

TMV 和 PVX 胁迫下云烟和番茄实时 荧光定量内参基因筛选^①

张 宁, 魏周玲, 杜利娟, 青 玲, 孙现超

西南大学 植物保护学院/植物病害生物学重庆市高校级重点实验室, 重庆 400716

摘要:合适的内参基因是采用实时荧光定量 PCR 研究基因表达获得可信数据的基础. 为了获得合适的内参基因, 更好地研究烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)和马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)与烟草和番茄 2 种寄主的互作, 本研究根据已报道的云烟和番茄看家基因设计引物, 使用 *geNorm^{Plus}* 软件分别对其在 TMV 和 PVX 侵染下的云烟 97 和番茄中表达量的稳定性进行了评估. 结果表明: 2 种寄主植物中供试看家基因中各有 4 对引物满足 qPCR 的要求, 分别是云烟 *tub*, *CYP*, *GAPDH*, β -*tub*, 番茄 18S, *UK*, *ACT*, *EFl- α* . 在 2 种病毒侵染后的云烟内参基因中表达最稳定的为 *CYP*, 番茄中内参基因为 *ACT*. 最终确定这 2 个看家基因分别作为实时荧光定量 PCR 研究烟草和番茄在 TMV 和 PVX 胁迫下寄主体内基因表达变化的内参基因. 该结果为进一步探讨 2 种病毒共同侵染时, 它们与烟草和番茄 2 种寄主互作生物学效应研究奠定了基础.

关键词:烟草花叶病毒; 马铃薯 X 病毒; 寄主; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

中图分类号: S572; S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)07-0013-06

近年来, 实时荧光定量 PCR 技术(Quantitative real time PCR, RT-qPCR)是在定性 PCR 技术基础上发展起来的核酸定量技术, 具有快速、高灵敏度等优点, 能够准确分析在不同时期及经过不同处理的基因表达差异^[1-3]. 在基因定量表达研究中, 被用作内参基因的看家基因(Housekeeping gene)的稳定性对定量结果有非常重要的影响^[4-5], 因为并不是所有的看家基因都适合作为任何实验条件下的内参基因^[6]. 因此, 在进行 RT-qPCR 实验之前, 有必要评估在符合该实验条件下看家基因的稳定性, 筛选出能够稳定表达, 且不受实验处理影响的看家基因作为内参基因, 以确保定量实验结果的客观和准确. 前期研究表明 TMV 和 PVX 的外壳蛋白均可以与烟草和番茄中的 IP-L 和 Fd I 相互作用^[7]. 为了进一步分析在 2 种病毒胁迫下, 这 2 个基因在烟草和番茄体内的表达变化, 需要筛选 2 种病毒胁迫下的内参基因. 虽然已有报道使用这 2 种寄主中的一些内参基因, 如多聚泛素酶基因来研究寄主功能基因的表达调控, 但不同非生物和生物胁迫条件下内参基因有所不同^[8-10]. 因此, 本文选择了 6 个烟草看家基因和 8 个番茄看家基因, 使用 *geNorm^{Plus}* 软件^[2]分别对其在 TMV 和 PVX 侵染下的云烟 97 和番茄中表达量的稳定性进行了评估^[7]. 确定表达最为稳定的云烟和番茄看家基因, 作为进一步研究这 2 种植物中功能基因定量表达研究的内参基因, 为进一步的病毒与寄主基因互作生物学效应研究奠定基础.

① 收稿日期: 2014-12-18

基金项目: 国家自然科学基金(30900937); 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB1122); 中央高校基本科研业务费(XNJI2009B023, 2362014xk08).

作者简介: 张 宁(1989-), 女, 新疆克拉玛依人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究.

通信作者: 孙现超, 研究员, 硕士研究生导师.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 供试毒源

TMV,PVX 纯毒源由保存在质粒上的病毒全长侵染性克隆农杆菌介导接种烟草获得,并通过-RT-PCR 和 ELISA 方法鉴定毒源,确认为 TMV,PVX 纯毒源后接种在云烟 97 和番茄上繁殖保存.

