

景宁木兰热胁迫下实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

王倩颖^{1,2}, 常鹏杰¹, 申亚梅¹, 张超¹, 董彬¹, 时宝柱²

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 奈曼旗桥河国有母树林经营林场, 内蒙古 通辽 028300)

摘要: 高温对景宁木兰 *Magnolia sinostellata* 生长产生严重影响。通过筛选景宁木兰热胁迫下稳定表达的内参基因, 可以为景宁木兰在高温条件下基因表达研究提供准确数据, 达到对目的基因进行准确量化的目的。以热胁迫下景宁木兰1年生实生苗的根、茎、叶组织为材料, 从转录组数据库中选取13个管家基因 *ACTIN-7*(肌动蛋白基因-7), *CYP*(亲环蛋白基因), *EF-1 α* (延伸因子-1 α 蛋白基因), *GAPDH*(甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因), *GTB*(GTP结合蛋白基因), *NAC*(NAC域蛋白基因), *NADP*(异柠檬酸脱氢酶基因), *TEF*(翻译延伸因子基因), *UBC*(泛素化酶基因), *UBQ*(多聚泛素蛋白基因), α -*TUB*(α 微管蛋白基因), β -*TUB*(β 微管蛋白基因)和18S(18S核糖体RNA), 通过Primer 5.0进行引物设计, 琼脂糖电泳和溶解曲线分析验证引物特异性; 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术和geNorm, NormFinder和BestKeeper等3个内参分析软件研究候选内参基因在热胁迫下不同组织中的表达稳定性, 并通过*CSLD3*和*KOR*2个目的基因的表达分析验证其可靠性。13个内参基因的电泳结果均显示单一条带, 溶解曲线也均显示单一峰, 证明引物特异性良好; 13对引物的扩增效率均在100%左右; 内参软件综合分析得到, *UBC*, *EF-1 α* 和*ACTIN-7*是景宁木兰在热胁迫下较为稳定的内参基因, 以3个单独的内参基因以及内参组合(*EF-1 α* 和*ACTIN-7*)为参照对*CSLD3*和*KOR*的表达模式进行校准, 也显示了一致的表达水平。通过qRT-PCR技术和内参软件分析, *UBC*, *EF-1 α* 和*ACTIN-7*等3个内参基因在景宁木兰热胁迫下不同组织中稳定性较高, *CSLD3*和*KOR*等2个目的基因的表达也证实了其可靠性。因此, *UBC*, *EF-1 α* 和*ACTIN-7*可以作为景宁木兰热胁迫下稳定表达的内参基因。图4表3参34

关键词: 林木育种学; 景宁木兰; 内参基因; 热胁迫; 实时荧光定量

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)05-0935-08

Reference genes for quantitative PCR in *Magnolia sinostellata* with heat stress

WANG Qianying^{1,2}, CHANG Pengjie¹, SHEN Yamei¹, ZHANG Chao¹, DONG Bin¹, SHI Baozhu²

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Naiman Banner National Seed Production Stan Business Forest Farm, Tongliao 028300, Inner Mongolia, China)

Abstract: In field investigation high temperature was found to have a serious effect on growth of *Magnolia sinostellata*, an endemic endangered species in Zhejiang. To determine if screening stable reference genes of *M. sinostellata* with heat stress could provide accurate data for research in gene expression and achieve accurate quantification of target genes, roots, stems, and leaf tissues from annual seedlings of *M. sinostellata* with heat stress were taken as materials. Expression stability of 13 reference genes from transcriptome data, such as *ACTIN-7* (*ACTIN-7*), *CYP* (Cyclophilin), *EF-1 α* (Elongation factors-1 α), *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *GBP* (GTP binding protein), *NAC* (NAC domain protein), *NADP* (NADP-isocitrate dehydrogenase), *TEF* (Translation elongation factors), *UBC* (Ubiquitin-conjugating enzyme), *UBQ* (Polyubiquitin

收稿日期: 2018-09-20; 修回日期: 2018-10-23

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02056-12); 国家林业公益性行业科研专项(201504322)

