

文章编号:2095-7386(2016)03-0049-07

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.009

茯苓 β -tubulin 基因实时荧光定量 PCR 体系的建立和评估

吴亚运,赵小龙,胡炳雄,陈平,张绍鹏

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:旨在以不同生长时期茯苓为材料, β -tubulin 基因为内参基因,建立实时荧光定量 PCR 体系。根据 GenBank 上同为真菌的黄曲霉菌 β -tubulin 基因保守区域设计内参引物,以茯苓菌丝体、初期菌核和成熟期菌核 cDNA 为模版,检测内参引物的特异性和稳定性;并对 PCR 反应体系中的引物浓度和模板浓度进行优化;最后利用茯苓转录组数据中 6 个显著差异表达基因对优化后的反应体系进行表达分析与验证。结果显示,综合扩增曲线和溶解曲线分析,在茯苓不同生长发育时期, β -tubulin 基因表达水平基本恒定;对比内参引物在不同浓度条件下的扩增效率,得到模板和引物的最优浓度分别为 80 ng/ μ L 和 1 μ mol/L。在优化后的反应体系中,6 个差异表达基因的表达变化趋势与转录组测序结果基本一致,得到的线性相关系数 r 值均大于 0.9,呈显著性正相关。成功地建立了以 β -tubulin 基因为内参基因的茯苓实时荧光定量 PCR 体系。

关键词:茯苓; β -tubulin;实时荧光定量 PCR;SYBRGreen I;转录组

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

Development and evaluation of real-time PCR conditioning *Wolfiporia cocos* using β -tubulin gene

WU Ya-yun, ZHAO Xiao-long, HU Bing-xiong, CHEN Ping, ZHANG Shao-peng

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The aim of this study is to develop a real-time fluorescence quantitative PCR condition for the β -tubulin gene of *Wolfiporia cocos* in different growth stage. The specific primers of β -tubulin gene were designed by the conserved sequence of *Aspergillus flavus*, cDNA of *Wolfiporia cocos* mycelia, early sclerotium and mature sclerotium were used to evaluate the specificity and stability of β -tubulin gene; And optimize the reaction factors such as primers concentration and template concentration. Then, six significantly differentially expressed genes from *Wolfiporia cocos* transcriptome were used to validate our optimized PCR reaction system. The results showed as follows, according to the amplification curve and melting curve, the expression of β -tubulin was showed stable during different developmental stages in *Wolfiporia cocos*; The optimum concentration of cDNA template and primers were respectively 80 μ g/ μ L and 1 μ mol/L. And, the expression dynamics tendency between differentially expressed genes are

收稿日期:2016-06-01.

作者简介:吴亚运(1990-),男,硕士研究生, E-mail:282595491@qq.com.

通信作者:张绍鹏(1982-),男,博士, E-mail:zsp0106@qq.com.

基金项目:武汉轻工大学生物与制药工程学院院立项目(2015s4).

basically consistent with transcriptome data *Wolfiporia cocos*, in which the liner correlation coefficient r was more than 0.9, showing a significant positive correlation. The real-time fluorescence quantitative PCR system for *Wolfiporia cocos* was successfully established which β -*tubulin* gene as reference gene.

Key words: *Wolfiporia cocos*; β -*tubulin*; real-time fluorescence quantitative PCR; SYBRGreen I; transcriptome

1 引言

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR) 是一种兴起于上世纪 90 年代的核酸定量分析技术。它集合了 PCR 灵敏度高、DNA 杂交特异性强和光谱技术高精度定量的特点,通过探测 PCR 反应中荧光信号的变化,获得特定区段中扩增产物的定量结果,现已广泛应用于分子生物学及医药检疫等研究领域^[1-3]。RT-PCR 分为绝对定量和相对定量,绝对定量是根据已知标准曲线来测定目的基因在样本中的精确拷贝数^[4]。相对定量是测定目的基因在 2 个或多个样本中含量的相对比例,不对基因的表达水平进行精确拷贝数计算。相对定量常需内参基因作为基准,利用内参基因在样品不同发育时期和不同组织细胞中表达水平趋于恒定的特点,对供试基因进行校正和标准化^[5]。常用的内参基因有 β -*tubulin*、*Tub*、*GAPDH*、 β -*actin*、*rRNA* 等^[6-7],其中 β -*tubulin* 基因是细胞骨架结构元件微管的基本结构单位,具有序列高度保守、mRNA 表达量高且稳定等特点,广泛运用于真核生物研究中^[8-9]。

