

赵素平, 胡博然, 胡花丽, 等. 徐香猕猴桃 RNA 提取条件及内参基因的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 44–48.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.010

# 徐香猕猴桃 RNA 提取条件及内参基因的优化

赵素平<sup>1,2</sup>, 胡博然<sup>1</sup>, 胡花丽<sup>2,3</sup>, 周宏胜<sup>2,3</sup>, 刘红艳<sup>1,2</sup>, 李鹏霞<sup>2,3</sup>

(1. 扬州大学旅游烹饪学院, 江苏扬州 225127; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014;  
3. 江苏省农业科学院园艺产品采后处理工程实验室, 江苏南京 210014)

**摘要:**以徐香猕猴桃成熟果实为材料, 采用优化的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取猕猴桃总 RNA, 同时对猕猴桃成熟果实内参基因进行筛选。猕猴桃具有富含多糖、多酚等物质的特点, 为了从猕猴桃果实中提取和分离出高质量的 RNA, 在 CTAB 方法的基础上, 通过多次试验改进, 对 CTAB 方法进行优化。结果表明, 优化的 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 含量及纯度均较高, 条带整齐、清晰、完整。同时, 通过实时荧光定量 PCR 对内参基因进行筛选, 选择 *ACTB* 作为徐香猕猴桃成熟果实的内参基因。

**关键词:**猕猴桃; RNA 提取; 内参基因

**中图分类号:** S663.401 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0044-05

高质量的 RNA 样品是分子生物学研究的基础, 在总 RNA 提取时, 能否有效地去除果实中的多糖、多酚等物质, 并抑制 RNA 酶活性, 是核酸提取效率及核酸质量的重要影响因素<sup>[1]</sup>。猕猴桃果实含有较多的多糖、酚类物质, 由于多糖、酚类物质的干扰, 使得猕猴桃 RNA 提取较其他植物 RNA 提取的难度大<sup>[2]</sup>。目前国内外有关提取猕猴桃果实总 RNA 的方法主要有改进的 Lopez-Gomez 与 Gomez-lim 方法<sup>[3]</sup>、异硫氰酸胍法<sup>[4]</sup>、HAc-NaAc 法<sup>[5]</sup>、RNA 提取试剂盒法等, 但是异硫氰酸胍法、试剂盒法比较昂贵, HAc-NaAc 法提取需要分离 DNA、RNA。本研究在十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法的基础上进行优化, 拟建立 1 种适于提取猕猴桃果实总 RNA 的经济简便的方法。另外, 内参基因的表达量可以对目标基因的表达量进行归一化和标准化, 以减小样本之间的差异, 内参基因在实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 中起重要作用<sup>[6]</sup>。相同猕猴桃果实不同品种、不同部位和不同发育阶段等均会对同一基因的表达产生影响, 因此, 根据果实品种及试验处理, 优化和选择用于 qRT-PCR 的内参基因至关重要。本研究以植物常用的内参基因 (*ACTB*、*TUB*、*18S rRNA*、*GAPDH* 和 *Actin*) 为基础<sup>[7]</sup>, 拟选择最适合徐香猕猴桃果实基因表达水平研究的内参基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

徐香猕猴桃, 购自南京众彩物流批发市场, 挑选大小相近、无病虫害、无机械损伤、成熟度基本一致的果实进行处理。

收稿日期: 2016-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31401555); “十二五”国家科技支撑计划(编号: 2011BAD24B03-5-1); 江苏省研究生培养创新工程(编号: KYZZ-0180)。

