

# 荧光定量 PCR 技术的原理及其在植物研究中的应用

黄小玲, 张登, 廖嘉明, 欧阳昆唏\*

(广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东广州 510642)

**摘要** 实时荧光定量 PCR 技术, 因其具有操作简单、重复性好、灵敏度高、定量准确、速度快等优点, 已广泛应用于分子生物学研究的多个领域。对实时荧光定量 PCR 技术的原理、定量方法以及在植物研究中的应用等进行概述, 以促进该技术的应用。

**关键词** 实时荧光定量 PCR; 原理; 应用

中图分类号 S126 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)25-0036-05

## Principles and Applications of Fluorescent Quantitative PCR in Plant Research

HUANG Xiao-ling, ZHANG Deng, LIAO Jia-ming et al (Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642)

**Abstract** Real-time fluorescence quantitative PCR technology has been widely used in many fields of molecular biology research due to its advantages of simple operation, good repeatability, high sensitivity, accurate quantitation and high speed. Principle, quantitative methods and applications in plant research of real-time fluorescence quantitative PCR technology were reviewed to promote its application.

**Key words** Real-time quantitative PCR; Principles; Application

自从 1985 年 Saiki 等<sup>[1]</sup>发明聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 以来, PCR 技术很快成为科研、临床诊断的热点技术。但传统 PCR 技术在应用中一是不能准确定量, 二是容易交叉污染, 产生假阳性。直到 1992 年, 日本 Higuchi 等<sup>[2]</sup>首次采用动态 PCR 方法和封闭式检测方式对目的核酸数量进行定量分析, 首次提出荧光定量 PCR 技术的概念。当时他使用 EB (溴化乙锭) 作为荧光标记染料, 采用一台经过改良的热循环仪, 用 UV 射线照射样品, 然后通过 CCD 相机检测产生的荧光值, 利用 PCR 反应中的数学函数关系, 再结合加入标准品的方法, 达到对检测样品进行准确定量的目的。但由于这种方法实验仪器昂贵, 一些非特异的 PCR 产物同样能被检测到并包含在被测的荧光信号值总量之中而导致定量不准确等因素, 最终使这种试验技术在当时没能成为主流的试验技术。

1995 年美国 PE 公司成功研制 TaqMan 技术, 1996 年又推出首台荧光定量 PCR 检测系统, 通过检测每个循环的荧光强度, 并使用 Ct 值进行分析, 荧光定量 PCR 才很快得到大家的接受, 并广为应用。

## 1 RT-qPCR 技术的原理

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 是通过 PCR 扩增反应中每个循环产物荧光信号的实时检测, 从而实现对起始模板的定量及定性分析。在实时荧光定量 PCR 反应中, 引入一种荧光化学物质, 随着 PCR 反应的进行, PCR 反应产物不断累计, 荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环, 收集一个荧光强度信号, 这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化, 从而得到一条荧光扩增曲线图。一般而言, 荧光扩

增曲线可分为 3 个阶段: 荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期。在荧光背景信号阶段, 扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖, 无法判断产物量的变化。而在平台期, 扩增产物已不再呈指数级的增加。PCR 的终产物量与起始模板量之间无线性关系, 所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。只有在荧光信号指数扩增阶段, PCR 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系, 可以选择在这个阶段进行定量分析。该技术不仅实现对 DNA 模板的定量, 而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染性、实时性和准确性等特点, 目前已广泛应用于分子生物学研究和医学研究等领域<sup>[3-6]</sup>。

## 2 RT-qPCR 的分类

荧光定量 PCR 使用的荧光化学可分为 2 种: 荧光探针和荧光染料。而荧光定量 PCR 的方法相应的可分为特异类和非特异类 2 类, 特异性检测方法是在 PCR 反应中利用标记荧光染料的基因特异寡核苷酸探针来检测产物; 而非特异性检测方法是在 PCR 反应体系中, 加入过量荧光染料, 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射出荧光信号。前者由于增加探针的识别步骤, 特异性更高, 但后者则简便易行, 并且价格较低。

