

# 实时荧光定量 PCR 中内参基因的选择

赵文静 徐洁 包秋华 陈永福 张和平\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:** 实时荧光定量 PCR 技术是分析基因表达谱的一种常用方法, 在分析中选择合适的内参基因对数据进行校正是得到可信数据的关键。以 *Lactobacillus helveticus* H9 为研究对象, 应用实时荧光定量 PCR 技术, 评价了 5 种常用内参基因 *ldh*、*recA*、*rpoB*、*gapdh* 和 16S rRNA 的表达稳定性, 通过 geNorm 和 NormFinder 程序进行数据分析, 结果表明 5 个候选内参基因在菌株不同的发酵时间点表达相对都较为稳定, 结合两种分析得到其中最为稳定的基因是 *ldh*, 适合于用作后续实时荧光定量 PCR 试验中的内参基因。

**关键词:** 实时荧光定量 PCR, 内参基因, GeNorm, NormFinder

## Selection of Reference Genes for Real-time Quantitative PCR

ZHAO Wen-Jing XU Jie BAO Qiu-Hua CHEN Yong-Fu ZHANG He-Ping\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** Real-time quantitative PCR is a commonly used method to analyse the gene expression profile, it is important to select an appropriate reference gene for normalization of experimental data when using this method. In our study, we used two statistical methods to evaluate the gene expression stabilities of five reference genes (*ldh*, *recA*, *rpoB*, *gapdh* and 16S rRNA) under the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* H9. The results showed that the best reference gene was *ldh* which was the most stable gene would be used for normalization of real-time quantitative PCR experiments data.

**Keywords:** Real-time quantitative PCR, Reference genes, GeNorm, NormFinder

实时荧光定量 PCR 技术由美国 Applied Biosystems 公司在 1996 年发明, 该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 而且具有灵敏性高、特异性强、快速准确等特点<sup>[1-2]</sup>。实时荧光定量 PCR 是一种强有力的检测基因表达谱的方法, 可以分析基因在不同时期的表达差异以及经过不同处理的样本间基因的表达差异等等。在分析中选用一种合适的内参基因对目的基因的表达量进行校正可以提高该方法的

灵敏度和重复性<sup>[3]</sup>。理想的内参基因应在所研究的各种试验因素条件下均恒定表达。然而, 大量的研究表明任何一种内参基因在所有的试验条件下都不是恒定表达的, 在不同类型的细胞、在细胞生长的不同阶段, 内参基因的表达都是有变化的。因此, 在进行基因表达分析之前都应该进行内参基因的验证, 选定一种较为稳定的内参基因用于对目的基因表达量的校正, 以期获得比较真实可信的

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项项目(No. 2010CB134502); 教育部创新团队发展计划项目(No. IRT0967)

\* 通讯作者: Tel: 86-471-4319940; 信箱: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2010-06-24; 接受日期: 2010-09-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

结果。

乳酸菌是指可发酵糖类主要产生乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称<sup>[4]</sup>。乳酸菌作为发酵剂广泛地应用于乳品工业。ACE抑制肽是一类具有ACE抑制活性的肽类物质,这些肽可以与血管紧张素转化酶ACE结合,从而起到降血压的作用。近年来人们研究发现,在众多的乳酸菌中,瑞士乳杆菌具有较强的蛋白水解能力<sup>[5]</sup>,在发酵过程中可以通过自身的蛋白水解系统利用乳蛋白产生ACE抑制肽。

乳酸菌的蛋白水解系统主要包括3个部分<sup>[6]</sup>:细胞壁表面相关的蛋白水解酶将蛋白水解为寡肽,之后通过不同的肽转运系统转运到细胞内,在细胞内多种肽酶的作用下水解为更小的肽和氨基酸。为了探索乳酸菌蛋白水解系统中的酶与ACE抑制肽产生的相关性,我们试图用实时荧光定量PCR技术研究这些酶类的基因表达情况,而选择一个合适的内参基因对于目的基因数据的校正非常关键,本试验对*Lactobacillus helveticus* H9在发酵过程中5种候选内参基因的表达稳定性进行评价,通过geNorm和NormFinder 2种程序方法对数据进行分析,以筛选出一种合适的内参基因用于校正后续荧光定量PCR试验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

瑞士乳杆菌*Lactobacillus helveticus* H9分离自西藏酸牦牛奶中,由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室菌种库保藏。