作者简介: 赵素平(1991—), 女, 安徽芜湖人, 硕士, 主要从事食品卫生与安全研究。E-mail: 1721781448@qq.com。

通信作者: 李鹏霞, 博士, 研究员, 主要从事果实流通保鲜与加工研究。E-mail: lpx213@126.com。

在处理后的 3、6、9 d 进行样品采集, 将果肉组织用液氮冷冻, 并在 -70 ℃ 下储存。

### 1.2 方法

**1.2.1 提取液配制** CTAB 抽提液成分: 2.5% (质量分数) CTAB, 2% (质量分数) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 100 mmol/L Tris-HCl [pH 值 8.0, 用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水配制], 25 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 2.0 mol/L NaCl, 0.5 g/L 亚精胺, 充分混匀后于 121 ℃ 灭菌 30 min。使用前加入 100 g/L 的  $\beta$ -巯基乙醇、三氯甲烷 + 异戊醇(体积比 24:1)、8 mol/L LiCl、70% 乙醇。以上试剂均用 0.1% DEPC 处理的灭菌双蒸水配制。

### 1.2.2 提取方法

**1.2.2.1 试剂盒法提取猕猴桃总 RNA** 严格按照试剂盒的要求提取总 RNA。

**1.2.2.2 优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA** 在传统 CTAB 方法<sup>[8]</sup>的基础上, 进行提取条件的优化。提取步骤: (1) 在经过 DEPC 水处理的无 RNA 的 2 mL 离心管中加入 1 mL CTAB 抽提液, 再加入 100  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇, 混匀备用。(2) 取猕猴桃冻样置于预冷的研钵中(研钵用乙醇燃烧灭菌后加液氮预冷), 加入液氮, 迅速研磨成均匀的粉末, 研磨得越细越好; 称取 0.4 g 磨碎的样品放入有 CTAB 抽提液的离心管中, 立即混匀, 65 ℃ 水浴 30 min (每隔 5 min 混匀 1 次)。(3) 取出离心管, 冷却至室温, 10 000 r/min、10 ℃ 离心 10 min, 取上清放入新的无 RNA 的离心管中。(4) 加入等体积三氯甲烷、异戊醇(体积比为 24:1), 于室温条件下剧烈摇动 5 min, 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min, 取上清液加入无 RNA 的新离心管内, 重复此步骤 3 次至蛋白层不再出现。(5) 吸取上清液至无 RNA 的新离心管中, 加入 1/2 体积 8 mol/L LiCl (使其终浓度为 4 mol/L LiCl), 于 -20 ℃ 放置过夜(即沉淀时间大于 8 h)。(6) 将于 -20 ℃ 放置 8 h 以上的离心管取出, 13 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min。(7) 去除上清, 用 600  $\mu$ L 75% 乙醇洗涤沉淀, 于 13 000 r/min、4 ℃ 离心 5 min, 重复此步骤 3 次, 最后一次倒掉乙醇后再空管离心 1 次, 吸出残留的

乙醇,之后在超净工作台上放置 5 min,使残留乙醇挥发,以免影响下游试验。(8)加 20 μL DEPC 处理的灭菌双蒸水溶解沉淀,充分混匀,长期保存于 -70 ℃。

1.3 总 RNA 的质量检测

(1)取 2 μL 总 RNA,用核酸定量分析仪测定并计算  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值及核酸的浓度,分析其质量与浓度。(2)检测 RNA 的琼脂糖凝胶电泳在 1×TAE 缓冲液中进行,在 3 μL RNA 加样缓冲液 (6×loading buffer) 中加入 2 μL 总 RNA,混合均匀后点样于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,利用凝胶成像系统观察 RNA 的完整性。

1.4 cDNA 合成

cDNA 的合成严格按照 First Strand cDNA Synthesis Kit (由 Thermo Scientific Revert Aid 提供)操作。总 RNA 的纯化:反应体系含有 2 μg/μL RNA,1 μL 10×反应缓冲液 (含  $\text{MgCl}_2$ ),1 μL (1 U) DNase I (RNase-free),加入无核酸酶的双蒸水使总体积至 10 μL。反应条件:37 ℃温育 30 min 后立即冰浴,之后加入 1 μL 50 mmol/L EDTA 再于 65 ℃温育

