

当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选

朋冬琴^{1,2}, 罗蜜蜜^{1,2}, 郭欣慰³, 栗孟飞^{1,2,4*}, 魏建和^{3*}

1. 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070
2. 干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070
3. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193
4. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: 目的 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 筛选当归 *Angelica sinensis* 不同材料中稳定表达的内参基因。方法 以不同生长期、春化温度、组织部位以及抽薹/未抽薹植株为材料, 对转录组数据库获得的 13 个候选内参基因和 1 个已报道的肌动蛋白基因的表达水平进行 qRT-PCR 检测, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 ΔC_t 和 RefFinder 等软件分析表达水平的稳定性。结果 不同材料中 14 个候选内参基因的稳定性存在显著差异, *ACT7*、*UBC32*、*UBC26* 和 *UBC7* 分别为不同发育阶段、春化温度、组织部位和抽薹/未抽薹植株中最稳定的内参基因; *EEF1G* 为所有样品中最稳定的内参基因, 其次为 *RPL3* 和 *UBC26*。结论 为进一步检测当归产量和品质形成过程中的基因表达提供重要参考。

关键词: 当归; 内参基因; qRT-PCR; 基因表达; 生长期; 春化温度; 组织部位; 抽薹

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)01-0269-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.027

Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Angelica sinensis*

PENG Dongqin^{1,2}, LUO Mimi^{1,2}, GUO Xinwei³, LI Mengfei^{1,2,4}, WEI Jianhe³

1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China
2. State Key Laboratory of Aridland Crop Science, Lanzhou 730070, China
3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
4. Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective Selecting the stable expression of reference genes in different materials of *Angelica sinensis* by using the method of quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Methods** The different growth stages, vernalization temperatures, tissue parts and bolted/unbolted plants were used as materials, the expression levels of 13 candidate reference genes obtained from the transcriptome database and one *Actin* gene reported in previous literatures were quantified by the qRT-PCR, and the stability of expression levels was analyzed by the software of geNorm, NormFinder, BestKeeper, ΔC_t and RefFinder. **Results** There were significant differences in the stability of the 14 candidate reference genes in the different samples. The genes *ACT7*, *UBC32*, *UBC26* and *UBC7* were the most stable reference gene in different growth stages, vernalization temperatures, tissue parts, and bolted/unbolted plants, respectively. The *EEF1G* gene was the most stable reference gene in all materials, followed by the *RPL3* and *UBC26* genes. **Conclusion** These findings will provide a critical reference for further detecting the gene expression during the formation of yield and quality of *A. sinensis*.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; reference gene; qRT-PCR; gene expression; growth stages; vernalization temperatures; tissue parts; bolting

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为多年生草 阴湿地区^[1-2]。其干燥根为我国常用大宗药材, 具有 本植物, 主要种植于我国甘肃、云南和青海等高寒 补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[3-4]。现代药

收稿日期: 2023-05-02

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC3501500); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21); 国家自然科学基金项目 (32160083); 甘肃省科技厅重点研发计划 (22YF7NA111)

作者简介: 朋冬琴 (1998—), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物学研究。E-mail: pengdongqin2021@163.com

*通信作者: 栗孟飞 (1980—), 男, 河南驻马店人, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源与利用研究。E-mail: lmf@gsau.edu.cn

魏建和 (1970—), 男, 福建建阳人, 博士, 教授, 主要从事药用植物栽培、分子育种和次生代谢产物调控研究。

E-mail: jhwei@implad.ac.cn

理研究表明,根中多糖对保肝、类风湿性关节炎和缺血性中风^[5-7],酚类化合物对抗炎、抗增殖和血小板聚集^[8-10],以及有机酸对抗阿尔茨海默病、抗氧化和抗炎等具有显著效果^[4, 11-12]。

独特的药理作用,促使当归全球市场需求量逐年增加,目前,年均需求量已超过 30 000 t,种植面积约 43 000 hm²^[13-14]。但在实际的生产过程中,当归产量和品质的提升一直受到早薹开花、连作障碍和逆境胁迫等因素的制约^[14-16]。大量研究证实,当归产量和品质的形成主要受到基因表达调控的影响,比如,质量标志物阿魏酸的生物合成受到苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)、肉桂酸 4-羟化酶基因(*C4H*)、对香豆素酸 3-羟化酶基因(*C3H*)和咖啡酸 3-O-甲基转移酶基因(*COMT*)的调节^[15];早薹开花受到 *constans 1* 过表达抑制剂(*suppressor of overexpression of constans 1*, *SOC1*)、开花时间控制蛋白(*flowering time control protein FCA*, *FCA*)和早花 3 (*early flowering 3*, *ELF3*)等基因的调控^[16-19];逆境胁迫(如寒冷、干旱和病原体)受到乙烯反应性转录因子(*ethylene-responsive transcription factors*, *ERFs*)、冷反应蛋白激酶 1 (*cold-responsive protein kinase 1*, *CRPK1*)和促分裂原活化蛋白激酶(*mitogen-activated protein kinases*, *MPKs*)等基因的调控^[19]。因此,准确检测当归生长过程中的基因表达水平,对于产量和品质的促成具有重要作用。

目前, Northern 印迹、RNase 保护分析、原位杂交、半定量逆转录 PCR (semi-RT-PCR) 和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 等多种检测方法已被应用于检测动物、植物和微生物中基因的表达水平^[20]。其中, qRT-PCR 检测因其高效、灵敏和适用于不同样品而被广泛应用于评估基因的表达水平^[20]。在 qRT-PCR 实验中,内参基因通过控制潜在的实验误差,在规范靶基因的表达水平方面发挥着关键作用^[20-22]。肌动蛋白 (*Actin*, *ACT*)、泛素结合酶 (*ubiquitin-conjugating enzyme*, *UBC*)、核糖

体蛋白 Ls (ribosomal protein Ls, *RPLs*)、18S 核糖体 RNA (18S ribosomal RNA, *18S rRNA*)、含 NAC 结构域的蛋白质 (NAC domain-containing protein, *NAC*) 和伸长率 1-a (elongation factor 1-a, *EFL-a*) 等持家基因通常被选为 qRT-PCR 检测中的内参基因^[23]。例如穿心莲中的 *UBC*^[24],三叶木通和板蓝根中的 *EF-1 α* ^[25-26],以及延胡索中稳定表达的 *RPL7* 均是持家基因^[27]。

