

• 药材与资源 •

川续断 Actin、Tubulin 和 GAPDH 基因的克隆及表达稳定性分析

梁 晴, 徐 娇, 周 涛*, 江维克, 肖承鸿, 王 绘, 冯汪银, 郑 伟, 陈 杰

贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550002

摘要: 目的 从川续断 *Dipsacus asper* 中克隆并筛选出稳定的内参基因用于实时荧光 PCR (qRT-PCR) 的分析校正, 为今后川续断功能基因的表达分析及调控机制研究提供基础。方法 从川续断转录组数据库中筛选并克隆肌动蛋白 (Actin)、微管蛋白 (Tubulin)、GAPDH 基因家族内参基因的核心片段, 以不同产地、不同组织部位和不同发育时期的川续断植株为材料, 通过 qRT-PCR 获得各基因的表达信息, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT、RefFinder 共 5 个内参评价软件分析各基因的表达稳定性, 综合评价并筛选出最佳的川续断内参基因。结果 克隆获得 10 个候选内参基因核心片段, 分别属于 Actin、Tubulin、GAPDH 3 大基因家族, 各家族基因序列间同源性较高; 稳定性综合分析结果显示, DaACT103 在不同产地及不同组织部位的表达稳定性较强且表达量相对较高, DaTUB5 在不同发育时期的表达稳定性较强且表达量相对较低。结论 DaACT103 和 DaTUB5 均可作为川续断的内参基因, 其中, DaACT103 适用于作为具有较高表达丰度基因的内参基因; DaTUB5 适用于作为表达丰度较低基因的内参基因。

关键词: 川续断; 内参基因; 克隆; qRT-PCR; 稳定性分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5571-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.022

Cloning and expression stability analysis of Actin, Tubulin and GAPDH genes in *Dipsacus asper*

LIANG Qing, XU Jiao, ZHOU Tao, JIANG Wei-ke, XIAO Cheng-hong, WANG Hui, FENG Wang-yin, ZHENG Wei, CHEN Jie

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To clone and screen the stable internal reference genes from *Dipsacus asper* for qRT-PCR analysis correction, so as to provide a preliminary basis for future research on expression analysis and regulation mechanism of *D. asper* functional genes. **Methods** The internal reference genes of Actin, Tubulin and GAPDH gene families were screened and cloned from *D. asper* transcriptome database. The *D. asper* plants from different origins, different tissues and different developmental stages were used to obtain expression information of each gene by qRT-PCR. The expression stability of each gene was analyzed by geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta CT and RefFinder, and the best genes were synthetically evaluated and screened. **Results** Ten core fragments for candidate internal reference genes were cloned, belonging to three gene families: Actin, Tubulin and GAPDH, with high homology among them. The results of stability analysis showed that the expression of DaACT103 was stable and relatively high in different regions and tissues, while the expression of DaTUB5 was stable and relatively low in different developmental stages. **Conclusions** DaACT103 and DaTUB5 are suitable as the internal reference genes for *D. asper*. DaACT103 is used as the internal reference gene with high abundances and DaACT105 is used as the internal reference gene with low abundances.

Key words: *Dipsacus asper* Wall. ex Henry; internal reference genes; clone; qRT-PCR; stability analysis

随着分子生物学的飞速发展, 基因表达分析已成为研究基因功能、表达规律、合成及代谢调控的重要手段之一^[1], 而内参基因作为参考基因在其研究中有

着的不可或缺的价值。内参基因是在生物体组织或细胞中均能稳定表达的基因, 其生物学功能是构成细胞基本转录成分以及维持细胞基本功能^[2]。在植物基因

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860675); 贵州省高层次创新型人才 (黔科合平台人才[2018]5638); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字[2018]022); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21); 贵州省国内一流建设学科项目 (中药学) (GNYL[2017]008 号)

作者简介: 梁 晴 (1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。Tel: 18798603212 E-mail: 794824968@qq.com

***通信作者** 周 涛 (1968—), 女, 教授, 研究方向为中药及民族药资源分类鉴定与质量控制。E-mail: taozhou88@163.com

表达分析的研究中,常见的内参基因有肌动蛋白基因(Actin)、微管蛋白基因(Tubulin)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)等^[3]。理想的内参基因是在内源或外源因素影响下表达量依旧稳定的基因,因此,常在基因表达定量分析(qRT-PCR)中作为参考基因,用以校正上样量及其操作过程中带来的误差,保证定量结果的准确性,但任何一种内参基因表达量都不是无限度的绝对恒定^[4],因此,根据不同的研究对象及实验处理,筛选出合适的内参基因是准确获得基因表达分析的关键。

川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 以根作续断入药^[5],现代药理研究证实具有治疗骨质疏松和更年期妇女骨折的作用^[6-7]。但文献报道其药材质量波动较大,特别是指标性成分川续断皂苷VI含量参差不齐^[8]。然而,目前影响川续断药材品质的形成机制的研究尚处于起步阶段。鉴于此,本研究通过克隆获得了川续断 Actin、Tubulin、GAPDH 3 个基因家族共 10 个候选内参基因的核心片段,并利用 qRT-PCR 分别检测其不同产地,不同组织部位,不同发育时期中基因的表达量,通过 5 个内参评价软件(geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT、RefFinder)分析各基因的表达稳定性,筛选出稳定性相对较强的基因作为川续断的内参基因,为今后川续断基因功能研究提供稳定、可靠的内参基因。