茯苓 *Wolfiporia cocos* 隶属于担子菌门 *Basidiomycetes*,多孔菌科 *Polyporaceae*,的高等真菌,其菌核是一种传统中药,《中国药典》2015 版收录有茯苓与茯苓皮两味药材^[10]。茯苓味甘、淡、性平,具有利尿渗湿、健脾宁心之功效,是我国珍贵的中药资源^[11-12]。目前对茯苓的药用研究主要集中于其有效成分、化学结构、药理作用等宏观层面,但在微观的分子领域,即通过研究茯苓差异表达基因的结构和功能,对茯苓代谢产物的合成条件与途径的调控方面却少有报道。

本研究根据 GenBank 上同为真菌的黄曲霉菌 β -*tubulin* 基因保守区域设计内参引物,以茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核的 cDNA 为模版,基于 Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 系统,采用 SYBR Green I 作为荧光染料,并对引物浓度和模板浓度 2 个反应因子进行优化,建立实时荧光定量 PCR 反应体系。利用 Illumina Hiseq 2000 高通量测序获得茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核的转录组

数据,使用 Trinity 和 TGICL 软件实现 Unigene 的 de novo 拼接,基于 BLAST 完成 Unigene 的蛋白质功能注释、KOG 功能注释、GO 分类和 KEGG 代谢通路分析。并从中选取 6 个差异表达基因:Comp12014_c0_seq1、Comp16737_c0_seq5、Comp13512_c0_seq1、Comp17073_c0_seq1、Comp19942_c1_seq2、Comp18048_c0_seq9,对优化后的 PCR 反应体系进行评测,均得到理想结果。为以 β -*tubulin* 基因作为内参基因进行茯苓代谢产物生物合成相关功能基因的差异表达验证奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

茯苓样品 *Wolfiporia cocos* 菌核于 2015 年采自湖北省罗田县九资河茯苓种植基地。根据 Shu 等^[13]报道,将菌核接种至 PDA 培养基,经分离纯化得到纯种茯苓菌种,通过菌种培养进一步得到茯苓菌丝。

真菌 RNA 提取试剂盒 (RN53 EASYspin Plus),购自北京艾德莱生物公司;反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit)、DNA 标志物 (DL2000 DNA Marker)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Premix ExTaq)、PCR 试剂盒 (PrimeScript © RT Master Mix),均购自 TaKaRa 公司。PCR 仪: Eppendorf 公司;超微量紫外分光光度计: Merinton 公司;ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪: 美国应用生物系统公司; Tanon Gis2010 凝胶成像系统: 天能科技(上海)公司。

2.2 方法

2.2.1 总 RNA 提取、质量检测与反转录

茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核总 RNA 的提取按照试剂盒说明书操作,总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性、超微量紫外分光光度计检测浓度和纯度。以提取的茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核总 RNA 为模版, Oligo-dT 为引物,分别反转录合成 cDNA,保存于 -20°C 。

2.2.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上同为真菌的黄曲霉菌 β -*tubulin* 基因保守区域为参照,依据 RT-PCR 引物设计原则,

利用 NoePrimer2.03 和 Primer5.0 引物设计软件设计引物 *β-tubulin*-F、R,用于扩增茯苓 *β-tubulin* 基因片段,推测目的片段长度为 130 bp 左右。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,*β-tubulin*-F:5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3',*β-tubulin*-R:5'-GCACTTCTCCAGACTACAAC-3'。

2.2.3 *β-tubulin* 基因目的片段扩增及鉴定

以反转录合成的 cDNA 为模版,*β-tubulin*-F、R 为引物,进行普通 PCR 扩增。扩增反应体系为 25 μ L: ddH₂O 8.5 μ L,2 $\times$ Tap PCR Mastermix 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L,cDNA 2 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。分别取 5 μ L 扩增产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测目的片段扩增长度及内参引物退火温度的特异性。

2.2.4 模版浓度的优化

选用茯苓菌丝体 cDNA 为模版,通过超微量紫外分光光度计检测其浓度,在所得 cDNA 浓度范围内依次设置 0.5 ng/ μ L,5 ng/ μ L,20 ng/ μ L,60 ng/ μ L,80 ng/ μ L,5 个模版浓度梯度,在 *β-tubulin* 内参引物浓度相同的前提下,从 RT-PCR 反应后得到的扩增曲线中选取最优模版浓度。