10 min,冰浴 5 min 后即可进行 cDNA 合成。

cDNA 合成:在上述体系中加入 random primer 1 μL,反应总体积调至 12 μL。65 ℃加热 5 min 后立即置于冰上降温,之后加入 4 μL 5×反应缓冲液,1 μL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL),2 μL 10 mmol/L dNTP Mix,1 μL RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL),总反应体系为 20 μL。之后于 25 ℃孵育 5 min,42 ℃孵育 60 min,70 ℃孵育 5 min。将合成产物于 -70 ℃保存备用。

1.5 猕猴桃内参基因的筛选

内参基因参照张慧琴等的研究<sup>[9-10]</sup>,详见表 1。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,对 5 个基因序列进行常规 PCR 扩增,反应体系:10 μL 2×PCR-Mix,各 0.8 μL 上、下游引物,0.5 μL cDNA,7.9 μL 灭菌双蒸水,总反应体系 20 μL。反应步骤:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,此步骤 35 个循环;72 ℃ 10 min。通过半定量 PCR 和 qRT-PCR 检测内参基因 *ACTB*、*TUB*、*Actin*、*GAPDH*、18S rRNA,挑选适合徐香猕猴桃成熟果实检测的内参基因。

表 1 内参基因引物序列

基因全称	基因简称	引物序列 (5'→3')
<i>actin isoform B</i>	<i>ACTB</i>	F:GTGCTCAGTGCTGGTTCAA;R:GACGCTGTATTCCTCTCAG
<i>protein Tubulin beta 4 chain</i>	<i>TUB</i>	F:TGAGCACTAAAGAGGTTGATGA;R:TGGGATGTCACACACTGG
<i>ribosomal RNA 18S</i>	18S rRNA	F:AACGAGACCTCAGCCTGCT;R:CCCAGAACATCTAAGGGCA
<i>glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	F:ACACTCCATCACTGCGACA;R:CACCTTGCCAACAGCCTTA
<i>β-Actin</i>	<i>Actin</i>	F:TGCAGATATTAGTGAAACC;R:CCACCACGGAGACGGAGCAC

2 结果与分析

2.1 猕猴桃总 RNA 提取结果

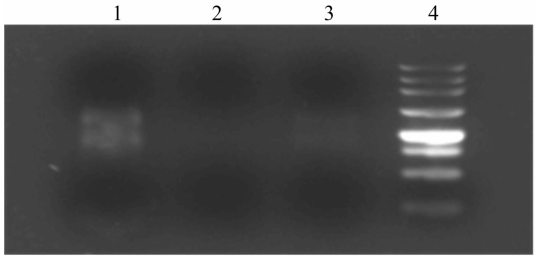
2.1.1 用试剂盒提取猕猴桃贮藏 0 d 样品 RNA 结果 在波长 280、230、260 nm 下的吸光度依次代表核酸、盐、蛋白等有机物的含量。高纯度 RNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值应介于 1.8~2.0 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值大于 2.0<sup>[11]</sup>。从表 2 可以看出,使用试剂盒提取猕猴桃 RNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值整体上分别低于 1.8、2.0,这说明 RNA 中蛋白、多糖等杂质污染严重。第 3 次提取猕猴桃总 RNA 质量有所提高,但是 RNA 含量低,不利于进行下游试验。从图 1 可以看出,试剂盒提取猕猴桃总 RNA 条带不清晰且弥散,说明 RNA 有所降解。由图 2 可以看出,猕猴桃总 RNA 条带清晰但亮度不高,说明 RNA 含量及纯度均较低。因此可知,试剂盒不适合用来提取徐香猕猴桃总 RNA。

表 2 试剂盒提取猕猴桃 RNA 的相应结果

提取次数	RNA 含量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
1	209	1.76	1.71
2	370	1.79	1.79
3	390	1.84	1.89

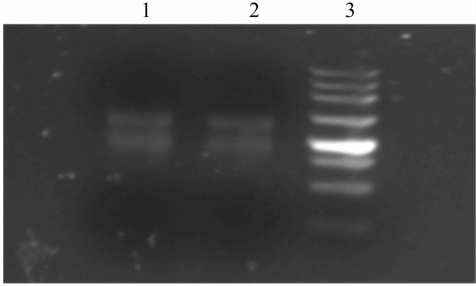
2.1.2 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 结果

