

无花果 RNA 的提取和半定量 RT-PCR 内参基因的优选

刘俊清¹ 陈立勇¹ 陈尚武² 张文¹ 马会勤^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 本试验以无花果的根、茎、叶、果作为材料, 比较了 CTAB 法和 Trizol 法对无花果材料 RNA 的提取效果。以 CTAB 法提取的不同无花果材料的 RNA 为模板, 反转成 cDNA 第一链, 通过半定量 RT-PCR, 研究了植物常用内参基因 *18S rRNA*、*Actin* 和 *Tubulin* 的表达量变化。结果表明: CTAB 法是适合不同无花果材料的 RNA 提取法; *18S rRNA* 在无花果不同组织中的表达水平较高, 且相对稳定, *Tubulin* 在无花果不同组织中相对表达量较低, 且相对稳定, 是研究无花果不同组织基因表达水平较为适宜的内参基因。

关键词 无花果; RNA 提取; 内参基因; 半定量 RT-PCR

中图分类号 S 663.3

文章编号 1007-4333(2012)05-0054-05

文献标志码 A

RNA isolation and internal reference gene selection for semi-quantitative RT-PCR of fig (*Ficus carica*)

LIU Jun-qing¹, CHEN Li-yong¹, CHEN Shang-wu², ZHANG Wen¹, MA Hui-qin^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Fig is an ancient fruit tree species with important economic value. Along with the development of fruit tree molecule biology, there are more and more such studies on figs, and one important area is the expression level of functional genes. RNA isolation and internal reference gene selection for semi-quantitative RT-PCR are key steps in gene expression studies. In this paper, fig root, stem, young leaf and young fruit were sampled. RNA isolation methods, i. e. Trizol and CTAB, were compared for their RNA extraction results. RNA quality results indicated that CTAB method had better performance in fig RNA isolation. Using fig RNA extracted with CTAB method from different tissues, after reversing transcription and the gain of the first strand cDNA, we studied the expression of three house-keeping genes to evaluate their feasibility as internal reference for semi-quantitative RT-PCR. Among of these three genes, *18S rRNA* showed rather high and stable expression level in four different tissues, while *Tubulin* revealed relatively low but stable expressions. The expression of *Actin* demonstrated differentiated expression in four different organs. Thus, *18S rRNA* and *Tubulin* were suggested as internal references. This study lays the ground for future study of gene expression in fig by semi-quantitative RT-PCR.

Key words fig; RNA extraction; internal reference gene; semi-quantitative RT-PCR

无花果 (*Ficus carica* L.) 为桑科无花果属植物, 原产于约旦和沙特阿拉伯一带, 为落叶灌木或乔木, 是世界上最古老、也是人类最早栽培的果树^[1]。

无花果传入我国大约是在汉代(公元前 3 世纪), 最早在新疆各地栽培, 到唐代(公元 7 世纪)才由新疆经丝绸之路传入甘肃和陕西等地, 以后逐渐传入中

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171939)

第一作者: 刘俊清, 硕士研究生, E-mail: liujunqing006@gmail.com

通讯作者: 马会勤, 教授, 主要从事葡萄与无花果研究, E-mail: hqma@cau.edu.cn

原。到宋代(公元 10 世纪)岭南诸地也有栽培,元和明时期(公元 14 世纪),无花果栽培渐盛^[2]。目前我国的无花果产区主要分布在新疆、江苏、山东、福建、四川、广东、广西、河北和河南等地,全国无花果种植面积在 2003 年就已达到 3 500 多 hm^2 ^[3]。近年来随着无花果作为具有诸多保健功能的“超级水果”被人们所认识,在城市周边地区无花果规模化商业的栽培出现了明显的进展。

生产的发展对果树的研究提出了新的需要,应用分子生物学手段解析果树的栽培、育苗、果实发育和采后中的关键问题已经成为必然的趋势。与其他果树相比,无花果的分子生物学研究还比较落后。基因表达分析在发现和预测新基因及其功能、了解基因表达调控等研究中起着十分关键的作用。高质量和高效率的 RNA 提取是基因表达分析的基础,而通过半定量 RT-PCR 手段,可以对特定基因的表达水平进行研究,具有灵敏度高、专一性好、快速简便、所需样品量少及所需花费较低等优点,许多涉及重要领域的研究也通过半定量 RT-PCR 的方法,对基因的表达特点进行过探索^[4]。而可靠的半定量 RT-PCR 实验结果,需要内参基因的参比与支持,以消除不同样品的 RNA 及逆转录效率上可能存在的不确定因素。

