

灰毡毛忍冬内参基因筛选和 Mads-box 家族基因 AGL15 的时空表达分析

蔡嘉洛¹, 朱贻霖², 谢舒平⁴, 陈 林², 欧阳琳¹, 刘 峰³, 张亚丽², 刘湘丹², 童巧珍², 易刚强^{2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410000

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410000

4. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210000

摘要: 目的 筛选灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* 基因表达分析的内参基因, 研究其 Mads-box 基因家族 AGL15 基因 (LmAGL15) 的时空表达特性。方法 克隆灰毡毛忍冬内参基因 18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl- β 的基因片段, 评价了 4 个基因在不同部位叶、茎和花蕾, 以及 4 个基因在灰毡毛忍冬生长不同时期的稳定性, 筛选内参基因, 分析 LmAGL15 基因的时空表达特性。结果 18 S rRNA 表达最稳定, 适宜作为内参基因, 叶片、茎的 LmAGL15 基因相对表达量较低, 花蕾相对表达量较高。花蕾不同发育时期, LmAGL15 的相对表达量呈现逐渐降低的变化, 20 d 后 LmAGL15 的相对表达量最低, 然后依次是花蕾初期 (15 d)、青绿色花蕾期 (10 d)、绿白色花蕾期 (5 d)。结论 18 S rRNA 是适宜的内参基因。叶片、茎和花蕾中, LmAGL15 的相对表达量差异明显。花蕾发育不同时期, LmAGL15 的相对表达量呈逐渐降低的变化, 与花蕾开放变化规律相似。

关键词: 灰毡毛忍冬; 内参基因; 蕾期延长; 时空表达特性; 18 S rRNA; Ubiquilin; Actin; Efl- β ; AGL15

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2727-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.022

Screening of reference genes in *Lonicera macranthoides* and spatio-temporal expression analysis of LmAGL15 in Mads-box family

CAI Jia-luo¹, ZHU Yi-lin², XIE Shu-ping⁴, CHEN Lin², OUYANG Lin¹, LIU Feng³, ZHANG Ya-li², LIU Xiang-dan², TONG Qiao-zhen², YI Gang-qiang²

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410000, China

4. College of pharmacy Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

Abstract: Objective To screen the reference genes of *Lonicera macranthoides* for gene expression analysis and to study the spatio-temporal expression characteristics of LmAGL15 which was a member of Mads-Box family. **Methods** In this study, 18 S rRNA, Ubiquilin, Actin and Efl- β of *L. macranthoides* were cloned and the stabilities of the four housekeeping genes were evaluated in different positions (leaves, stems, and buds) and different periods of bud development. In addition, the spatio-temporal expression of LmAGL15 gene was analyzed. **Results** 18 S rRNA was the most suitable reference gene for spatio-temporal expression analysis in *L. macranthoides*; The relative expression of LmAGL15 was low in leaves and stems, and that in buds was higher. **Conclusion** 18 S rRNA is the most suitable reference gene in *L. macranthoides*. The relative expression of LmAGL15 changes significantly in leaves, stems, and buds.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz; reference gene; bud period extended; spatio-temporal expression characteristics; 18 S rRNA; Ubiquilin; Actin; Efl- β ; AGL15

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. 具有清热解毒、凉散风热的功效, 临床上广泛用于
-Mazz. 来源于忍冬科, 为中药材山银花来源之一, 治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81203007); 湖南省自然科学基金资助项目 (13JJ9010); 湖南省教育厅科技创新平台 (14K071); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2014B368); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2014B368); 湖南省“中药学”重点学科建设项目资助 (湘教通[2011]76 号); 国家中医药管理局“药用植物学”重点学科资助 (国中医药发[2009]30 号)

作者简介: 蔡嘉洛 (1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药资源及中药新药研究。E-mail: 38692153@qq.com

***通信作者:** 易刚强 (1965—), 男, 副教授, 主要从事中药资源及中药新药研究。E-mail: 1220224712@qq.com

温热发病,也可作为提取绿原酸或挥发油的原料,广泛用于制药、香料、化妆品、保健食品、保健饮料等领域,具有较高的经济价值^[1]。2009 年甲型 H1N1 流感疫情发生后,金银花成了市场上的热销品种,价格不断上升,灰毡毛忍冬作为商品“金银花”的主流品种之一,已广泛应用于中药制剂中,值得进一步开发。

