

基于实时荧光定量 PCR 分析的北柴胡内参基因的筛选及验证

余 马, 刘 丹, 舒晓燕, 张 洪, 黄 晶, 侯大斌*

西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000

摘 要:目的 筛选出在北柴胡不同生长时期及不同器官中表达均稳定的内参基因并进行验证。方法 利用实时荧光定量 PCR 获得 18 个候选内参基因所有 C_t 值, 通过 3 种不同算法 (Bestkeeper、NormFinder、GeNorm) 的软件对内参基因稳定性进行分析, 采用皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 分析 3 个软件给出的稳定性排名结果。结果 所有候选内参基因的 C_t 值相对宽泛, ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b 和 ACT2 为最为合适的内参基因, 而 eIF6 被认为稳定性最差的内参基因。3 个软件计算结果均呈现显著性相关。结论 采用实时荧光定量 PCR 结合 3 种不同算法进行北柴胡内参基因的筛选及验证是可行的。在北柴胡柴胡分子遗传研究中, 发掘到的内参基因对目的基因进行均一化处理有助于提高目的基因表达分析的精确性及可信度。

关键词: 北柴胡; 川北柴 1 号; 内参基因; 算法; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3820-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.024

Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Bupleurum chinense*

YU Ma, LIU Dan, SHU Xiao-yan, ZHANG Hong, HUANG Jing, HOU Da-bin

School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China

Abstract: **Objective** To identify stable reference genes in different growth stages and different organs of *Bupleurum chinense*. **Methods** All C_t values of 18 candidate internal reference genes were obtained by real-time quantitative PCR. Three software (Bestkeeper, NormFinder, and GeNorm) based on different algorithms were used to analyze the stability of the internal reference gene. The Pearson correlation coefficient was also analyzed. **Results** The C_t values of all candidate genes were relatively broad. ADF1b, ADF5, ADF7, eIF2b, and ACT2 were the most stable reference genes, whereas the gene of eIF6 was the least stable of the reference gene. The results of three softwares showed significant correlation. **Conclusion** Real-time fluorescence quantitative PCR combined with three different algorithms for the screening and validation of the reference gene of *B. chinense* is feasible. The homogenization of the target gene by the reference genes of the present study is helpful to improve the accuracy and reliability of gene expression analysis in molecular genetic research of *B. chinense*.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; *Bupleurum chinense* I; reference genes; algorithms; quantitative real-time PCR

在生物科学研究中, 转录组测序、基因芯片、Northern 杂交和实时荧光定量 PCR 等基因表达分析技术被广泛应用于生物功能及遗传机制剖析^[1-4]。其中实时荧光定量技术因为其技术简单、低成本及高通量等优点, 越来越广泛地被应用于目的基因的表达模式分析中^[1]。然而, 实时荧光定量技术也受到很多因素的限制, 如样品初始浓度、RNA 浓度和合成 cDNA 反转录效率等。为了获得可靠精准的实验结果, 引入 1 个或多个内参基因进行样品的均一化

是必要的^[5-7]。

理想的内参基因在所有不同的实验条件及实验处理下均能稳定表达。持家基因过去通常被用做荧光定量 PCR 的内参基因, 这些持家基因多与细胞基本功能及细胞结构相关^[8-10], 如 18 S rRNA、26 S rRNA、GAPDH、ACT、TUB、UBC、EF-1a 等^[11-15]。然而, 同一个内参基因在不同的遗传背景或试验条件下表达结果同样会产生改变, 因此适用于所有物种及实验条件的理想内参基因并不存在。最近, 在

收稿日期: 2017-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603223); 四川省“十三五”育种攻关 (2006NYZ0036-4-2); 四川省科技扶贫专项 (2016NZYF0071)

作者简介: 余 马 (1986—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物育种。Tel: 15196278464 E-mail: yuwen0073@126.com

*通信作者 侯大斌, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物。Tel: (0816)6089523 E-mail: dbhou@126.com

甘蔗^[16]、柚棕^[17]、柚木^[18]、小麦^[19]等物种中越来越多的内参基因通过表达分析被分离及鉴定。为了增加荧光定量结果的精准性，在实验前分析多个内参基因的稳定性以发掘稳定表达的内参基因非常重要。在分析内参基因的稳定性中，目前主要采用 Bestkeeper^[20]、NormFinder^[6]和 GeNorm^[5] 3 种统计学算法。

