

杉木实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择

张颖¹, 陈婉婷¹, 陈冉红¹, 帅鹏^{1,2}, 李明^{1,2*}

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 国家林业和草原局杉木工程技术研究中心, 福建 福州 350002)

摘要: [目的] 筛选适用于杉木不同组织荧光定量 PCR 分析的稳定内参基因, 提高杉木实时荧光定量 PCR 试验准确性, 为杉木体内各个基因表达分析提供合适内参基因。 [方法] 通过实时荧光定量 PCR 获取 *GAPDH*、*EF1 α* 、*18S rRNA*、*28S rRNA*、*UBQ*、*UBC* 与 *Actin* 7 个候选内参基因在杉木无性系的根、茎和叶中的溶解曲线与 Ct 值; 利用软件 *geNorm*、*Normfinder* 和 *BestKeeper* 对候选内参基因的表达稳定性进行评价; 通过分析 2 个纤维素合酶基因 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 在杉木不同组织部位的相对表达情况, 对候选内参基因的稳定性进行验证。 [结果] *geNorm*、*Normfinder* 和 *BestKeeper* 分析结果均表明: 在杉木根和茎中最稳定的内参基因是 *EF1 α* 和 *Actin*; *geNorm*、*Normfinder* 结果显示杉木叶中稳定的内参基因是 *UBQ* 和 *EF1 α* , *BestKeeper* 显示杉木叶中最稳定合适内参基因是 *EF1 α* 和 *Actin*。以 *Actin* 与 *EF1 α* 作为内参基因, 荧光定量 PCR 分析表明, *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 基因的相对表达量在杉木不同组织中均有所不同, *ClCesA2* 的相对表达量在各个组织中均高于 *ClCesA1*。以不同内参基因作为试验内参基因分析 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 的表达情况得到, *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 在各个组织中的相对表达量排序主要为茎 > 叶 > 根。 [结论] 7 个候选内参基因中, 杉木不同组织中稳定表达的为 *Actin* 与 *EF1 α* , 适合作为表达分析的内参基因; *28S rRNA* 的表达稳定性低, 不适合作为杉木定量 PCR 分析的理想内参基因。

关键词: 杉木; 荧光定量; 内参基因; *BestKeeper*

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)02-0065-08

实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 是一种高精度、高通量地检测目的基因表达水平的稳定方法, 在现代分子生物学研究中的应用十分广泛。但是, 实时荧光定量 PCR 实验很容易受 RNA 质量、上样量、逆转录效率等的试验误差干扰, 这就需要内参基因 (Internal reference gene) 作为参照物来校正样品间的试验误差^[1-4]。内参基因的表达量越稳定, 越能更好地检测目的基因的特异性表达水平^[5-8]。针对不同的植物种类和组织部位, 前人对内参基因的选择进行了较多研究^[9-13]。大量研究表明, 内参基因的表达稳定性是相对的, 在植物的不同品种、组织部位和试验条件下表达的稳定性差异较大^[14-16]。因此, 筛选和评估内参基因表达的稳定性, 建立多内参基因的评价体系, 是提高实时荧光定量 PCR 试验准确性的重要保证。

杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) 是我国重要的针叶速生用材树种之一, 具有速生、丰

产、材质优良等特点, 在我国南方地区有广泛的栽培和利用。随着分子生物学的发展, 目前针对杉木的转录组测序、基因克隆和 microRNA 功能研究越来越多, 这些研究涉及到使用荧光定量 PCR 技术检测目的基因的表达情况^[17-18]。在荧光定量 PCR 实验中, 前人在对杉木内参基因的选择上各不相同, *EF1 α* 、*Actin*、*28S rRNA* 等被选用, 但是对杉木在不同组织中内参基因的筛选和表达稳定性研究极少^[19-20]。筛选和评估内参基因表达的稳定性, 是保证杉木荧光定量 PCR 准确性的重要前提。本文通过对比分析杉木中甘油醛三磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*)、转录延伸因子 (*EF1 α*)、18S 核糖体 RNA 基因 (*18S rRNA*)、28S 核糖体 RNA 基因 (*28S rRNA*)、泛素基因 (*UBQ*)、泛素结合酶基因 (*UBC*) 以及肌动蛋白基因 (*Actin*) 这 7 个传统的内参基因的稳定性, 挑选出可作为杉木在不同组织中基因表达分析所用的内参基因, 并通过杉木纤维素合酶基因 *ClCesA1* 和

收稿日期: 2018-01-09 修回日期: 2018-11-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31500541); 国家自然科学基金海峡联合基金项目(U1405211)

* 通讯作者: 李明. E-mail: limingly@126.com。

CiCesA2 的表达分析验证内参基因的表达稳定性,筛选出适合杉木的多内参基因的评价体系,为提高杉木实时荧光定量 PCR 试验准确性提供基础背景校正的参照值。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料采自国家林业和草原局杉木工程技术研究中心。选取1年生沙培30 d的杉木无性系幼苗的根、茎和叶为试验材料,采集幼嫩的根、茎和叶组织样品,用液氮冷冻后放 -80°C 冰箱保存。

