

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.01.017

福建柏实时荧光定量 PCR 内参基因的选择

周成城¹, 荣俊冬², 谢德金², 杨德明², 何天友¹, 郑郁善^{1,2*}

(1. 福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

摘要: [目的] 筛选稳定的内参基因, 用于福建柏不同组织部位荧光定量 PCR 分析。[方法] 基于福建柏转录组数据, 以福建柏的根、皮和鳞叶为材料, 设置 5 个浓度梯度 (0.32、1.6、8、40、200 ng·μL⁻¹) 的各组织 cDNA 混样作为模板, 选择 *ACT7*、*UBQ*、*EF2*、*CACs*、*TIP41*、*UBC2b*、*RH8*、*GAPDH* 8 个基因作为候选内参基因。利用实时荧光定量 PCR 技术并结合 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 等软件对候选内参基因的表达稳定性进行评价。选择评价结果中较为稳定的候选基因作为内参基因, 通过分析 4 个萜类合成酶基因 (*FhTPS1*、*FhTPS2*、*FhTPS3*、*FhTPS4*) 在福建柏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: 不同质量浓度福建柏各组织 cDNA 混合样品中, 最稳定的内参基因是 *UBC2b* 和 *ACT7*。荧光定量 PCR 分析表明, 候选内参基因 *ACT7* 和 *UBC2b* 在福建柏不同组织部位中表达稳定。4 个目的基因的相对表达量在福建柏根、皮和鳞叶中均有所不同, *FhTPS1* 基因在根中相对表达量最高, *FhTPS2* 和 *FhTPS4* 在鳞叶中相对表达量最高, *FhTPS3* 在皮中相对表达量最高。[结论] 8 个候选内参基因中, *ACT7* 与 *UBC2b* 稳定表达且不受 cDNA 质量浓度变化影响, 二者的组合能够实现稳定归一化并提高定量分析结果准确性, 适合作为福建柏各组织部位荧光定量表达分析的理想内参基因。*RH8* 的表达稳定性低, 不适合作为福建柏的内参基因。

关键词: 福建柏; 内参基因; 萜类合成酶; 定量表达

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)01-0137-09

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法, 具有准确性高、特异性好、试验过程简便等特点^[1-2]。荧光定量试验结果的准确性和可靠性取决于特定引物的扩增效率、cDNA 的纯度以及内参基因的稳定性等, 稳定的内参基因能够使目的基因的定量分析结果准确、特异性好^[3-4]。在不同植物间或同一植物不同组织部位间内参基因的表达稳定性有一定差异, 通常会选择在植物生命活动全过程或外界环境变化时都能表达相对稳定、受环境影响较小的管家基因 (Housekeeper gene), 如肌动蛋白 (Actin)、泛素蛋白 (Ubiquitin) 和甘油

醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 等^[5-6]。

福建柏 (*Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas) 为柏科福建柏属, 为我国特有种属, 分布在福建、广东、云南、广西等我国南部省份^[7]; 其树干通直、树型优美、四季常青、适应性强、抗性较好、材性稳定、结构细腻, 是我国优良的材用-景观两用型树种之一。不仅如此, 福建柏精油中含有多种药用、化工价值的成分, 开发利用价值高^[8]。但福建柏的研究集中于混交造林、成分分析等方面, 随着研究的深入, 分子生物学研究必不可少, 如功能基因、转录因子的表达分析等研究, 均涉及到使用荧光定量 PCR 技术检测目的基因的相对表达情况。本研究从福建柏转录组中选择了 8 个

收稿日期: 2020-04-10 修回日期: 2020-05-09

基金项目: 福建省科技重大专项 (2018NZ0001-1); 福建农林大学科技发展基金项目 (KF2015085)

* 通讯作者: 郑郁善, 博士生导师, 教授. 主要研究方向: 园林植物与应用、森林培育. Email: zys1960@163.com

管家基因作为候选内参基因, 包括肌动蛋白-7 (Actin-7, *ACT7*)、泛素蛋白 (Ubiquitin, *UBQ*)、延长因子-2 (Elongation factor-2, *EF2*)、氯氰菊酯配合物 (Clathrin adaptor complexes, *CACs*)、类 Tip41 家族蛋白 (Tip41-like family protein, *TIP41*)、泛素结合酶 E2 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2, *UBC2b*)、读框螺旋酶-8 (READ box helicase 8, *RH8*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)。通过 qRT-PCR 试验并结合 geNorm、Normfinder 和 Bestkeeper 软件进行分析, 筛选出稳定性强的内参基因。选择 4 个福建柏萜类合成酶基因 (*FhTPS*) 作为目的基因, 萜类化合物作为福建柏精油及挥发性气体中的主要成分之一, 而萜类合成酶基因为萜类合成途径中的关键酶基因, 具有重要的研究意义^[9]。利用目的基因在福建柏不同组织部位的相对表达水平及模式来验证筛选出的内参基因的稳定性, 为后续福建柏 RT-qPCR 试验的准确性、科学性提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为 20 年生生长良好、无病虫害的福建柏鳞叶、树皮和根, 于 2019 年 8 月采集于福建省福州市永泰县大湖国有林场的福建柏天然林, 使用无菌水把材料清洗干净并用无菌滤纸擦干后, 用锡箔纸包裹立即放进干冰中, 带回实验室置于 -80°C 冰箱保存备用。在同一区内取 3 棵树龄相近、长势一致的福建柏的鳞叶、树皮和根分别设置 3 个生物学重复用于总 RNA 提取、定量分析等试验。针对转录组测序, 按以上方式单独采集了植物各部位材料的 3 次生物学重复用于测序。