北柴胡 *Bupleurum chinese* DC. 为伞形科 (Umbellifetae) 多年生草本植物，其根为常用作大宗药材之一。药理研究表明柴胡具有解热、抗病毒、调血脂、保肝、抗炎、抗肿瘤等功效^[21-22]。柴胡在中国和韩国被世界卫生组织列为常用药用植物^[23-24]。其主要有效成分柴胡皂苷的生物合成可能涉及 3 个关键酶：BAS，构造基本的三萜骨架；细胞色素 P450，调解氧化反应；UGT，催化糖基化。柴胡属植物体内的 2 个乙酰辅酶 A 反应生成一个 β -香树脂醇，该物质在这 3 个关键酶的协同作用下经过一系列的生化反应过程最终合成柴胡皂苷，而这些基因的表达均是连续的^[25]。本研究应用 Bestkeeper^[20]、NormFinder^[6] 和 GeNorm^[5] 3 种统计学软件系统评价了 18 个候选内参基因在柴胡种的表达稳定性，以筛选合适的内参基因，为揭示柴胡皂苷代谢的分子机制及调控网络提供分子基础。

1 材料

材料品种为川北柴 1 号，由西南科技大学生命科学与工程学院、中国医学科学院药用植物研究所及四川德培源中药科技开发有限公司等多家单位共同选育，经西南科技大学侯大斌教授鉴定为北柴胡 *Bupleurum chinese* DC. 新审定品种。取样部位分别为川北柴 1 号的根、茎、叶、花、果实、侧根形成前植株、幼苗期根和叶，每个样品均取 2 份，共 16 份样品。

2 方法

2.1 RNA 提取及 cDNA 合成

总 RNA 的提取参照 Tang 等^[26]报道的方法，基因组 DNA 去除采用 DNase I (TIANGEN)。RNA 完整性采用琼脂糖凝胶电泳检测。RNA 浓度检测利用 NanoDrop2000 (Thermo 公司，美国)。反转录 cDNA 合成采用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司，加拿大) 试剂盒。

2.2 荧光定量 PCR 测定

18 个候选内参基因的具体信息 (注释及引物序列) 见表 1，荧光定量 PCR 的试剂采用 TransStart[®] Green qPCRSuperMix UDG (TransGen Biotech, Beijing, 中国) 试剂盒，荧光定量 PCR 仪为 CFX96 TouchTM 荧光定量 PCR 检测系统。PCR 反应体系遵循实验室前期研究 (表 2)。数据结果收集利用 CFX Manager Software 3.1。

表 1 18 个候选内参基因的序列信息

Table 1 Oligonucleotide sequences of 18 candidate reference genes

基因名称	引物序列 (5'→3')	基因名称	引物序列 (5'→3')
UBC6 (F)	ACCACTCTTTTACTTTTGTTCAT	eIF2a (F)	CAGACTGAGTTGGGTCTTGTTA
UBC6 (R)	TCCACAACCTTTACTATATCCAGATG	eIF2a (R)	TCTGATACTGTTGCCTCTATTCCT
UBC13 (F)	CGATGGTGGACTATTGGGTA	eIF2b (F)	TAATGGGAGCAACTGACCTGT
UBC13 (R)	GGCTTTTCTGCTGGTTTGGT	eIF2b (R)	TGGGCAGCAAAGATTGGTAG
ACT7 (F)	TCTCTGTGTCTCATATTCTCTCTTTC	eIF3 (F)	ACTACGAGGAGGCTGAAAGGT
ACT7 (R)	TTCACCATTCAGTTCCATTG	eIF3 (R)	GTTTACCGAGCAGTTTGTGGA
ADF1a (F)	TGCAAGCAACTGATCCAACA	UBC4 (F)	ACCAGCCATCGCTTCATCAC
ADF1a (R)	TACAAGAATAACAAGCCCGACA	UBC4 (R)	CCCAATCCATCAGACCCACT
ADF1b (F)	CGGCATCTGGTATGGCTG	eIF4 (F)	AGACCATTGAACAGCATCCA
ADF1b (R)	CAGGCAGTGAAATCCTCATAGC	eIF4 (R)	GAAATGAAATCTACACTAACAACCC
ADF7 (F)	TGGGGTTGAGGGCACTTG	ADF5 (F)	CGAGTTCCTCTTGAATCTGTC
ADF7 (R)	GACAACATACTACAAGTTCGCCAT	ADF5 (R)	TGAGGATTTCACTGCCTGTCTA
ACT1 (F)	GTCAAGTGCCCTCAACCCC	ACT2 (F)	TGCCCCGATGGTCAAGTTAT
ACT1 (R)	TGATGTTATTAGAAGTCGTGCCAA	ACT2 (R)	GCAGCTTCCATTCCAATCA
ACT4 (F)	CCAGAATCAAGCACAATACCAG	eIF6 (F)	GTTTCAGGCGCAAGGCTTT
ACT4 (R)	ACCCAAAAGCAAACAGAGAAAA	eIF6 (R)	CTGCAACCGGGTCATTCA
EF1b (F)	TCCTTCTGTCAACAGCCTTAAT	EF1a (F)	CAACATGATTGAGAGGTCTAGCA
EF1b (R)	AATGGTGATTCTGGGATGGTT	EF1a (R)	GAAGAGGGAGACGAAGAGGTT