1.2 内参基因的选择与特异性引物的设计

选取目前常用的内参基因为本试验的候选内参基因,分别是甘油醛三磷酸脱氢酶 GAPDH、转录延伸因子 EF1 α 、18S rRNA、28S rRNA、泛素 UBQ、泛素结合酶 UBC 以及肌动蛋白 Actin。在现有杉木转录组数据中筛选获得杉木候选内参基因的核心序列,杉木纤维素合酶基因 *CiCesA1* 序列来自文献[21],*CiCesA2* 基因由课题组自行克隆获得核心序列。根据各基因核心序列,使用 MEGA6.0 设计各个基因荧光定量 PCR 引物,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

表1 候选内参基因与 *CiCesA1*、*CiCesA2* 的引物序列

Table 1 Primer sequences of the candidate reference genes and *CiCesA1*, *CiCesA2*

基因名称 gene name	引物序列 Primer sequence(5' to 3')	退火温度 TM/ $^{\circ}\text{C}$	GC 含量 GC content/%
<i>GAPDH</i>	F:GCACCTATGTTTCTGGTTGGAGTA	57.9	45.8
	R:ACCGTCTTCTGTAGCTCTTGT	57.9	45.8
<i>UBQ</i>	F:AATAAATGCTTCAAATGTCAGGCTA	53.0	32.0
	R:TGAGATGGTCTGGTGATGTCGTGG	61.3	54.2
18S rRNA	F:GGGAACATTATCACGGACAGCATCAAC	61.1	48.1
	R:TGCGACTAATGGTCCAGATAGACTCCT	61.1	48.1
28S rRNA	F:AGTTTGTAGAAGCGTCTCAG	55.6	47.6
	R:GGGCCCCCTCCA	50.0	78.6
<i>EF1α</i>	F:TGGCAAGGAGCTTGAGAAAGAACCCA	61.2	50.0
	R:ACCCCAACAGCAACAGTCTGACGCAT	62.7	53.8
<i>UBC</i>	F:CTCCTGATGATAGAGGTCTAACG	60.2	47.8
	R:ATGACATGGAGGTCGGTACATAG	60.2	47.8
<i>Actin1</i>	F:CTCTCTCAGCACCTTCGAGCAG	63.8	59.1
	R:TCCACATACAACCGCTCCACTG	61.9	54.5
<i>CiCesA1</i>	F:CCATCCACAGCTAAATTATCTGC	58.4	43.5
	R:CATCATAGCTCTCAAATTCATGTAGA	57.3	34.6
<i>CiCesA2</i>	F:GTCGCAGGATCTCATAACAGG	60.0	52.4
	R:CACATTGATTCGAGGCTACA	55.8	45.0

1.3 实时荧光定量 PCR 试验

采用 TIANGEN 公司的 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒提取根、茎、叶样品的总 RNA,利用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和 Eppendorf 超微量分光光度计测定总 RNA 的质量与浓度。采用 Promega 公司的 Go-ScriptTM Reverse Transcription System 试剂盒进行反转录试验,合成杉木 RNA 样品的 cDNA 第 1 条链,统一稀释至 $30\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后用于荧光定量 PCR 试验。实时荧光定量 PCR 反应在 Thermo Fisher 公司 StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪上进行,使用 Promega 公司的 GoTag qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 反应。反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$,包括: $2 \times \text{qPCR Master Mix } 10\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 上、下游引物各

$0.4\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$, ROX 参比染料(含 SYBR) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $7\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 逐渐升温到 95°C , 速度 $0.11^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$, 设置 3 次生物学重复。

1.4 数据处理与分析

选用内参基因稳定性评价软件 geNorm (<https://genom.cmegg.be/>) 和软件 Normfinder (<https://moma.dk/normfinder-software>), 根据公式 $Q = E^{(\text{Minimum } Gt - \text{Sample } Gt)}$ (式中: Minimum *Gt* 为 *Ct* 最小值, Sample *Gt* 为各个样本 *Ct* 值) 计算相对表达量, 在软件中导入相对表达量 *Q* 值, 对候选内参基因进行稳定性评价, 实际操作中引物扩增率接近 100%, *E* 默

认为2。使用 BestKeeper 软件 (<http://www.genequantification.de/bestkeeper.html#descr>), 根据7个候选内参基因的 Ct 值对候选内参基因的稳定性进行统计分析, 分析选择杉木不同组织中合适的内参基因。采用 $Q = 2^{-(\text{Sample Ct} - \text{reference Ct})}$ (式中: reference Ct 为内参考基因 Ct 值) 计算杉木纤维素合酶基因的相对表达量, 并利用 SPSS 16.0 进行数据统计和处理。

2 结果与分析

2.1 内参基因的荧光定量 PCR 分析

杉木各样品 1% 琼脂糖凝胶电泳显示: 总 RNA 条带清晰, 无明显降解, 28S rRNA 条带比 18S rRNA 条带亮度高, 总 RNA 完整性良好 (图 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测表明: 7 个候选内参基因条带单一, 无非特异性扩增, 目的片段大小符合预期, 说明扩增产物为杉木内参基因的目的片段 (图 2)。分析荧光定量 PCR 的溶解曲线, 7 个候选内参基因均有明显的单一溶解峰 (图 3), 重复样品间扩增曲线重复性高, 且阴性对照则无信号显示, 7 个候选内参基因引物均具有较好的特异性。

