

# 红豆杉 *TbAP2* 基因荧光定量 PCR 体系的建立及优化

张恺恺<sup>1,2</sup>, 吕星<sup>2</sup>, 杨立莹<sup>2</sup>, 陈段芬<sup>2</sup>, 邱德有<sup>1</sup>, 杨艳芳<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** [目的] 建立稳定可靠的、适合检测红豆杉 (*Taxus L.*) *TbAP2* 基因表达量的荧光定量 PCR 实验体系。对于检测该物种中基因的组织特异性表达具有重要意义。 [方法] 以曼地亚红豆杉细胞为试材, 提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 根据 *TbAP2* 基因序列设计多对引物, 合成内参基因 *TBC41* 的引物, 采用正交试验  $L_9(3^4)$  方法分别筛选以上 2 个基因 5  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  小反应体系及 20  $\mu\text{L}$  常用体系中的最佳组合, 并通过 cDNA 模板用量和引物用量等方面进行优化, 以确保基因扩增效率在 90%~105% 之间。 [结果] 本研究建立了 *TBC41* 和 *TbAP2* 基因在 5、10、20  $\mu\text{L}$  体系下的荧光定量最佳 PCR 反应体系, 在优化后的 5  $\mu\text{L}$  体系下, 加入 Mix(2 $\times$ ) Universal 2.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1.0  $\mu\text{L}$ , 正反引物共 1.5  $\mu\text{L}$ , 内参基因 *TBC41* 和目的基因 *TbAP2* 的扩增效率均为 94%; 在优化后的 10  $\mu\text{L}$  下, 加入 Mix(2 $\times$ ) Universal 5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1.2  $\mu\text{L}$ , 正反引物共 1.3  $\mu\text{L}$ , *TBC41* 和 *TbAP2* 的扩增效率分别为 95% 和 94%。在优化后的 20  $\mu\text{L}$  下, 加入 Mix(2 $\times$ ) Universal 10  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 0.5  $\mu\text{L}$ , 正反引物共 1.5  $\mu\text{L}$ , *TBC41* 和 *TbAP2* 的扩增效率分别为 93% 和 99%, 以上各扩增体系回归系数  $R^2$  均大于 0.980。 [结论] 在以上 3 种反应体系下, 内参基因和目的基因均具有接近 100% 的扩增效率, 表明本研究成功建立了适合检测红豆杉 *TbAP2* 基因表达量的荧光定量 PCR 实验体系, 并为红豆杉其它基因的表达研究提供参考。

**关键词:** 红豆杉; AP2; 正交试验; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** S718.46

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2019)01-0039-08

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 技术兴起于 20 世纪 90 年代, 目前已经被普遍用于分析检测基因转录水平表达。相对于常规半定量 RT-PCR 而言, qRT-PCR 具有实时、特异性强及灵敏度高等优点, 已广泛应用于分子生物学、医学和诊断学等诸多研究领域。

qRT-PCR 从荧光组分角度上划分常用的主要有 2 种: DNA 结合染料 (SYBR Green I) 和 Taqman 探针法。SYBR Green I 法相较于后者具有实验简单、成本低等特点, 从而更多地被应用于低通量、单重实验。从实验目的角度 qRT-PCR 技术还可以分为绝对定量和相对定量 2 种。绝对定量主要通过建立已知量的标准品的标准曲线, 并利用未知待测样品量的 CT 值推算某个基因的绝对数值 (拷贝数)。相对定量则主要比较不同组织之间或处理样品与未处理

样品中目的基因的表达差异。相对定量数据计算方法主要有  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法 (Livak 法)、 $2^{-\Delta CT}$  法和 Pfaffl 法<sup>[1-2]</sup>。 $2^{-\Delta\Delta CT}$  法 (Livak 法) 是检测基因相对表达量数据分析中最为普遍采用的计算方法, 但是该方法要求目的基因和内参基因的扩增效率接近 100%, 否则, 倘若两者扩增效率相差较大, 就会导致实验结果不能真实反映基因的表达水平, 因此, 必须对实验体系进行优化或者采用 Pfaffl 法计算。

红豆杉 (*Taxus L.*) 为裸子植物, 属于红豆杉科, 因可以从该树种中提取抗癌药物紫杉醇而引起国际上的广泛关注。目前, 有关紫杉醇生物合成的分子机理研究已经较为深入, 已经发现了合成途径中 19 步的 14 个关键酶基因<sup>[3]</sup>, 也有多个转录因子基因以及其它相关基因如 JAZs、细胞色素 P450 等被分离克隆<sup>[4-8]</sup>, 并且研究者也都利用 qRT-PCR 的方法

收稿日期: 2017-10-24 修回日期: 2018-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570675、31670676); 中国林业科学研究院基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2014QB001)

\* 通讯作者: 杨艳芳 echoyyf@caf.ac.cn

研究了这些基因转录水平的表达。然而,目前尚未见到有关这些基因 qRT-PCR 中相对定量法的最佳反应体系建立及优化的研究。本研究针对前期工作中克隆得到 1 个 *TbAP2* 基因,构建适用于 qRT-PCR 实验的最佳反应体系,为更加准确获取 *TbAP2* 基因在转录水平不同时空条件下的表达研究提供行之有效的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

本研究中采用曼地亚红豆杉(*Taxus × media*)细胞系 Tm3 为实验材料,采用 6,7-V 固体培养基 25℃ 暗培养,每隔 25~30 d 转接 1 次。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

