

• 药材与资源 •

狭叶柴胡内参基因筛选及皂苷合成关键酶基因组织表达分析

杨林林, 孙 卓, 杨利民*, 韩 梅

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘 要: **目的** 筛选适宜狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* 组织表达分析的内参基因, 分析柴胡皂苷合成关键酶基因的组织表达模式。 **方法** 选取 Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α 5 个常用的内参基因作为候选, 分别使用 Delta CT、BestKeeper、NormFinder、geNorm 软件对各候选内参基因的稳定性进行评价, 并对候选内参基因的稳定性进行验证, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 以筛选得到的内参基因分析狭叶柴胡根、茎、叶、果中柴胡皂苷合成关键酶基因 HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 基因的组织表达模式。 **结果** 候选内参基因平均表达稳定性由高到低排序为 β -tubulin > Cyclophilin > Actin > EF-1 α > α -tubulin, β -tubulin 是狭叶柴胡基因组织表达分析的适宜内参基因。HMGR 基因表达量由高到低为根 > 茎/果 > 叶, IPPI 基因表达量由高到低为根 > 茎 > 果 > 叶, FPS 基因表达量由高到低为叶 > 根 > 茎 > 果, SS 基因表达量由高到低为叶 > 果 > 根 > 茎, β -AS 基因表达量高低为叶 > 根 > 果 > 茎, 其中 HMGR 与 IPPI 及 FPS 与 β -AS 基因的表达显著呈正相关 ($P < 0.05$)。 **结论** 筛选得到了狭叶柴胡不同组织基因表达分析的最适内参基因为 β -tubulin, 为狭叶柴胡基因组织表达分析奠定方法学基础。柴胡皂苷合成关键酶基因有不同的组织表达模式, 可能参与调控狭叶柴胡不同组织中柴胡皂苷合成与积累的流向。

关键词: 狭叶柴胡; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; 关键酶基因; 组织表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)15-3651-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.026

Screening of reference genes in *Bupleurum scorzonerifolium* and tissue expression analysis of key enzyme genes

YANG Lin-lin, SUN Zhuo, YANG Li-min, HAN Mei

College of Chinese Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To select suitable reference genes of *Bupleurum scorzonerifolium* for tissue expression analyses, and study the tissue expression characteristics of the key enzyme genes of saikosaponins biosynthesis. **Methods** Five candidate reference genes including Actin, α -tubulin, β -tubulin, Cyclophilin, and EF-1 α were chosen. The stability of these candidate reference genes was investigated by using four softwares (Delta CT, BestKeeper, NormFinder, and GeNorm). The stability of these candidate reference genes was tested and verified by real-time quantitative PCR. Used the stable reference gene, the tissue expression characteristics of the saikosaponins biosynthesis key enzyme genes (HMGR, IPPI, FPS, SS, and β -AS) was analyzed by qRT-PCR. **Results** The average expression stability of the five candidate reference genes from high to low was β -tubulin > Cyclophilin > Actin > EF-1 α > α -tubulin. β -tubulin was the most suitable reference gene for tissue expression analysis in *B. scorzonerifolium*. HMGR expression level was roots > stems and fruits > leaves, IPPI expression level was roots > stems > fruits and leaves, FPS expression level was leaves > roots > stems and fruits, SS expression level was leaves > fruits > roots > stems, β -AS expression level was leaves > roots > fruits > stems. HMGR was significant positive correlated with IPPI, and FPS was significant positive correlated with β -AS ($P < 0.05$). **Conclusion** β -tubulin gene was confirmed as the most suitable reference gene in different tissues of *B. scorzonerifolium*. It provided a methodological basis for the tissue expression analysis on the functional genes of *B. scorzonerifolium*. The expression pattern of five key enzyme genes of saikosaponins biosynthesis in different tissues had obvious differentiation, which might be involved in regulating the flow of saikosaponins synthesis and accumulation in various tissues of *B. scorzonerifolium*.

Key words: *Bupleurum scorzonerifolium* Willd.; reference gene; real-time quantitative PCR; key enzyme genes; tissues expression

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家中药材产业技术体系项目 (CARS-21)

作者简介: 杨林林 (1992—), 男, 博士研究生, 研究方向为植物生态学和分子生物学。E-mail: 731522990@qq.com

*通信作者 杨利民 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源生态与药材质量调控。E-mail: ylmh777@126.com

狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd. 是伞形科柴胡属多年生草本植物^[1]。《中国药典》2015 年版中规定狭叶柴胡的干燥根作为药材柴胡入药,并称之为“南柴胡”^[2]。柴胡是我国大宗药材之一,用于解热、治疗炎症、疟疾、月经不调已有上千年历史^[3]。狭叶柴胡的主要药效成分为柴胡皂苷属于齐墩果烷型三萜皂苷^[4],其中质量分数较高的有柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c 和柴胡皂苷 d。柴胡药材中的柴胡皂苷含量较低,不同产地药材质量差异大,总皂苷含量在 0.34%~4.81%^[5-6],而柴胡地下部分和地上部分中单体柴胡皂苷的含量差异极大,地下部分含量可达地上部分数十倍之多^[7-9]。

随着药用植物分子生物学的深入研究,柴胡皂苷生物合成途径已逐渐明晰,其中调控柴胡皂苷的关键酶基因也已逐渐被挖掘^[10]。3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)是柴胡皂苷合成途径中催化前体物质甲羟戊酸合成的限速酶^[11]。异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI)^[12]、法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPS)^[13]、鲨烯合成酶(squalene synthase, SS)^[14]连续催化异戊烯基焦磷酸、甲基丙烯基焦磷酸酯、法尼基焦磷酸生成角鲨烯,再由 β -香树素合成酶(β -amyrin synthase, β -AS)参与合成了柴胡皂苷前体物质 β -香树素^[15]。HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 基因是柴胡皂苷合成途径上游的重要调控酶基因,因此明确柴胡皂苷合成途径关键酶基因组织表达模式对从分子水平上探讨柴胡皂苷生物合成机制具有重要意义。

实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)具有灵敏度高、定量准确、特异性强等特点,是基因表达分析的重要工具^[16]。qRT-PCR 研究中必须用到内参基因,目前在植物中常选择 18S rRNA、肌动蛋白(Actin)、微管蛋白(Tubulin)、亲环蛋白(Cyclophilin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)等基因作为内参。可靠的内参基因必须满足在特定细胞类型、特殊试验条件下表达稳定的要求,利用 qRT-PCR 技术分析植物不同组织基因表达水平的关键是选择与之契合的内参基因。

本研究以狭叶柴胡根、茎、叶、果为实验材料,选择 5 个常用的内参基因(Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α)作为候选,采用 qRT-PCR 技术,并结合分析工具筛选适宜狭叶柴胡

组织表达分析的内参基因,为狭叶柴胡基因组织表达分析奠定方法学基础。并利用筛选得到的内参基因为参照,分析了柴胡皂苷生物合成途径上游 5 个关键酶基因(HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS)的组织表达模式,探讨了柴胡皂苷合成机制,为进一步研究关键酶基因的表达特征和柴胡皂苷的代谢调控提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

野生狭叶柴胡于 2017 年 9 月 5 日采集自吉林省白城市洮北区平台镇西北方向约 2.71 km(N: 45°74' E: 122°64') 草甸草原,随机采集狭叶柴胡 10 株,经吉林农业大学中药材学院杨利民教授鉴定为狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd.。将采集的新鲜样本置于冰盒中保鲜,带回后小心用净水冲刷泥沙,用滤纸吸干水分后将狭叶柴胡分解为根、茎、叶、果 4 部分,将狭叶柴胡不同组织用灭菌后的小刀切成小块,10 株狭叶柴胡不同组织部位的小块混合均匀后分装于冻存管中,立即置于液氮中速冻,贮存于-80 °C 超低温冷藏箱以用于后续实验。

1.2 试剂与仪器

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、BioTeke super RT Kit cDNA 合成试剂盒购于长春百金公司;DL 2 000 DNA Marker、Ex TaqTM Version 2.0 plus dye、SYBR[®] Premix Ex TaqTM 荧光染料等购于长春海灵科贸有限公司;梯度 PCR 扩增仪(Applied Biosystems, 美国 ProFlexTM 公司);荧光定量 PCR 仪(Mx3000P, 美国 Aligent 公司);超低温冰箱(MDF-382E, 日本 SANYO 公司);微量离心机(Heraeus Fresco 21, 美国 Thermo 公司);核酸/蛋白定量仪(NanoDrop 2000, 美国 Thermo 公司);制冰机(SIM-F140, 日本 SANYO 公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

分别取狭叶柴胡根、茎、叶、果组织样品 50~100 mg 在液氮中研磨成粉,按照总 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取总 RNA,采用 NanoDrop 2000 检测仪测定不同组织总 RNA 浓度。采用 BioTeke super RT Kit cDNA 试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA,于-20 °C 保存备用。

2.2 内参基因及目的基因的引物设计

由于狭叶柴胡内参基因及目的基因相关序列

未见报道, 因此选择狭叶柴胡近缘种设计引物。根据国内外在植物内参基因筛选方面相关文献, 以常用的内参基因为参考, 选择 5 个常用内参基因 Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α 作为候选, 并选择 5 个柴胡皂苷合成途径关键酶

