

巴戟天实时荧光定量 PCR 内参基因的选择

叶友杰, 谢德金, 杨德明, 黄霞, 陈礼光*, 荣俊冬, 郑郁善

福建农林大学林学院, 福建 福州 350000

摘要: 目的 选择合适的内参基因, 用于巴戟天不同组织和不同处理的叶中目标基因表达量的分析检测。方法 以巴戟天不同组织和不同处理的叶为材料, 根据巴戟天转录组数据, 选择甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP)、微管蛋白 α (tubulin alpha, TUA) 和肌动蛋白(Actin) 基因等 10 个内参基因作为候选基因。利用实时荧光定量技术, 并结合 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件分析内参基因的表达稳定性, 从而筛选出巴戟天不同组织和不同处理叶中表达稳定的内参基因。选择合适的内参基因对巴戟天的 1-脱氧木酮糖-5 磷酸合成酶(DXS) 和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR) 基因在不同组织和不同处理的叶中相对表达量进行分析。结果 内参基因 GAPDH 和泛素(UBQ) 在巴戟天不同组织中表达最稳定, GAPDH+UBQ 的双内参组合能够更加准确地分析目的基因在巴戟天不同组织的相对表达量, 而在不同处理的叶中 GAPDH 和 Actin 表达稳定性最好, 选择 GAPDH+Actin 的双内参组合可以确保目的基因相对分析表达结果的可靠性。在巴戟天不同组织中, DXS 目的基因的相对表达量为根<茎<叶, DXR 的相对表达量为茎<根<叶。在巴戟天不同处理的叶中, DXS 和 DXR 基因的相对表达量相对于未处理的叶(CK) 都有所提高。结论 筛选得到的稳定内参基因为后续巴戟天相关基因表达研究奠定基础, 使用 2 个稳定内参的组合对目的基因进行均一化处理有利于提高目的基因表达分析的准确性。

关键词: 巴戟天; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; 基因表达; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 肌动蛋白

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)04-1060-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.033

Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Morinda officinalis*

YE You-jie, XIE De-jin, YANG De-ming, HUANG Xia, CHEN Li-guang, RONG Jun-dong, ZHENG Yu-shan

College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China

Abstract: Objective To select the appropriate reference genes for calibrating the quantitative real-time PCR detection of gene expression in different tissues and leaves with different treatments of *Morinda officinalis*. **Methods** With different groups and different processing leaves of *M. officinalis* as materials, 10 internal genes, including GAPDH, CYP, TUA, Actin and so on, were selected as candidate genes according to the *M. officinalis* transcriptome data. The expression stability of internal reference genes was analyzed by using real-time fluorescence quantification technique combined with software such as geNorm, NormFinder and BestKeeper, so as to select stable reference genes in different tissues and leaves of *M. officinalis* with different treatments. Finally, appropriate internal reference genes were selected to analyze the relative expression levels of DXS and DXR genes in different tissues and leaves with different treatments. **Results** Internal reference genes GAPDH and UBQ were the most stable in different tissues of *M. officinalis*, the double internal reference combination of GAPDH + UBQ can more accurately analyze the relative expression levels of target genes in different tissues of *M. officinalis*, while the most stable reference genes in leaves with different treatments were GAPDH and Actin; The selection of the double reference combination of GAPDH + Actin can ensure the reliability of the target gene expression results. In different tissues of *M. officinalis*, the relative expression of DXS target gene was in sequence of root < stem < leaf, while the relative expression of DXR was stem < root < leaf. The relative expression levels of DXS and DXR genes in leaves with different treatments were increased compared with those untreated leaves (CK). **Conclusion** The selected stable internal reference genes lay a foundation for the subsequent study on the expression of related genes of *M. officinalis*. Using the combination of two stable internal references to homogenize the target genes is conducive to improving the accuracy of the analysis of the expression of target genes.

Key words: *Morinda officinalis* How; reference gene; real-time quantitative PCR; gene expression; GAPDH; actin

收稿日期: 2019-08-06

基金项目: 福建省科技重大专项资助(2004YZ02-05); 福建省科技创新平台资助(2008Y2001)

作者简介: 叶友杰, 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物栽培与利用方面的研究。E-mail: ab864370458@qq.com

*通信作者 陈礼光, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为从事森林培育、林木种苗研究。E-mail: fjclg@126.com

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 是一种通过在 DNA 扩增过程中利用荧光化学物质结合聚合酶链式反应从而检测产物的绝对或相对定量的方法, 因具有很高的敏感性和特异性, 一直被用于基因分析表达^[1-4]。qRT-PCR 结果的准确性需建立在一定条件的实验要求上, 如样本 RNA 和 cDNA 的纯度、特定引物的扩增效率、参考基因的选择等都会影响实验的结果, 其中合适的内参基因是定量结果准确的重要前提^[5]。内参基因一般选择在植物中稳定表达的基因, 这些基因大多是维持细胞正常生命代谢的管家基因, 例如肌动蛋白 (Actin) 基因、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、18 S 核糖体 rRNA 基因、微管蛋白基因等^[6-9]。