1.2 主要试剂与仪器

总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒、TB Green Premix Ex TaqII 购于 TaKaRa 公司; qRT-PCR 仪为 Applied BiosystemsTM 7500; 分光光度仪为 NanoDrop 2000。

1.3 方法

1.3.1 转录组测序、总 RNA 的提取与 cDNA 第一条链的合成 将采集回来的福建柏根、皮和鳞叶 3 个组织部位的植物材料立即送往武汉迈特维尔生物科技有限公司进行无参转录组测序。按照总 RNA 提取试剂盒说明书和反转录试剂盒说明书的操作步骤分别提取福建柏 3 个组织部位的总 RNA, 并进

行浓度测定和琼脂糖凝胶电泳检测。后反转录合成 cDNA 第一条链。

1.3.2 引物设计与特异性检测 从福建柏转录组数据筛选出表达量高、表达稳定的 *TPS* 基因部分片段, 经过 NCBI-Blast 比对后将匹配的 *TPS* 基因用 Primer Premier 5.0 软件设计 4 个 *FhTPS* 基因的 RT-qPCR 引物, 同时筛选并设计福建柏 8 个候选内参基因 (*ACT7*、*UBQ*、*EF2*、*CACs*、*TIP41*、*UBC2b*、*RH8*、*GAPDH*) 的引物 (表 1), 引物由福州铂尚测序公司提供。将设计好的引物用 TB Green 试剂盒进行 RT-qPCR 检测特异性 (即是否产生二聚体), 检测中模板用 ddH₂O 代替, 分析各引物的溶解曲线和高表达扩增情况。

表 1 福建柏内参基因及 *TPS* 基因引物

Table 1 Primer of reference genes and *TPS* genes of *Fokienia hodginsii*

基因名称 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	退火温度 T _m /°C	扩增长度 Amplification length/bp
<i>ACT7</i>	F: CTGCAGAGCGAGAAATTGTTTCG	60.5	90
	R: TTCCTTGGCTGTTTCAAGC	59.0	
<i>UBQ</i>	F: TGCCGAACCTGAACCTTTGC	59.6	81
	R: TTTTGGCTGAGTGACGCTG	59.6	
<i>EF2</i>	F: TTGTACGTGTGACGTGCAG	59.3	78
	R: ACTTGGAAGCCGTTTCAAC	59.9	
<i>CACs</i>	F: TGTAGTAGATGCCGGACGTTTG	60.4	79
	R: TGTTCCTGGCATTTCGCTTTG	59.4	
<i>TIP41</i>	F: AAATACGAGGGTTGGAGAGCAG	60.1	126
	R: ATGGGTTGCTTGTGGAGTG	58.7	
<i>UBC2b</i>	F: TTGATGCAGCGAAGGAATGG	58.9	76
	R: TGCATTTCCTGACAATCCG	58.6	
<i>RH8</i>	F: ACTCCAATTTACAGCCCTTC	58.5	80
	R: ACAGGCGCTTGACTTTGAAG	59.1	
<i>GAPDH</i>	F: TCGATTCCAAGGCCAGTATAGC	60.0	130
	R: TTGCGAGAACCAACGAATGC	59.8	
<i>FhTPS1</i>	F: TGGTGAACGTGCTGAAAAGC	59.6	139
	R: ATGGCGATCAATTCCAAGGC	59.0	
<i>FhTPS2</i>	F: TCTGAATACCTCGAAGCTGTGG	60.1	134
	R: ATTCCGAGGCATTGCAACTC	58.9	
<i>FhTPS3</i>	F: TTGCTCCCAAGTTGCATTCC	58.8	72
	R: AGCCCACTTGTCAAAAGTCC	59.7	
<i>FhTPS4</i>	F: TGGTGTGGATTCTTCTGCAC	58.1	88
	R: TCGAAATGTTGCCCAATCC	58.8	

1.3.3 内参基因筛选和 *FhTPS* 基因定量表达分析

将福建柏根、树皮和鳞叶反转录得到 cDNA 稀释至 $200\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 设置 5 个质量浓度梯度, 以 5 倍浓度稀释, 得到 200、40、8、1.6、0.32 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 5 个质量浓度的 cDNA 样品。把各质量浓度 3 个组织部位稀释好的 cDNA 混合至一个离心管中, 充分混匀后以此为模板。将 8 个候选基因 4 个 *FhTPS*

基因用 TB Green 试剂盒进行 RT-qPCR 实验, 反应体系 TB Green Premix Ex Taq 10 μL , 正反引物各 0.8 μL , RoxII 0.4 μL , ddH₂O 6 μL 。在内参基因筛选中按照 5 个质量浓度梯度作为 cDNA 的质量浓度, 在 *FhTPS* 基因进行验证定量分析中按照 TB Green 试剂盒说明书要求以 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 作为 cDNA 的质量浓度。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 34 s, 共 40 个循环; 溶解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s。每个候选内参基因在不同部位和不同浓度均设置 4 个重复, 后用 $Ct(2^{-\Delta\Delta Ct})$ 法计算 8 个候选内参基因和 4 个 *FhTPS* 基因在福建柏根、皮和鳞叶中的相对表达量。

