

不同人源性细胞中内参基因的筛选

李俊慧, 裴倩倩, 赵晓转, 王新明, 刘功成

(郑州标源生物与科技有限公司 研发部, 河南 郑州 450016)

摘要: 目的 为筛选在不同人源性细胞中能够稳定表达的内参基因, 以期为不同组织的定量研究提供一定的参考。方法 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测 36 种人源性细胞中 β -珠蛋白 (β -Globin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、核糖体 RNA (18S rRNA) 和核糖核酸酶 P (Rnase P) 4 个候选内参基因的表达量, 并利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 三个软件对候选内参基因的稳定性进行评价。结果 同一种细胞中, Rnase P 的表达量较高; 不同细胞中, 18S rRNA 的表达较为稳定。结论 综合分析发现候选内参基因 18S rRNA 虽较为稳定, 但并不是最优选择。

关键词: 人源性细胞; 内参基因; 筛选

中图分类号: Q812

Screening of reference genes in different human-derived cells

LI Junhui, PEI Qianqian, ZHAO Xiaozhuan, WANG Xinming, LIU Gongcheng

(Research and Development Department, Zhengzhou Bioyuan Biotech Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450016, China)

Abstract: **[Objective]** To screen internal reference genes that can be stably expressed in different human-derived cells, in order to provide a certain reference for quantitative research of different tissues. **[Methods]** The Expression of β -Globin, GAPDH, 18S rRNA and Rnase P four candidate reference genes in 36 types of human-derived cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The stability of four candidate reference genes was evaluated using geNorm, NormFinder and BestKeeper software. **[Results]** In the same type of cell, the expression of Rnase P is relatively high; in different cells, the expression of 18S rRNA is relatively stable. **[Conclusion]** Comprehensive analysis found that although the candidate reference gene 18S rRNA is relatively stable, it is not the best choice.

Keywords: human-derived cells; reference genes; screen

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 因其具有准确性高、操作简单、特异性强等优点, 常被用于基因表达分析、病毒载量定量和基因突变检测等^[1-2]。但 RT-qPCR 的检测结果会受样品 RNA 完整性、cDNA 质量、引物特异性及扩增效率等因素的影响, 因此, 为提高 RT-qPCR 检测结果的准确性需要引入一个或多个稳定表达的内参基因对目的基因进行校正和标准化^[3]。内参基因, 又称管家基因, 在各组织和细胞中的表达相对恒定, 一般用来做为参照物。其主要作用是校正上样量、上样过程中存在的实验误差, 保证实验结果的准确性。常用的内参基因包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、核糖核酸酶 P (Rnase P)、核糖体 RNA

(18S rRNA 和 28S rRNA)、 β -珠蛋白 (β -Globin)、 β 2-微球蛋白 (B2M)、 β -肌动蛋白 (β -actin, ACTB)、丁二酸脱氢酶复合物, 亚单位 A (SDHA)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (HPRT1) 和酸性核糖体磷酸蛋白 (ARBP) 等。

本文主要选择 GAPDH、 β -Globin、18S rRNA 和 Rnase P 4 个内参基因作为候选。其中 GAPDH 基因是糖酵解中的关键基因且高度保守, 含量丰富, 占总蛋白的 10%~20%^[4]。18S rRNA 基因是编码真核生物核糖体小亚基的 DNA 序列, 其编码基因 rDNA (18S rRNA/rDNA) 在生物演化过程中相当保守, 存在于所有真核生物细胞中。RnaseP 是一种由催化 RNA 和可变数量的蛋白质组分组成的

且普遍存在的核酸内切酶，常被用作内参使用，在临床使用中的效果被广泛认可^[5]。β-珠蛋白是哺乳类中的一种多重基因群。通过 RT-qPCR 方法筛选在不同细胞中能够稳定表达的内参基因，以期