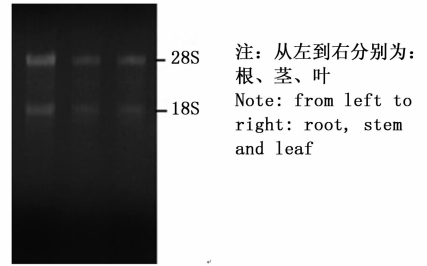
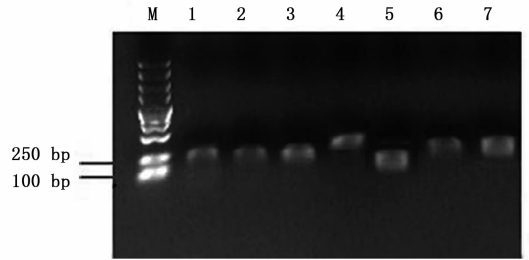


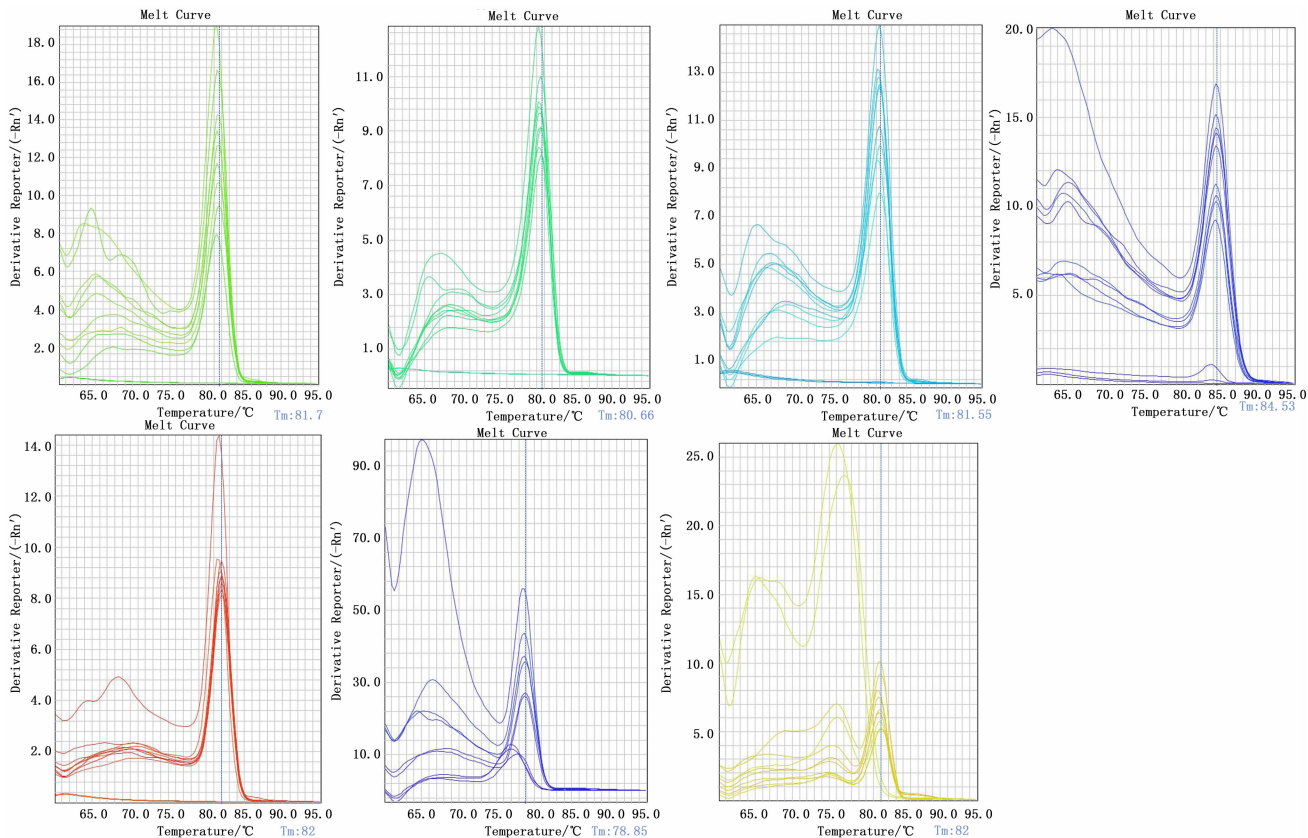
图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA agarose gel electrophoresis



M: DNA marker DL2000; 1: *Actin1*; 2: *EF1α*; 3: *UBC*; 4: *GAPDH*; 5: 18S rRNA; 6: *UBQ*; 7: 28S rRNA.

图 2 杉木根中 7 个内参基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of the seven reference genes in Chinese fir root



A: *GAPDH*; B: *UBQ*; C: 18S rRNA; D: 28S rRNA; E: *EF1α*; F: *UBC*; G: *Actin*.