1 材料及仪器试剂

1.1 材料

材料来源分为 4 个产地(贵阳市威宁县、黄平县、水城县、台江县)的 1 年生川续断植株根、3 个组织部位(根、基生叶、叶柄)的 1 年生川续断植株,及 4 个发育时期(6 个月、9 个月、一年生、两年生)的川续断植株根。于 2017 年 11 月~2018 年 5 月采自贵州省各县市,除贵阳市采集的样品为栽培外,其余材料均为野生,每个材料来源设置 3 个生物学重复。经贵州中医药大学江维克教授鉴定为川续断 *D. asper* Wall. ex Henry。样品采集后立即液氮速冻, -80 °C 保存备用。

1.2 仪器及试剂

ABI 7500 实时荧光定量分析仪,新加坡 Applied Biosystems 公司;伯乐 ChemiDoc TouchTM PCR 仪,英国伯乐(Bio-Rad)公司;Thermo Fisher NanoDropTM2000 核酸定量仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;伯乐 Chemi Touch 凝胶成像系统,英国伯乐(Bio-Rad)公司;微量移液器,德国

Eppendorf 公司;伯乐(BIO-RAD)电泳仪,英国伯乐(Bio-Rad)公司;Eppendorf AG 22331 Hamburg 台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;SPX-150B-D 振荡培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

总 RNA 提取试剂盒(LS1040)购自 Promega 北京生物技术有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)购自 Omega 公司;DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒(R6809)购自北京 TIANGEN 公司;逆转录酶 M-MLV、Go Taq[®] qPCR Master Mix、克隆载体 PMD-19T、SYBR Premix Ex TaqTMII 均购自 TaKaRa 公司;其余试剂均为国产分析纯;引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与逆转录

样品用液氮研磨成细粉,根据试剂盒说明书操作提取总 RNA;通过核酸定量仪及 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度、质量和完整性。以 Oligo dT 为引物按照逆转录酶 M-MLV 使用说明合成 cDNA 第一链。

2.2 候选基因的获得与 PCR 扩增

结合文献对植物常见内参基因的报道,从课题组前期构建的川续断转录组数据库中获得注释为 Actin、Tubulin、GAPDH 的基因序列,采用 NCBI 在线工具“ORF finder”(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)查询序列的开放式阅读框(ORF),利用 Primer 5.0 软件 ORF 区两端设计克隆引物,扩增体系为 25 μ L: 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, 12 μ L Taq 酶, 80 ng/ μ L 的 cDNA 模板 2 μ L, 灭菌 ddH₂O 补足体积;扩增程序: 98 °C 变性 10 s, 58~66 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2.3 切胶回收、TA 克隆及序列分析

以川续断根 cDNA 为模板,对 10 个候选内参基因的核心片段进行 PCR 扩增,扩增产物按琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收,通过核酸定量及 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测回收产物的浓度及质量。设置阳性对照(模板为试剂盒中的 Control Insert, 片段大小为 500 bp)、阴性对照(ddH₂O)、试验组(10 个候选内参基因的胶回收产物)分别进行 TA 克隆。目的基因与 PMD-19T 克隆载体连接体系: PMD-19T vector 0.5 μ L, 目的基因 4.5 μ L, Solution I 5 μ L, 16 °C 重组反应 4 h, 将重组质粒转化入 DH5 α 感受态细胞,并接种于含 60 mg/mL 氨

苜蓿青霉素的 LB 固体培养基上培养过夜, 挑选单克隆菌斑于含氨苄青霉素的液体培养基培养 8 h。以菌液为模板进行 PCR 阳性克隆检测, 每个候选内参基因选取多个阳性克隆送至上海生工生物工程股份有限公司测序。根据测序结果, 利用 BlastP 预测序列的保守结构域, 同时下载植物同源基因的氨基酸序列, 通过 Sequencher 4.8 对克隆序列进行同源比对分析, 利用软件 MEGA 7.0 的邻接法 (Neighbor-joining Method, NJ) 构建系统进化树。

2.4 qRT-PCR

根据测序结果, 以同源性最高并在系统进化树上聚为一类的基因为同源基因, 在基因不同位置上设计 qRT-PCR 引物; 非同源基因于特异区域内设计引物, 引物详情见表 1, T_m 均为 60 °C。PCR 扩增并用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 操作同“2.2”项。

以不同产地、不同组织部位及不同发育时期的川续断 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 操作, 每个处理设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。反应体系为 20 μ L: 10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L, SYBR II 10 μ L, ROX II 0.4 μ L, 模板 2 μ L, 灭菌 ddH₂O 补足体积; 扩增程序: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 34 s, 40 个循环。扩增完成后进行 60~95 °C 熔解曲线分析。

2.5 稳定性分析

利用内参评价软件 (geNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT、RefFinder) 分别分析以上 3 组材料来源的 qRT-PCR 数据。最终, 整合 5 个软件分析结果得到综合数值, 该数值越小, 则对应的内参基因越稳定。

geNorm 可筛选任何组别下任意数目的内参基因, 依据表达稳定性平均值 (M) 进行判断, 该值越低越好, 若该值大于 1.5, 认为其稳定度较差^[9]。NormFinder 可比较各基因在组内和组间的变异程度, 根据基因表达稳定值, 该值越小稳定性越好^[10]。BestKeeper 可计算获得各基因的标准差 (SD) 和变异系数 (CV), 其中 SD 和 CV 越小, 内参基因稳定性越强; 同时, 若 $SD > 1$ 时, 认为该基因稳定性较差, 不适合作为内参^[11]。Delta C_t 法是通过计算各候选内参基因 C_t 值的 SD 来判断基因的稳定性。SD 越小, 该基因的稳定性越强^[12]。RefFinder 是一款在线分析内参基因的软件, 能相对综合的评价各基因的表达稳定性, 在一定程度上避免了单一软件