巴戟天 *Morinda officinalis* How 是我国传统四大南药之一, 为双子叶茜草科植物, 主产于广西和广东, 是我国重要的林下经济作物。在该植物中已分离出多种药用成分, 包括蒽醌类、黄酮类、环烯醚萜类和寡糖等^[10]。现代药理研究表明, 巴戟天具有抗炎、抗疲劳、抗衰老、抗氧化、调节免疫和抗病毒等药用活性^[11-13]。关于巴戟天的研究报道主要集中在化学成分、药理作用和成分提取等方面, 但在分子生物学和功能基因组方面的研究基础仍然薄弱, 目前还未见关于巴戟天相关内参基因筛选的研究报道。本研究从巴戟天转录组数据中筛选了 10 个候选内参基因, 包括 GAPDH、细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP)、真核翻译起始因子 (translation initiation factor 2C, eIF)、微管蛋白 β (tubulin beta, TUB)、微管蛋白 α (tubulin alpha, TUA)、泛素缀合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, UBC)、泛素 (ubiquitin, UBQ)、延伸因子 (elongation factor 1 alpha, E1 α)、肌动蛋白基因 (actin)、16 S 核糖体 RNA (16 S rRNA-methyltransferase)。结合 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个内参基因分析软件, 研究在巴戟天不同组织和不同处理的叶中内参基因的表达量和表达稳定性, 旨在找出稳定表达且适用于巴戟天不同实验条件的内参基因, 并且通过不同内参基因的组合, 分析巴戟天不同组织和不同处理的叶中目的基因 1-脱氧木酮糖-5 磷酸合成酶 (DXS) 和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (DXR) 的表达差异, 为后续巴戟天分子生物学研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

将采于福建省南靖县和溪镇的 1~2 年生的健

康巴戟天幼苗栽植于花盆中, 在福建农林大学园林学院温室大棚内培养。经福建农林大学林学院邹小兴教授鉴定为茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda officinalis* How。任意挑选 3 棵生长良好的植株组成 1 个重复, 共 3 组重复, 其中每一组重复内的 3 棵植株的根、茎、叶 3 个组织部位分别取样, 材料采集后立即放入液氮中冷冻, 存放在 -80 °C 冰箱。

1.2 仪器

ThermoFisher 的 Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 系统。

2 方法

2.1 样品处理

低温胁迫在 4 °C 环境下对巴戟天植株进行低温处理; 高温胁迫在 40 °C 环境下对巴戟天进行高温处理, 低温和高温胁迫处理均在 4 h 后取巴戟天叶片, 每个样本 3 个重复。脱落酸 (abscisic acid, ABA) 处理, 用 100 μ mol/L ABA 喷洒巴戟天叶片; 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理, 用 100 μ mol/L MeJA 喷洒巴戟天叶片。经激素处理后, 每隔 24 h 取叶片, 每个处理各取 5 次, 每个样本 3 个重复。

2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

利用 RNAPrep Pure Plant (TIANGEN) 参考试剂盒说明书分别提取巴戟天根、茎、叶和 4 种处理下叶的总 RNA, 所得的总 RNA 用 Nanodrop2000 分光光度计测定其浓度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 后储存于 -80 °C 备用。将提取的巴戟天总 RNA 按照 Prime Script™ RT reagent Kit (TaKaRa 公司) 说明书反转录合成 cDNA 第 1 链, 并将产物于 -80 °C 储存备用。

2.3 引物设计与 qRT-PCR

根据巴戟天转录组数据和 qRT-PCR 引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 设计候选内参基因的定量 PCR 引物 (表 1)。

将反转录合成的 cDNA 第 1 链按 5 倍梯度稀释, 共 5 个质量浓度梯度。使用 ABI 公司的 7500 Real Time PCR System 仪器进行荧光定量检测。扩增体系和反应程序按照 TaKaRa 公司的 TB Green Premix Ex Taq 试剂盒的说明书进行操作, 反应体系为 20 μ L, 其中 TB Green Primermix Ex Taq (2 $\times$) 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 6 μ L ddH₂O, 每个样本 3 次技术重复。扩增程序: 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、34 s, 共 40 个循环; 熔解曲线: 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s。

表 1 候选内参基因的引物设计

Table 1 Primer design of candidate reference genes

内参基因	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp	扩增效率/%	相关系数
GAPDH	正向: GCTGGCATTGCTTTGAATCC 反向: AATCAACCACGCGAGAAGT	85	96.881	0.998
CYP	正向: GACGTTGTTTTCGCAAACCG 反向: TGGGACGACAAGATCTCCAAAG	140	109.318	0.981
eIF	正向: TGCCAATTGTGTCCAAGCTC 反向: AACAACCGCAGCAATCGATG	98	93.752	0.979
TUA	正向: TTGCAAGGGGGCATTATACG 反向: AAAACCTTGCAAGCCAGTGC	98	101.635	0.996
TUB	正向: ACCACTTGATTTCGGCAACC 反向: ATGGGATCAAGTTCACGGCTAG	102	95.959	0.998
UBC	正向: AAGGCCTCCCAAGCATTTTG 反向: TGGAGCACCTCTAAATAAGCC	100	93.152	0.992
UBQ	正向: ACCAGCAACGCCTTATCTTC 反向: TGGATGTTGTAGTCGGCTAGTG	70	99.117	0.997
Ef1 α	正向: ACTTCACAGGCTGATTGTGC 反向: AAGGGTGAAGGCAAGCAAAG	114	97.887	0.998
actin	正向: CATTGTGCTCAGTGGTGGC 反向: AATCTTCATGCTACTCGGGG	95	98.163	0.997
16 S	正向: CTCGCCAAGCAATCAAGTAAA 反向: GCCAAAGACACATCGGAATC	100	92.446	0.956