研究植物基因表达常用的内参基因主要有 18S *rRNA*、28S *rRNA*、*Actin*、*Tubulin* 和 *GAPDH* 等^[5],理想的内参基因应在不同类型的组织或细胞中、不同的试验处理下均恒定表达。为了更好地开展对无花果基因表达的研究,通过探索无花果不同材料 RNA 的提取方法,对 3 个常用的内参基因 18S *rRNA*、*Actin* 和 *Tubulin* 在无花果不同组织器官中的表达以及同一组织器官在不同发育期中的表达差异进行分析,以期为以后的无花果功能基因表达研究提供理论依据及参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试无花果品种为布兰瑞克(*Ficus carica* L. cv. Branswick),取自中国农业大学西校区科学园,分别收取根、嫩茎、幼叶和幼果,马上放入液氮中进行冷冻,然后将材料放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中贮藏备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

分别采用 Trizol 法和 CTAB 法进行无花果材料总 RNA 的提取。

样品在液氮中研磨成粉末后,混匀,取 50~100 mg 样品于离心管中,Trizol 法按照 Trizol 说明书进行。CTAB 法参照 Reid 等的程序^[6]。获得的 RNA 在离心管中室温晾干后,加 RNase-free water 溶解,琼脂糖凝胶电泳检测质量,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.2.2 RNA 的纯化、反转录以及 cDNA 第一链的合成

使用 RNase-Free 的 DNase 分别对提取的总 RNA 进行纯化处理,并用微量紫外分光光度计(ND 21000,美国)测定纯度及定量($\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 、 $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{230\text{ nm}}$),经纯化的总 RNA 保存与 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。反转录参照购自 Promega 公司的 cDNA 第一链合成试剂盒说明书,分别对根、茎、幼叶和幼果的 RNA 进行反转录,合成各自的 cDNA 第一链文库, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 半定量 RT-PCR 与基因表达分析

根据以色列农业科学院 Moshe Flaishman 教授提供的无花果 18S *rRNA*、*Actin* 和 *Tubulin* 基因的完整序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计半定量 RT-PCR 引物,引物由上海英俊生物公司合成。

将反转录得到的 cDNA 第一链稀释到一定的浓度梯度,选择能够使 PCR 条带清晰可见的浓度为半定量 PCR 的模板,同时根据所设引物的各项参数摸索适宜的退火温度,保持其他条件不变,改变循环数,确定合适的半定量循环数。

PCR 反应体系($25\text{ }\mu\text{L}$)为: $2.5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ PCR buffer, $2.5\text{ }\mu\text{L}$ primer-B($2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$), $2.5\text{ }\mu\text{L}$ primer-F($2.5\text{ }\mu\text{mol/L}$), $2\text{ }\mu\text{L}$ dNTP(2.5 mmol/L), $0.25\text{ }\mu\text{L}$ *Taq* 酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$), $1\text{ }\mu\text{L}$ 模板 cDNA ($213\text{ ng}/\mu\text{L}$), $14.25\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O。其中, $10\times$ PCR buffer、dNTP、*Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s,退火时间 50 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30~50 s;循环数; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,停止反应。根据引物的最适退火温度,设定不同的循环数,进行 PCR(东胜 PCR 仪,北京)。

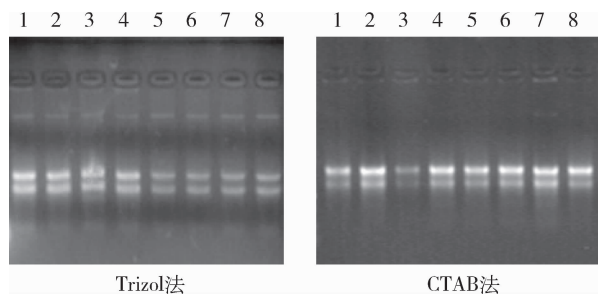
条带亮度定量:取 $5\text{ }\mu\text{L}$ PCR 产物,1%琼脂糖凝胶电泳检测,使用培清 JS 2680c 全自动凝胶成像