2.1.2.1 传统 CTAB 法第 1 次提取猕猴桃总 RNA 结果 以贮藏 0 d 猕猴桃样品为基础设置不同起始质量,进行总 RNA 的提取。从表 3 可看出,随着猕猴桃样质量的增加,提取的猕猴桃总 RNA 含量会相应提高,但  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值也随之下降,说明提取的总 RNA 含有多糖、多酚等物质,总



1—0.3 g 样品; 2—0.1 g 样品; 3—0.5 g 样品; 4—marker

图1 试剂盒第 2 次提取 RNA 结果



1、2—0.3 g 样品提取的 RNA; 3—marker

图2 试剂盒第 3 次提取 RNA 结果

表 3 CTAB 法提取猕猴桃贮藏 0 d 样品 RNA 的结果

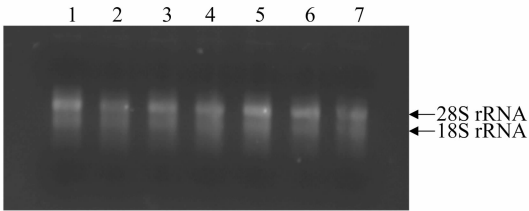
提取样品质量 (g)	RNA 含量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
0.2	262	1.81	1.85
0.4	489	1.73	1.66
0.6	626	1.71	1.65

RNA 质量不高,不适合用于下游分子生物学试验。

2.1.2.2 第 1 次优化条件提取猕猴桃总 RNA 结果 优化条件:猕猴桃样质量选择 0.5 g,CTAB 含量由 2.0% 提高至 2.5%,β-巯基乙醇含量由 2% 提高到 10%,三氯甲烷-异戊醇抽提次数增加至 3 次。利用优化后的 CTAB 法提取猕猴桃果实总 RNA,用核酸定量分析仪进行检测。由表 4 可知,猕猴桃总 RNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值基本在 1.8 ~ 1.9,而  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值介于 1.8 ~ 2.0,说明总 RNA 纯度提高了,但是仍存在少量多糖、多酚和蛋白质等物质。由图 3 的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果看出,总 RNA 电泳结果呈现 2 条带,且 28S 的亮度比 18S 的亮度大,但是 18S 条带出现了降解,需要进一步优化提取条件。

表 4 第 1 次优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 结果

贮藏时间 (d)	组别	RNA 含量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
0	0	507	1.90	1.97
3	CK	382	1.76	1.80
3	处理	354	1.82	1.82
6	CK	481	1.86	1.87
6	处理	471	1.85	1.87
9	CK	393	1.80	1.79
9	处理	533	1.86	1.84



1—贮藏 0 d; 2—贮藏 3 d 的 CK 组; 3—贮藏 3 d 的处理组; 4—贮藏 6 d 的 CK 组; 5—贮藏 6 d 的处理组; 6—贮藏 9 d 的 CK 组; 7—贮藏 9 d 的处理组

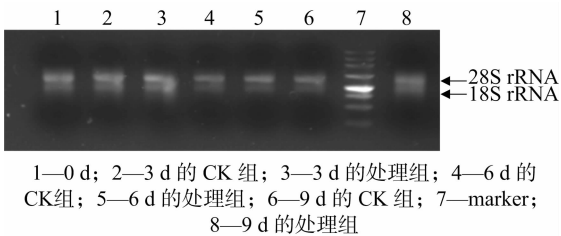
图 3 第 1 次优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 电泳结果

2.1.2.3 第 2 次优化条件提取猕猴桃总 RNA 结果 优化条件:样品质量由 0.5 g 减少至 0.3 g,70% 乙醇洗涤次数增加至 3 次。从表 5 可以看出,减少猕猴桃提取时的样品质量,增加乙醇洗涤次数,可以提高总 RNA 的纯度及质量,但  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值仍小于 2.0。由图 4 可知,猕猴桃总 RNA 条带整齐、清晰,但 RNA 条带亮度不高,说明 RNA 样品含量较低,因此需要进一步优化方法,从而提高猕猴桃总 RNA 的浓度及纯度。