基因 HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 为目的基因, 根据 Sui 等^[5]、Kim 等^[12]已经发表的序列用 primer 5.0 设计引物。内参基因和目的基因特异性引物见表 1。引物由生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 定量 PCR 引物序列
Table 1 Primers sequence of quantitative PCR

基因	NCBI 登录号	序列 (5'→3')	扩增长度/bp
Actin	FJ389747	TGCCCCGATGGTCAAGTTATC (上游); GGATTCCTGCAGCTTCCATTC (下游)	99
α -tubulin	FJ389749	TGTTATGCTCACTTGGCAGC (上游); AGATAGCCTGCCCTCAGACA (下游)	181
β -tubulin	FJ389750	ATGTTTCAGGCGCAAGGCTT (上游); TCTGCAACCGGGTCATTTCAT (下游)	101
Cyclophilin	FJ389751	AATTCAGGACCGGAACAAA (上游); CACTACCTGCCCAAACACCA (下游)	96
EF-1 α	FJ389748	GAAGGTGACAACATGATTGAGAGG (上游); TGAAGAGGGAGACGAAGAGGTT (下游)	128
HMGR	EU400217	TATAACTGGCGATGTGGTGAAG (上游); GTGGCTATGAAGATTGCAGAAAC (下游)	159
IPPI	GQ433719	AGGTGACATTCCCTTTGGTG (上游); AGAAGCTTCCTCTGTGCAGC (下游)	118
FPS	HQ123429	CTCACACACGCAGAGGTCAA (上游); TGGGGATATGGTTGCGAAG (下游)	96
SS	GQ889266	GATCCTGCCAATTTCCG (上游); CACGCCTCATTTTCACTACTC (下游)	112
β -AS	EU400220	ATGGTATGGGAAGTGGGGTGT (上游); ACGCCTTTACGAATGCTTTGA (下游)	111

2.3 内参基因及目的基因引物 PCR 产物检测

以狭叶柴胡根组织 cDNA 为模板, 分别对狭叶柴胡候选内参基因 (Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α) 及目的基因 (HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS) 片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 灭菌水 7.4 μ L, Ex TaqTM Version 2.0 plus dye 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 总计 20 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s); 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取 5 μ L 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳上检测。

2.4 qRT-PCR 检测

本实验在 Aligent Mx3000P 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系: 灭菌水 7.5 μ L, SYBR[®] Premix ex TaqTM 10 μ L, 引物各 0.5 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 总计 20 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 45 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 在延伸阶段检测荧光强度)。每个处理设置 3 个重复, 并以 ddH₂O 代替模板设置阴性对照。在 PCR 反应结束后进行熔解曲线分析, 以排除非特异性扩增产物和引物二聚体对实验结果的影响。

2.5 标准曲线的绘制

以狭叶柴胡根组织 cDNA 作为模板, 采用筛选

好的条件进行 qRT-PCR, 以 4 倍系列稀释狭叶柴胡根组织 cDNA 的 C_t 值作为纵坐标, 以狭叶柴胡根组织 cDNA 的拷贝数作为横坐标在 MxPro 软件中绘制狭叶柴胡候选内参基因 (Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α) 及目的基因 (HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS) 相对定量标准曲线, 并计算各基因的扩增效率, 当扩增效率在 90%~105% 时, 才能进行下一步数据分析^[17-18]。

2.6 内参基因稳定性评价

对各候选内参基因在狭叶柴胡根、茎、叶、果样品中 C_t 值比较分析, 得出各候选内参基因在不同样品中 C_t 值分布范围, 各内参基因在不同组织中的 C_t 值变化反映了各候选内参基因在不同组织中的相对表达量。在各候选内参基因在不同组织中表达丰度的基础上, 使用 Delta CT^[19]、BestKeeper^[20]、NormFinder^[21]、geNorm^[22] 软件对各候选内参基因的稳定性进行评价, 并使用 RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php>) 在线评估内参基因稳定性工具综合分析 4 个软件的结果, 从而筛选出最适合狭叶柴胡不同组织中基因表达分析的内参基因。

2.7 不同组织中内参基因表达稳定性验证

以狭叶柴胡 HMGR 基因作为目的基因, 用于验证候选内参基因的稳定性, 分别以狭叶柴胡根、茎、叶、果组织为 cDNA 为模板, 用 5 个候选内参

基因进行校准, 分析 HMGR 基因在不同组织中的相对表达量, 反应重复 3 次, 荧光定量 PCR 反应体系及反应程序参照“2.4”项方法。最终确定狭叶柴胡不同组织中基因表达分析的最适内参基因。