1.3.4 数据处理 利用 3 个内参基因稳定性评价软件 geNorm^[10]、Normfinder^[11] 和 BestKeeper^[12], 对 8 个候选内参基因的稳定性进行统计分析, 筛选出适合于福建柏各组织的稳定内参基因及组合。

2 结果与分析

2.1 转录本的拼接和总 RNA 的提取

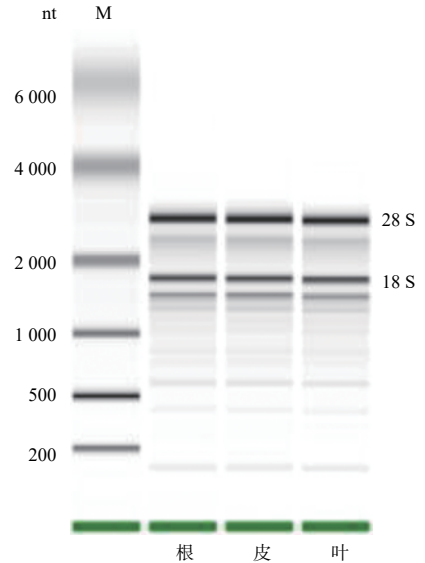
由测序得到的福建柏转录组数据中, 通过拼接得到 330 521 条转录本序列, 平均长度为 721 bp, 可用于后续分析使用。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 检测结果条带清晰, 28S rRNA 比 18S rRNA 条带更亮。同时利用分光光度仪进行纯度检测, 结果显示: A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0 之间。因此, 可以说明 RNA 无降解、完整性良好 (图 1)。

2.2 引物验证

通过 RT-qPCR 的扩增, 结果显示: 8 个候选内参基因的扩增效率为 98.32%~104.79%, 相关系数 R^2 为 0.973~0.999, 符合内参基因的初步要求, 可进行进一步反应; 而且 8 个候选内参基因扩增产物的溶解曲线均为单一峰, 特异性较好, 熔解温度 (T_m) 均在 80~90 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 可用于进一步分析 (图 2)。

2.3 候选内参基因 Ct 值分析

从 RT-qPCR 实验获得的各候选内参基因 Ct 值与其表达丰度成反比, Ct 值越大, 基因表达量越低^[13]。结果 (图 3) 显示: 从 5 个质量浓度的 Ct 值综合分析, 所选择的 8 个候选内参基因的平均值最低的为 *UBC2b* (24.40), 平均值最高的为 *UBQ* (31.25)。从各质量浓度单独分析, 从高浓度至低浓度过渡时, Ct 值均逐渐增大, 符合表达规律。而



注: nt: 核酸碱基; M: RNA marker RL6000

Notes: nt: indicates nucleotide; M: indicates RNA marker RL6000

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA agarose gel electrophoresis

且 5 个质量浓度梯度下各候选内参基因的平均 Ct 值大小规律一致, 说明试验误差较小。*UBQ* 在各质量浓度下 Ct 值明显高于其他 7 个候选内参基因, 不适合作为内参基因来检测高丰度基因的表达情况。

2.4 内参基因稳定性分析

2.4.1 geNorm 软件分析 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^[14]。软件分析结果表明: 在各处理中, 8 个候选内参基因 M 值均低于 1.5, 说明候选内参基因的表达均较稳定。表 2 可知: 在 5 个质量浓度下, M 值最小的均为 *ACT7*。在质量浓度为 8、200 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, *RH8* 的 M 值最大; 在质量浓度为 1.6、40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, *DAPDH* 的 M 值最大; 在质量浓度为 0.32 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, *TIP41* 的 M 值最大。说明 *ACT7* 在 geNorm 软件分析下的稳定性最好, 而 *RH8* 和 *DAPDH* 的稳定性较差。

在 geNorm 软件分析中, 标准化因子的配对差异分析 (V_n/V_{n+1}) 是对候选内参基因最佳配对数目的衡量。当 $V_n/V_{n+1} = 0.15$ 为分界值, 若 V_n/V_{n+1} 小于该数值说明 n 个内参基因可以实现稳定归一化^[10]。结果 (图 4) 表明: V_2/V_3 、 V_3/V_4 、 V_4/V_5 、 V_6/V_7 均小于 0.15, 说明在 $n=2$ 时已经能够实现稳定归一

