

## 转基因枳橙中 *rolABC* 基因荧光定量表达分析方法的建立

袁飞荣<sup>1,2,3</sup>, 严佳文<sup>1,2,3</sup>, 罗坤<sup>1,2,3</sup>, Alessandra Gentile<sup>4</sup>, 王晓君<sup>3</sup>, 刘东波<sup>1,3</sup>, 邓子牛<sup>1,2,3\*</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心 长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128; 4.卡塔尼亚大学 园艺与农产品加工系, 意大利, 卡塔尼亚 95123)

**摘要:** 以转*rolABC*基因枳橙B、D、E系及野生植株为材料, 制备标准品, 采用SYBR Green I染料, 构建*rol*基因和 $\beta$ -*actin*基因的双标准曲线, 校正引物扩增效率后, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对*rol*基因在嫩茎、嫩叶、功能叶、树皮和根中的mRNA水平进行相对定量, 建立适合于*rolA*、*rolB*、*rolC*基因实时荧光定量RT-PCR分析方法. 初步认为*rolC*基因在嫩茎、嫩叶、功能叶和树皮中表达量最高; 其次是*rolA*基因, 主要在嫩茎中表达; *rolB*基因表达量最低, 主要在根系中表达.

**关键词:** 实时荧光定量 RT-PCR; *rolABC* 基因; 特洛亚枳橙; 相对表达量; 基因表达

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0634-06

### Establishment of fluorescence quantitative RT-PCR assay on *rolABC* genes in transgenic Troyer citrange

YUAN Fei-rong<sup>1,2,3</sup>, YAN Jia-wen<sup>1,2,3</sup>, LUO Kun<sup>1,2,3</sup>, Alessandra Gentile<sup>4</sup>, WANG Xiao-jun<sup>3</sup>,

LIU Dong-bo<sup>1,3</sup>, DENG Zi-niu<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape, HNAU, Changsha 410128, China; 2. Changsha Subcenter, National Center of Citrus Improvement, Changsha 410128, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Corp Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China; 4. Dipartimento di Ortofloroorboricoltura e Tecnologie Agroalimentari, Catania University, Catania 95123, Italy)

**Abstract:** B, D, E transgenic clones with *rolABC* genes and wildtype plants were used as materials to construct binary standard curves of *rol* genes and  $\beta$ -*actin* gene with SYBR Green I fluorescent dye. After normalizing the influence of amplification efficiency with different primers in qRT-PCR, comparative Delta-delta *Ct* method was applied to develop suitable qRT-PCR method for analysing the expression of *rolA*, *rolB*, *rolC* genes in 5 tested tissues of B, D, E clones. The primary result showed that *rolC* expressed highest among 3 *rol* genes in tender stem, tender leaf, functional leaf and bark, *rolA* gene's expression in the middle level and mainly in tender stem, and *rolB* expressed lowest and mainly in root.

**Key words:** quantitative RT-PCR; *rolABC* genes; Troyer citrange; relative quantitation; gene expression

荧光定量PCR(FQ-PCR)是近年来发展起来的一种高效、准确、灵敏的核酸定量分析方法, 在病

毒检测、转基因植物鉴定和基因定量表达分析等领域已得到广泛应用<sup>[1-3]</sup>. 荧光定量PCR根据所用试剂

收稿日期: 2010-03-04

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADB7B02)

