

Nghiên cứu sử dụng gene mã hóa Adenine Phosphoribosyl Transferase (APRT) làm gene tham chiếu trong phân tích biểu hiện gene theo mô hoặc dưới ảnh hưởng của xử lý stress ở cây cà tím (*Solanum melongena*) bằng phương pháp RT-qPCR

Khuất Lê Uyên Vy^{1,2}, Bùi Thị Tường Vi^{1,2}, Phạm Thị Ánh Hồng^{1,2}, Nguyễn Thị Hồng Thương^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh

²Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

Liên hệ

Nguyễn Thị Hồng Thương, Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP. Hồ Chí Minh

Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

Email: nththuong@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 30-3-2022
- Ngày chấp nhận: 26-7-2022
- Ngày đăng: 30-9-2022

DOI: 10.32508/stdjns.v6i3.1177



Bản quyền

© ĐHQG TP.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Cây cà tím (*Solanum melongena*), loài cây cho quả có giá trị thực phẩm và dược liệu cao, thường dễ bị côn trùng và mầm bệnh tấn công. Trong số các phân tích chức năng các gene tham gia vào sự đáp ứng với các tác nhân gây căng thẳng ở cà tím, phân tích định lượng biểu hiện gene bằng RT-qPCR là một trong các phương pháp được sử dụng phổ biến và hiệu quả. Phương pháp RT-qPCR cần phải có bước chuẩn hóa dữ liệu biểu hiện của gene mục tiêu với gene tham chiếu (reference genes) để đảm bảo tính chính xác trong kết quả định lượng. Bài báo trình bày việc khảo sát sự biểu hiện phiên mã của gene mã hóa adenine phosphoribosyl transferase (*SmAPRT*) trên các loại mô khác nhau của *S. melongena* trong điều kiện bình thường, và trên mô lá của các cây cà tím bị gây vết thương cơ học hoặc xử lý với MeJA/MeSA. Cặp mồi được thiết kế để nhân bản đặc hiệu đoạn DNA dài 103 bp từ bản sao *SmAPRT*. Hiệu suất phản ứng qPCR đạt 92,7% và giá trị này ở trong phạm vi khuyến nghị (90–110%). Giá trị C_t của các phản ứng qPCR sử dụng khuôn cDNA từ các cây xử lý gây tạo vết thương hoặc xử lý với MeJA/MeSA không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các giá trị C_t thuộc nghiệm thức đối chứng. Gene *SmAPRT* cũng biểu hiện ổn định ở mô rễ, thân, lá, hoa và quả cà tím trong điều kiện bình thường. Do vậy, *SmAPRT* có thể được sử dụng làm gene tham chiếu để chuẩn hóa dữ liệu định lượng mức độ biểu hiện gene quan tâm ở các mô khác nhau cũng như trong đáp ứng của *S. melongena* với các tác nhân gây căng thẳng được mô phỏng.

Từ khoá: gene tham chiếu, *Solanum melongena*, methyl jasmonate, methyl salicylate, RT-qPCR, adenine phosphoribosyl transferase

MỞ ĐẦU

Cây cà tím (*Solanum melongena*) là loài nông sản quan trọng và phổ biến ở các nước Châu Á, Trung Đông, Cận Đông, Địa Trung Hải và Châu Phi. Cà tím được sử dụng để điều trị một số bệnh như tiểu đường, viêm khớp, hen suyễn và viêm phế quản¹. Vì hiệu quả biến nạp gene cao, cây cà tím còn được sử dụng làm cây mô hình để nghiên cứu các tình trạng nông học khác nhau thông qua công nghệ chuyển gene². Hiện tại, cơ sở dữ liệu bộ gene cà tím đã được giải mã tương đối hoàn chỉnh, với khoảng 35.000 gene được chú thích³. Đây là một nguồn dữ liệu hữu ích để phân tích chức năng các gene mới, đặc biệt là các gene tham gia trong con đường truyền tín hiệu căng thẳng (stress) ở loài này⁴⁻⁶.

Cây cà tím là cây hằng niên, quả mọng và được thu hoạch liên tục, khiến cho việc bảo vệ cây khỏi nấm bệnh và sâu hại gặp nhiều khó khăn. Hơn nữa, do người tiêu dùng thường để nguyên vỏ quả khi chế

biến cà tím, người trồng cần hạn chế sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật trên loại cây này. Thực vật nói chung và cây cà tím nói riêng phản ứng với các tác nhân gây căng thẳng bằng cách cảm ứng các con đường dẫn truyền tín hiệu, thông qua việc kích hoạt tổng hợp các hormone thực vật hoạt động như những tín hiệu phòng vệ bao gồm jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA) và ethylene (ET)^{7,8}, dẫn đến những thay đổi trong sự biểu hiện của các gene liên quan đến cơ chế phòng vệ^{7,9}. Việc phân tích các tác động của tổn thương cơ học và tác động của tín hiệu gây căng thẳng (JA/SA) đến sự biểu hiện của các gene liên quan đến cơ chế phòng vệ có thể góp phần làm sáng tỏ cơ chế phân tử của những quá trình này.

Ngày nay, phương pháp định lượng RT-qPCR đã trở thành một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi để định lượng nhanh chóng và chính xác sự biểu hiện của gene ở mức phiên mã. Tuy nhiên, sự chính xác của phương pháp định lượng RT-qPCR phụ thuộc vào việc chọn gene tham chiếu (reference

Trích dẫn bài báo này: Vy K L U, Vi B T T, Hồng P T A, Thương N T H. **Nghiên cứu sử dụng gene mã hóa Adenine Phosphoribosyl Transferase (APRT) làm gene tham chiếu trong phân tích biểu hiện gene theo mô hoặc dưới ảnh hưởng của xử lý stress ở cây cà tím (*Solanum melongena*) bằng phương pháp RT-qPCR.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 6(3):2314-2326.

genes) phù hợp để có thể chuẩn hóa dữ liệu biểu hiện của các gene mục tiêu. Việc sử dụng gene tham chiếu giúp kiểm soát sự khác biệt về số lượng và chất lượng RNA tách chiết giữa các mẫu khảo sát, hiệu suất của phản ứng phiên mã ngược, tính đặc hiệu của cặp mồi và hiệu suất của quá trình nhân bản. Một số gene giữ nhà (housekeeping genes) liên quan đến các hoạt động thiết yếu của tế bào như các gene mã hóa 18S rRNA, 25S rRNA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) và ubiquitin (UBQ) thường được sử dụng làm gene tham chiếu trong các phân tích RT-qPCR vì chúng có mức biểu hiện ổn định trong các điều kiện thí nghiệm khác nhau¹⁰⁻¹⁴. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng sự biểu hiện của các gene giữ nhà cũng thay đổi đáng kể trong nhiều trường hợp¹⁵⁻¹⁷. Do đó, trước khi phân tích sự biểu hiện phiên mã của gene mục tiêu trên một hệ thống sinh học cụ thể, cần đánh giá tính ổn định của gene tham chiếu được chọn trên chính hệ thống đó^{18,19}.