**2.1 SYBR Green I** SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染料。其与双链 DNA 结合后, 荧光大大增强。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497 nm, 发射波长最大约为 520 nm。由于 SYBR Green I 没有特异性, 不能识别特定的双链, 只要是双链就会结合发光, 对 PCR 反应中的非特异性扩增或引物二聚体也会产生荧光, 通常本底较高, 所以在临床上使用可能会有假阳性发生。但它能与所有的双链 DNA 相结合, 所以对不同模板不需要特别定制不同的特异的探针, 通用性较好, 并且价格相对较低, 因此国内外在科研中使用比较普遍。

**2.2 水解探针 (Taqman)** Taqman 探针是一种寡核苷酸探

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (31600525); 广东省科技计划项目 (2017B020201008)。

**作者简介** 黄小玲 (1985—), 女, 湖北恩施人, 实验员, 硕士, 从事林木遗传育种研究。\* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事林木遗传育种研究。

**收稿日期** 2018-05-07

针,荧光基团连接在探针的 5' 末端,而淬灭剂则在 3' 末端。当探针与靶序列配对时,荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭剂接近而被淬灭。在进行延伸反应时,聚合酶的 5' 外切酶活性将探针切断,使得荧光基团与淬灭剂分离,发射荧光。一分子的产物生成就伴随着一分子的荧光信号的产生。随着扩增循环数的增加,释放出来的荧光基团不断积累。因此,Taqman 探针检测的是积累荧光。

**2.3 杂交探针(Beacon、FRET) 分子信标(molecular beacon)**是一种呈发夹结构的颈环双标记寡核苷酸探针,两端的核酸序列互补配对,因此标记在一端的荧光基团与标记在另一端的淬灭基团紧紧靠近。荧光基团被激发后产生的光子被淬灭剂淬灭,由荧光基团产生的能量以红外而不是可见光形式释放出来。分子信标的颈环结构中,环一般为 15~30 个核苷酸长,并与目标序列互补;颈一般为 5~7 个核苷酸长,并互相配对形成颈的结构。荧光基团标记在探针的一端,而淬灭剂则标记在另一端。在复性温度下,因为模板不存在时形成颈环结构,当加热变性会互补配对的颈环双链解开,如果有模板存在,环序列将与模板配对。与模板配对后,分子信标将成链状而非发夹状,使得荧光基团与淬灭剂分开。当荧光基团被激发时,因淬灭作用被解除,发出激发光。由于是酶切作用的存在,分子信标也是积累荧光。常用的荧光基团有 FAM 和 Texas Red。

FRET 探针又称双杂交探针,FRET 探针由 2 条相邻探针组成,当退火时,在一条探针的 5' 端标记 FAM 和在另一条探针的 3' 端标记 Red640 基团相邻,激发 FAM 产生的荧光,作为 Red640 基团的激发光被吸收,使 Red640 发出波长为 640 nm 的荧光。当变性时,探针游离,两基团距离远,不能产生 640 nm 波长的荧光。由于 FRET 探针是靠近发光,所以检测信号是实时信号,非积累信号。常用的荧光基团有 LC-Red640、LC-Red705。

### 3 RT-qPCR 的定量方法

在实时荧光 PCR 中,模板的定量有 2 种方法:绝对定量和相对定量。绝对定量一般通过已知的标准曲线来确定我们所感兴趣基因的拷贝数;相对定量指在一定样品中靶序列相对于另一参照序列的量的变化。

**3.1 绝对定量** 绝对定量 RT-qPCR 一般采用外标准品定量的制备来实现绝对定量。而标准样品的种类有含有与待测样品相同扩增片段的克隆质粒、含有与待测样品相同扩增片段的 cDNA 或 PCR 的产物。将标准品稀释成不同浓度的样品,并作为模板进行 PCR 反应。以标准品拷贝数的对数值为横坐标,以测得的 ct 值为纵坐标,绘制标准曲线。对未知样品进行定量时,根据未知样品的 ct 值,即可在标准曲线中定出样品的拷贝数。绝对定量具有稳定、准确等优点,因此在很多文献中已有报道<sup>[7-11]</sup>。

