

DOI:10.11937/bfyy.201523054

番茄实时定量 PCR 内参基因选择的研究进展

王 艳¹, 刘 瑜²

(1. 吉林师范大学 生命科学学院, 吉林 四平 136000; 2. 农业部规划设计研究院, 北京 100125)

摘 要:实时定量 PCR 具有灵敏、准确、高通量等优点,已广泛应用于基因表达分析。常规的实时定量 PCR 关键步骤是选择合适的内参基因进行校正。该文总结了模式植物番茄传统内参基因类型的研究现状,提出了新的内参基因挖掘方法,以期对番茄实时定量 PCR 标准化提供了重要的理论依据。

关键词:番茄;内参基因;实时定量 PCR

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)23-0198-04

基因的表达分析在分子生物学领域应用广泛,在预测新基因、研究基因功能等方面具有重要作用。在转录水平进行基因表达的分析方法包括:生物信息学、构建文库、miRNA 芯片、荧光定量 PCR 和原位杂交等。实时定量荧光聚合酶链式反应(Real-time Fluorescence Quantitative PCR, 简写 RT-qPCR),实现了 PCR 技术由定性到定量的飞跃,目前 RT-qPCR 已成为基因表达研究的重要工具^[1]。RT-qPCR 在转录水平上具有快速、可靠、灵敏度高、特异性强、动态范围广等优点,已广泛应用于基因表达分析,验证基因芯片微阵列数据以及分子诊断等技术^[2]。在利用 RT-qPCR 时,通过表达稳定的内部参照做标准能够准确定量基因的表达水平,即应用内参基因对目标基因的表达进行标准化和校正。内参基因(Reference Genes)是检测基因表达水平变化时常用的参照物,理想的内参在各个组织和细胞中的表达相对恒定,且不受外界条件的影响(如生物和非生物胁迫),最常用的内源性参照基因为持家基因(House-keeping Genes)。持家基因是指不受外部环境的影响,在所有细胞

中均要表达的一类基因,其产物是维持细胞基本生命活动的必需品^[3],由于这些基因个体在各个生长阶段的大多数组织中持续表达或变化很小,高度保守,表达水平受环境影响小,只有启动序列或启动子与 RNA 聚合酶相互作用能够对其产生影响,不受其它机制的调节,而在植物中常被用作内参基因^[4-5]。但迄今为止,没有一种理想的内参基因可应用于所有植物并得以稳定表达,甚至同种植物不同组织或生长时期,选取的内参基因也不尽相同,如错误的使用内参基因,则无法对基因表达的微小差异进行判断,甚至会引致错误得出相反的结论^[6]。因此,在 RT-qPCR 分析中选择内参基因至关重要。为了获得可靠的试验结果,在定量 PCR 分析中,必须根据样品的不同选择最合适的 1 个或 1 个以上的内参基因进行校正,以尽可能除去不稳定因素。

番茄是研究果实发育的经典茄科模式植物,在番茄 RT-qPCR 的研究中应用如 β -actin、Ubiquitin、18SrRNA、GAPDH 等多种内参基因,尤其随着 microRNA 已成为植物研究的热点问题,在番茄 microRNA 表达研究过程中,RT-qPCR 是最有效的方法之一。转录效率可以通过使用内参基因校正,弥补制备过程中样本差别,使目的基因在不同样本之间具有可比较性,获得可靠结果^[7]。内参基因已经成为番茄 RT-qPCR 研究基因表达的重要内容。大量文献报道中采用传统内参基因对各种番茄

第一作者简介:王艳(1972-),女,本科,助理研究员,研究方向为生物学。E-mail:jlsfwangyan1111@126.com.

责任作者:刘瑜(1982-),女,硕士,工程师,研究方向为农产品加工。E-mail:skliuyu@163.com.

收稿日期:2015-07-24

Abstract: Large cherry is sweet and colorful, supplied with nutrients, and has a high value of medical care, popular in mass. But browning and rot happened frequently during preservation, which seriously influenced its commodity value. The research progress on large cherry disease, postharvest physiology and storage method in recent years were mentioned, research on regularity of physiological changes were discussed in detail, preservation method were also mentioned, unsolved problems were pointed, and the feasible research directions was prospected, which might provide subservient references for storage of large cherry in the future.