### 1.2 活化与接种发酵

菌株接种于MRS培养基,37°C培养16–18 h,活化两代备用。活化好的菌株以 $5 \times 10^6$ 接种于11%的灭菌脱脂乳中发酵48 h,在发酵的不同时间点取样。

### 1.3 RNA提取及cDNA合成

菌株在不同生长时期所采的样品经过离心收集菌体,液氮速冻而后于-80°C保存。冻存的菌体沉淀经液氮研磨后,利用宝生物的RNAiso™ Plus试剂提取样品总RNA,而后用DNaseI处理2次以消除RNA样本中的DNA污染。RNA的浓度采用Nanodrop ND-1000测定,RNA的完整性通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

利用PrimeScript™ RT反转录试剂盒(TaKaRa Biotechnology, Japan)进行样品的反转录,得到的cDNA样本于-20°C保存,用于荧光定量PCR。反转录反应体系为:5 × PrimeScript™ Buffer 2 μL; PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL; Oligo dT Primer ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) 0.5 μL; Random 6 mers ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 0.5 μL; RNA模板 ( $3 \times 10^{-2}$  g/L) 6.5 μL, 总体积为10 μL。反转录条件如下:37°C 15 min, 85°C 5 s。

### 1.4 看家基因的选择与引物设计

选择5种不同功能的常用内参基因*recA*、*rpoB*、*ldh*、*gapdh*和16S rRNA<sup>[7–10]</sup>。依据NCBI中已测序的瑞士乳杆菌*Lactobacillus helveticus* DPC4571的基因组中相应基因序列,使用Primer 5软件设计引物,由上海桑尼生物科技有限公司合成,引物信息见表1。

表1 瑞士乳杆菌各候选内参基因的引物序列  
Table 1 The Primers of candidate reference genes of *Lactobacillus helveticus* H9

基因 Gene symbol	基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primers sequences	序列号 Accession Numbers
16S rRNA	16S ribosomal RNA	GCTCGTGTCTGAGATGTT, TGTAGCCCAGGTCATAAGG	lhv_3101
<i>recA</i>	Recombinase A	TAATGAGTCAGGCTTTGCG, GCACGACCACCTGGAGTAG	lhv_0713
<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CGTCTATTATGGATTAGG, GAGCTTGTGACTTAGCCTTG	lhv_0743
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	GCTATGGGIATCGGCTCTGA, CAACTGGTGCCAAGTCGTAA	lhv_0302
<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	TTGGTGACGCAATGGACT, AGTTTCGCCAGGCTTCT	lhv_0978

## 1.5 实时定量 PCR

采用 TaKaRa 公司的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒和 ABI 公司的 StepOne™ 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 试验。PCR 反应体系如下: 2 × SYBR Premix Ex Taq 10 μL; cDNA template 1 μL (0.1 g/L); 引物 ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 0.4 μL; 无酶水 8.2 μL。PCR 扩增条件如下: 95°C 30 s; 95°C 10 s, 59°C 30 s, 72°C 30s, 在延伸阶段检测荧光强度, 收集信号, 40 个循环; 72°C 10 s。熔解曲线: 加热样品从 70°C 到 95°C, 每隔 0.5°C 停留 1 s 检测 1 次荧光强度变化。

## 1.6 数据分析

根据标准曲线将荧光定量 PCR 所得到的 Ct 值转化为相对定量数据, 用 geNorm 程序分析基因的表达稳定性, 同时利用 NormFinder 程序选出最稳定的基因, 二者结合确定最合适的内参基因用于后续试验对目的基因的校正。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RNA 的质量评定

在基因表达分析中, RNA 的质量是很重要的因素。所提取的 RNA 经 Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计检测浓度和纯度, 所测样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 2.0 左右, 琼脂糖凝胶电泳显示出清晰的 23S 和 16S 亚基条带, 5S 亚基条带模糊, 说明 RNA 降解程度较小。所提取的完整的 RNA 用 DNase I 处理后, 通过 PCR 扩增检测, 结果显示 RNA 样品中的 DNA 污染基本消除, 可以用于后续的反转录及实时荧光定量 PCR。