表 5 优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 结果

贮藏时间 (d)	组别	RNA 含量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
0	0	620	1.90	2.00
3	CK	349	1.84	1.83
3	处理	618	1.91	1.90
6	CK	368	1.80	1.78
6	处理	468	1.88	1.94
9	CK	400	1.80	1.80
9	处理	667	1.89	1.89

2.1.2.4 第 3 次优化条件提取猕猴桃总 RNA 结果 优化条件:样品质量 0.4 g,LiCl 由 1/3 体积增加至 1/2 体积,同时 LiCl 沉淀时间为过夜。通过提高样品质量至 0.4 g,以及 LiCl



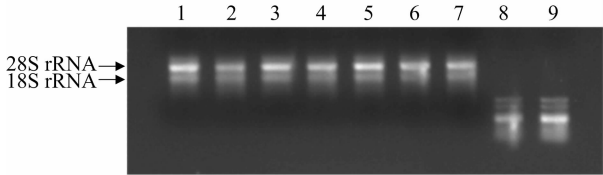
1—0 d; 2—3 d 的 CK 组; 3—3 d 的处理组; 4—6 d 的 CK 组; 5—6 d 的处理组; 6—9 d 的 CK 组; 7—marker; 8—9 d 的处理组

图 4 第 2 次优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 电泳结果

沉淀过夜提取总 RNA,由表 6 可知, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值介于 1.8 ~ 2.0 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值基本为 2.0 左右,表明提取的猕猴桃总 RNA 质量较高。从图 5 可以看出,RNA 条带整齐、清晰完整,28S 条带亮度约是 18S 条带亮度的 2 倍,表明总 RNA 的纯度、完整性和产率均较高,蛋白质、多糖及多酚等去除得较彻底,可作为反转录的模板。

表 6 优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 结果

贮藏时间 (d)	组别	RNA 含量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值
0	0	740	1.95	2.06
3	CK	559	1.92	1.96
3	处理	716	1.88	1.92
6	CK	735	1.93	2.05
6	处理	741	1.95	2.06
9	CK	660	1.96	2.13
9	处理	725	1.92	1.93

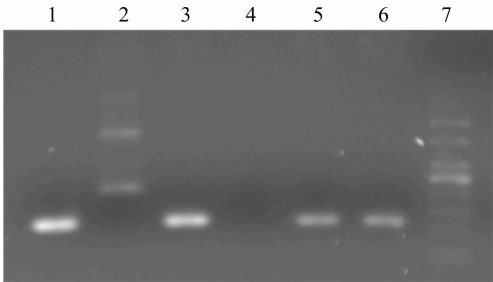


1—0 d; 2—3 d 的 CK 组; 3—3 d 的处理组; 4—6 d 的 CK 组; 5—6 d 的处理组; 6—9 d 的 CK 组; 7—9 d 的处理组; 8、9—marker

图 5 第 3 次优化 CTAB 法提取猕猴桃总 RNA 电泳结果

2.2 猕猴桃果实内参基因的筛选

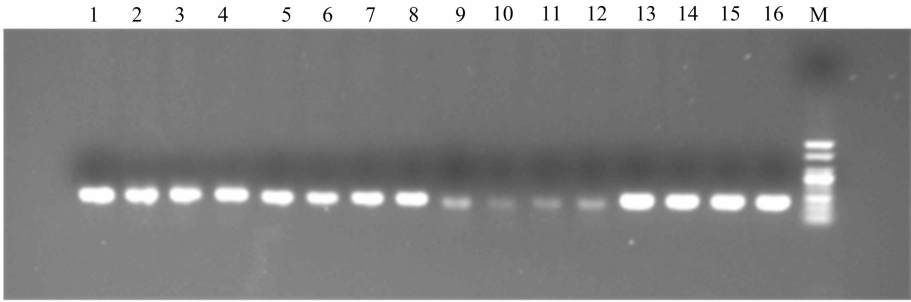
2.2.1 半定量 PCR 筛选猕猴桃果实内参基因 PCR 产物用溴化乙锭染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 GelDoc XR (Bio-Rad,美国)照相记录。对 *ACTB*、*TUB*、*Actin*、*GAPDH*、18S rRNA 5 个内参基因进行初步筛选。从图 6 看出,将猕猴桃贮藏 0 d 的 cDNA 分别加入 5 对内参引物进行 PCR 扩增,电泳结果为 *ACTB* 和 18S rRNA 亮度最高,*Actin* 有二聚体,*GAPDH* 没有表达,*TUB* 亮度相对较低,因此内参初步筛选结果为 *ACTB*、18S rRNA。



