

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220500

# 镉胁迫下构树 qRT-PCR 内参基因 筛选及验证

李红英<sup>1</sup>, 陈萌笛<sup>1</sup>, 王政博<sup>1</sup>, 郝自远<sup>1</sup>, 刘龙昌<sup>1</sup>, 赵西平<sup>1</sup>, 倪建伟<sup>2\*</sup>

(1. 河南科技大学园艺与植物保护学院, 河南 洛阳 471000; 2. 国家林业和草原局国家公园(自然保护地)发展中心, 北京 100714)

**摘要:** [目的] 筛选出镉(Cd)胁迫下构树中稳定表达的内参基因, 为后续开展构树耐Cd的分子机理研究奠定基础。[方法] 以Cd胁迫下构树的根和叶组织为材料, 通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测10个候选基因(*BpUBE2*、*BpRPL8*、*BpActin*、*BpGAPDH*、*BpHSP*、*BpTUA*、*BpDOUB*、*Bpβ-TUB*、*BpHIS*、*BpNADH*)的表达情况, 利用geNorm、NormFinder、BestKeeper和RefFinder分析软件对候选内参基因的表达稳定性进行综合评估, 并通过逆境胁迫响应基因*BpDREB*验证筛选出的内参基因的稳定性。[结果] *BpDOUB*和*BpNADH*在Cd胁迫下构树中基因表达相对稳定, *BpGAPDH*表达稳定性最差。以*BpDREB*验证内参稳定性时发现, 单独或组合使用*BpDOUB*及*BpNADH*为内参基因时, *BpDREB*基因表达水平显示出相似的趋势, 而稳定性较差的*BpGAPDH*基因未能对*BpDREB*的表达量进行准确校正。[结论] *BpDOUB*、*BpNADH*基因以及*BpDOUB*+*BpNADH*基因组合均可作为合适的内参基因, 提高Cd胁迫下构树相关基因表达分析的可靠性。

**关键词:** 构树; 内参基因; Cd胁迫; 荧光定量PCR

**中图分类号:** S718.46

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2023)04-0129-10

构树(*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.) 为桑科(Moraceae)构属(*Broussonetia*)落叶乔木, 自然分布于我国大部分地区和东南亚, 是一种典型的乡土树种和先锋植物。其表型性状和遗传多样性丰富, 基因组紧凑, 常作为木本植物研究的模式材料。因其易繁殖、抗逆性强、生长速度快等优点<sup>[1]</sup>, 被广泛应用于饲料、造纸和植被恢复等领域。此外, 构树还具有药用价值, 其类黄酮、多酚、果糖等含量远高于其它植物<sup>[2-3]</sup>, 构树中的黄酮衍生物对癌细胞有抑制作用<sup>[4]</sup>, 多酚类物质可以抑制冠状病毒蛋白酶<sup>[5]</sup>。近年来, 有研究证明, 构树对重金属Cd有一定的富集和转运能力<sup>[6]</sup>, 因此, 被认为是重金属污染区群落恢复的先锋树

种<sup>[7]</sup>, 其主要通过诱导或增强相关Cd抗性基因表达, 合成功能性基因来应对Cd胁迫<sup>[8]</sup>。因此, 了解关键基因的表达方式将有助于阐明构树Cd胁迫中所涉及的分子机制。

实时荧光定量PCR(qRT-PCR)因其方便快捷、强特异性和高灵敏度等优势, 已成为研究基因转录水平表达量的有效手段。然而, RNA质量、cDNA质量、样品稀释倍数以及实验操作准确度等因素都会影响qRT-PCR的准确性<sup>[9]</sup>, 因此, 引入适宜的内参基因, 对目的基因表达量标准化分析至关重要<sup>[10]</sup>。理想的内参基因是能够在细胞中稳定表达、表达量几乎不受外界环境干扰的基因, 一般为维持细胞基本生命活动的管家基因(Housekeeper

收稿日期: 2022-10-25 修回日期: 2023-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(32171701); 国家自然科学基金(31600552); 河南科技大学博士科研启动基金(13480076); 河南科技大学实验技术开发基金项目(SY2122014)