到目前为止,只有 *ACT*^[28]和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)^[29]被报道用于当归 qRT-PCR 检测中的内参基因。随着测序技术的快速发展,从当归中鉴定出越来越多的持家基因^[16-19, 30],这为选择稳定的内参基因奠定了基础。本研究基于当归全长转录组获得的 13 个候选基因和前期文献报道的 *ACT*,通过 qRT-PCR 检测和 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 ΔC_t 以及 RefFinder 软件分析,综合评估了 14 个候选内参基因在当归不同生长期、春化温度、组织部位以及抽薹/未抽薹植株中的稳定性。研究结果将为当归产量和品质形成过程中的基因表达分析提供重要参考。

1 材料和仪器

1.1 植物材料

本研究所用样品原植物由甘肃农业大学孙学刚教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels。样品采集详细信息见表 1。所有样品在 qRT-PCR 统一检测前, -80 °C 保存。

1.2 仪器

台式高速离心机 (德国 SORVAL 公司); ABI QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 Plant RNA Kit 试剂盒 (R6827, Omega 公

表 1 样品详细信息

Table 1 Detailed information of experimental samples

不同样品类型	样品具体信息	生物学重复	技术重复
不同生长发育时期	田间生长的 3 年生植株营养生长期 (S1)、营养生长至生殖生长过渡期 (S2)、抽薹初期 (S3)、抽薹伸长期 (S4) 的植株地上部分 ^[15, 18]	20	3
不同春化温度	未完成春化 (T1, 0 °C, 14 d)、完成春化 (T2, 0 °C, 60 d)、规避春化 (T3, -3 °C, 125 d) 的种苗茎顶端分生组织 ^[16, 31]	20	3
不同组织部位	温室生长 30 d 的叶、茎和根	9	3
抽薹/未抽薹植株	温室内种植的抽薹和未抽薹植株叶片和根 (1:1) 混合样品 ^[17]	20	3

司)提取总 RNA;使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计检测 RNA 样品浓度 (A_{260}/A_{280} 在 1.90~2.10);通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性;FastKing RT 试剂盒 (KR116, Tiangen) 合成 cDNA。

2.2 引物设计和 qRT-PCR 检测

基于当归全长转录组数据^[19] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA789039>),从中筛选出 13 个候选内参基因,利用 NCBI 中 Primer-BLAST 工具

设计引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;另外,还选择前期报道的 1 个 *ACT* 基因^[28],具体序列及产物长度见表 2。利用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒 (FP205, Tiangen) 进行 qRT-PCR 检测。利用 Excel 绘制标准曲线,横坐标 (X) 为 cDNA 稀释倍数的对数值,纵坐标 (Y) 为 C_t 值,得到标准曲线方程和线性相关系数 (R^2),根据标准曲线斜率值计算扩增效率^[32]。

表 2 qRT-PCR 分析引物序列

Table 2 Sequences of primer used in the qRT-PCR analysis

内参基因	Isoforms 号	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>ACT7</i>	Isoform0016078	F: TCCAGGCCGTTCTTTCACTC R: TCAGTCAGATCACGACCAGC	154
<i>UBC2</i>	Isoform0057795	F: CCAACAGTGCGTTTTGTGTCT R: GCAGGTGAATTTGGATTCTGGG	164
<i>UBC7</i>	Isoform0053782	F: GGGTTCAGCCTCTCAAGCAA R: TTGGGTAGTTGGGCGGAAAG	200
<i>UBC26</i>	Isoform0009132	F: GGAGCTCAAGTTGGCTGTCT R: TCCCTTCTGTGGAGGTGGAA	177
<i>UBC32</i>	Isoform0048917	F: GAAAGGCGTGTCTTGACAGT R: AGCATCCTGTGCAGAACCAA	144
<i>RPL3</i>	Isoform0021716	F: CTTGGAAAGACAGGGCAGGA R: CAGCAGAGACTGGCGAAGAG	180
<i>RPL37A</i>	Isoform0026020	F: AAGTGTACAGCACAGCAGA R: GGGAGGGCCAAAGACTCAAA	119
<i>RID2</i>	Isoform0049525	F: GCCAGAACTTCAAGCACCAC R: CGCTAAGCCCTGATCCACAA	185
<i>NAC071</i>	Isoform0026745	F: GCTTCCACCCTACCGATGAG R: CTCCATGTACCTTTTGGGA	159
<i>NAC078</i>	Isoform0017076	F: CCAGGAGGGCAGAACAATGA R: CGCAGTGACGTGGATTGAAC	195
<i>NAC087</i>	Isoform0009911	F: TATGGTCCCGATGCCAATCC R: CGTCCCAAGTTCCACAACCA	187
<i>REF1</i>	Isoform0037665	F: CCCTGTTGGACGTGTTGAGA R: TGAGGCAACATAACCACGCT	196
<i>EEF1G</i>	Isoform0037665	F: GTCCCAGCAGCCAAAAAGTC R: TCTGCCTTGGGCAATTCCTT	101
<i>ACT</i>	参考文献 ^[28]	F: TGGTATTGTGCTGGATTCTGGT R: TGAGATCACCACCAGCAAGG	109

2.3 数据分析

使用 Microsoft Office Excel 2010 进行数据处理,使用 geNorm^[33]、NormFinder^[34]、BestKeeper^[35]和 ΔCT ^[36]软件对候选内参基因的表达稳定性进行分析,利用 RefFinder 在线网站综合评价内参基因^[37],采用 SPSS 22.0 软件进行 One-Way ANOVA Duncan 数据差异性分析 ($P < 0.05$)。

2.4 候选内参基因的验证

为了验证所选内参基因表达的稳定性,针对 2 个关键基因 *SOC1* 和 *CAD1* 在当归 4 个不同生长发育时期 (S1~S4) 的表达水平进行比较。*SOC1*

