

• 药材与资源 •

显齿蛇葡萄实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证

许明^{1,2}, 伊恒杰³, 赵帅², 张玉文³, 杨志坚^{1,2}, 郑金贵^{1,2*}

1. 福建农林大学 作物遗传育种与综合利用省部共建教育部重点实验室, 福建 福州 350002

2. 福建农林大学农产品品质研究所, 福建 福州 350002

3. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘要: 目的 筛选适用于显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 的内参基因。方法 设计简并引物, 采用 RT-PCR 从显齿蛇葡萄中克隆 6 个候选内参基因片段, 包括肌动蛋白基因 (Actin)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GAPDH)、18 S 核糖体 rRNA 基因 (18 S-rRNA)、 α -微管蛋白基因 (α -Tubulin)、 β -微管蛋白基因 (β -Tubulin) 和多聚泛素酶基因 (UBQ)。应用 qRT-PCR 技术检测这 6 个候选内参基因在显齿蛇葡萄不同组织器官中 (茎尖、嫩叶、成熟叶、老叶、茎和根) 的表达情况。借助 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种统计学软件综合评价 6 个内参基因的表达稳定性。通过苯丙氨酸解氨酶基因 (AgPAL) 的表达分析对筛选出的内参基因进行稳定性验证。结果 18 S-rRNA、GAPDH 和 Actin 的表达稳定性较好, 适合作为显齿蛇葡萄不同组织基因表达研究的内参基因, 以这 3 个基因为内参基因分析 AgPAL 基因的相对表达量, 结果发现它们在各组织器官中的表达变化趋势基本一致。结论 确定显齿蛇葡萄 qRT-PCR 分析的合适内参基因, 为后续相关基因表达研究奠定基础。

关键词: 显齿蛇葡萄; 实时定量 PCR; 内参基因; 看家基因; 肌动蛋白基因; 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因; 18 S 核糖体 rRNA 基因; α -微管蛋白基因; β -微管蛋白基因; 多聚泛素酶基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1192-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.023

Screening and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Ampelopsis grossedentata*XU Ming^{1,2}, YI Heng-jie³, ZHAO Shuai², ZHANG Yu-wen³, YANG Zhi-jian^{1,2}, ZHENG Jin-gui^{1,2}

1. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. Crop Quality Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To screen reference genes for real time quantitative PCR (qRT-PCR) research in *Ampelopsis grossedentata*. **Methods** On the basis of the conserved sequences among plant species, six candidate reference genes (including Actin, 18 S-rRNA, GAPDH, α -Tubulin, β -Tubulin, and UBQ) were cloned from *A. grossedentata* by RT-PCR in this study. The expression stability of each reference gene in different tissues (shoot tip, young leaf, mature leaf, old leaf, stem, and root) were analyzed by three softwares (GeNorm, NormFinder, and BestKeeper), followed by validation of the expression pattern of AgPAL by qRT-PCR. **Results** Actin, 18 S-rRNA, and GAPDH expressed most stably in all samples and were suitable for reference genes, which were further confirmed by the transcript level analysis result of AgPAL in different tissues. **Conclusion** This is the first report on the screening and validation of reference genes for qRT-PCR in *A. grossedentata*, which benefits future studies on gene expression in this species.

Key words: *Ampelopsis grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang; qRT-PCR; reference genes; housekeeping gene; Actin; GAPDH; 18 S-rRNA; α -Tubulin; β -Tubulin; UBQ

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 国家科技支撑计划 (2013BAD01B05)

作者简介: 许明 (1978—), 男, 博士, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: (0591)83789231 E-mail: xmfau@163.com

*通信作者 郑金贵 (1949—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为地方特色植物种质资源发掘与创新利用。