分析结果带来的局限性和片面性^[13]。

2.6 引物特异性及扩增效率

根据各基因的熔解曲线进一步判断引物的特异性。对筛选确定为川续断的内参基因进行引物扩增效率试验, 以质粒为模板按 10 倍的浓度梯度进行稀释 (共 6 个稀释梯度), 稀释后模板进行 qRT-PCR 扩增, 根据 C_t 值建立 qRT-PCR 的标准曲线, 计算其斜率 (k) 及线性相关系数 (r), 再根据公式扩增效率 (E) = $10^{-1/k}$, 计算出引物的 E 。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量检测与 PCR 扩增

不同产地、不同组织部位、不同发育时期川续断材料总 RNA 电泳结果显示其完整性较好。核酸定量结果显示, A_{260}/A_{280} 均在 1.80~2.08, A_{260}/A_{230} 在 1.5 以上, 表明总 RNA 纯度较好。

10 个川续断候选基因核心片段 PCR 扩增电泳结果见图 1。结果显示, DaACT1、DaACT2、DaACT5、DaACT1157、DaACT103、DaTUB2、DaTUB3、DaTUB5、DaGAP1、DaGAP430 扩增条带大小分别为 945、1 398、966、1 286、1 303、654、837、934、1 364、1 152 bp, 电泳条带清晰、无非特异性扩增。

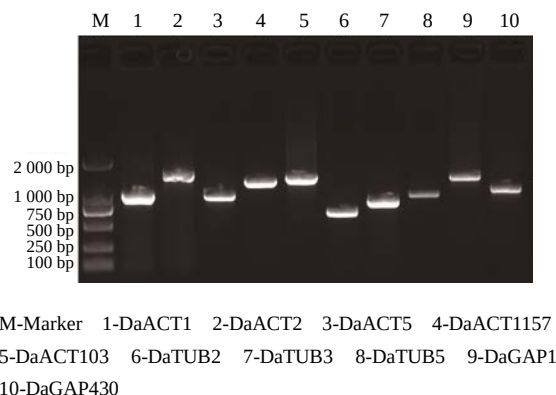


图 1 10 个候选内参基因核心片段 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification for core fragments of 10 candidate internal reference genes

3.2 序列同源性及进化树分析

克隆获得的 10 个川续断候选内参基因核心片段序列长度及编码氨基酸详情见表 1。BlastP 比对发现, 5 个 Actin 基因属于 NBD_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily 家族, 各序列间同源性均在 80% 以上, 其中, DaACT2、DaACT5 及 DaACT1157 基因的同源性达 99% 以上; 此外, 3 个 Tubulin 基因属于 Tubulin superfamily 家族, 各序列间同源性在 50% 以上; 2 个

表 1 川续断候选内参基因克隆及 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Cloning and qRT-PCR primer information for candidate internal reference genes

类型	基因名称	克隆引物				qRT-PCR 引物	
		引物序列 (5'-3')	$T_m/^{\circ}\text{C}$	ORF	编码氨基酸	引物序列 (5'-3')	产物长/bp
肌动蛋白基因	DaACT1	正向序列 GACATGGAGAAAATTGGCATCACA 反向序列 GGAACCTCAACGAAACTCACCACC	64	885	294	正向序列 TTTGGACCTGGCTGGTCGTG 反向序列 GCTCGTAGTCGAGTGCCACA	143
	DaACT2	正向序列 ATAAAAGATGGCTGATACAGAGGAC 反向序列 TCAACTAACCACATACAAGAGCA	60	1 134	377	正向序列 CCGGTTGGATCTCGCTGGTC 反向序列 GCCCATCGGCAACTCGTAG	209
	DaACT5	正向序列 TAAAAGATGGCTGATACAGAGGAC 反向序列 GCTGTGATTCTTTGCTCATACG	58	960	319	正向序列 TAAGGCCGGGTTTGTCTGGTG 反向序列 TCCATGTCGTCCCAATTGCTG	198
	DaACT1157	正向序列 ACAAATCTCTGTTCACTCACCAC 反向序列 CTAGCGCTAGACCTACTCAAACATC	60	1 134	377	正向序列 TGGTGTACGCCACACGGTTC 反向序列 TCAAGGGCAACGTAGGCAAGT	195
	DaACT103	正向序列 AGAGTTGCATAAAAAATGGCTGACG 反向序列 AAGGGAAAAACATCACAACCACTC	60	1 134	377	正向序列 ACAGCCGAGCGGGAATTGT 反向序列 TCTGGGACGCGGAATCTCTCT	170
	DaTUB2	正向序列 AATGCGGCAACCAATATCG 反向序列 TCAAGTGGTTCAATCTCCAAAGC	60	525	174	正向序列 GGCCAATGCGGCAACCAAT 反向序列 TCCGAATGCGCGTGGTAACG	95
微管蛋白基因	DaTUB3	正向序列 TGCCGATGAATGTATGTTTAGAC 反向序列 AACCACAAATCACCTCACCAACT	62	735	244	正向序列 ACGCCTACGTTTGGCGATCT 反向序列 TGGGTACAGTCAGGACGGT	218
	DaTUB5	正向序列 CGACGGCACAACAGAACAA 反向序列 AACCACAAATCACCTCACCACT	60	636	211	正向序列 CCTTCCTCGCTCCACTT 反向序列 AGGGTCAGCTGCACACATCA	141
	DaGAP1	正向序列 TTGGAATGGCTTCTCTCTCTAC 反向序列 TAACAAGCCAACAAGGGCAAATAAG	62	1 263	420	正向序列 GGTCCACTTCGCGGCATTCT 反向序列 CCCATGCCAGCCTTTGTCATC	104
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	DaGAP430	正向序列 GTTTTCTATTCTCTCCCGCCCTT 反向序列 ATTAGGTGTGGGACTCTGAAAGCC	66	873	290	正向序列 TGAAGGGCGGTGCCAAGAAG 反向序列 GGAGCAAGGCAATTGGTAGTGC	142