将 100 mg 红豆杉细胞进行液氮研磨,按照柱式

植物 RNA<sub>OUT</sub>2.0 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)说明书操作,提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 8000 分光光度计(Thermo, 美国)检测其浓度和质量。取 0.6 μg 总 RNA 用于反转录合成 cDNA,反转录体系以及操作步骤参照购自天根生化科技(北京)有限公司的 Fast Quant RT Kit (with gDNase)说明书进行。

### 1.3 引物设计以及筛选

根据课题组前期克隆获得的 *TbAP2* 基因序列<sup>[4]</sup>,利用 Primer 6.0 分别设计了 3 对引物,并根据上下游引物在基因上的位置,将不同上下游引物进行两两组合出多对引物,*TbAP2* 基因引物组合结果为:F1R1、F1R3、F2R1、F2R2、F2R3、F3R1、F3R3。具体信息见表 1。选择 *TBC41* 基因为内参基因<sup>[9]</sup>,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The information of PCR primers

引物名称 Primer name	上游引物 5'-3' Forward primer	下游引物 5'-3' Reverse primer
TBC41	F:CAAGAAGAAAGAGTCAGCAAA	R:GGAACGACATGACATTATGAATAG
TbAP2-1	F1:CTGCAATTGCTCTGGACAAA	R1:TCAACAGCTGCTCTCTCTGT
TbAP2-2	F2:CAAGGGTGTGAGAATGAGGAG	R2:GCAGCTTCTGCAGTTGAATATG
TbAP2-3	F3:TCCTCTGCTGCTCTGAAT	R3:CTCCTCTCTGTAACCAT

将上述 7 对引物组合首先进行普通 PCR 扩增,采用 25 μL 反应体系:12.5 μL 2 × Taq PCR Master Mix,1 μL 引物(浓度为 5 μmol · L<sup>-1</sup>),1 μL cDNA 模板(原液稀释 5 倍),加水补足至 25 μL。PCR 反应循环为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共进行 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。以水为模板作为阴性对照。反应结束后取 5 μL PCR 扩增产物,通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测引物的特异性和目的片段的扩增长度,初步筛选出较好的引物。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 实验设计及方案

荧光定量 PCR 实验采用正交试验设计,选择三因素三水平试验,故选择 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 的正交表来安排实验(表 2),其中,A 为 PCR 体系(5、10、20 μL),B 为 cDNA 模板用量(0.5、1.0、1.5 μL),C 为引物用量(0.3、0.5、1.0 μL),每个试验方案至少重复 3 次。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

用常规 PCR 初步筛选出的较好的引物,以反转录合成的 cDNA 为模板,荧光定量 PCR 试剂采用 KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix(2 ×) Universal(北京普凯瑞生物科技有限公司),按照正交试

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计

Table 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experimental design

实验号 No.	因素 Factors			方案 Program
	A (PCR 体系 /μL) PCR reaction	B (cDNA 模板 /μL) cDNA template	C (引物用量 /μL) Primer volume	
1	1(5)	1(0.5)	1(0.3)	A1B1C1
2	1	2(1.0)	2(0.5)	A1B2C2
3	1	3(1.5)	3(1.0)	A1B3C3
4	2(10)	1	2	A2B1C2
5	2	2	3	A2B2C3
6	2	3	1	A2B3C1
7	3(20)	1	3	A3B1C3
8	3	2	1	A3B2C1
9	3	3	2	A3B3C2

注:cDNA 模板浓度为 0.6 μg 总 RNA 反转录合成的 cDNA 原液稀释 5 倍;引物浓度为 5 μmol · L<sup>-1</sup>

Note: With 0.6 μg total RNA the first strand cDNA was synthesized, and then diluted 5 times as PCR template; the primer concentration was 5 μmol · L<sup>-1</sup>

验列出的方案进行试验,荧光定量 PCR 反应的程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 10 s,55℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 30 s,45 次循环,每次循环第 3 步采集荧光;最后 95℃ 变性 5 s,退火至 60℃ 后保温 1 min。实验中分别以灭菌 ddH<sub>2</sub>O 和去除 DNA 污染未反转

录的 RNA 为模板作为 NTC 和 NRC 阴性对照。

## 1.6 标准曲线的绘制

先将反转录成的 cDNA 稀释 5 倍,以其为原始液,按 3 倍梯度稀释成 5 个浓度梯度的标准品,进行荧光定量 PCR 扩增,利用 Excel 绘制标准曲线,以 CT 值为纵坐标,以稀释倍数的对数值为横坐标,并标注线性方程和  $R^2$ ,计算扩增效率。

## 2 结果与分析

### 2.1 曼地亚红豆杉细胞总 RNA 提取

提取高质量总 RNA 是做好荧光定量 PCR 的基础,本研究中提取的总 RNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,28S 和 18S 2 个条带清晰明亮,并无拖尾现象(图 1),表明提取的 RNA 完整程度高,无降解,无 DNA 和蛋白质污染,用于反转成 cDNA。

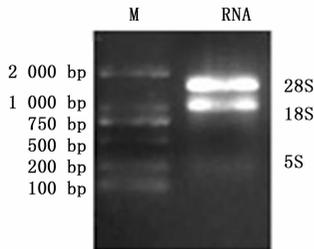


图 1 总 RNA 电泳图

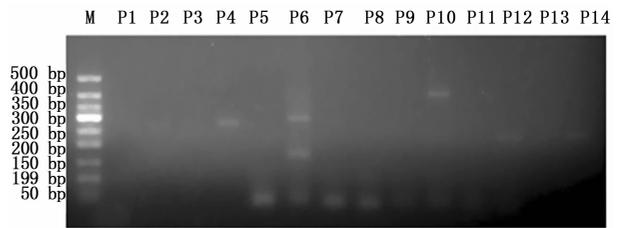
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of total RNA