Keywords: large cherry; postharvest physiology; preservation technology; research progress

中基因表达情况进行研究,缺乏在同一试验条件下对传统内参基因表达量的比较分析,对各个内参基因的稳定性特点亦缺乏总结性归纳。

1 番茄中传统内参基因的特点

番茄中传统内参基因有肌动蛋白(*Actin*)基因、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因、泛素(*Ubiquitin*)基因、18S 和 28S 核糖体 RNA(18S *rRNA*、28S *rRNA*)基因及肽链延伸因子(*ELF- α*)基因等。这些内参基因具有如下特点。

肌动蛋白是真核细胞中胞质微丝骨架主要的组分之一,包括 α 、 β 、 γ 3 种高度同源的肌动蛋白异构体^[8]。在各种生物中其氨基酸的同源性为 70%~100%,细胞进化高度保守。因此,大多数研究者选取的 *actin* 基因作为内参基因,*actin* 是番茄基因表达中应用最广泛的内参基因,尤其是一些与番茄抗逆性相关酶基因的表达和克隆方面应用广泛^[9]。在特定条件下所有番茄组织器官中均能稳定表达^[10]。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶是参与糖酵解过程中的一种

酶,在所有组织中都能稳定表达,并在相同细胞或组织中具有恒定的表达量,*GAPDH* 基因作为内参基因在番茄中较为常用,一般叶片组织中能够稳定表达。LOVDAL 等^[11]在对番茄叶片组织中多种内参基因抗逆表达量进行检测时发现,在光胁迫条件下 *GAPDH* 具有最高稳定的表达量,但在氮饥饿及低温胁迫时表达量不稳定。

泛素是存在于大多数真核细胞中的一种小蛋白。它的主要功能是标记需要分解掉的蛋白质,使其被水解。*Ubiquitin* 基因在真核生物中具有高度保守性,人类和酵母的泛素有 96% 的相似性,因此在实时定量和半定量 PCR 中也可作为内参基因。此外,在 microRNA 的 RT-qPCR 中,普通的内参基因不适用于 microRNA 的检测。小分子核仁 RNA(snoRNA)和转运 RNA(tRNA)常被作为 miRNA 的内参基因^[12]。如:U6 是一种 microRNA 的 RT-qPCR 分析中常用的内参基因^[13]。表 1 中列举了番茄传统内参基因的引物及其能够稳定表达的范围。

表 1 番茄中 RT-qPCR 内参基因所用引物

Table 1 Primers used for reference gene of RT-qPCR in tomato

内参基因	引物序列	应用范围举例	参考文献
<i>Actin</i>	F:5'-GGAATGGGACAGAAGGAT-3'	组织器官(叶片)	[14]
	R:5'-CAGTCAGGAGAACAGGGT-3'		
	F:5'-GGAATGGGACAGAAGGAT-3'	组织器官(果实)	[15]
	R:5'-CAGTCAGGAGAACAGGGT-3'		
	F:5'-GTCCTCTTCCAGCCATCCA-3'	组织器官(根)	[16]
<i>GAPDH</i>	R:5'-ACCACTGAGCACAATGTTACCG-3'	组织器官(叶片)	[17]
	F:5'-CAGGAACCCCTGAAGATATCCC-3'		
	R:5'-GCAGTTGGTACTCTGAAGGCC-3'	光周期	[11]
	F:5'-CTGCTCTCTCAGTAGCCAAACAC-3'		
	R:5'-CTTCTCCAATAGCAGAGGTTT-3'	组织器官(叶片,根)逆境胁迫(病毒诱导)	[18]
<i>Ubiquitin</i>	F:5'-TCGTAAGGAGTCCCCAATGCTGA-3'		
	R:5'-CAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTAA-3'	组织器官(叶片)	[19]
<i>Ubi3</i>	F:5'-TCCATCTCGTGCTCGTCT-3'		
<i>ELF-α</i>	R:5'-GAACCTTTCCAGTGTCATCAACC-3'	组织器官(根,茎,叶,花,果实)逆境胁迫(高温胁迫,干旱胁迫,盐胁迫)	[20]
	F:5'-ACCTTTGCTGAATACCCCTCCATTG-3'		
18S <i>rRNA</i>	R:5'-CACACTTCACCTTCCCCTTCTCTG-3'	组织器官(叶片)	[20]
	F:5'-GAGTCAATCAGCTCGCGTTGAC-3'	组织器官(叶片)	[21]
25S <i>rRNA</i>	R:5'-CGGATCATTCATCGGTAGGA-3'		
	F:5'-ATAACCGCATCAGGTCTCCA-3'	组织器官(叶片)	[22]
<i>EF-1α</i>	R:5'-CCGAAGTTACGGATCCATTT-3'		
	F:5'-AGATGGTCAGACCGTGAAC-3'	组织器官(果实)	[23]
	R:5'-TGGAGTACTTGGGGTGGTA-3'		
	F:5'-GGAAGTGTGAGAGGAGCCTAAG-3'	逆境胁迫(氮胁迫,冷胁迫)	[11]
	R:5'-CAACACCAACAGCAACAGTCT-3'		
U6	F:5'-TTGCTTGCTTTCACCTTGG-3'	组织器官(叶片,根,茎,花,果实),逆境胁迫(盐胁迫)	[24]
	R:5'-TTGGCACCAGTTGGGTCT-3'		
	F:5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC-3'	组织器官(叶片)	[13]
	R:5'-GGGCAGCCAAGGATGACT-3'		