从 1999 年开始以灰毡毛忍冬的自然变异株为接穗,通过多年嫁接筛选试验,初步培育出了花蕾期长,花冠不展开的无性系“湘蕾金银花”品种。该品种具有根系发达,对环境适应性强,花蕾簇生,花蕾期长,花冠不展开,花蕾颜色均一,气味芬香,产量高,抗病虫害能力强等优良的农艺学性状和特点,且性状稳定。其 4 年生苗每株年产干花 2~3 kg,每公顷年产干花 13~20 kg,是灰毡毛忍冬常规品种的 2 倍,为山东省和河南省金银花产量的 3~4 倍。

中药材的适宜采收直接影响着中药材的产量和质量,是中药材生产中的关键技术之一。花类药材一般在花蕾膨大即将开放期或花初开期采收,这时花中水分少、香气足,加工出来的药材外观质量佳,有效成分高。通过实地调查研究发现,灰毡毛忍冬的自然变异株——“湘蕾金银花”品种具有花蕾期长,花冠不展开,花蕾簇生、整齐、颜色均一的特点,可一次性采摘。该特性为药材的采收提供了充裕的时间,既确保了药材的颜色和质量,也减少了采收的人力、物力,大大降低了劳动成本,节约了资金。因此,对湘蕾灰毡毛忍冬蕾期延长机制的研究意义重大。本课题组利用分子生物学技术分析常规型灰毡毛忍冬植株与“湘蕾金银花”MADS-box 基因的差异,发现 4 条存在明显差异并属于 MADS-box 基因家族,现成功从灰毡毛忍冬总 RNA 中克隆得到可能参与控制蕾期延长的基因(LmAGL15)。运用生物信息学的方法对该序列进行同源性分析、理化性质分析,预测 LmAGL15 编码蛋白。通过功能分析确定该基因功能。LmAGL15 活性在一定程度上影响灰毡毛忍冬的蕾期长短^[2-3]。

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术具有高灵敏、高保真、高特异、高重现和高通量等特点,被广泛应用于基因表达的分析。但在数据处理过程中,结果往往会受到不同变量的影响,与目标基因特异性表达的真实值存在一定的差异,因此,选用稳定

表达的基因作为内参基因进行校正和标准化对准确分析实验结果非常关键。本研究克隆了灰毡毛忍冬 18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl- β 基因的片段,同时通过分析灰毡毛忍冬不同部位(叶、茎和花蕾)及花蕾发育不同时期基因表达稳定性分析,筛选出最佳内参基因,为灰毡毛忍冬的基因表达研究奠定方法学基础。利用所选内参基因,通过转基因技术将这些功能基因转入其他品种的灰毡毛忍冬、金银花或其他药用、食用、切花、香精香料原料等植株中,培育出花蕾期长或花冠不展开的新优良品种打下前期基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自湖南中医药大学药用植物园,经湖南中医药大学药用植物教研室主任周日宝教授鉴定为湘蕾型和常规型灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz, 各植株均保存茎、叶、花蕾各部位, -80 °C 保存备用。

1.2 试剂及仪器

Rever Tra Ace[®] qPCR RT Kit, 批号 FSQ-101, TOYOBO; SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time), 批号 DRR041A, TaKaRa; DNA Marker DL2000 购自全式金公司;其余未注明出处的药品、试剂均为国外或国内生产的分析纯级产品。

电泳仪,北京君意东方电泳设备公司; GeneQuant 核酸定量仪(Pharmacia Biotech 公司, 英国); Real-time PCR 扩增仪(Stepone Thermal Cycler), Applied Biosystem; 微量移液器,德国 Eppendorf 公司; Tanon 凝胶成像分析系统,上海天能公司; 恒温水浴锅,上海跃进实验仪器有限公司; 微波炉, LG; Aquapro 超级纯水仪,艾科浦公司; 制冰机 FM130, GRANT; 北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 内参基因的选择及特异性引物设计、检测

选择 4 个常用内参基因 18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl- β , 其中 Ubiquilin、Actin 和 Efl- β 3 个基因采用 CodeHop 方法设计简并引物(表 1), 18 S rRNA 则根据 GenBank 已登录的相关序列,用 Primer 4.0 软件设计引物。得到 18 S rRNA 引物序列,正向引物 5'-AGGCGCGCAAATTACCCAATCC-3', 反向引物 5'-GCCCTCCAATTGTTCTCTCGTTAAG-3', 引物长度 118 bp。以灰毡毛忍冬花蕾组织反转录得到的 cDNA 为模板克隆基因,然后再根据测序结果