作者简介: 王倩颖, 从事玉兰品种资源及种质创新研究。E-mail: 1463156503@qq.com。通信作者: 申亚梅, 副教授, 博士, 从事玉兰品种资源及种质创新研究。E-mail: yameishen@zafu.edu.cn

protein), α -*TUB* (Tubulin alpha), β -*TUB* (Tubulin beta), and 18S (18S ribosomal RNA) were detected and evaluated by quantitative reverse transcriptase (qRT)-polymerase chain reaction (PCR) along with geNorm, NormFinder, and BestKeeper. Also, two target genes, *CSLD3* and *KOR*, were analyzed to verify reliability of the screened reference genes. Specificity of the 13 pairs of primers was validated with agarose gel electrophoresis and a melting curve. Results showed that the 13 reference genes had a distinct PCR product in the electrophoresis figure, and the melting curve showed a single peak. Amplification efficiency of the 13 pairs of primers was about 100% with *UBC*, *EF-1 α* , and *ACTIN-7* being stable reference genes in different tissues of *M. sinostellata*. Additionally, the two target genes, *CSLD3* and *KOR*, showed consistent expression profiles when normalized by *UBC*, *EF-1 α* , and *ACTIN-7*, as well as the combination (*EF-1 α* and *ACTIN-7*). *UBC*, *EF-1 α* , and *ACTIN-7* were the best choices in different tissues of *M. sinostellata* with heat stress, and since expression analysis of the target genes, *CSLD3* and *KOR*, further confirmed reliability of these genes, *UBC*, *EF-1 α* , and *ACTIN-7* could serve as reference genes for expression among different tissues in *M. sinostellata* with heat stress. [Ch, 4 fig. 3 tab. 34 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Magnolia sinostellata*; reference genes; heat stress; qRT-PCR

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)是在普通 PCR 技术基础上发展起来的核酸定量技术, 具有灵敏度高、定量准确、特异性强、重复性好及高通量等优点, 已被广泛应用于基因表达分析的相关研究中^[1-2]。但在实验过程中, 目的基因的表达结果经常受 RNA 的提取质量、反转录合成效率等的影响, 使实验结果出现偏差^[3], 因此需要引入内参基因对基因表达结果进行校正和标准化以消除背景误差的影响^[4]。理想的内参基因是指在不同的组织, 不同时期, 不同环境条件下甚至是不同植物下皆可相对稳定表达的基因。它们是构成细胞的基本转录组成分, 参与维持细胞的基本功能, 且与要分析的目标基因具有相似的表达水平^[5]。但大量实验研究表明, 许多内参基因的转录水平会因为植物的发育阶段或实验条件的不同而出现差异, 这种差异会影响试验结果的准确性, 甚至得出错误的结论^[6-7]。因此, 在进行 qRT-PCR 试验前, 选择合适的内参基因变得尤为重要。景宁木兰 *Magnolia sinostellata* 是木兰科 Magnoliaceae 木兰属 *Magnolia* 新种, 落叶灌木, 先花后叶, 花色艳丽, 花瓣数量 9~18 瓣, 观赏价值极高, 分布于浙江南部地区海拔 1 000 m 以上的区域, 是浙江省特有种, 属于极度濒危物种^[8]。景宁木兰性喜温凉湿润、水分充足的环境, 但随着全球气候变暖, 城市热岛效应的加剧, 高温环境严重影响着植物的生长。目前对景宁木兰的研究集中在花色和花芽分化的转录组分析上^[9], 抗逆性研究鲜有报道。通常情况下, 采用遮阳等措施来降低高温对景宁木兰的伤害, 但植物自身的抗热胁迫的遗传特性才是起决定作用的因素。因此, 研究景宁木兰对高温胁迫的抗逆机制, 解析其响应高温的基因表达调控网络, 有针对性地发掘相关抗性基因, 对景宁木兰的保护、分子育种有积极的意义。目前, 尚未见到基于 qRT-PCR 技术筛选景宁木兰内参基因的相关报道。因此, 本研究以热胁迫下景宁木兰 1 年生实生苗的根、茎、叶组织为材料, 选取 13 个内参基因, 利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术和 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 等 3 个表达分析软件筛选热胁迫下表达稳定的内参基因, 以期对景宁木兰热胁迫下相关目的基因的表达提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

采用的植物材料为种植于浙江农林大学苗圃内景宁木兰 1 年生实生苗。选取长势一致, 无病虫害的植株 16 盆, 分别置于 2 个人工气候箱内(POX-1000A-12H), 气候箱光合光子照度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 湿度控制在 75%~80%, 温度分别为 25 $^{\circ}\text{C}$ (对照) 和 40 $^{\circ}\text{C}$ (高温处理), 光周期为 12 h/12 h。分别在处理 24 和 48 h 时采取根、叶片和茎段, 在液氮中速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 中保存, 用于 RNA 的提取。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和反转录 cDNA 的合成 将冻存的样品在液氮中研磨成粉后, 用 RNAperp Pure Plant Kit(天根, 北京)试剂提取材料的总 RNA, 通过质量浓度为 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整