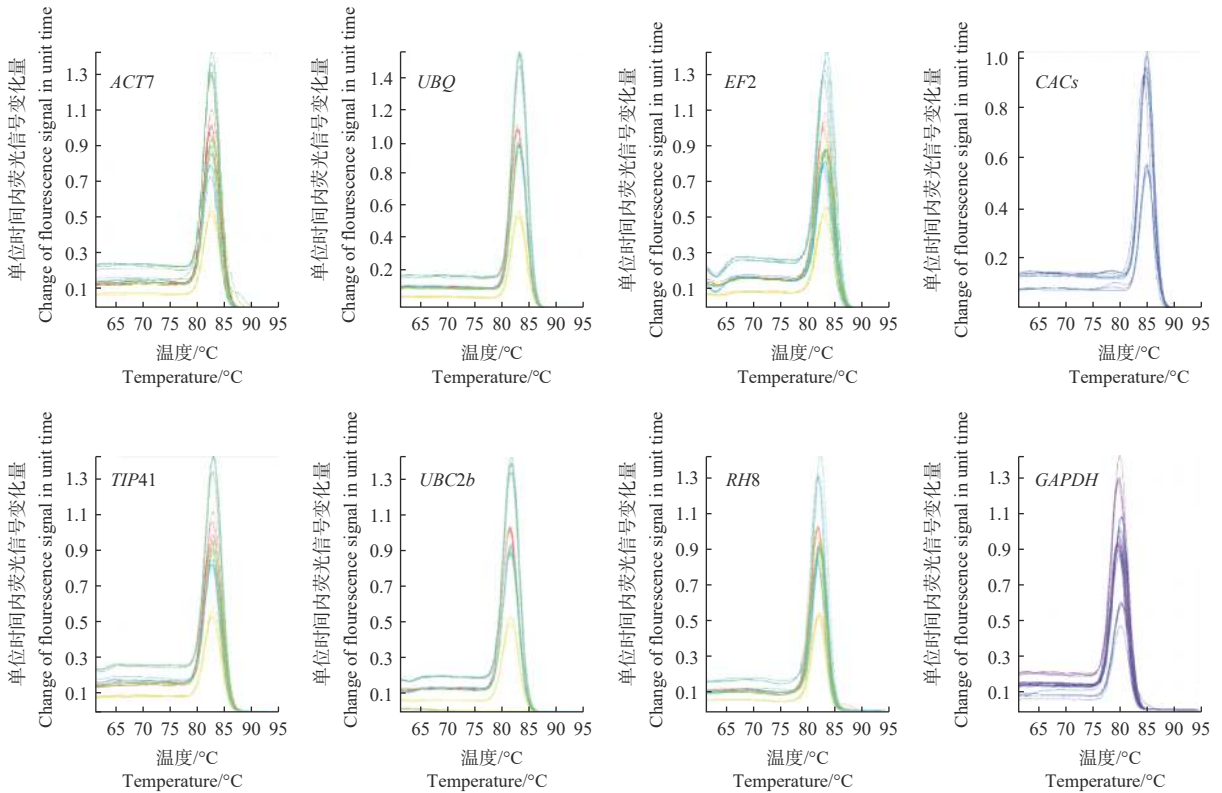


图 2 候选内参基因溶解曲线

Fig. 2 Melting curves of the candidate reference genes

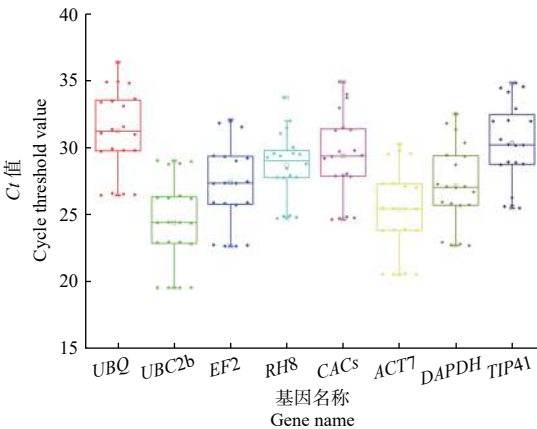


图 3 5 个质量浓度梯度福建柏组织混样的 cDNA 下候选基因 Ct 值

Fig. 3 The cycle threshold values of candidate reference genes in 5 mass concentrations of cDNA mixture

化, 即 2 个稳定内参基因的组合可以使定量结果更准确、可靠。

2.4.2 Normfinder 软件分析 利用 Normfinder 软件分析 8 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 3) 表明: 8 个候选内参基因的稳定性排序在 5 个质量浓度下

各有不同, 在质量浓度为 $0.32 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 表达稳定性较好的是 *RH8*、*CACs* 和 *ACT7*, 稳定性较差的是 *TIP41*; 在质量浓度为 1.6 、 $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 表达稳定性较好的均为 *ACT7*、*UBC2b*, 稳定性较差的分别是 *DAPDH* 和 *RH8*; 在质量浓度为 $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 表达稳定性较好的是 *EF2* 和 *UBC2b*, 稳定性较差的是 *DAPDH*; 在质量浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时表达稳定性较好的是 *TIP41* 和 *ACT7*, 稳定性较差的是 *RH8*。

2.4.3 BestKeeper 软件分析 BestKeeper 软件可以通过计算每个基因直接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*^[14]。此外, 当 *SD* 值大于 1 时则表明基因的表达不稳定^[13]。结果 (表 4) 显示: 在 5 个质量浓度梯度下, *SD* 值和 *CV* 值较小的均为 *UBC2b*、*EF2* 和 *ACT7*, 其中, 3 个候选内参基因的 *SD* 值均小于 0.1, *CV* 值均小于 0.4; 而 5 个质量浓度梯度下的 *r* 值排序差异较大, 其中, *r* 值较大的为 *TIP41* 和 *ACT7*, 较小的为 *UBC2b*。将 5 个质量浓度下的 *SD*、*CV* 和 *r* 进行综合排序, 稳定性较好的为 *UBC2b*、*ACT7* 和 *EF2*,

