

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^{1,2,3}, 严佳文^{1,2,3}, 罗坤^{1,2,3}, Alessandra Gentile⁴, 王晓君³, 刘东波^{1,3}, 邓子牛^{1,2,3*}

(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 β -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^{1,2,3}, YAN Jia-wen^{1,2,3}, LUO Kun^{1,2,3}, Alessandra Gentile⁴, WANG Xiao-jun³,

LIU Dong-bo^{1,3}, DENG Zi-niu^{1,2,3*}

(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 Ortoflorocarboricoltura 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 β -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^[1-3]. 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^[4-5]，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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[6]。*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^[7]，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^[8-10]。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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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^[11] 的根癌农杆菌 C58C1^[12] 介导转化枳橙^[13]，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^[14]，采集转*rolABC*基因枳橙B、D、E 3 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、E 3 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 μg 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^[15]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 ℃ 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 β -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 β -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 DT₁₈ 随机引物，MMLV 反转录酶建立体系合成 cDNA，依次添加 5×RT-Buffer 5 μL，1 μmol/L dNTP 5 μL 混合液和 4 μmol/L Oligo DT₁₈ 随机引物 0.5 μL，RNase Inhibitor 0.5 μL 和 MMLV RTase 0.5 μL，RNA 2 μg，加水补足体积到 25 μL，95 ℃ 5 min，42 ℃ 60 min，最后 72 ℃ 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 β -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 μL 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'-CTCGCCGCAGAAAGAAGGT-3'	5'-ATCGCCATTTTCGCAAGTTC-3'	100
<i>rolC</i> (X64255)	5'-TTCGGTTACGCGGATCCTAT-3'	5'-GCCGATTGCAAACTTGCACTC-3'	198
β -actin (CA824001)	5'-CACACTGGAGTGATGGTTGG-3'	5'-ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG-3'	228

Taq^{TM} (2×)10.0 μ L, 上游引物(2.5 μ mol/L) 1.5 μ L, 下游引物(2.5 μ mol/L) 1.5 μ L, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μ L, cDNA 1.5 μ L, ddH₂O 5.1 μ L, 每样本设置 3 个重复. 定量PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 31 s, 进行 40 个循环, 在 72 $^{\circ}$ 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, $10^1 \sim 10^5$ 倍稀释标准品, 构建 *rolABC* 基因的标准曲线, 设置 10^5 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^[16].

1.2.5 数据分析

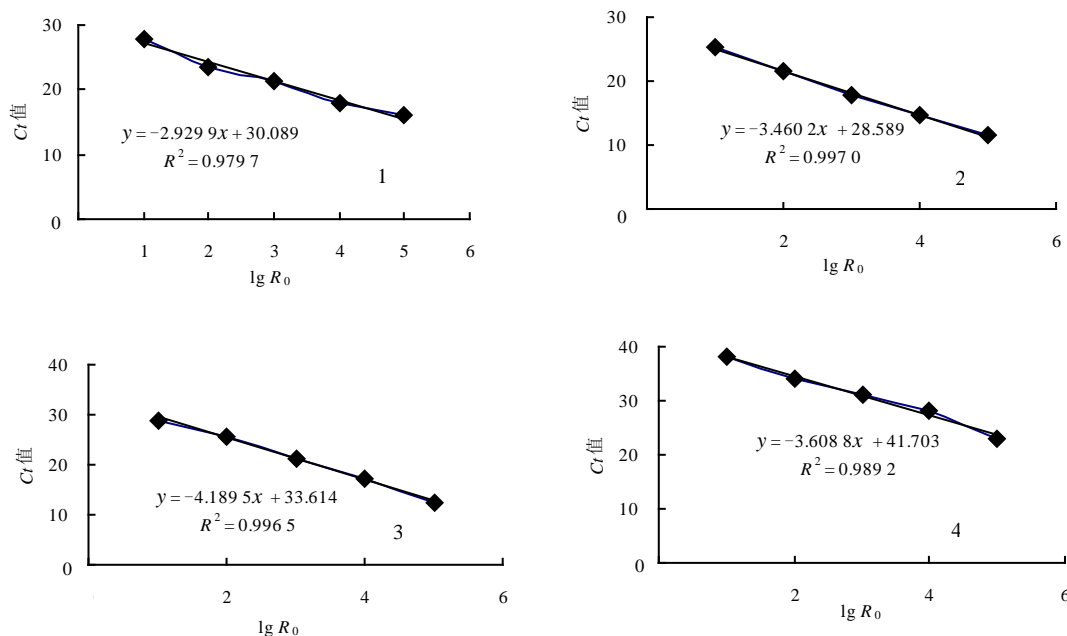
利用 7500 SDS system software 2.0 软件, 经 2 次自动设置荧光阈值和扩增效率获得 C_t 值, 根据

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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_t 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.