作者简介: 袁飞荣(1981—), 男, 湖南永州人, 博士研究生, 从事植物矮化机理研究; \*通讯作者, deng7009@163.com

不同可分为SYBR Green I 法、Taqman探针法及分子信标等,数据分析主要有绝对定量和相对定量两种方法<sup>[4-5]</sup>,在基因表达研究中,相对定量法应用广泛,常用的相对定量方法有双标准曲线法和  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[6]</sup>. *rolA*、*rolB*、*rolC*基因分别位于发根农杆菌A4菌株Ri质粒T-DNA区的第10、11、12开放阅读框上,至今已经成功利用Ri质粒对包括27个科55个属的许多草本植物和一些林木、果树进行了转化<sup>[7]</sup>,获得的转*rol*基因植物多数表现出节间变短、分枝增多、大量毛状根生成、植株显著矮化等特异性状<sup>[8-10]</sup>.不同的物种,基因表达具有特异性.笔者选用SYBR Green I荧光染料,采用校正引物扩增效率的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析*rolA*、*rolB*、*rolC*基因在转基因枳橙B、D、E系中嫩茎、嫩叶、功能叶、皮和根中的mRNA转录水平差异,建立了适合于*rolA*、*rolB*、*rolC*基因荧光定量RT-PCR分析方法.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

用包含双元质粒pDN3514<sup>[11]</sup>的根癌农杆菌C58C1<sup>[12]</sup>介导转化枳橙<sup>[13]</sup>,其中T-DNA区包括*CaMV 35S*启动子、*gus*基因、*npt II*基因和*rolA*、*rolB*、*rolC*基因.经分子鉴定获得多个转基因株系,组织培养繁殖B、D、E系及对照特洛亚枳橙自根苗作为试验材料<sup>[14]</sup>,采集转*rolABC*基因枳橙B、D、E3个株系的嫩茎、嫩叶、功能叶、树皮和根,立即液氮冷冻,提取RNA.RNA定量采用日本岛津公司UV-1800;采用北京Promega M-MLV Reverse Transcriptase反转录试剂盒合成cDNA,采用ABI 7500 荧光定量PCR仪,TaKaRa ,SYBR® Premix Ex Taq™, Perfect Real Time试剂盒进行定量PCR分析.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 RNA 制备

采用Trizol法提取转*rolABC*基因枳橙B、D、E3个株系的嫩茎、嫩叶、功能叶、树皮和根的总RNA,研磨后分装3管作为3个生物学重复,可见紫外分光光度计测定RNA浓度, $OD_{260}/OD_{280}$ 为1.8~2.0时,认为RNA质量达到要求,每管取6  $\mu$ g RNA用DNase I进行消化,消除DNA污染.

#### 1.2.2 实时定量 PCR 标准品的制备

冻融法<sup>[15]</sup>将包含*rolA*、*rolB*、*rolC*基因的pDN3514质粒转入大肠杆菌,挑取单菌落,转入30 mL 含抗50 mg/L卡那霉素的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡过夜,采用小量质粒提取法提取质粒(天根公司试剂盒TIANprep Mini Plasmid Kit DP103),用作*rolA*、*rolB*、*rolC*基因定量分析的标准品.提取样品的RNA,反转录合成cDNA作为 $\beta$ -*actin*基因定量分析的标准品,将标准品10倍梯度稀释作为模板进行定量PCR分析,分别构建*rolA*、*rolB*、*rolC*基因和 $\beta$ -*actin*基因定量表达分析的标准曲线.

#### 1.2.3 cDNA 第一链的合成

用Oligo DT<sub>18</sub>随机引物,MMLV反转录酶建立体系合成cDNA,依次添加5 $\times$ RT-Buffer 5  $\mu$ L,1  $\mu$ mol/L dNTP 5  $\mu$ L混合液和4  $\mu$ mol/L Oligo DT<sub>18</sub>随机引物0.5  $\mu$ L,RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ L和MMLV RTase 0.5  $\mu$ L, RNA 2  $\mu$ g,加水补足体积到25  $\mu$ L,95  $^{\circ}$ C 5 min,42  $^{\circ}$ C 60 min,最后,72  $^{\circ}$ C下加热10 min终止反应.