作者简介: 李红英, 博士, 讲师。主要研究方向: 农林植物发育相关基因鉴定和调控机理研究。Email: lihy@haust.edu.cn

\* 通讯作者: 倪建伟, 博士, 副研究员。主要研究方向: 树木生理代谢、国家公园建设等研究。Email: njwcaf@163.com

gene), 如肌动蛋白基因 (*Actin*)、18S 核糖体 RNA (*18S Ribosome RNA*)、微管蛋白基因 (*Tublin*) 和泛素蛋白基因 (*Ubiquitin*) 等; 但近年来大量研究证明, 随着物种以及组织器官的差异, 管家基因的转录水平有可能会发生变化, 如在羊草 (*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel.) 叶片、茎部以及穗中表达稳定性较高的内参基因分别是 *Actin*、*EF-1 $\alpha$*  和 *18S rRNA*, 而根部表达较为稳定的是 *APRT*、*18S rRNA*<sup>[11]</sup>。茉莉花 (*Jasminum sambac* (L.) Aiton.) 在不同的发育时期以及不同组织中筛选出的最适内参基因也不同<sup>[12]</sup>。此外, 同一植物在不同的环境下内参基因稳定性之间也存在差异, 如海州常山 (*Clerodendrum trichotomum* Thunb.) 内参基因 *RPL*、*AP-2* 基因在盐胁迫下表达最稳定, 干旱胁迫下 *MDH*、*AP-2* 基因表达最稳定, 而热胁迫下 *UBCE2* 和 *ACT* 表达最稳定<sup>[13]</sup>。这说明管家基因只能在特定的组织或处理方式中保持相对稳定, 因此, 应根据特定的试验条件来选择适合的内参基因, 减少试验误差<sup>[14]</sup>。

本研究以 Cd 胁迫下构树的根和叶为试验材料, 根据构树转录组数据选取了 10 个候选内参基因, 并通过 qRT-PCR 技术, 结合基因稳定性分析软件 *geNorm*<sup>[15]</sup>、*NormFinder*<sup>[16]</sup>、*BestKeeper*<sup>[17]</sup> 和 *RefFinder*<sup>[18]</sup> 在线分析工具, 对 10 个候选内参基因在构树 Cd 胁迫下根和叶片中的表达稳定性进行评估, 筛选出表达相对稳定的内参基因, 并利用构树逆境胁迫关键基因 *BpDREB*<sup>[19]</sup> 进一步验证上述结果的可靠性, 为后续开展构树 Cd 胁迫响应基因的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

构树种子购自江苏宿迁天桥区映阳苗木经营部, 将种子用  $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 GA3 溶液浸泡 24 h, 蒸馏水冲洗 2~3 次后播种于草炭土和蛭石混合基质中, 置于光照培养箱中 (温度  $30\ ^\circ\text{C}$ , 湿度 60%, 光照 12 h/黑暗 12 h) 培养。培养 6 个月后, 选取长势良好、大小一致的构树幼苗, 参照 Xu 等<sup>[7]</sup> 实验设计并稍作调整, 将幼苗小心剥离营养基质后置于 1/2 霍格兰营养液中缓苗 1 周, 每 3 d 更换 1 次, 之后加入  $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CdCl}_2$  进行模拟 Cd 胁迫处理, 分别在处理后 0 (CK)、3、6、12、24、48、72、96、120 h 取其根部与叶

片, 液氮速冻后放置于  $-80\ ^\circ\text{C}$  保存, 每个取样时间点均取 3 个重复。

### 1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成 利用 Trizol 法 (北京聚合美, MF034) 提取 RNA, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 使用超微量紫外分光光度计 (NanoDrop2000) 检测 RNA 浓度和纯度。利用 M5 Super qPCR RT Kit (北京聚合美, MF012) 完成 cDNA 第一链合成, 置于  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存备用。