M: DNA Marker D2000

### 2.2 引物筛选

根据课题组前期研究所克隆所得到的 *TbAP2* 基因序列设计特异性引物,将所有引物组合经常规 PCR 扩增。图 2 显示: *TbAP2* 基因的 7 对引物组合中, *TbF1R1*、*TbF1R3*、*TbF3R1* 和 *TbF3R3* 引物组合表现较好(P14、P12、P4、P2),均扩出单一条带且无二聚体产生,阴性对照也没有扩增出二聚体等杂带,且 *TbF3R1* 引物组合(P4)目的条带亮度最高,引物 *TbF3R3* 扩增的目的条带亮度最低(P2)。其它引物组合中, *TbF2R1* 引物组合扩出 1 条目的条带(P10),但 PCR 产物以及阴性对照均有二聚体产生(P10、P9); *TbF2R2* 引物组合未扩增出目的条带(P8),且阴性对照有二聚体产生(P7); *TbF2R3* 引物组合扩出 3 条条带(P6),且阴性对照有二聚体产生(P5)。

此外,将以上 7 对引物中表现较好的引物 *TbF1R1*、*TbF1R3*、*TbF3R1* 和表现较差的 *TbF2R1* 引物以及 *TBC41* 基因引物在 Roche 480 仪器上进行引物特异性验证和重复性检测,结果发现:引物



M: 50 bp Marker; P2、P4、P6、P8、P10、P12 及 P14 分别为 *TbF3R3*、*TbF3R1*、*TbF2R3*、*TbF2R2*、*TbF2R1*、*TbF1R3*、*TbF1R1* 引物 PCR 结果,P1、P3、P5、P7、P9、P11、P13 为各个引物组合对应阴性对照。

M: 50 bp Marker; P2, P4, P6, P8, P10, P12, and P14 were the PCR products of primer pairs *TbF3R3*, *TbF3R1*, *TbF2R3*, *TbF2R2*, *TbF2R1*, *TbF1R3* and *TbF1R1*, respectively; P1, P3, P5, P7, P9, P11, and P13 were the responsive negative control of the 7 primer pairs with sterile  $\text{dH}_2\text{O}$  as template.

图 2 7 对 *TbAP2* 基因引物 PCR 结果

Fig. 2 The PCR products of 7 primer pair s of *TbAP2* gene

*TBC41*、*TbF1R1*、*TbF1R3* 和 *TbF3R1* 特异性较好(图 3A、B、C、E),都只有 1 个明显单峰,而 *TbF2R1* 引物特异性确实较差(图 3D),峰形不锐利,且存在 1 个不明显的肩峰,表明确实存在非特异性扩增条带。

从引物扩增重复性角度分析,发现以上 5 对引物的重复性均表现良好,CT 值大小都在 20 ~ 30 之间,且 *TbF3R1* 的 CT 值平均值最小(21.72),而且每个基因均实行 3 复孔平行实验,发现 CT 值标准差最大为 0.28(表 3)。综合考虑,本研究选择引物 *TbF3R1* 和 *TBC41* 基因引物进行后续荧光定量 PCR 实验。

表 3 引物重复性检测

Table 3 The detection of the repeatability of primers

引物组合 Primer pairs	重复 1 Repeat1	重复 2 Repeat2	重复 3 Repeat3	CT 平均值 CT Mean Value	标准差 Std. Dev
<i>TBC41</i>	22.17	22.52	22.73	22.47	0.28
<i>TbF1R1</i>	26.57	26.94	26.80	26.77	0.19
<i>TbF1R3</i>	24.64	24.40	24.55	24.53	0.12
<i>TbF2R1</i>	22.36	22.61	22.54	22.50	0.13
<i>TbF3R1</i>	21.81	21.53	21.83	21.72	0.17

### 2.3 引物 *TBC41* 和 *TbF3R1* 的荧光定量 PCR 正交试验

将引物 *TBC41* 和 *TbF3R1* 按照正交试验方案同时进行荧光定量 PCR 并设置阴性对照。表 4 表明:最优方案的选择与  $K(k)$  值有关,在本实验中,CT 值越小,引物的扩增效率越高,因此,选择  $K_1(k_1)$ 、 $K_2$