性，紫外分光光度计来检测 RNA 的纯度 $[D(260)/D(280)=1.8\sim 2.1, D(260)/D(230)>1.8]$ 及质量浓度[终质量浓度 $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})=D(260)\times n\times 40$ 。其中， $D(\lambda)$ 为波长 λ 处的吸光度， n 为稀释倍数]。全长 cDNA 第 1 条链的合成按照 PrimeScriptTM RT Master Mix(Takara, 大连)试剂说明书操作，将得到的 cDNA 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 候选内参基因及定量引物设计 从前期构建的景宁木兰转录组数据库中，选取 13 个功能基因作为候选内参基因的荧光定量 PCR 引物。引物信息见表 1。

表 1 13 个候选内参基因和目的基因的引物序列
Table 1 Primer sequences of the 13 candidate reference genes and target genes

基因	基因描述	正向引物	反向引物
<i>ACTIN-7</i>	肌动蛋白基因	ACGAATCCGGTCCATCCATT	CCGTTCCACCAGGCAATATG
<i>CYP</i>	亲环蛋白基因	ATCTTTAAGTGTGGCCCGCC	CAACCGACCCAGATCACTGC
<i>EF-1α</i>	延伸因子 1 α 蛋白基因	GATGATTCCAACCAAGCCCA	CACCCACTGCAACAGTCTGG
<i>GADPH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因	TTGAAGACGCCGATCTGGAC	CAGCAACGGATTCCATCACC
<i>GTB</i>	GTP 结合蛋白	TTCTGCCTAGCTTCGTCGGA	GCGAGAACGCCATAGATCCA
<i>NAC</i>	NAC 域蛋白基因	TTCCATCCAACCGACGAAGA	CGGATTTGTACGCATCGAGC
<i>NADP</i>	异柠檬酸脱氢酶基因	GAGATGAAATGACCCGCGTT	ATCACGATGAGGAAGGCCAA
<i>TEF</i>	翻译延伸因子	TCTGAGGTCACAGCCGCTCT	GGCCTGATCCTTTCTCCCAG
<i>UBC</i>	泛素化酶基因	CGAACTCCCCTGCGAATTCT	TCAGTCTGCCGTCCAGCTCT
<i>UBQ</i>	多聚泛素酶基因	TCCATGCCCTTAAGCCAAAA	AATGACAGAGCGGTCTGTCT
α - <i>TUB</i>	α 微管蛋白基因	TGCCCCGGTTATATCTGCTG	TGTACTTCCCATGCCTCGGA
β - <i>TUB</i>	β 微管蛋白基因	AGCAGTTCACCGCCATGTTT	GTCTGCCGTTGCATCCTGAT
18S	18S 核糖体 RNA	AGCCTGAGAAACGGCTACCAC	ATACGCTATTGGAGCTGGAA
<i>CSLD3</i>	纤维素合成酶类似蛋白 D-3 基因	GGACGGCCACTTCCATTACC	GTCTGGCTCCGCATCAACAC
<i>KOR</i>	1,4- β -d-葡萄糖酶基因	CCGGACTTACCAGCTTCAA	GAAGCAAGGAAAGCCGCATT

1.2.3 内参基因荧光定量PCR 扩增程序 将反转录产物 cDNA 稀释 10 倍，使用 SYRB Premix Ex Tap II (Takara, 大连)实时定量 PCR 试剂盒，在 Light Cycler 480 II (Roche)实时定量 PCR 仪进行定量分析。反应体系为 SYRB Premix Ex Tap II 10.0 μL ，cDNA 模板 2.0 μL ，上下游引物各 0.8 μL (10 $\mu\text{m}\cdot\text{L}^{-1}$)，双蒸水(ddH₂O) 6.4 μL ，共 20.0 μL 体系。每个样品 3 次重复，扩增反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s，共 40 个循环，然后 60~95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 15 s 作为溶解曲线分析程序。

1.2.4 引物扩增效率的计算 将 12 个样品的 cDNA 等量混合作为模板，按照 5 倍梯度稀释产物，共 5 个梯度进行荧光定量 PCR，制作标准曲线。利用公式 $E=(10^{-1/K}-1)\times 100\%$ 计算得出内参引物的扩增效率。其中 E 为扩增效率， K 为标准曲线斜率。 $R^2=(\text{总平方和}-\text{残差平方和})/\text{总平方和}$ ，总平方和为标准曲线中响应浓度 C_i 的实际值与平方值的平方差之和，残差平方和为相应浓度下 C_i 的估计值与实际值的平方差之和^[10]。