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2 Fluorescence quantitative PCR reaction system

组分	体积/ μL
模板	1.0
上游引物 (F)	0.3
下游引物 (R)	0.3
2 $\times$ TransStart [®] Green qPCRSuperMix UDG	5.0
ddH ₂ O	3.4
总体积	10.0

2.3 数据分析

利用 SPSS 16.0 软件对收集的数据进行统计学分析; 内参基因稳定性采用 Bestkeeper、NormFinder 和 GeNorm 3 个软件分析; 皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 采用 Minitab 15 分析。

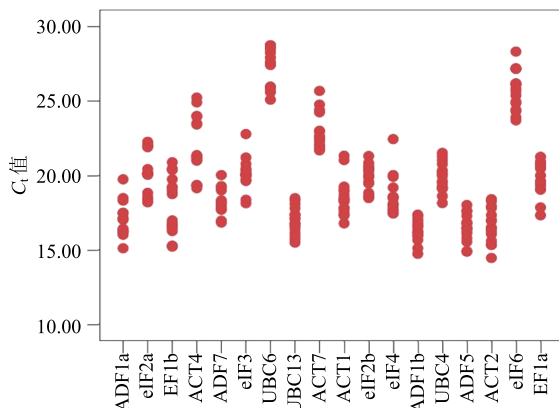
3 结果与分析

3.1 内参基因的表达数据

18 个候选内参基因在 16 份样品中, 每个候选内参基因都产生了 48 个循环阈值 C_t (cycle threshold), 即反应管内的荧光信号到达设定域值时所经历的循环数。剔除缺失及重复性较差的数据后, 18 个内参基因的平均 C_t 值为 16.28~27.63。其中 ADF1b 基因的表达丰度最高, C_t 平均值为 16.28 ± 0.69 , 其次为 ADF5 的 C_t 值 16.48 ± 0.88 , 表达丰度最低的为 UBC6 的 C_t 值 27.63 ± 1.28 。所有样品的方差均较低, ADF1b 的方差最低, 仅为 0.69, ACT4 (2.00) 最高。除 UBC6 和 eIF6 以外, 所有供试内参基因在所有样品中的分布基本相似 (图 1)。

3.2 18 个内参基因的稳定性分析

3.2.1 GeNorm 分析 GeNorm 根据所有实验中供试基因的成对变异来计算各候选基因的表达稳定值

图 1 18 个候选基因 C_t 值Fig. 1 18 candidate genes C_t values

(M 值, 表 3)。GeNorm 的分析结果表明, 所有内参基因 M 值均低于阈值 1.5, 都表现出较高的稳定性。在参试样品中均表现出较高稳定性 5 个基因为 ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b 和 ACT2。其稳定性排名为 $ADF1b = ADF5 > ADF7 > eIF2b > ACT2$ 。稳定性较差的 4 个基因为 eIF6 (1.201)、ACT4 (1.098)、EF1b (0.956)、UBC6 (0.915)。