Sự biểu hiện phiên mã của các gene 18S rRNA, adenine phosphoribosyl transferase (APRT), GAPDH, cyclophilin, actin, và ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBP) đã được khảo sát trên 6 mô khác nhau bao gồm lá non, lá trưởng thành, chồi, rễ, nụ hoa và hoa²⁰. Kết quả phân tích dữ liệu biểu hiện gene bằng ba thuật toán thống kê khác nhau (geNorm, NormFinder và BestKeeper) đã cho thấy rằng 18S rRNA, cyclophilin và APRT là các gene có sự biểu hiện ổn định nhất ở các mô nêu trên²¹. Kết quả này được ghi nhận trên 4 giống cà tím khác nhau (Pusa Shyamla, Pusa Ankur, Pusa Kranti và Pusa Uttam), 2 dòng cà tím chuyển gene và 2 dòng cà tím bị nhiễm tuyến trùng.

Bài báo này trình bày khả năng sử dụng APRT làm gene tham chiếu trong phân tích biểu hiện gene bằng phương pháp RT-qPCR ở cà tím, khi có tổn thương cơ học hoặc dưới ảnh hưởng của xử lý với MeJA hoặc MeSA. Tính ổn định trong sự biểu hiện của gene *SmAPRT* cũng được đánh giá trên các mô khác nhau của cây cà tím, bao gồm những mô đã được khảo sát trước đây gồm lá non, lá trưởng thành, rễ, và hoa, cùng những mô chưa được khảo sát như thân và quả.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Hạt cà tím (*Solanum melongena* L.) dòng thuần (giống cà tím Mê Linh quả dài) được cung cấp bởi Viện Cây ăn quả miền Nam (SOFRI). Hạt được gieo trồng trong nhà màng của Phòng thí nghiệm Sinh hóa Ứng dụng, Bộ môn Sinh hóa và được định danh tại Bộ môn Sinh

thái-Sinh học tiến hóa, Khoa Sinh học-Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. HCM.

Thu mẫu mô của cà tím

Chín cây cà tím 13 tuần tuổi (Hình 1) có kích thước đồng đều nhau được sử dụng để thu mẫu lá non, lá trưởng thành, thân, rễ, hoa và quả. Mỗi nghiệm thức bao gồm 3 tổ hợp, với mỗi tổ hợp bao gồm 3 cây cà tím.

Xử lý tạo vết thương cơ học và xử lý với tín hiệu căng thẳng (MeJA/MeSA) trên cây cà tím

Ba mươi sáu cây cà tím 6 tuần tuổi, có kích thước đồng đều, không bị côn trùng và mầm bệnh tấn công được lựa chọn cho 4 nghiệm thức bao gồm xử lý tạo vết thương, xử lý với MeJA, xử lý với MeSA và đối chứng. Mỗi nghiệm thức có 3 tổ hợp, với mỗi tổ hợp bao gồm 3 cây cà tím.

Ở nghiệm thức xử lý tạo vết thương: một lá ở tầng trên cùng (ngay dưới chồi cây) bị gây tổn thương cơ học bằng cách dùng kẹp hemostat bấm 3 đường ngang qua gân chính và gân phụ của lá (Hình 2). Sau 24 giờ xử lý, một lá nguyên vẹn ở ngay tầng dưới của lá bị gây tổn thương được thu nhận và bảo quản trong nitrogen lỏng.

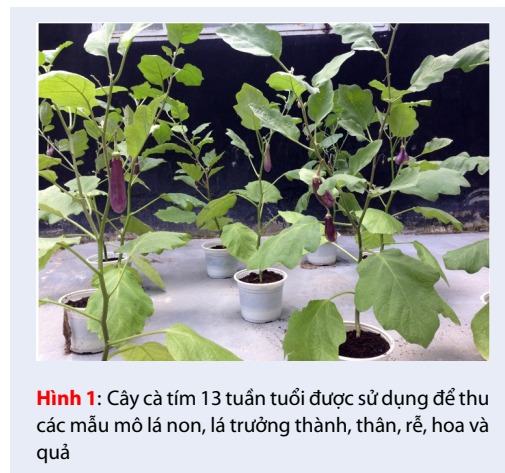
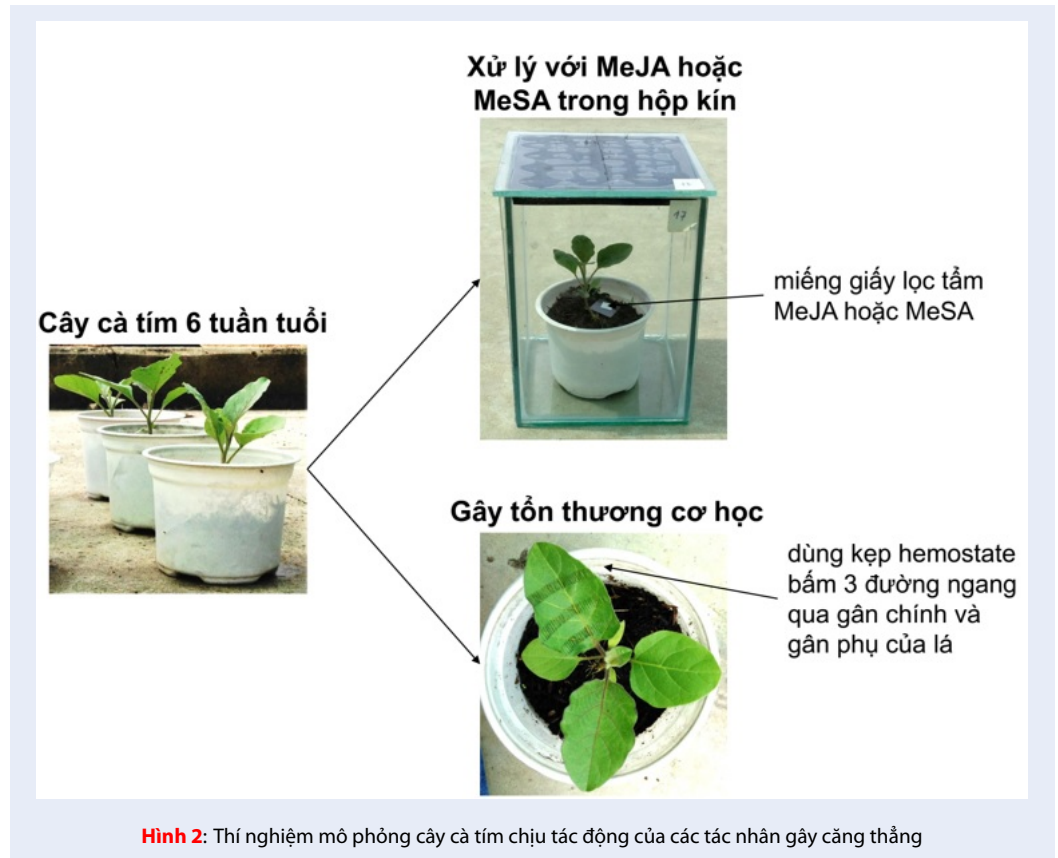
Ở nghiệm thức xử lý với MeJA: mỗi cây được đặt trong một hộp thủy tinh kín có chứa một mẫu giấy lọc được tẩm 6,8 mg MeJA²² (Hình 2). Sau 2 giờ xử lý, cây được đặt trở lại điều kiện sinh dưỡng bình thường trước đó để tiếp tục tăng trưởng. Sau 24 giờ, mô lá của mỗi cây được thu nhận và bảo quản trong nitrogen lỏng.