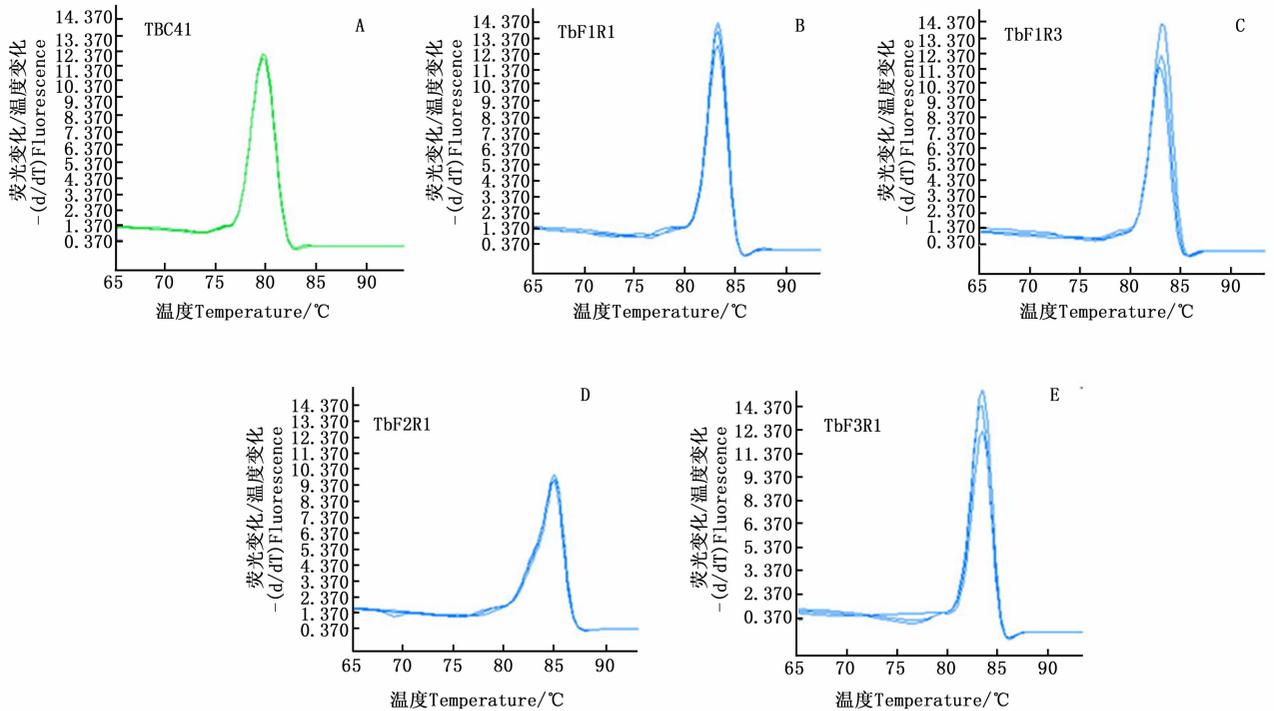


图3 TBC41 (A)、TbF1R1 (B)、TbF1R3 (C)、TbF2R1 (D) 和 TbF3R1 (E) 引物熔解曲线图

Fig. 3 Melting curve of primer pairs of TBC41 (A), TbF1R1 (B), TbF1R3 (C), TbF2R1 (D) and TbF3R1 (E)

(k<sub>2</sub>)、K<sub>3</sub>(k<sub>3</sub>)最小的水平,即 TBC41 扩增效率最高的方案为 A1B3C3。同理,可以看出 TbF3R1 引物组合扩增效率最高的方案也为 A1B3C3(表5)。此外,极差越大,表明因素越重要,可以看出,本研究中3个因素影响大小为:PCR 反应体系 > 引物量 > 模板用量。引物 TBC41 和 TbF3R1 在常用的 10 μL 体系下最佳方案为 A2B2C3, 20 μL 体系下最佳的组合方案分别为 A3B1C3 和 A3B3C2。由于 TbF3R1 的方案 A3B3C2 的 CT 值与方案 A3B1C3 相近,为使在同一方案中同时使 2 对引物具有相近的扩增效率,因此,后续确定扩增体系扩增效率的实验中,20 μL 体系采用方案 A3B1C3。

将模板 cDNA 依次稀释 3 倍,绘制 5、10、20 μL 体系下 TBC41 和引物 TbF3R1 在 A1B3C3、A2B2C3 和 A3B1C3 方案下的标准曲线,计算扩增效率。图 4 表明:尽管此 3 种方案下,6 条标准曲线的回归系数  $R^2$  都符合  $>0.980$  的条件,但是 TBC41 基因的扩增效率却只有 70%~80%,引物 TbF3R1 的扩增效率在 A1B3C3 和 A2B2C3 方案中分别为 98% 和 91%,而在 A3B1C3 方案中仅为 74%(表6)。可以看出,3 个方案中没有任何一个方案达到内参基因和目的基因扩增效率为 90%~105% 的标准,因此,需要对此 3 种方案进行继续优化。

表 4 引物 TBC41 正交试验方案结果

Table 4 The scheme of orthogonal experimental of primer TBC41 with qRT-PCR method

序号 No.	因素 Factors			方案 Program	CT 平均值 Mean CT
	A (PCR 体 系/μL)	B (cDNA 模 板/μL)	C (引物用 量/μL)		
	PCR reaction	cDNA template	Primer volume		
1	1	1	1	A1B1C1	26.34
2	1	2	2	A1B2C2	23.89
3	1	3	3	A1B3C3	22.42
4	2	1	2	A2B1C2	28.33
5	2	2	3	A2B2C3	25.36
6	2	3	1	A2B3C1	27.72
7	3	1	3	A3B1C3	29.10
8	3	2	1	A3B2C1	33.48
9	3	3	2	A3B3C2	29.93
K1	72.65	83.77	87.54		
K2	81.41	82.73	82.15		
K3	92.51	80.07	76.88		
k1	24.22	27.92	29.18		
k2	27.14	27.58	27.38		
k3	30.84	26.69	25.63		
R	6.62	1.23	3.55		