为不同组织的定量研究提供一定的参考。

1 材料

1.1 细胞

不同人源性细胞如下，见表 1。

表 1 人源性细胞

细胞株名称	来源	细胞株名称	来源	细胞株名称	来源
Hs578T	人乳腺癌细胞	LOVO 4	人结肠癌细胞	OVCAR-3	人卵巢癌细胞
CFPAC-1 5	人胰腺癌细胞	SHG-44	人胶质瘤细胞	SK-OV-3	人卵巢腺癌细胞
LTEP-P	人小细胞肺癌细胞	NCI-H2452	人间皮瘤细胞	Caov-3	人乳突状卵巢腺癌细胞
NCI-N87	人胃癌细胞	RL95-2 2	人子宫内膜癌细胞	colo205	人结肠癌细胞
SKBR-3	人乳腺癌细胞	HCC-94	人子宫鳞癌细胞	sw1116	人结肠腺癌细胞
BT-20	人乳腺癌细胞	C-33A 1	人宫颈癌细胞	LS174T	人结直肠腺癌细胞
T47D	人乳腺导管癌细胞	RBE	人肝胆管癌细胞	HuH6	人肝母细胞瘤细胞
ES-2	人卵巢透明细胞癌细胞	HEPG2	人肝癌细胞	PLC/PRF/5	人肝癌亚历山大细胞
COC2	人卵巢癌细胞	GBC-SD	人胆囊癌细胞	QGY-7703	人肝癌细胞
A2780	人卵巢癌细胞	SK-MES-1	人肺鳞癌细胞	SMMC-7721	人肝癌细胞
COC1	人卵巢癌细胞	MSTO-211H	人肺癌细胞株	HuH7	人肝癌细胞
HT-29 3	人结肠癌细胞	A-431	人表皮癌细胞	293T	人胚肾细胞

1.2 主要试剂及仪器

QIAamp RNA Blood Mini Kit 和 RNase-free DNase 试剂盒购自 Qiagen（德国）有限公司；SLAN-96P 购自上海宏石医疗科技有限公司。

2 方法

2.1 DNA 的提取

根据 Qiagen 公司的 QIAamp RNA Blood Mini Kit 试剂盒中的说明书，提取 36 种细胞中的 RNA。

2.2 候选内参基因 RT-qPCR 检测

新型冠状病毒 PCR 检测中试剂厂家常以 β-Globin、GAPDH、18S rRNA 和 Rnase P 作为内参与目标基因同时反应达到监控实验过程的目的。因此，笔者选择了内参基因分别为 β-Globin、GAPDH、18S rRNA 和 Rnase P 4 个厂家的新型冠状病毒核酸检测试剂盒检测候选内参基因。依据每个厂家试剂盒中的说明书设置相应的程序对提取的 36 种细胞 RNA 进行扩增。

2.3 候选内参基因的稳定性分析

利用 geNorm^[6]、NormFinder^[7] 和 BestKeeper^[8] 三个软件对 4 个候选内参基因的稳定性进行分析。其中，geNorm 和 NormFinder 软件是以 $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{min}}$) 进行分析，geNorm 软件通过计算候选内参基因的平均表达稳定值 (M) 对其稳定性进行评估，该值与内参基因的稳定性呈负相关，一般认为 M 值小于 1.5，内参基因表达

稳定^[6]。NormFinder 软件则以表达稳定值 (SV) 对候选内参基因的表达稳定性进行评价，该值越小，说明基因表达越稳定^[7]。Bestkeeper 软件是通过对样本原始 Ct 值的标准偏差 (SD)、变异系数 (CV) 和相关系数 (r) 进行分析，评价候选内参基因的表达稳定性，SD 和 CV 越小，r 越大，候选内参基因的稳定性越好^[8]。然后，依据 Delta Ct 方法计算各内参基因表达量的平均标准偏差 (STDEV)。基于 geNorm、Normfinder、BestKeeper 和 Delta Ct 四种分析结果，通过 RefFinder 在线分析工具 (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) 计算其几何平均数以获得候选内参基因稳定性的综合指数排名^[9]，综合指数越小，说明基因的表达稳定性越高。

3 结果

3.1 候选内参基因 RT-qPCR 结果

采用实时荧光定量 PCR 技术，检测 36 种人源性细胞中 GAPDH、β-Globin、18S rRNA 和 Rnase P 4 个内参基因，直接用 Ct 值比较同一种细胞中 4 个内参基因的表达水平。Ct 值的定义为荧光达到特定检测阈值水平所需的循环次数，与反应中模板核酸的量呈负相关^[10]。

RT-qPCR 结果显示，人小细胞肺癌细胞 (LTEP-P) 中 GAPDH 和 β-Globin 不表达，人卵巢癌细胞 (A2780) 中 β-Globin 不表达，人胶质瘤细