Ở nghiệm thức xử lý với MeSA: thực hiện tương tự như nghiệm thức xử lý MeJA, với mẫu giấy lọc được tẩm 3 mg MeSA²³ (Hình 2).

Ở nghiệm thức đối chứng (control): cây không bị gây tạo vết thương và không trải qua xử lý MeJA hoặc MeSA.

Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

Mẫu mô cà tím từ mỗi tổ hợp được nghiền thành dạng bột trong nitrogen lỏng. RNA tổng số được tách chiết từ 50 mg bột mô bằng kit EZ-10 Spin column Plant RNA Mini-preps (Bio Basic, Canada). DNA bộ gene còn hiện diện trong mẫu RNA tách chiết được loại bỏ theo hướng dẫn của kit RapidOut DNA Removal (Thermo Scientific, USA). Mẫu RNA có chất lượng tốt thường hiển thị rõ 2 vạch 28S và 18S khi điện di trên gel agarose 1%. Chất lượng RNA được đánh giá dựa trên tỷ lệ của sự hấp thụ tại bước sóng 260 và 280 nm (A_{260}/A_{280}). Hàm lượng RNA được xác định bằng



phương pháp đo mật độ quang trên máy quang phổ NanoVue Plus 7415 (Biochrom, UK). Quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của kit Reverse transcriptase Aid First Strand (Thermo Fisher Scientific, USA), sử dụng 1,5 μg RNA cho phản ứng có thể tích 20 μL . cDNA được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng qPCR.

Thiết kế cặp môi nhân bản đặc hiệu một đoạn trình tự DNA từ bản sao của gene *SmAPRT*

Mỗi xuôi *SmAPRT*-qF và mỗi ngược *SmAPRT*-qR sử dụng trong phản ứng RT-qPCR được thiết kế dựa trên trình tự mã hóa *APRT* (Genbank: JX448345)²¹ theo nguyên tắc sau: *i/* Chiều dài của mỗi (bp), hàm lượng GC (%) và nhiệt độ nóng chảy ($^{\circ}\text{C}$) trong khoảng khuyến nghị và các thông số này được kiểm tra bằng phần mềm OligoAnalyzer 3.1²⁰; *ii/* Khoảng cách giữa mỗi xuôi và mỗi ngược dao động trong khoảng 75–150 bp; *iii/* Ít nhất một trong hai môi bắt cặp bổ sung với vùng trình tự tiếp nối giữa hai exon kế nhau để mỗi chỉ bắt cặp với *SmAPRT* cDNA nhưng không bắt cặp với trình tự gene mục tiêu (trong trường hợp DNA bộ gene còn lẫn trong mẫu RNA tách chiết); *iv/* Cặp môi bắt cặp đặc hiệu với một trình tự duy nhất là bản sao của gene *SmAPRT*.

Khảo sát nhiệt độ gắn môi và kiểm tra tính đặc hiệu của mỗi trong phản ứng qPCR

Phản ứng qPCR được thực hiện trên hệ thống real-time PCR CFX96-Touch system (BioRad, USA) tại 4 điểm nhiệt độ gắn môi (T_a): 52 $^{\circ}\text{C}$; 55 $^{\circ}\text{C}$; 56,3 $^{\circ}\text{C}$ và

60 °C. Thành phần của phản ứng qPCR (tổng thể tích 12,5 μ L) bao gồm: 6,7 μ L nước đã loại nuclease; 1,25 μ L đệm phản ứng h-Taq 10X; 0,6 μ L MgCl₂ 50 mM; 0,25 μ L dNTP 10 mM; 0,5 μ L mỗi xuôi SmAPRT-qF 10 mM; 0,5 μ L mỗi ngược SmAPRT-qR 10 mM; 0,6 μ L EvaGreen[®] Dye 20X; 0,1 μ L SolGent[™] h-Taq DNA polymerase 2,5 U/ μ L; 2 μ L cDNA. Chu trình nhiệt của phản ứng qPCR như sau: 95 °C/ 15 phút, 40 chu kỳ của 95 °C (20 giây), T_a °C (40 giây) và 72 °C (6 giây), trong đó T_a (annealing temperature) là nhiệt độ gắn mỗi. Đường cong nóng chảy (melting curve) sau khi phản ứng qPCR kết thúc được thiết lập theo chương trình nhiệt độ như sau: tăng dần nhiệt độ từ 55 đến 95 °C, mỗi lần tăng 0,5 °C, giữ lại trong 5 giây và đọc tín hiệu. Nhiệt độ gắn mỗi được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo là nhiệt độ tại đó mẫu chứng âm cho kết quả âm tính (không ngoại nhiễm), còn mẫu khảo sát chỉ cho một đỉnh tín hiệu huỳnh quang duy nhất trong khoảng 75–90 °C trên đường cong nóng chảy (ứng với sản phẩm nhân bản đặc hiệu); đồng thời, phản ứng tại nhiệt độ gắn mỗi đó có giá trị chu kỳ ngưỡng C_t thấp nhất. Để kiểm chứng rằng phản ứng qPCR với cặp mỗi trên đã tạo ra sản phẩm nhân bản duy nhất và đặc hiệu, sản phẩm nhân bản được điện di trên gel agarose 1%, được tinh sạch và gửi giải trình tự hai chiều với mỗi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR tại 1st Base (Malaysia).

Khảo sát hiệu suất nhân bản

Hiệu suất nhân bản của phản ứng qPCR với cặp mỗi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR tại nhiệt độ gắn mỗi đã khảo sát được đánh giá thông qua đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng (C_t) với số lượng bản sao trong các mẫu cDNA đã được pha loãng theo hệ số bậc 10. Hiệu suất nhân bản của phản ứng qPCR (E%) được tính toán theo công thức: $E\% = (n^{-1/a} - 1) \times 100$, với n là hệ số pha loãng cDNA và a là hệ số góc của đường chuẩn có dạng $y = ax + b$ ^{24,25}. Phản ứng qPCR cho kết quả định lượng tin cậy khi hệ số tương quan R² \geq 0,985 và hiệu suất nhân bản (E%) trong khoảng 90-110%^{24,26}.

Khảo sát sự biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* ở cà tím

Mức độ biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* trong các mô khác nhau được khảo sát bằng phương pháp real-time PCR với các điều kiện phản ứng đã được thiết lập như trên. Khuôn được sử dụng trong phản ứng qPCR là các mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số thu nhận từ mô lá non, lá trưởng thành, thân, rễ, hoa và quả của cây cà tím.