图 3 候选内参基因溶解曲线

Fig. 3 Melting curves of the candidate reference genes

2.2 内参基因 Ct 值分析

荧光定量 PCR 获得的各内参基因 Ct 值与其表达丰度成反比, Ct 值越大, 基因表达量越低。结果表明: 所选择的 7 个候选内参基因中, 28S rRNA 的平均 Ct 值最低(6.55), 其余 6 个候选内参基因的 Ct 值为 19.70 ~ 27.84, 平均 Ct 值均高于 20(表 2)。28S rRNA 在杉木各组织中表达量明显高于其他 6 个内参基因, 不适合作为内参基因来检测高丰度基因的表达情况。

2.3 内参基因稳定性分析

2.3.1 geNorm 与 Normfinder 分析 分别采用 geNorm 与 Normfinder 软件对各内参基因的表达稳定性进行统计学分析。geNorm 软件是通过计算候选

内参基因的平均稳定指数 M 值来对比候选内参基因的稳定性, $M = 1.5$ 为稳定性分界线, 当 M 值低于 1.5 时, 可判定该候选内参基因较稳定, 且 M 值越低, 该内参基因的稳定性越高。geNorm 软件分析表明: 在杉木不同的组织中, 7 个候选内参基因的 M 值均低于临界值 1.5, 说明候选内参基因的表达均较稳定。表 3 表明: 在根与茎中, *UBQ* 的 M 值最大, 分别为 0.185 和 0.731, 且根中 *Actin* 的 M 值最低, *EF1 α* 次之, 茎中 *EF1 α* 的 M 值最低, *Actin* 居次; 叶中 28S rRNA 的 M 值最大, 为 0.252, 而 *UBQ* 的 M 值最小, 为 0.164。7 个候选内参基因的稳定性排序依次为 *EF1 α* > *Actin* > *GAPDH* > 18S rRNA > *UBC* > *UBQ* > 28S rRNA。

表 2 候选内参基因与 *CICesA1*、*CICesA2* 的平均 Ct 值

Table 2 The average Ct values of the candidate reference genes and *CICesA1*, *CICesA2*

组织 Tissues	平均 Ct 值								
	<i>GAPDH</i>	<i>UBQ</i>	18S rRNA	28S rRNA	<i>EF1α</i>	<i>UBC</i>	<i>Actin</i>	<i>CICesA1</i>	<i>CICesA2</i>
根 Root	24.79	23.51	27.84	7.68	23.91	22.76	24.90	27.80	26.99
茎 Stem	21.39	22.37	26.48	5.51	19.70	21.54	25.53	24.71	22.95
叶 Leaf	24.78	22.10	25.78	6.45	20.73	21.94	26.80	28.74	27.50

表 3 geNorm 软件候选内参基因稳定性评价

Table 3 The evaluation of candidate reference genes stability from geNorm and Normfinder

稳定性排序 Stability bank	根 Root		茎 Stem		叶 Leaf		最终排序 Final bank
	基因名称	稳定性 M 值	基因名称	稳定性 M 值	基因名称	稳定性 M 值	
	Gene name	Stability value	Gene name	Stability value	Gene name	Stability value	
1	<i>Actin</i>	0.11	<i>EF1α</i>	0.336	<i>UBQ</i>	0.164	<i>EF1α</i>
2	<i>EF1α</i>	0.114	<i>Actin</i>	0.339	<i>EF1α</i>	0.184	<i>Actin</i>
3	<i>GAPDH</i>	0.116	18S rRNA	0.350	<i>GAPDH</i>	0.196	<i>GAPDH</i>
4	18S rRNA	0.124	<i>UBC</i>	0.438	<i>Actin</i>	0.202	18S rRNA
5	28S rRNA	0.164	<i>GAPDH</i>	0.464	<i>UBC</i>	0.208	<i>UBC</i>
6	<i>UBC</i>	0.178	28S rRNA	0.697	18S rRNA	0.221	<i>UBQ</i>
7	<i>UBQ</i>	0.185	<i>UBQ</i>	0.731	28S rRNA	0.252	28S rRNA

Normfinder 软件是通过计算稳定性指数 M 值, 对候选内参基因进行稳定性比较。 M 值越小, 说明内参基因的表达稳定性越高, 反之则越低。 Normfinder 软件分析表明: 7 个候选内参基因的稳定性排序在不同的杉木组织中均有所不同, 根茎叶中最稳定的内参基因分别为 *GAPDH*、*EF1 α* 与 *UBQ*; 根与茎中最不稳定的内参基因是 *UBQ*, 叶中最不稳定的内参基因是 28S rRNA。 Normfinder 软件结果中 7 个候选内参基因的稳定性排序依次为 *EF1 α* > *GAPDH* > *Actin* > 18S rRNA > *UBC* > *UBQ* > 28S rRNA(表 4)。

2.3.2 BestKeeper 分析 BestKeeper 软件是通过对比各个候选内参基因 Ct 值的标准差 (SD)、变异系数 (CV) 对候选内参基因的稳定性进行综合分析, 稳定性较好的基因一般具有较低的 SD 值与 CV 值。

结果(表 5)表明: 在杉木根与叶中, *EF1 α* 的 SD 值和 CV 值是 7 个候选内参基因中最低的; 茎中 18S rRNA 的 SD 值和 CV 值在 7 个候选内参基因中均为最低, 相对比其他 6 个内参基因更稳定; 根茎叶中最不稳定的候选内参基因均是 28S rRNA。 候选内参基因的表达稳定性由高到低排序为 *EF1 α* > *Actin* > *GAPDH* > 18S rRNA > *UBC* > *UBQ* > 28S rRNA(表 5)。