Tel: (0591)83789231 E-mail: jgzheng@fafu.edu.cn

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 是一种在传统 PCR 技术基础上发展起来的新型核酸定量技术, 具有定量准确、灵敏度高、重复性好和高通量等优点, 已被广泛应用于基因的表达和转录组分析等研究中^[1-4]。在利用 qRT-PCR 技术进行相对定量表达分析时, 需要选择合适的内参基因对其进行校正, 以消除不同样品间 RNA 提取质量、反转录效率等对表达分析结果所造成的偏差^[5]。

在植物学研究中, 通常选用维持细胞正常生命代谢所必需的看家基因 (housekeeping gene) 作为内参基因, 如肌动蛋白基因 (Actin)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GAPDH)、18 S 核糖体 rRNA 基因 (18 S-rRNA)、微管蛋白基因 (Tubulin) 和多聚泛素酶基因 (UBQ) 等。然而大量研究表明, 大多数看家基因的的表达稳定性只是相对的, 同一种看家基因在不同物种、不同组织或不同实验条件下的表达水平可能存在较大的差异^[6-8]。因此, 针对不同的研究材料和实验条件, 选择合适的看家基因作为内参基因就显得十分必要。

显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* W. T. Wan 是我国特有的一种茶药两用植物资源, 其幼嫩茎叶富含二氢杨梅素等黄酮类化合物, 可经类似茶叶加工的方法制成保健茶 (俗称“藤茶”“莓茶”等)^[9]。现代药理研究表明, 显齿蛇葡萄及其二氢杨梅素提取物具有抗氧化^[10-12]、保肝护肝^[13-14]、降血压^[15]和抗肿瘤^[16-18]等功效, 其应用和开发价值正受到越来越多的关注。但目前显齿蛇葡萄的分子生物学和功能基因组研究还很薄弱, 尚无相关的内参基因报道及利用。本研究克隆了显齿蛇葡萄 Actin、18 S-rRNA、GAPDH、 α -Tubulin、 β -Tubulin 和 UBQ

共 6 个常见看家基因的编码区或部分序列, 以此为候选内参基因, 采用 qRT-PCR 法对其在不同组织器官中的表达定量, 并借助 3 种统计软件 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 综合分析它们的表达稳定性。然后再以筛选的内参基因为参照, 通过 qRT-PCR 分析显齿蛇葡萄苯丙氨酸解氨酶 (AgPAL) 基因的表达水平, 进行稳定性验证, 以期为后续的相关基因表达研究提供合适的内参基因。

1 材料与方法

1.1 材料

所用的显齿蛇葡萄种植于福建农林大学作物科学学院科教试验基地。在同一植株上分别采集茎尖、嫩叶、成熟叶、老叶、根和茎样品, 经液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

按照本实验室前期建立的方法^[19]提取显齿蛇葡萄不同样品的总 RNA, 采用 Thermo Fisher 公司的 NanoDrop™ 2000 分光光度计和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 完整性、浓度和纯度。使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent 试剂盒将显齿蛇葡萄各样品的总 RNA 反转录为第 1 链 cDNA, 获得的产物直接用于 PCR 或保存于 -20 °C 备用。

1.3 显齿蛇葡萄 6 个候选内参基因的克隆

根据 GenBank 数据库登录的葡萄等近缘物种的同源基因序列, 设计显齿蛇葡萄 6 个候选内参基因的特异性引物或简并引物 (表 1)。使用 TaKaRa 公司的 PrimeSTAR® HS Premix 高保真 Taq 酶进行 PCR 扩增, 目的片段纯化回收后, 克隆到 pTOPO-Blunt 载体上。挑取阳性克隆送往上海博尚生物技术有限公司测序, 然后通过 NCBI BLAST 比对确认序列的正确性。

