

# 山羊不同组织实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

徐颂为, 黄 忍, 杨 璐, 向 华\*, 张焕容\*

(西南民族大学 畜牧兽医学院, 成都 610041)

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2021)24-0031-07

**摘要:**为了筛选出在山羊组织中能稳定表达的内参基因, 试验采集 1 月龄简州大耳羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠、皮肤、肌肉、淋巴结和唇 10 个组织样品, 选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、组蛋白 3.3 (H3-histone family 3A, H3F3A)、 $\beta$ -肌动蛋白 (actin- $\beta$ , ACTB) 和肽基脯氨酰异构酶 (peptidylprolyl isomerase, PPIA) 4 个基因做为候选内参基因, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测上述 10 个组织样品的中 4 个候选内参基因的表达情况, 利用 geNorm 软件分析 4 个候选基因的定量数据, 筛选出在山羊组织中表达稳定的内参基因。结果表明: 成功克隆 GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 4 个内参基因, 4 个内参基因的 RT-qPCR 扩增曲线正常, 无引物二聚体和非特异性条带产生, PCR 产物单一, 绘制的标准曲线上各点在同一条直线上。4 个内参基因的稳定性排序为 H3F3A>PPIA>ACTB>GAPDH, 相对表达量依次为 PPIA>H3F3A>ACTB>GAPDH。说明 PPIA 和 H3F3A 基因表达水平较高, 稳定性较好, 可作为后续研究山羊组织中功能基因表达量的最佳内参基因。

**关键词:** 山羊; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; geNorm 软件; 稳定性

开放科学(资源服务)标识码  
Open Science Identity (OSID)



实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 具有定量准确、快速、特异性强、灵敏度高、操作简便等优点, 目前广泛应用于定量检测细胞、体液、组织中 mRNA 转录水平, 可针对检测含量较低的细胞因子 mRNA 的水平<sup>[1]</sup>。但由于样品 RNA 的产量、质量及逆转录效率上存在差别, 可造成试验中实际测得的表达量差异较大<sup>[2]</sup>。为了降低试验的误差, 通常在研究目的基因的表达时会选择内参基因来对目的基因进行校正和标准化, 因此选择表达稳定的内参基因是保证试验结果准确性的关键<sup>[3]</sup>。

内参基因理论上在不同的试验环境、试验条件、品种、组织及生理阶段中, 均有稳定均一的表达量, 且

内参基因和目的基因应该具有相似的转录水平<sup>[4]</sup>。但大量的研究表明, 绝大多数常用的内参基因并不是绝对的稳定表达, 而只是在一定试验条件下的细胞、组织内相对的稳定表达<sup>[5]</sup>。因此, 在试验过程中, 对候选的内参基因的表达进行稳定性分析是十分必要的。常用的内参基因有转录延伸因子 (elongation factors 1 alpha, EF-1 $\alpha$ )、泛素 (ubiquitin, UBQ)、肌动蛋白 (actin, ACT)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、18S rRNA、肽基脯氨酰异构酶 (peptidylprolyl isomerase, PPIA)、 $\beta$ 2-微球蛋白 (beta-2-microglobulin, B2M)、RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNA Pol II)、亲环蛋白 (cyclophilin, CYP)、转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TFRC)、组蛋白 3.3 (H3-histone family 3A, H3F3A)。ACT 是细胞中一种重要的蛋白质, 其基因编码序列是高度保守的, 可当作基因表达研究的内参基因<sup>[6]</sup>。GAPDH 是一种在细胞内表达的蛋白质, 主要参与细胞的糖酵解途径, 具有修复损伤、启动细胞凋亡、参与蛋白磷酸化修饰等生理功能<sup>[7]</sup>。PPIA 基因在山羊肌肉前体脂肪细胞诱导分化

收稿日期: 2021-02-23; 修回日期: 2021-10-18

基金项目: 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2020SZ52)

作者简介: 徐颂为 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物传染病学, 156952592@qq.com.

\*通信作者: 向 华 (1986—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为畜禽传染病学, xianghua2008411@163.com; 张焕容 (1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为动物传染病快速诊断与防治技术, 727746768@qq.com.