2.8 柴胡皂苷合成关键酶基因表达量测定

以狭叶柴胡根、茎、叶、果组织 cDNA 为模板, 根据表 1 中各目的基因的引物序列, 分别对狭叶柴胡 HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 基因进行荧光定量 PCR 扩增, 反应重复 3 次。荧光定量 PCR 反应体系及反应程序参照“2.4”项方法, 以筛选到的狭叶柴胡 β -tubulin 基因为内参, 不同组织中的表达量以狭叶柴胡根中表达量为对照。

2.9 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算狭叶柴胡不同组织部位中柴胡皂苷合成关键酶基因表达量, 使用 Excel 2016 分析数据并作图, 利用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析和 Pearson 相关性分析。

3 结果与分析

3.1 狭叶柴胡总 RNA 提取结果

将狭叶柴胡根、茎、叶、果组织总 RNA 进行浓度和纯度检测, 总 RNA A_{260}/A_{280} 值在 1.80~2.10, 质量浓度在 212~1 948 ng/ μ L, 总 RNA 的质量较高, 可用于下一步实验。

3.2 内参基因与目的基因 PCR 产物检测

狭叶柴胡候选内参基因 (Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α) 及目的基因 (HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS) 片段的 PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳上检测结果见图 1, 扩增条带单一、没有杂带, 显示 PCR 扩增反应有较高的专一性, 说明各基因引物具有较高特异性, 可用于下一步实验。

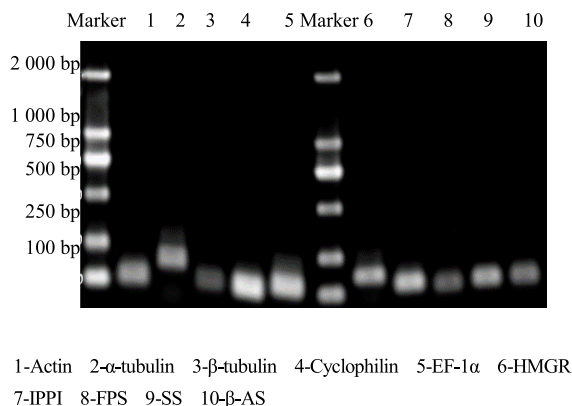


图 1 狭叶柴胡内参基因和目的基因引物可用性检测

Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis of PCR products of five reference genes and five target genes

3.3 内参基因与目的基因 qRT-PCR 熔解曲线分析

内参基因与目的基因 qRT-PCR 熔解曲线分析结果见图 2, 狭叶柴胡候选内参基因 Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α 熔解温度 (T_m) 在 83.34、85.28、82.84、82.92、83.83 $^{\circ}$ C 处显示特异性单峰; 狭叶柴胡 HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 基因片段 T_m 值分别在 84.78、83.84、82.92、80.96、81.97 $^{\circ}$ C 处显示特异性单峰。各个基因 qRT-PCR 熔解曲线分析均没有形成杂峰, 说明扩增产物的特异性较高, 不存在引物二聚体。

3.4 内参基因与目的基因 qRT-PCR 标准曲线的建立

狭叶柴胡内参基因与目的基因 qRT-PCR 标准曲线、扩增效率见表 2, 获得的扩增曲线比较平滑, 有明显的指数扩增期, 各基因标准曲线方程斜率在 $-3.087 \sim -3.423$, r^2 均 > 0.995 , 符合线性方程计算的要求。扩增效率在 95.9%~104.8%, 处于合理范围, 表明 qRT-PCR 检测基因表达量的方法具有较好的重复性和准确性。

3.5 内参基因 qRT-PCR 表达分析

qRT-PCR 表达分析各候选内参基因在狭叶柴胡根、茎、叶、果中表达 C_t 值如图 3 所示, C_t 值的大小反映了对应基因的表达丰度高低。在不同组织中 C_t 值波动最大的是 α -tubulin, 其 C_t 值范围在 21.41~25.89, 所有候选基因中 α -tubulin 最不稳定; 其次是 EF-1 α 基因, 其 C_t 值范围在 19.70~23.46, 虽然 EF-1 α 在不同组织中 C_t 值较低, 但浮动范围较大, 并不是符合本实验要求的内参基因。在不同组织中表达较为稳定的基因是 β -tubulin、Cyclophilin 和 Actin, 它们的 C_t 值波动范围较小, β -tubulin 基因的 C_t 值集中在 24.31~26.84, Cyclophilin 基因的 C_t 值集中在 19.21~21.82, Actin 基因的 C_t 值集中在 22.56~25.68, 其中 Cyclophilin 基因的 C_t 值最小, β -tubulin 和 Actin 基因 C_t 值高于 Cyclophilin 基因。还应进行各候选内参基因的稳定性评价及验证, 以确定狭叶柴胡不同组织中相对定量分析的最适内参基因。