表 1 候选内参基因片段克隆的特异性引物或简并引物

Table 1 Degenerate or specific primers for candidate reference genes cloning

基因名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C	预期片段长度/bp
Actin	F: ATGGCAGAAGAAGATATTCAGC R: TTAGAAGCATTTCTATGCACAA	56	1 131
18 S-rRNA	F: TCATATGCTTGTCTCAAAGATTA R: CCTTCCTCTAAATGATAAGGTT	54	1 737
GAPDH	F: ATGGGGAAGATCAAGATCG R: TTATTTGCAGGATGCCATG	54	1 014
α -Tubulin	F: ATGAGRGAGTGCATYTCVATYC R: TCARTAYTCRTCTCCYTCGTCAC	51	1 356
β -Tubulin	F: TACCCDGATMGVATGATGKT R: AACATDGCWGTAACTGCTC	56	692
UBQ	F: GCWGAAGTTGCTGTHCGYA R: TCTTBACCATAGTRTCCCG	56	732

1.4 qRT-PCR 分析

根据候选内参基因的测序结果以及本实验前期克隆的显齿蛇葡萄 AgPAL 基因片段序列^[19], 设计荧光定量 PCR 引物 (表 2)。在对各候选内参基因进行 qRT-PCR 之前, 先通过普通 PCR 验证每对引物的特异性。以获得的第一链 cDNA 为模板,

PCR 体系为 Premix Taq 10 μL, 混合 cDNA 1 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 0.4 μL, ddH₂O 补足体积至 20 μL。反应程序为 95 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 候选内参基因和 AgPAL 基因的定量 PCR 引物序列和扩增参数

Table 2 Primer sequences and amplification parameters of candidate reference genes and AgPAL

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	扩增效率/%	R ²
Actin	F: CATTGTGAGCAACTGGGATG	125	129.22	0.995
	R: GATTAGCCTTCGGGTGAGA			
18 S-rRNA	F: CATAAACGATGCCGACCAG	111	95.79	0.998
	R: TTCAGCCTTGCGACCATACT			
GAPDH	F: TGGCTTTCCGTGTTCTACT	113	104.77	0.999
	R: TCCCTCTGACTCCTCCTTGA			
α-Tubulin	F: GTGAAACTGGTGCTGGGAAG	114	97.88	0.992
	R: GTTGTTCTGGGTGGAAGAGC			
β-Tubulin	F: AAAGATGAGCACCAAGGAGGT	108	113.85	0.989
	R: TCACACACGCTGGATTTCAC			
UBQ	F: TGAGAATGATATGCCCTCTGG	122	119.24	0.991
	R: ATGTGTCCCAACCAACGAT			
AgPAL	F: TCAGCACCTCAATCTTCCAA	109	99.80	0.996
	R: GATGGGTTTCCACTCTCCAG			

qRT-PCR 反应在 Applied Biosystems 7500 定量 PCR 仪上进行, 反应体系体积为 20 μL: SYBR[®] Premix Ex Taq 10 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 0.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 用无菌 H₂O 补足体系。阴性对照用 1.0 μL 纯水代替模板。反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火 34 s, 40 个循环; 最后在 60~95 ℃ 生成溶解曲线。每个反应重复 3 次。

利用筛选到的内参基因, 按上述相同的定量 PCR 反应体系和程序, 进行 AgPAL 基因的表达水平分析。

1.5 数据分析

将反转录的 cDNA 按照 1:10 梯度依次稀释成 5 个梯度, 并以此为模板进行 qRT-PCR 扩增, 以 cDNA 浓度的对数值为横坐标, 以测得的 Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线。计算各个候选内参基因的扩增效率和相对表达量。

扩增效率 = 0.1/斜率⁻¹

相对表达量 = 扩增效率^{ΔCt}

使用 3 种统计学软件 GeNorm、NormFinder 和

BestKeeper 对各个候选内参基因的表达稳定性进行统计分析, 从而筛选出合适的内参基因。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因片段的克隆

利用表 1 中的特异性引物或简并引物, 对 6 个候选内参基因进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 每对引物均能扩增出清晰的特异性条带 (图 1)。经测序, 各个基因片段的长度分别为 1 131、1 737、1 014、

