

巨龙竹秆形发育过程实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

郭晓娟, 陈凌娜, 杨汉奇*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南昆明 650224)

摘要: [目的] 利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和表达分析软件筛选适用于巨龙竹秆形发育研究的 qRT-PCR 的稳定内参基因。[方法] 应用常规 PCR 和 qRT-PCR, 分析 *EF-1 α* 、*GAPDH*、*Actin*、*Tubulin*、*TIP-41*、*PP2A* 共 6 个内参基因在不同秆形巨龙竹(“通直型”和“弯曲型”)竹笋 3 个不同发育时期的表达情况。利用 GeNorm、NormFinder 软件对各内参基因的表达稳定性进行评估;以筛选的内参基因对巨龙竹木质素合成中的 *PTAL* 基因的表达量进行定量分析,验证所筛选内参基因的有效性。[结果] PCR 和 qRT-PCR 的结果表明,6 个候选内参基因 PCR 目的片段电泳条带单一,熔解曲线具有明显的单一峰。内参基因 *Actin*、*EF-1 α* 、*GAPDH* 的稳定性和相关性表现最佳;以它们为内参,对茎秆发育过程中 *PTAL* 基因进行定量分析,结果显示它们均具有高效性。[结论] *Actin*、*EF-1 α* 、*GAPDH* 可以作为巨龙竹秆形发育研究中目的基因定量分析的内参基因。为进一步分析巨龙竹秆形发育过程中关键基因表达量的变化提供研究基础。

关键词: 巨龙竹;秆形发育;内参基因;qRT-PCR

中图分类号:S718

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2018)02-0120-06

Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR in Studying Culm Shape Development of *Dendrocalamus sinicus*

GUO Xiao-juan, CHEN Ling-na, YANG Han-qi

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To select suitable quantitative real-time PCR (qRT-PCR) reference genes for studying culm shape development of *Dendrocalamus sinicus* Chia et J. L. Sun. [Method] PCR and qRT-PCR were used to analyze the mRNA expression stability of six candidate reference genes (*EF-1 α* , *GAPDH*, *Actin*, *TIP-41*, *Tubulin* and *PP2A*) in a set of six bamboo shoot samples at three development stages of the straight-culmed and bending-culmed *D. sinicus* respectively. The software GeNorm and NormFinder were employed to evaluate the data for reference genes. Quantitative analysis of *PTAL* was used to test the effectiveness of the candidate reference genes. [Result] The results showed that six candidate reference genes were of expected size and single peaking melting curve. Of them, *Actin*, *EF-1 α* and *GAPDH* had the best stability and correlativity. Meanwhile, these three candidate reference genes had the highest efficiency based on quantitative analysis results of the *PTAL* gene during the culm development. [Conclusion] The *Actin*, *EF-1 α* and *GAPDH* were optional inference genes for normalizing purpose genes in studying culm shape development of *D. sinicus*. The study can provide references for gene expression analysis in the

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAFYBB2017ZX001-8)、国家自然科学基金(31270662)、云南省科学技术厅(2014HB041)

作者简介: 郭晓娟(1991—),女,硕士研究生,研究方向:林木遗传育种。Email:lkygj_417@163.com.

* 通讯作者: 杨汉奇(1974—),男,研究员,研究方向:竹类种质资源遗传改良。

culm development of *D. sinicus*.

Keywords: *Dendrocalamus sinicus*; culm shape development; reference genes; qRT-PCR