是花器官分生组织形成过程中的关键基因,可通过整合外界环境和内在因素等各种成花途径信号,激活下游花器官发育所需的基因促进植株开花^[38]。*CAD1* 可参与催化香豆醛形成松柏醇,然后聚合形成木质素^[39]。qRT-PCR 检测同“2.2”项,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达水平^[40-42]。

3 结果与分析

3.1 引物验证

对当归各组织 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,发现均具有 28 S RNA、18 S RNA 2 条明显清晰的条带,且没有消失或弥散现象 (图 1),说明

RNA 没有降解,完整性良好,符合后续实验要求。qRT-PCR 结果显示,14 个候选内参基因扩增效率在 96.31%~108.71%,相关系数在 0.953 2~0.999 1 (表 3)。同时,每个引物的熔解曲线均为特异的

单一扩增峰(图 2),没有产生引物二聚体,表明这 14 个候选内参基因均具有良好的特异性,反应专一性高,符合 qRT-PCR 引物标准,可以进行后续实验。

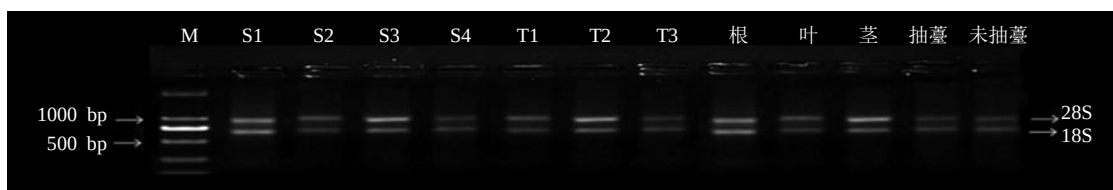


图 1 不同样本总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from different samples

表 3 候选内参基因的标曲方程、扩增效率及相关系数

Table 3 Scalar equations, amplification efficiencies and correlation coefficients of candidate reference genes

内参基因	标曲方程	扩增效率/%	R^2
<i>ACT7</i>	$Y = -2.3538X + 24.28$	98.13	0.9925
<i>UBC2</i>	$Y = -2.2985X + 21.20$	101.42	0.9836
<i>UBC7</i>	$Y = -2.3317X + 21.84$	99.42	0.9848
<i>UBC26</i>	$Y = -2.2479X + 25.63$	104.62	0.9532
<i>UBC32</i>	$Y = -2.3860X + 26.07$	96.31	0.9981
<i>RPL3</i>	$Y = -2.3538X + 23.07$	98.13	0.9930
<i>RPL37A</i>	$Y = -2.1875X + 29.67$	108.71	0.9891
<i>RID2</i>	$Y = -2.2485X + 27.57$	104.58	0.9670
<i>NAC071</i>	$Y = -2.3206X + 28.20$	100.08	0.9906
<i>NAC078</i>	$Y = -2.3483X + 27.57$	98.45	0.9991
<i>NAC087</i>	$Y = -2.3033X + 27.26$	101.12	0.9835
<i>REF1A</i>	$Y = -2.3675X + 24.22$	97.35	0.9967
<i>EEF1G</i>	$Y = -2.3349X + 26.50$	99.23	0.9956
<i>ACT</i>	$Y = -2.3799X + 26.09$	96.65	0.9956

3.2 候选内参基因 C_t 值分析

在基因表达分析中, C_t 值是反映基因表达丰度的一个重要参数, C_t 值越低, 基因的表达量越高^[31]。将荧光定量结果值绘制成箱线图, 箱宽代表数据的波动程度, 箱线长度则反应基因的稳定性, 图 3 结果显示, 14 个候选基因 C_t 值分布在 18.32~32.99, 其中, *RPL37A* 的波动幅度最小, 其次是 *UBC32* 和 *RID2*; 相反, *REF1A* 的波动幅度最大, 表明其稳定性最差。

3.3 geNorm 分析

利用 geNorm 计算候选内参基因平均稳定值 (M), M 值越小, 基因表达越稳定 (M 值小于 1.5 为阈值)^[33]。图 4 结果显示, 14 个候选内参基因所有 M 值均低于 1.5, 表明这 14 个基因表达均相对稳定, 进而可以初步用作候选基因。geNorm 软件评

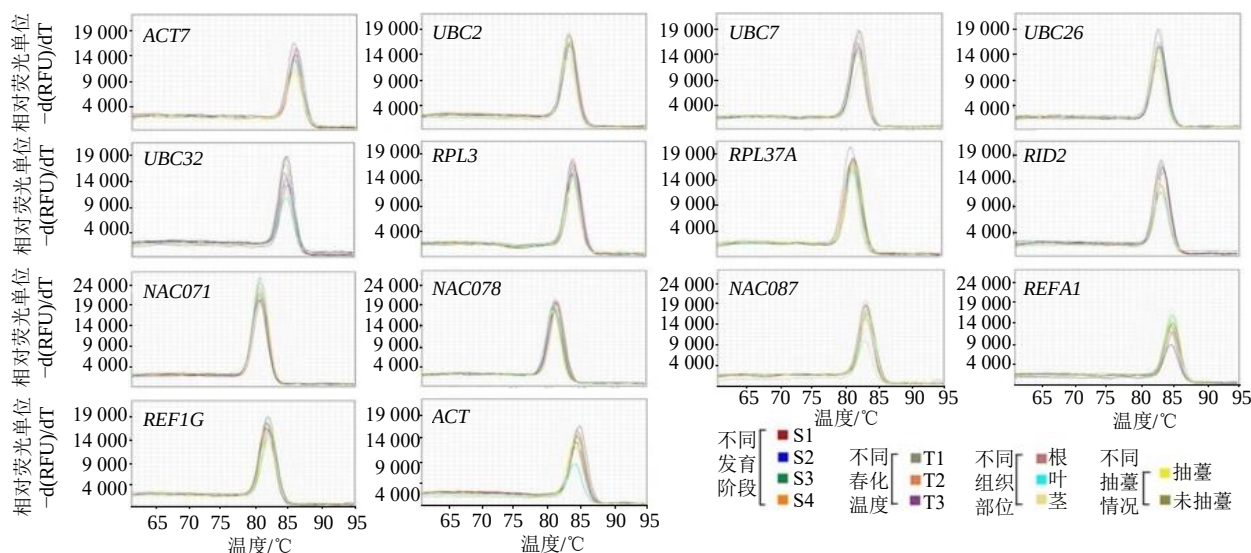
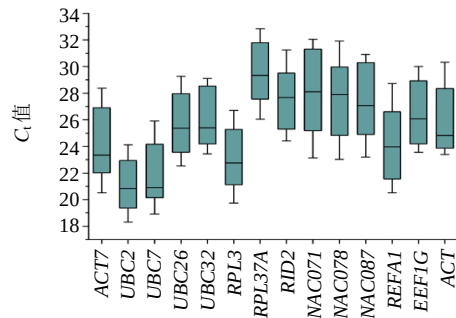