GAPDH 基因属于 Gp_dh_N_superfamily 家族, 各序列间同源性高达 99%。

分别将川续断 10 个候选内参基因的氨基酸序列和其他植物内参的氨基酸序列进行系统进化树分析, 见图 2, 5 个 Actin 基因中 DaACT2、DaACT5 与 DaACT1157 聚为一类且他们与梨、苹果等植物的 Actin 基因亲缘关系较近; DaACT1 与 DaACT103 聚为另一类, 其中 DaACT103 的氨基酸序列与大桉、野草莓的 Actins 序列的相似度较高, 亲缘关系较近, DaACT1 与柚子的 Actin 基因亲缘关系较近, 见图 2-a; 3 个 Tubulin 基因

和人参、野胡萝卜、罂粟等植物的 Tubulin 基因亲缘关系较近, 见图 2-b; 2 个 GAPDH 基因和黄瓜、南瓜、向日葵等植物的 GAPDH 亲缘关系较近, 见图 2-c, 以上结果表明各家族基因分别在亲缘关系及基因功能方面具有相似性, 同时, 也表明了克隆得到的川续断各候选内参基因核心片段间具有较强的保守性。

3.3 表达稳定性分析

qRT-PCR 引物对 PCR 扩增结果显示产物条带清晰单一, 可用于后续试验, 见图 3。此外, qRT-PCR 结果进一步说明该引物特异性好、无引物二聚体及

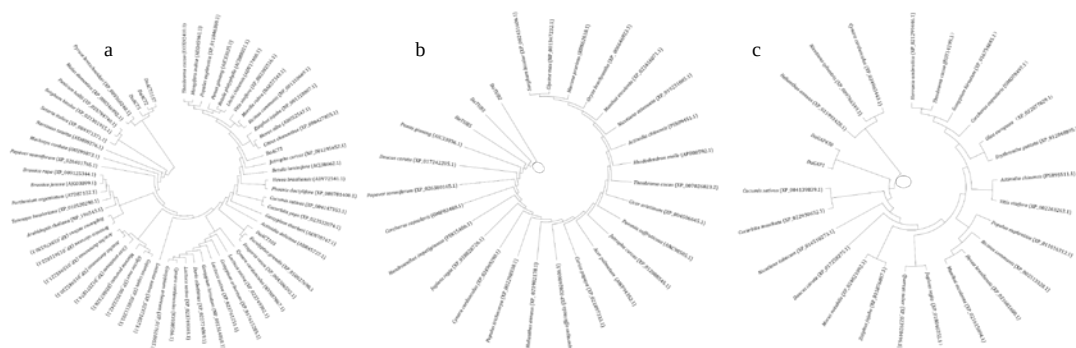


图 2 川续断 Actin (a)、Tubulin (b)、GAPDH (c) 氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of amino acid sequence system of Actin (a), Tubulin (b) and GAPDH (c) from *D. asper*

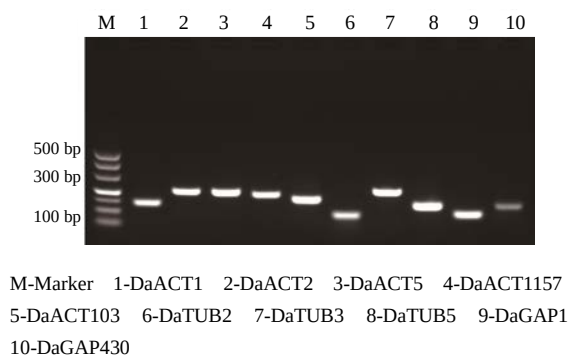


图 3 候选内参基因片段 PCR 产物电泳分析

Fig. 3 Electrophoretic analysis of PCR products of candidate internal reference gene fragments

非特异性扩增。利用 5 个内参基因评价软件分别分析 10 个川续断候选内参基因在不同产地、不同组织部位、不同发育时期的表达稳定性。

3.3.1 不同产地川续断候选内参基因稳定性分析 各基因在 4 个不同产地川续断根中 C_t 值均有一定变化, 其整体变化范围为 20~28 个循环数, 见图 4-a, 其中 DaACT103、DaACT1 的表达丰度较高, $C_t < 23$ 个循环, DaGAP1、DaGAP430 的表达丰度较低, C_t 值为 28 个循环。

geNorm 分析结果显示, 各基因 M 值排名依次为 DaACT103、DaTUB2、DaTUB5、DaACT1、DaGAP1、DaTUB3、DaGAP430、DaACT2、DaACT5、DaACT1157, 其中 DaACT103 的 M 值最小, 为 0.592, 表达最为稳定; 相反, DaACT1157 的 M 值最大, 为 1.07, 稳定度相对较差。