1.2.5 数据分析和处理 利用 geNorm，NormFinder 和 BestKeeper 3 个软件分析 13 个候选内参基因在不同处理下不同组织中的表达稳定性进行分析，从而得到热胁迫下景宁木兰表达相对稳定的内参基因。其中，BestKeeper 软件直接通过计算 C_i 对每个候选内参基因进行分析；geNorm 和 NormFinder 将 C_i 根据公式 $Q=E^{C_{i\min}-C_{i\text{sample}}}$ 进行转化，式中 E 为扩增效率，当其接近 100%时，默认为 2 进行计算^[11]； $C_{i\min}$ 为该基因在所有组织中的最小 C_i ； $C_{i\text{sample}}$ 为该基因在各个组织中的 C_i 。

2 结果与分析

2.1 景宁木兰 RNA 的质量检测

提取的 RNA 条带清晰，没有弥散片状或条带消失的现象，说明 RNA 完整性良好，且没有降解。景宁木兰 RNA 样品的 $D(260)/D(230)$ 皆约 2.0， >1.8 ，说明 RNA 纯度较高，符合后续实验的要求。

2.2 景宁木兰候选内参基因引物特异性及扩增效率检测

将 12 个样品的 cDNA 等量混合，按照 10 倍梯度稀释产物作为模板，进行普通 PCR 和定量 PCR 扩

增。琼脂糖凝胶电泳结果显示：13 个引物的产物只有单一条带，无可见引物二聚体，且 13 个引物的溶解曲线都只有明显的单一峰，说明引物的特异性良好。计算扩增效率结果显示：扩增效率为 97.36%~110.91%，*UBC* 最高，*GADPH* 最低，相关系数 R^2 为 0.990~0.999(表 2)。符合 qRT-PCR 试验的要求。

表 2 候选内参基因扩增特性

Table 2 Candidate reference genes amplification specificity

基因	扩增效率/%	线性相关系数 R^2	曲线斜率
<i>ACTIN-7</i>	110.07	0.994	-3.102
<i>CYP</i>	103.23	0.990	-3.247
<i>EF-1α</i>	106.98	0.998	-3.165
<i>GADPH</i>	97.36	0.994	-3.387
<i>GTB</i>	109.43	0.998	-3.115
<i>NAC</i>	99.27	0.999	-3.340
<i>NADP</i>	100.42	0.998	-3.312
<i>TEF</i>	105.84	0.996	-3.190
<i>UBC</i>	110.91	0.996	-3.086
<i>UBQ</i>	109.28	0.997	-3.118
α - <i>TUB</i>	105.02	0.996	-3.207
β - <i>TUB</i>	110.22	0.999	-3.099
18S	104.54	0.996	-3.218

2.3 景宁木兰候选内参基因表达水平分析

利用比较 C_t 的方法评估 13 个候选内参基因在不同处理下平均表达水平(图 1)。18S 的 C_t 最小，为 4.601，平均表达水平最高；余下 12 个候选内参基因的 C_t 为 15.869~23.072，表达水平相差不大。

2.4 景宁木兰候选内参基因表达稳定性分析

geNorm 软件根据计算得到的平均表达稳定指数 M 来进行稳定性排序， M 越大表明基因越不稳定，以 $M=1.5$ 为标准， $M<1.5$ 认为是理想内参基因的稳表达标准。同时，该软件还通过内参基因标准化的配对差异分析(V_n/V_{n+1})来得到内参基因的合适数量，软件默认以 $V_n/V_{n+1}=0.15$ 为标准，当 $V_n/V_{n+1}<0.15$ 时，表明 n 个内参基因已经可以稳定作为内参基因，没必要引入第 $n+1$ 个基因^[12]。通过图 2 可知：13 个基因的 M 为 0.050 0~0.200 0， <1.5 ，说明 13 个候选内参基因都达到了作为内参基因的标准，其中 *ACTIN-7* 和 *EF-1 α* 最为稳定， $M=0.334$ 49。*GADPH* 的 M 最大，为 1.141 66，是所有候选内参基因中表达最不稳定的。图 3 表明： V_2/V_3 为 $0.021<0.15$ ，说明 2 个基因可稳定作为内参基因，结果可靠，无需引入第 3 个基因。进一步分析表明：*ACTIN-7* 和 *EF-1 α* 为最佳内参组合。

BestKeeper 软件通过计算内参基因 C_t 的标准偏差(SD)对内参基因的稳定性进行排序，标准偏差越小表明内参基因的稳定性越好，如果标准偏差 >1 ，则认为该基因不稳定^[8]。表 3 显示：在不同组织中，*NADP* 和 *GADPH* 的标准偏差大于 1，说明这 2 个基因表达不稳定。余下的 11 个内参基因的标准偏差皆小于 1，其中 *UBC*，*EF-1 α* ，*ACTIN-7* 和 *GTB* 稳定性最好，排名最高。