### 2.2 引物扩增效率及特异性

本试验中通过梯度稀释 cDNA 样本作为模板进行 PCR 扩增后绘制每个内参基因的标准曲线, 得到引物的相关参数见表 2。从表中可以看到 5 个内参基因的线性相关系数( $R^2$ )变化范围为 0.993–1.000。同时根据  $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$  计算而得到的扩增效率为 96.8%–119.4%, 符合实时荧光定量 PCR 对扩增效率的要求。

为了验证 5 种内参基因的引物特异性, 扩增片段经 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果显示每种引物均扩增出预期大小的片段, 没有出现引物二聚体, 说明引物的特异性较好(图 1)。同时观测所研究 5 个内参基因的熔解曲线, 也都只出现单一的信号峰, 说明没有引物二聚体和非特异性条带产生(图 2)。

表 2 瑞士乳杆菌内参基因引物扩增参数  
Table 2 The parameters derived from real-time quantitative PCR analysis of the candidate reference genes of *L. helveticus* H9

基因 Gene symbol	扩增长度 Amplicon length (bp)	斜率 Slope	相关系数 Correlation ( $R^2$ )	扩增效率 PCR efficiency (%)
16S rRNA	159	-3.27	-0.995	102.2
<i>recA</i>	133	-3.02	-0.999	114.4
<i>gapdh</i>	286	-3.35	-1.000	98.8
<i>rpoB</i>	235	-2.93	-0.999	119.4
<i>ldh</i>	137	-3.40	-0.993	96.8

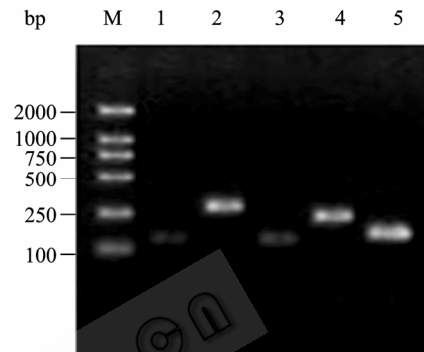


图 1 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

Note: M: Marker; 1: *ldh*; 2: *gapdh*; 3: *recA*; 4: *rpoB*; 5: 16S rRNA.

### 2.3 内参基因的稳定性评价

5 个候选内参基因的稳定性通过 geNorm<sup>[11]</sup> 程序分析。geNorm 程序通过计算基因的表达稳定值  $M$  对基因的表达稳定性进行排序, 并且通过标准化因子配对差异分析  $V_{n/n+1}$  来确定所需内参基因的最合适数目。基因的表达稳定值  $M$  值越小, 表明稳定性越高。由图 3 可以得到内参基因的表达稳定性排列顺序为 *ldh* (0.390) > *gapdh* (0.411) > 16S rRNA (0.415) > *recA* (0.567) > *rpoB* (0.603), 表明候选的 5 个看家基因的  $M$  值都小于程序所推荐值 1.5, 其中最稳定的基因是 *ldh*, 可以作为 real-time qPCR 分析中的内参基因。

在基因表达分析中, 有时使用单一的内参基因校正不符合试验的要求, 因此需要 2 个或 2 个以上的内参基因对目的基因进行校正以减少试验误差, 从而得到更加准确的结果。geNorm 程序分析了内参基因的配对差异值  $V_{n/n+1}$ , 结果显示所有的  $V_{n/n+1}$  值都小于程序所推荐值 0.15(图 4), 而且  $V_{2/3}$  值为 0.085, 说明无需加入第 3 个基因进行校正, 最合适的内参基因数目是 2 个, 分别是表达最为稳定的 *ldh* 和 *gapdh*。