Tương tự, mức độ biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* trong mô lá của các cây chịu tác động của

các tác nhân gây căng thẳng bao gồm xử lý gây tạo vết thương cơ học, xử lý với MeJA và xử lý với MeSA cũng được khảo sát bằng phương pháp qPCR với các điều kiện phản ứng tương tự. Giá trị chu kỳ ngưỡng C_t trong nghiệm thức đối chứng và xử lý được ghi nhận và so sánh bằng phân tích thống kê.

Xử lý thống kê

Phương pháp phân tích thống kê ANOVA một yếu tố (Tukey HSD test) được sử dụng để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng C_t trung bình (C_{t-tb}) của các phản ứng qPCR trong thí nghiệm khảo sát nhiệt độ gắn mỗi, và trong thí nghiệm khảo sát biểu hiện của gene *SmAPRT* theo mô ở cây cà tím. Ở thí nghiệm mô phỏng cây cà tím chịu tác động của các tác nhân gây căng thẳng, phương pháp Student's *t*-test (two-tail, unpaired, equal variance) được sử dụng để so sánh giá trị chu kỳ ngưỡng C_{t-tb} của các phản ứng qPCR trong nghiệm thức xử lý với giá trị C_{t-tb} trong nghiệm thức đối chứng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế cặp mỗi nhân bản đặc hiệu một đoạn trình tự DNA từ bản sao của gene *SmAPRT*

Trình tự, thông số và vị trí của mỗi xuôi SmAPRT-qF và mỗi ngược SmAPRT-qR được trình bày trong Bảng 1 và Hình 3. Cặp mỗi được dự đoán cho phép nhân bản đặc hiệu một đoạn trình tự DNA có chiều dài 103 bp.

Tách chiết RNA tổng số

Các mẫu RNA tách chiết được điện di trên gel agarose 1%. Hình ảnh từ bản gel (Hình 4) cho thấy các mẫu RNA đều có chất lượng tốt với các vạch 18S và 28S hiện diện rõ nét.

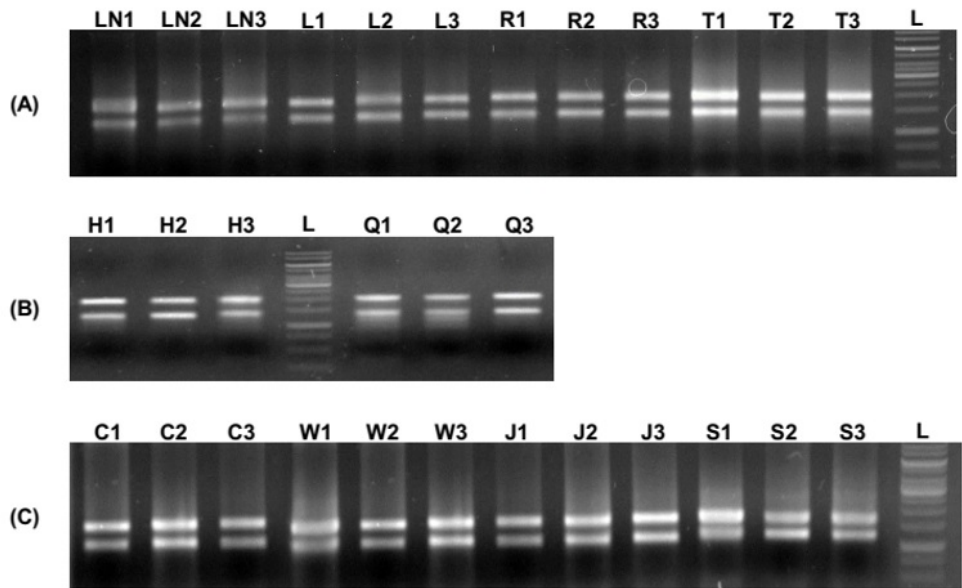
Khảo sát nhiệt độ gắn mỗi trong phản ứng qPCR

Mẫu cDNA của mô quả (pha loãng 10 lần) được sử dụng làm khuôn trong phản ứng. Kết quả ở Hình 5 cho thấy các đường cong nóng chảy ứng với các điểm nhiệt độ gắn mỗi được khảo sát đều chỉ có một đỉnh tín hiệu huỳnh quang duy nhất trong khoảng nhiệt độ 81,5–82,5 °C. Dựa trên phân tích thống kê ANOVA một yếu tố - Tukey HSD test, các giá trị chu kỳ ngưỡng C_{t-tb} của các phản ứng qPCR sử dụng nhiệt độ gắn mỗi khác nhau (Bảng 2) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p-value = 0,088 > 0,05) (Bảng 5). Như vậy, trong các thí nghiệm tiếp theo, có thể sử dụng một trong 4 nhiệt độ gắn mỗi nêu trên. Cụ thể, 55 °C đã được chọn làm nhiệt độ gắn mỗi.


```

TGGCGGCTCATGAACCGATTCTTAAGGACGATCGTATCGCTGGGATCTCTTCTGCTATTCCG
GGTCATACCCGACTTTCTAAACCCGGGATTATGTTTCAGGATATAACGACTTTGCTTCTT
GATACTAAGGCGTTTAAGGACACTGTTGACTTGTGGTTGAGAGATACAAGGACAAAAAC
      SmAPRT-qF
ATCACTGTGGTTGCAGGTGTGGAAGCAAGAGGTTTATCTTTGGTCCTCCCATTCATTGCG
      SmAPRT-qR
CTATTGGAGCCAAATTTGTCCCATGAGGAAACCTAAGAAGCTACCTGGGAGGTTATTT
CAGAAGAGTATTCTTTGGAATATGGAACAGACAAGATGGAGATGCATGTAGGTGCTGTGC
AAGCCAGTGACCGTGCACCTTGTGGTAGATGATCTTATTGCGACTGGAGGGACCCTAACTG
CTGCGATTAGGCTTCTTGAGCGTGTGGGAGC
    
```

Hình 3: Vị trí bắt cặp của mỗi xuôi SmAPRT-qF và mỗi ngược SmAPRT-qR trên một phần trình tự mã hóa *SmAPRT* (Genbank: JX448345). Các exon kế nhau được phân biệt với nhau bởi màu nền.



Hình 4: Kết quả điện di mẫu RNA tổng số tách chiết từ các mô khác nhau (A và B) và từ mô lá trong thí nghiệm mô phỏng cây cà tím chịu tác động của các tác nhân gây căng thẳng (C). LN: lá non; L: lá trưởng thành; R: rễ; T: thân; H: hoa; Q: quả; C: đối chứng; W: xử lý gây tạo vết thương; J: xử lý với MeJA; S: xử lý với MeSA; L: thang chuẩn DNA 1kb.