NormFinder 软件通过计算组内和组间的方差得到表达稳定值，并对候选内参基因进行排序，稳定值越小，表明内参基因越稳定。表 3 显示：*UBQ*，*EF-1 α* 和 *TEF* 分别排在前 3 位，表达稳定值较为接近，表达最为稳定；*CYP* 的稳定值最大，为 0.237，表达稳定性最差。

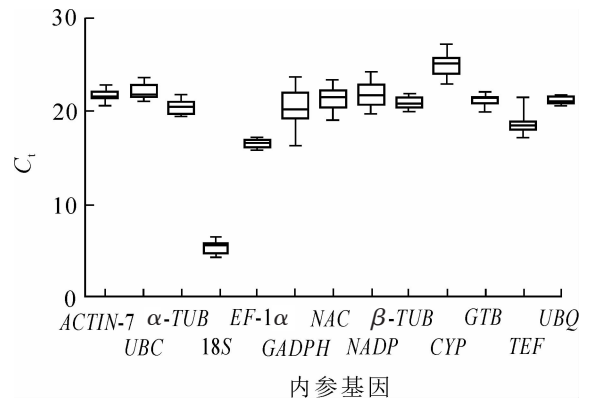


图 1 候选内参基因不同组织中的 C_t

Figure 1 Candidate reference genes C_t values in different tissues

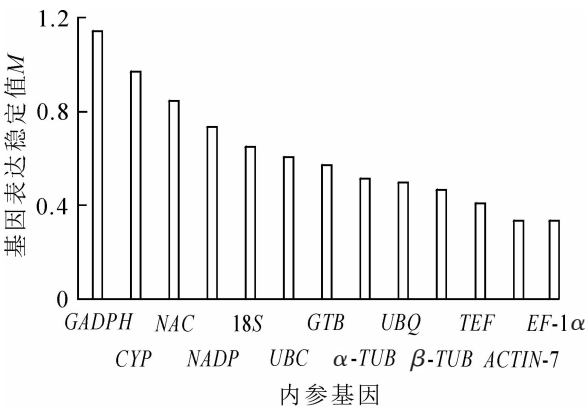


图 2 geNorm 软件分析内参基因表达稳定值
Figure 2 Reference genes expression stability by geNorm

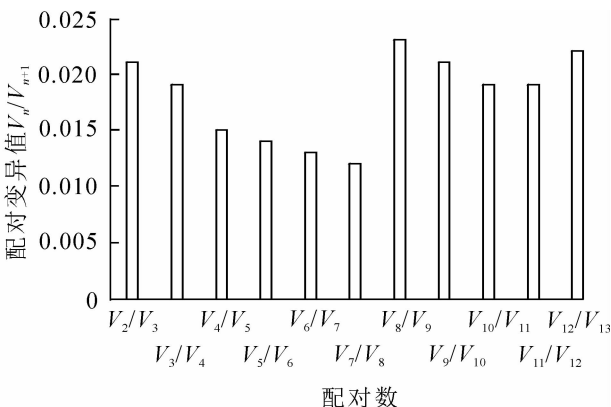


图 3 geNorm 软件分析内参基因配对变异值
Figure 3 Reference genes pairwise variation value by geNorm

表 3 BestKeeper 和 NormFinder 软件分析内参基因表达稳定性及排名

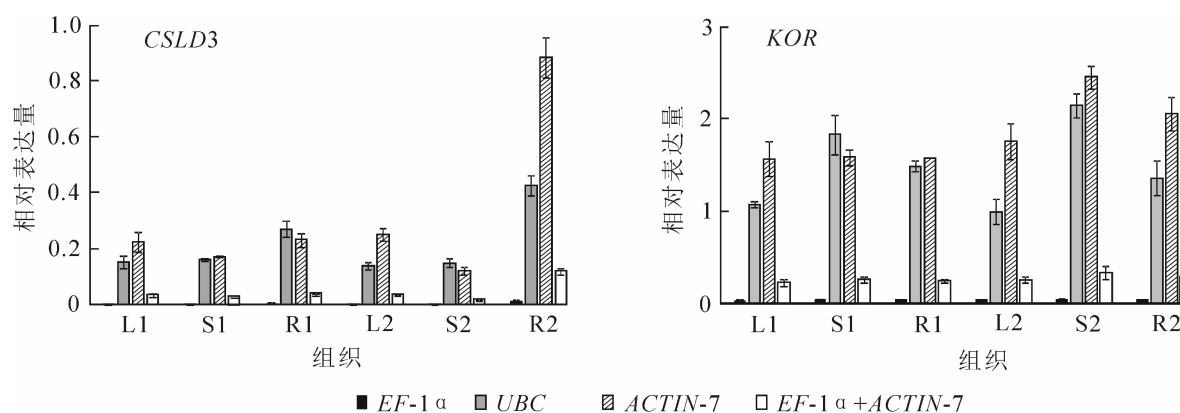
Table 3 Reference genes expression stability and ranking by BestKeeper and NormFinder									
基因名	NormFinder		BestKeeper		基因名	NormFinder		BestKeeper	
	稳定值	排名	标准偏差	排名		稳定值	排名	标准偏差	排名
UBQ	0.107	1	0.643	11	ACTIN-7	0.147	8	0.418	78
EF-1α	0.112	2	0.407	26	NAC	0.149	9	0.964	34
TEF	0.127	3	0.508	73	β-TUB	0.159	10	0.518	46
GTB	0.134	4	0.488	21	GADPH	0.161	11	1.629	78
UBC	0.134	5	0.338	45	α-TUB	0.107	12	0.739	43
18S	0.142	6	0.576	29	CYP	0.112	13	0.959	90
NADP	0.146	7	1.082	30					