1—*ACTB*; 2—*Actin*; 3—18S rRNA; 4—*GAPDH*; 5、6—*TUB*; 7—marker

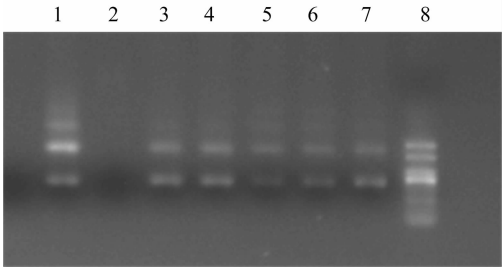
图 6 5 个内参基因电泳结果

由图 7 可知,将猕猴桃不同时间和不同处理的 cDNA 通过分别加入 *ACTB*、18S rRNA、*TUB* 和 *GAPDH* 这 4 对内参引物进行 PCR 扩增,电泳结果为 *ACTB*、18S rRNA 亮度最高且表达较稳定,*TUB* 亮度相对较低,而 *GAPDH* 亮度高但表达稳定性不高。



1~4—*ACTB* 基因贮藏 3 d 的 CK 组、贮藏 6 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的处理组; 5~8—18S rRNA 基因贮藏 3 d 的 CK 组、贮藏 6 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的处理组; 9~12—*TUB* 基因贮藏 3 d 的 CK 组、贮藏 6 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的处理组; 13~16—*GAPDH* 基因贮藏 3 d 的 CK 组、贮藏 6 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的 CK 组、贮藏 9 d 的处理组; M—marker

图7 *ACTB*、18S rRNA、*TUB*、*GAPDH* 内参基因电泳结果



1—贮藏 0 d; 2—CK3; 3—处理3; 4—CK6; 5—处理6; 6—CK9; 7—处理9; 8—marker

图8 *Actin* 内参基因电泳结果

2.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 *ACTB*、*TUB* 和 18S rRNA

由表 7 可知,*TUB* 的  $C_T$  值基本在 32 以上,说明 *TUB* 基因基本不表达,18S rRNA 的  $C_T$  值介于 8.0 ~ 11.0 之间,值相对偏低,不适宜作为徐香猕猴桃果肉的内参基因,而 *ACTB* 的  $C_T$  值介于 19.0 ~ 24.0 之间,表达稳定性相对较高,因此选择 *ACTB* 作为荧光定量 PCR 的内参基因。

3 讨论

3.1 优化 CTAB 法提取徐香猕猴桃总 RNA

优化后的 CTAB 法所用试剂均是常规试剂,可有效降低试验成本<sup>[12-13]</sup>。本研究中优化 CTAB 法的关键:(1)提取猕猴桃总 RNA 时样起始量不能太大,否则提取液不能完全消化猕猴桃内的物质,优化后选取的样品质量为 0.4 g。(2)CTAB 含量由 2.0% 提高到 2.5%,CTAB 是蛋白质的变性剂,提高 CTAB 含量可以有效去除果实中的蛋白质。(3)提取液中  $\beta$ -巯基乙醇含量由 2% 提高到 10%,可以变性蛋白,有效抑制 RNA 酶的活性<sup>[14]</sup>,同时, $\beta$ -巯基乙醇作为有效还原剂,能有效抑制酚类物质及内源酚的氧化,防止褐化效应发生,提高 RNA 提取质量。(4)三氯甲烷-异戊醇抽提次数增加至 3 次,三氯甲烷和异戊醇混合液使蛋白质变性、分层,且可以去除脂类,还可使有机相和无机相迅速分离,从而有效回收 RNA。(5)LiCl 由 1/3 体积增加至 1/2 体积,高浓度 LiCl 在选