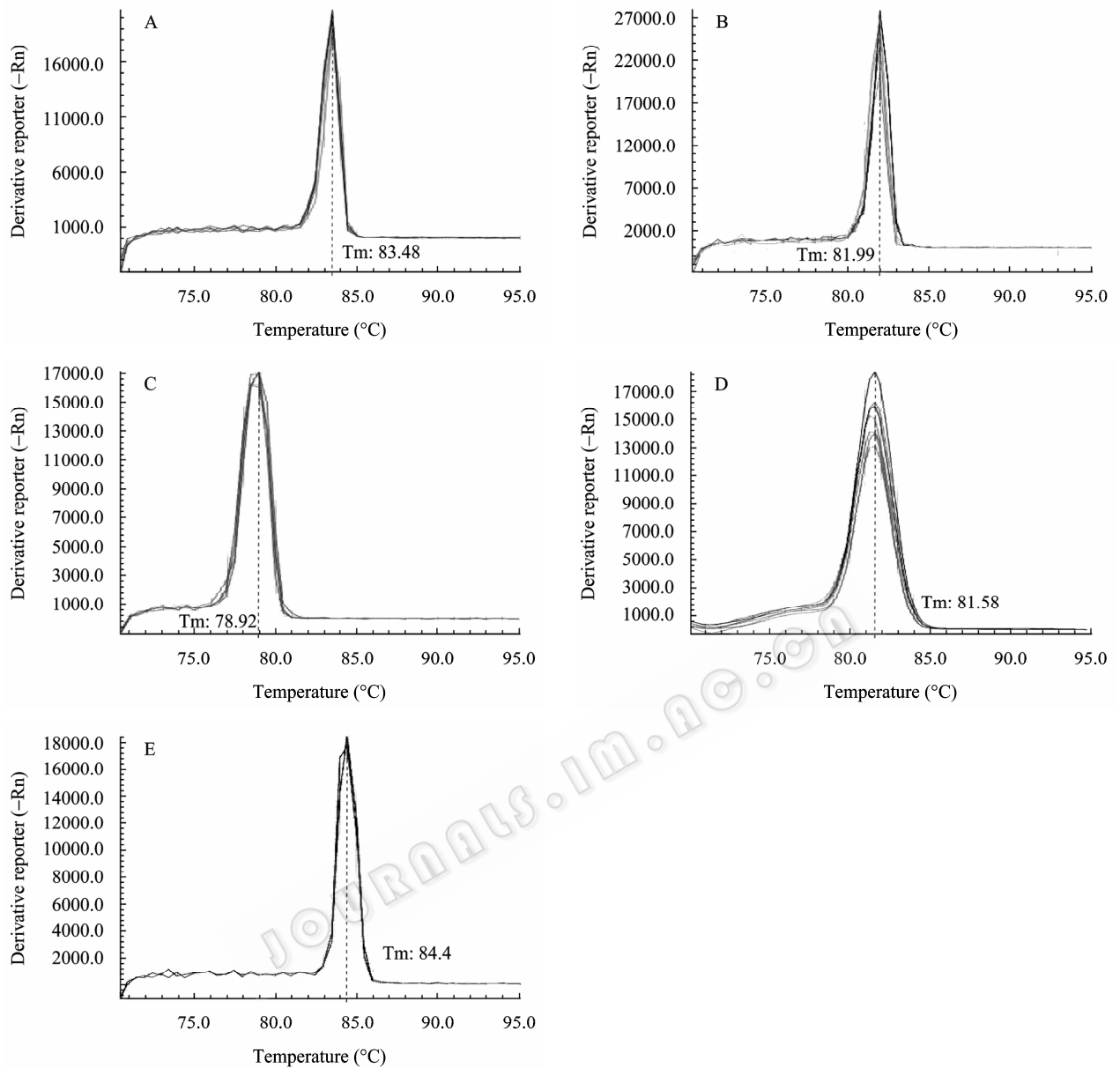


图2 各内参基因的溶解曲线

Fig. 2 Melting curves generated for five reference genes

Note: A: *ldh*; B: *gapdh*; C: *recA*; D: *rpoB*; E: 16S rRNA.

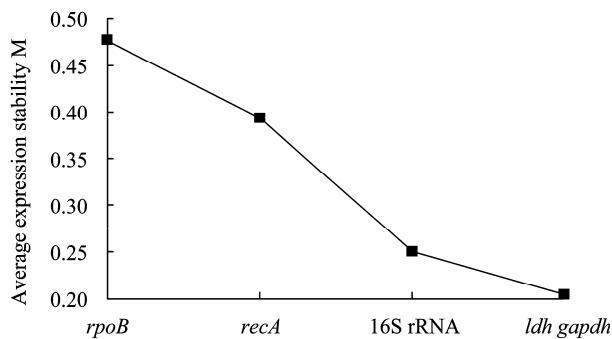
图3 geNorm 软件分析各内参基因的表达稳定值  $M$ 

Fig. 3 Expression stability values of the reference genes calculated by geNorm

本试验同时应用 NormFinder<sup>[12]</sup> 软件分析了 5 个候选看家基因的表达稳定性。NormFinder 程序是 2004 年 Andersen 发明的一种评价基因表达稳定性的方法, 与 geNorm 程序一样也是一种比较常用的方法。通过对荧光定量数据分析得出基因的表达稳定值, 根据稳定值的大小排序, 具有最小稳定值的基因是最为稳定的基因。通过 NormFinder 程序分析会得到每个基因的表达稳定值, 同时还提供当使用此基因校正时所引用的系统误差值。应用此程序分析得到本试验中 5 个候选内参基因的稳定性如表 3