1.1.2 植物材料

云烟 97 由重庆市烟草科学研究所提供,番茄种子均由西南大学植物保护学院植物病毒实验室提供,并在人工气候室内培养至 4~6 叶期,备用.

1.2 烟草和番茄病毒胁迫处理

培养至 4~6 叶期的烟草和番茄,分别用汁液摩擦接种方法单独接种 TMV 和 PVX,接种 7 d 后用 ELISA 检测确定接毒是否成功.

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

按照试剂盒 Trizol reagent(TaKaRa, Japan)的说明书步骤分别提取病毒胁迫处理的云烟 97 和番茄的总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,测定 RNA 的浓度和纯度(NanoDrop RND-2000, US).用 Prime ScriptTM RT reagent Kit(TaKaRa, Japan)试剂盒提供的方法将总 RNA 反转录成 cDNA.

1.4 引物设计

使用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供的 Primer-BLAST 工具分别设计了 6 个云烟的看家基因:肌动蛋白基因(*ACT*)、微管蛋白基因(*tub*)、多聚泛素酶基因(*UBQ*)、亲还蛋白基因(*CYP*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)、 β 微管蛋白基因(β -*tub*); 8 个番茄的看家基因:18S 核糖体 RNA (18S)、尿甘酸激酶基因(*UK*)、肌动蛋白基因(*ACT*)、微管蛋白基因(*TUB*)、泛素连接酶基因(*UBI*)、亲还蛋白基因(*CYP*)、转录延伸因子(*EFl- α*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)的 RT-qPCR 引物(表 1、表 2).

表 1 云烟看家基因 RT-qPCR 引物

基因名	上 游 引 物	下 游 引 物
<i>ACT</i>	GACATGAAGGAGGAGCTTGC	ATCATGGATGGCTGGAAGAG
<i>tub</i>	CAACCTCTGTGGTGGAACCT	GGAACAAGGTTGGTCTGGAA
<i>UBQ</i>	GCGGTGGTATGCAGATTTTC	CGACCATCTTCCAAGTCTT
<i>CYP</i>	TTCCTCTCCATGGCTAATGC	ATCCAGATCCAACAGCCTCA
<i>GAPDH</i>	TGCAGTGAACGACCCATTTA	TGGATTCCACAACGAAATCA
β - <i>tub</i>	ACTGAAGCCGAGAGCAACAT	AACAAGTCCACTTGGCAGAAA

表 2 番茄看家基因 RT-qPCR 引物

基因名	上 游 引 物	下 游 引 物
18S	GGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGA	GTTCTTGATTAATGAAAACATCCT
<i>UK</i>	TGGTAAGGGCACCCAATGTGCTAA	ATCATCGTCCCATTCTCGGAACCA
<i>ACT</i>	AGGCAGGATTTGCTGGTGATGATGCT	ATACGCATCCTTCTGTCCCATTCCGA
<i>TUB</i>	CCTGACAGCTTCTGCCATGT	CATCTTCAGCCCAGTTGGTG
<i>UBI</i>	TCGTAAGGAGTGCCCTAATGCTGA	CAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTAA
<i>CyP</i>	CTCTTCGCCGATACCACTCC	TCACACGGTGGAAGGTTGAG
<i>EFl-α</i>	ATTGGAATGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>GAPDH</i>	ACCACAAATTGCCTTGCTCCCTTG	ATCAACGGTCTTCTGAGTGGCTGT

1.5 实时荧光定量 PCR

利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 试剂盒(购自 TaKaRa, Japan)在定量 PCR 仪(ABI, American)上进行实时荧光定量 PCR. PCR 反应总体积为 20 μ L, 包含 10 μ L SYBR Green I, 上、下游引物(10 μ mol/L)各

1 μL 、cDNA 模板 1 μL 、无菌超纯水 7 μL . PCR 反应程序为设定程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 循环 40 次; 最后 60 $^{\circ}\text{C}$ 持续升温至 95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 30 s. 共有 3 次生物学重复. 每个基因的实时定量 PCR 扩增均以清水为对照, 以检验扩增的背景.