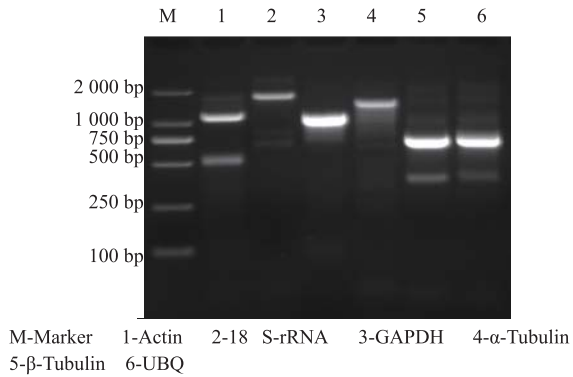


图 1 候选内参基因片段的克隆

Fig. 1 Cloning of candidate reference genes from *A. grossedentata*

1 356、692、732 bp，与预期的长度完全一致。NCBI BLAST 比对结果显示，上述 6 个基因片段推导的氨基酸序列与其他物种均具有较高的同源性（表 3），表明所克隆的这些基因片段分别属于显齿蛇葡萄 Actin、18 S-rRNA、GAPDH、 α -Tubulin、 β -Tubulin 和 UBQ 基因。

2.2 扩增特异性与扩增效率分析

普通 PCR 扩增的电泳结果显示，6 个候选内参基因均能扩增出与预期片段大小一致的特异条带，且条带下方无引物二聚体（图 2），表明本实验采用的荧光定量引物特异性较好，可用于后续 qRT-PCR 分析。

表 3 显齿蛇葡萄候选内参基因的 BLAST 比对结果
Table 3 BLAST results of candidate reference genes from *A. grossedentata*

基因名称	同源基因（GenBank 登录号）	覆盖率/%	同源性/%
Actin	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (FQ382126.1)	100	96
	芒果 <i>Mangifera indica</i> (JF737035.1)	99	89
	可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XM_007016371.1)	98	89
18 S-rRNA	葡萄 (AF207053.1)	100	99
	台湾火筒树 <i>Leea guineensis</i> (AF206951.1)	99	99
	银鹊树 <i>Tapiscia sinensis</i> (AF207034.1)	100	99
GAPDH	葡萄 (XM_002263109.3)	100	96
	可可树 (XM_007037842.1)	97	85
	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (KR905466.1)	99	85
α -Tubulin	葡萄 (XM_010666156.1)	100	96
	白杨 <i>Populus tremuloides</i> (AY180376.1)	100	88
	可可树 (XM_007018307.1)	100	88
β -Tubulin	葡萄 (XM_002275270.3)	100	97
	柳石楠 <i>Salix arbutifolia</i> (KC243681.1)	98	87
	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> (XM_002510494.1)	100	86
UBQ	葡萄 (XM_010653329.1)	94	97
	可可树 (XM_007015537.1)	80	90
	蓖麻 <i>Ricinus communis</i> (XM_002514388.1)	81	88

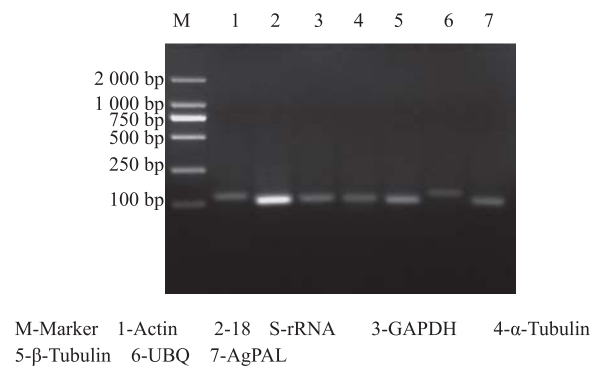


图 2 候选内参基因和 AgPAL 基因的普通 PCR 扩增
Fig. 2 Normal PCR amplification of candidate reference gene and AgPAL segments