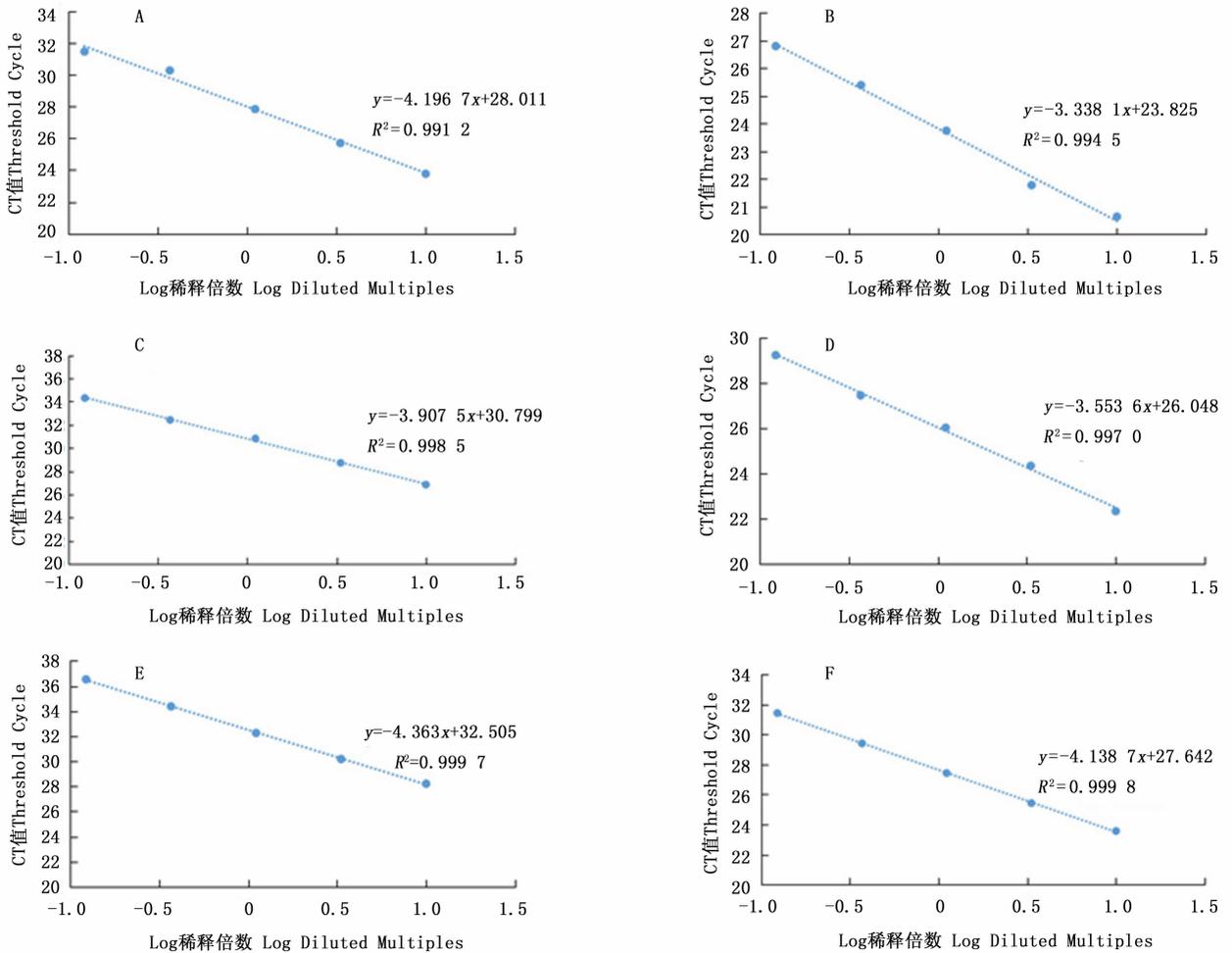
注:K<sub>i</sub>:水平效应,即任一列上水平号为 i 所对应的实验结果之和; k<sub>i</sub>:平均效应,即水平和除以水平数; R:极差,即在任一列上最大 K(k) 值与最小 K(k) 值之差。cDNA 模板浓度为 0.6 μg 总 RNA 反转录合成的 cDNA 原液稀释 5 倍; 引物浓度为 5 μmol · L<sup>-1</sup>。下同

Note: K<sub>i</sub>: horizontal effect, that is, the sum of the experimental results corresponding to level number i in any column; k<sub>i</sub>: the average effect, that is, the sum of the horizontal divided by the quantity of the horizontal; R: Range, the different between the maximum value K(k) and the minimum K(k) value. With 0.6 μg total RNA the first strand cDNA was synthesized, and then diluted 5 times as PCR template; the primer concentration was 5 μmol · L<sup>-1</sup>. The same below.

表 5 TbF3R1 正交试验方案结果

Table 5 The scheme of orthogonal experimental of primer TbF3R1 with qRT-PCR method

因素 Factors					CT 平均值 Mean CT	因素 Factors					CT 平均值 Mean CT
序号 No.	A (PCR 体系/ $\mu$ L) PCR reaction	B (cDNA 模板/ $\mu$ L) cDNA template	C (引物用量/ $\mu$ L) Primer volume	方案 Program		序号 No.	A (PCR 体系/ $\mu$ L) PCR reaction	B (cDNA 模板/ $\mu$ L) cDNA template	C (引物用量/ $\mu$ L) Primer volume	方案 Program	
1	1	1	1	A1B1C1	21.59	9	3	3	2	A3B3C2	22.43
2	1	2	2	A1B2C2	20.41	K1	61.37	67.50	66.98		
3	1	3	3	A1B3C3	19.37	K2	64.78	65.04	65.42		
4	2	1	2	A2B1C2	22.58	K3	69.67	63.28	63.42		
5	2	2	3	A2B2C3	20.72	k1	20.46	22.50	22.33		
6	2	3	1	A2B3C1	21.48	k2	21.59	21.68	21.81		
7	3	1	3	A3B1C3	23.33	k3	23.22	21.09	21.14		
8	3	2	1	A3B2C1	23.91	R	2.77	1.41	1.19		



A, C, E; TBC41 在 5、10、20  $\mu$ L 下的标准曲线; B, D, F; TbF3R1 引物在 5、10、20  $\mu$ L 下的标准曲线。

A, C, E; the standard curve of TBC41 in 5, 10 and 20  $\mu$ L reaction volumes; B, D, F; the standard curve of TbF3R1 in 5, 10 and 20  $\mu$ L reaction volumes.