2.3.3 内参基因稳定性验证 为验证候选内参基因的表达稳定性, 试验采用实时荧光定量 PCR 分别检测在 7 个候选内参基因下, 杉木根、茎、叶中 2 个纤维素合酶基因 *CICesA1* 和 *CICesA2* 的表达情况。 结果(图 4)表明: 7 个内参基因在杉木各个组织中的表达趋势均有不同, 其中, 以 *Actin*、*EF1 α* 、*UBC*、18S rRNA 与 28S rRNA 作为内参基因时, 2 个目的基因在

表 4 Normfinder 软件候选内参基因稳定性评价

Table 4 The evaluation of candidate reference genes stability from geNorm and Normfinder

稳定性排序 Stabilit-y bank	根 Root		茎 Stem		叶 Leaf		最终排序 Final bank
	基因名称 Gene name	稳定性 M 值 Stability value	基因名称 Gene name	稳定性 M 值 Stability value	基因名称 Gene name	稳定性 M 值 Stability value	
1	<i>GAPDH</i>	0.033	<i>EF1α</i>	0.017	<i>UBQ</i>	0.042	<i>EF1α</i>
2	<i>18S rRNA</i>	0.034	<i>Actin</i>	0.017	<i>EF1α</i>	0.087	<i>GAPDH</i>
3	<i>Actin</i>	0.036	<i>18S rRNA</i>	0.057	<i>GAPDH</i>	0.096	<i>Actin</i>
4	<i>EF1α</i>	0.046	<i>UBC</i>	0.174	<i>Actin</i>	0.099	<i>18S rRNA</i>
5	<i>28S rRNA</i>	0.094	<i>GAPDH</i>	0.220	<i>UBC</i>	0.120	<i>UBC</i>
6	<i>UBC</i>	0.112	<i>28S rRNA</i>	0.464	<i>18S rRNA</i>	0.130	<i>UBQ</i>
7	<i>UBQ</i>	0.115	<i>UBQ</i>	0.484	<i>28S rRNA</i>	0.162	<i>28S rRNA</i>

表 5 BestKeeper 软件分析候选内参基因的稳定性

Table 5 Stability analysis of candidate reference genes by BestKeeper

组织 Tissues	<i>EF1α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>UBQ</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>28S rRNA</i>	<i>UBC</i>	<i>Actin</i>
根 Root	<i>SD [\pm Cl]</i>	0.009	0.047	0.159	0.089	0.125	0.076
	<i>CV [% Cl]</i>	0.036	0.191	0.676	0.321	1.623	0.336
	排序 Bank	1	3	6	4	7	5
茎 Stem	<i>SD [\pm Cl]</i>	0.142	0.105	0.495	0.086	0.501	0.289
	<i>CV [% Cl]</i>	0.720	0.491	2.212	0.323	9.090	1.343
	排序 Bank	4	3	6	1	7	5
叶 Leaf	<i>SD [\pm Cl]</i>	0.036	0.076	0.123	0.215	0.237	0.049
	<i>CV [% Cl]</i>	0.173	0.309	0.555	0.835	3.680	0.222
	排序 Bank	1	3	5	6	7	2
最终排序 Final bank	1	3	6	4	7	5	2

SD: 标准差 Standard Deviation; CV: 变异系数 Coefficient of Variation.