图 2 14 个候选内参基因溶解曲线

Fig. 2 Melting curves of 14 candidate reference genes

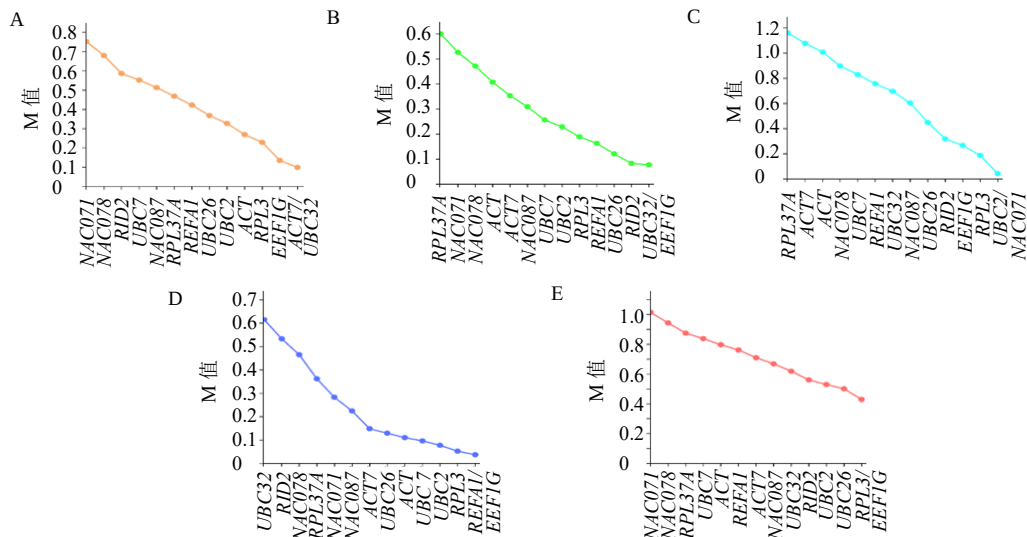


箱部中线表示中位数, 箱部上方-上四分位数, 箱部下方-下四分位数, 箱部上方上线-最大值, 箱部下方下线-最小值。

Box center-median, Box top-upper quartile, Box bottom-lower quartile, Box top line-maximum, Box bottom line-minimum.

图 3 候选内参基因 C_t 值分布

Fig. 3 C_t value distribution of candidate reference genes



A-不同发育阶段, B-不同春化温度, C-不同组织部位, D-抽薹和未抽薹植株, E-所有实验样品。

A-different developmental stages, B-different vernalization temperatures, C-different tissue parts, D-bolted and unbolted plants, E-all the experimental samples.

图 4 geNorm 分析候选内参基因表达稳定性

Fig. 4 Expression stability of candidate reference genes analyzed by geNorm

标准化因子的配对差异分析 (V_n/V_{n+1}) 来选择内参基因的最佳数目, $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时表示 n 个内参基因已经满足稳定归一化^[33, 35]。图 5 结果显示, 除了 V_2/V_3 (0.165) 中所有样品组外, 几乎所有的配对变异值均小于 0.15, 表明 2 个内参基因足以满足当归 qRT-PCR 定量分析结果的可靠性。

3.4 NormFinder 分析

NormFinder 分析是利用 M 值对候选内参基因进行排序, M 值越低, 内参基因越稳定^[34, 43]。表 4 结果显示, 14 个候选内参基因的稳定性值存在显著

差异, 在 4 个不同生长发育时期样品中, *ACT7* 和 *UBC32* 的 M 值最低 (0.10), 表达最稳定, 而 *NAC071* 的 M 值最高 (0.75, 图 4-A); 在不同春化温度样品中, *UBC32* 和 *EEFIG* 的 M 值最低 (0.07), 而 *RPL37A* 的 M 值最高 (0.60, 图 4-B); 在不同组织部位样品中, *UBC2* 和 *NAC071* 的 M 值最低 (0.04), 而 *RPL37A* 的 M 值最高 (1.16, 图 4-C); 在抽薹/未抽薹植株样品中, *REF1* 和 *EEFIG* 的 M 值最低 (0.04), 而 *UBC32* 的 M 值最高 (0.62, 图 4-D); 在所有实验样品中, *RPL3* 和 *EEFIG* 的 M 值最低 (0.43), 而 *NAC071* 的 M 值最高 (1.02, 图 4-E)。基于 geNorm 分析, *EEFIG*、*UBC2*、*ACT7*、*REF1* 和 *RPL3* 表现出相对较高的稳定性。

为获得更可靠的评价结果, 利用候选内参基因

差异, *ACT7*、*REF1*、*UBC26* 和 *UBC7* 分别为不同生长发育时期、春化温度、组织部位、抽薹/未抽薹植株中最稳定的内参基因; 而 *EEFIG* 为所有样品中最稳定的内参基因, 其次是 *UBC26* 和 *RPL3*。NormFinder 分析的 14 个候选内参基因的稳定性与 geNorm 分析 M 值基本一致。

