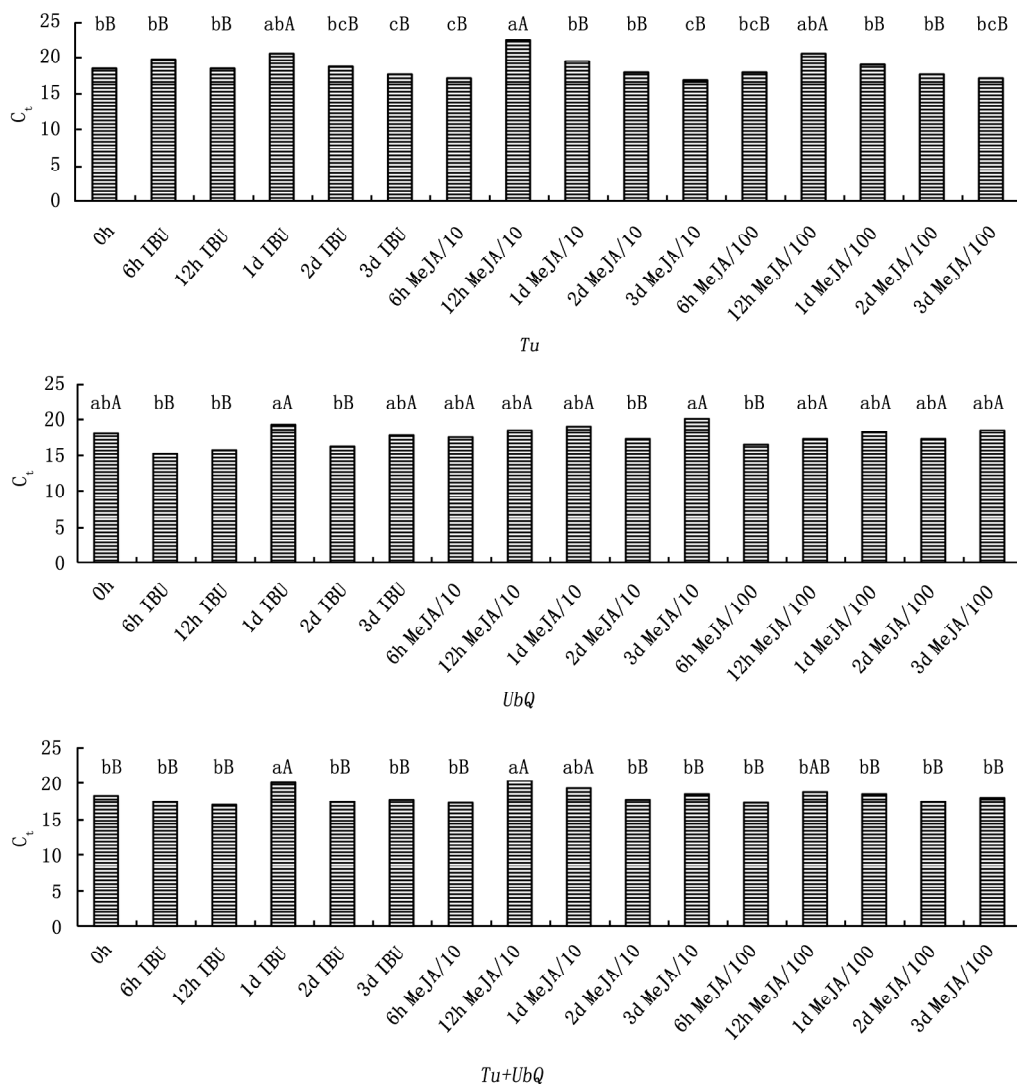


图2 茉莉酸甲酯及其抑制剂IBU处理的白桦细胞中持家基因*Tu*和*UbQ*的 C_t 值检测

Fig.2 The C_t value of housekeeping genes *Tu* and *UbQ* of birch cells treated with MeJA and IBU