3.6 内参基因稳定性评价

分别使用 Delta CT、BestKeeper、NormFinder、geNorm 软件对各候选内参基因的稳定性进行评价, 并使用 RefFinder 综合评价 4 个软件的分析结果, 狭叶柴胡根、茎、叶、果中候选内参基因的表达稳定性评价结果显示, Delta CT、NormFinder 分析表明 β -tubulin 是最稳定的内参基因, Actin 和 EF-1 α

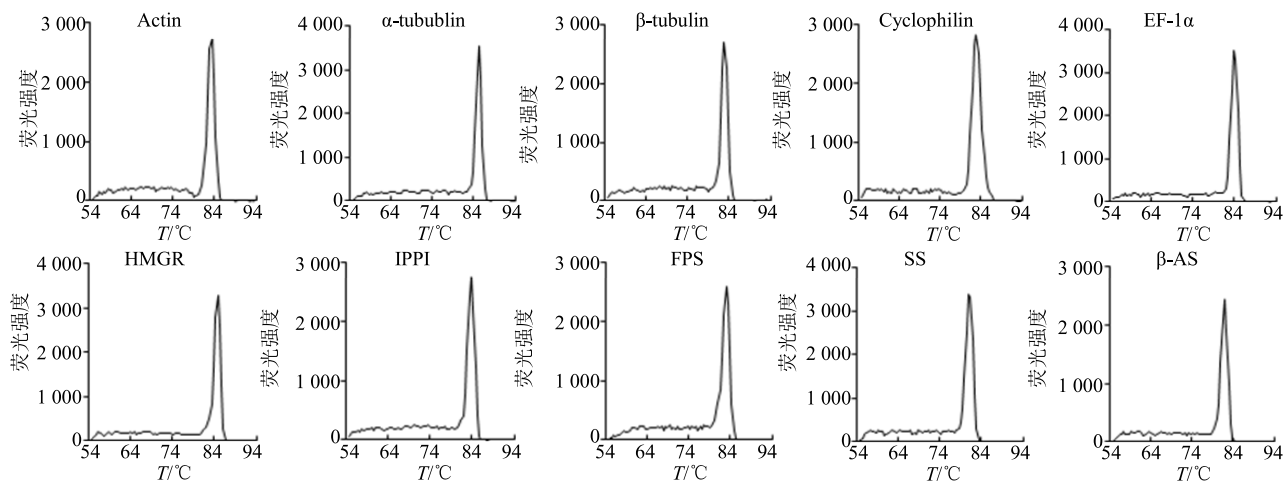


图 2 内参基因和目的基因的溶解曲线

Fig. 2 Melting curves of five reference genes and five target genes

表 2 内参基因与目的基因 qRT-PCR 标准曲线

Table 2 qRT-PCR standard curve of reference genes and target genes

基因	标准曲线方程	r^2	扩增效率/%
Actin	$Y = -3.382 \log X + 55.03$	0.996	97.6
α -tubulin	$Y = -3.368 \log X + 50.04$	0.999	98.1
β -tubulin	$Y = -3.333 \log X + 53.34$	0.997	99.5
Cyclophilin	$Y = -3.110 \log X + 45.44$	0.999	103.8
EF-1 α	$Y = -3.115 \log X + 45.89$	0.999	104.6
HMGR	$Y = -3.423 \log X + 35.79$	0.995	95.9
IPPI	$Y = -3.360 \log X + 35.94$	0.999	98.4
FPS	$Y = -3.230 \log X + 37.65$	0.997	104.0
SS	$Y = -3.211 \log X + 37.23$	0.998	104.8
β -AS	$Y = -3.087 \log X + 57.61$	0.998	102.8

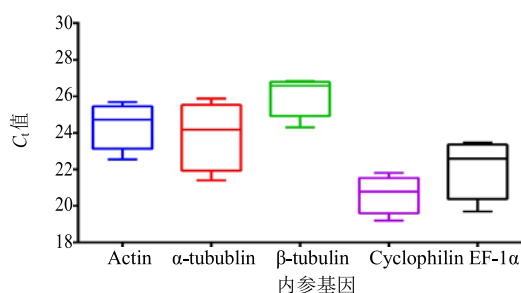


图 3 各内参基因的平均 C_t 值

Fig. 3 Median C_t values for five reference genes

基因是较稳定的内参基因；BestKeeper 分析表明 Cyclophilin 基因是最稳定的内参基因， β -tubulin 和 Actin 比较稳定；geNorm 分析表明 Actin 和 Cyclophilin 是最稳定的内参基因，其次是 β -tubulin 基因；4 个软件分析结果均显示 α -tubulin 基因在狭叶柴胡不同组织中作为内参最不稳定。4 个软件的分析结果并不完全一致，可能是由于其评分计算方法差异，因此需要使用 RefFinder 对 4