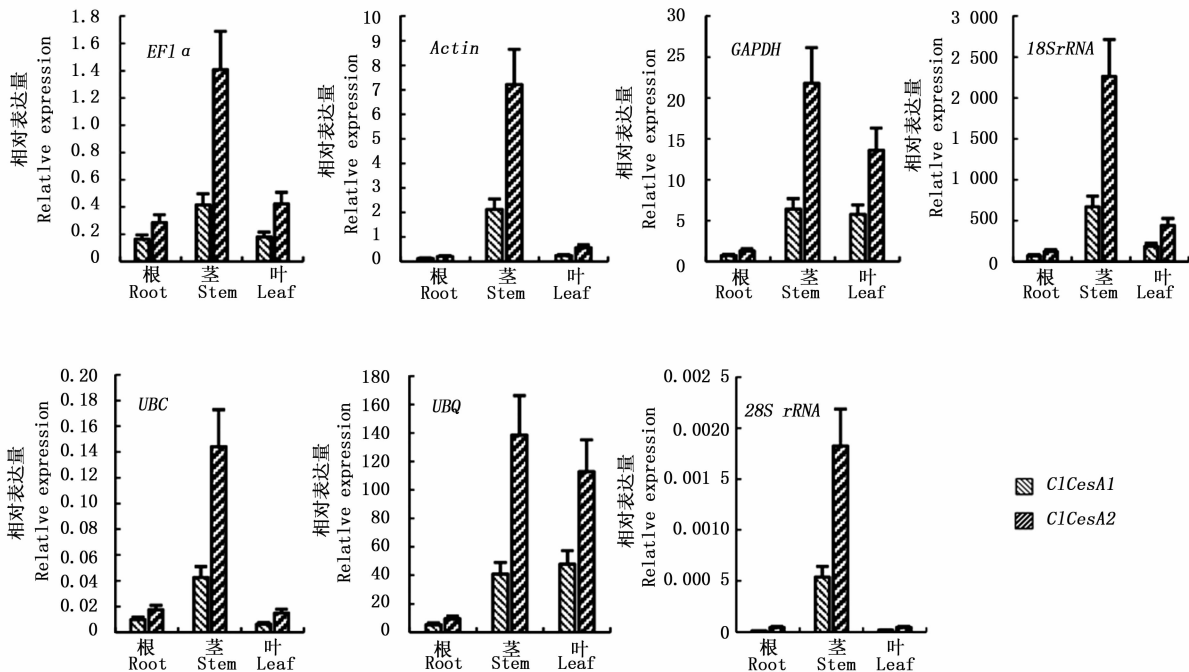


图 4 候选内参基因作为试验内参基因分析目标基因的表达

Fig. 4 The candidate reference genes as test reference gene in the analysis of target gene expression

杉木根、茎与叶中表达趋势相近,且均为茎中的相对表达量最高。*GAPDH* 和 *UBQ* 作为内参基因时,*CIC-*

esA2 的相对表达趋势基本相同,均为茎中目的基因相对表达量最高,叶中次之,根中最低;而 *C1CesA1*

则是在茎与叶中相对表达量相近,且均高于根中的相对表达量。同时,结果表明,以不同内参基因为参照时,杉木这 2 个基因的相对表达量有很大差异(纵坐标的相对表达量值),*EF1 α* 的相对表达量介于 0.15 ~ 1.4,而 18S *rRNA* 的相对表达量则介于 28 ~ 2 263(图 4)。*ClCesA2* 的表达量在杉木根、茎与叶中均高于 *ClCesA1*; *Actin*、*UBC*、18S *rRNA* 与 28S *rRNA* 显示的 2 个基因在不同杉木组织的表达趋势与相对表达量较为一致,均为茎中远高于根和叶。结果说明,在进行荧光定量试验过程中,采用不同的内参基因对目的基因的表达进行校正,会出现不同的试验结果,如果试验时选用的内参基因不恰当,可能导致相对表达量的错误估计。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 凭借其特异性好、灵敏度高等特点,被广泛应用于基因的表达分析研究中,其分析的结果则与内参基因的选择密切相关,不恰当的内参基因将使分析结果产生偏差,甚至得出错误的结论^[22-24]。因此,在用实时荧光量 PCR 分析目标基因的表达情况之前,需要对内参基因进行筛选,以确保分析结果的有效性。

传统的内参基因多数是细胞骨架的基本组成或参与生物体基本代谢调控过程的基因,如 *Actin* 编码细胞骨架结构蛋白,*TUB*(β 微管蛋白, β -tubulin) 主要参与细胞生长和光刺激反应,*GAPDH* 编码糖酵解、糖异生及光合作用碳固定循环过程中的关键酶,*EF1 α* 参与转录延伸等等。由于内参基因的重要意义,研究人员对不同植物中稳定表达的内参基因筛选做了较多研究,筛选出了一些针对植物不同组织部位的稳定内参基因。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 种子中稳定的内参基因为 *UBC*^[25],拟南芥在不同组织中的稳定内参基因为 *UBQ5*、*APT1* 以及 *EF1 α* ^[26];水稻(*Oryza sativa* L.) 在不同组织中稳定的内参基因为 *CYC*^[27],干旱胁迫下水稻不同类型样本中的稳定内参基因则是 *UBQ* 与 *GAPDH*^[16];烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 在不同组织中稳定的内参基因为 *L25* 与 *EF1 α* ^[28],在非生物胁迫下的稳定内参基因则是 *PP2A* 与 *Actin*^[29];番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 在不同组织器官中的稳定内参基因为 *CYC* 和 *TIP41*^[30]。同时,针对植物在不同试验条件下的内参基因筛选,也逐渐成为研究趋势。胡杨(*Populus euphratica* Oliv.) 较为稳定的内参基因,

在干旱胁迫下为 *Glla* 和 *Actin*,在短期盐处理下为 *Glla* 和 *RPL17*,在长期盐处理条件下则是 *TUB* 和 *RP*^[31]。茶树(*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.) 在不同成熟叶片与愈伤组织中 *GAPDH* 为较为合适的内参基因,在不同组织器官中则是 β -*actin* 最为稳定^[32];而在不同逆境条件下对比筛选茶树幼叶中的内参基因时发现,在冷害、干旱与盐胁迫等条件下,*GAPDH* 的表达稳定性优于其他内参基因^[33]。同时也有研究表明,不同氮处理下茶树幼叶中的稳定内参基因是 *GAPDH* 或者 *GAPDH* + β -*actin* 组合^[34]。这些研究均表明,内参基因要根据植物类型、组织部位和试验条件进行准确的筛选评估和验证,因此,建立多内参基因的评价体系,是提高实时荧光定量 PCR 试验准确性的重要保证。