**3.2 相对定量** 相对定量是指在测定目的基因的同时测定某一内源性管家基因,采用靶基因与内源对照基因的表达比值来标准化结果<sup>[12-14]</sup>。在定量 PCR 中,为了去除不同样本在 RNA 产量、质量和反转录效率上可能存在的差别而获得

目标基因特异性表达的真正差异,通常选择内参基因进行校正和标准化<sup>[15-19]</sup>。定量 PCR 结果的准确性在很大程度上取决于稳定内参基因的选择。目前,Vandesompele 等<sup>[20]</sup>、Andersen 等<sup>[21]</sup>、Pfaffl 等<sup>[22]</sup>分别编写 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 程序用于比较内参基因的表达变化和稳定性,并且 GeNorm 程序得到进一步改进<sup>[23]</sup>。

### 4 MIQE 指导方针

目前,对如何更好地进行和解释定量 PCR 试验缺少一致的意见。且由于缺少足够的试验细节描述而进一步恶化,从而妨碍读者对试验结果的精密评价和试验的重复。因此,Bustin 等<sup>[24]</sup>于 2009 年提出 MIQE 指导方针(The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments,MIQE)。MIQE 是一套评估定量 PCR 试验描述的最低需要的指导方针,包括样品的获取、试验设计验证以及数据分析等方面。MIQE 指导方针旨在为试验结果提供可靠性,从而确保科学文献的真实性、促进实验室之间的一致性以及提高试验的透明度。非定量 PCR 专业人士对于 MIQE 指导方针众多试验关联细节的详尽描述感到繁琐和畏惧,使得已建立的试验常规报告变得复杂。为此,Bustin 等<sup>[25]</sup>于 2010 年提出一套简约版的指导方针——MIQE 概要,覆盖每个定量 PCR 试验的主要参数。按照 MIQE 的指导方针,完全公布试验试剂、序列以及数据分析方法能更好地使其他研究者重现试验结果<sup>[24]</sup>。

### 5 实时荧光定量 PCR 在植物研究中的应用

定量 RT-PCR 技术主要用于基因表达的定性和定量检测,其自问世以来在基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域取得较大的成绩<sup>[26]</sup>。虽然在植物研究方面应用起步较晚,但目前在植物学研究中的应用越来越广泛,如植物营养学研究、植物发育学研究、植物抗逆机理研究、转基因植物的检测、病原菌的检测、植物与微生物互作机理研究、植物抗病性检测、信号转导、环境对植物基因表达的影响等方面<sup>[27]</sup>。

**5.1 基因差异表达分析** 植物的生长、发育、分化和衰老涉及许多基因的时空顺序表达,因此,研究这个过程中基因表达的变化是揭示生长发育机理的重要手段。RT-qPCR 技术是研究植物基因表达水平变化的一项重要技术<sup>[27]</sup>。Farzad 等<sup>[28]</sup>利用 RT-qPCR 技术研究角堇(*Viola cornuta* cv.)的 3 个花青苷生物合成基因查尔酮合酶基因(*CHS*)、二氢黄酮醇 4-还原酶基因(*DFR*)和花色苷合酶基因(*ANS*)在花的 3 个不同发育时期的表达差异,并且把角堇确立为研究自然条件下基因调控花颜色改变的新模式系统。Harada 等<sup>[29]</sup>在康乃馨开花的过程中,研究与花瓣的生长和发育相关基因的表达,荧光定量分析显示 4 个木葡聚糖内传糖苷酶/水解酶基因 *XTH* (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, *XTH*) 和 3 个扩展蛋白基因 *EXP* (expansin, *EXP*) 在康乃馨的绿色营养器官、花瓣、柱头以及花柱的不同部位存在差异表达,并且发现在不同的发育时期,这 7 个基因在花瓣中的表达也有差异。结果表明 *DcXTH2*、*DcXTH3*、*DcEXPA1* 和 *DcEXPA2* 在康

乃馨花开放的过程中与花瓣的生长发育有关。Wang等<sup>[30]</sup>利用荧光定量PCR研究EXP基因在杉木各个不同部位的表达情况,发现CIEXPA1、CIEXPA2 2个基因在形成层中存在特异表达,并结合转基因烟草研究,表明这2个基因通过直接或间接影响纤维素的新陈代谢参与植物的生长发育。