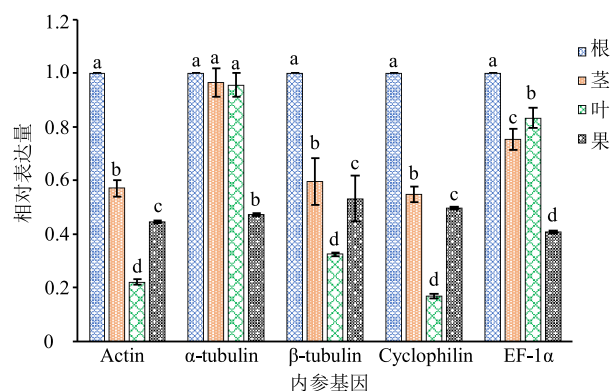
个软件的分析结果进行综合评价。RefFinder 综合评价排名为 β -tubulin > Cyclophilin > Actin > EF-1 α > α -tubulin，下一步对候选内参基因稳定性进行验证，以最终确认适宜狭叶柴胡不同组织基因表达分析的内参基因。

3.7 不同组织中内参基因表达稳定性验证

以狭叶柴胡不同组织为材料，分别用不同内参基因(Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α)分析目的基因 HMGR 在不同组织中的表达量，结果如图 4 所示。分别采用稳定性较好的内参基因(Actin、 β -tubulin、Cyclophilin)对目的基因 HMGR 进行校准时，HMGR 基因在不同组织部位中的表达有相似趋势，而稳定性较差的内参基因 α -tubulin 和 EF-1 α 对 HMGR 基因的组织表达差异结果影响较大，HMGR 相对表达量不稳定，与其他内参基因差异显著，不适宜作为狭叶柴胡组织表达分析的内参基因。综合 RefFinder 的评价结果和内参基因表达稳定性验证结果，在该研究中选择狭叶柴胡 β -tubulin 基因用于下一步柴胡皂苷合成关键酶基因的组织表达分析。

3.8 柴胡皂苷合成关键酶基因组织表达分析

采用 qRT-PCR 的方法，以筛选得到的狭叶柴胡 β -tubulin 基因作为内参，检测狭叶柴胡根、茎、叶、果组织中参与柴胡皂苷合成的上游关键酶基因 HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS 的相对表达量，结果见图 5。HMGR 基因在根中的表达量显著高于其他组织，其次是茎和果，在叶中的表达量较低，根中表达量是叶的 3 倍；IPPI 基因的组织表达模式与 HMGR 基因相似，相关性分析结果表明 IPPI 与



小写字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Same letter indicates that difference is not significant ($P > 0.05$); Different letters indicate significant differences, same as blow ($P < 0.05$)

图 4 以不同内参基因校准分析 HMGR 在不同组织中的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Relative quantification analysis of HMGR in various tissues using different genes as internal controls ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

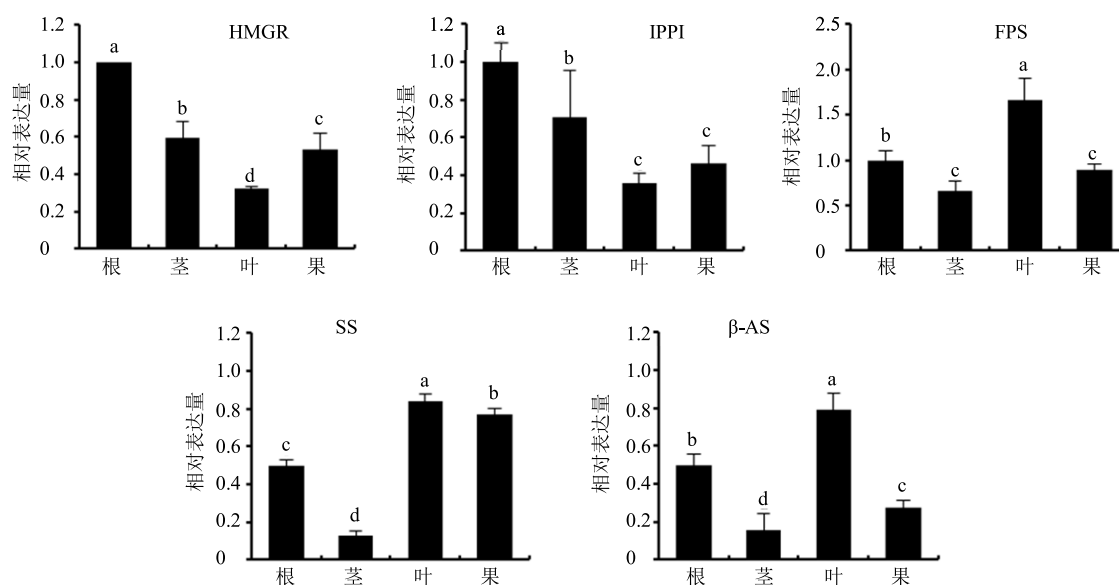


图 5 关键酶基因 qRT-PCR 表达分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Expression analysis of key enzyme genes by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