2.4 数据处理与分析

采用 geNorm^[14]、NormFinder^[15] 和 BestKeeper^[16] 3 个内参基因分析软件对 10 个内参基因的稳定性进行筛选, 综合分析得到最优内参基因及最优组合。用 $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ 法计算不同内参基因组合对巴戟天不同组织和不同处理叶中目的基因 DXS 和 DXR 相对表达量的影响。

3 结果与分析

3.1 引物验证

qRT-PCR 结果显示候选内参基因扩增效率在 92.446%~109.318%, 相关系数在 0.956~0.999 (表 1)。由图 1 可知 10 个候选内参基因的熔解曲线只有单一信号峰, 进一步琼脂凝胶电泳 PCR 产物显示单一条带, 综合说明引物无二聚体且特异性良好。

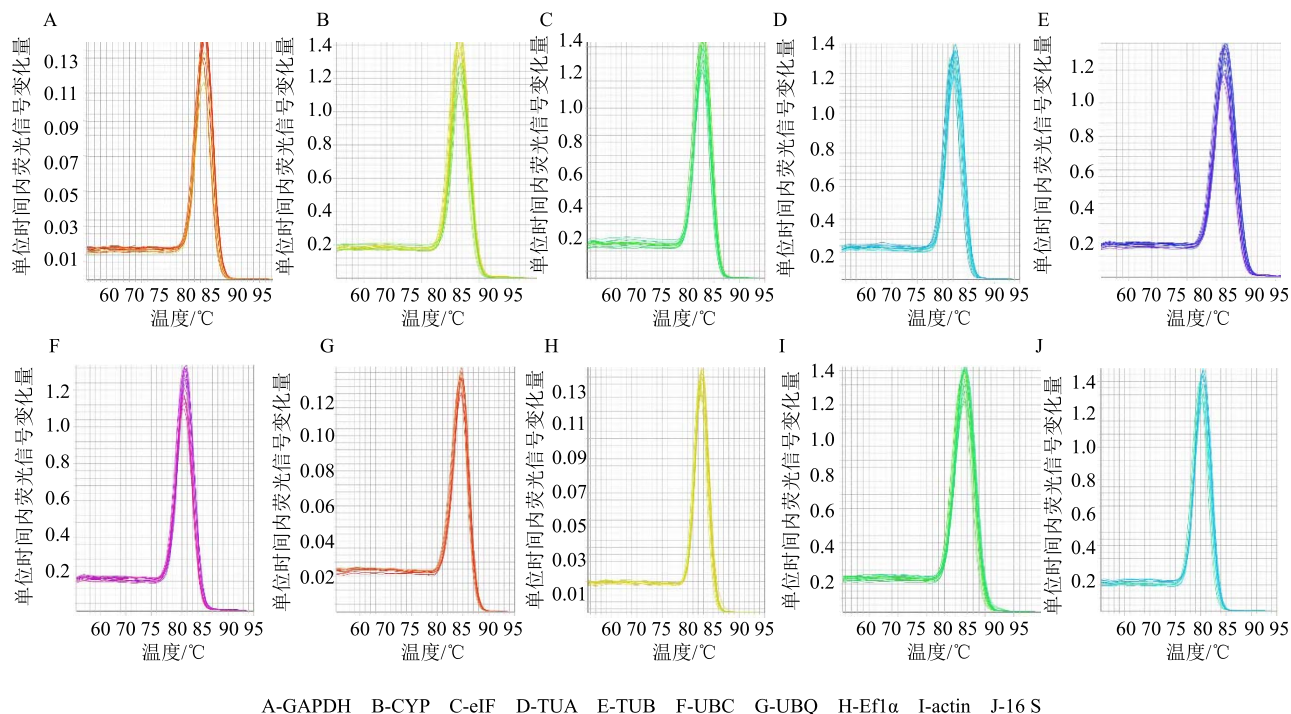


图 1 候选内参基因熔解曲线

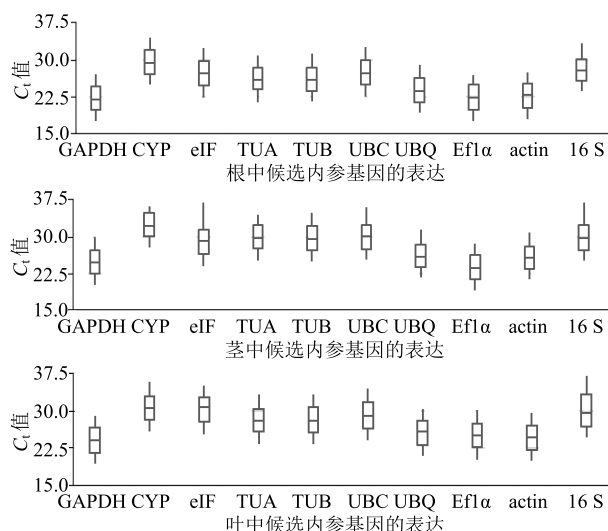
Fig. 1 Melting curve of candidate reference genes