表 3 18 个候选基因在 GeNorm 软件分析下的表达稳定性

Table 3 Expression stability of 18 candidate genes under GeNorm software analysis

排名	基因名称	M 值	排名	基因名称	M 值
1	ADF1b	0.301	10	ACT1	0.705
2	ADF5	0.301	11	UBC4	0.721
3	ADF7	0.421	12	ADF1a	0.753
4	eIF2b	0.436	13	eIF4	0.778
5	ACT2	0.506	14	UBC13	0.856
6	eIF2a	0.598	15	UBC6	0.915
7	ACT7	0.625	16	EF1b	0.956
8	eIF3	0.662	17	ACT4	1.098
9	EF1a	0.693	18	eIF6	1.201

3.2.2 NormFinder 分析 NormFinder 软件在计算参试基因的任意稳定值及标准误的同时, 考虑到每个内参基因的组内及组外的变异^[6]。根据 NormFinder 软件给出的结果 (表 4), 所有样品中最为稳定的 5 个内参基因为 ADF7、ADF1b、eIF2b、ADF5 和 ACT2。稳定值为 0.237~0.349, 该结果于用 GeNorm 软件分析中得出的结果一致, 但各基因排名略有差异。eIF6 为最不稳定的内参基因, 稳定值 0.927, 该数接近于软件的阈值 1.0。另外, 各基因在所有样品中稳定性波动均不大且属正常波动。

表 4 18 个候选基因在 NormFinder 软件分析下的表达稳定性

Table 4 Expression of 18 candidate genes in NormFinder software analysis

排名	基因名称	稳定值	排名	基因名称	稳定值
1	ADF7	0.237	10	eIF4	0.484
2	ADF1b	0.305	11	EF1a	0.513
3	eIF2b	0.327	12	UBC13	0.521
4	ADF5	0.346	13	UBC4	0.531
5	ACT2	0.349	14	ADF1a	0.628
6	ACT7	0.367	15	UBC6	0.631
7	eIF3	0.411	16	ACT4	0.804
8	eIF2a	0.444	17	EF1b	0.828
9	ACT1	0.416	18	eIF6	0.927

3.2.3 Bestkeeper 分析 Bestkeeper 软件根据方差估算内参基因的稳定性,同时给出样品之间的变异系数和相关系数等其他信息^[24],用变异系数(coefficient of variation, CV)值及标准差(standard error of the mean, SD)来表示。根据该软件给出的稳定性排名结果发现,最稳定的 5 个基因为 ADF7、ADF1b、ADF5、eIF2b 和 UBC13(表 5)。其中 ADF7 被估测为最稳定的内参基因, CV $\pm$ SD 为 3.18 $\pm$ 0.58; UBC13 在该软件分析下排名第 5, CV $\pm$ SD 为 3.36 $\pm$ 0.74,而在 GeNorm 和 NormFinder 软件分析中它分别排第 14 和 12, ACT2 基因在前 2 个软件分析中均处第 5,而在 Bestkeeper 软件中排名第 8,属于波动性较大的基因。其他基因与 GeNorm 和 NormFinder 软件分析结果基本一致。

表 5 18 个候选基因在 Bestkeeper 软件分析下的表达稳定性
Table 5 Expression of 18 candidate genes in Bestkeeper software analysis

编号	基因名称	CV $\pm$ SD	编号	基因名称	CV $\pm$ SD
1	ADF7	3.18 $\pm$ 0.58	10	eIF2a	5.45 $\pm$ 0.85
2	ADF1b	3.76 $\pm$ 0.61	11	UBC4	4.94 $\pm$ 0.89
3	ADF5	4.20 $\pm$ 0.69	12	ACT1	4.07 $\pm$ 0.89
4	eIF2b	3.35 $\pm$ 0.71	13	ADF1a	4.71 $\pm$ 0.92
5	UBC13	4.34 $\pm$ 0.74	14	eIF4	3.77 $\pm$ 1.02
6	ACT7	3.98 $\pm$ 0.73	15	ACT4	4.13 $\pm$ 1.04
7	eIF3	3.94 $\pm$ 0.80	16	UBC6	9.52 $\pm$ 1.04
8	ACT2	4.27 $\pm$ 0.81	17	eIF6	11.39 $\pm$ 1.06
9	EF1a	4.83 $\pm$ 0.84	18	EF1b	1.76 $\pm$ 1.71