#### 1.2.4 标准曲线的建立与样品实时定量 PCR

根据GenBank中*rolA*、*rolB*、*rolC*和 $\beta$ -*actin*基因的序列,利用ABI公司Primer Express 3.0软件设计引物(表1),用SYBR Green I法进行实时定量PCR分析,20  $\mu$ L反应体系为:SYBR® Premix Ex

表1 定量 RT-PCR 靶标基因及内参基因引物序列

Table 1 Primers sequence of target genes and reference gene used in quantitative RT-PCR

基因	上游引物	下游引物	扩增片段长度/bp
<i>rolA</i> (X64255)	5'-GACCTTCGGAGTATTATGGC-3'	5'-AAGTCATGGCCAAAGGAGTG-3'	143
<i>rolB</i> (CAA45540)	5'-CTCGCCGAGAAAGAAGGT-3'	5'-ATCGCCATTTTCGCAAGTTC-3'	100
<i>rolC</i> (X64255)	5'-TTCGGTTACGCGGATCCTAT-3'	5'-GCCGATTGCAAACCTGCACTC-3'	198
$\beta$ - <i>actin</i> (CA824001)	5'-CACACTGGAGTGATGGTTGG-3'	5'-ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG-3'	228

*Taq*<sup>TM</sup> (2×)10.0 μL, 上游引物(2.5 μmol/L) 1.5 μL, 下游引物(2.5 μmol/L) 1.5 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, cDNA 1.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 5.1 μL, 每样本设置 3 个重复. 定量PCR反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 31 s, 进行 40 个循环, 在 72 °C 延伸步骤收集荧光信号, 最后添加熔解曲线. 同样反应体系和定量PCR反应条件, 10<sup>1</sup>~10<sup>5</sup>倍稀释标准品, 构建*rolABC*基因的标准曲线, 设置 10<sup>5</sup> 稀释的DNA起始模板值为 10, 其他梯度的DNA模板数依次递增. PCR扩增效率通过标准曲线的斜率计算<sup>[16]</sup>.

1.2.5 数据分析

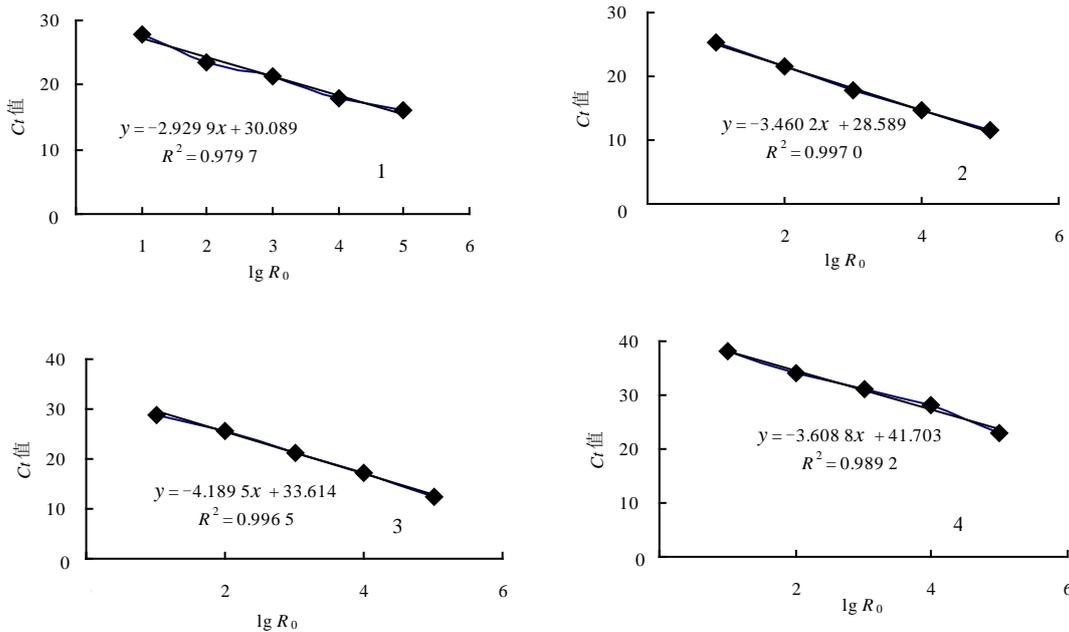
利用 7500 SDS system software 2.0 软件, 经 2 次自动设置荧光阈值和扩增效率获得*C<sub>t</sub>*值, 根据