3.2 候选内参基因的稳定性分析

3.2.1 不同组织中内参基因 C_t 值分析 通过 qRT-PCR 获得了 5 个质量浓度梯度下 10 个候选内参基因在不同组织部位的 C_t 值, C_t 值大小与基因的表达丰度呈反比, C_t 值越大, 基因的表达量越低。结果显示, 10 个候选内参基因的平均 C_t 值为 21.95~32.23, 综合 3 个组织部位的平均 C_t 值, GAPDH 是表达量最高的基因 (综合平均 C_t 值为 23.59), CYP 是表达量最低的基因 (综合平均 C_t 值为 30.69)。除了 eIF 和 16 S 在茎中上箱须较长, 其他基因在 3 个部位中均有良好的表达稳定性 (图 2)。

3.2.2 geNorm 分析 使用 geNorm 软件对 10 个候选内参基因在不同实验条件下的表达稳定性进行分析, 通过软件分析得到候选内参基因的平均稳定值 (M), 该值与基因稳定性呈负相关, M 值小于 1.5, 则该内参基因表达稳定。软件分析结果表明, 在巴戟天根、茎、叶和不同处理的叶中, 所有候选内参基因的 M 值均低于 1.5, 说明所有候选内参基因的表达均较稳定。表 2 显示, 在根、茎、叶 3 个组织部位中 GAPDH 的 M 值最低, 分别是 0.230、0.466 和 0.357, 16 S 的 M 值最大, 分别是 0.355、1.098 和 0.982。表 3 显示, CYP 在 ABA 和低温处理的叶中 M 值最大, 分别是 0.605 和 0.616; 在 MeJA 和高温处理中 M 值最大的分别是 16 S (0.902) 和 Efl α (0.636); GAPDH 在 MeJA、低温和高温处理中的 M 值最小, 分别为 0.284、0.312 和 0.325; ABA 处理中 M 值最小的基因是 Efl α (0.320)。

geNorm 软件除了可以得到 M 值外, 也可以通



箱体的上下边分别是 C_t 值中的上四分位数和下四分位数, 箱须的上下边分别是 C_t 值中的最大值和最小值, 箱体中的横线是 C_t 值的中位数

The upper and lower quartiles of the box body are respective the upper and lower quartiles of the C_t value, the upper and lower parts of the box whiskers are respective the maximum and minimum values of the C_t value, and the horizontal line in the box body is the median value of the C_t value

图 2 候选内参基因在不同组织中的 C_t 值

Fig. 2 C_t values of candidate reference genes in different tissues

过候选内参基因标准化因子的配对差异分析 (V_n/V_{n+1}) 得到内参基因的最佳数目。软件默认 $V_n/V_{n+1}=0.15$, 当 $V_n/V_{n+1}<0.15$ 时表明 n 个内参基因已经足够稳定归一化。如图 3 所示, 所有实验条件下 V_2/V_3 均小于 0.15, 所以说明 2 个稳定基因的组合就足够增加定量结果的可靠性。

表 2 geNorm 软件分析不同组织部位内参基因稳定性

Table 2 Reference gene stability of different tissue sites analyzed by geNorm

排序	根		茎		叶	
	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值
1	GAPDH	0.230	GAPDH	0.466	GAPDH	0.357
2	TUB	0.236	UBQ	0.481	CYP	0.785
3	UBQ	0.243	Efl α	0.482	eIF	0.474
4	Efl α	0.246	TUB	0.495	TUA	0.474
5	eIF	0.251	actin	0.516	TUB	0.393
6	actin	0.253	TUA	0.567	UBC	0.431
7	UBC	0.291	UBC	0.703	UBQ	0.391
8	CYP	0.301	CYP	0.847	Efl α	0.390
9	TUA	0.306	eIF	1.095	actin	0.358
10	16 S	0.355	16 S	1.098	16 S	0.982

表 3 geNorm 软件分析不同处理叶中内参基因稳定性

Table 3 Reference gene stability in leaves under different treatments analyzed by geNorm

排序	ABA 处理		MeJA 处理		低温处理		高温处理	
	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值
1	Efl α	0.320	GAPDH	0.284	GAPDH	0.312	GAPDH	0.325
2	UBQ	0.341	Efl α	0.297	TUB	0.338	CYP	0.338
3	actin	0.351	Actin	0.316	Efl α	0.346	UBQ	0.341
4	TUA	0.353	TUB	0.317	UBQ	0.366	TUB	0.350
5	GAPDH	0.380	TUA	0.338	actin	0.366	TUA	0.382
6	eIF	0.462	UBC	0.339	TUA	0.407	eIF	0.386
7	16 S	0.478	UBQ	0.344	UBC	0.479	UBC	0.413
8	UBC	0.502	eIF	0.384	16 S	0.484	16 S	0.537
9	TUB	0.519	CYP	0.448	eIF	0.542	Actin	0.541
10	CYP	0.605	16 S	0.902	CYP	0.616	Efl α	0.636