1.6 引物扩增效率及熔解曲线分析

将反转录后的云烟和番茄健康 cDNA 样品以 5 倍浓度梯度稀释(原用 cDNA 的 5¹, 5², 5³, 5⁴ 和 5⁵ 倍稀释液), 并以此为模板进行 qPCR 扩增后, 分别制作云烟 6 条内参基因及番茄 8 条内参基因的标准曲线. 引物的扩增效率(E)与标准曲线的斜率(slope)相关, 根据标准曲线的斜率, 由方程 $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100\%$ 计算出引物的扩增效率. 扩增效率在 95%~110% 的引物符合要求.

1.7 内参基因的选择

利用候选内参基因引物对所有样品进行扩增. 将 C_t 值导入到 Excel 表格中, 对于每个基因, 找出所有样品中 C_t 值最小的样品, 计算其他样品与该样品的 ΔC_t 值($\Delta C_t = \text{某样品中各看家基因 } C_t \text{ 值} - \text{该样品中最小的 } C_t \text{ 值}$), 定义该样品的表达量为 1, 则其他样品相当表达量为 $2^{-\Delta C_t}$. 使用 $geNorm^{Plus}$ 前先将各看家基因在不同样本中的 C_t 值按照 $2^{-\Delta C_t}$ 进行转换, 将转换后的数据载入 $geNorm^{Plus}$ 中进行稳定性评估, 结果输出为代表基因表达稳定性的平均值 M , M 值越小, 表达越稳定. 在此基础上, 利用软件计算 n ($2 \leq n \leq 7$) 个基因作为内参基因得出的标准化因子与 $n + 1$ 个基因作为内参基因得出的标准化因子的配对变异之 $V_{n/n+1}$, 当 $V_{n/n+1} < 0.15$ 时, n 个基因满足内参基因的要求; 如果 $V_{n/n+1} > 0.15$, 则表明 n 基因不足以满足内参基因的要求, 需要增加内参基因的数目.

2 结果与分析

2.1 引物扩增效率及扩增产物的溶解曲线分析

云烟和番茄看家基因引物的扩增效率、决定系数如表 3、表 4 所示. 根据定量实验的要求, 引物的扩增效率在 90%~110% 之间、决定系数在 0.900 以上可满足定量实验, 且扩增产物的溶解曲线只有明显的单一信号峰, 不存在非特异性扩增^[4]. 在所设计的 6 对云烟和 8 对番茄的看家基因引物中, 各有 4 对引物满足 qPCR 的要求, 分别是云烟 tub , CYP , $GAPDH$, $\beta\text{-tub}$; 番茄 18S, UK , ACT , $EFl-\alpha$.

表 3 云烟内参基因 RT-qPCR 引物的扩增效率

基因名称	决定系数 R^2	扩增效率/%	基因名称	决定系数 R^2	扩增效率/%
tub	0.928	100.5	$\beta\text{-tub}$	0.992	106.7
CYP	0.998	109.6	ACT	0.983	128.3
$GAPDH$	0.979	105.5	UBQ	0.962	130.7

表 4 番茄内参基因 RT-qPCR 引物的扩增效率

基因名称	决定系数 R^2	扩增效率/%	基因名称	决定系数 R^2	扩增效率/%
18S	0.996	105.5	TUB	0.982	117
UK	0.988	109.7	UBI	0.995	134.3
ACT	0.996	108.8	CYP	0.986	137
$EFl-\alpha$	0.991	110	$GAPDH$	0.984	114