竹亚科牡竹属的巨龙竹 (*Dendrocalamus sinicus* Chia et J. L. Sun) 为我国云南特有大型丛生竹种,其胸径可达 30 cm,秆高可达 30 m 以上,是目前已知世界上最高大粗壮的竹种^[1]。巨龙竹秆形在自然分布区中存在两种遗传稳定的变型,即“通直型”和“弯曲型”^[2]。弯曲型竹秆基部常畸变,呈短缩、鼓胀、歪扭等形状,不利于竹板材加工;通直型巨龙竹秆形通直,平均单株质量 100 ~ 150 kg,单位面积年均产材量比我国主要经济竹种毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie.) 高 5 ~ 8 倍^[3]。通直型巨龙竹是培育特大型工业用材的优异竹种之一,也是我国南部热区竹产业发展和生态环境建设中最具发展潜力的优良经济竹种之一^[3-4]。秆形作为巨龙竹资源培育与利用的关键性状之一,其发育机制尚不清楚,这给巨龙竹优良种源的选择和培育带来了障碍。同时,“通直型”和“弯曲型”巨龙竹作为一对自然的变异类型,也是木本竹种秆形发育研究中理想的对照系。目前,作者正在开展巨龙竹秆形发育的转录组分析,试图解析不同秆形发育过程中关键基因的时空表达模式。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术因其特异性强、灵敏度高、快速准确、重复性好等^[5-6] 优点被广泛用于基因表达分析。在植物学研究中,常选用稳定表达的内参基因转录延伸因子-1 α (*EF-1 α*)、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶 (*GAPDH*)、肌动蛋白基因 (*Actin*)、微管蛋白基因 (*Tubulin*) 为内参基因^[7-8]。随着基因芯片和基因组学的发

展,又挖掘了新的内参基因蛋白磷酸酶 2A (*PP2A*) 和液泡膜内嵌蛋白基因 (*TIP-41*) 等^[8]。各内参基因在不同组织、不同发育时期、不同处理中的稳定性也存在差异^[8]。近期有关竹亚科植物内参基因的筛选已有一些相关报道,主要集中在毛竹等温带散生竹中,筛选出 *PP2A*、*TIP41* 等作为毛竹不同组织基因表达定量分析的内参基因^[9-11],但这些内参基因在不同发育时期的表达稳定性是未知的。针对巨龙竹不同秆形发育特点,本研究用 qRT-PCR 评价 *EF-1 α* 、*GAPDH*、*Actin*、*Tubulin*、*TIP-41*、*PP2A* 6 个内参基因在巨龙竹茎秆发育过程中的表达稳定性,筛选在巨龙竹不同生长阶段、不同秆形变异种群中最佳内参基因,为下一步解析参与巨龙竹秆形发育关键基因的表达模式提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 以云南省西盟县中课种群(通直型)和孟连县景信种群(弯曲型)2 个种群内 0 ~ 1 个月的笋(或幼竹)作为研究对象。巨龙竹发笋期(5 月下旬至 8 月下旬)的定点观察结果显示,秆形变化主要出现在竹秆基部 1 ~ 3 m 内的竹节,1 个月内秆形基本定型。因此,从每个类型种群中选择 3 个竹丛,每个竹丛从选取笋后 5 天、15 天、30 天的竹笋,分别代表秆形发育的初期、中期和后期。样品取自竹笋基部竹节,用干净的刀片切成小块立即放入液氮中,液氮处理后于 -80℃ 贮存备用。

表 1 采样具体信息

Table 1 Sampling information

地点 Site	茎秆类型 Culm type	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude/m	采样时间 Time
西盟县中课镇窝笼村	通直型	99°32'06"	22°43'48"	1 254	2 016 - 07 - 15
孟连县景信乡景信村	弯曲型	99°36'31"	22°26'36"	1 007	2 016 - 07 - 16

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒 (*TransZol Up Plus RNA Kit*), 反转录试剂盒 (*TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix*), qRT-PCR 荧光染料 (*TransStart Top Green qPCR SuperMix*) 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 每个组织取 3 个不同的生物学重复。总 RNA 的提取参照 *TransZol Up Plus*

RNA Kit 试剂盒说明书进行,提取的总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, Nanodrop 8000 紫外分光检测仪检测 OD 值后直接用于反转录或保存于 -80℃ 备用。

1.2.2 反转录合成 cDNA 按照 *TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix* 试剂盒说明书,各取样品的总 RNA 7 μ L 反转录成 cDNA 第一链。所得 cDNA 产物直接用于 PCR 和 qRT-