过程的不同时期相对表达量趋势基本一致<sup>[8]</sup>。H3F3A 基因在骨巨细胞瘤(GCTB)中有较高的特异性,可用于 GCTB 的鉴别诊断<sup>[9]</sup>。

用于评价不同试验条件下内参基因稳定性的软件有多种,包括 Norm Finder、Best Keeper 和 geNorm 软件<sup>[10]</sup>。Norm Finder 软件是先获得内参基因表达稳定值,再根据稳定值大小来筛选出最合适的内参基因,将表达稳定值最小的内参基因作为最合适的内参基因,其缺点为只能筛选出一个最合适的内参基因。Best Keeper 软件通过计算得出每个基因之间产生配对的相关系数(*r*)、标准偏差(*SD*)和变异系数(*CV*),通过比较各个值的大小,最终确定稳定性较好的基因为内参基因<sup>[10]</sup>。geNorm 软件可用于筛选任何试验的任意数目的内参基因,最终挑选出 2 个或 2 个以上的内参基因组合来校正数据,可使相对定量的结果更为精确,其优点是可以用于筛选任何样品的任意数目内参基因,通过该程序可以筛选出合适的内参基因以及确定最适内参基因数目<sup>[10]</sup>。

近年来,研究人员在山羊的起源、进化<sup>[11]</sup>、驯化<sup>[12]</sup>等方面取得了很大的突破,促进了山羊产业的发展。但是对山羊不同组织内参基因的筛选的研究少见报道。本研究将山羊 4 个内参基因[GAPDH、H3F3A、beta-肌动蛋白(ACTB)和 PPIA]作为候选基因,采用 geNorm 软件进行内参基因的稳定性分析,筛选出在山羊组织中稳定表达的内参基因,以期对山羊相关基因组的定量研究提供一定的参考。

## 1 材料

### 1.1 试验动物和供试组织样本

3 只 1 月龄健康的简州大耳羊,购自四川省简阳大哥大牧业有限公司。试验羊只屠宰后立即采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠、皮肤、肌肉、淋巴结和唇共 10 个组织样品,每个样品均为 3 只羊的混合组织,置于-80℃保存,备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

Eastep™ 总 RNA 提取试剂盒,购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit、Premix Taq、SYBR Premix Ex Taq II、DL-1 000 DNA Marker、胶回收试剂盒、pMD19-T 载体和大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒,购自 Omega(美国)有限公司;紫外分光光度计,购自岛津企业管理(中国)有限公司。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

分别将心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠、皮肤、肌肉、淋巴结和唇共 10 个组织样品置于预冷的研钵中,加液氮研磨至粉末状,利用 Eastep™ 总 RNA 提取试剂盒提取组织样品的总 RNA。利用紫外分光光度计

和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和质量,确保所有样品总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 在 1.8~2.1 之间,且琼脂糖凝胶电泳后条带清晰。利用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。

### 2.2 GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因的克隆鉴定

选取 GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因为候选内参基因,参照参考文献[13]设计 4 个基因的引物,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物信息见表 1。分别以 10 个组织样本的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增体系:cDNA 模板 2 μL, Premix Taq 10 μL,上下游引物各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。扩增条件:95℃预变性 10 min;95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环;72℃再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段,连接至 pMD19-T 载体,并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,提取质粒,将经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 1 4 个候选内参基因的引物信息

Table 1 Primer information of four candidate reference genes

内参基因	引物序列	目的片段大小/bp
GAPDH	F 5'-ATCTCGCTCTGGAAGATG-3'	227
	R 5'-TCGGAGTGAACGGATTCG-3'	
H3F3A	F 5'-GAGGTCTCTATACCATGGCTC-3'	150
	R 5'-GTACCAGGCCTGTAACGATG-3'	
ACTB	F 5'-TGGGCATGGAATCCTG-3'	194
	R 5'-GGCGCGATGATCTTGAT-3'	
PPIA	F 5'-TGACTTCACAGCCATAAT-3'	180
	R 5'-CTTGCCATCCAACCACTC-3'	

### 2.3 候选内参基因 RT-qPCR 检测

将 2.2 中测序正确的含 4 个候选内参基因的重组质粒均稀释到  $1 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu$ L,然后分别进行 10 倍倍比稀释,以  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu$ L 的重组质粒为模板,分别对 4 个内参基因进行 RT-qPCR 检测。RT-qPCR 扩增体系(20 μL):SYBR Premix Ex Taq II 10 μL,上下游引物各 0.5 μL,重组质粒模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。qPCR 扩增程序:95℃预变性 5 min;95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,共 40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,形成熔解曲线。每个样品 3 次重复,取 3 次 Ct 值的平均值。以重组质粒浓度的对数(lg)值作为横坐标,Ct 值为纵坐标,建立标准曲线。使用 IBM SPSS Statistics 20 软件估算标准曲线的回归系数(*R*<sup>2</sup>)及斜率(*slope*),计算引物的扩增效率(*E*),计算公式为  $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$ <sup>[14-15]</sup>。