1.2.2 引物设计 根据构树转录组序列, 对选定的 10 个候选内参基因 *BpUBE2*、*BpRPL8*、*BpActin*、*BpGAPDH*、*BpHSP*、*BpTUA*、*BpDOUB*、*Bp $\beta$ -TUB*、*BpHIS*、*BpNADH* 使用 Primer3web (V4.1.0, <http://primer3.ut.ee/>) 设计引物, 并利用 Blast 工具检测引物特异性。引物序列、扩增产物长度和  $T_m$  值等详见表 1, 引物由通用生物 (安徽) 股份有限公司合成。

1.2.3 qRT-PCR 反应条件 qRT-PCR 采用 SYBR Green 染料法, 按照  $2 \times$  M5 HiPer SYBR Premix EsTaq 试剂盒 (北京聚合美, MF787) 说明书配制 PCR 反应体系为: cDNA 模板  $1\ \mu\text{L}$ , 正反向引物 ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各  $0.2\ \mu\text{L}$ ,  $2 \times$  M5 HiPer SYBR Premix EsTaq  $5\ \mu\text{L}$ , 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足至  $10\ \mu\text{L}$ 。每个样品均设置 3 个重复, 利用伯乐公司的 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪对样品进行扩增。PCR 反应程序:  $95\ ^\circ\text{C}$  预变性 30 s;  $95\ ^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60\ ^\circ\text{C}$  退火 30 s, 39 个循环, 熔解曲线: 以  $65\ ^\circ\text{C}$  到  $95\ ^\circ\text{C}$ , 每个循环增加  $0.5\ ^\circ\text{C}$ , 持续 0.05 s 获得解链温度, 采集荧光信号。

1.2.4 引物特异性及扩增效率检测 将 cDNA 样本等量混合后用  $\text{ddH}_2\text{O}$  稀释 1 倍作为模板进行普通 PCR 扩增, 用于检测引物的特异性。反应体系为:  $14.3\ \mu\text{L}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ ,  $2\ \mu\text{L}$   $10 \times$  PCR Buffer,  $1.6\ \mu\text{L}$  dNTP ( $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.1\ \mu\text{L}$  rTaq ( $5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), cDNA  $1.5\ \mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各  $0.25\ \mu\text{L}$ 。反应程序为  $95\ ^\circ\text{C}$  2 min;  $98\ ^\circ\text{C}$  10 s,  $60\ ^\circ\text{C}$  30 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  30 s, 30 个循环,  $72\ ^\circ\text{C}$  5 min, 反应结束后用 2% 的琼脂糖凝胶进行引物特异性检测。

将 Cd 胁迫下所有样本的 cDNA 取适量等量混合后稀释成 6 个梯度 ( $1/3$ 、 $1/9$ 、 $1/27$ 、 $1/81$ 、 $1/243$ 、 $1/729$ ), 并以此为模板进行 qPCR 扩增, 用于标准曲线的绘制, 并利用公式  $E=(3^{-1/\text{slope}}-1) \times$

表1 构树 10 个候选内参基因的引物序列及扩增效率

Table 1 Primer sequences and amplification efficiency of 10 candidate reference genes in *B.papyrifera*