NormFinder 分析结果显示, 各基因 M 值排名同 geNorm 分析结果, 其中 DaACT103 的稳定值最小, 为 0.271, SD 值为 0.045, 表达最为稳定; DaACT1157 基因的稳定值最大, 为 1.078, SD 值为 0.154, 稳定性最差。

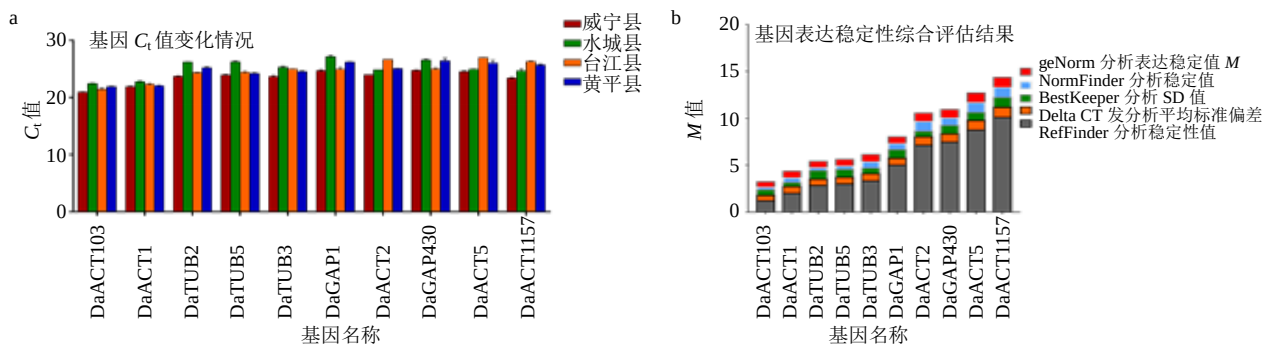


图 4 不同产地川续断候选内参基因表达稳定性分析

Fig. 4 Stability analysis of candidate internal reference gene expression of *D. asper* in different producing areas

BestKeeper 分析结果与 geNorm、NormFinder 的分析结果略有不同, 各基因表达量的 SD 值排名为 DaACT1、DaACT103、DaTUB5、DaTUB3、DaACT2、DaACT5、DaGAP430、DaTUB2、DaGAP1、DaACT1157, 其中 DaACT1、DaACT103、DaTUB5 的 SD 值较小, 分别为 0.43、0.45、0.54, 其基因表达量波动较小; 而 DaACT1157 的 SD 值大于 1, 不适合作为内参使用。

Delta C_t 分析所得各基因 C_t 值排名同 geNorm 分析结果, 其中 DaACT103、DaTUB2、DaTUB5 基因表达较平稳, DaACT2、DaACT5、DaACT1157 的表达稳定性较差。

RefFinder 综合分析结果排名为 DaACT103、DaACT1、DaTUB2、DaTUB5、DaTUB3、DaGAP1、DaACT2、DaGAP430、DaACT5、DaACT1157, 其中 DaACT103、DaACT1、DaTUB2、DaTUB5、DaTUB3 的稳定值较为接近, 即基因表达稳定性较好, 以 DaACT103 为最优; 相反 DaACT5、DaACT1157 的表达稳定性相对较差。

由于 5 个软件的判断依据均是计算所得稳定值越小, 基因稳定性越强, 因此, 加和 5 个软件的分析结果, 能获得更为综合及直观的评定, 见图 4-b。结果显示, 不同产地的川续断根中内参基因的稳定值较强的为 DaACT103、DaACT1、DaTUB2, 较差的为 DaACT5、DaACT1157, 其中稳定性最好的是 DaACT103。

3.3.2 不同组织部位川续断候选内参基因稳定性分析 各基因在川续断根、基生叶、基生叶柄中 C_t 值的变化范围为 19~29 个循环数, 见图 5-a, 同不同产地候选内参基因 C_t 值变化一样, DaACT103、DaACT1 的表达丰度较高, $C_t < 23$ 个循环, DaACT5、DaACT2 的表达丰度较低, C_t 值最高为 29 个循环。