2.2.5 引物浓度的优化

选取最优浓度的茯苓菌丝体 cDNA 为模版,通

过超微量紫外分光光度计检测 *β-tubulin* 内参引物浓度,在所得浓度范围内依次设置 0.1 μ mol/L,0.5 μ mol/L,1 μ mol/L,5,10 μ mol/L,5 个引物浓度梯度,从 RT-PCR 反应后得到的扩增曲线中选取最优引物浓度。

2.2.6 *β-tubulin* 内参基因适用性验证

以反转录合成的 cDNA 为模版,*β-tubulin*-F、R 为引物,选取最优反应条件,由 RT-PCR 反应后得到的溶解曲线和扩增曲线分别检测内参引物的特异性和目的基因的表达水平。

2.2.7 优化后反应体系的评测

从茯苓转录组数据中选取 6 个显著差异表达基因: Comp12014_c0_seq1、Comp16737_c0_seq5、Comp13512_c0_seq1、Comp17073_c0_seq1、Comp19942_c1_seq2、Comp18048_c0_seq9。通过对比差异表达基因的 RPKM 值(表 1)与其在反应过程中实际表达水平的变化趋势,对优化后的 RT-PCR 反应体系进行重复性和稳定性检测。根据茯苓转录组数据,利用 NoePrimer2.03 和 Primer5.0 引物设计软件,分别对 6 个差异表达基因设计特异性引物(表 1),引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

表 1 差异表达基因信息

基因名称	引物序列	RPKM(菌丝体/初期菌核/ 成熟菌核)值	功能
Comp12014_c0_seq1	正:5'-ACGGAGGTTGTGTATC-3' 反:5'-CTGGTGAGAGTCTTGTGTG-3'	0.13/204.117/96.6633	Dihydroxy-acid dehydratase
Comp16737_c0_seq5	正:5'-CGCCTGCTCACTATCT-3' 反:5'-GCTTTGGTGATGTTCCG-3'	5.31/14.9367/26.43	G-protein coupled receptor signaling pathway
Comp13512_c0_seq1	正:5'-GATTTTGTGTTTGGTG-3' 反:5'-GGTACTGTCCGCTGAT-3'	415.067/56.5567/302.547	Cysteine proteinase
Comp17073_c0_seq1	正:5'-TGGTGCGTAAGGTTCA-3' 反:5'-CGATTATCTTGATTGCG-3'	6.39333/2.46667/0.45	Cytochrome P450 monooxy- genase
Comp19942_c1_seq2	正:5'-AGCCAGTAAAGGGTCC-3' 反:5'-ATCCGTCTGTCGTCGT-3'	9.54667/26.62/9.1467	Mitogen-activated protein ki- nase
Comp18048_c0_seq9	正:5'-GTCCAGTGGCATTAG-3' 反:5'-CTTTGTCTGCTGTGTCT-3'	13.7033/4.83/2.67	G-protein coupled receptor signaling pathway

3 结果

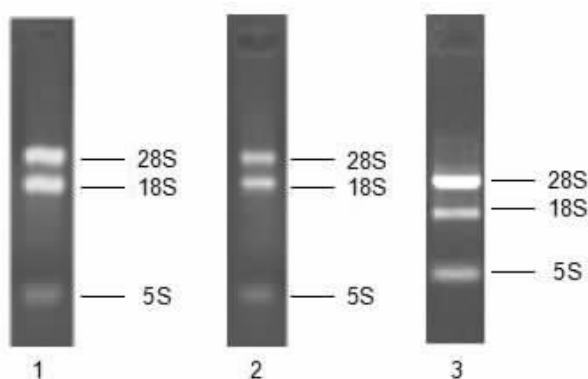
3.1 总 RNA 质量检测

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核总 RNA 的完整性进行检测(图 1)。

结果显示总 RNA 中 28S、18S 和 5S 三条特征条带清晰明亮,无 DNA 和其它杂质的污染。表明总 RNA 未发生降解,完整性良好。

采用超微量紫外分光光度计对茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核总 RNA 的浓度和纯度进行检测。