### 2.4 候选内参基因表达稳定度分析

分别以 10 个组织样品的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR, 扩增体系和条件同 2.3, 得到 4 个候选内参基因在 10 个组织样品中的平均  $C_t$  值。采用  $\Delta C_t$  值、geNorm 程序分析 4 个候选内参基因的稳定性<sup>[16-17]</sup>, 具体步骤: 筛选同一个内参基因在不同组织中的最小  $C_t$  值( $C_{t_{min}}$ ), 计算  $\Delta C_t$ ,  $\Delta C_t = C_t - C_{t_{min}}$ , 式中:  $C_t$  为各组织中内参基因的  $C_t$  值, 计算  $2^{-\Delta C_t}$ ; 得到的数据制成表格导入 geNorm 软件运行, 利用该程序计算每个候选内参基因表达稳定度 ( $M$ ) 的平均值, 根据  $M$  值的大小对候选内参基因的稳定性进行排序 ( $M$  值越小, 表达就越稳定;  $M$  值始终  $\leq 1.5$ ), 选出最优内参基因。

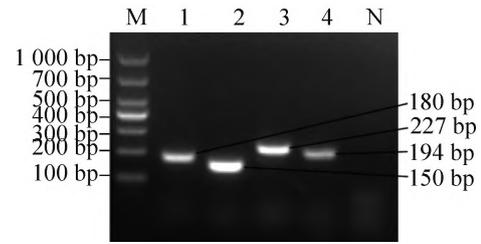
### 2.5 候选内参基因的相对表达量

分别将 10 个组织样本的 4 个候选内参基因  $C_t$  值的平均值代入标准曲线方程, 得出原始拷贝数, 以 4 个候选内参基因模板拷贝数的平均值为基线, 高于此值的为正表达, 低于此值的为负表达<sup>[18]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 候选内参基因的 PCR 扩增结果

对山羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肠、皮肤、肌肉、淋巴结和唇共 10 个不同组织样品的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 从 10 个不同的组织样品 cDNA 中均能扩增出候选内参基因 GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA, 大小与预期片段大小相符。见图 1。



M. DL-1 000 Marker; 1. PPIA; 2. H3F3A; 3. GAPDH; 4. ACTB; N. 阴性对照。

图 1 4 个候选内参基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of four candidate reference genes

### 3.2 候选内参基因的克隆与测序

成功构建含 GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因的重质粒, 测序结果表明, 4 个重组质粒中所含目的基因序列与 NCBI 中收录的基因序列的一致性在 98%~99% 之间, 序列相似度较高。

### 3.3 候选内参基因的 RT-qPCR 检测结果

3.3.1 候选内参基因的扩增曲线和熔解曲线分析结果见 145 页彩图 2 和图 3。

由 145 页彩图 2 可知, GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因的扩增曲线走势正常, 平行性良好。

由 145 页彩图 3 可知, GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因熔解曲线均出现明显的单一峰, 无引物二聚体和非特异性条带的扩增, 说明引物的特异性良好。