图 4 TBC41 和 TbF3R1 引物在 A1B3C3、A2B2C3 和 A3B1C3 中的标准曲线

Fig. 4 The standard curves of the primer pairs of TBC41 and TbF3R1 in A1B3C3, A2B2C3 and A3B1C3 programs before optimization

表6 优化前 A1B3C3、A2B2C3 和 A3B1C3 方案中 TBC41 和 TbF3R1 的扩增效率

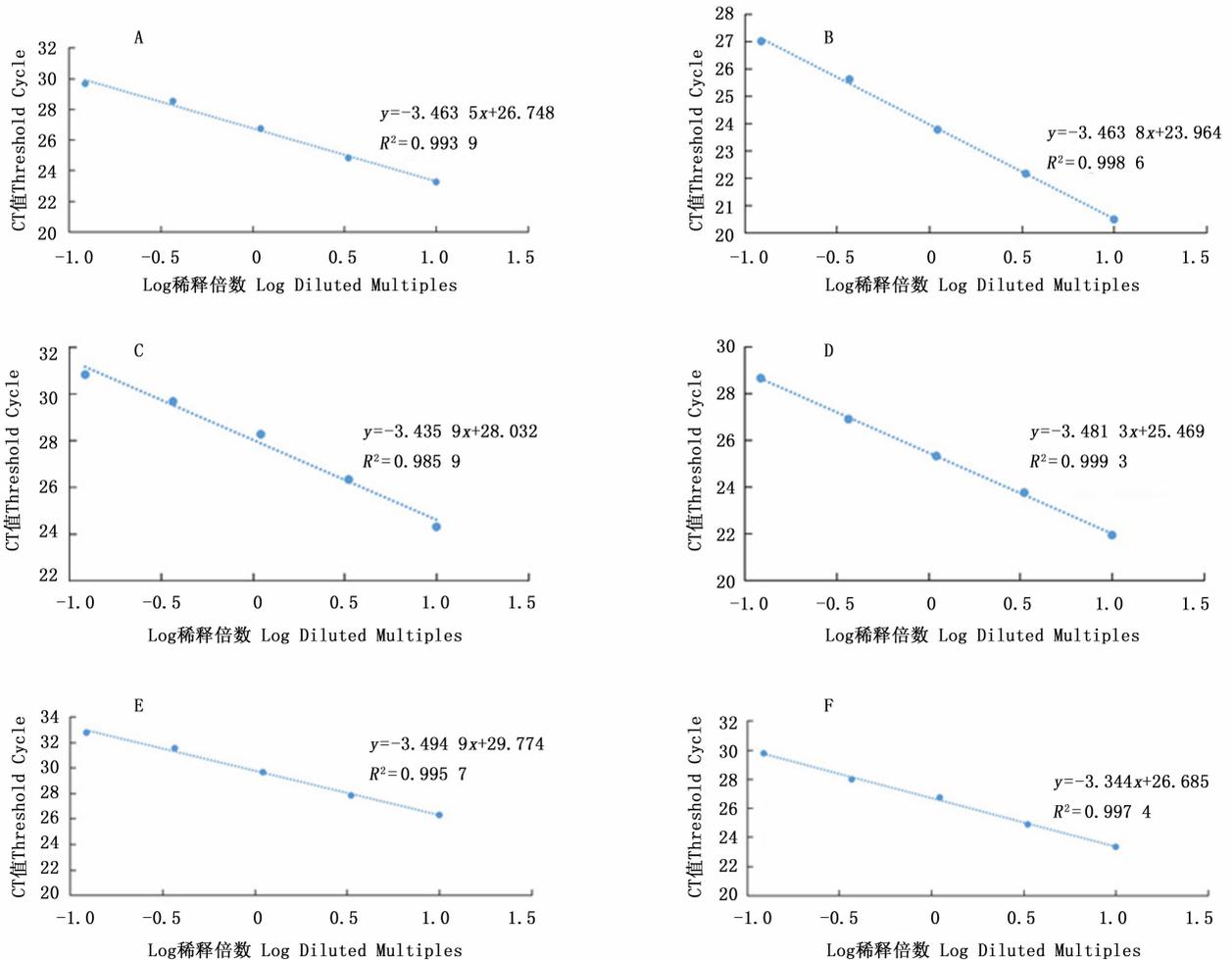
Table 6 The amplification efficiency of TBC41 and TbF3R1 primer pairs under A1B3C3, A2B2C3 and A3B1C3 programs before optimization

反应体系 Reaction system/ $\mu\text{L}$	方案 Program	引物组合 Primer	扩增效率 PCR efficiency/%	回归系数 $R^2$	斜率 Slope
5	A1B3C3	TBC41	73	0.991 2	-4.196 7
		TbF3R1	98	0.994 5	-3.338 1
10	A2B2C3	TBC41	80	0.998 5	-3.907 5
		TbF3R1	91	0.997 0	-3.553 6
20	A3B1C3	TBC41	70	0.999 7	-4.363 0
		TbF3R1	74	0.999 8	-4.138 7

## 2.4 不同实时荧光定量 PCR 体系的优化

一般来说,实验中扩增效率较难准确达到 100%,因此,在实际操作时,保证扩增效率为 90%~105%,线性回归系数  $R^2 > 0.980$ ,即可视为满足  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算要求。本实验通过改变体系中模板和