胞（SHG-44）中 Rnase P、GAPDH 和 β -Globin 不表达。且在同一种细胞中，4 个内参基因的表达量不同，在大部分细胞中，Rnase P 的表达量偏高， β -Globin 的表达含量偏低。见图 1。

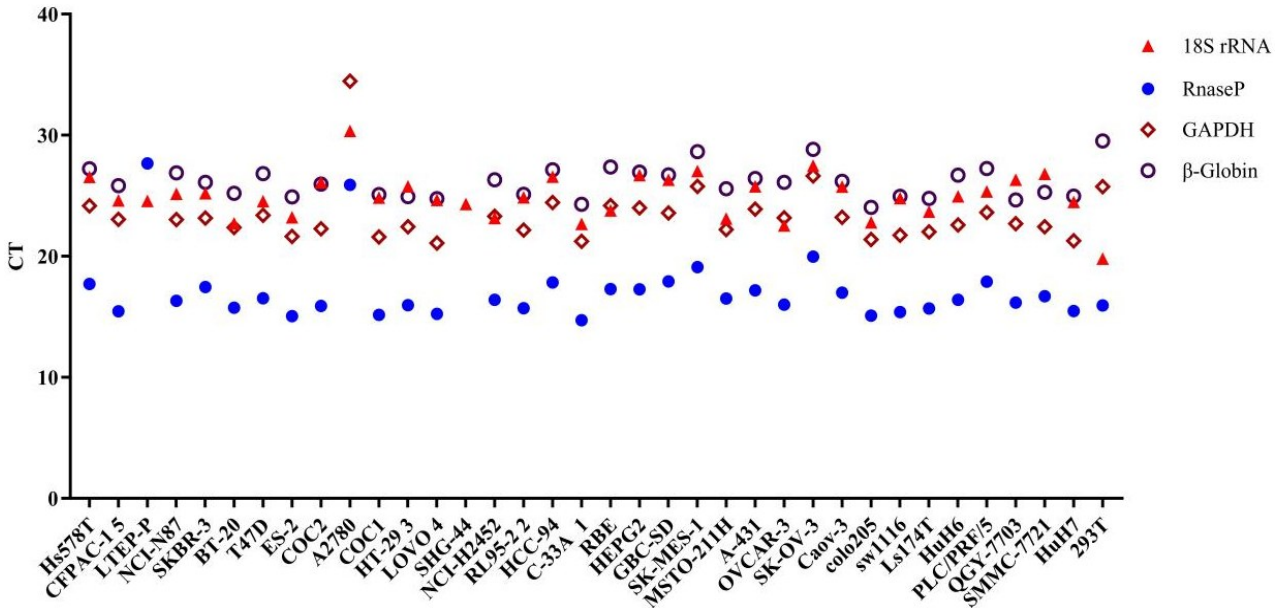


图 1 不同细胞候选内参基因表达量

3.2 候选内参基因的稳定性分析

geNorm 软件分析结果表明，在这 36 种人源性细胞中，4 个候选内参基因的稳定性排序为 18S rRNA=Rnase P>GAPDH> β -Globin，但其平均表达稳定值（M）均大于 1.5。NormFinder 软件结果显示，4 个候选内参基因的稳定性排序为 GAPDH>18S rRNA>Rnase P> β -Globin。BestKeeper 软件结果显示，4 个候选内参基因的稳定性排序为

18S rRNA>Rnase P>GAPDH> β -Globin。采用 Delta Ct 法对候选内参基因的表达稳定性进行分析，结果表明 18S rRNA（5.78）的 STDEV 最小， β -Globin（7.64）的 STDEV 最大。利用 RefFinder 在线工具综合分析结果显示，4 个候选内参基因在不同细胞中的稳定性表达的顺序为 18S rRNA>Rnase P=GAPDH> β -Globin。见表 2。