结果显示茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核总 RNA 浓度分别为 1 053 ng/ μ L、779 ng/ μ L 和 845 ng/ μ L, A260/A280 值介于 1.9—2.0 之间, A260/A230 值介于 2.0—2.2 之间。表明总 RNA 中无蛋白质或酚类等有机物污染,具有较高的纯度及浓度,满足反转录和 PCR 实验要求。



1-茯苓菌丝体总 RNA 2-茯苓初期菌核总 RNA
3-茯苓成熟菌核总 RNA

图1 茯苓不同生长发育时期总 RNA 电泳结果

3.2 β -tubulin 基因目的片段的 PCR 扩增检测

采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 β -tubulin 基因普通 PCR 扩增产物进行检测(图 2)。结果显示,在茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核这 3 个生长时期, β -tubulin 基因扩增得到的目的片段长度均在 130 bp 左右且无杂带,与预期结果一致。表明 β -tubulin-F、R 引物特异性强,PCR 反应选取的引物退火温度适宜,无需再进行引物退火温度的优化。



M-Marker 1-茯苓菌丝体 2-茯苓初期菌核
3-茯苓成熟菌核

图2 β -tubulin 基因目的片段 PCR 扩增结果

3.3 模板浓度优化检测

采用超微量紫外分光光度计检测茯苓菌丝体

cDNA 浓度,用 EASY Dilution 试剂依次稀释为 0.5 ng/ μ L, 5 ng/ μ L, 20 ng/ μ L, 60 ng/ μ L, 80 ng/ μ L 5 个浓度梯度,选取相同浓度的 β -tubulin-F、R 引物进行 RT-PCR 反应,并设置阴性对照 1 例,对 cDNA 模板浓度进行优化检测(图 3)。结果显示在浓度梯度的扩增曲线中,当模板浓度为 80 ng/ μ L 时,得到的 Ct 最小,扩增效率最高,因此模板的最优浓度为 80 ng/ μ L。

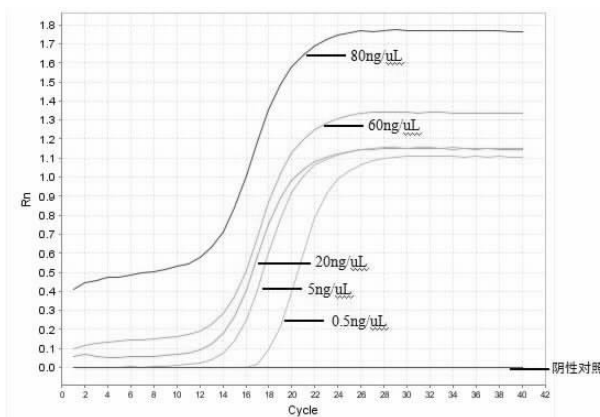


图3 模板浓度优化结果

3.4 引物浓度优化检测

在模板最优浓度确定后,采用超微量紫外分光光度计检测 β -tubulin-F、R 引物浓度,用 EASY Dilution 试剂依次稀释为 0.1 μ mol/L, 0.5 μ mol/L, 1 μ mol/L, 5 μ mol/L, 10 μ mol/L 5 个浓度梯度,进行 RT-PCR 反应,并设置阴性对照 1 例,对引物浓度进行优化检测(图 4)。结果显示在浓度梯度的扩增曲线中,当引物浓度为 1 μ mol/L 时,得到的扩增曲线最好,扩增效率最高,因此引物的最优浓度为 1 μ mol/L。