**5.2 植物病理学研究** 植物抗病性及其机制研究一直是当今植物病理学和植物抗病育种中的热点和焦点问题<sup>[31]</sup>。RT-qPCR技术可以用于研究病原菌感染宿主植物的过程中,宿主植物基因表达的改变以及抗病植株与感病植株的基因表达的差异,为植物抗病机理的研究和抗病品种的选育提供理论依据<sup>[27]</sup>。到目前为止,RT-qPCR技术已在水稻<sup>[32-34]</sup>、玉米<sup>[35-37]</sup>、小麦<sup>[38-39]</sup>、大麦<sup>[40-42]</sup>、大豆<sup>[43]</sup>、豌豆<sup>[44]</sup>、黄瓜<sup>[45]</sup>、橙<sup>[46]</sup>、花生<sup>[47]</sup>、油菜<sup>[48]</sup>、葡萄<sup>[49]</sup>、苹果<sup>[50]</sup>、辣椒<sup>[51]</sup>、杨树<sup>[52]</sup>、云杉<sup>[53]</sup>等植物中广泛应用。

**5.3 外源基因拷贝数分析** 植物转基因研究中,外源基因在植物基因组中的拷贝数为1~2个时能够较好表达,插入拷贝数较多时会导致表达不稳定,甚至发生基因沉默现象<sup>[54]</sup>。因此,T<sub>0</sub>代转基因外源基因的拷贝数是研究植物转基因分子特性的基础步骤之一<sup>[26]</sup>。Southern-blot方法是鉴定转基因拷贝数的传统方法,但其具有操作繁琐、试剂昂贵、样品需要量大等缺点,使得研究人员消耗太多的人力、物力。实时定量PCR法克服了Southern blot的定量缺点,已被广泛应用于DNA的定量检测。Mason等<sup>[55]</sup>利用TaqMAN探针荧光定量PCR技术检测转基因番茄的目的基因的1、2、3拷贝数,并且与通过Southern blot分析所得的结果进行比较,发现前者所获信息的质量比后者更高。Yi等<sup>[56]</sup>利用荧光定量PCR技术,以单拷贝基因*GhUBC1*为内参,对转基因棉花的28个T<sub>0</sub>代株系的拷贝数进行成功检测,并且有效地从T<sub>1</sub>代的转基因群体中鉴定出纯合子。然而,由于转基因常常伴随着嵌合体的出现<sup>[57-58]</sup>,而荧光定量PCR技术也可用于嵌合体的检测<sup>[59]</sup>。

**5.4 植物病菌、病原微生物及害虫检测** 植物病菌或病原微生物常常能引起多种农作物、园林观赏、经济作物及牧草发生病害。传统的检测方法主要是采用生物学和血清学方法,费时又费力。自从实时荧光定量PCR技术应用于植物病菌的检测之后,不仅有效地提高检测速度和水平,而且检测的灵敏度也比一般的检测方法高出100倍左右。还有一个明显的优点是试验中不需要PCR的后续处理及病原菌的分离培养,大大简化试验操作步骤,缩短检测时间<sup>[60]</sup>。自2002年Frederick首次将该方法应用于植物病原真菌的检测<sup>[61]</sup>,国内外已出现大量利用该技术检测病原菌的报道<sup>[62-67]</sup>。

目前,实时定量PCR技术应用于植物害虫鉴定、防治等研究相对其他领域较少,但该技术对植物害虫、植物病原线虫<sup>[68-70]</sup>和害螨<sup>[71]</sup>研究中已经显示出极好的应用前景<sup>[72]</sup>。传统的植物害虫鉴定方法依赖于形态特征和寄主范围等特征来区分,但是对于一些植物害虫之间的区分比较困难,尤其是检疫性植物害虫实蝇类<sup>[73]</sup>、蓟马类<sup>[74-75]</sup>等,而实时定量