3.5 BestKeeper 分析

BestKeeper 分析是根据相关系数、标准偏差和 RSD 判断候选基因稳定性, 相关系数越高, 标准偏差和 RSD 越小, 基因越稳定, 但标准偏差大于 1

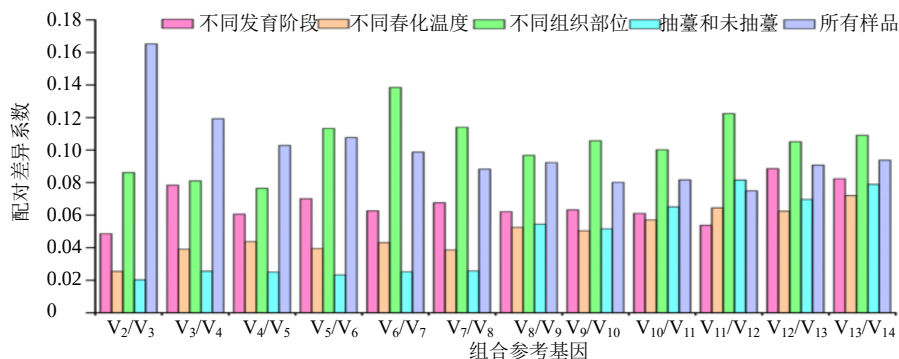


图 5 geNorm 分析候选内参基因配对变异系数

Fig. 5 Coefficients of paired variation of candidate reference genes analyzed by geNorm

表 4 NormFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

Table 4 Expression stability of candidate reference genes calculated by NormFinder

内参基因	发育阶段 (排序)	春化温度 (排序)	组织部位 (排序)	抽薹和未抽薹 (排序)	所有样品 (排序)
<i>ACT7</i>	0.149 (1)	0.592 (11)	1.425 (13)	0.032 (5)	0.647 (8)
<i>UBC2</i>	0.422 (6)	0.141 (5)	0.762 (9)	0.024 (4)	0.622 (7)
<i>UBC7</i>	0.457 (7)	0.215 (8)	0.929 (10)	0.020 (1)	0.954 (12)
<i>UBC26</i>	0.171 (2)	0.123 (3)	0.170 (1)	0.254 (8)	0.423 (2)
<i>UBC32</i>	0.193 (3)	0.080 (2)	0.540 (5)	1.098 (14)	0.603 (6)
<i>RPL3</i>	0.518 (8)	0.169 (6)	0.640 (6)	0.021 (3)	0.445 (3)
<i>RPL37A</i>	0.757 (12)	1.001 (14)	1.508 (14)	0.766 (11)	0.899 (11)
<i>RID2</i>	0.591 (10)	0.129 (4)	0.449 (3)	0.977 (13)	0.566 (5)
<i>NAC071</i>	1.144 (14)	0.872 (13)	0.757 (8)	0.486 (10)	1.299 (14)
<i>NAC078</i>	1.046 (13)	0.756 (12)	1.216 (11)	0.967 (12)	1.069 (13)
<i>NAC087</i>	0.418 (5)	0.514 (9)	0.520 (4)	0.393 (9)	0.508 (4)
<i>REF1</i>	0.546 (9)	0.052 (1)	0.674 (7)	0.169 (7)	0.749 (9)
<i>EEF1G</i>	0.282 (4)	0.187 (7)	0.401 (2)	0.105 (6)	0.230 (1)
<i>ACT</i>	0.627 (11)	0.534 (10)	1.420 (12)	0.020 (2)	0.821 (10)

则认为该基因不稳定^[44]。表 5 结果显示, 14 个候选内参基因的稳定性存在显著差异, *RPL37A*、*NAC078*、*NAC078* 和 *NAC071* 分别为不同发育阶段、春化温度、组织部位、抽薹/未抽薹植株中最稳定的内参基因; 而 *UBC2* 为所有样品中最稳定的内参基因, 其次是 *UBC32* 和 *UBC7*。但 BestKeeper 分析的 14 个候选内参基因的稳定性与 geNorm 和 NormFinder 分析结果不一致。

3.6 ΔC_t 分析

ΔC_t 分析是通过平均标准偏差对候选基因进行排序, 平均标准偏差越低, 内参基因越稳定^[36]。表 6 结果显示, 14 个候选内参基因的稳定性值存在显著差异, *ACT7*、*REF1*、*UBC26* 和 *UBC7* 分别为不同发育阶段、春化温度、组织部位、抽薹/未抽薹植株中最稳定的内参基因; 而 *EEF1G* 为所有样品中最稳定的内参基因, 其次是 *UBC26* 和 *RPL3*。 ΔC_t 分析的 14 个候选内参基因的稳定性与 geNorm 和 NormFinder 分析结果基本一致。

3.7 RefFinder 分析

RefFinder 软件是基于 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 ΔC_t 软件的排序值的几何平均数进行整体排序来确定候选内参基因的稳定性^[45]。表 7 结果显示, 14 个候选内参基因的稳定性值存在显著差异, *ACT7*、*UBC32*、*UBC26* 和 *UBC7* 分别为不同发育阶段、春化温度、组织部位、抽薹/未抽薹植株中最稳定的内参基因; 而 *EEF1G* 为所有样品中最稳定的内参基因, 其次是 *RPL3* 和 *UBC26*。RefFinder 分析的 14 个候选内参基因的稳定性与 NormFinder 和 ΔC_t 分析结果一致。结合 C_t 值、geNorm、NormFinder、BestKeeper、 ΔC_t 和 RefFinder 分析结果, 可以选择 *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 作为内参基因, 用于评估当归不同材料中的基因表达水平。

3.8 内参基因的稳定性验证

为了验证所选内参基因的可靠性, 选取最稳定的 3 个内参基因 *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 以及最不稳定的 2 个内参基因 *NAC071* 和 *NAC078*, 对 2 个

表 5 BestKeeper 分析候选内参基因的表达稳定性

Table 5 Expression stability of candidate reference genes calculated by BestKeeper