分析仪(上海培清科技有限公司,上海)照相,并使用仪器自带软件进行数据的具体分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

将分别采用 Trizol 法、CTAB 法提取的无花果的根、茎、幼叶和幼果的总 RNA 各取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。从琼脂糖凝胶电泳图可以看出 2 种方法所提 RNA 中均含少量 DNA 杂质, Trizol 法所提 RNA 的 28S 与 18S 亮度几乎一致且条带模糊;而 CTAB 法所提 RNA 中 28S 与 18S 条带清晰,亮度比例合适,5S 条带相对较弱,说明 RNA 降解少(图 1)。



泳道 1、2 为根,3、4 为茎,5、6 为幼叶,7、8 为幼果。

图 1 Trizol 法和 CTAB 法提取无花果总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Total RNA isolation efficiency of fig tissues by Trizol and CTAB methods

纯度高和完整性好的 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰明亮,28S 条带荧光亮度是 18S 条带的 1.5~2.0 倍,且 RNA $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 的应介于 1.8~2.0 之间, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 比值在 2.0 左右^[7]。分别对提取的总 RNA 用 DNase I 进行纯化处理后,琼脂糖凝胶电泳如图 2,测得的 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 、 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 值如表 1 所示。其中,采用 Trizol 法提取的总 RNA 经纯化后, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 、 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 值均小于 1.8,说明有降解且含有较多杂质;而采用 CTAB 法提取的 RNA 经纯化后, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 值都在 1.8~2.0 之间,所有样品 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 值都在 2.0 左右,说明 RNA 纯度较高、完整性较好,可用于后续试验。以上结果表明,CTAB 法是提取无花果 RNA 的合适方法。

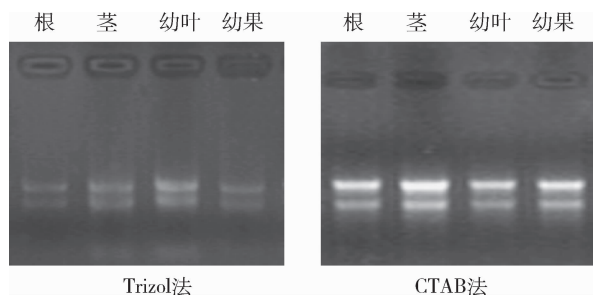


图 2 Trizol 法和 CTAB 法提取的纯化后的无花果总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Total RNA isolation efficiency of fig tissues by Trizol and CTAB methods after purification

表 1 Trizol 法和 CTAB 法提取的无花果总 RNA 纯度的比较

Table 1 Comparison of purity of total RNA isolated by Trizol and CTAB methods

RNA 样品	Trizol 法				CTAB 法			
	根	茎	幼叶	幼果	根	茎	幼叶	幼果
$OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$	1.787	1.504	1.670	1.683	1.912	1.837	1.886	1.861
$OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$	1.421	1.097	1.726	1.765	2.036	1.972	1.954	2.140
质量浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)	121.5	98.9	143.2	109.3	278.2	204.8	349.3	262.1

将采用 CTAB 法提取纯化后的幼果、幼叶、茎和根的总 RNA 分别作为模板合成各自的 cDNA 第一链,构建文库。

2.2 半定量 RT-PCR 引物的设计

与一些重要的果树树种不同,无花果的全基因组测序目前还没有完成,也缺乏转录组的信息。根据 Flaishman 教授提供的无花果 18S rRNA、Actin

和 Tubulin 全基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件,设计了半定量 RT-PCR 引物序列(表 2)。

2.3 3 个内参基因在无花果幼叶中的表达水平和 PCR 循环数的优化

不同的内参基因在同一植物组织中的表达丰度不同。为了探索不同内参基因表达量的差异,优化针对不同功能基因表达水平研究的内参基因的选

表 2 半定量 RT-PCR 中使用的引物

Table 2 Primers used in semi-quantitative RT-PCR

基因	正向引物	反向引物
<i>18S rRNA</i>	5'TCAAGGAAAGACAACGAGACGAT3'	5'GGATTCTGCAATTCACACCAAG3'
<i>Actin</i>	5'GAACCACCAGACAGGACGATG3'	5'CTACCACTGCTGAACGGGAAA3'
<i>Tubulin</i>	5'ATCCTACAACCTACATCCATCTAACG3'	5'GTGGATACCCAACAATGTGAAGTCT3'