择性沉淀 RNA 的同时,可使多糖留在溶液中而不随 RNA 沉淀下来<sup>[15]</sup>。LiCl 沉淀需要在 4 ℃ 放置过夜,时间长,但是 RNA 的产率高,且 RNA 纯度高,从而降低了 RNA 降解的概率。LiCl 本身沉淀大片段 RNA 效果好的特点使得到的 RNA 大片段损失很少,更适于进行后续的分子生物学试验<sup>[16]</sup>。(6)70% 乙醇洗涤增加至 3 次。多次乙醇洗涤可有效去除多糖,同时高浓度的 NaCl 也有助于去除多糖<sup>[17]</sup>。(7)加入 0.5 g/L 亚精胺可以有效抑制 RNA 酶活性。基于以上优化后的 CTAB 法提取的猕猴桃总 RNA,完全可以满足 RT-PCR、Northern Blotting 等分子生物学试验的要求。

表 7 *ACTB*、*TUB* 和 18S rRNA qRT-PCR 结果

基因	贮藏时间(d)	组别	$C_T$ 平均值
<i>ACTB</i>	0	0	21.96
	3	CK	19.30
	3	处理	23.37
	6	CK	20.40
	6	处理	20.93
	9	CK	23.77
	9	处理	22.79
	9	处理	22.79
	9	处理	22.79
<i>TUB</i>	0	0	35.09
	3	CK	36.00
	3	处理	32.50
	6	CK	32.47
	6	处理	32.74
	9	CK	32.92
	9	处理	33.21
	9	处理	33.21
	9	处理	33.21
18S rRNA	0	0	8.70
	3	CK	9.33
	3	处理	9.84
	6	CK	9.79
	6	处理	10.31
	9	CK	10.05
	9	处理	10.86
	9	处理	10.86
	9	处理	10.86

注: $C_T$  表示从基线到指数增长拐点所对应的循环数。

择性沉淀 RNA 的同时,可使多糖留在溶液中而不随 RNA 沉淀下来<sup>[15]</sup>。LiCl 沉淀需要在 4 ℃ 放置过夜,时间长,但是 RNA 的产率高,且 RNA 纯度高,从而降低了 RNA 降解的概率。LiCl 本身沉淀大片段 RNA 效果好的特点使得到的 RNA 大片段损失很少,更适于进行后续的分子生物学试验<sup>[16]</sup>。(6)70% 乙醇洗涤增加至 3 次。多次乙醇洗涤可有效去除多糖,同时高浓度的 NaCl 也有助于去除多糖<sup>[17]</sup>。(7)加入 0.5 g/L 亚精胺可以有效抑制 RNA 酶活性。基于以上优化后的 CTAB 法提取的猕猴桃总 RNA,完全可以满足 RT-PCR、Northern Blotting 等分子生物学试验的要求。

### 3.2 徐香猕猴桃内参基因的优化

选择一种或多种参考基因作为内参基因用来分析 qRT-PCR 基因的表达,同时参考基因需要不受试验条件的影响<sup>[18]</sup>。qRT-PCR 分析最常用的参考基因包括 *Actin*、18S RNA、*GADPH*、*TUB* 等<sup>[19]</sup>。有研究表明,相同植物的不同品种、不同组织器官以及相同组织器官在不同发育阶段,同一基因的表达均会出现差异<sup>[20-21]</sup>。因此,根据猕猴桃的品种及不同的处理方式,选用合适的内参基因对其他基因的表达水平进行归一化,才能对试验结果进行正确判断与比对。随着分子生物学研究的广泛开展和不断深入,基因表达分析已经广泛应用于猕猴桃基因代谢调控机制的研究中,因此筛选稳定的内参基因在基因表达分析中起着关键作用<sup>[22]</sup>。