PCR 或保存于 -20°C 备用。

1.2.3 内参基因的引物设计 使用 Primer Premier 5.0 软件设计候选内参基因的 qRT-PCR 引物,引物序列见表 2。引物由昆明硕擎生物技术有限公司合成,采用 PAGE 纯化。

表 2 qRT-PCR 检测中所用的 6 个候选内参基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of six candidate reference genes for qRT-PCR analysis

基因 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	解链 温度 Tm/°C	扩增产物长 度 Length of amplified product/bp
PP2A	F: CAGTCATCCCATGCTCTTGCT	60.6	158
	R: GAAGCTGGCTTACGTGAGATGAA	59.8	
EF-1 α	F: GCAACAAAACCACGCTTGAGA	59.6	186
	R: GGGTCGTGTTGAGACTGGTG	59.5	
GAPDH	F: AGTCCACTGGTGTCTTCACTG	59.6	178
	R: CAATTTGTGGTGCAGCTAGCATT	60.0	
Actin	F: TGCCTACATTGCCCTGGACTA	59.6	162
	R: FCCATTCCAATGAAGGATGGCT	59.8	
Tubulin	F: GTCGATGCCGAGAATACCT	59.4	186
	R: GCAGTTGCAACCATCAAGACC	59.6	
TIP-41	F: CAGCGAAATGGAAGTTCAGAAG	59.8	169
	R: TGTCATCAGTATCTCCCAAC	59.7	

注:正向引物(F) forwards primer,反向引物(R) reverse primer,解链温度(Tm) melting temperature。

1.2.4 候选内参基因的普通 PCR 利用表 2 中的引物对 6 个候选内参基因进行普通 PCR,体系为 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix } 10 \mu\text{L}$,混合 cDNA $2.0 \mu\text{L}$,正向和反向引物(浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $1.0 \mu\text{L}$,ddH₂O 补充体积至 $20 \mu\text{L}$ 。反应温度程序为: 95°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 45 个循环; 72°C 延伸 10 min。反应完成后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测各 PCR 产物。

1.2.5 候选内参基因的 qRT-PCR 分析 qRT-PCR 采用 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系: $2 \times \text{TransStart Top Green qPCR SuperMix } 10 \mu\text{L}$,各样品的 cDNA $1.0 \mu\text{L}$ (阴性对照加 ddH₂O $1.0 \mu\text{L}$),正向和反向引物(浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $0.4 \mu\text{L}$,用 ddH₂O 补足体积至 $20 \mu\text{L}$ 。反应程序为: 94°C 预变性 30 s; 94°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 40 个循环; $65 \sim 95^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线分析。实验设计 3 个技术重复。加样完成后迅速放入 Bio-Rad CFX 96 real-time PCR 仪上进行反应。数据读取由仪器自动完成。

1.2.6 数据分析及内参基因稳定性评价 qRT-PCR 扩增完成后,采用 Ct 值的方法^[12]计算 6 个内参基因的表达量。利用内参基因评价软件 GeNorm

和 NormFinder 分别对不同基因进行稳定性评价,以确定理想的内参基因。

1.2.7 内参基因有效性验证 以筛选出的基因为内参,对巨龙竹木质素合成中 PTAL(Phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase)^[13] 基因的表达量进行定量分析,验证内参基因的有效性。体系和反应程序同 1.2.5,实验设 3 个生物学重复,每个生物学重复设 3 个技术重复。根据项目组前期采用相同植物材料进行转录组测序获得的结果(待发表)和实时荧光定量分析之间基因表达量的相关性验证内参基因的有效性。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 样品的质量分析

提取的总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示如图 1,所提总 RNA 有 28S、18S 两条清晰的条带,条带无拖尾, RNA 完整。经 Nanodrop 8000 紫外分光检测仪检测, A260/280 值在 1.7 ~ 2.0 范围内, A260/230 值大于 2.0, RNA 的纯度高,表明所制备的总 RNA 质量较好,满足试验需求。