2<sup>-ΔΔ*C<sub>t</sub>*</sup>法计算*rolA*、*rolB*、*rolC*基因表达值, 比较各基因在不同组织中的表达值. 采用SPSS 15.0 软件进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 标准曲线

取*rolA*、*rolB*、*rolC*和β-actin基因标准品, 10倍稀释做为模板, 进行实时荧光定量PCR, 设置3个同水平重复, 构建标准曲线, 获得cDNA浓度的对数值与*C<sub>t</sub>*值的关系(图1) *rolA*、*rolB*、*rolC*、β-actin基因的相关系数均达到0.98或以上, 扩增效率*E*值分别为119.4%、94.5%、73.3%和89.3%.



1、2、3、4 分别代表 *rolA*、*rolB*、*rolC* 和 β-actin 基因标准曲线.

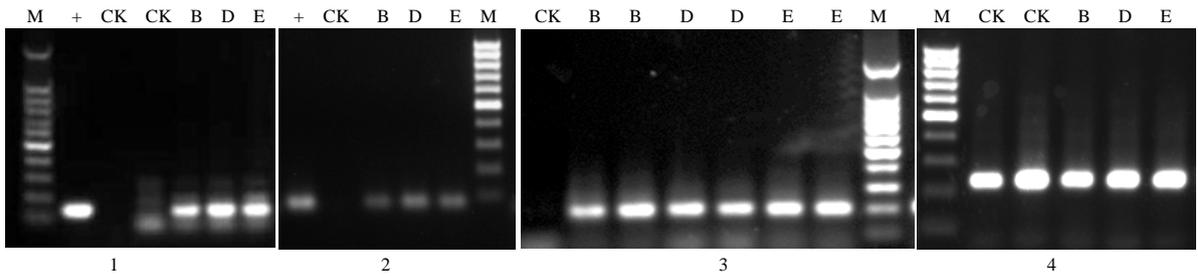
图 1 *rolA*、*rolB*、*rolC* 基因及内参基因 qRT-PCR 标准曲线

Fig. 1 Standard curves of *rol* genes and reference gene were established for quantitative RT-PCR analysis

2.2 引物扩增特异性验证

1%琼脂糖电泳和qRT-PCR产物熔解曲线确认, 电泳均获得单一目标条带, 片段大小正确(图2),

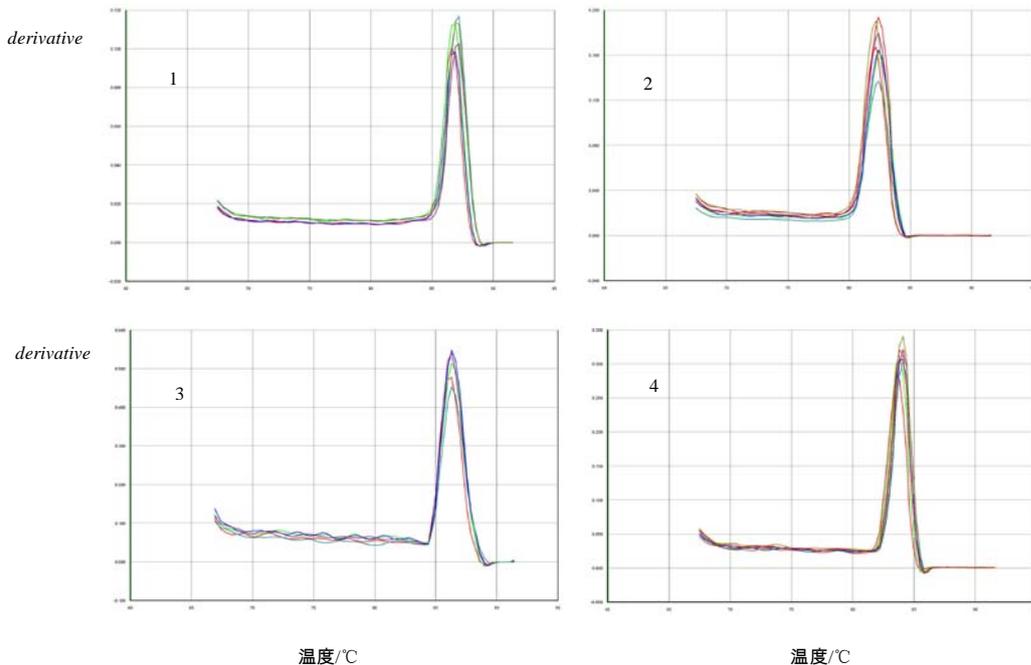
*rolA*、*rolB*、*rolC*及β-actin基因熔解曲线都呈单峰型(图3), 说明设计的引物均能达到荧光定量RT-PCR的要求.