进一步对各候选内参基因进行 qRT-PCR 分析，结果显示，各候选内参基因的熔解曲线为显著的单一信号峰，曲线重复性好（图 3），表明 qRT-PCR 反应专一性高，结果准确可信。由各候选内参基因标准曲线得出的相关系数（ R^2 ）均大于 0.990，扩增

效率在 95.79%~129.22%（表 2），符合 qRT-PCR 对扩增效率的要求。

2.3 候选内参基因的表达稳定性分析

为了进一步分析 6 个候选内参基因在显齿蛇葡萄不同组织器官中的表达稳定性，借助 3 个常用统计学软件 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper，对 qRT-PCR 所获得的 C_t 值进行综合分析。其中 GeNorm 软件通过计算内参基因的表达稳定性平均值（ M 值）来评价， M 值越小则稳定性越高，从图 4 可以看出，当使用 geNorm 软件进行评价时，6 个候选内参基因的表达稳定性依次为 GAPDH > Actin > 18 S-rRNA > β -Tubulin > UBQ > α -Tubulin。

NormFinder 软件与 GeNorm 软件类似，也是将基因的 C_t 值转化成相对表达量，然后计算基因的 M 值。 M 值越小，说明基因表达越稳定。

图 5 结果显示，使用 NormFinder 软件进行分

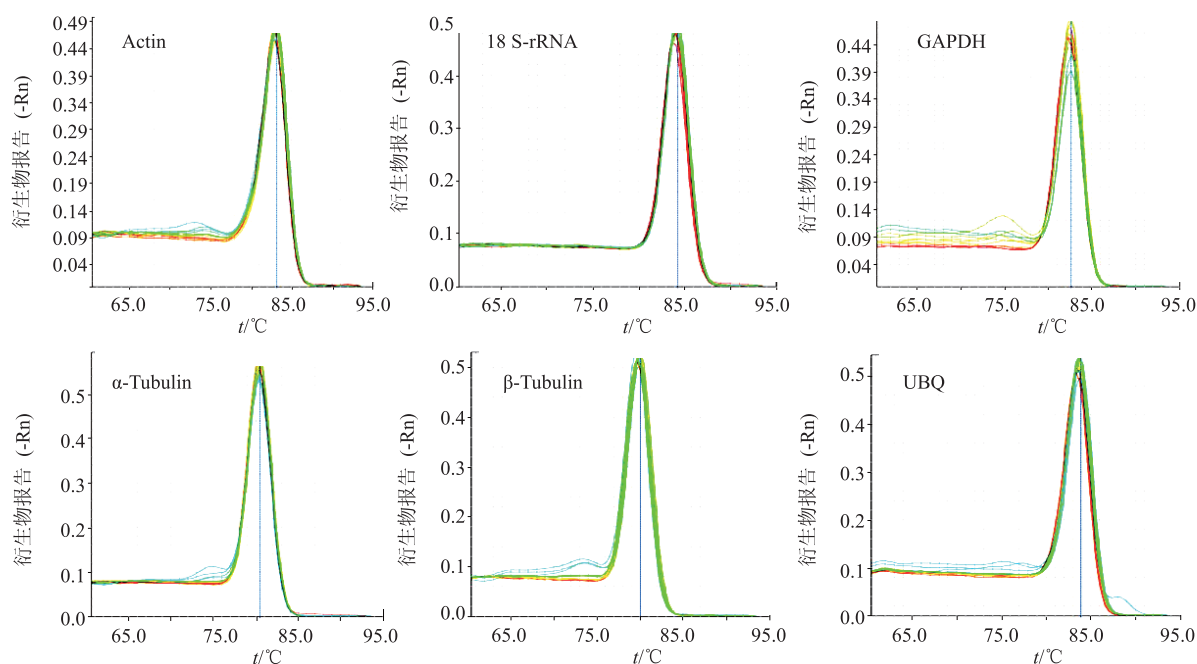


图 3 显齿蛇葡萄 6 个候选内参基因的溶解曲线

Fig. 3 Melting curves of six candidate reference genes of *A. grossedentata*

析时, 表达稳定性由高到低的排序为 GAPDH = Actin > 18 S-rRNA > β-Tubulin > UBQ > α-Tubulin。此结果与 GeNorm 软件的分析结果基本相符。