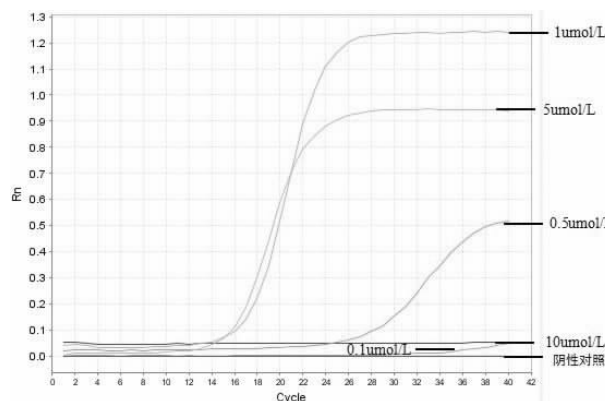


图4 引物浓度优化结果

3.5 β -tubulin 内参基因适用性检测

分别以茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核的

cDNA 为模板, β -tubulin-F、R 为引物,选取最优反应条件,并设置阴性对照 1 例进行 RT-PCR 反应,对 β -tubulin 内参基因的适用性进行检测(图 5—6)。结果显示,在茯苓不同生长时期的扩增曲线中, β -tubulin 内参基因 CT 值均在 19 个循环左右,且无较大差异,说明该基因在茯苓不同发育时期表达量稳定;在 3 个不同时期的溶解曲线中, β -tubulin 内参基因均在 84.5 $^{\circ}\text{C}$ 时出现单一特异峰,且峰形锐利,由此进一步得知所用内参引物扩增出的目的条带单一,无引物二聚体及非特异性扩增产物,特异性强。

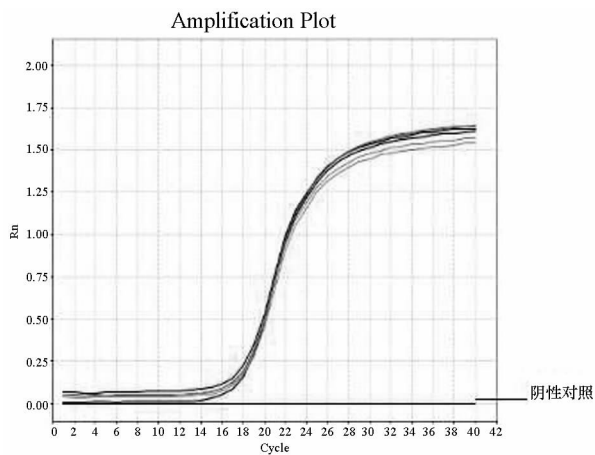


图 5 β -tubulin 基因扩增曲线

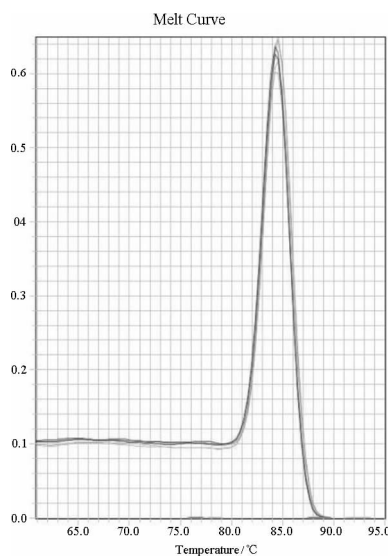


图 6 β -tubulin 基因溶解曲线

3.6 最优 RT-PCR 反应体系的确立与评测

通过对茯苓 β -tubulin 基因的实时荧光定量 PCR 反应体系条件的摸索,成功建立了基于 SYBR Green I 为荧光染料的相对定量 RT-PCR 方法,其最优反应体系为 20 μL 体系:SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , 1 $\mu\text{mol/L}$

上、下游引物各 1 μL , 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 cDNA 模板 2 μL , RNase Free dd H₂O 6 μL 。最佳 PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 进行 40 个循环。

选取茯苓转录组中 6 个差异表达基因: Comp12014_c0_seq1、Comp16737_c0_seq5、Comp13512_c0_seq1、Comp17073_c0_seq1、Comp19942_c1_seq2、Comp18048_c0_seq9, 以茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核的 cDNA 为模版, 运用(表 1)中引物, 并设置阴性对照 1 例进行 RT-PCR 反应。通过比较差异表达基因在茯苓不同生长时期的 RPKM 值与其在 RT-PCR 反应中实际表达量水平的变化趋势, 对优化后的反应体系进行评测(图 7)。结果显示, 6 个差异表达基因的表达量变化趋势与转录组测序结果基本一致, 进一步由 6 个差异表达基因的 RPKM 值和其在 RT-PCR 中得到的 CT 值, 计算出 2 组数据间的线性相关系数, 得到 r 值均大于 0.9, 表明为显著性正相关。

4 讨论

实时荧光定量 PCR 作为目前分析目的基因转录水平最为敏感的方法, 以操作简便、封闭无污染、重复性好、结果易于分析^[14] 而广泛应用于各学科研究中。但该方法所涉及前期准备事项繁多, 如内参基因筛选、样品 RNA 提取、模板和引物浓度的选择及所用试剂等因素都会对最终的定量结果造成影响。因此, 对比性的选取适用于供试样品的最优反应条件, 才能确保定量结果的准确性^[15-16]。