基因名称 Gene symbol	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$	扩增产物长度 Amplification Length/bp	扩增效率 Amplification Efficiency/%	相关系数 $R^2$
<i>BpUBE2</i>	<i>BpUBE2</i> -F: AGGTTTCGCTTCCTCACCAAAA	52.4	154	102.81	0.995
	<i>BpUBE2</i> -R: TCATCAGGGTTTGGAGCACTC	54.4			
<i>BpRPL8</i>	<i>BpRPL8</i> -F: TGATCACCGACATCATCCACG	54.4	185	90.55	0.992
	<i>BpRPL8</i> -R: TCTGATCGGAAGGACATTGCC	54.4			
<i>BpActin</i>	<i>BpActin</i> -F: TCCTCCTCAACTCTCCTCCTG	56.3	193	93.43	0.990
	<i>BpActin</i> -R: TTGCCAGCTCTCCAAATGAT	52.4			
<i>BpGAPDH</i>	<i>BpGAPDH</i> -F: CCATGGAAGGACTTGGGGATC	56.3	156	90.43	0.995
	<i>BpGAPDH</i> -R: GTTCACTCCCACCACGTATGT	54.4			
<i>BpHSP</i>	<i>BpHSP</i> -F: CCAGCGCTGATGTTAGATTGC	54.4	174	92.66	0.993
	<i>BpHSP</i> -R: TTGCCATCAGAGCCTTTTCCT	52.4			
<i>BpTUA</i>	<i>BpTUA</i> -F: TCGAAAGGCCAACATACACCA	52.4	175	96.59	0.997
	<i>BpTUA</i> -R: GAGATGACAGGGGCATACGAG	56.3			
<i>BpDOUB</i>	<i>BpDOUB</i> -F: CCTGATCTTCGCCGAAAACA	54.4	194	97.48	0.999
	<i>BpDOUB</i> -R: TGGAGAGGGTTGAAGAGAGCT	54.4			
<i>Bp<math>\beta</math>-TUB</i>	<i>Bp<math>\beta</math>-TUB</i> -F: CGGAACTGACGCAACAAATGT	52.4	118	93.57	0.994
	<i>Bp<math>\beta</math>-TUB</i> -R: ACCTCCTTCGTGCTCATCTTG	54.4			
<i>BpHIS</i>	<i>BpHIS</i> -F: GTCTTGGAGCTGGCTGGTAAT	54.4	129	102.21	0.993
	<i>BpHIS</i> -R: ACCACCGCTATTGTTCTTT	52.4			
<i>BpNADH</i>	<i>BpNADH</i> -F: TCCTTTGAATTCTCCGCCCAA	52.4	191	97.18	0.987
	<i>BpNADH</i> -R: GAAGCCCGTGAACCTGAAACC	54.4			
<i>BpDREB</i>	<i>BpDREB</i> -F: TAAACCAGCTCACCCAATCCC	54.4	274	90.99	0.989
	<i>BpDREB</i> -R: CGGTTCTTGGGGAGTCTGATC	56.3			

100% 计算引物扩增效率。反应体系和程序如 1.2.3 所述。

1.2.5 候选内参基因稳定性分析 通过荧光定量 PCR 得出 10 个候选基因在 Cd 胁迫下构树不同组织中的  $C_T$  值, 使用 Microsoft Excel 2016 软件整理原始  $C_T$  值, 并分别采用基于 Microsoft Excel 2010 的 3 个基因稳定性评价软件 (geNorm、NormFinder、BestKeeper) 和在线分析工具 RefFinder (<https://blooge.cn/RefFinder/>) 对 10 个候选内参基因的稳定性进行综合评价, 筛选出构树在 Cd 胁迫下的最佳内参基因。

1.2.6 内参基因稳定性验证 选择构树逆境胁迫响应基因 *BpDREB* 用于验证筛选出的内参基因的稳定性。以 Cd 胁迫下构树的 cDNA 为模板, 使用荧光定量 PCR 技术, 以最佳候选基因及其组合作为标准化因子, 以不稳定的内参基因作为比较, 使

用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析 *BpDREB* 基因在构树根部和叶片中的相对表达量, 实验设置 3 个重复, 反应体系和程序如 1.2.3 所述。

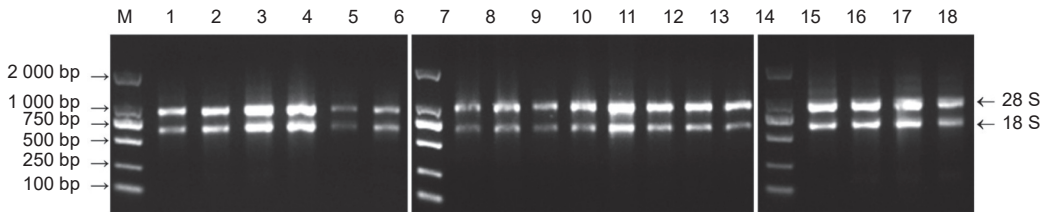
## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 质量检测

RNA 样品浓度为  $160\sim 287\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,  $A_{260/280}$  的值为  $2.0\sim 2.2$ , 这表明 RNA 无蛋白或酚类污染, 纯度较高。琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1) 显示: 各样本的 RNA 主带清晰, 无弥散拖尾现象, 且 28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 条带的 2 倍, 这表明 RNA 无明显降解, 完整性良好, 可用于后续实验。