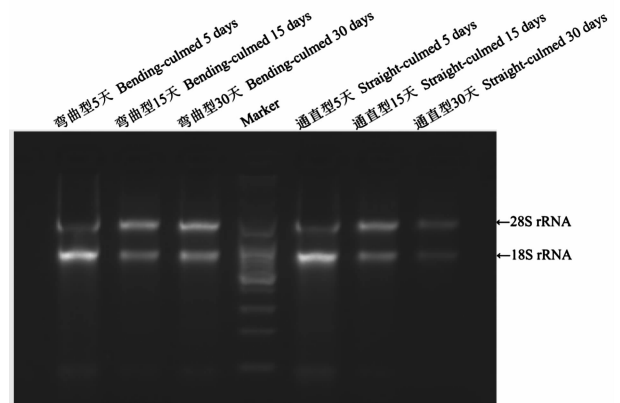


图 1 巨龙竹不同秆形各发育时期总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis results of total RNA extracted from different types of *D. sinicus* at three developmental stages

2.2 内参基因的普通 PCR 分析

常规 PCR 结果显示,各内参基因均可见预期大小的目标条带(如图 2),且条带单一,无非特异性扩增,表明引物特异性良好,可用于后续 qRT-PCR 实验。

2.3 标准曲线与熔解曲线的分析

设置 5 个浓度梯度,3 个技术重复,标准曲线相关系数 R^2 均大于 0.99,说明了线性关系好。扩增效率 E 在 90% ~ 105%。熔解曲线有单一峰值,峰线

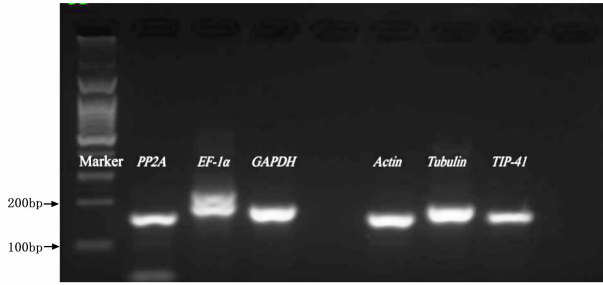


图2 6个候选内参基因常规PCR的电泳结果
Fig.2 Electrophoresis results of six candidate reference genes

窄而尖,说明引物特异性好,扩增产物单一。

2.4 内参基因稳定性评价

对于不同样品或组织中基因表达的精确定量分析,选择合适的内参基因是关键,GeNorm软件和NormFinder软件是专业用来筛选内参基因的软件。

2.4.1 GeNorm软件评价结果 GeNorm软件程序采用几何平均算法,通过计算出每个内参基因稳定性的M值来筛选出稳定性较好的内参基因,M值越小内参基因的稳定性就越好,反之,稳定性越差。同时,通过归一化因子法计算出最适合的内参基因搭配组合^[12,14],来确定所需内参基因的最适数目,当 $V_n/(n+1) < 1.5$ 时,说明有 n 个基因可以作为qRT-PCR定量分析的内参基因,当 $V_n/(n+1) > 1.5$ 时,说明有 $n+1$ 个基因可以作为qRT-PCR定量分析的内参基因。通过GeNorm分析,6个内参基因的稳定性由高到低的顺序为: $EF-1\alpha = GAPDH > Actin > TIP-41 > PP2A > Tubulin$ (图3)。根据标准差数据分析(图4), $V_n/(n+1)$ 均大于1.5,其中V5/6的M值最小,可以选择6个内参基因做组合。

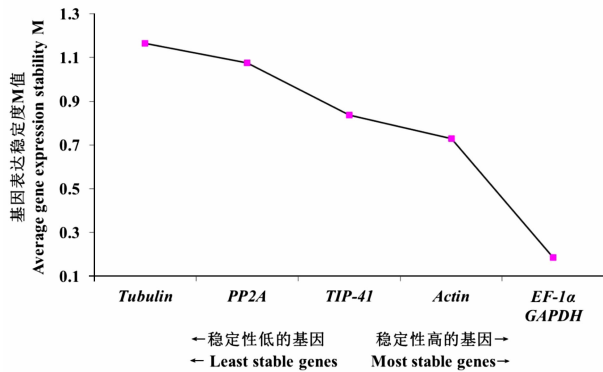


图3 6个候选内参基因的表达稳定性GeNorm分析
Fig.3 Expression stabilities of six candidate reference genes analyzed by GeNorm