1、2、3、4 分别代表 *rolA*、*rolB*、*rolC* 和  $\beta$ -*actin* 基因 qRT-PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳；+ 为 *rolABC* 阳性质粒正对照；CK 为非转基因枳橙；B、D、E 为转 *rolABC* 基因枳橙 B、D、E 系。

图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 qRT-PCR 产物大小及特异性

Fig.2 Evaluating the specificity of qRT-PCR primers and amplified fragment size with 1% agarose gel electrophoresis



1、2、3、4 分别为 *rolA* 基因、*rolB* 基因、*rolC* 基因、 $\beta$ -*actin* 基因 qRT-PCR 扩增产物的的熔解曲线。

图 3 熔解曲线评价 qRT-PCR 引物的特异性

Fig.3 Evaluating the specificity of primers used in qRT-PCR

2.3  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *rol* 基因在转基因枳橙 3 个株系组织中相对表达的稳定性

在 ABI 7500 SDS2.0 软件中输入各基因扩增效率校正  $Ct$  值，用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 *rolA*、*rolB*、*rolC* 基因表达，总体上，*rolC* 基因表达最强，其在嫩茎、嫩叶、树皮、功能叶中均高水平表达，在根中不表达(图 4-3)。*rolA* 基因主要在嫩茎中表达(图 4-1)。*rolB* 基因表达量最低，主要在根中表达，在其他组织中表达值很低(图 4-2)。不同株系、不同组织外源基因

表达差异明显，*rolA* 基因在 B、D 系嫩茎中表达显著强于 E 系，*rolB* 基因在 B、D 系根中表达水平同样显著高于 E 系。*rolC* 基因在嫩茎中 B 系最高，B、D 系 *rolC* 基因在嫩叶、功能叶、皮中表达无明显差异，但在 E 系嫩叶、功能叶中 *rolC* 基因表达量显著高于 B、D 系。3 次重复结果比较稳定，说明所建立的相对定量方法可靠，可进一步用于 *rolA*、*rolB*、*rolC* 基因时空表达研究。