### 2.2 引物特异性及扩增效率检测

以 Cd 胁迫下构树根和叶等量混合的 cDNA 为模板进行常规 PCR 扩增, 结果 (图 2) 表明: 所



注: M:DL2000 DNA Marker, 1~9: CdCl<sub>2</sub> 胁迫下构树 0、3、6、12、24、48、72、96、120 h 的叶片; 10~18: CdCl<sub>2</sub> 胁迫下构树 0、3、6、12、24、48、72、96、120 h 的根部。

Notes: M:DL2000 DNA Marker, 1~9: Leaves of *B.papyrifera* under cadmium stress at 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h; 10~18: Roots of *B.papyrifera* under cadmium stress at 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h.

图 1 构树 Cd 胁迫下叶片与根部总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from leaves and roots under cadmium stress in *B.papyrifera*

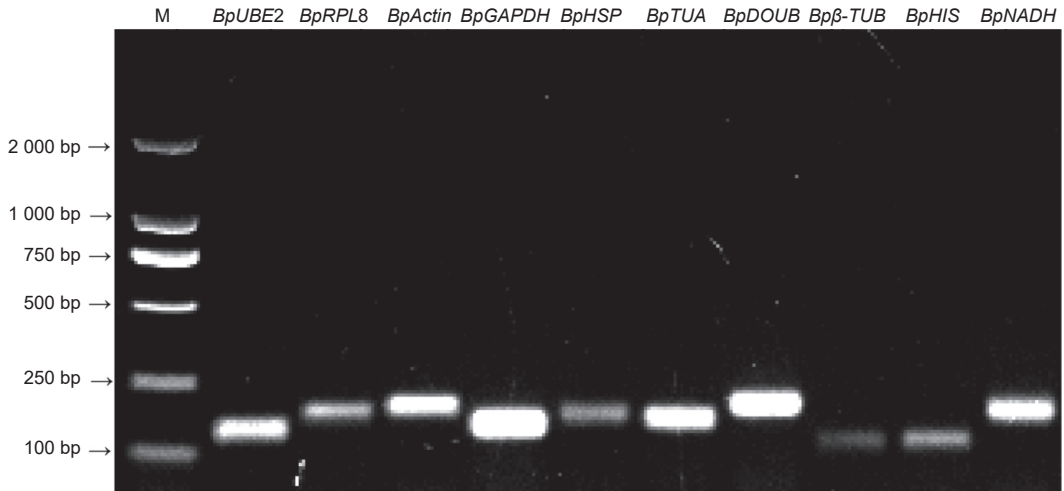


图 2 构树候选内参基因常规 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of conventional PCR products of candidate reference genes of *B.papyrifera*

有引物目标片段单一明亮, 无引物二聚体及非特异性扩增现象, 且条带大小与预期相符。进一步利用 qRT-PCR 技术验证引物特异性, 结果 (图 3) 表明: 各候选内参基因的溶解曲线均呈单一溶解峰, 说明所用引物都能进行特异性扩增。经计算, 各候选内参基因扩增效率 ( $E$ ) 为 90.43%~102.81%, 相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.987~0.999 (表 1)。以上结果表明, 各候选基因特异性和扩增效率良好, 可用于后续实验。

### 2.3 内参基因稳定性分析

**2.3.1 内参基因  $C_T$  值分析**  $C_T$  值与基因表达量呈反比,  $C_T$  值越低基因表达水平越高。通过对箱线图 (图 4) 进行分析可知: 大部分基因  $C_T$  值分布在 21~28 之间, 表达丰度适中。此外, 由箱线图跨度可初步判定 *BpGAPDH* (21.59~32.58) 的  $C_T$  值跨度广, 基因表达稳定性较弱, 而 *BpNADH* (25.86~27.36)、*BpDOUB* (23.09~