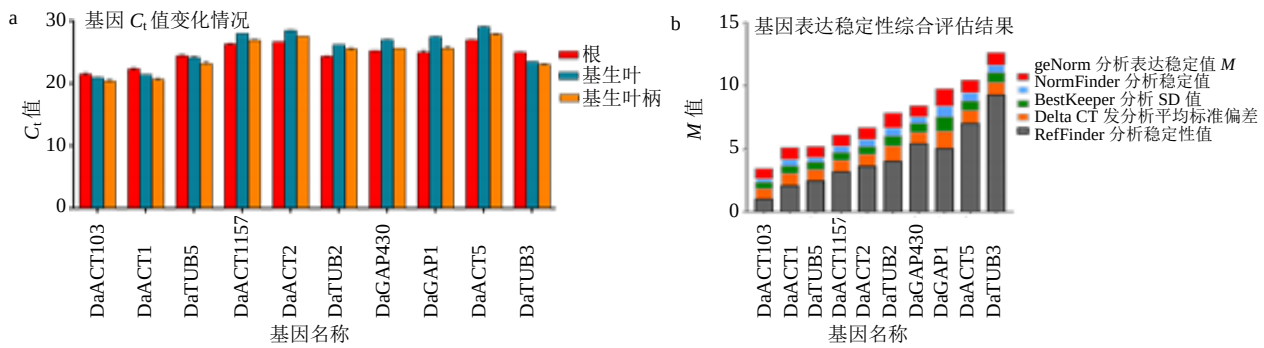


图 5 不同组织部位川续断候选内参基因表达稳定性分析

Fig. 5 Stability analysis of candidate internal reference gene expression of *D. asper* in different tissues

geNorm 分析结果显示, 各基因 M 值排名依次为 DaACT103、DaTUB5、DaGAP430、DaACT1157、DaACT2、DaACT1、DaTUB3、DaACT5、DaTUB2、DaGAP1, 其中 DaACT103 的 M 值最小, 为 0.827, 表达相对最稳定; 相反, DaGAP1 的 M 值最大, 为 1.374, 稳定性相对较差。

NormFinder 分析结果表明, 各基因的 M 值排名为 DaACT103、DaTUB5、DaACT1157、DaACT1、DaGAP430、DaACT2、DaTUB3、DaTUB2、DaACT5、DaGAP1, 其中 DaACT103 的稳定值最小, 为 0.267, 其 SD 值为 0.089, 表达最为稳定; DaGAP1 的稳定值最大, 为 0.848, SD 值为 0.126, 稳定性最差。BestKeeper 分析结果中各基因表达量的 SD 值大小排名为 DaACT103、DaTUB5、DaACT1、DaACT2、DaACT1157、DaGAP430、DaACT5、DaTUB3、DaTUB2、DaGAP1, 其中 DaACT103、DaTUB5、DaACT1 的 SD 值较小, 分别为 0.49、0.59、0.59, 其基因表达量较为恒定; 而 DaGAP1 的 SD 值大于 1, 不适合作为内参使用。

Delta C_t 分析所得各基因 C_t 值排名同 geNorm 分析结果, 即 DaACT103、DaTUB5 基因表达较平

稳, DaTUB2、DaGAP1 的表达稳定性较差。RefFinder 综合分析结果排名为 DaACT103、DaACT1、DaTUB5、DaACT1157、DaACT2、DaTUB2、DaGAP1、DaGAP430、DaACT5、DaTUB3, 其中 DaACT103、DaACT1 及 DaTUB5 的基因表达稳定性均较好, 又以 DaACT103 为最佳; 相反 DaACT5、DaTUB3 表达稳定性相对较差。

5 个软件分析结果的整合见图 5-b。结果显示, 不同产地的川续断根中内参基因的稳定性较强的为 DaACT103、DaACT1、DaTUB5, 较差的为 DaACT5、DaTUB3, 其中稳定性最好的是 DaACT103。

3.3.3 不同发育时期川续断候选内参基因稳定性分析 各基因在川续断根不同发育时期 C_t 值的变化范围为 20~30 个循环数, 见图 6-a, 同上述结果, DaACT103、DaACT1 的表达丰度较高, C_t 值 < 23 个循环, DaACT5、DaACT2 的表达丰度较低, C_t 最高为 30 个循环。

geNorm 分析结果显示, 各基因 M 值排名依次为 DaTUB5、DaACT103、DaTUB2、DaACT1、DaGAP1、DaGAP430、DaTUB3、DaACT5、

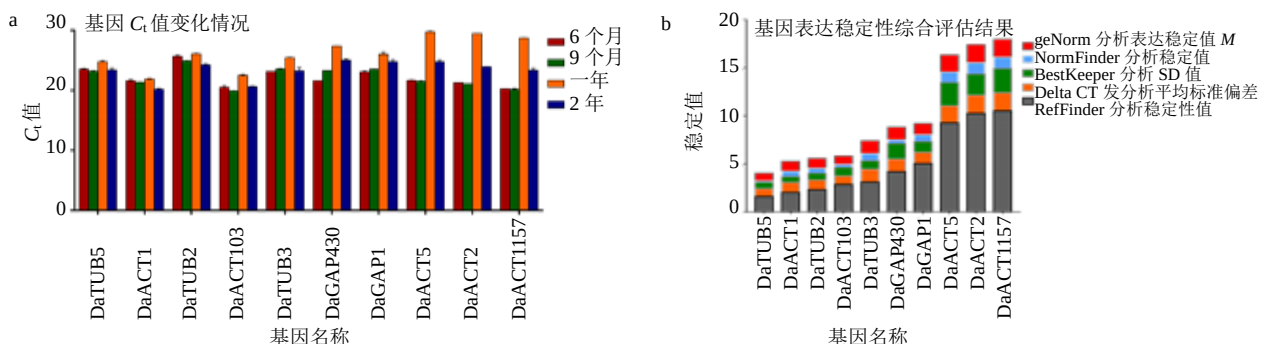


图 6 不同发育时期川续断候选内参基因稳定性分析

Fig. 6 Stability analysis of candidate internal reference gene expression of *D. asper* in different developmental stages