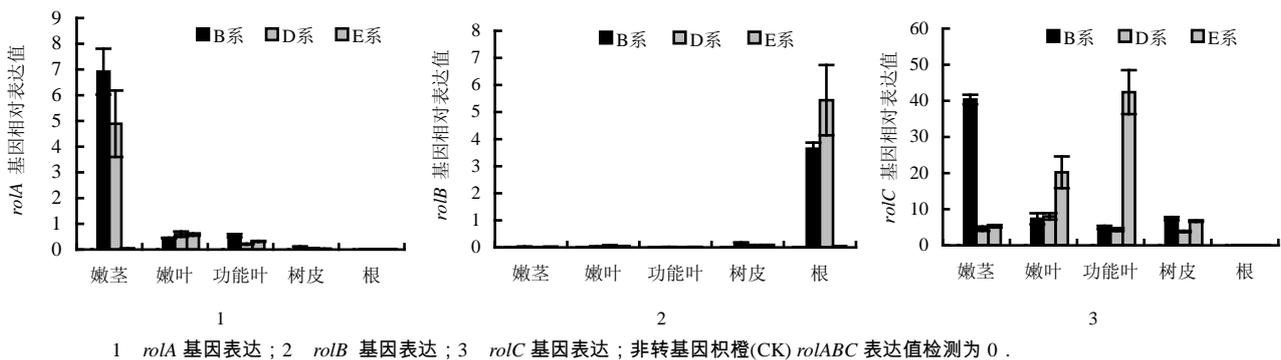


图4 *rol* 基因在 3 个株系中的 qRT-PCR 相对定量分析

Fig.4 Relative quantitative RT-PCR analysis of *rol* genes in 5 tested tissues of 3 different transgenic Troyer citrange clons

### 3 讨论

管家基因(house keeping genes)在生物体内持续稳定表达,实时荧光定量PCR技术的核心是应用管家基因作为内参基因对样品细胞数进行归一化,定量一定细胞数的靶标核酸的含量。然而,内参基因的稳定性易受物种、组织器官、发育阶段、环境条件影响<sup>[17-18]</sup>,因此,对内参基因评价和选择,是荧光定量PCR对核酸准确定量的关键。目前,常用的内参基因有甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因、 $\beta$ -actin、28S和18S rRNA基因,但不同物种中管家基因的稳定性并不一致,因而,必须选择和评价内参基因的稳定性<sup>[19]</sup>。评价内参基因选择有严格的程序<sup>[16-19]</sup>,所设置的参数能较好评价内参基因的稳定性,在数据处理上,可以利用优化的内参基因组合对样品 $C_t$ 值进行归一化处理,其定量结果更加可靠,多内参基因的应用已成为荧光定量PCR研究基因表达的趋势<sup>[20-23]</sup>。

在基因表达研究中,相对定量法常用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,计算方便,适合于大量样品的分析,但由于 $C_t$ 值受引物扩增效率影响很大,用此法计算不能消除扩增效率的误差,定量准确性受到影响,在引物扩增效率处于90%~110%之外<sup>[24]</sup>,通常需引入扩增效率对 $C_t$ 值进行归一化,不少定量PCR仪自带软件包含此项功能,如7500 SDS2.0软件,可输入特异引物的扩增效率对 $C_t$ 值进行校正,然后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对定量结果,从而消除扩增效率的误差。双标准曲线法因为需要制备标准品,同时建立内参基因和靶标基因的标准曲线,程序变得复杂,适合于多基

因但小量样品的核酸定量分析,定量方法的稳定性、可靠性通常采用设置试验重复来验证。标准品在核酸定量分析、引物扩增效率的计算上均有应用,DNA常用的标准品有插入靶标基因的质粒、PCR扩增回收产物,高丰度靶标基因的DNA样品,RNA常用的标准品有插入靶标基因的质粒、PCR扩增回收产物和高丰度的RNA合成的cDNA,以及体外转录的获得RNA,最佳的标准品是最能体现样品荧光定量PCR扩增动力学的模板<sup>[25]</sup>。

此外,PCR反应体系的稳定性也影响定量结果。为调控反应体系的稳定性,核酸样品在定量分析前必须进行纯化、浓度归一化,DNA样品可进行浓度测定、计算、稀释归一化,RNA样品在反转录时必须控制加入的RNA量,之后再行cDNA浓度的归一化。这样可以更好地保证PCR反应体系的稳定性,避免不同样品因模板量不同和反应体系改变而影响扩增效率,从而影响到最终定量结果。

本研究方法以包含*rol*基因质粒作为靶标基因定量分析的标准品,提取样品RNA,采用Oligo DT<sub>18</sub>合成cDNA作为内参基因定量分析的标准品,通过梯度稀释标准品,构建靶标基因和内参基因定量分析双标准曲线。标准品与样品用作模板扩增动力学曲线有较好的一致性,通过建立标准曲线,较好的消除了扩增效率的影响,对样品浓度进行归一化,建立稳定的反应体系,定量分析高效,结果可靠。

### 参考文献:

- [1] 朱捷,杨成君,王军. 荧光定量PCR技术及其在科研中的应用[J]. 生物技术通报, 2009(2): 73-76.