张慧琴等发现,*TUB* 和 *ACTB* 在华特猕猴桃 6 种不同组织中表达均稳定,适合作为华特猕猴桃不同组织基因表达的内参基因<sup>[9]</sup>。本试验通过半定量 PCR 检测 *ACTB*、*TUB*、*Actin*、*GAPDH*、18S rRNA 这 5 个内参基因可知,*ACTB* 在徐香猕猴桃果实中表达最稳定。由本研究结果可知,通过荧光定量 PCR 进一步确定 *ACTB* 适合作为徐香猕猴桃果实的内参基因。因此,通过半定量 PCR、qRT-PCR 最终选择 *ACTB* 作为徐香猕猴桃果肉的内参基因,用于实时荧光定量 PCR 分析。这些研究结果可为下一步揭示徐香猕猴桃衰老机制研究提供有力的试验方法。

#### 参考文献:

- [1]王 杰,王 全,田 娜,等. 不同植物组织 RNA 提取方法的比较分析[J]. 北京农学院学报,2015,30(1):76-80.
- [2]汤三妹,杨 娟,周秋莲,等. 猕猴桃 RNA 提取与 RT-PCR[J]. 生物技术通报,2005(5):67-71.
- [3]陈昆松,徐昌杰,张上隆,等. 富含多糖猕猴桃果实组织中总 RNA 提取方法的改进[J]. 植物生理学报,1998(5):371-373.
- [4]梅晓宏,高红岩,罗云波. 提取猕猴桃果实总 RNA 的新方法[J]. 中国食品学报,2007,7(3):55-57.
- [5]刘胜洪,刘 文,刘明峰,等. 一种高效提取猕猴桃 DNA 和 RNA 的方法[J]. 生物技术通报,2011(9):171-175.
- [6]Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR[J]. Nature Protocols, 2006, 1(3):1559-1582.
- [7]Ferradas Y, Rey L, Martinez O, et al. Identification and validation of reference genes for accurate normalization of real-time quantitative PCR data in kiwifruit[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 102:27-36.
- [8]刘 军. 猕猴桃 *GalUR* 基因克隆及功能分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [9]张慧琴,谢 鸣,肖金平,等. 猕猴桃实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 浙江农业学报,2015,27(4):567-573.
- [10]张 波. 猕猴桃脂氧合酶基因家族的功能解析及其调控[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [11]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):41-45.
- [12]张 涛,韩 梅,刘翠晶,等. 人参总 RNA 提取方法及反转录酶的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):34-37.
- [13]刘 波,张晓明,郭巧生,等. 百蕊草根系总 RNA 提取方法比较及优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):44-46.
- [14]王静毅,郑丽珊,冀小蕊,等. 番木瓜果皮和种子总 RNA 提取方法的研究[J]. 热带农业科学,2006,26(6):18-20.
- [15]郝福玲,刘雅莉,王跃进. 百合花瓣总 RNA 提取方法的研究[J]. 西北植物学报,2005,25(6):1143-1147.
- [16]宋 蓓,赵 锦,刘孟军,等. 改良 CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立[J]. 中国农学通报,2007,23(7):79-83.
- [17]邵 毅,罗云波,张京声,等. 李果实高质量 RNA 提取方法的比较和优化[J]. 北京林业大学学报,2010,32(1):57-62.
- [18]Vandesompele J, de Preter 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):research0034.1-research0034.11.
- [19]Thellin O, Elomoulij B, Heinen E, et al. A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(4):323-333.
- [20]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 Research, 2004, 64(15):5245-5250.
- [21]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.
- [22]Gu C S, Chen S M, Liu Z L, et al. Reference gene selection for quantitative Real-Time PCR in chrysanthemum subjected to biotic and abiotic stress[J]. Molecular Biotechnology, 2011, 49(2):192-197.