除表 1 所列,还有一些也在番茄中得到应用,经试验证明作为内参基因能得到稳定表达,如:蒋明等^[25]在对番茄几丁质酶基因和 *LeCHI* 基因进行 RT-PCR 检测

时,选取 *Tubulin* 为内参基因,结果表明,*Tubulin* 在根、茎、叶和花蕾中均有稳定表达。MAHER 等^[26]对 4 种茄科植物(茄子、辣椒、番茄和马铃薯)进行实时定量 PCR,

选取同源性高达 95% 的 β -果糖苷酶基因作为内参基因, 结果表明 β -果糖苷酶基因具有高特异性和灵敏度。YANG 等^[27] 用传统方法和实时定量 PCR 对转基因番茄“华番 1 号”进行检测筛选, 选取一种番茄中特异性内源基因 *LAT52* 作为内源参照基因, 建立了可靠准确的筛选和结构特异性 PCR 检测系统。此外, 在同种环境下, 同一植株中, 可通过选取不同的组织器官对内参基因的稳定性进行评价, 如 TIZIANA 等^[18] 对番茄生物胁迫处理, 对根和叶片组织中 8 种内参基因(*EF-1 α* 、*18S rRNA*、*Tubulin*、*Cyclophilin*、*UK*、*GAPDH*、*Actin*、*Ubi*)的稳定性进行测试, 其中 *GAPDH* 和 *Ubiquitin* 在 2 种组织中稳定性最高, *Actin* 及 *UK* 也在各个组织中也有稳定表达, *Cyclophilin* 仅在根组织中表现出稳定的表达效果, 常用的内参基因 *EF-1 α* 和 *18S rRNA* 在 2 种组织中都不稳定, 不适合作为番茄叶片及根组织中基因表达的内参基因。

2 番茄中新内源性内参基因

研究发现常用的内参基因均存在缺陷, 在不同类型组织细胞、不同阶段器官发育和不同的试验条件下, 其表达量通常变异较大^[28-29]。因此, 针对特定的试验条件及样品类型寻找适合内参基因至关重要。EXPOSITO-RODRIGUEZ 等^[30] 曾对番茄不同组织及不同发育时期内参基因的选择进行系统评价, 选取番茄不同组织不同发育时期确定具有代表性的 27 个样本, 进行内参基因表达稳定性分析, 研究番茄中 7 个常用的持家基因(*GAPDH*、*EF1 α* 、*TBP*、*RPL8*、*APT*、*DNAJ*、*TUA*)和 4 个在拟南芥和葡萄中能够稳定表达新的持家基因(*CAC*、*TIP41*、*SGN-U346908*、*SAND*)表达稳定性, 结果表明 4 个新的内参基因的稳定性普遍高于 7 个传统内参基因, 其中 *CAC*、*TIP41* 稳定性最好^[31]。目前在番茄内参基因的挖掘方面研究, 总结起来主要有以下 3 种方法。

2.1 基于 EST 数据库发现新的内参基因

EST 数据库筛选新的内参基因是根据来源对公共数据库中的 EST 序列进行分类, 从中寻找在特定 cDNA 文库中出现频率高的 EST 序列, 再结合网络搜索得到这些基因在不同试验条件下(如逆境胁迫)的表达谱, 筛选出了一批稳定性较好的候选内参基因, 再通过 RT-qPCR 验证挖掘出新的内参基因^[32], 2003 年 COKER 等^[33] 统计分析了番茄 EST 数据库中的 127 个基因在不同 cDNA 文库中的出现频率, 并据此来判断基因的表达稳定性, 得出 5 个稳定性较高的基因作为番茄中的新内参基因。