PCR技术是解决这一问题的可靠手段<sup>[72]</sup>。

**5.5 转基因植物鉴定** 随着现代生物技术的发展,转基因食品已逐步进入普通百姓的生活。转基因食品特别是水稻、小麦、玉米等主要粮食作物的转基因品种往往具有高产、优质、抗病虫害的特点<sup>[31]</sup>。但在解决人类面临的粮食和能源危机的同时,也带来新的问题,如生态问题,转基因食品对人类健康的危害等,因此,对转基因产品的检测和定量是大家关注的焦点<sup>[26]</sup>。

荧光定量PCR技术已成为转基因产品快速灵敏检测的技术途径,并被广泛使用<sup>[76-78]</sup>。根据目前转基因技术中使用的基因构件主要来源于花椰菜花叶病毒的35S启动子和NOS终止子,绝大部分转基因产品含有这2个基因片段,用检测定量这2个片段就可达到简便、快速、准确地确定是否为转基因产品<sup>[79]</sup>。

## 6 前景

目前,实时荧光定量PCR技术还广泛应用于植物营养学研究、植物发育学研究、植物抗逆机理研究、植物与微生物互作机理研究、植物抗病性检测、信号转导、环境对植物基因表达的影响等方面<sup>[27]</sup>。近年来,许多科研工作者基于荧光PCR的基本原理对荧光PCR技术进行不断地研究和改进,使荧光PCR技术得到进一步的完善,并在此基础上开发出许多新的荧光定量PCR技术。随着科学技术的不断发展,仪器设备和试剂费用的降低及相关知识的普及,RT-qPCR技术将成为分子生物学实验室必备的研究工具,将会广泛应用于植物研究各领域。

## 参考文献

- [1] SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. *Science*, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [2] HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH P S, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences[J]. *Biotechnology*, 1992, 10(4): 413-417.
- [3] KUBISTA M, ANDRADE J M, BENGTTSSON M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. *Molecular aspects of medicine*, 2006, 27: 95-125.
- [4] RODRÍGUEZ A, LUQUE M I, ANDRADE M J, et al. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products[J]. *Food microbiology*, 2011, 28(6): 1190-1199.
- [5] MATSUYAMA S, NISHI K. Genus identification of toxic plant by real-time PCR[J]. *International journal of legal medicine*, 2011, 125(2): 211-217.
- [6] ALAEI H, BAEYEN S, MAES M, et al. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR[J]. *Journal of microbiological methods*, 2009, 76(2): 136-145.
- [7] CAO Y, ZHANG Z H, LING N, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. *Biology and fertility of soils*, 2011, 47(5): 495-506.
- [8] KOVANDA A, KOCJAN B J, LUZAR B, et al. Characterization of novel cutaneous human papillomavirus genotypes HPV-150 and HPV-151[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): 1-10.
- [9] KOVANDA A, POLJAK M. Real-time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response[J]. *Journal of virological methods*, 2011, 175: 125-128.
- [10] POSTOLLEC F, FALENTIN H, PAVAN S, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology[J]. *Food microbiology*, 2011, 28(5): 848-861.
- [11] WHELAN J A, RUSSELL N B, WHELAN M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. *Journal of immunological methods*, 2003, 278(1/2): 261-269.