0h: 处理前; 6h IBU: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBU 处理 6 h; 12h IBU: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBU 处理 12 h; 1d IBU: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBU 处理 1 d; 2d IBU: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBU 处理 2 d; 3d IBU: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IBU 处理 3 d; 6h MeJA/10: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 6 h; 12h MeJA/10: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 12 h; 1d MeJA/10: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 1 d; 2d MeJA/10: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 2 d; 3d MeJA/10: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 3 d; 6h MeJA/100: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 6 h; 12h MeJA/100: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 12 h; 1d MeJA/100: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 1 d; 2d MeJA/100: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 2 d; 3d MeJA/100: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理 3 d。

达变化很小,且以*Tu+UbQ*同时使用时变异系数最低,可以明确同时使用这2个持家基因组合作为MeJA及其抑制剂IBU处理的白桦细胞基因定量表达的内参对照效果最佳。

3 白桦植株中持家基因表达变化

在整个生长季节(哈尔滨)6~10月期间,一年生白桦植株中根皮、叶片和茎皮中持家基因*Tu*和*UbQ*的表达略有变化,如*Tu*基因在6月、7月茎皮及8月根中表达量较高(C_t 值低于其他处理)外,其他处理间相对稳定;*UbQ*基因在6月叶、根,7月和10月叶中, C_t 值较高;而*Tu+UbQ*基因 C_t 值在6

月叶和根中表现高于其他处理,其他时间各部位2个持家基因的表达量相对稳定,*Tu*、*UbQ*及*Tu+UbQ*基因各处理表达量的变异系数分别为0.092、0.083和0.070,因此,可以明确在不同生长季节内白桦植株中各部位2个内参基因的表达量基本稳定,但在进行基因定量表达研究时使用*Tu+UbQ*组合作为内参对照,能够更好的对表达量进行平衡化(图3、表2)。

对不同树龄白桦茎皮中持家基因*Tu*和*UbQ*的 C_t 值检测结果表明,一年生、四年生、六年生和八年生的白桦茎皮中*Tu*基因及*Tu+UbQ*基因 C_t 值