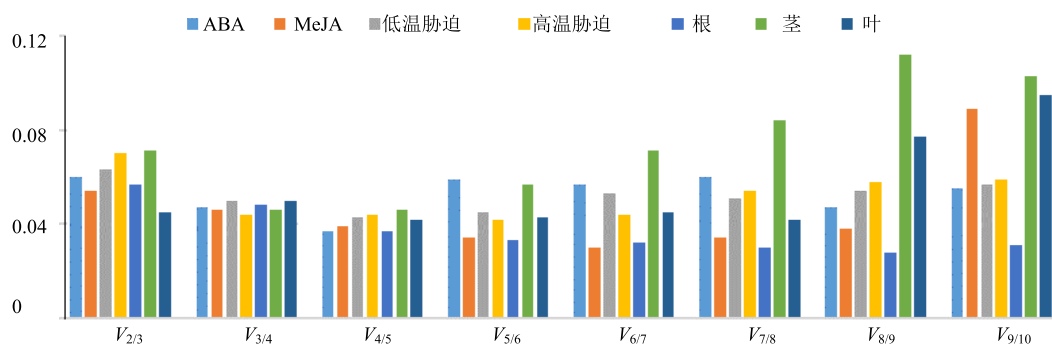


图 3 geNorm 软件分析内参基因最适数目

Fig. 3 Analysis of optimal number of reference genes for normalization by geNorm

3.2.3 NormFinder 分析 利用 NormFinder 软件分析 10 个候选内参基因得到候选内参基因的 M 值, 根据 M 值越低基因表达越稳定的原则对候选内参基因进行比较。软件分析结果表明, 10 个候选内参基因的稳定性排序在不同实验条件下各有不同, 根、茎、叶中表达稳定性最好的基因分别为

GAPDH、UBQ 和 Actin, 16 S 在根和叶中表达稳定性最差, 茎中 eIF 的表达最不稳定 (表 4); MeJA、低温和高温处理中最稳定的基因是 GAPDH, Efl α 是 ABA 处理中稳定性最好的基因, CYP 在 ABA、低温和高温处理中稳定性最差, MeJA 处理中 16 S 的表达稳定性最差 (表 5)。

表 4 NormFinder 分析不同组织中内参基因稳定性

Table 4 Reference gene expression stability value of different tissue sites for normalization by NormFinder

排序	根		茎		叶	
	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值
1	GAPDH	0.085	GAPDH	0.040	actin	0.021
2	TUB	0.097	UBQ	0.040	GAPDH	0.035
3	UBQ	0.101	TUB	0.049	UBQ	0.109
4	eIF	0.106	Efl α	0.065	UBC	0.111
5	Efl α	0.107	atin	0.126	TUB	0.123
6	actin	0.115	TUA	0.202	Efl α	0.126
7	UBC	0.155	UBC	0.358	eIF	0.200
8	CYP	0.163	CYP	0.503	TUA	0.245
9	TUA	0.169	16 S	0.703	CYP	0.499
10	16 S	0.213	eIF	0.710	16 S	0.654

表 5 NormFinder 分析不同处理叶中内参基因稳定性

Table 5 Reference gene stability in leaves under different treatments analyzed by NormFinder

排序	ABA 处理		MeJA 处理		低温处理		高温处理	
	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值	内参基因	M 值
1	Eflα	0.043	GAPDH	0.042	GAPDH	0.060	GAPDH	0.059
2	UBQ	0.097	TUB	0.049	Eflα	0.098	actin	0.101
3	TUA	0.118	Eflα	0.075	TUB	0.101	TUA	0.114
4	actin	0.126	actin	0.102	Actin	0.134	UBQ	0.122
5	GAPDH	0.171	TUA	0.121	UBQ	0.145	TUB	0.161
6	eIF	0.251	UBQ	0.132	TUA	0.199	Eflα	0.183
7	16 S	0.254	UBC	0.150	UBC	0.264	UBC	0.190
8	UBC	0.281	eIF	0.184	16 S	0.275	eIF	0.319
9	TUB	0.311	CYP	0.255	eIF	0.320	16 S	0.330
10	CYP	0.374	16 S	0.612	CYP	0.388	CYP	0.402

3.2.4 BestKeeper 分析 BestKeeper 软件可以通过计算每个基因之间产生配对的标准偏差 (SD)、变异系数 (CV) 和相关系数变量 (r) 来评价内参基因的表达稳定性。表达稳定性好的基因一般呈现较高的 r 值、较小的 SD 和 CV。此外, 当 SD 值大于 1 时则表明基因的表达不稳定。结果显示, 在不同组织部位中 GAPDH 和 UBQ 的 r 最大 ($r=0.997$), 但 UBQ 的 SD 值和 CV 值均小于 GAPDH, 所以 UBQ 的表达最稳定 (表 6); 在不同处理的叶中, actin 的相关系数最大 ($r=0.987$) 且 SD 值小于 1, 说明 atin 表达最稳定 (表 7)。