2.4.2 NormFinder软件评价结果 NormFinder软

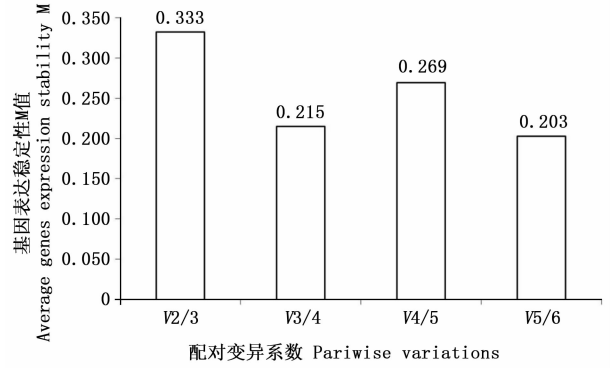


图4 6个候选内参基因标准化因子的配对差异分析
Fig.4 Pairwise variance analyses of six candidate reference genes

件采用方差估计算法,先获得内参基因表达稳定值,再根据稳定值(M值)大小来筛选最适合的内参基因,M值最小的内参基因为最适合的内参基因^[14-15]。通过NormFinder分析,6个内参基因的稳定性由高到低的顺序为: $Actin > GAPDH > EF-1\alpha > PP2A > Tubulin > TIP-41$ 。

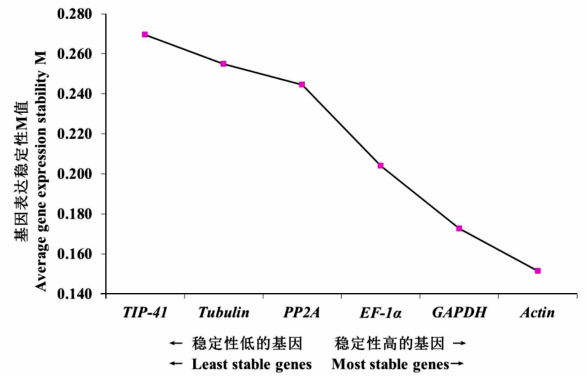


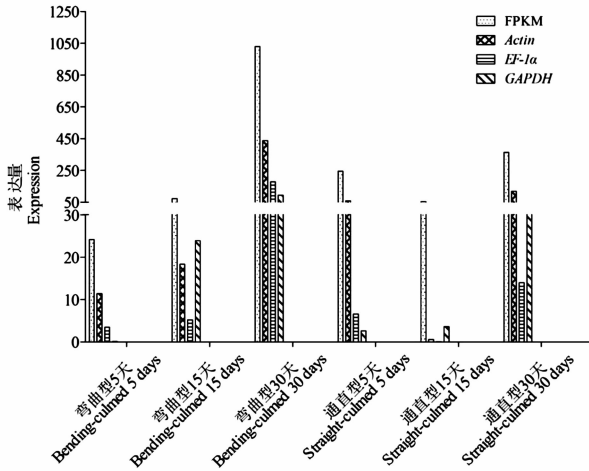
图5 6个候选内参基因的表达稳定性NormFinder分析
Fig.5 Expression stabilities of six candidate reference genes analyzed by NormFinder

综上所述:通过使用GeNorm与NormFinder 2种软件对6个候选内参基因的稳定性评估结果得知GAPDH、Actin、EF-1 α 的稳定性最佳,可作为研究巨龙竹秆形发育过程基因表达分析使用的内参基因。

2.5 内参基因应用的验证

为了验证筛选的内参基因在巨龙竹茎秆发育过程中应用的有效性,选取木质素合成过程中的酶基因PTAL,分别以Actin、EF-1 α 和GAPDH为内参,对两种秆型巨龙竹不同发育时期的材料中的PTAL基因进行定量分析。结果如图6所示,以Actin定量的PTAL基因表达量最高,GAPDH定量的PTAL基因表达量最低。根据前期转录组测序的结果,在弯曲型