2.2 利用基因芯片技术筛选

基因芯片技术是一种高通量筛选差异基因的方法, 适应大规模功能基因的发掘需求而发展起来的技术, 目前有报道利用基因芯片技术筛选内参基因的文献。CZECHOWSKI 等^[34] 利用全基因组搜索并经过试验验证

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等模式植物中获取可靠的内参基因。BAS 等^[35] 在对番茄种子进行 RT-qPCR 表达时对内参基因进行鉴定, 通过分析拟南芥种子基因芯片数据, 挖掘稳定表达的基因作为新的内参基因。并推导出番茄种子同源基因, 再通过测试其稳定性挖掘新的内参基因。

2.3 利用建库实现内参基因的筛选

生物体内存在一些 RNA, 对外界环境的胁迫作用具有应激反应^[36], 但小 RNA 与普通基因所用的内参基因大小的差异使内参基因的表达量远高于 microRNA 的表达量, 导致校正 microRNA 数据时结果不理想, 多数研究人员通常使用 U6 和 5S rRNA 作为 microRNA 检测的内参, 但目前的研究表明, 在很多情况下 microRNA 的这 2 种传统的内参基因, 在某种条件下不稳定而且差异很大^[37], 因此在未经验证的条件下, 应谨慎使用内参基因。现今对 microRNA 的内参基因选择的研究报道很少, 而且没有统一的规范, 较为理想的方法是利用小 RNA 自身特点, 在特定的试验条件下, 通过建立小 RNA 文库, 挖掘新的小 RNA 同时筛选出表达稳定的小 RNA 作为实时定量 PCR 的内参基因。如 JIN 等^[38] 对灰霉病感染番茄利用基因芯片鉴定 microRNA 的表达量变化进行了分析, 得出结论应激反应可以筛选表达量变化较大的 microRNA, 研究相应的作用机理, 同时也可以筛选出表达稳定的 microRNA 作为同种胁迫条件下的内参基因。

3 展望

番茄品种繁多, 又是传统的模式植物, 对番茄中各种功能基因在不同生长阶段或者特定环境下的差异表达的测定具有重要意义, 内参基因的稳定性决定着表达量真实性, 对内参基因稳定性的进行系统的验证才刚刚起步, 因此, 挖掘可靠的内参基因也将更加有助于揭示番茄基因表达的内在规律, 为实时定量 PCR 的研究提供了重要的参考依据。

参考文献

- [1] YOO W, KIM T, LI S, et al. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR[J]. *Parasitol Res*, 2009, 104: 321-328.
- [2] HACQUARD S, VENEANT-FOURREY C, DELARUELLE C, et al. Validation of *Melampsoralarici-populina* reference genes for in planta RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2011, 75: 106-112.
- [3] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. *植物生理学*, 2014, 50(8): 1119-1125.
- [4] 蔡灵, 吴曼丽, 范丹, 等. 大黄鱼 *Hepcidin* 基因转录物的相对定量分析[J]. *上海大学学报*, 2012, 18(4): 413-418.
- [5] MUKESH J, AASHIMA N, AKHILESH K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 345: 646-651.
- [6] BUSTINS. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. *J Mol Endocrinol*, 2002(29):

23-39.