3.3 内参基因稳定性的验证

利用 DXS 和 DXR 这 2 个基因进一步验证筛选得到的内参基因的稳定性。综合 3 种定量分析软件

表 6 BestKeeper 分析不同组织部位内参基因表达稳定性
Table 6 Reference gene stability of different tissue sites analyzed by BestKeeper

内参基因	SD	CV/%	r	P 值
GAPDH	0.986	5.172	0.997	0.001
CYP	1.109	4.228	0.905	0.001
eIF	0.962	4.015	0.778	0.013
TUA	1.298	5.567	0.972	0.001
TUB	1.185	5.067	0.978	0.001
UBC	0.994	4.131	0.987	0.001
UBQ	0.864	4.177	0.997	0.001
Eflα	0.856	4.506	0.721	0.029
actin	1.228	6.206	0.986	0.001
16 S	0.818	3.356	0.988	0.001

表 7 BestKeeper 分析不同处理下内参基因表达稳定性

Table 7 Reference gene stability under different treatments analyzed by BestKeeper

内参基因	SD	CV/%	r	P 值
GAPDH	0.479	2.367	0.957	0.001
CYP	0.475	1.809	0.176	0.581
eIF	0.540	2.148	0.953	0.001
TUA	0.431	1.839	0.978	0.001
TUB	1.065	4.553	0.923	0.001
UBC	0.496	2.056	0.896	0.001
UBQ	0.334	1.575	0.566	0.055
Eflα	0.587	2.954	0.986	0.001
actin	0.587	2.814	0.987	0.001
16 S	0.691	2.638	0.956	0.001

的结果, 选取 2 个稳定性较好的候选内参基因 (GAPDH 和 UBQ) 来分析目的基因在不同组织中的表达, 同时选取一个稳定性较差的内参基因 16 S 作为对照。选取 2 个稳定性较好的候选内参基因 (GAPDH 和 Actin) 来分析目的基因在不同处理的叶中的表达, 同时选取一个稳定性较差的内参基因 CYP 作为对照。

DXS 和 DXR 是丙酮酸/磷酸甘油醛 (DXP) 途径的关键酶, 在植物萜类次生代谢物质的合成中发挥重要作用^[17-18]。研究表明, DXP 途径主要发生在质体中^[19], DXS 和 DXR 基因在植物的叶、花和果实中表达量较高^[20-21]。如图 4 所示, 根据 2 个稳定性较好的内参基因进行相对表达量的量化, DXS 在叶中表达量最高, 根中表达量最低; DXR 在叶中表

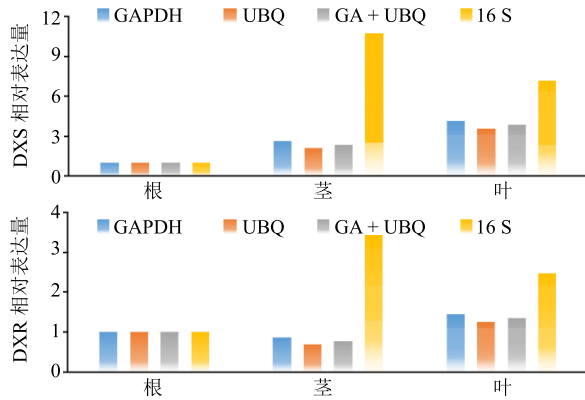


图 4 DXS 和 DXR 在巴戟天不同组织中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis for DXS and DXR in different tissues of *M. officinalis*

达量最高, 茎中表达量最低。同时, 以 GAPDH 和 UBQ 的组合进行数据标准化, 目的基因显示出一致的相对表达水平, 进一步表明了这 2 个内参基因的可靠性。此外, 分析结果也表明了稳定性较差的内参基因 16 S 过高的估计了 DXS 和 DXR 的表达水平。

有研究表明 DXS 和 DXR 基因的表达受到光、激素、温度、昼夜节律和发育程度等因素的调控^[22-23]。本实验利用筛选出的稳定内参分析了 ABA、MeJA、低温和高温对巴戟天叶片中 DXS 和 DXR 表达的影响。如图 5 所示, 3 个基因 (GAPDH、Actin 和 CYP) 量化出的目的基因表达量各不相同。但 GAPDH 和 Actin 得到的目的基因表达显示出了类似的趋势, 为了使结果更加可靠, 根据 geNorm 软件给出的内参基因最适数目, 使用 GAPDH 和 Actin 的内参组合精确目的基因的表达结果。结果显示, 相比于未处理的 CK 组, 4 种处理中的 DXS 和 DXR 都提高