表 2 geNorm 软件分析不同 cDNA 质量浓度下候选内参基因稳定性

Table 2 Stability analysis of candidate reference genes of in different mass concentrations of cDNA by geNorm

排名 Ranking	0.32 ng· μL^{-1}		1.6 ng· μL^{-1}		8 ng· μL^{-1}		40 ng· μL^{-1}		200 ng· μL^{-1}	
	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	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>ACT7</i>	0.037	<i>ACT7</i>	0.042	<i>ACT7</i>	0.046	<i>ACT7</i>	0.126	<i>ACT7</i>	0.289
2	<i>UBC2b</i>	0.040	<i>RH8</i>	0.043	<i>UBC2b</i>	0.050	<i>EF2</i>	0.131	<i>EF2</i>	0.297
3	<i>UBQ</i>	0.056	<i>CACs</i>	0.044	<i>EF2</i>	0.072	<i>UBC2b</i>	0.178	<i>TIP41</i>	0.323
4	<i>CACs</i>	0.065	<i>UBC2b</i>	0.060	<i>DAPDH</i>	0.097	<i>UBQ</i>	0.219	<i>UBC2b</i>	0.339
5	<i>RH8</i>	0.068	<i>TIP41</i>	0.068	<i>TIP41</i>	0.134	<i>TIP41</i>	0.327	<i>CACs</i>	0.548
6	<i>EF2</i>	0.077	<i>UBQ</i>	0.073	<i>CACs</i>	0.179	<i>CACs</i>	0.559	<i>DAPDH</i>	0.649
7	<i>DAPDH</i>	0.093	<i>EF2</i>	0.094	<i>UBQ</i>	0.208	<i>RH8</i>	0.765	<i>UBQ</i>	0.763
8	<i>TIP41</i>	0.151	<i>DAPDH</i>	0.108	<i>RH8</i>	0.297	<i>DAPDH</i>	0.939	<i>RH8</i>	1.134

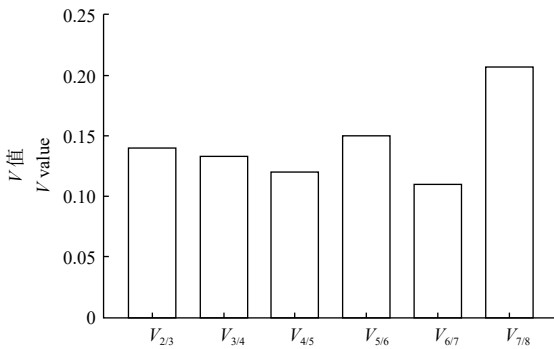


图 4 geNorm 软件分析内参基因最适数目

Fig. 4 Analysis of optimal number of reference genes for normalization by geNorm

稳定性较差的为 *DAPDH* 和 *RH8*。

2.5 内参基因稳定性验证

根据 3 个分析软件得出的结果, 选择稳定性较好的 2 个基因 (*ACT7* 和 *UBC2b*) 进行验证, 以稳定性较差的 *RH8* 基因作为对照, 同时利用 4 个 *FhTSPS* 基因验证内参基因在福建柏根、树皮、鳞叶 3 个不同组织中的表达稳定性。结果 (图 5) 显

示: 4 个 *FhTSPS* 基因在福建柏的根、树皮、鳞叶 3 个不同组织的相对表达量趋势一致, 符合转录组数据中 FPKM (Reads Per Kilobase per Million) 值中的变化规律, 从而验证了 *FhTSPS* 基因能够在福建柏 3 个组织部位中稳定表达。4 个基因在以 *ACT7* 和 *UBC2b* 作为内参基因时, 表达趋势一致且稳定, 验证了 *ACT7* 和 *UBC2b* 有较好的稳定性, 2 个作为组合进行基因表达量分析时能够相互印证, 增加定量结果的准确性。以 *RH8* 为内参基因时, 4 个基因的表达趋势波动较大, 验证了 *RH8* 稳定性较差。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 是基因表达分析研究中的重要技术之一, 分析结果的准确性和重复性会受试验中各因素影响, 其中, 一个重要因素是内参基因的稳定性, 较为稳定的内参基因, 才能确保分析结果的准确性^[15]; 而内参基因的稳定性是相对的, 不

表 3 Normfinder 软件分析不同 cDNA 质量浓度下候选内参基因稳定性

Table 3 Stability analysis of candidate reference genes of in different mass concentrations of cDNA by Normfinder