不同组织中筛选了 7 个常用的内参基因, 结果得出 β -tubulin 是最适宜北柴胡不同组织表达分析的内参基因; 余马等^[27]从北柴胡新品种“川北柴 1 号”中挖掘得到 5 个最适内参基因(ADF1b、ADF5、ADF7、eIF2b、ACT2), 多个内参基因的分离与鉴定增加了荧光定量结果的精准性。但在狭叶柴胡中的研究多集中于药效成分含量分析, 对于适宜狭叶柴胡中组织表达分析的内参基因尚未见报道, 无疑阻碍了其

HMGR 显著正相关 ($P < 0.05$), 说明 IPPI 与 HMGR 可能在参与柴胡皂苷生物合成途径有相同的作用机制; FPS 基因与 β -AS 基因在不同组织中相对表达量为叶 > 根 > 果 > 茎, 且呈显著正相关 ($P < 0.05$) 的关系, FPS 基因与 β -AS 基因可能协同作用参与柴胡皂苷生物合成的调控; SS 基因主要在叶、果和根中表达, 在茎中表达量较低, 仅为根的 1/4。狭叶柴胡中柴胡皂苷合成途径上游的各个关键酶基因自有其组织表达模式, 在不同组织中均有稳定表达, 可参与调控狭叶柴胡中柴胡皂苷的合成与积累。

4 讨论

qRT-PCR 因其灵敏度高、定量准确、特异性强等特点成为研究基因表达水平的重要工具, 国内外学者大量研究表明适宜的内参基因和精确的数据标准化是分析基因表达的先决条件^[23-25], 从常用的内参基因中筛选合适的内参为对照可准确分析狭叶柴胡基因的组织表达情况。目前关于柴胡属植物内参基因筛选工作少见报道, Dong 等^[26]在北柴胡

药效成分生物合成机制研究, 相关研究的滞后不利于狭叶柴胡资源的合理开发与利用。本研究以 5 个常用的内参基因 (Actin、 α -tubulin、 β -tubulin、Cyclophilin、EF-1 α) 为研究对象, 结果分析表明 β -tubulin 基因在分析狭叶柴胡基因组织表达中最为稳定、可靠, 这与 Dong 等^[26]的研究有相似结果。 β -tubulin 参与生命体的基本活动, 对于保持细胞形状、运动、胞内物质运输起到了不可或缺的作用^[28]。

β -tubulin 基因在狭叶柴胡根、茎、叶、果中表达丰度相近 (C_t 值在 24.31~26.84), 相较于其他 4 个候选内参基因 β -tubulin 更为稳定, 稳定性验证结果也显示 β -tubulin、Actin、Cyclophilin 这 3 个较为适宜的内参基因, 其对于目的基因表达的校准结果更为一致, 因此综合 4 个软件分析结果及 RefFinder 评价排序以及内参基因的稳定性验证, 本实验选择 β -tubulin 基因作为分析狭叶柴胡组织表达的内参。

柴胡皂苷是药材柴胡的主要药效成分, 作为次生代谢产物受到植物体内多种关键酶基因表达的调控, 目前对于柴胡属植物中柴胡皂苷代谢途径关键酶基因还处于发掘阶段, 已获得全长并得到功能验证的基因较少。Kim 等^[12]从三岛柴胡 *B. falcatum* L. 毛状根中克隆了 HMGR、IPPI、FPS、SS、OSC 基因核心片段, 随着毛状根的生长 5 个基因表达量不断上调, 发现 HMGR、IPPI、FPS、SS、OSC 基因对柴胡皂苷生物合成过程中起调节作用。董乐萌等^[29]最先从北柴胡 *B. chinense* DC. 幼嫩的根组织中克隆了 HMGR、IPPI 和 FPS 基因的核心片段, 大小分别为 470、532、466 bp。隋春等^[30-31]分别克隆了北柴胡 IPPI 和 SS 基因全长, 推进了柴胡中柴胡皂苷合成关键酶基因功能的研究。qRT-PCR 技术用于分析关键酶基因表达不需要得到基因全长, 仅需几百碱基核心片段即可, 因此利用 qRT-PCR 技术分析狭叶柴胡中关键酶基因表达具有操作简便、快速等优势。Dong 等^[26]分析了北柴胡不同组织中 (HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS) 基因的表达, 5 个基因在各个组织中有不同的表达模式, 其中催化柴胡皂苷重要前体物质 β -香树素合成的 β -AS 基因在根中表达量远高于其他部位, 这可能是造成柴胡皂苷在根中积累较多的原因之一。张宇等^[32]发现干旱胁迫显著提高北柴胡苗中柴胡皂苷含量及关键酶基因 (HMGR、IPPI、FPS、 β -AS) 表达量, 并且关键酶基因表达量与皂苷含量间存在显著正相关的关系。在本研究中, 首次分析了狭叶柴胡中参与皂苷合成的 5 个关键酶基因 (HMGR、IPPI、FPS、SS、 β -AS) 的组织表达模式, 各个关键酶基因的组织表达各有差异, 也表现出来了一定的相关性, 其中 IPPI 与 HMGR 及 FPS 与 β -AS 在组织表达模式上显著正相关 ($P < 0.05$), 说明关键酶基因在调控柴胡皂苷的合成与积累过程中存在着协同作用, 多个关键酶之间共同调控了柴胡皂苷的组织分布, 关键酶基因主要在根中表达, 在不同组织中存在着代谢产物 (柴胡皂苷) 的合成与流动, 关键酶基因