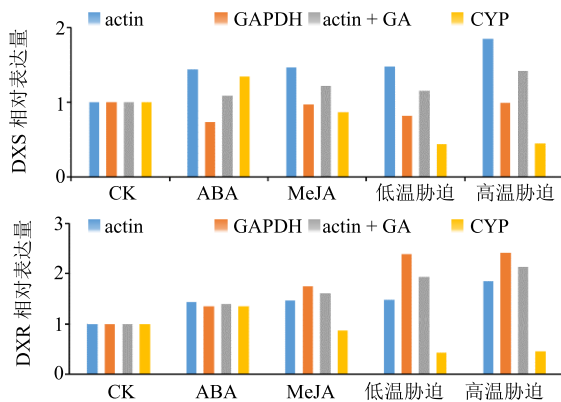


图 5 DXS 和 DXR 在不同处理的巴戟天叶片中的表达分析
Fig. 5 Expression analysis for DXS and DXR under different treatments in leaves of *M. officinalis*

了表达量。此外, 稳定性较差的 CYP 得到的目的基因表达趋势与其他基因差距较大, 表明不稳定的内参不能有效地标准化表达数据。

4 讨论

基因表达分析是了解生物调控机制的重要方法。为了获得高质量的数据, 应该特别注意挑选表达稳定的内参基因^[24]。理想的内参基因应该能在所有组织中表达且不受内外因素影响, 然而实际情况中不同的组织部位和处理条件都会影响内参基因的表达^[25-26]。由于客观因素的限制, 通常选择传统的管家基因作为内参基因。管家基因作为维持细胞基本生命活动的基因, 在进化过程中具有一定的保守性, 所以一般在细胞内能维持稳定的表达水平。例如, Actin、TUB 和 TUA 影响细胞骨架基本成分的合成^[27]; GAPDH 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 是糖酵解的关键酶, 具有修复 DNA、调节组蛋白、促进细胞凋亡等多种功能^[28]。由于管家基因的稳定表达, 在多种植物研究中报道了使用管家基因作为内参基因, Actin 在辣椒和萝卜的不同组织部位中均能稳定表达^[29-30]; GAPDH 在大白菜花芽发育过程中表达稳定^[31]; TUB 是异子蓬在不同发育阶段和不同组织部位中最合适的参考基因^[32]。

通过 qRT-PCR, 得到了内参基因的 C_t 值。内参基因与目的基因的理想表达水平差异不宜过大且 C_t 值最好在 15~30。通过 C_t 值比较分析发现 GAPDH、UBQ 和 Actin 的 C_t 值均在 15~30, 同时它们也是在软件分析中表达稳定性较好的内参基因, CYP 和 16 S 相对于其他候选内参基因拥有较大的 C_t 值, 表达稳定性上也劣于其他候选内参基因。使用了 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种荧光定量分析软件对候选内参基因的稳定性进行了评估, 在巴戟天不同组织部位中, geNorm 和 NormFinder 显示 GAPDH 的稳定性最好, 而 BestKeeper 计算得出 UBQ 才是最稳定的基因, GAPDH 次之。在巴戟天不同处理的叶中, geNorm 和 NormFinder 显示稳定性最好的基因是 GAPDH, 而 BestKeeper 显示 Actin 是最稳定的基因。研究表明, 不同软件分析得到的候选参考基因的稳定性 and 排名有一点差异, 这可能与软件数据处理的统计方法不同有关, 例如在不同处理下的褐顶棘的研究中 2 种软件给出的最优稳定基因是不同的^[33], Fan 等^[34]在筛选毛竹不同发育时期下不同组织中的内参基

因时, 3 种软件给出了各不相同的稳定性排名。在筛选内参基因时要综合考虑内参基因的排名和稳定值, 如在分析不同组织部位内参基因稳定性时, UBQ 虽然在根、茎、叶中的稳定性排名都不是第一, 但是它的稳定值符合稳定内参的要求, 所以也是可以作为内参基因。进一步经过目的基因验证, 使用 UBQ 作为内参定量分析目的基因得到了和 GAPDH 相一致的结果, 而 GAPDH 是软件分析中在不同组织稳定性第一的内参。

本实验使用筛选得到的稳定内参基因定量了目的基因 (DXS 和 DXR) 在巴戟天不同组织部位中以及在不同处理的叶中的表达。结果显示, 在定量目的基因在不同组织部位中的表达时, 2 个稳定性最佳的基因 (GAPDH 或 UBQ) 及其组合定量标准化的结果呈现一致。另外, 由稳定性最差的 16 S 得到的标准化定量数据明显出现了过高的误差。但在定量目的基因在不同处理的叶中的表达时, 2 个稳定性最佳的基因 (GAPDH 和 Actin) 定量标准化结果之间出现了差异。有研究表明, 选择 2 个或 2 个以上的内参基因可以减少实验结果的偏差^[35]。例如 Zheng 等^[36]筛选杜鹃花不同组织和不同发育阶段的稳定内参时, 使用单个内参和 2 个内参的组合对 2 个目的基因进行表达验证。结果显示, 单个最内参与组合的表达趋势虽然一致, 但是表达量上还是有微小的差异, 而不稳定内参的表达水平则呈现相反的结果。结合 geNrom 给出的最适内参基因数目和筛选得到的稳定内参, 使用 GAPDH 和 Actin 的内参基因组合来定量目的基因在不同处理的叶中的表达可使定量结果更加准确可靠。此外, 作为在不同处理的叶中稳定性最差的内参基因, CYP 过低的估计了目的基因的表达, 不能准确的标准化目的基因的表达。