3.3 综合分析所有样品中的表达稳定性

为了综合分析样品中合适的内参基因,采用皮尔森相关系数分析 3 个软件给出的稳定性排名结果(Bestkeeper、NormFinder 和 GeNorm)(图 2)。3 个软件计算结果均呈现显著较高相关性,其中 Bestkeeper 和 GeNorm 相关系数为 0.879 ($P=0.000$), Bestkeeper 和 NormFinder 相关系数为 0.904 ($P=0.000$), NormFinder 和 GeNorm 相关系数为 0.965 ($P=0.000$),这表明 3 个软件的结果基本一致。综合 3 个软件的计算结果,最终确定 3 个软件中计算结果较为稳定的 5 个内参基因,分别为 ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b 和 ACT2,稳定性较差的 5 个内参基因为 ADF1a、UBC6、eIF1a、ACT4 以及 eIF6。

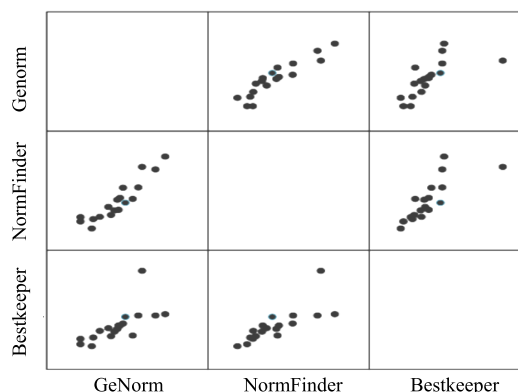


图 2 皮尔森相关系数分析(Bestkeeper、NormFinder 和 GeNorm)给出的稳定性排名结果

Fig. 2 Stable ranking results in Pearson correlation coefficient analysis (Bestkeeper, NormFinder and GeNorm)

4 讨论

在北柴胡中,柴胡皂苷量是影响柴胡药用价值的重要因子之一,柴胡皂苷合成过程包括 2 个乙酰辅酶 A 反应生成 1 个 β -香树脂醇,糖的供给及利用等^[25]。目前,基因表达分析广泛的应用于植物次生代谢产物的分子机理研究中,荧光定量 PCR 是其研究的主要技术^[26-27]。为了获得可靠及准确的柴胡皂苷相关基因表达模式,筛选合适的内参基因对样品进行均一化处理是必要的。

在之前研究中,EF1a、Actin 被广泛的作为植物内参基因^[27-28]。然而,本研究结果显示他们不适合作为北柴胡分子研究的内参基因。在本研究在 18 个内参基因发掘到 5 个内参基因(ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b 和 ACT2)为最合适的内参基因,特别是 ADF7 表现出了极高的稳定性。ADF7 对肌动蛋白骨架的重塑过程非常重要,该基因在柴胡不同发育时期和不同器官中表现出了相对稳定的表达,与其他植物呈现了相似的结果^[29]。泛素蛋白连接酶基因 UBC6 和 UBC13 因为在柴胡各个部位均有表达,可是其表达水平随柴胡不同生长时期和不同器官差异而表现并不稳定,因此不适合作为内参基因。此外,因为算法及取样部位的差异,18 个候选内参基因的稳定性排名也有所不同,如泛素蛋白连接酶基因 UBC13 在北柴胡的花中同样呈现较高的稳定性,其他不稳定的 5 个内参基因也表现出相似结果。

本研究结果再一次验证绝对表达稳定的内参基因是不存在的,因此,为了获得更可靠表达结果,研究特异物种时应用不同的软件评估筛选较为稳定的内参基因非常必要。在筛选内参基因过程中,最

好选择多个具有不同生物学功能及途径的内参基因。总之, ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b 和 ACT2, 可以作为北柴胡皂苷相关实验中首选的内参基因, 且在使用过程中仍需要 Bestkeeper、NormFinder 和 GeNorm 软件共同分析。本研究结果有助于更好地了解北柴胡皂苷合成过程中相关基因的表达及调控。