排名 Ranking	0.32 ng· μL^{-1}		1.6 ng· μL^{-1}		8 ng· μL^{-1}		40 ng· μL^{-1}		200 ng· μL^{-1}	
	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	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>RH8</i>	0.014	<i>ACT7</i>	0.016	<i>ACT7</i>	0.023	<i>EF2</i>	0.063	<i>TIP41</i>	0.143
2	<i>CACs</i>	0.015	<i>UBC2b</i>	0.032	<i>UBC2b</i>	0.025	<i>UBC2b</i>	0.083	<i>ACT7</i>	0.145
3	<i>ACT7</i>	0.019	<i>UBQ</i>	0.066	<i>DAPDH</i>	0.072	<i>UBQ</i>	0.093	<i>UBC2b</i>	0.251
4	<i>UBC2b</i>	0.053	<i>TIP41</i>	0.072	<i>EF2</i>	0.097	<i>ACT7</i>	0.106	<i>EF2</i>	0.318
5	<i>UBQ</i>	0.056	<i>RH8</i>	0.076	<i>TIP41</i>	0.134	<i>TIP41</i>	0.137	<i>CACs</i>	0.672
6	<i>EF2</i>	0.106	<i>CACs</i>	0.078	<i>CACs</i>	0.179	<i>CACs</i>	1.131	<i>DAPDH</i>	0.896
7	<i>DAPDH</i>	0.137	<i>EF2</i>	0.115	<i>UBQ</i>	0.208	<i>RH8</i>	1.276	<i>UBQ</i>	1.106
8	<i>TIP41</i>	0.319	<i>DAPDH</i>	0.137	<i>RH8</i>	0.297	<i>DAPDH</i>	1.350	<i>RH8</i>	2.176

表4 BestKeeper 软件分析不同 cDNA 质量浓度下
候选内参基因稳定性

Table 4 Stability analysis of candidate reference genes
different mass concentrations of cDNA by BestKeeper

综合排序 Comprehensive rank	基因名称 Gene name	SD	CV	r
1	<i>UBC2b</i>	0.050	0.184	0.238
2	<i>ACT7</i>	0.090	0.320	0.614
3	<i>EF2</i>	0.086	0.298	0.332
4	<i>UBQ</i>	0.206	0.618	0.364
5	<i>CACs</i>	0.336	1.076	0.488
6	<i>TIP41</i>	0.206	0.680	0.835
7	<i>DAPDH</i>	0.368	1.262	0.339
8	<i>RH8</i>	0.588	1.940	0.568

注: SD、CV和r值均为不同质量浓度下的平均值。

Note: SD, CV and r value are average value in different mass concentrations.

同植物、不同组织部位、不同生长时期和不同试验条件均会影响内参基因的稳定性^[16]。如 *Actin* 基因在核桃^[17] 中为理想的内参基因, 而在剑麻^[18] 中表现不稳定; 在多花兰的花器官中的理想内参基因为 *GAPDH*, 营养器官中则为 28S *rRNA*^[19]; 在川续

断根的不同生长时期, 筛选出的理想内参基因均不相同^[20]; 玉米在多种非生物胁迫和不同激素处理下的理想内参基因均有所差异^[21]。由此可知, 在进行荧光定量 PCR 实验前, 针对不同试验材料、试验条件等因素进行内参基因的筛选是有必要的。

理想的内参基因在同一植物所有组织中均表达相对稳定且受内外因素影响较小, 一般为细胞骨架的基本组成或参与生物体基本代谢调控过程的管家基因, 如编码细胞骨架结构蛋白的 *Actin*、*TUB* 和 *TUA* 等基因^[22]; 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 *GAPDH* 基因^[23]; 标记待分解蛋白、跨膜蛋白的泛素 *UBC*、*UBQ* 基因等等^[24]。本研究根据前人研究报道的常用内参基因, 在福建柏转录组数据库中选择 8 个候选内参基因, (*ACT7*、*UBQ*、*EF2*、*CACs*、*TIP41*、*UBC2b*、*RH8*、*GAPDH*), 利用 GeNorm、Normfinder 和 BestKeeper 软件对这些基因在福建柏不同组织 (根、皮和鳞叶) 混合样品中的 qPCR 试验结果进行综合分析。3 个软件对内参基因稳定性评价的一个重要指标为 *Ct* 值, 理想的内参基因平均 *Ct* 值通常在 15~30 之间^[13]。通过比较 8 个候选内参基因的 *Ct* 值, 发现除 *UBQ* 以外, 其它 7 个候选内参基因的 *Ct* 值均在该范围之内, 同时在软件分析中 *UBQ* 稳定性也