设计引物。使用 Taq DNA 聚合酶 (TIANGEN ET108-02) 扩增 18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl-β 的基因片段, 纯化回收后连入克隆用细菌, 进行测

序检测, 通过 NCBI Blast 比对确认序列的正确性。利用正确的内参基因片段设计定量 PCR 引物 (表 2), 进行定量 PCR 反应^[2-3]。

表 1 灰毡毛忍冬候选内参基因的简并引物序列

Table 1 Degenerate primer sequence of candidate reference genes of *L. macranthoids*

基因	引物序列 (5'-3')	扩增长度/bp
Ubiquilin	F: GGAGGTGGAGTCYTCCGAYACNATHGA	234
	R: TGGYACACGTAGGYCAGGCCRCAYTTNCC	
Efl-β	F: CGYGTGATCGAGCGGTTYGARAARGA	134
	R: CCACGGCYACGGTCTGNCKCATRTC	
Actin	F: GGYGAAGARGACCCAGATYATGTTYGARACNTT	236
	R: CCTYGGNGNTCCAYATCTGNTGRAANGT	

表 2 内参基因定量 PCR 引物序列

Table 2 Primer sequence of quantitative PCR

基因	引物序列 (5'-3')	扩增长度/bp
Actin	正向: AGGAACCAACCGATCCAGACA	236
	反向: GGTGCCCTGAGGTCCTGTT	
Ubiquilin	正向: GTTGATTTTGTCTGGAAGC	234
	反向: GATCTTGGCCTTCACGTTGT	
Efl-β	正向: GCACCAACTTGTTGAGAATGC	134
	反向: TTTCAACTGACCAGGGAACC	
18 S rRNA	正向: CTTCGGGATCGAGTAATGA	118
	反向: GCGGAGTCCTAGAAGCAACA	

2.2 RNA 提取

取 0.1 g 灰毡毛忍冬加入到预冷的研钵中, 加入 Trizol 1 mL, 液氮研磨组织; 将研碎的组织转移到 1.5 mL 离心管中, 室温静置 5 min; 12 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清到一个新的离心管中; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈震荡混匀 30 s。室温静置 10 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上层水相移至另一离心管中, 加入等体积的异丙醇, 充分混匀, 室温静置 10 min; 4 °C, 12 000 r/min, 离心 10 min, 用 75%乙醇洗 2 遍, 之后用 20 μL 灭菌双蒸水溶解 RNA。用 GeneQuant 核酸定量仪对总 RNA 在 260、280、230 nm 测定吸光度 (A_{260} 、 A_{280} 、 A_{230}) 及浓度。1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和完整性。

2.3 RNA 反转录合成 cDNA

cDNA 合成按照 TIANScript II RT Kit (KR107) 试剂盒说明书要求进行, 将灰毡毛忍冬不同部位及花蕾不同时期的样品 RNA 反转录合成 cDNA, 用于 PCR 扩增。

2.4 内参基因及 LmAGL15 基因的 qRT-PCR 扩增

采用 Real-time PCR 扩增仪 (Stepone Thermal Cycler) 进行扩增。qRT-PCR 反应总体系: SYBR Premix Ex TaqTM ($2 \times$) 10 μL, Primer F (10 μmol/L) 1 μL, Primer R (10 μmol/L) 1 μL, Cdna 1 μL, 用 ddH₂O 补齐 20 μL。实时荧光定量反应程序为 95 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 55 s 并收集荧光, 38 个循环, 55~94 °C 生成熔解曲线。每个样品重复 4 次。同时用 qRT-PCR 定量分析引物, 生成熔解曲线, 熔解曲线为单峰时用于后续分析^[4]。

2.5 标准曲线的绘制及基因扩增效率

以 cDNA 第一链作为模板, 依次稀释 6 个梯度, 每个梯度稀释 10 倍, 即 cDNA 初始模板浓度分别为 1、0.1、0.01、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} μmol/L。根据荧光定量 PCR 结果, 以测得的 C_t 值为纵坐标, cDNA 初始模板浓度对数值为横坐标, 绘制标准曲线。利用公式 $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ (slope 为标准曲线斜率) 计算基因的扩增效率^[3]。