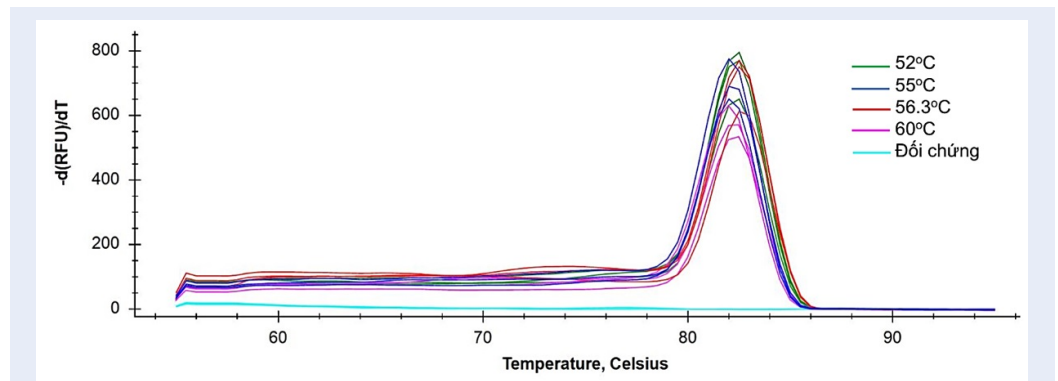
Bảng 1: Các thông số cơ bản của cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR

Tên mồi	Trình tự (5' → 3')	Số nt	Cấu trúc thứ cấp	Bắt cặp giữa 2 mồi	T _m (°C)	GC (%)
SmAPRT-qF	TGGTTGCAGGTGTGGAAG	18	không	không	55,4	55,6
SmAPRT-qR	CCAGGTAGCTTCTTAGGTTTC	21	không	không	52,6	47,6

Bảng 2: Giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR với cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR khi sử dụng các nhiệt độ gắn mồi (T_a) khác nhau

T _a	52 °C	55 °C	56,3 °C	60 °C
C _{t1}	25,12	25,09	25,06	24,37
C _{t2}	25,22	25,07	24,89	24,98
C _{t3}	25,61	25,23	25,23	25,30
C _{t-ib} ± SE	25,32 ± 0,15	25,13 ± 0,05	25,14 ± 0,10	24,88 ± 0,27

Các giá trị C_{t-ib} của các phản ứng qPCR sử dụng nhiệt độ gắn mồi khác nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê, thể hiện qua kết quả phân tích ANOVA một yếu tố (p = 0,088 > 0,050) (Bảng 5)



Hình 5: Đường cong nóng chảy của sản phẩm nhân bản trong các phản ứng qPCR sử dụng các nhiệt độ gắn mồi (T_a) khác nhau

Phân tích trình tự của đoạn DNA được nhân bản trong phản ứng qPCR

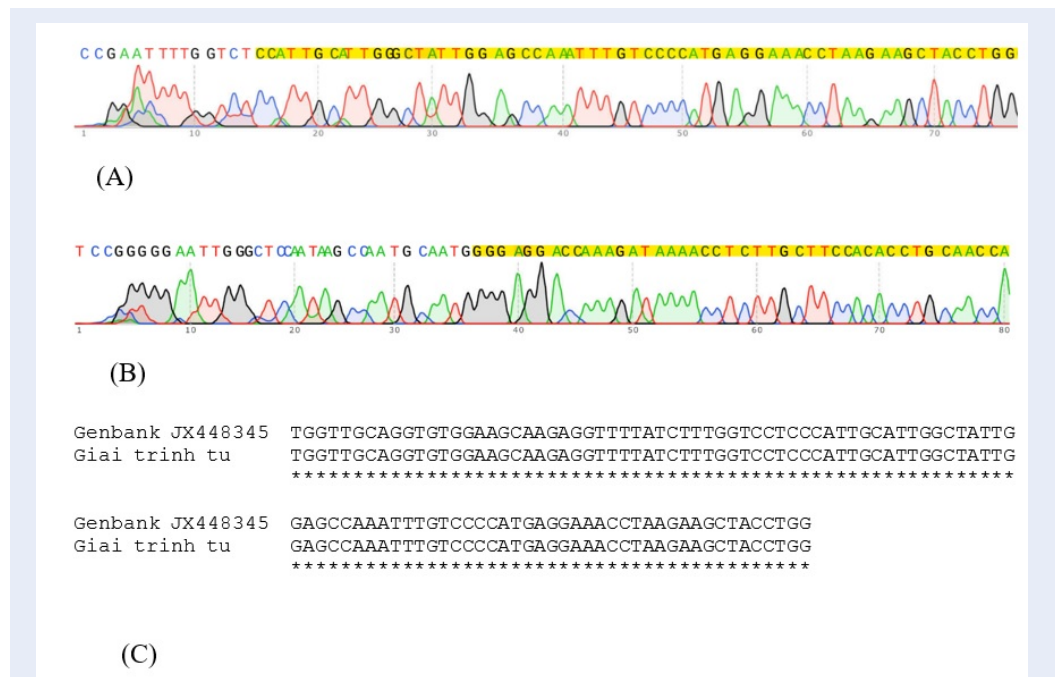
Hình ảnh điện di sản phẩm nhân bản của phản ứng qPCR sử dụng cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR cho thấy ở giếng M của bản gel xuất hiện một vạch có vị trí thấp hơn vạch 250 bp của thang chuẩn DNA (Thermo Fisher Scientific, USA). Vạch này phù hợp với kích thước dự đoán 103 bp của sản phẩm nhân bản đặc hiệu (Hình 6). Bên cạnh đó, ở giếng đối chứng (sử dụng nước đã loại nuclease thay cho cDNA) không xuất hiện vạch có kích thước tương ứng (Hình 6). Sản phẩm nhân bản sau đó được tinh sạch từ gel agarose và giải trình tự hai chiều với mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR. Kết quả giải trình tự (Hình 7) cho thấy đoạn DNA này chính là sản phẩm nhân bản duy nhất và đặc hiệu của phản ứng qPCR.

Hiệu suất nhân bản của phản ứng qPCR

Để đánh giá hiệu suất nhân bản của phản ứng qPCR, đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng (C_t) với số lượng bản sao hiện diện trong mẫu cDNA đã pha loãng nồng độ theo hệ số 10 được xây dựng như mô tả trong Hình 8. Đồ thị đường chuẩn có hệ số tương quan R² = 0,9996 và có phương trình y = -3,511x + 20,167; trong đó hệ số góc (a) = -3,511 (Hình 8). Hiệu suất nhân bản của phản ứng qPCR được tính toán dựa trên hệ số góc của đường chuẩn là 92,7 %. Giá trị hiệu suất này nằm trong phạm vi khuyến nghị (90–110 %) đảm bảo độ tin cậy của kết quả định lượng.

Sự biểu hiện phiên mã của gene SmAPRT ở các mô khác nhau của cà tím

Dựa trên các dữ liệu nghiên cứu so sánh độ ổn định trong biểu hiện phiên mã của các gene tham chiếu



Hình 7: Phân tích trình tự đoạn DNA được nhân bản trong phản ứng qPCR với cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR. (A) Kết quả giải trình tự sản phẩm qPCR với mồi xuôi SmAPRT-qF; (B) Kết quả giải trình tự sản phẩm qPCR với mồi ngược SmAPRT-qR; (C) Kết quả sắp giống cột trình tự đoạn DNA được nhân bản theo cơ sở dữ liệu (Genbank: JX448345) và theo kết quả giải trình tự.