BestKeeper 软件则是直接根据每个候选内参基因的 C_t 值, 计算标准差(SD)和变异系数(CV), 以此来判断其表达稳定性。SD 和 CV 值越小则表示基因表达越稳定; 当 SD 值大于 1 时则被认为该基因的表达稳定性较差。从表 4 可知, 在 6 个候选内参基因中, 18 S-rRNA 的 SD 和 CV 值是最小的, 说明该基因表达最稳定, 其次是 GAPDH 和 Actin。而 UBQ、β-Tubulin 和 α-Tubulin 的 SD 值均大于 1, 说明这 3 个基因的表达稳定性差, 不适合作为内参基因。

综上所述可以看出, 3 种软件的分析结果尽管存在一定差异, 但其总体趋势基本一致。在显齿蛇葡萄不同组织器官样品中, Actin、GAPDH 和 18 S-rRNA 基因的表达稳定性均较好, 可作为内参基因, 而 β-Tubulin、UBQ 和 α-Tubulin 的稳定性都相对较差, 不适合作为内参基因。

2.4 内参基因的稳定性验证

为了进一步验证本研究筛选的 3 个内参基因的稳定性, 采用 qRT-PCR 法分析了显齿蛇葡萄苯丙氨酸解氨酶基因 AgPAL 的相对表达量。结果显示, 当以本研究筛选的 Actin、GAPDH 和 18 S-rRNA 为

内参基因进行定量时, AgPAL 基因在不同组织器官中的表达变化趋势基本一致(图 6), 即 AgPAL 在根中表达量最高, 茎次之, 接下来依次是茎尖、嫩叶和老叶, 而在成熟叶中表达量最低。

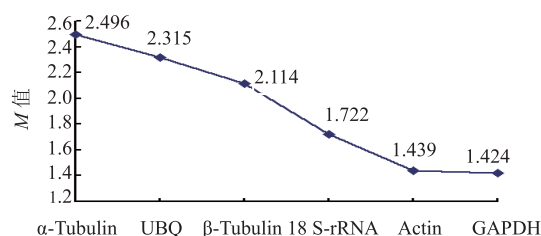


图 4 GeNorm 软件分析 6 个候选内参基因在不同组织器官中的表达稳定性

Fig. 4 Expression stability of six candidate reference genes in different tissues analyzed by GeNorm

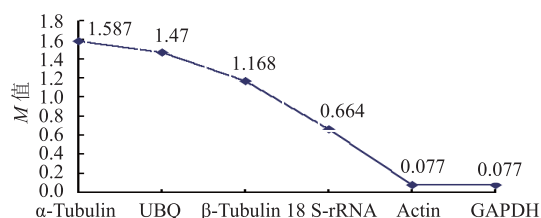


图 5 NormFinder 软件分析 6 个候选内参基因在不同组织器官中的表达稳定性

Fig. 5 Expression stability of six candidate reference genes in different tissues analyzed by NormFinder

表 4 BestKeeper 软件分析 6 个候选内参基因在显齿蛇葡萄不同组织中的表达稳定性

Table 4 Expression stability of six candidate reference genes in different tissues analyzed by BestKeeper

分析参数	Actin	18 S-rRNA	GAPDH	α -Tubulin	β -Tunulin	UBQ
GM [CP]	28.47	12.75	21.84	21.80	24.38	28.38
AM [CP]	28.48	12.76	21.85	21.95	24.46	28.41
min [CP]	27.38	12.44	20.87	19.79	22.59	26.58
max [CP]	29.82	13.47	23.29	26.41	27.83	30.40
SD	0.73	0.27	0.71	2.49	1.83	1.13
CV/%	2.58	2.08	3.26	11.32	7.49	3.99