- [7] DAVOREN P, MCNEILL R, LOWERY A, et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer[J]. BMC Mol Biol, 2008(9):76.
- [8] 牙库甫江·阿西木, 关波, 张富春. 植物基因表达转录分析中内参基因的选择与应用[J]. 生物技术通报, 2011(7):7-11.
- [9] 李琳琳, 李天来, 余朝阁, 等. 钙素对 SA 诱导番茄幼苗抗灰霉病的调控作用[J]. 园艺学报, 2012, 39(2):273-280.
- [10] YANG Y, WU Y, PIRRELLLO J, et al. Silencing Sl-EBF1 and Sl-EBF2 expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 61(3):697-708.
- [11] LOVDAL T, LILLOC. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress [J]. Anal Biochem, 2009, 387:238-242.
- [12] FINNEGAN E, MATZKE M. The small RNA world[J]. J Cell Sci, 2003, 116(23):4689-4693.
- [13] 金幼芳, 徐根明, 李艳, 等. 定量 PCR 检测 microRNA 表达的数据归一化新技术[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(5):473-481.
- [14] 任晓平, 张喜春, 张楠, 等. 低温胁迫对番茄幼苗叶片中脯氨酸降解酶的活性及其基因表达量的影响[J]. 中国农业通报, 2012, 28(10):132-135.
- [15] 肖东, 肖阳, 蔡应繁, 等. 番茄果实成熟相关基因 SlPEL 和 SlAPL 的表达特性[J]. 作物学报, 2010, 36(7):1135-1143.
- [16] 李仁, 吴新新, 李蔚, 等. 番茄水通道蛋白基因 SlAQP 的克隆与序列分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2):302-310.
- [17] 吴正景, 程智慧, 孟焕文. 番茄叶片胞壁转化酶 cDNA 克隆及反义沉默表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(2):241-245.
- [18] TIZIANA M, ELISA S, DONATO G, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(6):805-816.
- [19] 宋圆圆, 王瑞龙, 魏晓晨, 等. 地表球囊霉诱发番茄抗早疫病的机理[J]. 应用生态学报, 2011, 22(9):2316-2324.
- [20] 唐平华, 陈国平, 潘宇, 等. 番茄多蛋白桥梁因子基因 LeMBF1 的克隆及抗病性分析[J]. 生命科学研究, 2012, 16(2):138-143.
- [21] 傅天珍, 高永生, 陈集双. 系统侵染的番茄植株中黄瓜花叶病毒的时序变化[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4):359-365.
- [22] GIOVANNA M, PIERO C, GIAN P, et al. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in Bemisia tabaci[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147:282-289.
- [23] 张建成, 周文静, 邓秀新. 超表达草生欧文氏菌 *crtB* 基因促进转基因番茄类胡萝卜素合成的研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(3):390-396.
- [24] 杨荣超, 蔡玉静, 邓春婷, 等. 番茄两个盐胁迫响应基因的 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 植物科学学报, 2011, 29(2):178-182.

- [25] 蒋明, 郑君利. 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 几丁质酶基因 LeCHI 的克隆与序列分析[J]. 台州学院学报, 2009, 31(3):44-48.
- [26] MAHER C, REDOUANE E M, AURELIE B, et al. Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: Potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*) [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56, 1818-1828.
- [27] YANG L T, SUN H F, PENG A H, et al. Screening and construct-specific detection methods of transgenic Huafan No 1 tomato conventional and real-time PCR[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85:2159-2166.
- [28] MASCIA T, SANTOVITO E, GALLTELLID, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(6):805-816.
- [29] HRUZT, WYSSM, DOCQUIERM, et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization [J]. BMC Genomics, 2011(12):156.
- [30] EXPOSITO-RODRIGUEZ M, BORGES-ANDRES A, BORGES-PEREZ A, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process[J]. BMC Plant Biology, 2008(8):131-142.
- [31] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6):30-36.
- [32] 胡瑞波. 大豆 *FT_TFL1* 基因克隆、表达模式及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [33] COKER J, DAVIES E. Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data[J]. Bio Techniques, 2003, 35:740-748.
- [34] CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2005, 139:5-17.
- [35] BAS J, DEKKERS, LEO W, GEORGE W, et al. Densification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds[J]. Plant Cell Physiol, 2012, 53(1):28-37.
- [36] COVARRUBIAS A, REYES J. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs[J]. Plant Cell Environ, 2010, 33:481-489.
- [37] PELTIER H, LATHAM G. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues[J]. RNA, 2008, 14(5):844-852.
- [38] JIN W B, WU F L, XIAO L, et al. Microarray-based analysis of tomato miRNA regulated by *botrytis cinerea*[J]. Plant Growth Regul, 2012, 31:38-46.

Research Advance of Reference Gene Selection in Tomato Real-time Quantitative PCR

WANG Yan¹, LIU Yu²

(1. School of Life Science, Jilin Normal University, Siping, Jilin 136000; 2. Chinese Academy of Agricultural Engineering, Beijing 100125)

Abstract: Real-time quantitative PCR technology, with sensitive, accurate and high-throughput characteristics, had been widely used in gene expression analysis. Based on the relative quantitative analysis, the crucial step was selecting a proper reference gene, in this paper, research status of tomato's traditional reference gene types was summarized and other methods were proposed to find new reference genes. The present study provided the first important clues for accurate data normalization in real-time PCR in tomato.

Keywords: tomato; reference gene; real-time PCR