- [12] WITTEW C T, HERRMANN M G, GUNDRY C N, et al. Real-time multiplex PCR assays[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 430-442.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] MORSE D L, CARROLL D, WEBER L, et al. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *Analytical biochemistry*, 2005, 342(1): 69-77.
- [15] BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems[J]. *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29(1): 23-39.
- [16] CHEN R, GYOKUSEN M, NAKAZAWA Y, et al. Selection of housekeeping genes for transgene expression analysis in *Eucommia ulmoides* Oliver using real-time RT-PCR[J]. *Journal of botany*, 2010, 2010: 1-7.
- [17] CHEN L, ZHONG H Y, KUANG J F, et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions[J]. *Planta*, 2011, 234(2): 377-390.
- [18] JAIN M, NIJHAMWAN A, TYAGI A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006, 345(2): 646-651.
- [19] CARRILLO-CASAS E M, HERNÁNDEZ-CASTRO R, FRANCISCO SUÁREZ-GÜEMES F, et al. Selection of the internal control gene for real-time quantitative RT-PCR assays in temperature treated *Leptospira* [J]. *Current microbiology*, 2008, 56(6): 539-546.
- [20] 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): 1-12.
- [21] 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.
- [22] PFAFFL M W, 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]. *Biotechnology letters*, 2004, 26(6): 509-515.
- [23] HELLEMANS J, MORTIER G, DE PAEPE A, et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data[J]. *Genome biology*, 2007, 8(2): 1-9.
- [24] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clinical chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [25] BUSTIN S A, BEAULIEU J F, HUGGETT J, et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments[J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11: 74.
- [26] 马月萍, 戴思兰, 马艳蓉. 荧光定量 PCR 技术在植物研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2011(7): 37-45.
- [27] 胡丹丹, 顾金刚, 姜瑞波, 等. 定量 RT-PCR 及其在植物学研究中的应用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2007(3): 520-525.
- [28] FARZAD M, GRIESBACH R, HAMMOND J, et al. Differential expression of three key anthocyanin biosynthetic genes in a color-changing flower, *Viola cornuta* cv. Yesterday, Today and Tomorrow [J]. *Plant science*, 2003, 165(6): 1333-1342.
- [29] HARADA T, TORII Y, MORITA S, et al. Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening[J]. *Journal of experimental botany*, 2011, 62(2): 815-823.
- [30] WANG G F, GAO Y, WANG J J, et al. Overexpression of two cambium-abundant Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*)  $\alpha$ -expansin genes *ClEX-PA1* and *ClEXPA2* affect growth and development in transgenic tobacco and increase the amount of cellulose in stem cell walls[J]. *Plant biotechnology journal*, 2010, 9(4): 486-502.
- [31] 王甜, 陈庆富. 荧光定量 PCR 技术研究进展及其在植物遗传育种中的应用[J]. *种子*, 2007, 26(2): 56-61.
- [32] BABU R, JIANG C J, XU X, et al. Isolation, fine mapping and expression profiling of a lesion mimic genotype, spl(NF4050-8) that confers blast resistance in rice[J]. *Theoretical and applied genetics*, 2011, 122(4): 831-854.
- [33] GOMI K, SATOH M, OZAWA R, et al. Role of hydroperoxide lyase in white-backed planthopper (*Sogatella furcifera* Horváth)-induced resistance to bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. [J]. *The plant journal*, 2010, 61(1): 46-57.
- [34] LIU X Q, LI Y Y, WANG L Y, et al. The effect of the rice blast resistance gene Pi36 on the expression of disease resistance-related genes[J]. *Chinese science bulletin*, 2010, 55(18): 1881-1888.
- [35] WANG F, QIN G Z, SUI Z H, et al. Improved method for assaying maize plant resistance to maize rough dwarf disease by artificial inoculation and real-time RT-PCR[J]. *European journal of plant pathology*, 2006, 116(4): 289-300.
- [36] SHI Y, QIN Y H, CAO Y Y, et al. Influence of an m-type thioredoxin in maize on polyviral infection[J]. *European journal of plant pathology*, 2011, 131: 317-326.
- [37] U Ź AROWSKA A, DIONISIO G, SARHOLZ B, et al. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 1-15.
- [38] XIA N, ZHANG G, LIU X Y, et al. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses [J]. *Molecular biology reports*, 2010, 37(8): 3703-3712.
- [39] ZENG X Q, WANG C Y, ALI M, et al. Profiling gene expression patterns of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) resistance gene in new wheat germplasm [J]. *Pakistan journal of botany*, 2010, 42(6): 4253-4266.
- [40] YANG F, JENSEN J D, SVENSSON B, et al. Analysis of early events in the interaction between *Fusarium graminearum* and the susceptible barley (*Hordeum vulgare*) cultivar Scarlett [J]. *Proteomics*, 2010, 10(21): 3748-3755.
- [41] MCGRANN G R D, TOWNSEND B J, ANTONIW J F, et al. Barley elicits a similar early basal defence response during host and non-host interactions with *Polymyxa* root parasites[J]. *European journal of plant pathology*, 2009, 123(1): 5-15.
- [42] GJETTING T, CARVER T L, SKØT L, et al. Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells[J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2004, 17(7): 729-738.
- [43] PANTHEE D R, MAROIS J J, WRIGHT D L, et al. Differential expression of genes in soybean in response to the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow) is soybean growth stage-specific [J]. *Theoretical and applied genetics*, 2009, 118(2): 359-370.
- [44] VERONICO P, MELILLO M T, SAPONARO C, et al. A polygalacturonase-inhibiting protein with a role in pea defence against the cyst nematode *Heterodera goettingiana* [J]. *Molecular plant pathology*, 2011, 12(3): 275-287.
- [45] LI J W, LIU J, ZHANG H, et al. Identification and transcriptional profiling of differentially expressed genes associated with resistance to *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber [J]. *Plant cell reports*, 2011, 30(3): 345-357.
- [46] SCUDERI G, POLIZZI G, CIRVILLERI G. Quantitative RT-PCR expression analysis of lipopepsipeptides synthetase and defence-related genes in orange fruit in response to antagonist-pathogen interaction[J]. *Journal of phytopathology*, 2011, 159(7/8): 555-562.
- [47] WANG T, ZHANG E H, CHEN X P, et al. Identification of seed proteins associated with resistance to pre-harvested aflatoxin contamination in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 1-11.
- [48] YANG B, RAHMAN M H, LIANG Y, et al. Characterization of defense signaling pathways of *Brassica napus* and *Brassica carinata* in response to *Sclerotinia sclerotiorum* challenge [J]. *Plant molecular biology reporter*, 2010, 28(2): 253-263.
- [49] VASANTHAIAH H K N, BASHA S M, KATAM R. Differential expression of chitinase and stilbene synthase genes in Florida hybrid bunch grapes to ElsinoA ampelina infection [J]. *Plant growth regulation*, 2010, 61(2): 127-134.
- [50] BOUDICHEVSKAIA A, FLACHOWSKY H, DUNEMANN F. Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to *HerVf* genes for scab resistance in apple [J]. *Plant breeding*, 2009, 128(1): 84-91.
- [51] ZHENG J Y, ZOU X X, MAO Z C, et al. A novel pepper (*Capsicum annu-*