引物的体积(表 7),以达到内参基因和目的基因的扩增效率都在 100%左右的标准。表 8 表明:经过优化后,5、10、20  $\mu\text{L}$  体系下,内参基因 *TBC41* 和目的基因 *TbAP2* 的扩增效率均可以保持在 93%~99%之间,且  $R^2$  都在 0.980 以上(图 5)。



A、C、E: TBC41 在 5、10、20  $\mu\text{L}$  下的标准曲线; B、D、F: TbF3R1 引物在 5、10、20  $\mu\text{L}$  下的标准曲线。

A、C、E: the standard curve of TBC41 in 5, 10 and 20  $\mu\text{L}$  reaction volume; B、D、F: the standard curve of TbF3R1 in 5, 10 and 20  $\mu\text{L}$  reaction volume.

图5 TBC41 和 TbF3R1 引物在优化后 5、10、20  $\mu\text{L}$  体系下的标准曲线Fig. 5 The standard curves of the primer pairs of TBC41 and TbF3R1 in 5, 10 and 20  $\mu\text{L}$  reaction volumes after optimization

表 7 优化后的荧光定量 PCR 体系

Table 7 The optimized qRT-PCR composition

组成成分 Composition	5 $\mu\text{L}$ 体系 5 $\mu\text{L}$ reaction system/ $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$ 体系 10 $\mu\text{L}$ reaction system/ $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$ 体系 20 $\mu\text{L}$ reaction system/ $\mu\text{L}$
Mix(2 $\times$ ) Universal	2.5	5	10
cDNA	1.0	1.2	0.5
正、反引物体积	1.5	1.3	1.5
ddH <sub>2</sub> O	0	2.5	8

注: cDNA 模板浓度为 0.6  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录合成的 cDNA 原液稀释 5 倍; 引物浓度为 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Note: 0.6  $\mu\text{g}$  total RNA is reverse transcribed to cDNA stock solution and then diluted 5 times as cDNA template; the primer concentration was 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

表 8 不同 PCR 反应体系下引物 TBC41 和 TbF3R1 的扩增效率

Table 8 The amplification efficiency of primers TBC41 and TbF3R1 in different PCR reactions after optimization

反应体系/ $\mu\text{L}$ reaction system	引物组合 Primer	扩增效率 PCR efficiency/%	回归系数 $R^2$	斜率 Slope
5	TBC41	94	0.993 8	-3.483 5
	TbF3R1	94	0.998 6	-3.463 8
10	TBC41	95	0.985 9	-3.435 9
	TbF3R1	94	0.999 3	-3.481 3
20	TBC41	93	0.995 7	-3.494 9
	TbF3R1	99	0.997 4	-3.344 0

### 3 讨论

在 qRT-PCR 的相对定量实验中, 引物设计、模板浓度和质量以及退火温度等都是影响实验结果的重要因素<sup>[10-12]</sup>。SYBR Green I 是当前 qRT-PCR 实验最常用的试剂, 具有较强的灵敏性, 但是却也存在不能专一识别目的基因双链 DNA 的缺点, 实验中经常会出现引物二聚体或非特异性扩增出现的荧光值而影响实验的准确性。因此, 设计出高效且特异性扩增的引物至关重要。在本研究中, 笔者针对 *TbAP2* 基因设计、组合出的 7 对引物进行普通 PCR 筛选, TbF1R1、TbF1R3、TbF3R1 和 TbF3R3 引物组合均扩增出单一条带, 其他 3 对引物均有引物二聚体或者杂带。由于 TbF3R3 引物扩增效率最低, 因此利用 Roche480 针对 TbF1R1、TbF1R3 和 TbF3R1 进行特异性和重复性分析。熔解曲线分析显示: 3 种引物组合只扩增出唯一单峰, 未产生引物二聚体等非特异性扩增, 表明 3 种引物组合均具有良好特异性。此外, 3 种引物组合还具有良好的重复性, 技术重复 CT 值误差均小于 1。

鉴于 TbF3R1 的 CT 值最小, 且标准差较小

( $SD=0.17$ ), 因此, 选择该引物组合以及内参基因 *TBC41* 进行后续正交实验进行 qRT-PCR 最佳体系建立。通过表 6 可以看出: 2 个基因未优化正交实验给出的最佳方案在 5、10、20  $\mu\text{L}$  体系下扩增效率绝大部分未能达到标准, 并且 5  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  体系下 *TBC41* 和 *TbF3R1* 的扩增效率相差 19% 和 25%。可见, 建立和优化 qRT-PCR 反应体系十分有必要; 而优化后的 3 种 qRT-PCR 体系引物 *TBC41* 和 *TbF3R1* 的扩增效率在 93%~99% 之间, 因而更适合用于  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算。

此外, 从本研究结果还可以看出 qRT-PCR 反应体系对于扩增效率的影响力最高, 其次是引物用量和模板用量(表 4、5)。目前, 国内实验室大多采用 10~25  $\mu\text{L}$  体系, 而市场上商业公司大多采用 384 孔 5  $\mu\text{L}$  反应体系。减少 qRT-PCR 反应体系, 最大好处是能够节约经费降低成本, 还有利于检测低拷贝基因的表达, 但也存在降低稳定性的风险。已有研究者针对转录水平低表达基因, 在甘蓝 (*Brassica oleracea*) 和叶用莴苣 (*Lactuca sativa*) 中建立了小体积(10  $\mu\text{L}$ ) 的 qRT-PCR 反应体系<sup>[13-14]</sup>。本研究中建立的 5  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  小体积反应体系中, 目的基因和内参基因的扩增效率均在 94% 左右, 同样为检测 *TbAP2* 以及其他红豆杉中低拷贝基因的表达提供了有益参考。此外, 一般认为, 最佳的引物浓度应该在 0.1~0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 较高的引物浓度会导致非特异性产物扩增; 而高质量的 cDNA 模板也是影响 qRT-PCR 定量结果的重要因素。因此, 必须保证提取的 RNA 完整且无基因组 DNA 污染<sup>[11]</sup>。