2.2 $geNorm^{Plus}$ 对云烟内看家基因稳定性的评估结果

为了筛选合适的看家基因, 分别用选出的各 4 对引物在所有接毒 TMV 及 PVX 后的云烟和番茄样本中进行评估, 选出表达稳定性最好的. 根据 $geNorm^{Plus}$ 软件的评价方法得出云烟接毒 TMV 后 4 个看家基因的稳定性从大到小依次为 CYP 、 $\beta\text{-tub}$ 、 tub 、 $GAPDH$, 其中 CYP 和 $\beta\text{-tub}$ 的 M 值并没有明显差异(图 1a). 对于 qPCR 研究中可能使用到的多内参基因情况, 可判断合适内参个数的参数值(pairwise variation value), 利用 $geNorm^{Plus}$ 程序对内参基因的配对差异值 $V_{n/n+1}$ 进行分析, P 值如图 1b 所示. 同样, 云烟接毒 PVX 后 4 个看家基因的稳定性从大到小依次为 CYP 、 $GAPDH$ 、 $\beta\text{-tub}$ 、 tub (图 1c), P 值如图 1d 所示. 综合软件分析结果, 在侵染 2 种病毒后的云烟 4 个内参基因中表达最稳定的为 CYP .

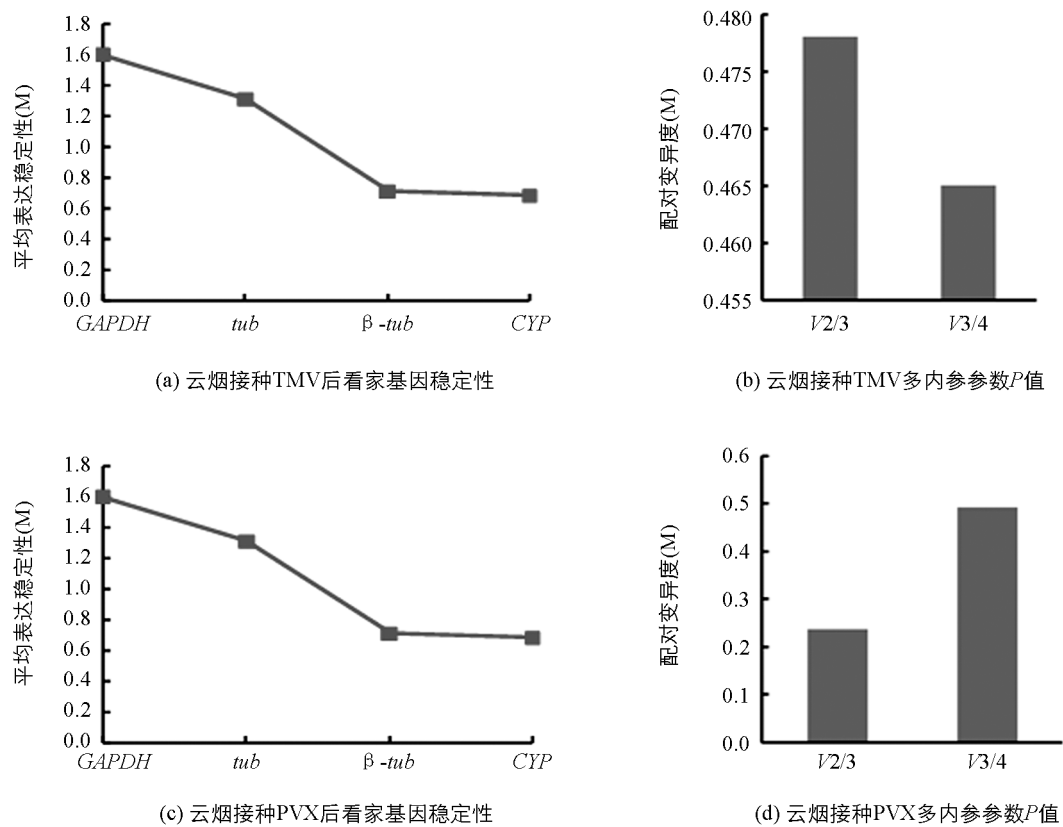


图 1 接种 TMV 和 PVX 后云烟内看家基因的稳定性评估

2.2 *geNorm^{Plus}* 对番茄内看家基因稳定性的评估结果

用上述相同的方法分析发现,在番茄接种 TMV 后,4 个看家基因的稳定性从大到小依次为 *ACT*、*EFl-α*、*UK*、*GAPDH*(图 2a), *P* 值如图 2b 所示. 与 TMV 的评估结果相似,番茄接种 PVX 后,4 个看家基因的稳定性从大到小依次为 *ACT*、*EFl-α*、*GAPDH*、*UK*(图 2c), *P* 值如图 2d 所示. 综合 2 种病毒侵染定量分析结果,选定番茄的内参基因为 *ACT*.

3 讨 论