3.3.2 候选内参基因标准曲线的建立 结果见图 4 和表 2。

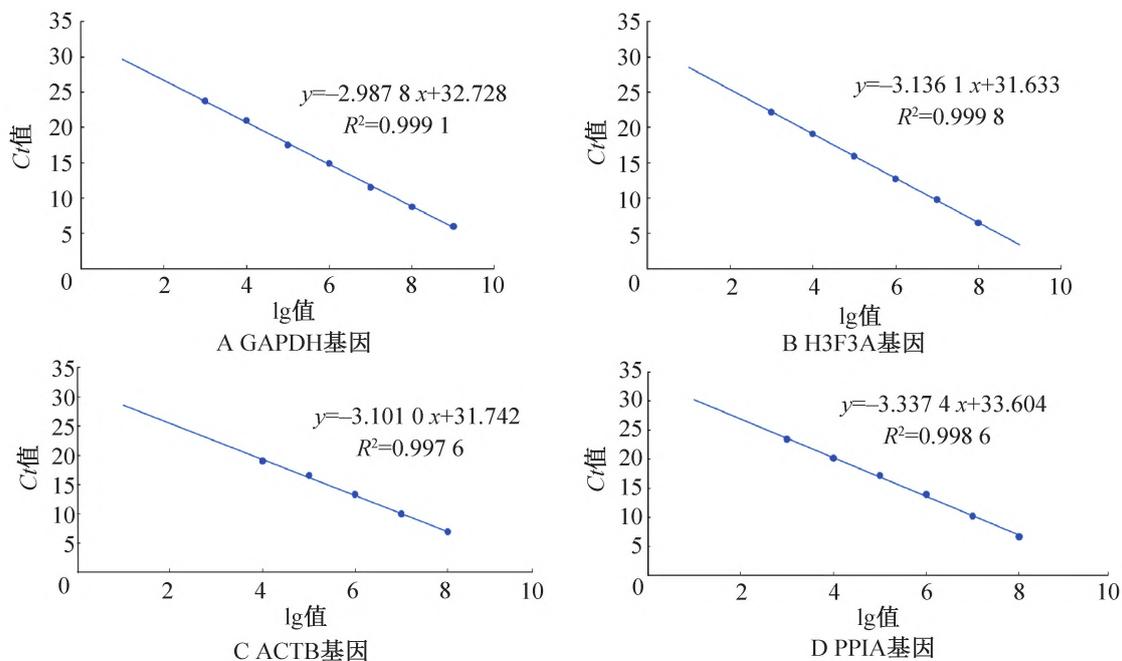


图 4 4 个候选内参基因的标准曲线

Fig. 4 Standard curves of four candidate reference genes

由图 4 可知, GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基因的重组质粒模板浓度的 lg 值与  $C_t$  值成反比, 各点

基本分布在同一条直线上。

由表 2 可知, GAPDH、H3F3A、ACTB 和 PPIA 基

表2 4个内参基因线性回归方程、 $R^2$ 和 $E$ 的测定结果

Table 2 Results of linear regression equation, regression coefficient and amplification efficiency of four reference genes

基因	标准曲线方程	$R^2$	slope	$E/\%$
GAPDH	$y = -2.9878x + 32.728$	0.9991	2.99	115.8
H3F3A	$y = -3.1361x + 31.633$	0.9998	3.13	108.7
ACTB	$y = -3.1010x + 31.742$	0.9976	3.10	110.2
PPIA	$y = -3.3374x + 33.604$	0.9986	3.34	99.3

因线性回归方程的  $R^2$  分别为 0.999 1, 0.999 8, 0.997 6, 0.998 6,  $E$  分别为 115.8%、108.7%、110.2%、99.3%, 具有良好的线性关系, 可以进行后

续试验。

### 3.4 候选内参基因组织表达稳定度分析 结果见图 5。

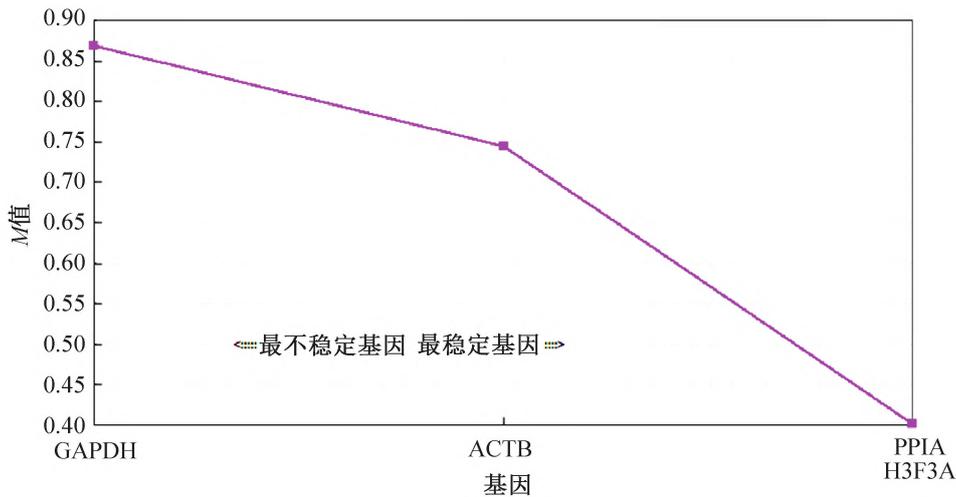


图5 4个候选内参基因表达稳定性的分析结果

Fig. 5 Analysis results of expression stability of four candidate reference genes

由图 5 可知, 山羊的 10 个组织中 GAPDH、ACTB、PPIA 和 H3F3A 基因的  $M$  值依次为 0.87, 0.74, 0.41, 0.40, 说明 4 个候选内参基因表达稳定度由高到低排序依次为 H3F3A>PPIA>ACTB>GAPDH。

### 3.5 候选内参基因的表达丰度分析

基因的  $C_t$  值越小说明其表达丰度越高, 反之, 表达丰度越低。GAPDH、ACTB、PPIA 和 H3F3A 4 个候选内参基因在 10 个组织中的平均  $C_t$  值计算结果见图 6。

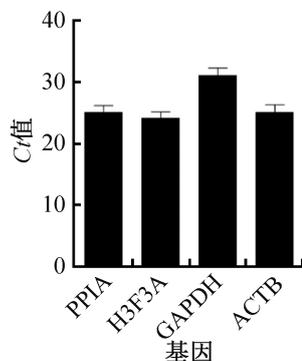


图6 4个候选内参基因表达丰度的测定结果

Fig. 6 Determination results of expression abundance of four candidate reference genes