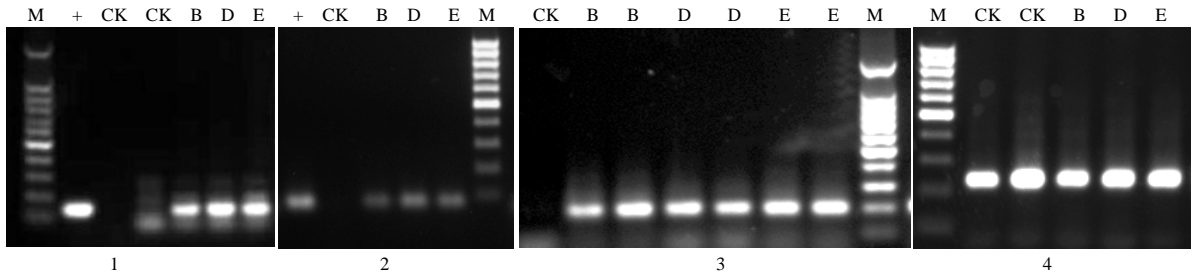
图 1 *rolA*、*rolB*、*rolC* 基因及内参基因 qRT-PCR 标准曲线

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),

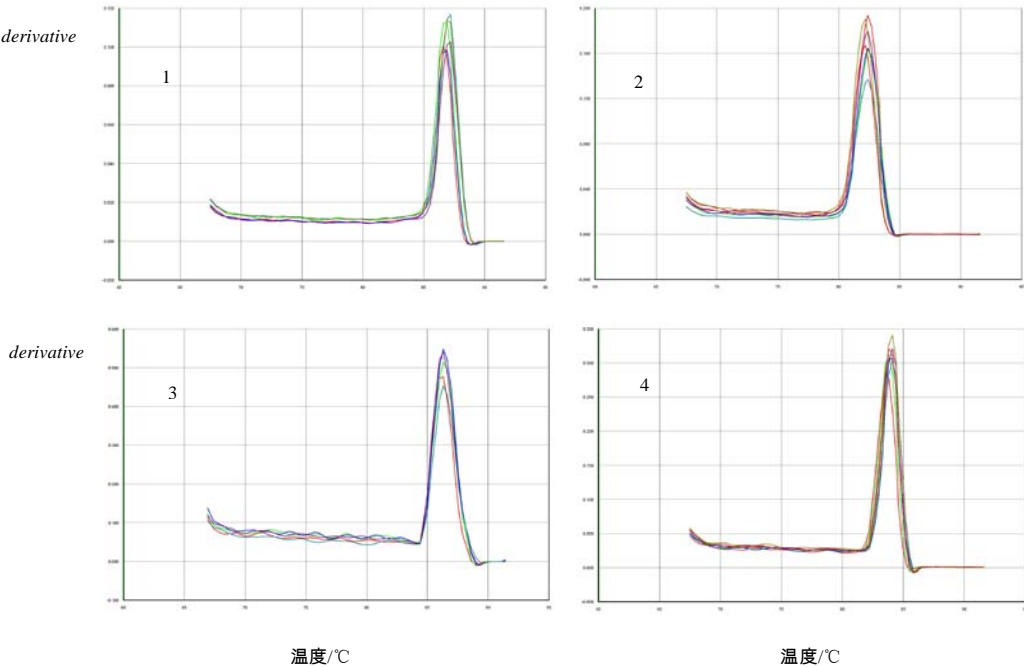
rolA、*rolB*、*rolC* 及 β -actin 基因熔解曲线都呈单峰型(图 3), 说明设计的引物均能达到荧光定量 RT-PCR 的要求.



1、2、3、4 分别代表 *rolA*、*rolB*、*rolC* 和 β -*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、 β -*actin* 基因 qRT-PCR 扩增产物的的溶解曲线。

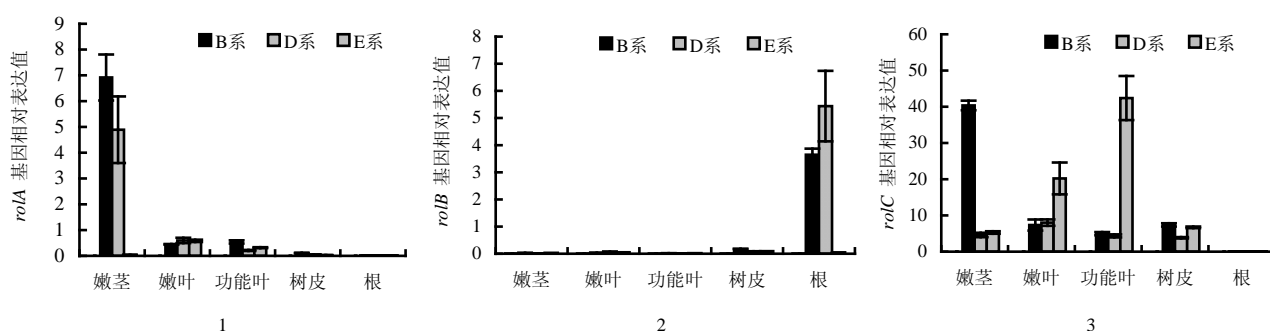
图 3 溶解曲线评价 qRT-PCR 引物的特异性

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

2.3 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 C_t 值，用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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。



1 *rolA* 基因表达; 2 *rolB* 基因表达; 3 *rolC* 基因表达; 非转基因枳橙(CK) *rolABC* 表达值检测为 0.

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 clones

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^[17-18], 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、 β -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^[19]. 评价内参基因选择有严格的程序^[16-19], 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^[20-23].

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^[24], 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^[25].

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 DT₁₈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 , Università 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