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

所示, 其中最为稳定的基因是 *ldh*, 这个结果与通过 geNorm 程序分析所得到的结果一致, 说明 *ldh* 基因是在所研究试验条件下表达稳定的基因。

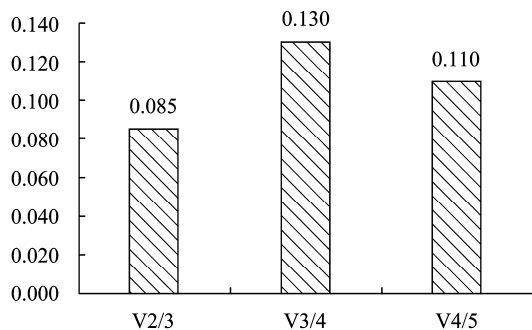


图 4 geNorm 软件分析确定用作校准的最适内参基因的数目

Fig. 4 Determination of the optimum number of reference genes for normalization by geNorm

表 3 NormFinder 软件分析各内参基因的表达稳定值  
Table 3 Expression stability values of the reference genes calculated by NormFinder

基因 Gene symbol	稳定值 Stability value	标准差 standard deviation
<i>rpoB</i>	0.365	0.125
<i>recA</i>	0.328	0.115
<i>ldh</i>	0.095	0.094
<i>gapdh</i>	0.178	0.087
16S rRNA	0.150	0.085

### 3 结论

实时荧光定量 PCR 是分析基因表达的一种有效方法, 而在基因相对表达研究中选择合适的内参基因做校正是很关键的。可用于评价内参基因稳定性的方法有好多种, 例如 qBasePlus<sup>[13]</sup>软件、REST<sup>[14]</sup>软件、BestKeeper<sup>[15]</sup>软件等。本试验选用 geNorm 和 NormFinder 两种程序对 *L. helveticus* H9 5 种候选内参基因在 6 个不同发酵时间点的表达稳定性进行评价, 选择一种合适的内参基因用于后续试验。由 geNorm 软件程序分析得到最稳定的基因是 *ldh*, 最合适的内参基因数目是 2 个, 为最稳定表达的 *ldh* 和 *gapdh*; 通过 NormFinder 软件程序分析得到最为稳定表达的是 *ldh*, 所以结合两种方法我们确定选用 *ldh* 作为内参基因用于校正实时荧光定量分析目的基因的表达量。

### 参考文献

[1] Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advan*

*Physiol Edu*, 2005, **29**(3): 151–159.

- [2] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 2004, **10**(3): 190–212.
- [3] Huggett J, Dheda K, Bustin S, *et al.* Real-time RT-PCR normalization; strategies and consideration. *Genes and Immunity*, 2005, **6**(4): 279–284.
- [4] 张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社, 2007: 193–194.
- [5] Kilpi EER, Kahala MM, Steele JL, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *International Dairy Journal*, 2007(17): 976–984.
- [6] Savijoli K, Ingmer H, Varmanen P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**(4): 394–406.
- [7] Savard P, Roy D. Determination of differentially expressed genes involved in arabinoxylan degradation by *Bifidobacterium longum* NCC2705 using real-time RT-PCR. *Probiotics and Antimicrobiol Proteins*, 2009, **1**(2): 121–129.
- [8] Marco ML, Kleerebezem M. Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. *J Appl Microbiol*, 2008, **104**(2): 587–594.
- [9] Marco ML, Bongers RS, Vos WMD, *et al.* Spatial and temporal expression of *Lactobacillus plantarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(1): 124–132.
- [10] Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, *et al.* Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. *BMC Mol Biol*, 2006(7): 32.
- [11] Vandesompele J, Preter DK, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002, **3**(7): research 0034.
- [12] Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 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. *Cancer Res*, 2004(64): 5245–5250.
- [13] Hellemans J, Mortier G, Paeppe DA, *et al.* qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 2007, **8**(2): R19.
- [14] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(9): e36.
- [15] Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(6): 509–515.