DaACT1157、DaACT2，其中 DaTUB5 的 M 值最小，为 0.812，表达相对最稳定；而 DaACT5、DaACT1157、DaACT2 的 M 值均大于 1.5，稳定度相对较差。

NormFinder 分析结果表明，各基因 M 值大小排名为 DaTUB5、DaACT103、DaGAP430、DaTUB2、DaACT1、DaGAP1、DaTUB3、DaACT5、DaACT2、DaACT1157，其中 DaTUB5 的稳定值最小，为 0.136，其 SD 值为 0.089，表达最为稳定；DaACT1157 的稳定值最大，为 1.187，SD 值为 0.292，稳定性最差。

BestKeeper 分析结果中各基因表达量的 SD 值大小排名为 DaACT103、DaTUB5、DaTUB2、DaTUB3、DaACT1、DaGAP1、DaGAP430、DaACT2、DaACT5、DaACT1157，其中 DaACT103、DaTUB5、DaTUB2 的 SD 值较小，分别为 0.61、0.67、0.70，其基因表达量较为恒定；而 DaGAP1、DaGAP430、DaACT2、DaACT5、DaACT1157 的 SD 值大于 1，不适合作为内参使用。

Delta C_t 分析所得各基因 C_t 值排名为同 geNorm 分析结果，即 DaTUB5、DaACT103、DaTUB2 基因表达

较平稳；而 DaACT1157、DaACT2 的表达稳定性较差。RefFinder 综合分析结果排名为 DaTUB5、DaACT1、DaTUB2、DaACT103、DaTUB3、DaGAP430、DaGAP1、DaACT5、DaACT2、DaACT1157，其中 DaTUB5、DaACT1、DaTUB2、DaACT103、DaTUB3 的基因表达稳定性均较好，以 DaTUB5 为最佳；相反 DaACT1157、DaACT2 的表达稳定性相对较差。

5 个软件分析结果的整合见图 6-b。结果显示，不同产地的川续断根中内参基因的稳定性较强的为 DaTUB5、DaACT1、DaTUB2，较差的为 DaACT2、DaACT1157，其中稳定性最好的是 DaTUB5。上述结果显示各软件筛选出稳定性最佳的内参基因略有不同，但排名趋势基本一致，各个处理条件下 4 个基因（DaACT103、DaACT1、DaTUB2、DaTUB5）的排名基本靠前，熔解曲线见图 7，4 个基因均呈现单一峰，表明引物特异性较好。但 DaACT1 的表达丰度有一定波动，同时，DaTUB2 在不同组织部位中表达丰度差异明显，鉴于此，综合评价结果得出 DaACT103 和 DaTUB5 可以作为川续断的内参基因。

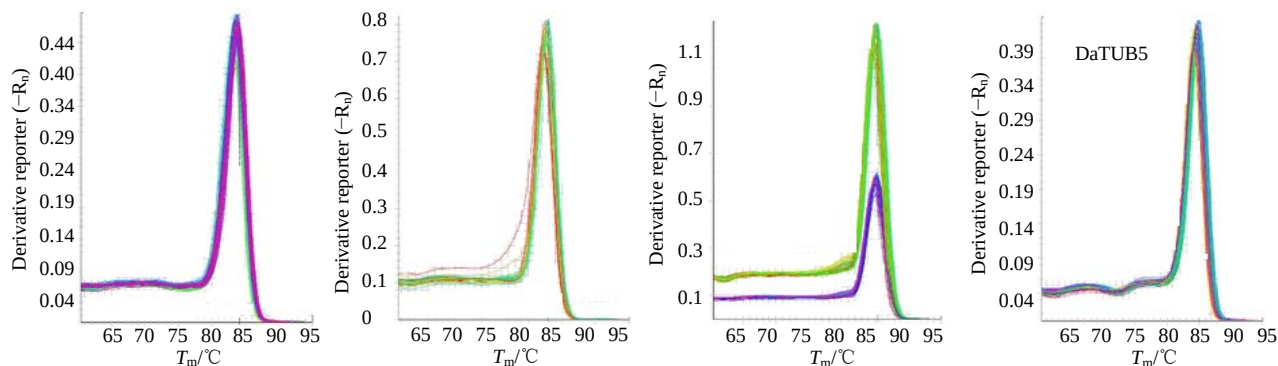


图 7 稳定性较好的 4 个川续断内参基因熔解曲线

Fig. 7 Melting curve of four stable internal reference genes with better stability

3.4 引物扩增效率

根据 DaACT103 和 DaTUB5 梯度稀释的 C_t 值，以 $\lg$ [模板浓度] 为横坐标 (X)，对应 C_t 值为纵坐标 (Y) 进行标准曲线的绘制标准曲线，回归方程分别为 $Y_{\text{DaACT103}} = -3.2174X + 33.851$ 、 $Y_{\text{DaTUB5}} = -3.2326X + 34.287$ ，引物的扩增效率、标准曲线参数及熔解温度见表 2，2 个基因的相关系数均符合 qRT-PCR 反应要求大于 0.98，扩增效率基本满足理想扩增效率 95%~105%^[14]。

4 讨论

Actin 和 Tubulin 基因均是细胞骨架构成的基本组分，在生物体生命活动中扮演着十分重要的

表 2 内参基因 qRT-PCR 中特异性引物参数

Table 2 Specific primer parameters of internal reference genes for qRT-PCR

基因	斜率	R^2	扩增效率/%	稀释倍数	$T_m/^\circ\text{C}$
DaACT103	-3.2174	0.9971	104.0	10	84.15
DaTUB5	-3.2326	0.9851	103.9	10	85.21