择,可以通过指数型扩增的 PCR 对内参基因的表达量进行分析。

以无花果幼叶 cDNA 第一链为材料,根据所设计引物的各项参数,确定 *18S rRNA*、*Actin*、*Tubulin* 的最适退火温度分别为 53.8、52.7 和 54.5 °C。设定循环数分别为 28、30、32、34、36、38 和 40,进行 PCR。

结果表明:模板浓度为 213 ng/μL,加样量为 1 μL 条件下,当循环数为 28 时 3 个基因均未出现明显可见的条带,循环数增至 30 个后,*18S rRNA*、*Actin* 出现明显可见条带,而 *Tubulin* 直至 34 个循环时才出现明显可见的条带;循环数增加到 34 个时,*18S rRNA*、*Actin* 亮度增加至饱和,循环数增加为 38 个时,*Tubulin* 亮度增加至饱和(图 3)。根据以上结果,确定 *18S rRNA* 和 *Actin* 的循环数设定为 30 个,*Tubulin* 的循环数设定为 34 个。

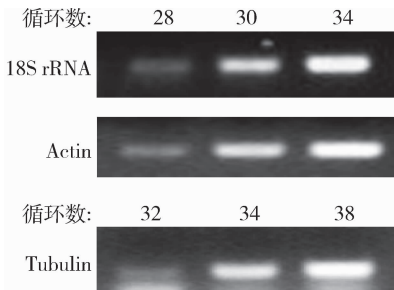


图 3 无花果幼叶中 3 个内参基因 PCR 不同循环数的扩增差异

Fig. 3 Amplification of three house-keeping genes in fig young leaves with different PCR cycles

2.4 3 个内参基因在无花果不同组织器官中的表达水平

同一内参基因在植物不同组织中的表达量可能存在差异^[8],因此,当探索基因在不同植物组织间表达规律时,须尽量保证所选内参基因不存在组织特异性表达。将无花果根、茎、幼叶和幼果 cDNA 第一链模板浓度调至相同,将 *18S rRNA*、*Actin* 设置为 30 个循环,*Tubulin* 设置为 34 个循环,分别进行 PCR,探索这 3 个内参基因在不同组织器官中的表

达差异,结果显示:*18S rRNA* 的表达水平均较高;*Actin* 在根和茎中的表达量高,在幼果中表达量低,而 *Tubulin* 整体上表达水平较低,但表达量较稳定(图 4(a))。凝胶照片经扫描分析软件进行 PCR 条带灰度定量分析,结果如图 4(b)。

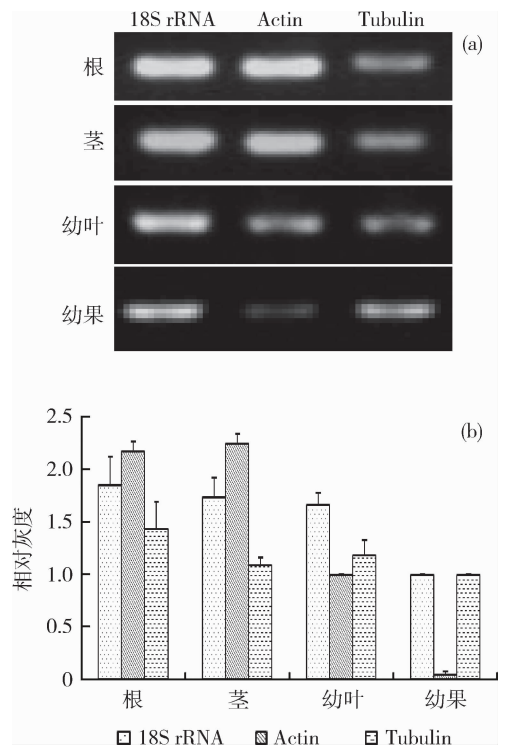


图 4 3 个内参基因在无花果不同组织器官中的表达量比较

Fig. 4 Expression of three house-keeping genes in different tissues of fig

3 讨论

3.1 无花果材料的 RNA 提取

高质量的 RNA 是后续 cDNA 文库构建、定量与半定量 RT-PCR、Northern 杂交等分子生物学研究的重要基础^[9]。本试验选取了常用的 Trizol 法与 CTAB 法,来探索更适用于无花果不同组织 RNA 的提取方法,其中 Trizol 法具有简便省时的特点^[10],被广泛应用于各种模式植物 RNA 的提取,