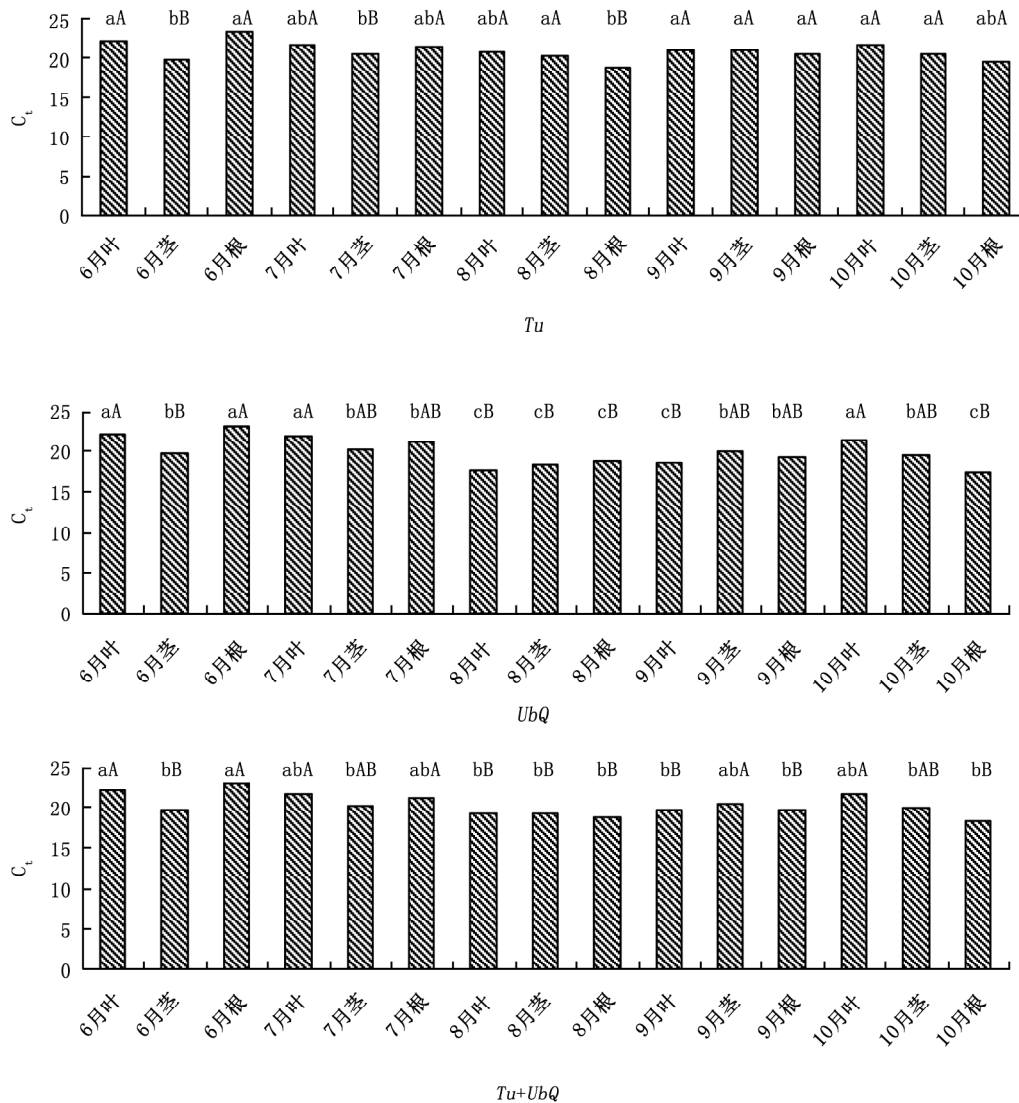


图3 一年生白桦植株不同部位持家基因*Tu*和*UbQ*的 C_t 值变化
Fig.3 The C_t value of housekeeping genes *Tu* and *UbQ* in different tissues of white birch

变异系数分别为0.150和0.094, 显著高于单独使用 *UbQ* 基因的变异系数0.047, 且 *Tu* 基因的 C_t 值在八年生的茎皮中显著高于其他树龄, 而 *UbQ* 基因在不同树龄茎皮间的表达变化不显著, 说明检测不同树龄茎皮中基因的定量表达变化仅需 *UbQ* 基因作为内参对照(图4、表2)。

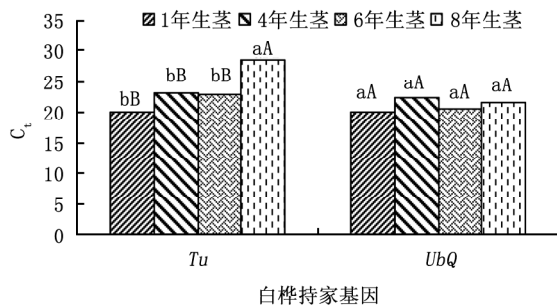


图4 不同树龄白桦茎皮中持家基因 *Tu* 和 *UbQ* 的 C_t 值变化
Fig.4 The C_t value of housekeeping genes *Tu* and *UbQ* in stem skin of white birch at different ages

本研究中使用来自2种培养条件下(IS和NT培养基)的白桦悬浮细胞, 并分别利用来源于细胞中的内源性诱导子进行处理, 可以明确2种培养条件下的白桦细胞中持家基因 *Tu* 和 *UbQ* 表达基本稳定, 且以 *Tu+UbQ* 共同使用对于平衡 qRT-PCR 数据效果最佳。同时对生长季节内一年生白桦植株各部位2个内参基因表达分析的结果表明, 在进行基因定量表达研究时, 使用 *Tu+UbQ* 组合作为内参对照能更有效地对表达量进行平衡化, 而如果检测不同

树龄茎皮中某些基因的定量表达变化, 仅需 *UbQ* 基因作为内参对照(图4、表2)。最终明确白桦持家基因 *Tu* 和 *UbQ* 在不同诱导子处理的白桦细胞和不同部位及生长时期白桦植株的表达量均较稳定, 可以作为白桦内参基因在荧光定量基因表达中应用。

参考文献

- 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
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 139: 5~17
- Lee PD, Sladek R, Greenwood CMT, Hudson TJ (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome Res, 12: 292~297
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, 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
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. BMC Plant Biol, 14: 27
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol, 75: 291~295
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3 (7): 0034.1