巨龙竹中, *PTAL* 基因的 FPKM 值在发育 5 天、15 天、30 天的材料中分别为 24.15、73.52 和 1 029.38; 在通直型巨龙竹中分别为 245.31、53.82 和 363.4。以不同内参基因获得的表达量与转录组测序获得的表达量进行相关性分析, 相关性从大到小为 *Actin* > *EF-1 α* > *GAPDH*, 相关系数分别为 0.99, 0.95 和 0.92, 说明筛选出的 3 个内参基因有效性均较高。



注: 以筛选出的 3 个内参基因 *Actin*、*EF-1 α* 和 *GAPDH*, 对两种秆形巨龙竹 3 个不同发育时期笋中 *PTAL* 基因定量的结果, FPKM 表示转录组测序结果中 *PTAL* 基因在不同样品中的表达量。

Note: *PTAL* expression of two types of *D. sinicus* at three development stages were quantitated by three reference genes *Actin*, *EF-1 α* and *GAPDH*. FPKM represents *PTAL* expression level in different samples from the transcriptome sequencing result.

图 6 不同内参基因对 *PTAL* 基因的定量分析

Fig. 6 Quantitative analysis of different reference genes to *PTAL*

3 讨论

近年来, 随着测序技术的快速突破, “基因组学”的研究越来越便捷, 极大地促进了转录组等技术手段的迅猛发展, 使之成为探索基因调控网络研究的得力工具。目前, 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术由于其更高的敏感性和特异性, 已经成为基因表达深入研究的基本方法^[6]。而合适稳定表达的内参基因的筛选将决定表达量数据的可靠性。本研究对不同变异类型、不同发育时期的巨龙竹竹笋样品进行内参基因筛选的结果对解析“通直型”和“弯曲型”巨龙竹差异发育的分子机理有重要意义。

在 qRT-PCR 反应中, 合适内参基因的选择是决定目的基因精确定量分析的先决条件。理想的内参基因应在生物体不同的生长发育阶段、组织及各种

外界因素条件下均恒定表达。然而, 内参基因的适用性并不是普遍的, 需要从多个内参基因中筛选出表达相对稳定的一个或一个以上作为研究对象的内参基因^[15]。Zeng 等^[16]在对枸杞属两个种 *Lycium barbarum* L. 和 *L. ruthenicum* Murray 内参基因的筛选中, 确定在不同的组织细胞中, 表达最稳定的内参基因并不统一。对牡丹不同发育阶段种子和花瓣进行 qRT-PCR 内参基因筛选的结果也显示, 在不同发育阶段及不同组织, 最稳定的内参基因也不同^[17]。而相同内参基因在禾本科的大麦、小麦和燕麦间的通用性研究结果表明, *GAPDH*、*TUBB*、*18S rRNA* 在三者中都表达稳定, 而 *EIF4A* 和 *TUBA* 分别在小麦和燕麦中表达稳定, 说明并不是所有内参基因在亲缘关系相近的物种中都通用^[18]。在竹亚科植物中, 相关内参基因筛选的研究十分有限, 而且并非所有的竹亚科植物都能通用一种内参基因。对毛竹成花基因 *PheTFL1* 表达分析的研究中, 选择了 *PP2A* 作为毛竹 *PheTFL1* 基因定量分析的内参基因^[9]。Fan^[10]等从 14 个候选内参基因中选择 *TIP41* 和核苷酸通道结合蛋白基因 (*NTB*) 作为毛竹开花前后表达量分析的内参基因。

本研究中, 选择 *EF-1 α* 、*GAPDH*、*Actin*、*Tubulin*、*TIP-41*、*PP2A* 作为巨龙竹的候选内参基因, 其中 *EF-1 α* 、*GAPDH*、*Actin*、*Tubulin* 均为植物学研究中经典的内参基因。*EF-1 α* 主要参与快速增殖细胞的生长与增殖^[19], *GAPDH*、*Actin* 和 *Tubulin* 均与细胞骨架结构的形成有关^[20-22]。*PP2A* 和 *TIP-41* 是新挖掘的内参基因, *PP2A* 主要参与细胞功能的调节^[23], *TIP-41* 主要参与细胞水分的转运^[24]。这些内参基因已在多种植物研究中证明了其有效性^[9-10, 18]。