参考文献

- [1] Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, *et al.* The real-time polymerase chain reaction [J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(2): 95-125.
- [2] Josefsen K, Nielsen H. Northern blotting analysis [J]. *RNA: Meth Protoc*, 2011, 703: 87-105.
- [3] Lang V, Usadel B, Obermeyer G. De novo sequencing and analysis of the lily pollen transcriptome: an open access data source for an orphan plant species [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 87(1/2): 69-80.
- [4] Le M Q, Pagter M, Hinch D K. Global changes in gene expression, assayed by microarray hybridization and quantitative RT-PCR, during acclimation of three *Arabidopsis thaliana* accessions to sub-zero temperatures after cold acclimation [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 87(1/2): 1-15.
- [5] 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): 1-12.
- [6] Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [7] Huggett J, Dheda K, Bustin S, *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes Immunol*, 2005, 6(4): 279-284.
- [8] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits [J]. *J Biotechnol*, 1999, 75(2): 291-295.
- [9] Daud II, Scott M E. Validation of reference genes in cervical cell samples from human papillomavirus-infected and-uninfected women for quantitative reverse transcription-PCR assays [J]. *Clin Vacc Immunol*, 2008, 15(9): 1369-1373.
- [10] Frericks M, Esser C. A toolbox of novel murine house-keeping genes identified by meta-analysis of large scale gene expression profiles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779 (12): 830-837.
- [11] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169-193.
- [12] Goidin D, Mamessier A, Staquet M J, *et al.* Ribosomal 18 S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations [J]. *Anal Biochem*, 2001, 295(1): 17-21.
- [13] Kim S, Kim T. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease [J]. *Biotechniques*, 2003, 35(3): 456-458.
- [14] Lossos I S, Czerwinski D K, Wechsler M A, *et al.* Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies [J]. *Leukemia*, 2003, 17(4): 789-795.
- [15] Mitter K, Kotoulas G, Magoulas A, *et al.* Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 153(4): 340-347.
- [16] Ling H, Wu Q, Guo J, *et al.* Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97469.
- [17] Chan P L, Rose R J, Abdul M A, *et al.* Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in oil palm elite planting materials propagated by tissue culture [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99774.
- [18] Galeano E, Vasconcelos T S, Ramiro D A, *et al.* Identification and validation of quantitative real-time reverse transcription PCR reference genes for gene expression analysis in teak (*Tectonagrandis* L. f.) [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1): 464.
- [19] Long X Y, Wang J R, Ouellet T, *et al.* Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(3): 307-311.
- [20] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [21] 杨 柳, 王雪莹, 刘 畅, 等. 北柴胡化学成分与药理作用的研究进展 [J]. *中医药信息*, 2012, 29(3): 143-145.
- [22] 徐献海, 张 雪, 杨 亮. 论柴胡的产地来源及药理作用 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2012, 34(4): 18-20.

- [23] World Health Organization (WHO). *Medicinal Plants in China: A Selection of 150 Commonly Used Species* [M]. Mamila: World Health Organization, 1997.
- [24] World Health Organization (WHO). *Medicinal Plants in the Republic of Korea: Information on 150 Commonly Used Medicinal Plants* [M]. Mamila: World Health Organization, 1998.
- [25] Ashour M L, Wink M. Genus *Bupleurum*: A review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(3): 305-321.
- [26] Tang C, Huang D, Yang J, *et al.* The sucrose transporter *HbSUT3* plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(10): 1708-1720.
- [27] Dusotoit C A, Kongsawadworakul P, Maurousset L, *et al.* Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (*HbSUT_{1B}*) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Tree Physiol*, 2010, 30(12): 1586-1598.
- [28] 徐 杰, 高水平, 张文婷, 等. 芍药 Actin 基因在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1661-1665.
- [29] Duan C, Rio M, Leclercq J, *et al.* Gene expression pattern in response to wounding, methyl jasmonate and ethylene in the bark of *Hevea brasiliensis* [J]. *Tree Physiol*, 2010, 30(10): 1349-1359.
- [30] 侯双利, 韩 梅, 刘翠晶, 等. 人参 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2530-2533.
- [31] Xu J H, Qin Z H, Liao Y S, *et al.* Characterization and expression of an actin-depolymerizing factor from *Eimeria tenella* [J]. *Parasitol Res*, 2008, 103(2): 263-270.
- [32] Robledo D, Hernandez U J, Cal R M, *et al.* Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 648.