2.6 数据处理

根据 4 个内参基因及在灰毡毛忍冬组织材料中的相对表达量, 分别应用 Genorm (ver.3.0) 和 NormFinder (ver.0.9) 程序对 4 个候选内参基因的表达稳定性进行分析, 筛选合适的内参基因^[5-6]。

3 结果与分析

3.1 克隆内参基因片段

18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl-β 等常用作内参基因, 灰毡毛忍冬中没有相应的序列报道。根据近缘物种基因序列设计引物, 克隆 18 S rRNA、

Ubiquilin、Actin 和 Efl- β 4 个基因的部分片段。从图 1 可以看出每对引物扩增产物没有引物二聚体及非特异条带, 均能扩增出清晰的特异性条带, 表明各内参基因引物均能特异地扩增相应片段, 可以用于实时荧光定量 PCR 分析。且测序结果显示各基因片段的长度分别是 118、234、236、134 bp, 与预期的长度基本一致。利用 NCBI 数据库对测序结果进行同源性搜索 (表 3), 由比对结果可知, 克隆片段与不同物种相应基因序列同源性高于 70%, 即所得克隆为目标基因^[3]。

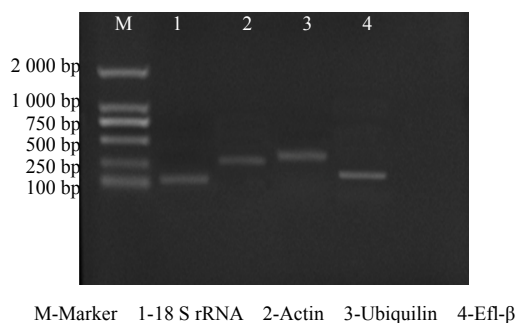


图 1 4 种内参基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of ten reference genes

表 3 内参基因片段 BLAST 比对部分结果

Table 3 Partial BLAST results of reference gene fragments

内参基因	登录号	来源	扩增长度/bp	覆盖率/%	同源性/%
18 S rRNA	GR878775.1	柳枝稷	118	98	89
Actin	RAK5268.1	红海榄	721	90	92
Ubiquilin	AAQ76040.1	黄瓜	410	85	91
Efl- β	ACS68201.1	油菜	1 160	92	90

3.2 内参基因荧光定量 PCR 的效率及 qRT-PCR 分析

18 S rRNA、Ubiquilin、Actin 和 Efl- β 的标准曲线参数、扩增效率和熔解温度见表 4。4 个内参基因均统一模板质量浓度为 400 ng/ μ L; 斜率为 -3.300 ± 0.150 , 在 $-3.0 \sim -3.5$; 相关系数均大于 0.99, 高于定量 PCR 反应要求的 0.98; 扩增效率 (99.900 ± 2.909) %。4 个内参基因的斜率、相关系数和扩增效率都很接近, 且均在合理范围内。

由图 2 可知选择的 4 个内参基因在不同的生物部位呈现的熔解曲线为显著的单一峰, 表明所设计的内参基因引物都能扩增出各内参基因的相应产物, 因此表明 qRT-PCR 的分析结果是准确可靠的。

C_t 的大小反映了对应基因的表达丰度高低, C_t 值越大对应基因丰度越低。叶、茎和花蕾中, Ubiquilin 基因的 C_t 平均值最大 (表 5), 即其表达丰度低于其他 3 个基因。且茎中 Actin 基因的 C_t 为

20.480 高于叶/花蕾的 14.025/15.693 (6/5 个循环), 可知茎片与叶/花蕾中 Actin 基因。花蕾发育不同时期内参基因 C_t 值及熔解温度见表 6。

3.3 内参基因稳定性评价

利用 Normfinder 和 Genorm 2 种方法综合分析内参基因的稳定性, 通过生成基因表达稳定值 (M) 来筛选内参基因, M 值越大, 内参基因越不稳定, M 值越小, 内参基因越稳定。此方法简化了内参基因的分析过程。灰毡毛忍冬叶、茎及花蕾中, 表达稳定性 M 值分析结果见图 3、4。Normfinder 和 Genorm 的基因稳定性 M 值排序基本一致, 18 S rRNA 的稳定性最高, Ubiquilin 的稳定性最低。

3.4 LmAGL15 的时空表达分析

LmAGL15 基因定量 PCR, 不同部位及花蕾不同时期样本 cDNA 模板均统一模板质量浓度为 365 ng/ μ L, 扩增标准曲线的斜率是 -3.097 , 相关系数 0.998, 均处于合理范围内。LmAGL15 的熔解度曲