25.12)、*BpUBE2* (21.78~23.67) 的  $C_T$  值跨度小, 基因表达较稳定。以上结果表明, 构树中不同内参基因在 Cd 胁迫下具有不同的表达水平, 从  $C_T$  值变化跨度推测 *BpNADH*、*BpDOUB* 和 *BpUBE2* 表达量较稳定, 是潜在的最佳候选内参基因。

**2.3.2 geNorm 分析** 通过 geNorm 软件计算各候选内参基因在构树 Cd 胁迫下不同组织中表达稳定性的 M 值, 该软件是以  $M=1.5$  为临界值, M 值越小, 则内参基因的稳定性越高<sup>[20]</sup>。geNorm 分析结果 (图 5A) 表明: 在 Cd 胁迫下构树各候选内参基因 M 值均低于 1.5, 即各候选内参基因表达都相对稳定, 稳定性排序从高到低依次为 *BpDOUB* (0.35)=*BpUBE2* (0.35) > *BpNADH* (0.399) > *BpHIS* (0.443) > *BpActin* (0.501) > *BpTUA* (0.535) > *BpHSP* (0.567) > *BpRPL8* (0.666) > *Bpβ-TUB* (0.776) > *BpGAPDH* (1.416)。

为确定内参基因的最佳数量, 使用配对变异系

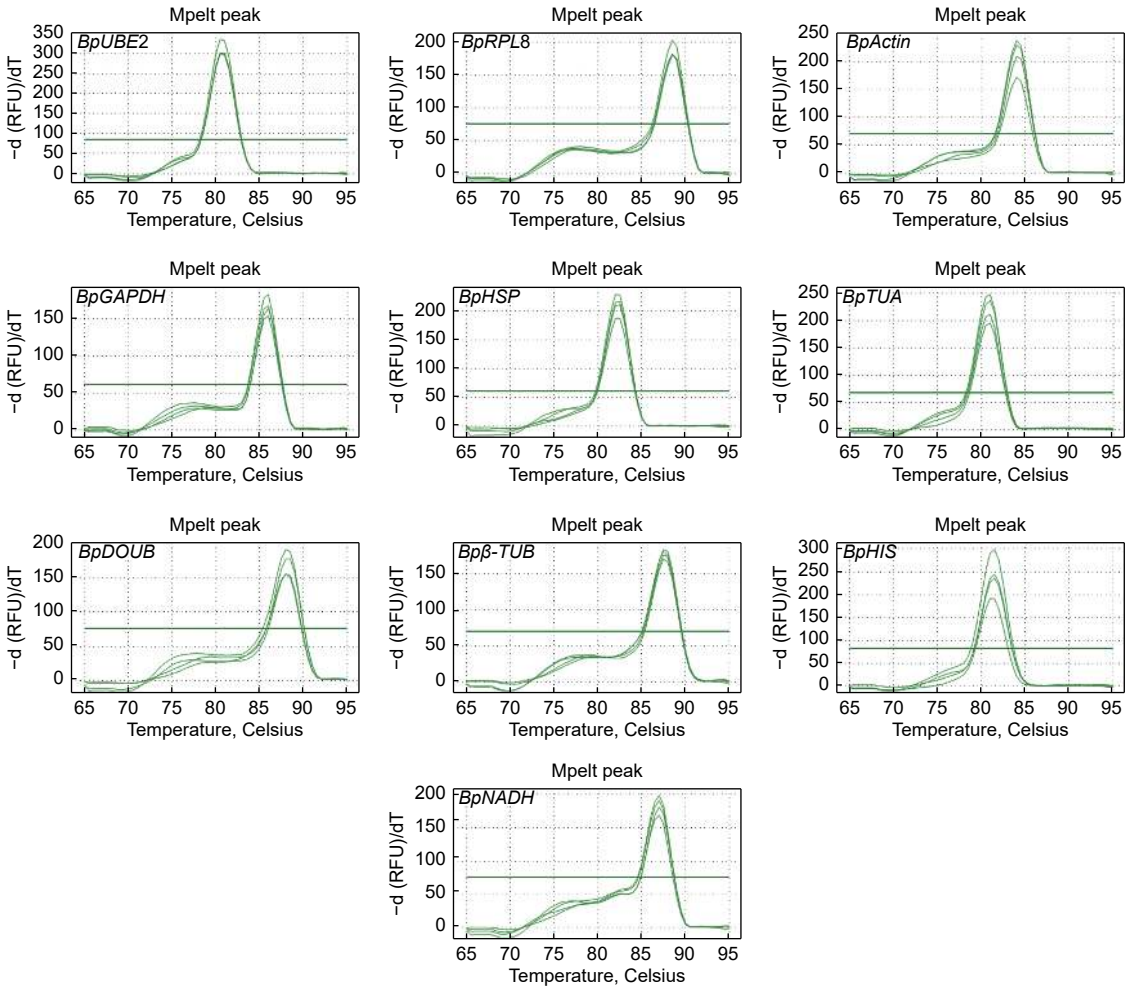


图 3 构树 10 个候选内参基因溶解曲线图

Fig. 3 Melting curves of the 10 candidate reference genes of *B. papyrifera*

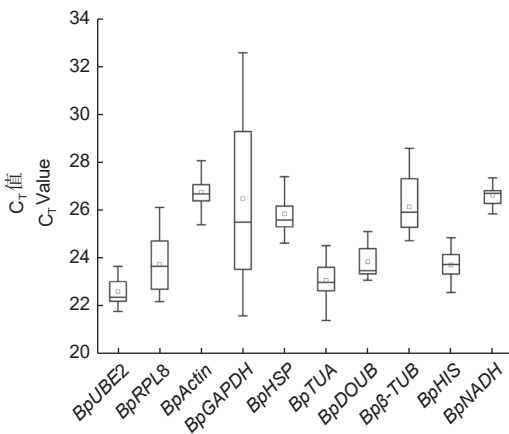