由图 6 可知, H3F3A 的表达丰度是 4 个基因中最高的, PPIA 和 ACTB 次之, GAPDH 的表达丰度最低。

### 3.6 候选内参基因的相对表达量

结果见图 7。

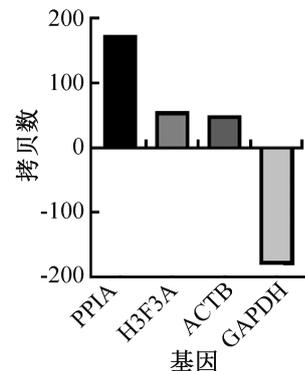


图7 4个候选内参基因相对表达量的测定结果

Fig. 7 Determination results of relative expression of four candidate reference genes

由图 7 可知: 4 个基因相对表达量由高到低排序依次为 PPIA>H3F3A>ACTB>GAPDH, 其中 PPIA 的表达量最高, GAPDH 的表达量最低。



#### 4 讨论

目前在 mRNA 水平对基因表达定量的技术包括 RNA 印迹、基因芯片、qPCR 等,目的基因表达量都需要用内参基因进行校正。理想的内参基因应在特定试验条件下的组织、细胞中均稳定表达。大量筛选内参基因的研究都是针对某些物种的特定组织<sup>[19-20]</sup>,任何一种内参基因的恒定表达都只是在一定条件下的恒定,在不同类型的细胞和组织、细胞增殖和器官发育的不同阶段、不同试验条件下,内参基因表达量通常差异较大。

ACTIN 和 GAPDH 基因是被广泛使用的内参基因<sup>[21]</sup>,然而大量研究发现,ACTIN 和 GAPDH 基因并非最理想的内参基因<sup>[22]</sup>。陈利等<sup>[23]</sup>在对山羊不同组织内参基因表达稳定度分析时发现,GAPDH 和 ACTIN 基因在 9 个候选内参基因中分别排在第 5 位和第 6 位。王子东等<sup>[24]</sup>研究发现,在牛转基因成纤维细胞中 ACTIN 基因的稳定性在 9 个内参基因中排在第 8 位。马志远等<sup>[25]</sup>在筛选山羊小肠粘膜内参基因时发现,GAPDH 基因表达稳定度排在 PGK1 和 18S rRNA 基因之后。综上,除 ACTIN 和 GAPDH 基因外,还存在多种候选内参基因。

PPIA 和 H3F3A 基因作为内参基因的报道相对较少。朱鑫等<sup>[26]</sup>对猪血管内皮细胞 5 种内参基因进行筛选,结果表明,PPIA 基因稳定性最好,且 ACTIN 和 GAPDH 基因均排在其后。C. Puech 等<sup>[13]</sup>研究发现,PPIA 和 H3F3A 基因是牛外周血中表达最稳定的基因,说明 PPIA 和 H3F3A 基因作为内参基因是可靠的。山羊常用的内参基因主要包括 GAPDH、ACTIN、18S rRNA、RPLP0、TBP 等,鲜有以 PPIA 作为候选内参基因的报道,国内以 H3F3A 基因作为山羊候选内参基因的研究少见报道。本研究综合分析 GAPDH、H3F3A、ACTB、PPIA 4 个内参基因在 1 月龄山羊不同组织中的稳定度、表达丰度以及相对表达量时发现,PPIA 和 H3F3A 基因的各项指标均排在 ACTB 和 GAPDH 基因之前,这与 C. Puech 等<sup>[13]</sup>研究发现山羊全血中 PPIA 和 H3F3A 基因在 5 对内参基因中最稳定相一致。

#### 5 结论

本研究运用 RT-qPCR 技术结合  $\Delta Ct$ 、geNorm 软件 2 种内参基因稳定性分析方法得出,在 1 月龄山羊的不同组织中稳定表达的内参基因为 PPIA 和 H3F3A,本试验可为后续研究在山羊组织中表达的功能性基因提供理论依据。

#### 参考文献:

[1] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386-401.  
[2] FLEIGE S, PFAFFL M W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance[J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27