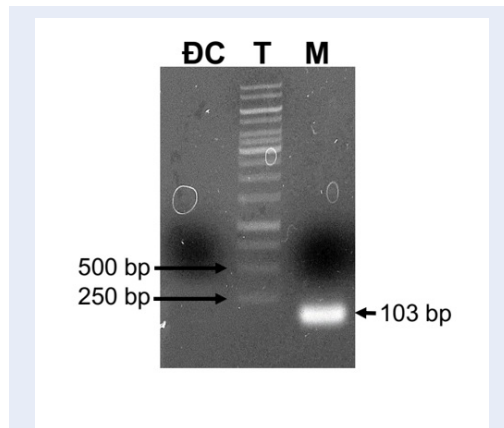
Bảng 3: Giá trị chu kỳ ngưỡng C_t trong phản ứng qPCR khảo sát biểu hiện của gene *SmAPRT* ở các mô khác nhau của cây cà tím

Mô	C_{t1}	C_{t2}	C_{t3}	$C_{t-ib} \pm SE$
Lá non	21,82	21,87	21,85	21,85 \pm 0,01
Lá già	22,65	21,60	22,16	22,14 \pm 0,30
Thân	21,47	21,69	20,71	21,29 \pm 0,30
Rễ	22,76	21,64	22,45	22,28 \pm 0,33
Hoa	20,82	20,67	21,39	20,96 \pm 0,22
Quả	22,36	22,44	22,49	22,43 \pm 0,02

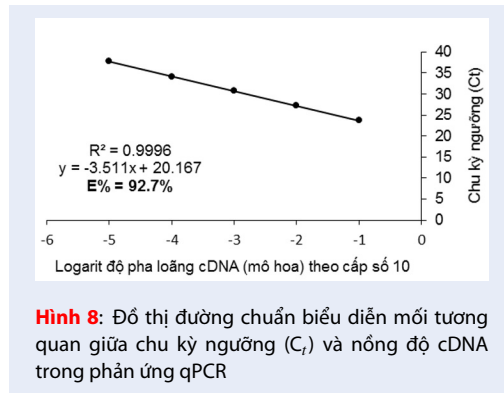
Các giá trị C_{t-ib} của các phản ứng qPCR không khác biệt có ý nghĩa thống kê, thể hiện qua kết quả phân tích ANOVA một yếu tố (p -value = 0,70 > 0,05) (Bảng 6)

tiềm năng ở cây cà tím, *SmAPRT* được đánh giá là gene có sự biểu hiện phiên mã tương đối ổn định trong 6 mô đại diện cho các giai đoạn phát triển của cà tím (lá non, lá trưởng thành, chồi, rễ, nụ hoa và hoa)²¹. Trong nghiên cứu này, tính ổn định trong sự biểu hiện của gene *SmAPRT* được khảo sát một cách đầy đủ hơn trên các mô khác nhau của cây cà tím bao gồm cả những mô chưa được sử dụng trong nghiên cứu nêu trên như mô thân và mô quả. Giá trị C_t của các phản ứng qPCR với cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR trên các mẫu cDNA lần lượt được

chuẩn bị từ mô lá non, lá trưởng thành, thân, rễ, hoa và quả được thể hiện ở Bảng 3. Giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) của *SmAPRT* ở các mô khác nhau không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p -value = 0,70 > 0,05) theo phân tích ANOVA một yếu tố (Bảng 6), chứng tỏ gene này biểu hiện ổn định ở các mô cà tím được khảo sát. Kết quả này tương đồng với nhận định của Gantasala và cộng sự (2013) khi phân tích tính ổn định trong biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* trên 6 mẫu mô đại diện 6 giai đoạn phát triển khác nhau của cà tím gồm: lá non, lá trưởng thành, chồi, rễ, nụ



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm qPCR sử dụng cặp mồi SmAPRT-qF và SmAPRT-qR trên gel agarose 1%. ĐC: Đối chứng âm không bổ sung cDNA; T: Thang chuẩn DNA 1kb; M: Sản phẩm nhân bản sử dụng khuôn cDNA chuẩn bị từ mô quả cà tím.



Hình 8: Đồ thị đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng (C_t) và nồng độ cDNA trong phản ứng qPCR

hoa và hoa. Đồng thời, kết quả của nghiên cứu này cho thấy *SmAPRT* cũng biểu hiện ổn định trong cả mô thân và mô quả, vốn không được khảo sát trong nghiên cứu của Gantasala và cộng sự²¹.

Sự biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* khi cây cà tím chịu tác động của các yếu tố gây căng thẳng

Giá trị C_t của các phản ứng qPCR trong thí nghiệm khảo sát sự biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* trong điều kiện cây cà tím chịu tổn thương cơ học hoặc được xử lý với MeJA hay MeSA được thể hiện ở Bảng 4. Kết quả phân tích thống kê so sánh giá trị chu kỳ ngưỡng C_t giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức xử lý bằng phương pháp Student's *t*-test (two-tail, unpaired, equal variance) cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mẫu xử lý và mẫu đối chứng (p-value > 0,05) (Bảng 7). Điều này cho thấy

gene *SmAPRT* biểu hiện ổn định ở tất cả các nghiệm thức của thí nghiệm mô phỏng cây cà tím chịu các tác động từ các yếu tố gây căng thẳng nêu trên.

Năm 2014, nhóm nghiên cứu của Zhou và cộng sự²⁷ đã khảo sát sự biểu hiện phiên mã của 9 gene giữ nhà (*18sRNA*, *CYP*, *UBQ*, *GAPDH*, *TUB*, *TUA*, *EFL*, *ACTIN* và *RPOB*) trên 4 hệ thống thực nghiệm khác nhau ở cây cà tím *S. melongena* L. bao gồm các mô khác nhau, xử lý hormone (ABA, MeJA và SA), căng thẳng sinh học (xâm nhiễm tuyến trùng *Verticillium dahliae*) và căng thẳng phi sinh học (nóng, lạnh, hạn hán và nhiễm mặn). Dựa trên nghiên cứu này, xét một cách tổng thể, gene mã hóa cho GAPDH và 18S RNA được cho là có biểu hiện ổn định nhất trong các điều kiện thí nghiệm được khảo sát. Tuy nhiên, có thể thấy rõ mức độ ổn định trong sự biểu hiện phiên mã của từng gene giữ nhà thay đổi đáng kể giữa các hệ thống thực nghiệm khác nhau. Nói cách khác, mức biểu hiện phiên mã của các gene có thể ổn định trong điều kiện thí nghiệm này nhưng lại có sự biến động trong những điều kiện khác. Gene mã hóa 18S RNA được đánh giá là có biểu hiện ổn định nhất trong thí nghiệm xử lý hormone, tuy nhiên chỉ được xếp ở vị trí thứ 6 về độ ổn định trong thí nghiệm khảo sát sự biểu hiện theo mô. Ngược lại, gene mã hóa GAPDH đứng đầu về mức độ ổn định trong biểu hiện ở các mô khác nhau của cà tím nhưng được xếp ở vị trí thứ 4 ở thí nghiệm xử lý hormone²⁷. Trong báo cáo này, gene *SmAPRT* không chỉ thể hiện tính ổn định trong biểu hiện ở các mô khác nhau mà còn cả trong điều kiện cây cà tím chịu ảnh hưởng của một số tác động của các tác nhân gây căng thẳng bao gồm xử lý gây tổn thương cơ học, xử lý với hormone (MeJA hoặc MeSA).