角色，其对应家族基因的表达量也相对稳定。其中，Actin 在核苷酸及氨基酸水平均具有高度的保守性及同源性，因此，常作为植物的内参基因被使用^[1,15]。但绝对理想的内参基因是不存在的^[16]，因此，研究材料来源的多元化及综合的评价方法就显得尤为重要。本研究以不同产地、不同组织部位、不

同发育时期的川续断为材料,利用 5 个内参评价软件分析各来源下 10 个候选基因的稳定性,综合筛选出川续断中表达稳定性较强的内参基因为 DaACT103 和 DaTUB5。其中, DaACT103 的 C_t 值约为 21.14,适用于作为具有较高表达丰度目的基因的内参; DaTUB5 的 C_t 值约为 24.34,适用于作为表达丰度较低目的基因的内参,在实验研究过程中,应结合目的基因的表达情况有针对性的选择上述内参基因。

Actin 主要划分为 2 类,第一类表达恒定,在维持细胞形态及细胞器定位方面有重要作用,另一类根据植物生长的需求表达有所变化,与植物生理活动密切相关^[17]。本研究在川续断中克隆获得了 5 个不同的 Actin 基因核心片段,序列间同源性均在 80%以上,具有较强的保守性,进化树分析显示 DaACT2、DaACT5 及 DaACT1157 聚为一类, DaACT1 与 DaACT103 聚为一类,聚类关系较近的基因在功能上更为接近。同时,稳定性评价结果与进化树分析结果一致:无论是不同产地、不同组织部位还是不同发育时期, DaACT2、DaACT5、DaACT1157 的表达量低且表达差异相对较大,尤其在发育时期,他们的稳定性远不及 DaACT103 及 DaACT1,相反, DaACT103 及 DaACT1 在各处理中不但表达量较高且稳定性好,故推测 DaACT103 及 DaACT1 为第一类 Actin 基因, DaACT2、DaACT5、DaACT1157 为第二类 Actin 基因,其中 DaACT1 的熔解曲线丰度波动较大,因此,最终选择 DaACT103 作为川续断的内参基因之一。

微管蛋白是自然界最保守的蛋白之一, Tubulin 作为微管蛋白家族成员具有较高的同源性,如拟南芥中 9 个 Tubulin 基因被认为有着同一祖先,因此,编码该类蛋白的基因常作为内参基因被使用^[18]。本实验筛选并克隆获得 3 个 Tubulin 家族基因,进化树分析表明他们基因的氨基酸序列具有很高的同源性及保守性,其中, DaTUB5 不同产地、不同组织部位、不同发育时期稳定性均较强,故适合作为川续断的另一个内参基因。

通过表达稳定性分析发现,不同内参评价软件在同一实验条件下有时会得到不同的分析结果,这可能是由于每个软件的计算方法、分析程序及侧重点不同所致,因此,为确保筛选得到的内参基因稳定可靠,在进行稳定性分析时选择多个评价软件综合分析是有必要的^[19]。本研究综合 5 个内参基因评价软件确定 DaACT103 及 DaTUB5 适合作为川续断的内参基因被使用,这为探讨川续断次生代谢成分形成的遗传学机

制以及表达调控规律奠定了前期基础。

参考文献

- [1] 邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 等. 刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1819-1822.
- [2] 吴永娜, 胡静, 王引权, 等. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2485-2489.
- [3] 许明, 伊恒杰, 赵帅, 等. 显齿蛇葡萄实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1192-1198.
- [4] 涂冬萍, 莫长明, 马小军, 等. 罗汉果实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 204-209.
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [6] 刘二伟, 吴帅, 樊官伟. 川续断化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010(7): 1421-1423.
- [7] 李广润, 宫丽丽, 吕亚丽, 等. 川续断皂苷 VI 药理作用研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(7): 477-480.
- [8] 卫莹芳, 刘永, 谢达温, 等. 不同产地续断的质量比较 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(2): 173-174.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Luchsinger C, Arias M E, Vargas T, et al. Stability of reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data in bovine blastocysts produced by IVF, ICSI and SCNT [J]. *Zygote Camb Engl*, 2014, 22(4): 505-512.
- [12] 周园园. 巨大芽孢杆菌 Sneb207 诱导大豆抗胞囊线虫机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [13] 赵业. 刺参 *Apostichopus japonicas* (Selenka) 夏眠期间基因表达模式及 DNA 甲基化基础特征研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2015.
- [14] 汪冬冬, 宋亚谊, 陈功, 等. qPCR 快速定量检测泡结球甘蓝发酵过程中优势细菌的数量变化 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 124-129.
- [15] 吴永娜, 李剑, 许瑞, 等. 党参肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2518-2522.
- [16] 李丹丹, 胡博, 王庆, 等. 药用植物内参基因研究进展 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 903-910.
- [17] 李军, 赵爱春, 王茜龄, 等. 三个桑树肌动蛋白基因的克隆与组织表达分析 [J]. 作物学报, 2011, 37(4): 641-649.
- [18] 蒋素华, 梁芳, 王洁琼, 等. 蕲春兰 TUB 基因片段的克隆及序列分析 [J]. 华北农学报, 2015, 30(4): 31-34.
- [19] 李健. 芍药实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2544-2549.