- um L.) WRKY gene, *CaWRKY30*, is involved in pathogen stress responses[J]. *Journal of plant biology*, 2011, 54(5): 329-337.
- [52] ZHANG Q, ZHANG Z Y, LIN S Z, et al. Characterization of resistance gene analogs with a nucleotide binding site isolated from a triploid white poplar[J]. *Plant biology*, 2008, 10(3): 310-322.
- [53] HALL D E, ROBERT J A, KEELING C I, et al. An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil[J]. *The plant journal*, 2011, 65(6): 936-948.
- [54] INGHAM D J, BEER S, MONEY S, et al. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(1): 132-134, 136-140.
- [55] MASON G, PROVERO P, VAIRA A M, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[J]. *BMC Biotechnology*, 2002, 2: 1-20.
- [56] YI C X, ZHANG J, CHAN K M, et al. Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Analytical biochemistry*, 2008, 375(1): 150-152.
- [57] CHRISTOU P, FORD T L. Recovery of chimeric rice plants from dry seed using electric discharge particle acceleration[J]. *Annals of Botany*, 1995, 75(5): 449-454.
- [58] SCHMULLING T, SCHELL J. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras[J]. *Plant molecular biology*, 1993, 21(4): 705-708.
- [59] FAIZE M, FAIZE L, URGOS L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation[J]. *BMC Biotechnology*, 2010, 10: 1-8.
- [60] 徐小刚, 刘雅婷. 实时荧光定量 PCR 在植物病害中的应用[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(7): 52-56.
- [61] SCHAAD N W, FREDERICK R D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics[J]. *Canadian journal of plant pathology*, 2002, 24(3): 250-258.
- [62] BABU B K, MESAPOGU S, SHARMA A, et al. Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of plant and human pathogenic *Macrophomina phaseolina* from field and environmental samples[J]. *Mycologia*, 2011, 103(3): 466-473.
- [63] TOOLEY P W, CARRAS M M, SECHLER A, et al. Real-time PCR detection of sorghum ergot pathogens *Claviceps africana*, *Claviceps sorghi* and *Claviceps sorghicola*[J]. *Journal of phytopathology*, 2010, 158(10): 319-324.
- [64] 殷幼平, 黄冠军, 赵云, 等. 柑桔溃疡病菌实时荧光定量 PCR 检测与应用[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(6): 607-613.
- [65] 钱国良, 胡白石, 卢玲, 等. 梨火疫病病菌的实时荧光 PCR 检测[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(2): 123-128.
- [66] 夏明星, 赵文军, 马青, 等. 番茄细菌性溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(2): 152-157.
- [67] SANKARAN S, MIAHRA A, EHSANI R, et al. A review of advanced techniques for detecting plant diseases[J]. *Computers and electronics in agriculture*, 2010, 72(1): 1-13.
- [68] 王金成, 季镭, 杨秀丽, 等. 松材线虫 TaqMan 探针实时荧光 PCR 诊断[J]. *植物病理学报*, 2006, 36(3): 281-284.
- [69] 王焱, 季镭, 余本渊, 等. 3种松材线虫分子检测技术的比较分析[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2007, 31(4): 128-132.
- [70] LEAL I, GREEN M, ALLEN E, et al. Application of a real-time PCR method for the detection of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine[J]. *Nematology*, 2007, 9(3): 351-362.
- [71] 李明, 卢文才, 冯祖宏, 等. 朱砂叶螨热激蛋白 HSP70 基因 *TCHSP70-4* 的克隆与表达[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(12): 1235-1243.
- [72] 郭庆, 王忠跃, 孔繁芳, 等. 实时荧光定量 PCR 在植物害虫研究中的应用[J]. *江西植保*, 2011, 34(2): 47-53.
- [73] 徐浪, 余道坚, 李建光, 等. AllGlo 实时荧光 PCR 快速检测 6 种按实蝇[J]. *植物检疫*, 2010, 24(5): 18-21.
- [74] 吴霞, 张桂芬, 万方浩. 基于 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术的西花蓟马快速检测[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(3): 497-503.
- [75] HUANG K S, LEE S E, YEH Y, et al. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine[J]. *Biology letter*, 2010, 6(4): 55-57.
- [76] ELENIS D S, KALOGIANNI D P, GLYNOU K, et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, 392(3): 347-254.
- [77] MICHELINI E, SIMONI P, CEVENINI L, et al. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms an update[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, 392(2): 355-367.
- [78] ZHANG D, GUO J. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products[J]. *Journal of integrative plant biology*, 2011, 53(7): 539-551.
- [79] 王梁燕, 洪奇华, 张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(1): 62-67.