实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)具有特异性强、灵敏度高、重复性好及高通量等特点,克服了普通 PCR 不能准确定量的不足,能够准确分析基因在不同时期的表达差异性 & 经过不同处理样本间的表达差异,已成为分子生物学中研究基因表达的主要方法^[11-13]. 利用 RT-qPCR 分析基因相对定量表达时,为了消除不同组织细胞间初始模板量、RNA 质量、酶促反应效率等偏差,需要选择合适的内参基因进行校正和标准化,内参基因(又名看家基因)是一类在不同实验条件、不同组织和细胞中均可维持稳定表达水平的一类基因^[3, 14]. 目前普遍采用的看家基因作为实时荧光定量 PCR 的内参基因,如 β-肌动蛋白基因(*β-actin*)、18S 核糖体 RNA 基因(18S *rRNA*)、α 微管蛋白基因(*α-tubulin*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)和多聚泛素酶基因(*ubiquitin*)等. 然而研究发现,随着实验条件的变化,没有任何一种内参基因在不同的植物组织及器官中的表达是始终稳定的,所以迄今为止并未找到适合所有条件下的理想内参基因^[15]. 在这样的背景下,进行任何 RT-qPCR 试验前必须先进行内参基因的筛选,根据特定的实验材料、实验条件选择合适的内参基因.

本研究选取了 6 个云烟及 8 个番茄常用的看家基因,利用 *geNorm^{Plus}* 软件分别评估了这 2 种植物在 TMV 和 PVX 侵染下,几个内参基因在叶片中表达量的稳定性,并为后续检测功能基因表达量的变化提供了理论依据. 分析结果表明,云烟侵染 TMV 后经过筛选,其中 *CYP* 和 *β-tub* 是表达量比较稳定的 2 个基因,而云烟侵染 PVX 后表达量比较稳定的是 *CYP* 和 *GAPDH* 基因. 由此说明,在这 2 种病毒侵染下,表达量均较为稳定的是 *CYP* 基因,可以作为后续定量实验中内参基因的理想选择. 但是由于在不同的组织

中, 看家基因的表达量也存在一定的变化, 所以本实验只证明了云烟叶片中表达稳定的内参基因是 *CYP* 基因, 这也说明了没有一个看家基因可以在所有的实验条件下持续稳定地表达。