表 4 4 个内参基因扩增效率、标准曲线参数和熔解温度

Table 4 Standard curve parameters, amplification efficiency, and solution temperature of four reference genes

基因名称	斜率	相关系数	扩增效率/%	熔解温度平均值/ $^{\circ}$ C
18 S rRNA	-3.422	0.999	100.332	83.330
Actin	-3.397	0.998	101.541	78.563
Ubiquilin	-3.214	1.001	99.998	83.623
Efl β	-3.377	0.999	100.214	81.244

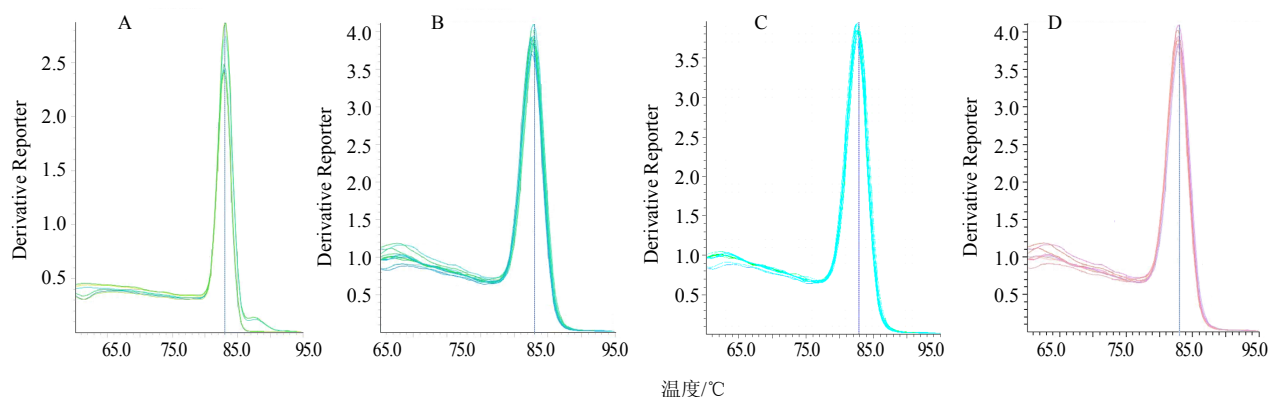


图 2 灰毡毛忍冬组织中 18 S rRNA (A)、Actin (B)、Ubiquilin (C) 和 Efl-β (D) 的 qRT-PCR 熔解曲线

Fig. 2 qRT-PCR melting curves of 18 S rRNA (A), Actin (B), Ubiquilin (C), and Efl-β (D) in tissues of *L. macranthoides*

表 5 叶、茎和花蕾内参基因 C_t 和溶解温度平均值

Table 5 C_t and average melting temperature of reference genes in leaves, stems, and buds

基因名称	C_t 平均值			溶解温度平均值/°C		
	茎	叶	花蕾	茎	叶	花蕾
18 S rRNA	15.522	14.281	15.142	83.028	83.031	83.032
Actin	20.480	14.025	15.693	78.563	78.564	78.563
Ubiquilin	27.052	21.856	22.417	83.623	83.623	83.624
Efl-β	21.474	26.967	24.310	82.788	82.733	82.733

表 6 花蕾不同发育时期内参基因 C_t 和溶解温度的平均值

Table 6 C_t and average melting temperature of reference genes in different development periods of buds

基因名称	C_t 平均值				溶解温度平均值/°C			
	5 d	10 d	15 d	20 d	5 d	10 d	15 d	20 d
18 S rRNA	15.613	15.281	15.142	15.495	83.330	83.181	83.031	83.031
Actin	15.827	15.554	15.693	18.911	78.563	78.564	78.563	78.563
Ubiquilin	23.824	23.220	22.417	26.609	83.624	83.623	83.624	83.623
Efl-β	35.139	34.071	34.310	37.116	81.244	81.244	82.733	82.733