CTAB法虽然用时较长,但是非常适合于含有多酚及多糖类物质的植物材料的RNA提取,被成功应用于葡萄等果树材料上^[11]。试验结果表明:Trizol法提取的无花果总RNA含有较明显的DNA条带,亮度及比例均较差,且 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 、 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ 值均较小,说明有多酚及多糖类物质的污染,而CTAB法提取的不同无花果组织材料的RNA各种质量指标均符合要求,质量较高,因此,CTAB法是更适合于无花果组织材料RNA的提取方法。

3.2 研究无花果基因表达水平可选用的内参基因

常用的内参基因往往与植物的基本生命活动密切相关,其表达产物多是细胞生命活动必不可少的组分,环境因素通常不会显著影响内参基因的表达。理想的内参基因应具有:在不同的组织器官和发育阶段中表达稳定、在生物或非生物胁迫下表达稳定、表达水平与目标基因相近等特征。实际上,完全理想的内参基因几乎是不存在的^[12],随着基因表达研究的迅速发展,对不同组织器官以及不同处理条件下,定量和半定量PCR实验研究中内参基因的选择也有了更高的要求。目前,植物研究中常用的内参基因主要有:*18S rRNA*、*Actin*、*Tubulin*、*GAPDH*、*EF12A*和*UBQ*等。

大量研究结果表明,不同植物最合适的内参对照基因并不一定相同^[13],同一种植物不同组织器官之间有些内参基因表达很稳定^[14],而有些内参基因的表达却可能存在差异^[15]。因此,针对特定的试验条件和植物种类选择合适的内参基因,对于得到准确的基因表达结果是至关重要的。试验结果表明,无花果的根、茎、幼叶和幼果中*18S rRNA*的表达水平较高,且稳定,*Tubulin*相对表达量较低,且相对稳定,*Actin*表达量虽然也较高,但不稳定。因此,*18S rRNA*和*Tubulin*是研究无花果基因在不同组织中表达水平时优选的内参基因。近年来的研究结果^[16]认为,单个内参基因用来作归一化可能导致相对误差变大,而采用2~3个内参基因作为标准可以更好地减少归一化时的误差。通过多个内参基因的应用,可能会更准确反应基因表达水平变化,为无花果各基因作用机理的研究提供有力支持。

致谢:感谢以色列农科院Moshe Flaishman教授提供的无花果*18S rRNA*、*Actin*和*Tubulin*的全序列信息。感谢北京市园林绿化局无花果引种与优质栽培项目资助。

参 考 文 献

- [1] Kislew M E, Hartmann A, Bar-Yosef O. Early domesticated fig in the Jordan Valley[J]. *Science*, 2006, 312:1372-1374
- [2] 曹尚银. 无花果无公害高效栽培[M]. 北京:金盾出版社, 2003: 20
- [3] 曹尚银, 杨福兰. 石榴无花果良种引种指导[M]. 北京:金盾出版社, 2003:132
- [4] Morris D L, Davila J C. Analysis of rat cytochrome P450 isoenzyme expression using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1996, 52:781-792
- [5] Jain M, Nijhawan A, Tyagi A 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] Reid K E, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical de-termination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6(27):1211
- [7] 尹慧, 陈莉, 李晓艳, 等. 百合叶片总RNA提取方法比较及优化[J]. *中国农业大学学报*, 2008, 13(4):4-45
- [8] Liu D W, Chen S T, Liu H P. Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer[J]. *Eur Respir*, 2005, 26(6):1002-1008
- [9] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7):1736-1737
- [10] Kirkland P A, Busby J, Stevens S, et al. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 351(2):254-259
- [11] 赵晓, 马会勤, 陈尚武, 等. 葡萄果实发育后期半定量RT-PCR内参基因的优选[J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(3):7-14
- [12] Lee P D, Sladek R, Greenwood C M T, et al. Control genes and variability: Absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies[J]. *Genome Res*, 2002, 12:292-297
- [13] Jian B, Liu B, Bi Y R, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9:59
- [14] Iskandar H M, Simpson R S, Casu R E, et al. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 22(4):325-337
- [15] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 75:291-295
- [16] Vandesompele J, Preter K D, 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