Wang Z 等通过软件 geNorm、Normfinder 和 Best-Keeper 筛选对比了 *UBQ*、*eIF-3*、*eIF-4A*、*Actin*、*GAPDH*、*EF1 α* 、 α -*TUB*、 β -*TUB* 及 40S 这 9 个常用内参基因在杉木形成层中的稳定性,得出在杉木形成层过程中 *eIF-3*、*eIF-4A*、*UBQ* 和 *Actin* 的稳定性较优,并选择 3 个软件稳定性均居优的基因 *eIF-3* 作为分析杉木形成层发展情况的表达分析中的内参基因^[20]。本试验通过软件 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 对杉木中的 7 个候选内参基因进行稳定性评价分析,综合 3 个软件的分析结果,筛选杉木基因表达分析中可用的相对最稳定的内参基因,并通过纤维素合酶基因 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 的表达分析验证综合筛选结果。软件 geNorm 显示,根中最稳定的内参基因为 *Actin*,茎中为 *EF1 α* 、叶中为 *UBQ*;软件 Normfinder 分析表明,根中 *GAPDH* 最稳定,茎中是 *EF1 α* ,叶中则是 *UBQ*;软件 BestKeeper 分析得到根与叶中稳定内参基因是 *EF1 α* ,茎中是 18S *rRNA*。在杉木根、茎叶中 *ClCesA2* 的相对表达量均高于 *ClCesA1*,且不同内参基因作为校正参比时,*ClCesA1* 和 *ClCesA2* 的表达量均有所不同。以 *Actin*、*EF1 α* 、*UBC*、18S *rRNA* 与 28S *rRNA* 作为内参基因时,*ClCesA1* 和 *ClCesA2* 基因在根、茎和叶中的表达趋势相近,均为茎中相对表达量最高,叶次之。以 *GAPDH* 和 *UBQ* 作为内参基因时,*ClCesA1* 在杉木茎与叶中的相对表达量相近,且高于根中表达量,*ClCesA2* 则是表现为茎中最高,叶次之。3 个软件综合评价结果显示,在杉木根与茎中,合适的稳定内参基因均以 *Actin*、*EF1 α* 与 *GAPDH* 为主;而在杉木叶中,软件 geNorm、Normfinder 评价得到的最佳内参基因是 *UBQ* 与 *EF1 α* ,软件

BestKeeper 得出的合适内参基因为 *Actin* 与 *EF1 α* , 同杉木根和茎的稳定内参基因相接近;同时,3个组织器官中最不稳定的内参基因均为 *28S rRNA*。结果表明,7个候选内参基因中,*Actin* 与 *EF1 α* 在杉木不同组织中较为稳定,推荐作为荧光定量PCR试验的内参基因;*28S rRNA* 评价为较不稳定,不适合作为杉木基因表达分析的内参基因。

4 结论

本研究通过对比分析 *GAPDH*、*EF1 α* 、*18S rRNA*、*28S rRNA*、*UBQ*、*UBC* 与 *Actin* 共7个候选内参基因在杉木实时荧光定量PCR分析中的表达稳定性,筛选获得了在杉木不同组织中稳定表达的合适内参基因 *Actin* 与 *EF1 α* ;*28S rRNA* 的表达稳定性低,不适合作为杉木实时荧光定量PCR分析的理想内参基因。以 *Actin* 与 *EF1 α* 作为内参基因,对纤维素合酶基因 *ClCsA1* 和 *ClCsA2* 在杉木不同组织中的相对表达量进行分析,结果表明:*ClCsA1* 和 *ClCsA2* 在杉木中的相对表达量排序为茎 > 叶 > 根,且 *ClCsA2* 在各个组织中的相对表达量均高于 *ClCsA1*。本研究筛选获得了适合杉木实时荧光定量PCR分析的内参基因,为提高杉木实时荧光定量PCR试验准确性提供了基础背景校正的稳定参照值。

参考文献:

[1] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantitation[J]. *Biotechniques*, 2000, 29(2):332-337.

[2] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29(1):23-39.

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

[4] Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR[J]. *Methods*, 2010, 50(4):227-230.

[5] 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.

[6] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量PCR内参基因的选择[J]. *中国农业科技导报*, 2009, 11(6):30-36.

[7] 张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(5):546-550.

[8] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(8):1119-1125.

[9] 苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 等. 实时荧光定量PCR分析中毛果杨内参基因的筛选和验证[J]. *植物学报*, 2013, 48(5):507-518.

[10] 任锐, 戴鹏辉, 李萌, 等. 珙桐实时定量PCR内参基因的筛选及稳定性评价[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(10):1565-1575.

[11] 庞强强, 李植良, 罗少波, 等. 高温胁迫下茄子qRT-PCR内参基因筛选及稳定性分析[J]. *园艺学报*, 2017, 44(3):475-486.

[12] 孙亚丽, 张德辉, 赵亮, 等. 铜胁迫下天蓝苜蓿根组织实时定量PCR内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(10):1223-1231.

[13] 魏毅东, 陈玉, 郭海萍, 等. 水稻缺素胁迫下实时荧光定量RT-PCR的内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(11):1302-1312.

[14] Chi X, Hu R, Yang Q, et al. Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2012, 287(2):167-176.

[15] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards; use and limits[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 75(2-3):291-295.

[16] Bevitoni R, Oliveira M B, Grossidesá M F, et al. Selection of optimized candidate reference genes for qRT-PCR normalization in rice (*Oryza sativa* L.) during *Magnaporthe oryzae* infection and drought[J]. *Genetics & Molecular Research Gmr*, 2014, 13(4):9795-9805.