内参基因	发育阶段 (排序)	春化温度 (排序)	组织部位 (排序)	抽薹和未抽薹 (排序)	所有样品 (排序)
<i>ACT7</i>	1.675 (6)	0.994 (13)	1.835 (13)	0.335 (5)	2.365 (10)
<i>UBC2</i>	1.548 (3)	0.513 (4)	0.730 (4)	0.443 (8)	1.761 (1)
<i>UBC7</i>	2.027 (10)	0.591 (7)	1.562 (12)	0.409 (7)	1.962 (3)
<i>UBC26</i>	1.800 (9)	0.705 (9)	0.961 (6)	0.588 (12)	2.008 (5)
<i>UBC32</i>	1.691 (7)	0.564 (5)	1.438 (10)	0.333 (4)	1.908 (2)
<i>RPL3</i>	1.565 (4)	0.766 (11)	0.580 (2)	0.487 (9)	2.010 (6)
<i>RPL37A</i>	1.434 (1)	1.232 (14)	1.002 (8)	0.119 (3)	1.983 (4)
<i>RID2</i>	2.039 (11)	0.630 (8)	0.987 (7)	1.041 (14)	2.129 (7)
<i>NAC071</i>	2.417 (14)	0.245 (2)	0.699 (3)	0.059 (1)	3.049 (14)
<i>NAC078</i>	2.403 (13)	0.186 (1)	0.256 (1)	1.034 (13)	2.750 (13)
<i>NAC087</i>	2.070 (12)	0.983 (12)	1.273 (9)	0.116 (2)	2.434 (11)
<i>REFA1</i>	1.767 (8)	0.719 (10)	1.445 (11)	0.543 (11)	2.488 (12)
<i>EEF1G</i>	1.608 (5)	0.578 (6)	0.858 (5)	0.516 (10)	2.153 (8)
<i>ACT</i>	1.479 (2)	0.289 (3)	1.876 (14)	0.381 (6)	2.325 (9)

表 6 ΔC_t 分析候选内参基因的表达稳定性Table 6 Expression stability of candidate reference genes calculated by ΔC_t

内参基因	发育阶段 (排序)	春化温度 (排序)	组织部位 (排序)	抽薹和未抽薹 (排序)	所有样品 (排序)
<i>ACT7</i>	0.540 (1)	0.699 (11)	1.543 (12)	0.44 (6)	0.959 (8)
<i>UBC2</i>	0.677 (5)	0.471 (6)	1.038 (8)	0.414 (2)	0.932 (7)
<i>UBC7</i>	0.727 (8)	0.499 (8)	1.235 (10)	0.414 (1)	1.152 (12)
<i>UBC26</i>	0.581 (4)	0.444 (3)	0.897 (1)	0.493 (8)	0.826 (2)
<i>UBC32</i>	0.549 (2)	0.444 (2)	1.006 (6)	1.105 (14)	0.923 (6)
<i>RPL3</i>	0.679 (6)	0.456 (5)	0.985 (4)	0.423 (4)	0.843 (3)
<i>RPL37A</i>	0.872 (12)	1.038 (14)	1.661 (14)	0.826 (11)	1.137 (11)
<i>RID2</i>	0.820 (11)	0.448 (4)	0.938 (3)	0.986 (13)	0.914 (5)
<i>NAC071</i>	1.190 (14)	0.900 (13)	1.033 (7)	0.632 (10)	1.444 (14)
<i>NAC078</i>	1.111 (13)	0.805 (12)	1.391 (11)	0.978 (12)	1.269 (13)
<i>NAC087</i>	0.711 (7)	0.634 (9)	1.005 (5)	0.583 (9)	0.903 (4)
<i>REFA1</i>	0.753 (10)	0.432 (1)	1.063 (9)	0.454 (7)	1.037 (9)
<i>EEF1G</i>	0.573 (3)	0.472 (7)	0.900 (2)	0.436 (5)	0.786 (1)
<i>ACT</i>	0.747 (9)	0.652 (10)	1.543 (13)	0.420 (3)	1.080 (10)

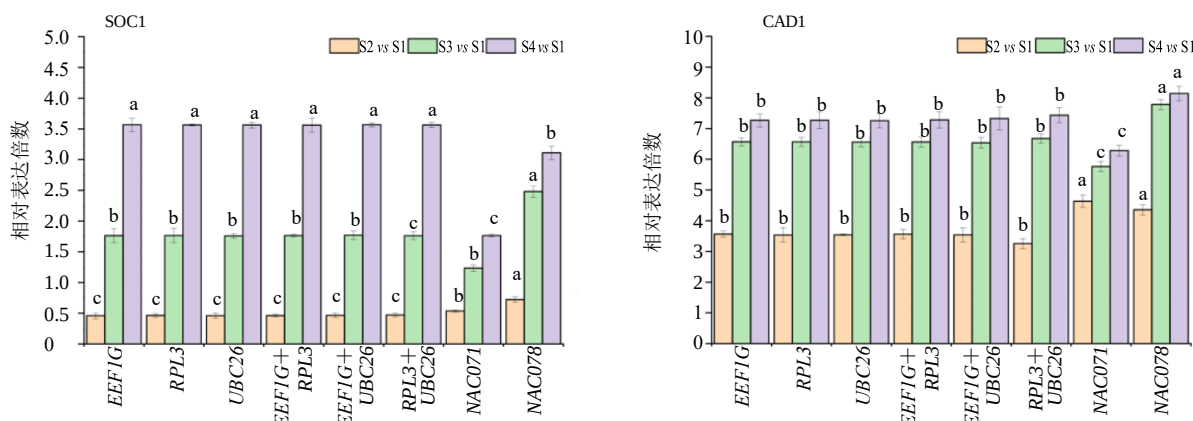
表 7 RefFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

Table 7 Expression stability of candidate reference genes calculated by RefFinder