(2/3): 126-139.  
[3] 台玉磊,韩立强,杨国庆,等. 仔猪组织基因表达中实时定量 PCR 内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(04): 732-736.  
[4] JUNG M, RAMANKULOV A, ROIGAS J, et al. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2007, 8:47.  
[5] 张艳君,朱志峰,陆融,等. 基因表达转录分析中内参基因的选择[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(05): 546-550.  
[6] 贺淹才. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展[J]. *生命的化学*, 2002, 22(03): 248-250.  
[7] 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(03): 181-191.  
[8] 许晴,林森,朱江江,等. 山羊肌肉前体脂肪细胞诱导分化过程中内参基因的表达稳定性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(05): 907-918.  
[9] 陈修文,汤显斌,王铁延,等. 骨巨细胞瘤中 H3F3A 基因突变检测及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2019, 35(09): 1115-1116, 1118.  
[10] 吴建阳,何冰,杜玉洁,等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. *现代农业科技*, 2017(05): 278-281.  
[11] 孙金梅. 山羊的起源和进化[J]. *中国养羊*, 1997(01): 7-9, 20.  
[12] 贾青,常洪,马章全. 山羊的起源驯化和品种形成[J]. *河北农业大学学报*, 1997, 20(02): 68-71.  
[13] PUECH C, DEDIEU L, CHANTAL I, et al. Design and evaluation of a unique SYBR Green real-time RT-PCR assay for quantification of five major cytokines in cattle, sheep and goats[J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11:65.  
[14] 陶蓉,李慧,孙宇航,等. 美国白蛾内参基因的鉴定及筛选[J]. *林业科学*, 2019, 55(09): 111-120.  
[15] RADONIC A, THULKE S, MACKAY L M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 856-862.  
[16] XIE F, SUN G, STILLER J W, et al. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26980.  
[17] VANDESOMPELE J, DE P K, 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): 467-470.  
[18] MAMO S, GAL A B, BODO S, et al. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro[J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 14.  
[19] OHL F, JUNG M, XU C, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(12): 1014-1024.  
[20] ZHANG X, DING L, SANDFORD A J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2005, 6: 4.  
[21] LI L, JIANG J, WANG L, et al. Expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 versus gamma 2, and their association with intramuscular fat in goat tissues[J]. *Gene*, 2013, 528(2): 195-200.  
[22] ZHU H, PARK S, SCHEFFLER J M, et al. Porcine satellite cells are restricted to a phenotype resembling their muscle origin[J]. *J Anim Sci*, 2013, 91(10): 4684-4691. (下转第 40 页)



- [12] 孙艳,张涛,安拉扎,等.凉山黄牛肉质检测初报[J].中国牛  
业科学,2018,44(5):39-40.
- [13] 刘庆雨,张琪,李娜,等.藏香猪胴体性能及肉质品质测定  
[J].养猪,2019(6):54-56.
- [14] YI K L, LI Z C, YAN H F, et al. Study on the beef quality traits of  
xiangxi yellow cattle[J]. J Dome Anim Ecol, 2011, 32(5): 39-42.
- [15] 施永海,张根玉,张海明,等.金钱鱼肌肉营养成分的分析和  
评价[J].食品工业科技,2015,36(6):346-350.

## Comparative analysis of nutritional components between red beef and marble beef in Sanjiang cattle

LI Zhu<sup>1</sup>, HE Shiming<sup>1\*</sup>, WU Jinbo<sup>1</sup>, RAN Qiang<sup>2</sup>, MENG Xin<sup>2</sup>, ZHANG Jianbo<sup>3</sup>, WANG Rongfang<sup>4</sup>

(1. Institute of Animal Science and Technology of Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Hongyuan 624402, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Service Center in Wenchuan County of Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture,

Wenchuan 623000, China; 3. The Specialized Cooperatives of Sanjiang Zhongfu Cattle Breeding in Wenchuan County, Wenchuan

623000, China; 4. Mao County Jiuding Livestock and Poultry Breeding Co., Ltd., Maoxian 623200, China)