2.5 景宁木兰候选内参基因表达稳定性验证

综合以上 3 个软件分析的结果，本研究选择了稳定性较好的 3 个基因(*UBC*，*EF-1α* 和 *ACTIN-7*)和 1 个基因组合(*EF-1α* 和 *ACTIN-7*)。通过分析 *CSLD3* 和 *KOR* 基因在景宁木兰不同组织的表达模式来进一步验证筛选的候选内参基因的稳定性。*CSLD3* 是植物合成根毛细胞壁的重要纤维素合成酶基因，可以引起细胞壁形成的缺陷^[13]。研究表明此基因在根部中表达最高^[14]。*KOR* 基因是植物合成细胞壁中发挥重要作用的纤维素合成酶基因，在茎中和木质部中表达量最高^[6,15]。对 3 个内参基因进行相对表达量量化(图 4)，*CSLD3* 在根中表达最高，*KOR* 在茎中表达最高。以 *EF-1α* 和 *ACTIN-7* 内参基因组合标准化，目的基因也显示出一致的表达水平，进一步表明了这 3 个内参基因的可靠性。

3 讨论

SPIEGELAERE 等^[16]研究认为软件间的算法和判断标准不同导致结果的差异，因此在评估内参基因时应先综合分析各软件的结果，再进行比较排序，最终筛选出最适宜的内参基因。理想的内参基因应在各种类型的组织、细胞和各种实验因素条件下均恒定表达^[17-18]。但大量实验表明：内参基因只是在一定的范围内可以稳定表达，在特定的实验条件下，应该筛选特定的内参基因来进行实验^[19]。因此，本研究选择了景宁木兰在热胁迫下的根、茎、叶组织进行内参基因的筛选研究。得到 *UBC*，*EF-1α* 和 *ACTIN-7* 为热胁迫下不同组织的最佳内参基因，这 3 个内参基因均是传统内参基因，其中 *UBC* 基因是泛素蛋白翻译后修饰的基因，参与细胞多种调控过程，如细胞周期，细胞的增值与分化，信号转导等^[20]，在桂花 *Osmanthus fragrans* 花芽的不同发展阶段^[21]、桉树 *Eucalyptus robusta* 不同组织^[22]中均表达稳定；*ACTIN* 是细胞的骨架成分，几乎在所有的真核细胞中均有表达^[23]，在杨树 *Populus tomentosa* 不同光周期和低温条件下的茎尖、幼叶、成熟叶和树皮组织中、油菜 *Brassica campestris* 的营养组织中以及番茄 *Lycopersicon esculentum* 的叶子和根组织中也表现出最佳的稳定性^[24-26]。*EF-1α* 是一种重要的多功能蛋白，参与细胞转导、翻译控制、骨架组成等多种重要的细胞学过程^[27]。*ACTIN* 和 *EF-1α* 在毛果杨 *Populus trichocarpa* 不同组织为材料^[11]和梧桐 *Firmiana platanifolia* 种子的不同发育阶段^[28]中均表现出较高的稳定



L1和L2分别指24和48 h的叶片；S1和S2分别指24和48 h的茎；R1和R2分别指24和48 h的根

图4 *CSLD3* 和 *KOR* 在景宁木兰不同组织中的表达分析

Figure 4 Expression of *CSLD3* and *KOR* in different tissues of *Magnolia sinostellata*

性。SILVEIRA 等^[29]在一种重要牧草珊瑚状臂形草 *Brachiaria brizantha* 的内参基因筛选中同样得到 *EF-1α* 稳定性最佳的结果。