### 4 结论

为了更准确地检测红豆杉 *TbAP2* 基因的表达量, 本研究对内参基因 *TBC41* 和目的基因 *TbAP2* 的最佳荧光定量 PCR 体系进行了建立和优化, 成功建立了红豆杉 *TbAP2* 基因和内参基因 *TBC41* 在 5  $\mu\text{L}$  小体系、10  $\mu\text{L}$  和 20  $\mu\text{L}$  体积下的最佳 qRT-PCR 反应体系, 且 3 个体系扩增效率均在 90%~105% 之间, 回归系数  $R^2 > 0.980$ 。本研究建立的 qRT-PCR 反应体系, 为今后检测 *TbAP2* 基因以及红豆杉其他相关基因在转录水平不同时空条件下的表达提供了有效的方法和理论指导。

### 参考文献:

[1] Livak K, Schmittgen T D. 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.
- [2] 刘正霞,徐 阳,徐进梅,等. 不同引物及数据分析方法对定量 PCR 结果的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2009, 29(8): 1112–1117.
- [3] Croteau R, Ketchum R E, Long R M, *et al.* Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5(1): 75–97.
- [4] 杨艳芳,刘洪伟,邱德有. 欧洲红豆杉 AP2/ERF 转录因子基因序列分析[J]. *生物资源*, 2014, 36(4): 54–59.
- [5] 李艳艳,杨艳芳,王俊青,等. 红豆杉 *TcLBDs* 基因的克隆与表达分析[J]. *林业科学*, 2015, 51(10): 126–133.
- [6] Nasiri J, Naghavi M R, Alizadeh H, *et al.* Seasonal-based temporal changes fluctuate expression patterns of *TXS*, *DBAT*, *BAPT* and *DBTNBT* genes alongside production of associated taxanes in *Taxus baccata*[J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(5): 1103–1119.
- [7] Liao W F, Zhao S Y, Zhang M, *et al.* Transcriptome assembly and systematic identification of novel cytochrome P450s in *Taxus chinensis*[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1468.
- [8] Zhang M, Chen Y, Nie L, *et al.* Molecular, structural, and phylogenetic analyses of *Taxus chinensis* JAZs[J]. *Gene*, 2017, 620: 66–74.
- [9] Ramirez-Estrada K, Osuna L, Moyano E, *et al.* Changes in gene transcription and taxane production in elicited cell cultures of *Taxus × media* and *Taxus globosa*[J]. *Phytochemistry*, 2015, 117: 174–184.
- [10] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time PCR[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1559–1582.
- [11] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1736–1737.
- [12] Baker M. qPCR: quicker and easier but don't be sloppy [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(3): 207–212.
- [13] 王效维,刘海霞,杨颖丽,等. 低表达甘蓝花药发育相关基因小体积荧光定量反应体系的简历和可靠性分析[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(4): 111–115.
- [14] 李 婷,韩莹琰,范双喜,等. 叶用莴苣荧光定量 PCR 体系的优化[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(13): 106–113.

## Optimization of Fluorescent Quantitative Real-time PCR System of *Taxus chinensis* var. *mairei*

ZHANG Kai-kai<sup>1,2</sup>, LV Xing<sup>2</sup>, YANG Li-ying<sup>2</sup>, CHEN Duan-fen<sup>2</sup>, QIU De-you<sup>1</sup>, YANG Yan-fang<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 2. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China)

**Abstract:** [Objective] To establish a stable and suitable real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) experiment system of *TbAP2* in *Taxus* L. [Method] Total RNA was extracted from the cell line of *Taxus × media* and used to reverse transcript cDNA. According to the sequence of *TbAP2* gene obtained previously, 7 primer pairs were designed and synthesized with the *TBC41* gene as the housekeeping gene. The orthogonal test  $L_9(3^4)$  method were used to choose the stable and suitable qRT-PCR experiment system with the cDNA as template. The volume of qRT-PCR reaction included 5, 10 and 20  $\mu\text{L}$ . The amplification efficiency would be assured between 90%–105% by adjusting the dosage of cDNA template and primer pairs, respectively. [Result] This study established the optimal qRT-PCR reaction system of *TBC41* *TbAP2* and gene in 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  and 20  $\mu\text{L}$  volume. In the optimized 5  $\mu\text{L}$  system, the amplification efficiency of both *TBC41* and *TbAP2* were 94%. In the optimized 10  $\mu\text{L}$  system, the amplification efficiency of *TBC41* and *TbAP2* were 95% and 94%, respectively. In the optimized 20  $\mu\text{L}$  system, the amplification efficiency of *TBC41* and *TbAP2* were 93% and 99%, respectively. The regression coefficient  $R^2$  in all the three amplification system were greater than 0.980. [Conclusion] All the reaction systems mentioned above show that the amplification efficiency of *TBC41* and *TbAP2* close to 100%, indicating that these detection program are suitable to investigate the *TbAP2* gene expression by qRT-PCR method.

**Keywords:** *Taxus* L.; AP2; orthogonal test; qRT-PCR

(责任编辑:张 研)