图 4 构树 10 个候选内参基因  $C_T$  值箱线图

Fig. 4 Box plot of the  $C_T$  values of 10 candidate reference genes of *B. papyrifera*

稳定可靠。由图 5B 可知：本实验所有样品的  $V_{2/3} < 0.15$ ，说明在 Cd 胁迫下选择 2 个基因作为内参基因，结果稳定可靠，无需选择更多基因。

**2.3.3 Normfinder 分析** NormFinder 软件是根据表达稳定值 (S 值) 对基因的稳定性进行排序, S 值越小基因表达越稳定<sup>[21]</sup>。NormFinder 分析结果 (图 6) 表明: 在 Cd 胁迫下, 构树的根, 叶组织中, 10 个候选内参基因表达稳定性排名从高到低依次为: *BpDOUB* (0.175) > *BpNADH* (0.208) > *BpActin* (0.214) > *BpHIS* (0.287) > *BpUBE2* (0.324) > *BpTUA* (0.328) > *BpHSP* (0.740) > *Bpβ-TUB* (0.815) > *BpRPL8* (1.246) > *BpGAPDH* (3.947), 即在 Cd 胁迫下构树中 *BpDOUB* (0.175) 和 *BpNADH* (0.208) 表达稳定性较高, 而 *BpGAPDH* (3.947) 的稳定性最低, 不合作为内参基因使用。

数  $V_{n/(n+1)}$  对 10 个候选内参基因进行分析,  $V_{n/(n+1)}$  的临界值为 0.15, 当  $V_{n/(n+1)} < 0.15$  时, 说明选择  $n$  个基因作为内参基因即可保证结果