理想的内参基因的表达水平应是适中的，不宜过高，也不宜过低， C_t 应为 15~30^[30]。本研究中 18S rRNA 基因的 C_t 远低于 15，表达丰度过高，影响其稳定性，不适宜作为内参基因。在光皮桦 *Betula luminifera* 的根、茎、叶和种子等不同组织中也出现了 18S 的 C_t 过低的情况^[10]。在牡丹 *Paeonia suffruticosa* 不同组织不同花期^[31]以及水稻 *Oryza sativa* 受到稻纵卷叶螟 *Chaphalocrocis medinalis* 虫害诱导后内参基因研究^[32]中也得到了相同结果。而周良云等^[33]对黄花嵩 *Artemisia annua* 进行不同浓度的镉处理，最终选取了 *ACTIN-7*，18S 和 *PAL* 为内参基因来校正目的基因的表达量；苏晓娟等^[11]也发现毛果杨在锌胁迫下 18S rRNA 稳定性较好，可用作内参基因。进一步表明了不同植物在不同条件下，内参基因稳定性差异较大。

研究中选择 2 个或 2 个以上的基因可以有效增加结果的可靠度及精确度，以此来减弱单一内参基因可能造成的结果偏差^[17]。刘文哲等^[10]在光皮桦中通过目的基因的表达分析验证内参基因的可靠性，结果显示了 3 个内参基因及其组合对目的基因定量标准化差异较小。PARK 等^[34]在不同品种甘薯 *Dioscorea esculenta* 的非生物胁迫条件下，使用单个稳定的内参基因 *ARF* 和最佳内参基因组合 (*ARF/COX*) 对 2 个目的基因 *IbLEA14* 和 *swpa2* 进行表达验证，结果也显示了单个内参基因和组合验证对目的基因表达水平的校准结果基本一致。本研究以 *EF-1α* 和 *ACTIN-7* 为组合内参基因进行表达验证，发现单个内参 *EF-1α* 与其有微小差异，2 个基因组合可使基因定量结果更加准确。但是与单个基因做内参相比，2 个或 2 个以上的基因做内参需要增加更多的样本量和耗费大量成本，且实验结果并无明显差异。因此，在实验过程中可综合考虑后再进行选择。

4 参考文献

- [1] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective [J]. *J Mol Endocrinol*, 2005, 34(3): 597 – 601.
- [2] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986 – 994.
- [3] VANGUILDER H D, VRANA K E, FREEMAN W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 619 – 626.
- [4] 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 Biol*, 2002, 3(7). doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [5] de MACEDO LEMOS E G, ABDELNOOR R V, BENEVENTI M A, et al. Identificação de genes de referência para análise de expressão por PCR quantitativo em tempo real, em soja submetida à seca [J]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2011, 46(1): 58 – 65.
- [6] LIU Jing, WANG Qun, SUN Minying, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization

- in *Panax ginseng* at different stages of growth and in different organs [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e112177. doi: 10.1371/journal.pone.0112177.
- [7] FENG Hao, HUANG Xueling, ZHANG Qiong, *et al.* Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **51**: 116 – 122.
- [8] ZHANG S Z. *Magnolia sinostellata* and relatives (Magnoliaceae) [J]. *Phytotaxa*, 2013, **154**: 47 – 58.
- [9] FAN Lijie, CHEN Mengqian, DONG Bin, *et al.* Transcriptomic analysis of flower bud differentiation in *Magnolia sinostellata* [J]. *Genes*, 2018, **9**(4): 212.
- [10] 刘文哲, 牛明月, 李秀云, 等. 光皮桦实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 林业科学, 2016, **52**(8): 29 – 37.
- LIU Wenzhe, NIU Mingyue, LI Xiuyun, *et al.* The selection of reference genes for quantitative PCR in *Betula luminifera* [J]. *Sci Silv Sin*, 2016, **52**(8): 29 – 37.
- [11] 苏晓娟, 樊保国, 袁丽钊, 等. 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证[J]. 植物学报, 2013, **48**(05): 507 – 518.
- SU Xiaojuan, FAN Baoguo, YUAN Licha, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa* [J]. *Chin Bull Bot*, 2013, **48**(5): 507 – 518.
- [12] 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, **48**(5): 278 – 281.
- WU Jianyang, HE Bing, DU Yujie, *et al.* Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2017, **48**(5): 278 – 281.
- [13] FAVERY B, RYAN E, FOREMAN J, *et al.* KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Gen Dev*, 2001, **15**(1): 79 – 89.
- [14] HAMANN T, OSBORNE E, YOUNGS H L, *et al.* Global expression analysis of CESA and CSL genes in *Arabidopsis* [J]. *Cellulose*, 2004, **11**(3/4): 279 – 286.
- [15] MALONEY V J, SAMUELS A L, MANSFIELD S D. The endo-1,4- β -glucanase Korrigan exhibits functional conservation between gymnosperms and angiosperms and is required for proper cell wall formation in gymnosperms [J]. *New Phytol*, 2012, **193**(4): 1076 – 1087.
- [16] SPIEGELAERE W, DERN-WIELOCH J, WEIGEL R, *et al.* Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(3): e0122515.
- [17] MA Shuhua, NIU Hongwei, LIU Chunji, *et al.* Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different stress conditions in soybean [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e75271. doi: 10.1371/journal.pone.0075271.
- [18] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 植物学报, 2010, **45**(5): 579 – 587.
- SUN Meilian, WANG Yunsheng, YANG Dongqing, *et al.* Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2010, **45**(5): 579 – 587.
- [19] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT 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 Res*, 2004, **64**(15): 5245 – 5250.
- [20] 蓝兴国, 李晓屿, 杨佳, 等. 羽衣甘蓝泛素结合酶 *ubc7* 基因分离, 原核表达及纯化[J]. 中国农学通报, 2013, **29**(34): 76 – 80.
- LAN Xingguo, LI Xiaoyu, YANG Jia, *et al.* Isolation, prokaryotic expression and purification of *ubc7* from stigma of Ornamental Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2013, **29**(34): 76 – 80.
- [21] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression malization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0136355. doi: 10.1371/journal.pone.0136355.
- [22] de OLIVEIRA L A, BRETON M C, BASTOLLA F M, *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in *Eucalyptus* species [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, **53**(2): 405 – 422.
- [23] SANTELLA L, CHUN J T. Actin, more than just a housekeeping protein at the scene of fertilization [J]. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(8): 733 – 743.

- [24] PETTENGILL E A, PARMENTIER-LINE C, COLEMAN G D. Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populus* for use in photoperiod and low-temperature studies [J]. *BMC Res Notes*, 2012, **5**(1): 366.
- [25] CHEN Xue, TRUKSA M, SHAH S, *et al.* A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus* [J]. *Anal Biochem*, 2010, **405**(1): 138 – 140.
- [26] LØVDAL T, LILLO C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress [J]. *Anal Biochem*, 2009, **387**(2): 238 – 242.
- [27] 周冰, 曹诚, 刘传喧. 翻译延伸因子 1A 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, **18**(2): 281 – 284.
ZHOU Bing, CAO Cheng, LIU Chuanxuan. Advance in research on translation elongation factor 1 Aipha [J]. *Lett Biotechnol*, 2007, **18**(2): 281 – 284.
- [28] HAN Xiaojiao, LU Mengzhu, CHEN Yicun, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e43084. doi: 10.1371/journal.pone.0043084.
- [29] SILVEIRA É D, ALVES-FERREIRA M, GUIMARÃES L A, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha* [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, **9**(1): 84.
- [30] WAN Hongjian, ZHAO Zhenguo, QIAN Chuntao, *et al.* Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. *Anal Biochem*, 2010, **399**(2): 257 – 261.
- [31] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 2012, **20**(5): 521 – 528.
WANG Yanjie, DONG Li, ZHANG Chao, *et al.* Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Agric Biotechnol*, 2012, **20**(5): 521 – 528.
- [32] 李冉, 李建彩, 周国鑫, 等. 水稻虫害诱导相关基因实时定量 PCR 中内参基因的选择[J]. 植物学报, 2013, **48**(2): 184 – 191.
LI Ran, LI Jiancai, ZHOU Guoxin, *et al.* Validation of rice candidate reference genes for herbivore-induced quantitative real-time PCR analysis [J]. *Chin Bull Bot*, 2013, **48**(2): 184 – 191.
- [33] 周良云, 莫歌, 王升, 等. 基于实时荧光定量 PCR 对镉处理下黄花蒿内参基因稳定性的分析[J]. 中国中药杂志, 2014, **39**(5): 777 – 784.
ZHOU Liangyun, MO Ge, WANG Sheng, *et al.* Stability analysis of reference gene based on real-time PCR in *Artemisia annua* under cadmium treatment [J]. *China J Chin Meteria Medica*, 2014, **39**(5): 777 – 784.
- [34] PARK S C, KIM Y H, JI C Y, *et al.* Stable internal reference genes for the normalization of real-time PCR in different sweetpotato cultivars subjected to abiotic stress conditions [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e51502. doi: 10.1371/journal.pone.0051502.