KẾT LUẬN

Gene *adenine phosphoribosyl transferase (SmAPRT)* có mức biểu hiện phiên mã ổn định ở các mô khác nhau của cà tím (p-value = 0,70 > 0,05) hoặc khi cây cà tím ở trong điều kiện căng thẳng như có tổn thương cơ học (p-value = 0,16 > 0,05), hoặc có xử lý với MeJA (p-value = 0,12 > 0,05) hay MeSA (p-value = 0,70 > 0,35) - những hormone liên quan đến con đường truyền tín hiệu căng thẳng. Do vậy, *SmAPRT* có thể là gene tham chiếu phù hợp cho các phân tích định lượng sự biểu hiện gene bằng phương pháp RT-qPCR trong các điều kiện thí nghiệm nêu trên. Phản ứng qPCR với cặp mồi được thiết kế trong Bảng 1 đã cho phép nhân bản đặc hiệu một đoạn trình tự DNA có kích thước 103 bp từ bản sao gene *SmAPRT* với hiệu suất nhân bản (92,7%) trong khoảng khuyến nghị 90–110%.

PHỤ LỤC

Bảng 5, 6, 7, 8 và 9

Bảng 4: Giá trị chu kỳ ngưỡng C_t trong phản ứng qPCR khảo sát biểu hiện gene *SmAPRT* ở cây cà tím khi cây chịu tác động của các yếu tố gây căng thẳng

Yếu tố gây căng thẳng	Tổn thương cơ học	Xử lý với MeJA	Xử lý với MeSA	Đối chứng
C_{t1}	22,92	21,39	22,13	22,69
C_{t2}	22,95	20,99	22,74	21,57
C_{t3}	22,34	21,64	22,56	21,98
$C_{t-ab} \pm SE$	22,74 \pm 0,20	21,34 \pm 0,19	22,48 \pm 0,18	22,08 \pm 0,33
p-value	0,16	0,12	0,35	

Giá trị C_{t-ab} của mẫu xử lý và mẫu đối chứng không khác biệt có ý nghĩa thống kê, thể hiện qua kết quả phân tích thống kê Student's t-test (two-tail, unpaired, equal variance) ($p\text{-value} > 0,05$) (Bảng 7, 8 và 9)

Bảng 5: Kết quả phân tích thống kê ANOVA một yếu tố để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR sử dụng các nhiệt độ gắn mỗi (T_a) khác nhau

Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Row 1	4	99,64	24,91	0,130		
Row 2	4	100,16	25,04	0,020		
Row 3	4	101,37	25,34	0,033		
ANOVA						
Source of Variation		df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,394	2	0,197	3,231	0,088	4,256
Within Groups	0,549	9	0,061			
Total	0,943	11				

Bảng 6: Kết quả phân tích thống kê ANOVA một yếu tố để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR khảo sát sự biểu hiện phiên mã của gene *SmAPRT* ở các mô khác nhau của cà tím

Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Column 1	6	131,88	21,98	0,567		
Column 2	6	129,91	21,65	0,327		
Column 3	6	130,95	21,83	0,451		
ANOVA						
Source of Variation		df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,324	2	0,162	0,361	0,703	3,682
Within Groups	6,725	15	0,448			
Total	7,049	17				

Bảng 7: Kết quả phân tích thống kê bằng phương pháp Student's *t*-test (two-tail, unpaired, equal variance) để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR khảo sát biểu hiện của gene *SmAPRT* khi cây cà tím bị xử lý gây vết thương cơ học

	Variable 1	Variable 2
Mean	22,080	22,737
Variance	0,321	0,11233
Observations	3	3
Pooled Variance	0,220	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-1,716	
P(T<=t) one-tail	0,081	
t Critical one-tail	2,132	
P(T<=t) two-tail	0,161	
t Critical two-tail	2,776	

Bảng 8: Kết quả phân tích thống kê bằng phương pháp Student's *t*-test (two-tail, unpaired, equal variance) để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR khảo sát biểu hiện của gene *SmAPRT* khi cây cà tím bị xử lý với MeJA

	Variable 1	Variable 2
Mean	22,080	21,340
Variance	0,321	0,107
Observations	3	3
Pooled Variance	0,214	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	1,958	
P(T<=t) one-tail	0,061	
t Critical one-tail	2,132	
P(T<=t) two-tail	0,122	
t Critical two-tail	2,776	

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn TS. Trần Kim Cường, Viện Cây ăn quả miền Nam đã cung cấp hạt giống cà tím.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ABA: abscisic acid
 APRT: adenine phosphoribosyl transferase
 CYP: cyclophilin
 dNTP: deoxynucleotide triphosphate
 E%: PCR efficiency

EF1: elongation factor 1-alpha
 ET: ethylene
 GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 HSD: honestly significant difference
 JA: jasmonic acid
 MeJA: methyl jasmonate
 MeSA: methyl salicylate
 RPOB: RNA polymerase beta subunit
 RT-qPCR: reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction
 RuBP: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase
 SA: salicylic acid

Bảng 9: Kết quả phân tích thống kê bằng phương pháp Student's t-test (two-tail, unpaired, equal variance) để so sánh các giá trị chu kỳ ngưỡng (C_t) trong phản ứng qPCR khảo sát biểu hiện của gene *SmAPRT* khi cây cà tím bị xử lý với MeSA

	Variable 1	Variable 2
Mean	22,080	22,477
Variance	0,321	0,098
Observations	3	3
Pooled Variance	0,210	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	-1,061	
P(T<=t) one-tail	0,174	
t Critical one-tail	2,132	
P(T<=t) two-tail	0,349	
t Critical two-tail	2,776	