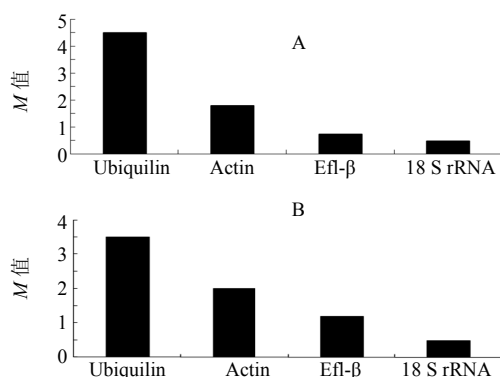


图 3 NormFinder 软件 (A) 和 GeNorm 软件 (B) 分析候选内参基因在灰毡毛忍冬不同部位组织中的表达稳定性

Fig. 3 Expression stability of candidate reference genes in different parts of *L. macranthoides* by NormFinder (A) and GeNorm (B)

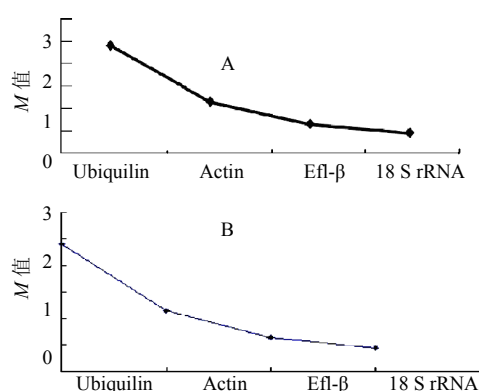


图 4 NormFinder 软件 (A) 和 GeNorm 软件 (B) 分析候选内参基因在灰毡毛忍冬花蕾不同时期的表达稳定性

Fig. 4 Expression stability of candidate reference genes during different bud stage of *L. macranthoides* by NormFinder (A) and GeNorm (B)

线为单峰, 叶、茎和花蕾不同发育时期 (5、10、15、20 d) 的峰值均接近于 80 °C, 表明 PCR 扩增特异性良好。且在相同的反应体系中, 茎和花蕾的 C_t 值分别为 26.645 和 26.465, 小于叶片 (32.633), 可见 LmAGL15 基因在茎和花蕾组织的表达丰度较高。比对不同花蕾时期 LmAGL15 基因的表达丰度, 20 d 的 C_t 值 (36.936) 最大, 均大于花蕾其他发育时期。表明花蕾发育后期, LmAGL15 基因的表达丰度明显降低。

根据内参基因筛选结果以 18 S rRNA 作为内参基因, 分析 LmAGL15 基因在不同部位及不同时期的表达情况 (图 5~8)。结果表明 LmAGL15 基因在叶片中相对表达量最低, 茎中次之、花蕾中最高。且花蕾发育过程中, 5~15 d LmAGL15 基因的相对表达量较稳定, 20 d 明显降低。5 d LmAGL15 的相对表达量较高, 可能是由于花蕾发育后期受物质动员过程影响, LmAGL15 参与的代谢过程活跃引起的。

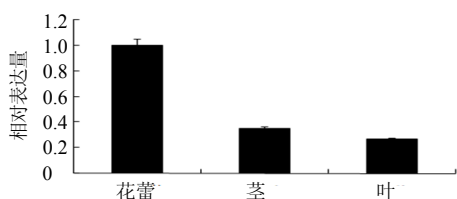


图 5 叶、茎、花蕾中 LmAGL15 表达的变化

Fig. 5 Expression change of LmAGL15 gene in leaves, stems, and buds

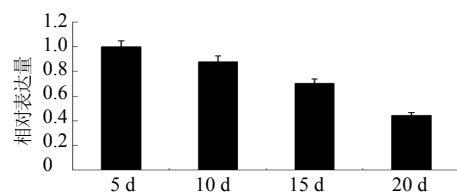
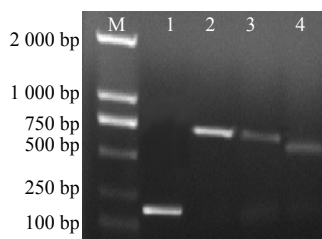


图 6 花蕾不同发育时期 LmAGL15 表达的变化

Fig. 6 Expression change of LmAGL15 gene in different bud development periods



M-Marker 1-18 S rRNA 内参基因 2-花蕾 3-叶 4-茎
M-Marker 1-18 S rRNA acting gen 2-bud 3-leaf 4-stem