内参基因	发育阶段 (排序)	春化温度 (排序)	组织部位 (排序)	抽薹和未抽薹 (排序)	所有样品 (排序)
<i>ACT7</i>	1.565 (1)	1.199 (13)	12.742 (14)	5.886 (8)	8.459 (8)
<i>UBC2</i>	4.821 (5)	5.384 (6)	4.120 (5)	4.000 (3)	3.742 (4)
<i>UBC7</i>	8.859 (11)	7.737 (10)	10.446 (11)	2.432 (1)	8.303 (7)
<i>UBC26</i>	4.738 (4)	4.243 (4)	2.449 (1)	8.563 (11)	2.783 (3)
<i>UBC32</i>	2.546 (2)	2.115 (1)	6.999 (9)	10.236 (12)	4.559 (5)
<i>RPL3</i>	5.264 (6)	6.671 (8)	3.464 (3)	4.243 (5)	2.711 (2)
<i>RPL37A</i>	6.000 (8)	14.000 (14)	12.172 (12)	7.949 (10)	8.730 (9)
<i>RID2</i>	10.977 (12)	4.427 (5)	4.213 (6)	13.243 (14)	5.439 (5)
<i>NAC071</i>	14.000 (14)	8.142 (11)	3.600 (4)	5.623 (7)	14.000 (14)
<i>NAC078</i>	13.000 (13)	6.447 (7)	6.040 (8)	12.243 (13)	13.000 (13)
<i>NAC087</i>	8.050 (9)	9.671 (12)	5.958 (7)	6.179 (9)	5.925 (6)
<i>REFA1</i>	8.712 (10)	2.659 (2)	8.887 (10)	4.818 (6)	9.671 (10)
<i>EEF1G</i>	3.663 (3)	4.141 (3)	2.991 (2)	4.162 (4)	1.682 (1)
<i>ACT</i>	5.609 (7)	7.579 (9)	12.724 (13)	3.834 (2)	9.740 (11)

关键基因 *SOC1* 和 *CAD1* 在当归 4 个不同生长发育时期样品中的相对表达水平进行验证。图 6 结果显示,在单个内参基因 *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 以及 *EEF1G*+*RPL3*、*EEF1G*+*UBC26* 和 *RPL3*+*UBC26* 组合之间, *SOC1* 和 *CAD1* 表达水平没有显

著差异,但单基因 *NAC071* 和 *NAC078* 过低评估了目的基因的表达,不能准确呈现基因的表达水平。以上结果表明,以最稳定的 3 个基因 *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 及其组合,可作为当归不同材料中的内参基因。



不同小写字母代表同一时期不同基因或组合之间达到显著差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$) among different genes or combinations for the same stage.

图 6 *SOC1* 和 *CAD1* 在当归不同生长发育时期的表达稳定性分析

Fig. 6 Stability analysis of *SOC1* and *CAD1* expression in *Angelica sinensis* at different growth and development stages

4 讨论

当归是我国常用大宗药材,生物和非生物因素显著影响植株生长和药效成分生物合成,该过程受到生长和代谢相关基因表达的调控^[17-18, 46]。因此,准确检测关键基因的表达水平对于提高当归体内生物活性代谢产物的积累至关重要。鉴于目前当归仅有 2 个内参基因 *ACT* 和 *GAPDH* 可供选择的现状^[28-29],本研究借助前期当归全长转录组测序结果,通过 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 ΔC_t 和 RefFinder 软件分析和验证,从 14 个候选内参基因中筛选得到最稳定的 3 个基因 *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26*。

目前,geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 分析已广泛应用于筛选植物中的最适内参基因,比如,研究发现 *CYP* 和 *EF-1a* 适合作为人参的内参基因^[47], *ACT5*、*RPL3* 和 *18S rRNA* 是羊躑躅中表达最稳定的内参基因组合^[20], *EF1-a*、*UBC* 和 *ACT* 是牛膝中表达最稳定的内参基因组合^[48]。在本研究中,应用 C_t 值、geNorm、NormFinder、BestKeeper、 ΔC_t 和 RefFinder 软件筛选当归不同材料中最稳定的内参基因,结果发现,利用相同的方法,不同样品中 14 个候选内参基因的稳定性存在差异,例如,在 geNorm 分析中,不同发育阶段、春化温度、组织

部位、抽薹/未抽薹植株稳定性较高的基因分别为 *ACT7* 和 *UBC32*、*UBC32* 和 *EEF1G*、*UBC2* 和 *NAC071*、以及 *REF1A* 和 *EEF1G*;在 NormFinder 和 ΔC_t 分析中, *ACT7*、*REF1A* 和 *UBC26* 表达最稳定;在 BestKeeper 分析中, *RPL37A*、*NAC078* 和 *NAC078* 表达最稳定;在 RefFinder 分析中, *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 表达最稳定。

由于不同组织和器官以及不同生长条件下的基因表达存在明显差异^[49],因此,有必要找出最稳定的内参基因组合,确保基因表达水平在面对不同的样品时更加准确。目前,候选内参基因在多个药用植物中的表达稳定性已有研究报道,例如, *EF-1a* 与 *18S rRNA* 是铁皮石斛不同组织部位中最稳定的内参基因组合^[50]; *UBC* 与 *ACT* 是甘青青兰中响应干旱胁迫时最稳定的内参基因组合^[51]; *ACT* 与 *18S rRNA* 是青蒿中响应镉胁迫时最稳定的内参基因组合^[52]。本研究通过验证发现, *EEF1G*、*RPL3* 和 *UBC26* 任意二者组合,可用于准确评估当归不同材料中的基因表达水平。研究结果将为进一步检测当归产量和品质形成过程中的基因表达提供重要参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang H Y, Bi W G, Yu Y, et al. *Angelica sinensis* (Oliv.)