TUA: alpha-tubulin

TUB: beta-tubulin

UBQ: ubiquitin

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả không có xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Khuất Lê Uyên Vy lên kế hoạch nghiên cứu, thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý dữ liệu và viết bản thảo. Bùi Thị Tường Vi thực hiện các thí nghiệm, thu thập và xử lý dữ liệu. Nguyễn Thị Hồng Thương định hướng và lên kế hoạch nghiên cứu, hướng dẫn nghiên cứu và góp ý bản thảo. Phạm Thị Ánh Hồng đồng hướng dẫn nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Franklin G, Sheeba C, Lakshmi Sita G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2004;40(2):188-91; Available from: <https://doi.org/10.1079/IVP2003491>.
- Magioli C, Mansur E. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta Botanica Brasílica*. 2005;19(1):139-48; Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000100013>.
- Barchi L, Pietrella M, Venturini L, Minio A, Toppino L, Acquadro A, et al. A chromosome-anchored eggplant genome sequence reveals key events in Solanaceae evolution. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-13; PMID: 31409808. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47985-w>.
- Chen L-m, Li X-w, He T-j, Li P-j, Liu Y, Zhou S-x. Comparative biochemical and transcriptome analyses in tomato and eggplant reveal their differential responses to *Tuta absoluta* infestation. *Genomics*. 2021;113(4):2108-21; PMID: 33964421. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.002>.
- Pang Y-Z, Wang Z-H, Guo S-S, Zhang S-S, Zheng L-W, Zhang J-Z. *Verticillium dahliae* reduces plant growth, constitutively induces antioxidant metabolism and gene expression in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2021;114:101641; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101641>.
- Miyatake K, Saito T, Negoro S, Yamaguchi H, Nunome T, Ohyama A. Detailed mapping of a resistance locus against *Fusarium* wilt in cultivated eggplant (*Solanum melongena*). *Theoretical and Applied Genetics*. 2016;129(2):357-67; PMID: 26582508. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2632-8>.
- Maffei ME, Arimura G-I, Mithöfer A. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Natural Product Reports*. 2012;29(11):1288-303; PMID: 22918379. Available from: <https://doi.org/10.1039/c2np20053h>.
- Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2012;28:489-521; PMID: 22559264. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>.
- Howe GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:41-66; PMID: 18031220. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2005;139(1):5-17; PMID: 16166256. Available from: <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>.
- Bézier A, Lambert B, Baillieux F. Cloning of a grapevine *Botrytis*-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related *hsr203J*. *Journal of Experimental Botany*. 2002;53(378):2279-80; PMID: 12379797. Available from: <https://doi.org/10.1093/jxb/erf101>.
- Burleigh SH. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Science*. 2001;160(5):899-904; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00460-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00460-X).
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal Biotechnology*. 1998;9(1):67-78; PMID: 9676236. Available from: <https://doi.org/10.1080/10495399809525893>.

14. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2000;46(1-2):69-81; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9).
15. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 1999;75(2-3):291-5; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00163-7).
16. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 2000;29(2):332-7; PMID: 10948434. Available from: <https://doi.org/10.2144/00292rv02>.
17. Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research*. 2002;12(2):292-7; PMID: 11827948. Available from: <https://doi.org/10.1101/gr.217802>.
18. Remans T, Keunen E, Bex GJ, Smeets K, Vangronsveld J, Cuypers A. Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell*. 2014;26(10):3829-37; PMID: 25361954. Available from: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130641>.
19. Chapman JR, Waldenström J. With reference to reference genes: a systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PloS one*. 2015;10(11):e0141853; PMID: 26555275. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141853>.
20. Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almagro HG. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(suppl-2):W163-W9; PMID: 18440976. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>.
21. Gantasala NP, Papolu PK, Thakur PK, Kamaraju D, Sreevathsa R, Rao U. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L.). *BMC Research Notes*. 2013;6(1):1-11; PMID: 23919495. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-312>.
22. Falara V, Alba JM, Kant MR, Schuurink RC, Pichersky E. Geranylinalool synthases in solanaceae and other angiosperms constitute an ancient branch of diterpene synthases involved in the synthesis of defensive compounds. *Plant Physiology*. 2014;166(1):428-41; PMID: 25052853. Available from: <https://doi.org/10.1104/pp.114.243246>.
23. Ament K, Van Schie CC, Bouwmeester HJ, Haring MA, Schuurink RC. Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta*. 2006;224(5):1197-208; PMID: 16786318. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0301-5>.
24. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015;3:9-16; PMID: 27077029. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>.
25. Töwe S, Kleinedam K, Schlöter M. Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;82(3):338-41; PMID: 20621132. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.005>.
26. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015;10(4):1261-4; PMID: 26622475. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712>.
27. Zhou X, Liu J, Zhuang Y. Selection of appropriate reference genes in eggplant for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. *Scientia Horticulturae*. 2014;176:200-7; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.010>.

Adenine phosphoribosyl transferase (*SmAPRT*) is an appropriate reference gene for quantitative gene expression analysis by RT-qPCR in different tissues as well as in the response to some specific stress conditions of eggplant (*Solanum melongena* L.)

Vy Le Uyen Khuat^{1,2}, Vi Thi Tuong Bui^{1,2}, Hong Thi Anh Pham^{1,2}, Thuong Thi Hong Nguyen^{1,2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City

²Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Thuong Thi Hong Nguyen, Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City

Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: nththuong@hcmus.edu.vn

History

- Received: 30-3-2022
- Accepted: 26-7-2022
- Published: 30-9-2022

DOI : 10.32508/stdjns.v6i3.1177



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Eggplant (*Solanum melongena* L.), an important vegetable crop because of its nutritional and medicinal values, is often attacked by insects and pathogens. Quantitative gene expression analysis by reverse transcription–quantitative PCR (RT–qPCR) is an effective and common approach to analyze the function of genes involving in the stress responses in eggplant. The RT–qPCR method always included the step of normalizing the expression data of the target gene to that of a stably expressed internal reference gene to ensure the accuracy of the quantitative results. This paper presented the evaluation of the transcriptional expression of adenine phosphoribosyl transferase (*SmAPRT*) gene in different tissues of *S. melongena* (young leaf, mature leaf, stem, root, flower, and fruit) under normal conditions. Besides, the expression of *SmAPRT* was also measured in leaf tissues of plants damaged by mechanical wounding, plants treated with stress signal molecules induced by methyl jasmonate (MeJA) or methyl salicylate (MeSA), and untreated control plants. PCR with a *SmAPRT*-specific primer pair (*SmAPRT*-qF as forward primer and *SmAPRT*-qR as reverse primer) amplified a 103-bp fragment from *S. melongena* with the efficiency of 92.7%. This value was within the recommended range (90–110%). The *Ct* values of qPCR reactions using cDNA template from the wounded plants or plants treated with MeJA or MeSA were not statistically significantly different from the *Ct* ones of the control plants. This *SmAPRT* gene was also stably expressed in all tested eggplant tissues. Therefore, *SmAPRT* would be used as a reference gene to normalize expression data of genes of interest in different tissues as well as in the response of *S. melongena* to the specific stress conditions as stated above.

Key words: reference gene, *Solanum melongena*, methyl jasmonate, methyl salicylate, RT-qPCR, adenine phosphoribosyl transferase

Cite this article : Khuat V L U, Bui V T T, Pham H T A, Nguyen T T H. *Adenine phosphoribosyl transferase (SmAPRT) is an appropriate reference gene for quantitative gene expression analysis by RT-qPCR in different tissues as well as in the response to some specific stress conditions of eggplant (Solanum melongena L.)*. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 2022, 6(3):2314-2326.