图 7 灰毡毛忍冬不同部位中 LmAGL15 基因的表达

Fig. 7 Expression of LmAGL15 genes in different parts of *L. macranthoides*

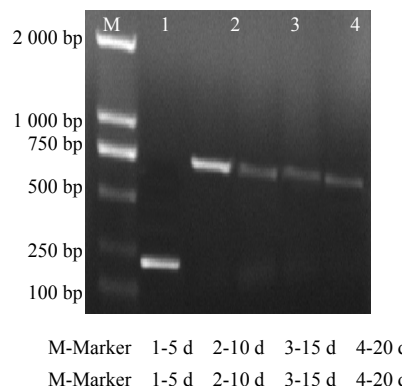


图 8 灰毡毛忍冬花蕾不同时期 LmAGL15 基因的表达

Fig. 8 Expression of LhAGL15 genes in different parts of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. after agarwood formation

4 讨论

筛选内参基因是基因差异表达分析的基础工作。通常分析多个内参基因的稳定性以及表达丰度, 再选择稳定性最好、表达丰度稳定的作为内参基因。常以内参基因表达量作为分母, 目标基因与之比较, 用比值的变化趋势来表示目标基因的表达量变化规律。但是内参基因的使用仍然具有局限性, 不同的实验条件和处理背景都会影响内参基因的稳定性及表达量分析的结果。本研究中的 LmAGL15 基因在叶片、茎和花蕾中表达稳定性略低于在花蕾的不同发育时期。可见, 适宜的内参基因需要根据具体情况选择^[7-9]。

本实验研究的 4 个基因为研究较多的传统内参基因, 通过对内参基因 (18 S rRNA、Ubiquilin、Actin、Efl-β) 进行荧光定量 PCR 稳定性分析, 结果表明, 18 S rRNA 在灰毡毛忍冬不同部位以及花蕾不同发育时期中表达均最稳定, Actin 虽然在苹果不同组织的基因表达分析中表现也较稳定, 但表达丰度偏低。因此, 18 S rRNA 为灰毡毛忍冬最适内参基因^[10-13]。当然在追踪基因表达的微小变化时, 单独使用一个内参基因往往不能得到准确的定量结果, 这时可以同时列出 2 个或几个内参基因进行内参校正。

同时, 本研究中叶、茎和花蕾相对 LmAGL15 表达量具有一定的差异, 可能与 LmAGL15 基因与生长生殖的功能有关。报道 AGL15 同源基因均在非胚性器官根、茎和叶中的表达量极低而在花蕾等生殖器官中具有相对较高表达量, LmAGL15 基因表达量的结果和在油菜中的表达模式分析结果相

似。因此通过 LmAGL15 基因在花蕾发育过程中的表达模式分析, 表明了其参与灰毡毛忍冬花蕾发育过程并发挥着一定作用^[14-17]。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 汪 冶, 肖聪颖, 梅树模, 等. 湘蕾金银花最佳采收时间和干燥方法的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 100-101.
- [3] 汪 冶, 黄 云. 湘蕾金银花的选育及推广初报 [J]. 中药材, 2004, 27(12): 896-897.
- [4] 蒋晓梅, 张新全, 严海东, 等. 柳枝稷根组织实时定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(1): 55-63.
- [5] Makapugay H C, Dhammika N N P, Soejarto D D, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of the major sweet principle of Luo Han Kuo fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 33: 348-350.
- [6] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, *et al.* Studies on the constituents of *Fructus Momordicae*. II. Structure of sapogenin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2015, 103(11): 55-66.
- [7] Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, *et al.* Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Momordica grosvenori* (Cucurbitaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2014, 38: 2030-2032.
- [8] Tang Q, Ma X J, Mo C M, *et al.* An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 343-346.
- [9] Jung J D, Park H W, Hahn Y, *et al.* Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 22(3): 224-230.
- [10] 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*, 2014, doi: 10.1186/1471-2199-6-4.
- [11] 张艳君, 朱志峰, 陆 融. 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(5): 546-549.
- [12] 侯维海, 孙 鹏, 陈全家, 等. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(17): 76-79.
- [13] 张艳君, 朱志峰, 陆 融. 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(5): 546-550.
- [14] 易刚强, 蔡嘉洛, 朱贻霖, 等. 灰毡毛忍冬 MADS-box 基因家族 AGL15 基因的克隆、生物信息学和表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 640-647.
- [15] 侯志强, 王庆国. 鲜切马铃薯实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(12): 5207-5210.
- [16] 魏永赞, 赖 彪, 胡福初, 等. 用于荔枝 qPCR 分析的内参基因克隆及稳定性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(7): 301-306.
- [17] 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): 521-526.