### 名词解释

扩展总被引频次:指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年被引用的总次数。这是一个非常客观实际的评价指标,可以显示该期刊被使用和受重视的程度,以及在科学交流中的作用和地位。

扩展影响因子:这是一个国际上通行的期刊评价指标,是 E·加菲尔德于 1972 年提出的。由于它是一个相对统计量,所以可公平地评价和处理各类期刊。通常,期刊影响因子越大,它的学术影响力和作用也越大。具体算法为:

$$\text{扩展影响因子} = \frac{\text{该刊前 2 年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该刊前 2 年发表论文总数}}$$

扩展即年指标:这是一个表征期刊即时反应速率的指标,主要描述期刊当年发表的论文在当年被引用的情况。具体算法为:

$$\text{扩展即年指标} = \frac{\text{该期刊当年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊当年发表论文总数}}$$

扩展他引率:指该期刊全部被引次数中,被其他刊引用次数所占的比例。具体算法为:

$$\text{扩展他引率} = \frac{\text{被其他刊引用的次数}}{\text{期刊被引用的总次数}}$$

扩展引用刊数:引用被评价期刊的期刊数,反映被评价期刊被使用的范围。

扩展学科扩散指标:指在统计源期刊范围内,引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{引用刊数}}{\text{所在学科期刊数}}$$