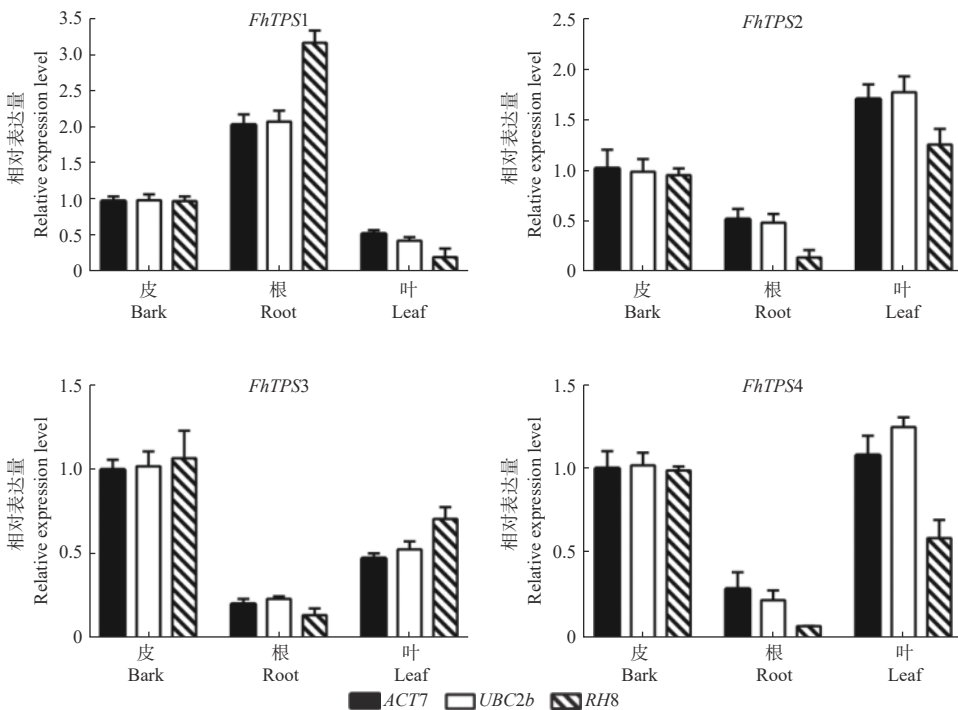


图5 候选内参基因作为试验内参基因分析目的基因的表达

Fig. 5 The candidate reference genes as test reference gene in the analysis of target gene expression

较差。

geNorm 和 Normfinder 软件均是根据 M 值来评价分析, 2 个软件分析结果中最稳定的均为 *ACT7*, BestKeeper 则显示 *UBC2b* 最稳定, 说明不同软件分析得到的最稳定内参基因有一定差异。Fan 等研究结果也验证了这一结论, 其分析毛竹不同组织部位的稳定内参基因, 在 3 个软件中候选内参基因的排名均有所不同^[25]。在 5 个质量浓度 (0.32、1.6、8、40 和 200 ng· μL^{-1}) 的不同组织 cDNA 混合样品中, geNorm 和 BestKeeper 结果显示 5 个质量浓度中最稳定的均为 *ACT7*, Normfinder 结果显示 5 个质量浓度中最稳定基因各有差异, 推测可能是 cDNA 混合样品中不同组织存在一定表达差异造成的, 但综合其他 2 个软件分析结果, 3 个软件的总体结果仍趋于稳定的内参基因不会受到 cDNA 质量浓度变化的影响, *ACT7* 为最稳定的内参基因。但单个内参基因往往会产生一些试验误差, 2 个及以上内参基因的组合可以减少误差, 提高准确性^[26]。如 Xiao 等以不同时期杜鹃花的不同组织为材料, 分析单个内参基因和 2 个内参基因组合对目的基因的相对表达量进行分析, 结果显示 2 个内参基因组合比单个内参基因的结果差异较小^[27]。因此, geNorm 软件分析中标准化因子的配对差异分析 (V_n/V_{n+1}) 有一定价值, 其对候选内参基因最佳配对数目的衡量, 判断内参基因能够实现稳定归一化的数量。geNorm 结果显示 V_2/V_3 值小于 0.15, 说明 2 个内参基因的组合就能实现稳定归一化, 即选择稳定性最好的 *ACT7* 和 *UBC2b* 组合。

利用软件分析并不能保证一个内参基因有准确的结果, 还需在利用相关目的基因在特定试验条件下验证筛选出的内参基因的表达稳定性, 才能得出真实可靠的定量数据^[28]。因此, 本研究选择 4 个 *FhTPS* 基因作为目的基因, 以 *ACT7* 和 *UBC2b* 组合作为内参基因, 稳定性最差的 *RH8* 基因作为对照, 分析了目的基因在福建柏根、皮和鳞叶中的表达。定量分析结果验证了筛选出的 *ACT7* 和 *UBC2b* 能够使目的基因有较为稳定的相对表达水平且表达趋势一致, *RH8* 稳定性差不适合作为内参基因, 该结果与 geNorm 和 BestKeeper 软件分析结果一致, 与 Normfinder 软件的结果有一定差异, 但与 3 个软件的综合分析结果一致。因此, 通过对目的基因的定量分析对筛选出的内参基因进行验证能够对软件分

析的结果进行佐证, 使内参基因筛选结果更具科学性。

4 结论

本研究通过对比分析 *ACT7*、*UBQ*、*EF2*、*CACs*、*TIP41*、*UBC2b*、*RH8*、*GAPDH* 共 8 个候选内参基因在福建柏不同质量浓度的各组织 cDNA 混合样品中 RT-qPCR 分析中的表达稳定性, 利用 3 个分析软件综合分析并筛选获得了稳定表达的内参基因 *ACT7* 与 *UBC2b*, 且 *ACT7* 和 *UBC2b* 组合能够实现稳定均一化, 使定量结果更可靠; *RH8* 表达不稳定, 不适合作为内参基因。经过 4 个 *FhTPS* 目的基因的验证, 确定了 2 个基因的稳定性。这对今后福建柏的基因定量表达研究有重要意义。

参考文献:

- [1] Luo M, Gao Z, Li H, et al. Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4444. doi: 10.1038/s41598-018-22743-6.
- [2] 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 Biology, 2010, 10(1): 49-56.
- [3] Saddhe A A, Malvankar M R, Kumar K. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in halophytic plant *Rhizophora apiculata*[J]. PeerJ, 2018, 6: e5226. doi: 10.7717/peerj.5226. eCollection 2018.
- [4] 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.
- [5] Huis R, Hawkins S, Neutelings G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 71-79.
- [6] Xia W, Xiao M, Huang L, et al. Identification of the valid reference genes for quantitative RT-PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) under salt stress[J]. Molecules, 2009, 20(3): 4833-4847.
- [7] Yin Q Y, Chen S F, Guo W, et al. Pronounced genetic differentiation in *Fokienia hodginsii* revealed by simple sequence repeat markers[J]. Ecology and evolution., 2018, 8(22): 10938-10951.
- [8] 周成城, 徐文达, 陈凌艳, 等. 福建柏种质资源的保护和利用研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2019, 15(4): 271-278.
- [9] Chen X, Chen H, Yuan J S, et al. The rice terpene synthase gene OsTPS19 functions as an (S)-limonene synthase in planta and its overexpression leads to enhanced resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(10): 1778-1787.
- [10] Vandesompele J, De Peter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization

- of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(7): research0034.1.
- [11] 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 Research*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [12] 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]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509-515.
- [13] 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.
- [14] 张 颖, 陈婉婷, 陈冉红, 等. 杉木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择[J]. *林业科学研究*, 2019, 32(2): 65-72.
- [15] Wu Y, Tian Q, Huang W, *et al.* Identification and evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Passiflora edulis* under stem rot condition. [J]. *Molecular biology reports*, 2020, 47(4): 2951-2962.
- [16] Wei L, Miao H, Zhao R, *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.
- [17] 宋晓波, 常英英, 刘 昊, 等. 核桃不定根发生阶段内参基因筛选与关键基因表达分析[J]. *园艺学报*, 2019, 46(10): 1907-1918.
- [18] 张燕梅, 王瑞芳, 杨子平, 等. 剑麻内参基因筛选与稳定表达分析[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(11): 2166-2173.
- [19] 张 玥, 陈 娟, 谢泰祥, 等. 多花兰实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(24): 8163-8169.
- [20] 晋海军, 王海霞, 刘绍红, 等. 川续断根实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(24): 7998-8004.
- [21] 齐月爱. 玉米在非生物胁迫和激素处理条件下实时荧光定量PCR内参基因的选择[D]. 四川: 四川农业大学, 2012: 42-46.
- [22] Deng L, Wu Y, Li J, *et al.* Screening reliable reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Moringa oleifera*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0159458.
- [23] Nicholls C, Li H, Liu J. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions[J]. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology*, 2012, 39(8): 674-679.
- [24] Chen C, Chen R, Wu S Y, *et al.* Genome-wide analysis of *Glycine soja* ubiquitin (UBQ) genes and functional analysis of GsUBQ10 in response to alkaline stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(3): 268-278.
- [25] 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.
- [26] 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]. *Molecular Genetics Genomics*, 2016, 291(4): 1795-1811.
- [27] Xiao Z, Sun X, Liu X, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. Don[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1547-1552.
- [28] Faccioli P, Ciceri G P, Provero P, *et al.* A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(5): 679-688.

Quantitative Real-time PCR Analysis of *Fokienia hodginsii* During Selection of Reference Genes

ZHOU Cheng-cheng¹, RONG Jun-dong², XIE De-jin², YANG De-ming², HE Tian-you¹, ZHENG Yu-shan^{1,2}

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

2. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: [Objective] To Screen the stable internal control genes for fluorescence quantitative PCR analysis in different tissues of *Fokienia hodginsii*. [Method] Based on transcriptome data of *F. hodginsii*, the root, bark and leaf of *F. hodginsii* were selected as materials, the cDNA mixture of different tissues of *F. hodginsii* in 5 mass concentrations (0.32, 1.6, 8, 40 and 200ng· μL^{-1}) were established as models, 8 genes (*ACT7*, *UBQ*, *EF2*, *CACs*, *TIP41*, *UBC2b*, *RH8* and *GAPDH*) were selected as the candidate genes. The expression stability of the candidate genes were evaluated by real-time fluorescent quantitative PCR combined with geNorm, NormFinder and BestKeeper software. Stable candidate genes in evaluation results were selected as the internal control genes and their stabilities were verified by analyzing the relative expression of four terpene synthase target genes (*FhTPS1*, *FhTPS2*, *FhTPS3* and *FhTPS4*) in different tissues of *F. hodginsii*. [Result] The results by analyzing with the three kinds of software showed that the most stable internal control genes in different tissues were *ACT7* and *UBC2b*. The results of fluorescent quantitative PCR analysis showed that *ACT7* and *UBC2b* were stably expressed in different tissues of *F. hodginsii*. The relative expression levels of the four target genes were different among the tissues of *F. hodginsii*. The relative expression level of *FhTPS1* was the highest in root, *FhTPS2* and *FhTPS4* were the highest in leaf, *FhTPS3* was the highest in bark. [Conclusion] Of the 8 candidate reference genes, *ACT7* and *UBC2b* are suitable as internal control genes for expression analysis due to they are stably expressed among tissues of *F. hodginsii* and not affected by the changes of cDNA mass concentration, the combination of two genes is normalized stably and improves the accuracy of quantitative analysis. *RH8* is not suitable as internal control gene due to its instability.

Keywords: *Fokienia hodginsii*; reference gene; terpene synthase (TPS); quantitative expression

(责任编辑: 张 研)