- [2] Bustin S A . Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR(RT-PCR) : Trends and problems [J] . J Mol Endocrinol , 2002 , 29(1) : 23-39 .
- [3] 郭杨, 陈世界, 郭万柱, 等 . 荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J] . 动物医学进展, 2009, 30(2) : 78-82 .
- [4] Kenneth J L , Thomas D S . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J] . Methods , 2001 , 25(4) : 402-408 .
- [5] Rieu I , Powers S J . Real-time quantitative RT-PCR : Design , calculations , and statistics[J] . Plant Cell , 2009 , 21(4) : 1031-1033 .
- [6] Tania Nolan , Rebecca E Hands , Stephen A Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J] . Nature Protocols , 2006 , 3(1) : 1559-1582 .
- [7] Mary C Christey. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants[J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*, 2001, 37(6): 687-700.
- [8] Schmülling T, Schell J, Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development[J]. *EMBO J*, 1988, 7(9): 2621-2629.
- [9] Rugini E, Mariotti D. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes and rooting in woody species[J]. *Acta Hort(ISHS)*, 1991, 300:301-308.
- [10] Bulgakov V P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism[J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(4):318-24.
- [11] Negri P . Trasferimento di geni *rol* di *Agrobacterium rhizogenes* a piante arboree[D] . Tesi di Dottorato : Dipartimento Colture Arboree , Universita di Bologna , 1992 .
- [12] Chilton M D , Tepfer D A , Petit A , et al . *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells[J] . Nature , 1982 , 295 : 432-434 .
- [13] Gentile A , Deng Z N , La Malfa S , et al . Morphological and physiological and effects of *rolABC* genes into citrus genome[J] . *Acta Hort(ISHS)* 2004 632 235-242 .
- [14] 胡春华, 谢玉明, 黄训才, 等 . 转 *rolABC* 基因枳橙快繁技术[J] . 果树学报, 2006, 33(1) : 142-144 .
- [15] 余云舟, 杜娟, 王罡, 等 . 重组质粒导入根癌农杆菌冻融法的研究[J] . 吉林农业大学学报, 2003, 25(3) : 257-259 .
- [16] 唐永凯, 贾永义 . 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨 [J] . 生物技术, 2008, 18(3) : 89-91 .
- [17] Schmittgen T D , Zakrajsek B A . Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression : Validation by real-time quantitative RT-PCR[J] . J Biochem Biophys Methods , 2000 , 46(1/2) : 69-81 .
- [18] Thellin O , Zorzi W , Lakaye B , et al . Housekeeping genes as internal standards : Use and limits[J] . J Biotechnol , 1999 , 75(2/3) : 291-295 .
- [19] Brunner A M , Yakovlev I A , Strauss S H . Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies[J] . BMC Plant Biol , 2004 , 4(14) : 1-7 .
- [20] GeNorm Software for Windows VBA applet for Microsoft Excel 2000/XP/2003 (Version 3.5) [2010-06-29] <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorml>.
- [21] NormFinder Software (2005-jan-05 Version 0.953) [2010-05-28] <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm> .
- [22] Andersen C L , Jensen J L , Orntoft 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(15) : 5245-5250 .
- [23] Pfaffl M W , Tichopad A , Prgomet C , et al . Determination of stable housekeeping genes , differentially regulated target genes and sample integrity : Best Keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J] . Biotechnol Lett , 2004 , 26(6) : 509-515 .
- [24] Vandesompele J , De Preter K , Pattyn F , et al . Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J] . Genome Biol , 2002 , 3(7) : Research0034 .
- [25] Rutledge R G , Cote C . Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves [J] . Nucleic Acids Res , 2003 , 31 : e93 .

责任编辑: 罗慧敏  
英文编辑: 胡东平