- Diels in China: Distribution, cultivation, utilization and variation [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2012, 59(4): 607-613.
- [2] 刘迪, 崔秀文, 黄天苗, 等. 当归抽薹开花过程中赤霉素代谢水平及其关键酶基因克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 222-234.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 139.
- [4] Wei W L, Zeng R, Gu C M, *et al.* *Angelica sinensis* in China—a review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 116-141.
- [5] Hua Y L, Xue W X, Zhang M, *et al.* Metabonomics study on the hepatoprotective effect of polysaccharides from different preparations of *Angelica sinensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(3): 1090-1099.
- [6] Han Y, Chen Y, Zhang Q, *et al.* Overview of therapeutic potentiality of *Angelica sinensis* for ischemic stroke [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153652.
- [7] Hu Q, Wu C Y, Yu J T, *et al.* *Angelica sinensis* polysaccharide improves rheumatoid arthritis by modifying the expression of intestinal Cldn5, Slit3 and Rgs18 through gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209(Pt A): 153-161.
- [8] Zhang L A, Du J R, Wang J, *et al.* Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP *Ex vivo* and arterio-venous shunt thrombosis *in vivo* in rats [J]. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2009, 129(7): 855-859.
- [9] Wang J, Du J R, Wang Y, *et al.* Z-ligustilide attenuates lipopolysaccharide-induced proinflammatory response via inhibiting NF-kappaB pathway in primary rat microglia [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(7): 791-797.
- [10] Saw C L L, Wu Q, Su Z Y, *et al.* Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2013, 34(6): 303-311.
- [11] Upton R. American herbal pharmacopoeia and therapeutic compendium: Dang Gui root-*Angelica sinensis* (Oliv.) [M]. American Herbal Pharmacopoeia: Scotts Valley, CA, USA, 2003: 1-41.
- [12] Long Y, Li D, Yu S, *et al.* Medicine-food herb: *Angelica sinensis*, a potential therapeutic hope for Alzheimer's disease and related complications [J]. *Food Funct*, 2022, 13(17): 8783-8803.
- [13] 晋玲. 当归生产加工适宜技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 2.
- [14] 栗孟飞, 康天兰, 晋玲, 等. 当归抽薹开花及其调控途径研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5894-5899.
- [15] Li M L, Cui X W, Jin L, *et al.* Bolting reduces ferulic acid and flavonoid biosynthesis and induces root lignification in *Angelica sinensis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 170: 171-179.
- [16] Liu X X, Luo M M, Li M F, *et al.* Transcriptomic analysis reveals LncRNAs associated with flowering of *Angelica sinensis* during vernalization [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2022, 44(5): 1867-1888.
- [17] Li M F, Li J E, Wei J H, *et al.* Transcriptional controls for early bolting and flowering in *Angelica sinensis* [J]. *Plants*, 2021, 10(9): 1931.
- [18] Li J, Li M L, Zhu T, *et al.* Integrated transcriptomics and metabolites at different growth stages reveals the regulation mechanism of bolting and flowering of *Angelica sinensis* [J]. *Plant Biol*, 2021, 23(4): 574-582.
- [19] Luo M M, Liu X X, Su H Y, *et al.* Regulatory networks of flowering genes in *Angelica sinensis* during vernalization [J]. *Plants*, 2022, 11(10): 1355.
- [20] Xiao Z, Sun X B, Liu X Q, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. don [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1547.
- [21] Banda M, Bommineni A, Thomas R A, *et al.* Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR [J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2008, 649(1/2): 126-134.
- [22] Chi X Y, Hu R B, Yang Q L, *et al.* Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(2): 167-176.
- [23] Pierzchała M, Pareek C, Urbański P, *et al.* Selection of reference genes for gene expression studies in porcine hepatic tissue using quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Anim Sci Pap Rep*, 2011, 29(1): 53-63.
- [24] 李竹君, 郭健雄, 李永文, 等. 穿心莲实时定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(2): 240-244.
- [25] 杨航, 刘红昌, 石小兵, 等. 三叶木通果实成熟过程内参基因筛选 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(5): 1206-1212.
- [26] Qu R J, Miao Y J, Cui Y J, *et al.* Selection of reference genes for the quantitative real-time PCR normalization of gene expression in *Isatis indigotica fortune* [J]. *BMC Mol Biol*, 2019, 20(1): 1-12.
- [27] Su X, Lu L Y, Li Y S, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) expression

- analysis in *Galium aparine* L [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0226668.
- [28] Xu R, Xu J, Li Y C, *et al.* Integrated chemical and transcriptomic analyses unveils synthetic characteristics of different medicinal root parts of *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(1): 19-28.
- [29] Yu G, Zhou Y, Yu J J, *et al.* Transcriptome and digital gene expression analysis unravels the novel mechanism of early flowering in *Angelica sinensis* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10035.
- [30] Zhu T T, Zhang M H, Su H Y, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals differential mechanism of flavonoid biosynthesis in two cultivars of *Angelica sinensis* [J]. *Molecules*, 2022, 27(1): 306.
- [31] Liu X X, Luo M M, Li M F, *et al.* Depicting precise temperature and duration of vernalization and inhibiting early bolting and flowering of *Angelica sinensis* by freezing storage [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 853444.
- [32] Radonić A, Thulke S, MacKay I M, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 856-862.
- [33] 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): 34.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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: 33.
- [37] Su W B, Yuan Y, Zhang L, *et al.* Selection of the optimal reference genes for expression analyses in different materials of *Eriobotrya japonica* [J]. *Plant Meth*, 2019, 15(1): 1-11.
- [38] Lee J, Oh M, Park H, *et al.* SOC₁ translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY* [J]. *Plant J*, 2008, 55(5): 832-843.
- [39] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, *et al.* Lignin biosynthesis and structure [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 895-905.
- [40] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [41] Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates [J]. *Anal Biochem*, 2008, 379(1): 127-129.
- [42] Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, *et al.* A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR [J]. *J Mol Diagn*, 2001, 3(2): 55-61.
- [43] Han X J, Lu M Z, Chen Y C, *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): e43084.
- [44] Gantasala N P, Papolu P K, Thakur P K, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L) [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6: 312.
- [45] Xie F L, Xiao P, Chen D L, *et al.* miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. *Plant Mol Biol*, 2012: 80(1):75-84.
- [46] 叶友杰, 谢德金, 杨德明, 等. 巴戟天实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 1060-1068.
- [47] Liu J, Wang Q, Sun M Y, *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.
- [48] Li J T, Han X P, Wang C, *et al.* Validation of suitable reference genes for RT-qPCR data in *Achyranthes bidentata* blume under different experimental conditions [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 776.
- [49] 李杨松, 刘希贤, 王珑静, 等. 单枝味连不同组织部位生物碱含量与其商品等级关联研究 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2566-2579.
- [50] 张岗, 赵明明, 张大为, 等. 铁皮石斛实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1664-1668.
- [51] 么郡郡. 甘青青兰泛素连接酶 *DiE3* 基因的克隆及抗性研究 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2021.
- [52] 周良云, 莫歌, 王升, 等. 基于实时荧光定量 PCR 对镉处理下黄花蒿内参基因稳定性的分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 777-784.