GM-几何平均数 AM-算术平均数 CP-置信参数
GM-geomean AM-average mean CP-confidence parameter

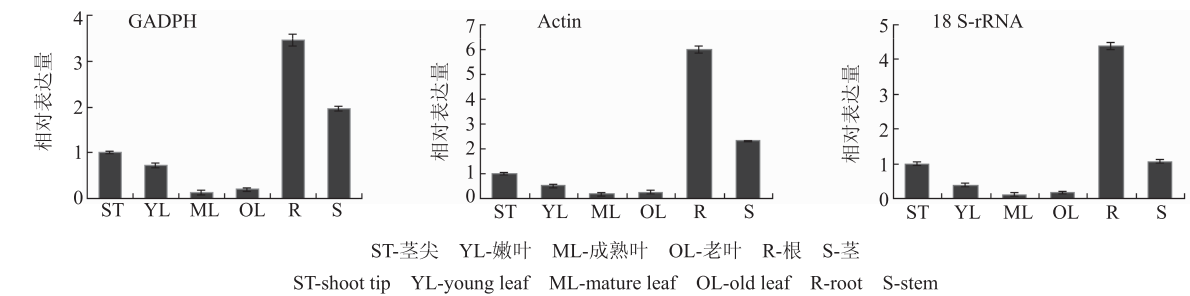


图 6 以 3 种内参基因为参照分析显齿蛇葡萄 AgPAL 基因的表达

Fig. 6 Expression of AgPAL genes analyzed using three reference genes for normalization

3 讨论

qRT-PCR 现已成为植物分子生物学中进行基因表达定量的常用技术一,其实验前提是选择合适的内参基因作为参照物,以校正上样量和上样过程中存在的实验误差,从而保证定量结果的准确、可靠^[4,20-21]。显齿蛇葡萄的内参基因研究目前尚未见报道,影响了其分子生物学研究工作的开展。本研究从显齿蛇葡萄中克隆了 6 个常见看家基因的编码区或部分序列,并借助 3 个最常用的统计学软件 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper,进行表达稳定性的综合分析。从稳定性的排序结果来看,GeNorm 和 NormFinder 的分析结果基本一致,而 BestKeeper 的评价结果与前两者略有差异,类似现象在柑橘 *Citrus grandis* (Linn.) Osbeck^[22]、刺槐 *Robinia pseudoacacia* L.^[23]、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey^[24]和石蒜 *Lycoris radiata* (L. Herit.) Herb.^[25]等其他物种的内参基因研究也同样存在,这可能是由于这 3 个软件的算法和评价指标不同造成的。尽管如此,3 个软件的分析结果均表明,Actin、GAPDH 和 18 S-rRNA 在显齿蛇葡萄不同组织器官中的表达相对稳定,适合作为内参基因。为了验证这一结果,进一步选择显齿蛇葡萄 AgPAL 基因为检测对象,qRT-PCR 分析结果表明,以本研究

筛选的 Actin、GAPDH 和 18 S-rRNA 为内参基因时,目标基因 AgPAL 在显齿蛇葡萄不同组织器官的表达水平均表现出一致的变化趋势。

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是催化植物苯丙烷代谢途径第一步反应的结构酶,它参与植物类黄酮等次生代谢物质的形成,对植物的抗病、抗虫、抗逆及生长发育具有重要的作用^[26]。黄海波^[27]采取生化手段测定了显齿蛇葡萄不同时期、不同组织部位的 PAL 活性差异,结果发现在芽和嫩叶中, PAL 活性较高,而在成熟叶和茎中逐步下降,且 PAL 酶活性与总黄酮、二氢杨梅素含量之间具有一定的相关性。在本研究中,通过 qRT-PCR 法(分子水平上)分析了显齿蛇葡萄不同组织器官 AgPAL 基因的表达水平差异,实验结果与黄海波^[27]报道的较为一致,说明 AgPAL 可能在显齿蛇葡萄类黄酮的合成代谢过程中发挥重要作用。上述研究结果对揭示 AgPAL 基因的功能以及阐明显齿蛇葡萄类黄酮高含量形成的分子机制也具有一定的意义。