在 10 个不同的候选内参基因中, 筛选得到 GAPDH、UBQ 和 Actin 等表达稳定性良好的内参基因, 经过验证确定了这些基因作为巴戟天 qRT-PCR 内参基因的可靠性。此外, 本研究发现基于不同实验条件下的 GAPDH 都有着良好的表达稳定性。本研究评估的基因对于今后研究巴戟天的基因表达分析评价具有重要意义。

参考文献

[1] Artico S, Nardeli S M, Brilhante O, *et al.* Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time

quantitative RT-PCR data [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 49-56.

[2] Bustin S A, Benes V, Garson J A, *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 611-622.

[3] Vanguilder H D, Vrana K E, Freeman W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *Bio Techniq*, 2008, 44(5): 619-626.

[4] Paolacci A R, Tanzarella O A, Porceddu E, *et al.* Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10(1): 11-18.

[5] Dheda K, Huggett J F, Chang J S, *et al.* The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization [J]. *Anal Biochem*, 2005, 344(1): 141-143.

[6] Ferradás Y, Rey L, Martínez O, *et al.* Identification and validation of reference genes for accurate normalization of real-time quantitative PCR data in kiwifruit [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 102: 27-36.

[7] Huis R, Hawkins S, Neutelings G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 71-79.

[8] Xia W, Xiao M, Linkai H, *et al.* Identification of the valid reference genes for quantitative, RT-PCR in Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*) under salt stress [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4833-4847.

[9] Wang J Y, Zhong H N, Lin L Q, *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in preharvest and postharvest longan fruits under different experimental conditions [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 780.

[10] Yong J, Lu C, Huang S, *et al.* Chemical components isolated from the roots of *Morinda officinalis* [J]. *Chem Nat Compounds*, 2015, 51(3): 548-549.

[11] Zhang J H, Xin H L, Xu Y M, *et al.* *Morinda officinalis* How. -a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharm*, 2017, 213: 230-255.

[12] Kim I T, Park H J, Nam J H, *et al.* In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis* [J]. *J Pharm Pharm*, 2010, 57(5): 607-615.

[13] Zhang H, Li J, Xia J, *et al.* Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 7-12.

- [14] 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, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- [15] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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.
- [16] 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]. *Biot Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [17] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8915-8920.
- [18] Proteau P J. 1-Deoxy-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: An overview [J]. *Bioorg Chem*, 2004, 32(6): 483-493.
- [19] Carreteropaulet L, Ahumada I, Cunillera N, *et al.* Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1581-1591.
- [20] Gupta P, Agarwal A, Akhtar N, *et al.* Cloning and characterization of 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid biosynthesis from Indian ginseng, *Withania somnifera* [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(1): 285-295.
- [21] Wang H, Yao L. Cloning and expression profile of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene from an oil-bearing rose [J]. *Russian J Plant Physiol*, 2014, 61(4): 548-555.
- [22] Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, *et al.* A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(6): 657-666.
- [23] Zhang C S, Xin C, Jia G, *et al.* Cloning and expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene (DXR) in *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Agricult Biot*, 2014: 298-308.
- [24] 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.
- [25] Wei L B, Miao H M, Zhao R H, *et al.* Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR [J]. *Planta*, 2013, 237(3): 873-889.
- [26] Hellemans J, Vandesompele J. *Quantitative Real-Time PCR* [M]. New York: Humana Press, 2014.
- [27] Deng L T, Wu Y L, Li J C, *et al.* Screening reliable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Moringa oleifera* [J]. *PLoS One* 2016, 11(8): e0159458.
- [28] Nicholls C, Li H, Liu J P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions [J]. *Clin Exper Pharm Physiol*, 2012, 39(8): 674-679.
- [29] Wang S B, Liu K W, Diao W P, *et al.* Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR [J]. *Mol Breed*, 2012, 30(3): 1393-1400.
- [30] Xu Y Y, Zhu X W, Gong Y Q, *et al.* Evaluation of reference genes for gene expression studies in radish (*Raphanus sativus* L.) using quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(3): 398-403.
- [31] Xu X, Yang Z, Sun X, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR during flower bud development in CMS7311 of heading Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Acta Physiol Plantarum*, 2014, 36(3): 809-814.
- [32] Cao J, Wang L, Lan H. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in *Suaeda aralocaspica*, an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy [J]. *Peer J*, 2016, 4(2): e1697.
- [33] Huihui Z, Yanping F, Wei H, *et al.* Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 475-483.
- [34] Fan C, Ma J, Guo Q, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573.
- [35] Cui B, Smooker P M, Rouch D A, *et al.* Selection of suitable reference genes for gene expression studies in *Staphylococcus capitis* during growth under erythromycin stress [J]. *Mol Genet Genom*, 2016, 291(4): 1795-1811.
- [36] Xiao Z, Sun X, Liu X, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. Don [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1547-1552.