4 结论

通过候选内参基因的稳定性 and 有效性的验证分析与评估, 在不同变异类型的巨龙竹笋期及其不同发育时期, 表达稳定性最佳的内参基因是 *Actin*、*EF-1 α* 、*GAPDH*。下一步将结合巨龙竹秆形发育转录组学的分析, 利用筛选出的内参基因对后续筛选的目的基因进行定量分析, 研究巨龙竹秆形发育过程中相关基因的表达模式。

参考文献:

- [1] 耿伯介, 王正平. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 谷志佳, 杨汉奇, 孙茂盛, 等. 巨龙竹资源分布特点及其开花结实现象 [J]. 林业科学研究, 2012, 25(1): 1-5.

- [3] 辉朝茂,张国学,李在留,等. 珍稀竹种巨龙竹种群特性及其保护研究[J]. 竹子研究会刊,2004,23(4):4-9.
- [4] 杨汉奇,孙茂盛,阮桢媛,等. 云南4种典型热带丛生竹种源分化[J]. 林业科学研究,2014,27(2):172-176.
- [5] Bustin S A, Beaulieu J F, Huggett J, et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments [J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11(1):1-5.
- [6] 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 and Genomics, 2012, 287(2):167-176.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 齐飞燕,胡陶,彭镇华,等. 毛竹实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选及成花基因 *PheTFL1* 表达分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(1):48-52.
- [10] 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.
- [11] Cui K, Wang H, Liao S, et al. Transcriptome Sequencing and Analysis for Culm Elongation of the World's Largest Bamboo (*Dendrocalamus sinicus*) [J]. Plos One, 2016, 11(6):e0157362.
- [12] 魏洁书,杨锦芬. 应用荧光定量比较 Ct 值法测定基因相对表达量[J]. 中国科技论文在线精品论文, 2013, 6(5):390-395.
- [13] Fraser C M, Chapple C. The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis* [J]. American Society of Plant Biologists, 2011, 9(1):e0152.
- [14] 吴建阳,何冰,杜玉洁,等. 利用 geNorm, NormFinder 和 Best-Keeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. 现代农业科技, 2017, (5):278-281.
- [15] Andersen C L, Jensen J L, rntoft 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 Research, 2004, 64(15):5245-5250.
- [16] Zeng S, Liu Y, Wu M, et al. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization and its applications in *Lycium* [J]. Plos One, 2014, 9(5):e97039.
- [17] 刘洪峰,高乐旋,胡永红. 牡丹不同发育阶段种子和花瓣组织实时荧光定量 PCR 中内参基因的挖掘与筛选[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(12):1639-1648.
- [18] Jaroová J, Kundu J K. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1):1-9.
- [19] 覃迎姿,黄先益,叶兴枝,等. 植物延伸因子 *eEF1A* 研究进展[J]. 南方农业学报, 2009, 40(5):472-477.
- [20] 李洁,谢文光,沈倍奋,等. *GAPDH* 功能多样性研究进展[J]. 军事医学, 2006, 30(5):483-486.
- [21] 郭景康,陈青云,戢茜,等. 拟南芥、水稻和杨树 *ACTIN* 家族全基因组分析[J]. 上海大学学报:自然科学版, 2009, 18(4):426-431.
- [22] 董辉,李越中,胡玮. γ -微管蛋白研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5):686-690.
- [23] Chao Z, Yan W, Fu M, et al. Molecular cloning, expression and functional analysis of three subunits of protein phosphatase 2A (*PP2A*) from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2017, 204(1):77-89.
- [24] 邢朝斌,刘岩,周秘,等. 刺五加液泡膜内在蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 中草药, 2014, 45(2):250-254.

(责任编辑:张玲)