**Abstract:** In order to explore the nutritional composition difference between red beef and marble beef produced by Sanjiang cattle high quality beef production technology system, 11 healthy Sanjiang cattle aged four to five months were randomly selected from the same resource group in Sanjiang cattle breeding area, Sanjiang Township, Wenchuan County, including seven bulls and four cows. Then, three cattle (two bulls and one cow) were randomly selected and fed to 24 months of age according to *Sanjiang Red Beef Production Technical Specification* before slaughter. The other eight cattle (five bulls and three cow) were fed to 36 months of age according to *Sanjiang Marble Beef Production Technical specification* before slaughter. The content of moisture, protein, fat, cholesterol, ash, vitamin A, vitamin C, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin E, mineral elements (Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, K, Na) and amino acids in Sanjiang red beef and marble beef were determined, and the contents of total amino acids (TAA), flavor amino acids (FAA), essential amino acids (EAA), and non-essential amino acids (NEAA) were calculated, the differences between two kinds of beef were compared and analyzed. The results showed that the Sanjiang beef was rich in various vitamins, minerals and flavor amino acids. The moisture content in red beef were 67.47%, which were significantly higher than marble beef with 61.39% ( $P < 0.05$ ). The contents of vitamin B<sub>1</sub> and Zn in red beef were 0.05 mg/kg and 34.73 mg/kg, respectively, which were significantly higher than those in marble beef (0.03 mg/kg and 27.09 mg/kg,  $P < 0.01$ ). The Fe and Se contents of marble beef of Sanjiang cattle were 23.66 mg/kg and 0.09 mg/kg, respectively, which were significantly higher than those of red beef (18.57, 0.03 mg/kg,  $P < 0.01$ ). There were no significant differences in protein, fat, cholesterol, ash, vitamin B<sub>2</sub> and vitamin E contents between the two kinds of beef ( $P > 0.05$ ). There were no significant differences in TAA and EAA contents between the two kinds of beef, and the histidine content of marble beef was extremely significantly higher than that of red beef ( $P < 0.01$ ), and the cystine content of marble beef was significantly higher than that of red beef ( $P < 0.05$ ). The EAA/TAA and EAA/NEAA values of marble beef were higher than red beef ( $P > 0.05$ ). Vitamin A was not detected in either beef. It indicated that Sanjiang marble beef and red beef were both high-quality beef with high nutritional value. The red beef contained less fat and more vitamin B<sub>1</sub> and Zn, while marble beef had better amino acid composition and higher Fe and Se content.

**Keywords:** Sanjiang cattle; red beef; marble beef; mineral elements; amino acids

(023)

(上接第 35 页)

- [23] 陈利,赵薇,占思远,等.山羊不同组织及不同发育时期骨骼肌内  
参基因的表达稳定性分析[J].畜牧兽医学报,2014,45(8):  
1228-1236.
- [24] 王子东,苏建国,殷彪,等.牛转 FAD3B 基因胎儿成纤维细胞中  
内参基因的稳定性评估[J].生物技术通报,2012,11:118-126.
- [25] 马志远,翁秀秀,李飞,等.湖羊小肠黏膜内参基因筛选[J].动物  
营养学报,2015,27(11):3478-3484.
- [26] 朱鑫,吴巧,冯晓辉,等. H1N1 猪流感病毒感染猪血管内皮细胞  
后内参基因的筛选[J].西南民族大学学报,2014,40(4):  
490-494.

## Screening of reference genes for real-time fluorescence quantification PCR in different goat tissues

XU Songwei, HUANG Ren, YANG Lu, XIANG Hua\*, ZHANG Huanrong\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** In order to screen out reference genes that could be stably expressed in goat tissue, ten tissues of heart, liver, spleen, lung, kidney, intestine, skin, muscle, lymph and lip of one-month-old Jianzhou big ear sheep were collected in the experiment. Four genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), H3-histone family 3A (H3F3A), actin-beta (ACTB) and peptidylprolyl isomerase (PPIA), were selected as candidate reference genes. Real-time fluorescence quantification PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of four candidate reference genes in the above ten tissue samples, and the quantitative data of four candidate genes were analyzed using the geNorm program to select reference genes with stable expression in goat tissues. The results showed that four reference genes (including GAPDH, H3F3A, ACTB and PPIA) were successfully cloned. The RT-qPCR amplification curves of the four reference genes were normal, without primer dimer and non-specific bands were produced, the PCR products were single, and each point on the drawn standard curve was on the same line. The stability of the four reference genes was H3F3A > PPIA > ACTB > GAPDH, and the relative expression was PPIA > H3F3A > ACTB > GAPDH. It indicated that PPIA and H3F3A genes had high expression level and good stability, and could be used as the best reference genes for subsequent study of the expression of functional genes in goat tissues.

**Keywords:** goat; reference genes; real-time fluorescence quantification PCR; geNorm software; stability

(023)

· 畜牧科学 ·

## 山羊不同组织实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

(作者 徐颂为等,正文见第 31-35,40 页)