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] Wan H J, Zhao Z G, Qian C T, *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.
- [3] Gachon C, Mingam A, Charrier B. Real-time PCR: What relevance to plant studies [J]. *J Experi Bot*, 2004, 55(402): 1445-1454.
- [4] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用 [J]. *植物生理学报*, 2014, 50(8): 1119-1125.
- [5] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227-230.
- [6] Tang R Y, Dodd A, Lai D, *et al.* Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, 39(5): 384-390.
- [7] Long X Y, Wang J R, Ouellet T, *et al.* Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for qPCR based transcript normalization in wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(3): 307-311.
- [8] 张翠彩, 逢波, 蒋秀高, 等. 霍乱弧菌基因表达分析中内参基因的选择 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30(5): 433-438.
- [9] 张友胜, 杨伟丽, 崔春. 显齿蛇葡萄化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(5): 402-403.
- [10] Ye L Y, Wang H J, Duncan S E, *et al.* Antioxidant activities of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef [J]. *Food Chem*, 2015, 172: 416-422.
- [11] Xin M L, Ma Y J, Xu K, *et al.* Structure-activity relationship for dihydromyricetin as a new natural antioxidant in polymer [J]. *J Appl Pol Sci*, 2013, 128(3): 1436-1442.
- [12] Zheng X J, Xiao H, Zeng Z, *et al.* Composition and serum antioxidation of the main flavonoids from fermented vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) [J]. *J Funct Foods*, 2014, 9: 290-294.
- [13] Shen Y, Lindemyer A K, Gonzalez C, *et al.* Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(1): 390-401.
- [14] Murakami T, Miyakoshi M, Araho D, *et al.* Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin [J]. *Bioactors*, 2004, 21(1/4): 175-178.
- [15] 赵喜兰. 显齿蛇葡萄叶总黄酮对原发性高血压大鼠的降血压研究 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(6): 351-355.
- [16] Wu S, Liu B, Zhang Q, *et al.* Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): 1-7.
- [17] Xia J, Guo S, Fang T, *et al.* Dihydromyricetin induces autophagy in HepG2 cells involved in inhibition of mTOR and regulating its upstream pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 66: 7-13.
- [18] Zhou Y, Shu F, Liang X, *et al.* Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): 1-9.
- [19] 许明, 杨志坚, 郑金贵. 藤茶叶片总 RNA 的提取及苯丙氨酸解氨酶基因 (*pal*) 片段的克隆 [J]. *生物学杂志*, 2015, 32(2): 96-99.
- [20] De P K, Vandesompele J, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Gen Biol*, 2002, 3(7): 1-11.
- [21] Han X, Lu M, Chen Y, *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): 1-10.
- [22] 王梨嫒, 潘永娟, 杨莉, 等. ‘琯溪蜜柚’荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. *果树学报*, 2013, 30(1): 48-54.
- [23] 王金星, 张利军, 廖资亿, 等. 刺槐实时定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. *林业科学*, 2014, 50(9): 167-172.
- [24] 郭茜茜, 马小军, 白隆华, 等. 罗汉果内参基因筛选和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶时空表达分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(15): 2224-2229.
- [25] 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(6): 1129-1138.
- [26] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望 [J]. *果树学报*, 2003, 20(5): 351-357.
- [27] 黄海波. 藤茶 PAL 特性及其与黄酮和 DMY 含量变化相关性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.