反应体系中选用的 SYBR Premix Ex Taq II 是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 反应的专用试剂, SYBR Premix Ex Taq II 中已将 DNA 聚合酶、Buffer、dNTP、SYBR Green I 等试剂混合均匀, 实验时 PCR 反应液的配制十分方便。另外, SYBR Premix Ex Taq II 中添加了耐热性 RNaseH, 在以 cDNA 为模板进行 PCR 反应时, 可以最大限度抑制 cDNA 中残存的 mRNA 对 PCR 反应造成的损害作用。SYBR Green I 是一种脱氧核糖核酸结合染料, 能与任意双链 DNA 在任意反应条件下结合并发出荧光^[17-19]。所以当 RT-PCR 中出现非特异性扩增时, 同样会出现荧光信号积累, 在反应过程中引物浓度过高或模板浓度过低都将导致 PCR 非特异性扩增, 进而影响定量结果^[20-21]。本研究中对引物和模板各设置 5 组浓度梯度进行 RT-PCR 反应。通过对比扩增曲线在不同浓度条件下的扩增效

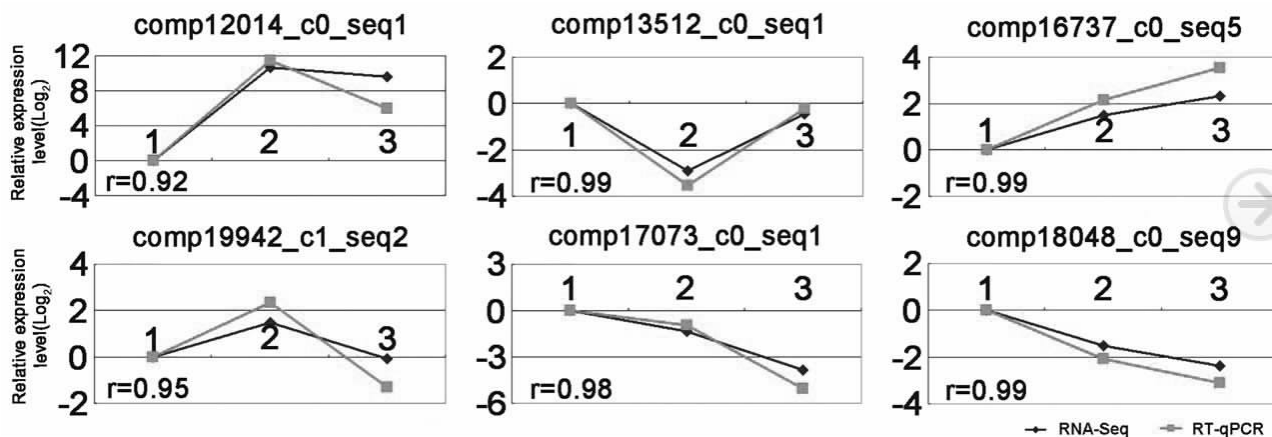


图7 差异表达基因的表达量验证

率,确定模板和引物的最佳反应浓度,从而避免了非特异性扩增及扩增效率差异对定量结果的影响。

β -tubulin 基因作为内参基因常用于相对定量结果的校正,但尚未见到有关茯苓 β -tubulin 基因用于荧光定量 PCR 研究的报道。近年来,随着基因克隆和测序技术的不断发展,对个体在不同生长阶段及各组织细胞中基因表达水平的定量分析,已成为探索生物体生命活动规律和调节机制的关键手段。本研究从茯苓转录组中选取参与调控细胞色素 P450 氧化酶、半胱氨酸蛋白酶、丝裂原活化蛋白酶等生物酶合成的 6 个显著差异表达基因,以 β -tubulin 基因为内参基因,在茯苓菌丝体、初期菌核和成熟菌核 3 个生长发育时期进行表达差异验证。得到的表达量变化趋势与转录组测序结果基本一致,由 6 个差异表达基因的 RPKM 值与其在 RT-PCR 中的 CT 值,得到 2 组数据间的线性相关系数 r 值均大于 0.9,呈显著性正相关。本研究建立的茯苓 β -tubulin 基因 RT-PCR 方法,经实验结果表明,操作简单有效、特异性强、重复性好,对进一步阐明茯苓相关基因的功能和茯苓生长发育中物质合成与代谢通路的分子作用机制提供了有效的方法学基础。