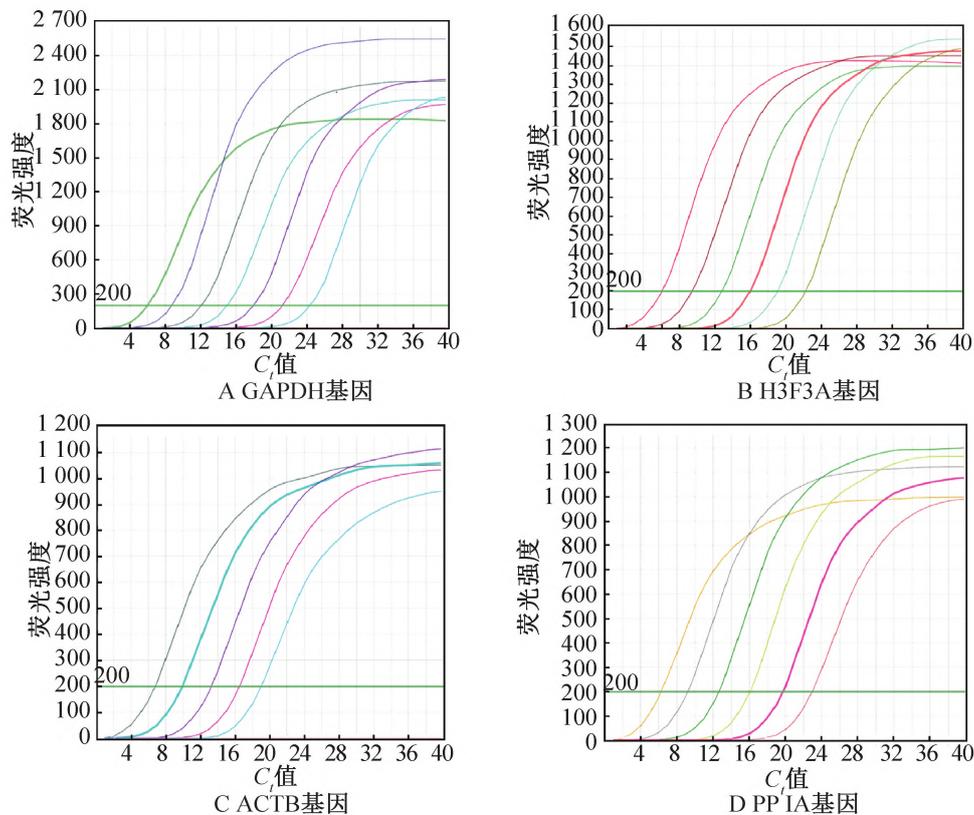


图 2 4 个候选内参基因 RT-qPCR 的扩增曲线

Fig. 2 Amplification curves of RT-qPCR for four candidate reference genes

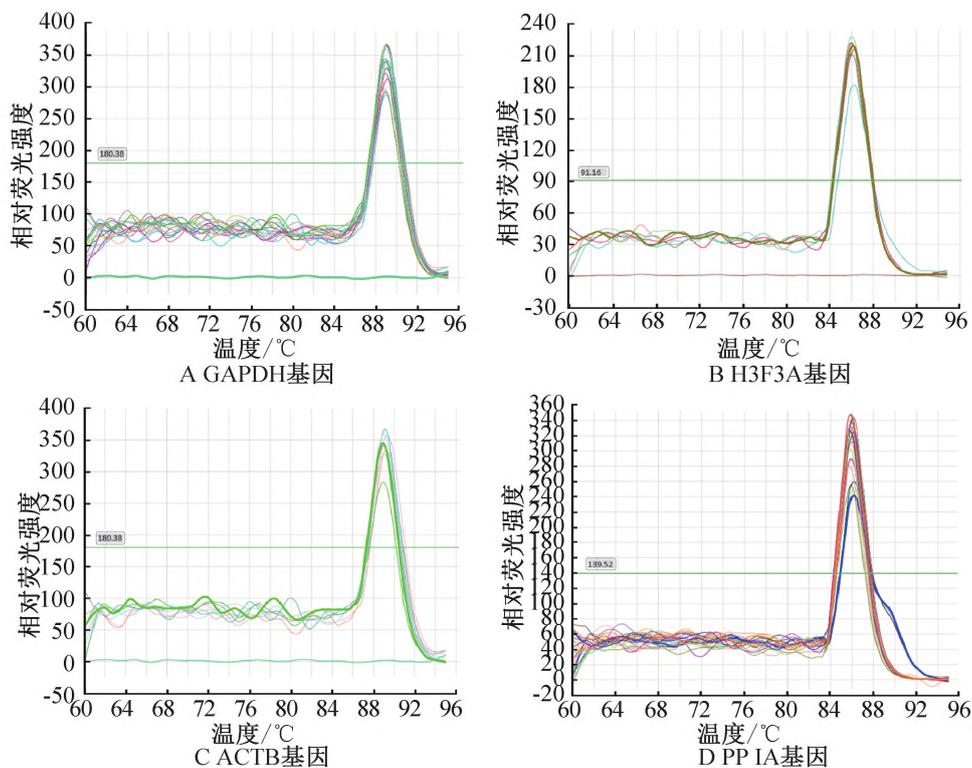


图 3 4 个候选内参基因 RT-qPCR 的熔解曲线

Fig. 3 Melting curves of RT-qPCR for four candidate reference genes