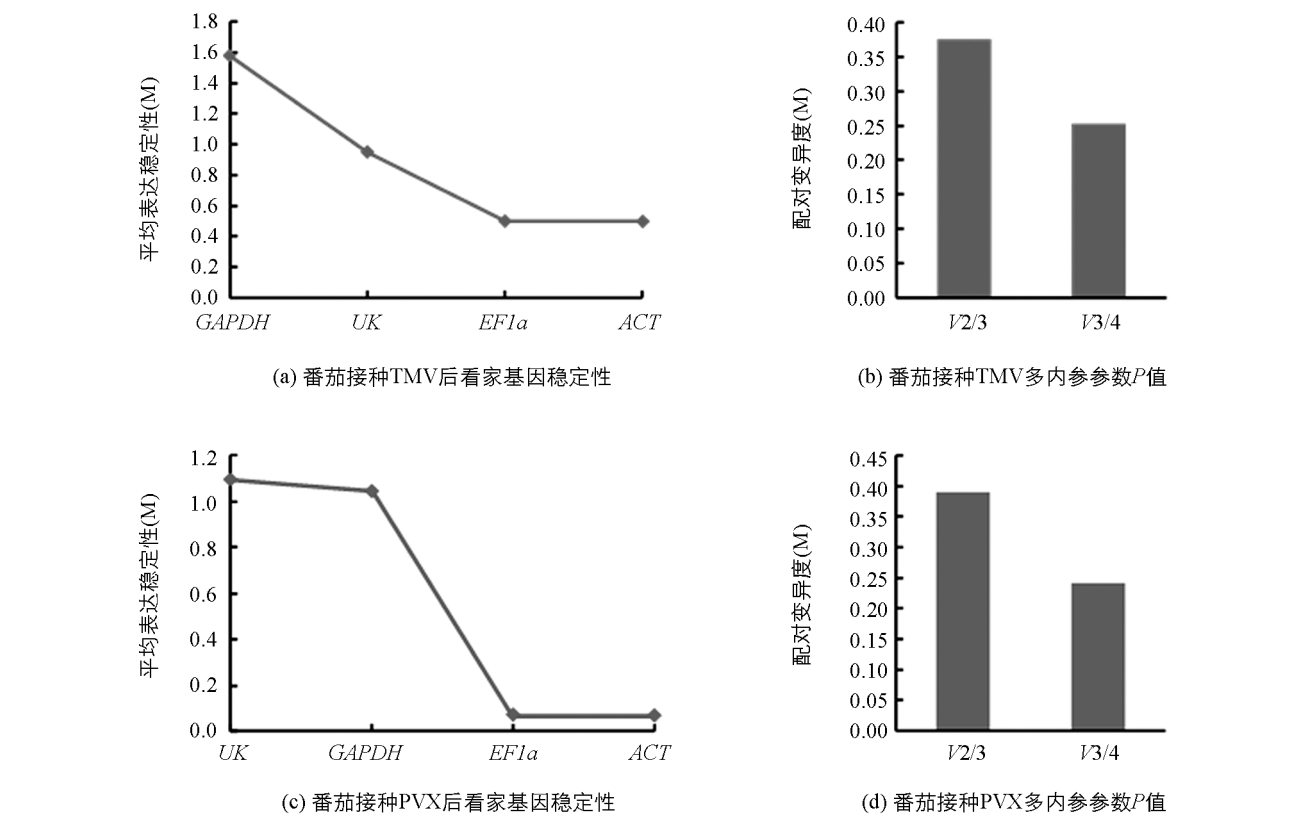


图 2 接种 TMV 和 PVX 后番茄内看家基因的稳定性评估

同样, 在番茄中也选取了常见的看家基因, 比如 *EFl-α* 作为一个重要的内参基因, 它的主要功能是将氨酰 tRNA 带到核糖体, 促进蛋白质合成中肽链的延伸, 因此又被称为延伸因子^[16-17]. 还有一个重要的内参基因就是肌动蛋白 *actin* (*ACT*), 作为细胞的必要组成成分之一^[18], 并且在大量的定量表达研究中被选作内参基因. 分析结果表明, 不管是在 TMV 还是 PVX 侵染下, 番茄叶片中表达量相对稳定的都是 *ACT* 和 *EFl-α*, 由于 *ACT* 基因的表达在压力环境下具有更高的稳定性, 所以本研究选取了 *ACT* 为番茄 qPCR 实验中的看家基因。

参考文献:

[1] 欧阳松应, 杨 冬, 欧阳红生, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用 [J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 74—76.