5 结论

本研究以茯苓 3 个不同生长阶段的 cDNA 为模板, β -tubulin 基因作为内参基因,通过对引物扩增效率与特异性的检测以及模板和引物浓度的优化,建立了茯苓实时荧光定量 PCR 体系。并从茯苓转录组数据中挑选出 6 个显著差异表达基因,对比分析基因表达量变化趋势,进一步对 PCR 体系进行实验验证。

参考文献:

- [1] Chung H W. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative-competitive PCR (QC-PCR)[J]. Exp Mol Med, 2001, 33(11):85-87.
- [2] Dussault A A, Poullot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR[J]. Biol proced, 2006, 8(1):1-10.
- [3] 陈旭, 齐风坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8):148-155.
- [4] Dhanasekaran S, Doherty T M, Kenneth J, et al. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification[J]. J Immund Methol, 2010, 354(1/2):34-39.
- [5] Rajarapu S P, Mamidala P, Mittapalli O. Validation of reference genes for gene expression studies in the emerald ash borer (Agrilus planipennis)[J]. Insect Sci, 2012, 19(1):41-46.
- [6] 董恩妮, 梁青, 李利, 等. 实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(11):92-96.
- [7] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8):1119-1125.
- [8] Michael J Sweeney, PilarPamies, Alan D. W Dobson. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in Aspergillus parasiticus 439[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 56(1):97-103.
- [9] 徐国恒. 细胞骨架-微管[J]. 生物学通报, 2005, 40(5):21-22.

- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [11] 梁学清,李丹丹,黄忠诚. 茯苓药理作用研究进展[J]. 河南科技大学学报,2012,30(2):154-156.
- [12] 刁铁成. 茯苓药理作用的初步研究[J]. 中医临床研究,2015,7(8):23-24.
- [13] Shu S H, Chen B, Zhou M C, et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e71350-71352.
- [14] Haller F, Kulle B, Schwager S, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 335(1):1-9.
- [15] 杨怡妹,孙晓娜,王小利,等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索,2011,30(7):15-19.
- [16] Woo T H, Patel B K, Cinco M, et al. Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35(1):23-30.
- [17] Navidshad B, Liang J B, Jahromi M F. Correlation Coefficients Between Different Methods of Expressing Bacterial Quantification Using Real Time PCR [J]. International Journal Molecular Science, 2012, 13(2):2119-2132.
- [18] 孙炳剑,陈清清,袁虹霞,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用[J]. 中国农业科学,2015,48(1):55-62.
- [19] 陈海一,迟德富,姚大彬,等. SYBR Green I 法洋虫 β -action 基因实时荧光定量 RT-PCR 体系的建立[J]. 中国农学通报,2013,29(12):157-163.
- [20] Chris H, Philippa L, Severine T, et al. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(2):241-244.
- [21] 周晓丽,朱国坡,李雪华,等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(2):87-89.

(上接第 48 页)

- [10] Kashion S S, Vallerskog T, Martens G, et al. Initiation of acquired immunity in the lungs of mice lacking lymph nodes after infection with aerosolized *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Am J Pathol, 2010, 176(1):198-204.
- [11] Van Crevel R, Ottenhoff T H, Van der Meer J W, Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2):294-309.
- [12] Leuillet C, Martinon F, Perez C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors [J]. J Immunol, 2006, 177(9):6245-6255.
- [13] Cambier C J, Stanley Falkow, Latita Ramakrishnam. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Cell. 2014, 159:1497-1509.
- [14] 卢佳丽,杨晓明. 结核分枝杆菌的免疫学研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2010(01):74-78.
- [15] Flynn JL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections [J]. Microbes Infect, 2006, 8(4):1179-1188.
- [16] 董毅,吴利先. T 细胞免疫在抗结核杆菌感染中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 18:3593-3595.
- [17] O'Garra A, Redford P S, McNab F W, et al. The Immune Response in Tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31:475-527.
- [18] Sud D, Bigbee C, Flynn JL, et al. Contribution of CD8 + T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. The Journal of Immunology, 2006, 176(7):4296-4314.