则控制着代谢的流向, 不同组织中关键酶基因的差异表达决定了柴胡皂苷的组织差异。因此深入开展狭叶柴胡中参与柴胡皂苷合成的关键酶基因研究, 从分子角度阐释柴胡皂苷形成机制, 是实现柴胡药材质量调控的重要手段。

参考文献

- [1] Kuang H, Sun S, Yang B, *et al.* New megastigmane sesquiterpene and indole alkaloid glucosides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 35-38.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, *et al.* ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416-423.
- [4] 黄涵签, 王潇晗, 付航, 等. 柴胡属药用植物资源研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2989-2996.
- [5] Sui C, Zhang J, Wei J, *et al.* Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genom*, 2011, 12(1): 539.
- [6] 袁伯川, 李文东, 马永生, 等. 柴胡属药用植物的分子鉴定及市售柴胡药材的质量调查 [J]. 药学学报, 2017, 52(1): 162-171.
- [7] Huang H Q, Zhang X, Xu Z X, *et al.* Fast determination of saikosaponins in *Bupleurum* by rapid resolution liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(4): 1048-1055.
- [8] 孟杰, 陈兴福, 杨文钰, 等. 柴胡主根与侧根中柴胡皂苷 a 及皂苷 d 含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1218-1222.
- [9] 谭玲玲, 侯晓敏, 胡正海. 狭叶柴胡营养器官中柴胡皂苷和黄酮类化合物的积累部位及含量比较 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(2): 276-281.
- [10] Lin T Y, Chiou C Y, Chiou S J. Putative genes involved in saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum* species [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 12806-12826.
- [11] Abe I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes [J]. *Nat Prod Rep*, 2007, 24(6): 1311-1331.
- [12] Kim Y S, Cho J H, Ahn J, *et al.* Upregulation of isoprenoid pathway genes during enhanced saikosaponin biosynthesis in the hairy roots of *Bupleurum falcatum* [J]. *Mol Cells*, 2006, 22(3): 269-274.
- [13] Zhao C L, Cui X M, Chen Y P, *et al.* Key enzymes of triterpenoid saponin biosynthesis and the induction of their activities and gene expressions in plants [J]. *Nat*

- Prod Commun*, 2010, 5(7): 1147-1158.
- [14] Sawai S, Saito K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2011, 2: 25.
- [15] 明乾良, 韩 婷, 黄 芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [16] Hong S Y, Seo P J, Yang M S, *et al.* Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8(1): 112-116.
- [17] 杨 苓, 胡晓静, 徐志峰, 等. 桃蛀螟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 昆虫学报, 2017, 60(11): 1266-1277.
- [18] 王世强, 党凯凯, 牛俊峰, 等. 黄精实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4770-4777.
- [19] Silver N, Best S, Jiang J, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7(1): 33-39.
- [20] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best keeper-excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [21] 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.
- [22] Etschmann B, Wilcken B, Stoevesand K, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm[J]. *Veterinary Pathology*, 2006, 43(6): 934-942.
- [23] Tang Q, Ma X, Mo C, *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(1): 343.
- [24] Liu J, Wang Q, Sun M, *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.
- [25] 袁 伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436.
- [26] Dong L M, Sui C, Liu Y, *et al.* Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum chinense* [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 5017-5023.
- [27] 余 马, 刘 丹, 舒晓燕, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3820-3825.
- [28] Bhat K M, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 2849-2854.
- [29] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(5): 56-60.
- [30] 隋 春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1178-1184.
- [31] 隋 春, 魏建和, 战晴晴, 等. 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 283-290.
- [32] 张 宇, 周自云, 夏鹏国, 等. 干旱胁迫对柴胡中皂苷合成关键酶基因表达及皂苷含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 643-647.