[2] VANDESOMPELE J, DE P K, PATTYN F, et al. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes [J]. Genome Biology, 2002, 3(7): research0034.

[3] BUSTIN S A. Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2002, 29(1): 23—39.

[4] 袁 伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学通报, 2012, 47(4): 427—436.

[5] DIE J V, ROMAN B, NADAL S, et al. Evaluation of Candidate Reference Genes for Expression Studies in Pisum Sativum Under Different Experimental Conditions [J]. Planta, 2010, 232(1): 145—153.

[6] COKER J S, DAVIES E. Selection of Candidate Housekeeping Controls in Tomato Plants Using EST Data [J]. Bio Techniques, 2003, 35(4): 740—742, 744—749.

[7] SEO S, OKAMOTO M, IWAI T, et al. Reduced Levels of Chloroplast FtsH Protein in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco Leaves Accelerate the Hypersensitive Reaction [J]. The Plant Cell Online, 2000, 12(6): 917—932.

[8] 刘 祥, 赵志新, 王 斐, 等. 蜡梅水通道蛋白基因 CpAQP1 转录水平变化及其启动子克隆 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(2): 48—55.

- [9] SCHOLTZ J J, VISSER B. Reference Gene Selection for qPCR Gene Expression Analysis of Rust-Infected Wheat [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2013, 81(4): 22–25.
- [10] JAROSOVA J, KUNDU J K. Validation of Reference Genes as Internal Control for Studying Viral Infections in Cereals by Quantitative Real-Time RT-PCR [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(10): 146–154.
- [11] 陈 旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. *东北农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 41(8): 148–155.
- [12] 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.
- [13] SUZUKI T, HIGGINS P J, CRAWFORD D R. Control Selection for RNA Quantitation [J]. *Bio Techniques*, 2000, 29(2): 332–337.
- [14] THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, et al. Housekeeping Genes as Internal Standards: Use and Limits [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 75(2/3): 291–295.
- [15] 覃迎姿, 黄先益, 叶兴枝, 等. 植物延伸因子 eEF1A 研究进展 [J]. *广西农业科学*, 2009, 40(5): 472–477.
- [16] 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.
- [17] 于 森. 海带(*Saccharina japonica*)内参基因筛选及部分管家基因的系统进化分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [18] 梁 云, 袁素霞, 冯慧颖, 等. 百合肌动蛋白基因 lilyActin 的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(7): 1318–1326.

Selection of Reference Genes in Tobacco and Tomato Stressed by TMV or PVX

ZHANG Ning, WEI Zhou-ling, DU Li-juan,
QING Ling, SUN Xian-chao

*Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology, School of Plant Protection,
Southwest University, Chongqing 400716, China*

Abstract: It is the base to select proper reference genes for getting valid data to analyze gene expression by quantitative real-time PCR(RT-qPCR). In order to get proper reference genes of tobacco and tomato infected by TMV or PVX for studying the interaction between the viruses and their hosts, we designed the primer pairs of the housekeeping genes of tobacco and tomato based on the previous studies, and evaluated their expression stability in TMV or PVX infected tobacco and tomato with *geNorm*^{Plus} software. The results showed that the primer pairs of *tub*, *CYP*, *GAPDH* and β -*tub* in tobacco and the primer pairs of 18S, *UK*, *ACT* and *EFl- α* in tomato matched the request of RT-qPCR. *CYP* was the most stable housekeeping gene in tobacco infected by TMV or PVX, and *ACT* was the most stable housekeeping gene in tomato. So, these two genes were determined to be the reference genes normalization of qRT-PCR data in tobacco or tomato in virus- host interaction system, which provides a base for studying the biological effect of the interaction between TMV or PVX and its hosts.

Key words: *Tobacco mosaic virus*; *Potato virus X*; host; quantitative real time PCR; reference gene