[17] 彭沙沙. 杉木材性相关基因的克隆、表达及单核苷多态性分析[D]. 杭州:浙江农林大学, 2011.

[18] 祝艾静. 杉木 microRNA399a 的功能研究[D]. 新乡:河南师范大学, 2015.

[19] Bao W, Qu Y, Shan X, et al. Screening and validation of housekeeping genes of the root and cotyledon of *Cunninghamia lanceolata* under abiotic stresses by using quantitative Real-Time PCR[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8):1198-1215.

[20] Wang Z, Chen J, Liu W, et al. Transcriptome characteristics and six alternative expressed genes positively correlated with the phase transition of annual cambial activities in chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*, (*Lamb.*) Hook)[J]. *Plos One*, 2013, 8(8):e71562.

[21] 魏晓晓, 王士亚, 陈潇潇, 等. 一个新杉木纤维素合酶 *ClCsA* 基因的克隆与植物表达载体构建[J]. *福建农林大学学报:自然版*, 2017, 46(1):66-72.

[22] Albershardt T C, Iritani B M, Ruddell A. Evaluation of reference genes for quantitative PCR analysis of mouse lymphocytes. [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2012, 384(1-2):196-199.

[23] Luo H, Luo K, Luo L, et al. Evaluation of candidate reference genes for gene expression studies in *Cymbidium kanran*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 167(3):43-48.

[24] Mohelnikvaduchonova B, Oliverius M, Honsova E, et al. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative Real-Time PCR in human pancreatic carcinoma[J]. *Disease Markers*, 2012, 32(3):203-20.

[25] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1):5-17.

- [26] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(6):609–618.
- [27] Pabuayon I M, Yamamoto N, Trinidad J L, et al. Reference genes for accurate gene expression analyses across different tissues, developmental stages and genotypes in rice for drought tolerance[J]. *Rice*, 2016, 9(1):32–39.
- [28] Schmidt G W, Delaney S K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2010, 283(3):214–233.
- [29] Liu D, Shi L, Han C, et al. Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in Virus-Infected, *Nicotiana benthamiana*, Using Quantitative Real-Time PCR[J]. *Plos One*, 2012, 7(9):e46451–e46451.
- [30] Expósito Rodríguez M, Borges A A, Borges Pérez A, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process [J]. *Bmc Plant Biology*, 2008, 8(1):131.
- [31] Wang H L, Chen J, Tian Q, et al. Identification and validation of reference genes for *Populus euphratica* gene expression analysis during abiotic stresses by quantitative real-time PCR[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152(3):529–545.
- [32] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. *植物学报*, 2010, 45(5):579–587.
- [33] 郝 珊. 茶树不同逆境条件下 *qRT-PCR* 适宜内参基因的筛选 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 47–55.
- [34] 刘 圆, 王丽鸳, 韦 康, 等. 不同氮处理茶树实时定量 PCR 内参基因筛选和验证[J]. *茶叶科学*, 2016(1):92–101.

Quantitative Real-time PCR Analysis of *Cunninghamia lanceolata* in the Selection of the Reference Genes

ZHANG Ying¹, CHEN Wang-ting¹, CHEN Ran-hong¹, SHUAI Peng^{1,2}, LI Ming^{1,2}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China;

2. Chinese Fir Engineering and Technological Research Center, National Forestry and Grassland Administration, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: [Objective] To improve the accuracy of real-time fluorescence quantitative PCR test and provide a suitable background reference for expression analysis of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*), so as to select the stable internal control genes. [Method] The soluble curve and Ct value of seven candidate internal reference genes including *GAPDH*, *EF1 α* , *18S rRNA*, *28S rRNA*, *UBQ*, *UBC* and *Actin* in roots, stems and leaves of Chinese fir clones were obtained by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression stability of candidate reference genes was assessed by geNorm, Normfinder and BestKeeper. The expression stability of candidate reference genes was estimated by analyzing the relative expression of two cellulose synthase genes *CiCesA1* and *CiCesA2* in different tissues of Chinese fir. [Result] Three softwares, geNorm, Normfinder and BestKeeper, showed that the most stable internal reference genes expressed in Chinese fir roots and stems were *EF1 α* and *Actin*. The software geNorm and Normfinder showed that the stable internal reference genes expressed in Chinese fir leaves were *UBQ* and *EF1 α* . The software BestKeeper showed that the most stable and suitable internal reference genes for expression analysis are *EF1 α* and *Actin*. *Actin* and *EF1 α* as internal reference genes showed that the relative expression levels of *CiCesA1* and *CiCesA2* were different among the tissues of Chinese fir, and the relative expression level of *CiCesA2* was higher than that of *CiCesA1* in all tissues. According to expression analysis of different reference genes as test reference gene expression of *CiCesA1* and *CiCesA2*, the relative expression levels of *CiCesA1* and *CiCesA2* were mainly stem > leaf > root. [Conclusion] Of the 7 candidate reference genes, *Actin* and *EF1 α* are suitable as internal control genes for expression analysis due to stably expressed in different tissues of Chinese fir. *28S rRNA* is not suitable as an ideal internal control gene for quantitative PCR analysis of Chinese fir as a result of the lower expression stability.

Keywords: *Cunninghamia lanceolata*; fluorescence quantitative PCR; internal reference gene; BestKeeper