表 2 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper 分析结果及排名

内参基因	geNorm		NormFinder		BestKeeper						Delta Ct		RefFinder 综合排序	
	M	排序	SV	排序	SD	排序	CV	排序	r	排序	STDEV	排序	基因稳定性	排序
18S rRNA	3.617	1	3.473	2	1.36	1	5.44	1	0.669	4	5.78	1	1.19	1
Rnase P	3.617	1	4.191	3	1.91	2	11.52	2	0.969	1	6.01	3	2.06	2
GAPDH	5.042	2	3.168	1	2.70	3	12.24	3	0.877	2	5.93	2	2.06	2
β -Globin	6.339	3	6.786	4	3.99	4	16.67	4	0.808	3	7.64	4	4.00	3

4 讨论

内参基因是一类始终保持着低水平的甲基化且一直处于活性转录状态的基因，高度保守且在大多数情况下持续表达。其表达水平受环境因素影响较小，而且是在个体生长的大多数或几乎全部组织中持续表达，或变化很小。理想的内参基因应具备以下几个特点：①表达量大；②稳定；③不存在假基因；④表达水平与细胞周期以及细

胞是否活化无关；⑤不受任何内源性、外源性或处理的影响等。

本研究通过 RT-qPCR 方法分析 Hs578T、CFPAC-1 5、LTEP-P、NCI-N87、SKBR-3、BT-20、T47D、ES-2、COC2、A2780、COC1、HT-29 3、LOVO 4、SHG-44、NCI-H2452、RL95-2 2、HCC-94、C-33A 1、RBE、HEPG2、GBC-SD、SK-MES-1、A-431、MSTO-211H、OVCAR-3、SK-OV-3、Caov-3、colo205、sw1116、Ls174T、HuH6、PLC/PRF/5、

QGY-7703、SMMC-7721、HuH7 和 293T 等 36 种细胞中的 4 个候选内参基因的 Ct 值，获得稳定表达内参基因。利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 三个软件对其稳定性进行评价，结果表明不同软件得出的稳定性排序存在一定差异，综合分析显示，18S rRNA 在 36 种细胞中的表达较为稳定。geNorm 软件一般认为 M 值小于 1.5，内参基因表达稳定^[6]，但笔者通过 geNorm 软件分析 36 种人源性细胞中的 4 个候选内参基因，发现候选内参基因的平均表达稳定值（M）均大于 1.5。Bestkeeper 软件一般认为 SD 和 CV 越小，r 越大，候选内参基因的稳定性越好^[8]，但笔者通过 Bestkeeper 软件分析 36 种人源性细胞中的 4 个候选内参基因发现 18S rRNA 的 SD 和 CV 最小，r 却是最大的。因此，geNorm 和 BestKeeper 软件的分析结果是否也说明 18S rRNA 并不是这 36 种细胞中的最优选择。

目前为止，没有一种内参基因是通用的或万能的，RADONIĆ 等^[11]通过实时荧光定量 PCR 方法，检测了心脏、大脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾脏、胰腺、脾脏、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠和结肠和外周血白细胞（PBL）16 种不同人体组织中 13 种管家基因的 RNA 转录水平，研究表明，未发现在每种组织中通用的内参基因，也证实了这一观点。因此，在针对不同的试验以及不同的样本时，应通过验证多种内参基因确定适合自己的。

参 考 文 献

[1] KOU XY, ZHANG L, YANG SZ, et al. Selection and validation of

reference genes for quantitative RT-PCR analysis in peach fruit under different experimental conditions[J]. *Sci Hortie*, 2017, 225: 195-203.

[2] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 611-622.

[3] 徐圆圆, 赵国春, 郝颖颖, 等. 无患子 RT-qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(10): 80-89.

[4] 付国良, 黄晓红. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶功能的研究进展[J]. *生物物理学报*, 2013, 29(3): 181-191.

[5] 何安娜, 张梦怡, 李逢钰, 等. 人乳头瘤病毒 6 型和 11 型通用型含内源性内参的重组酶介导的等温扩增技术检测方法的建立[J]. *新发传染病电子杂志*, 2022, 7(2): 25-29.

[6] VANDESOMPELE J, PRETER KD, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): RESEARCH0034.

[7] ANDERSEN CL, JENSEN JL, ØRNTTOFT 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[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.

[8] 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[J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.

[9] XIE FL, XIAO P, CHEN DL, et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs[J]. *Plant Mol Biol*, 2012.

[10] WALKER NJ. Tech. Sight. A technique whose time has come[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 557-559.

[11] RADONIĆ A, THULKE S, MACKAY IM, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 856-862.

(方丽蓉 编辑)