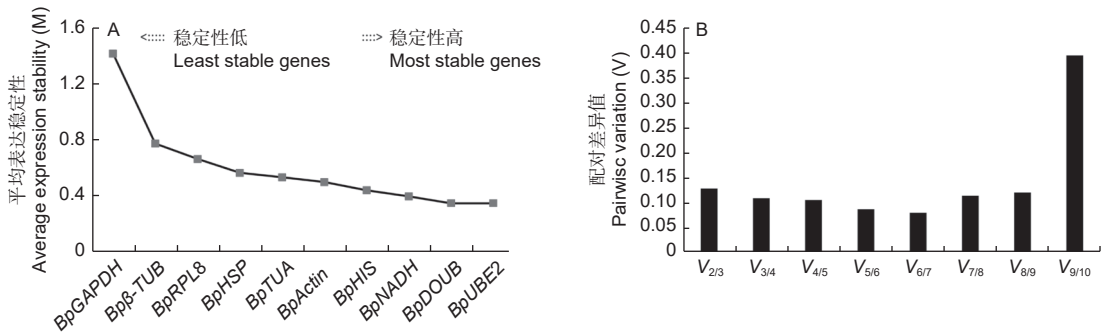


图 5 通过 geNorm 软件分析构树 10 个候选内参基因的平均表达稳定性 (A) 和最适数目 (B)

Fig. 5 Average expression stability (A) and optimum number (B) of 10 candidate reference genes of *B. papyrifera* analyzed by geNorm software

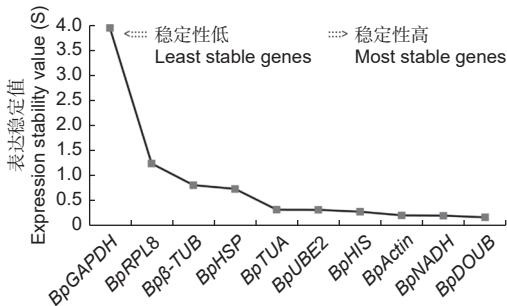


图 6 NormFinder 软件分析构树内参基因表达稳定性

Fig. 6 Expression stability of the candidate reference genes of *B. papyrifera* calculated by NormFinder software

表 2 Bestkeeper 软件分析构树内参基因的表达稳定性和排名

Table 2 Analysis of expression stability and ranking of candidate reference genes of *B. papyrifera* by BestKeeper software

基因名 Gene name	变异系数 CV	标准偏差 SD	排名 Rank
<i>BpNADH</i>	1.19	0.32	1
<i>BpHIS</i>	1.98	0.47	2
<i>BpUBE2</i>	2.10	0.48	3
<i>BpDOUB</i>	2.32	0.55	4
<i>BpActin</i>	2.27	0.61	5
<i>BpHSP</i>	2.59	0.67	6
<i>BpTUA</i>	3.09	0.71	7
<i>Bpβ-TUB</i>	3.54	0.93	8
<i>BpRPL8</i>	4.00	0.95	9
<i>BpGAPDH</i>	12.85	3.40	10

2.3.4 BestKeeper 分析 Bestkeeper 主要是通过比较各候选内参基因  $C_T$  值之间的标准偏差 (SD) 和变异系数 (CV) 来评价基因的稳定性<sup>[22]</sup>。当 SD 值 < 1.0 时, 即认为该基因表达相对稳定。Bestkeeper 的分析结果 (表 2) 表明: *BpGAPDH* (3.40) > 1.0, 不适合作为内参基因, 其余 9 个候选基因的 SD 值均 < 1.0, 说明大多数候选内参基因表达较稳定, 候选内参基因表达稳定性排序从高到低依次为: *BpNADH* (0.32) > *BpHIS* (0.47) > *BpUBE2* (0.48) > *BpDOUB* (0.55) > *BpActin* (0.61) > *BpHSP* (0.67) > *BpTUA* (0.71) > *Bpβ-TUB* (0.93) > *BpRPL8* (0.95) > *BpGAPDH* (3.40), 其中, *BpNADH* 的 SD 和 CV 值最小 (SD = 0.32, CV = 1.19), 稳定性最好。

2.3.5 RefFinder 分析 为避免单一内参基因评价程序引起结果误差, 通过在线分析工具 RefFinder 对 3 个软件的基因表达稳定性排序进行几何平均值计算, 几何平均值越小, 基因的表达稳定性越高。结果 (表 3) 所示, 各基因综合稳定性排序从高到低依次为 *BpDOUB* (1.41) > *BpNADH* (2.34) >

*BpUBE2* (2.59) > *BpHIS* (2.83) > *BpActin* (4.16) > *BpTUA* (6.24) > *BpHSP* (6.74) > *Bpβ-TUB* (8.24) > *BpRPL8* (8.74) > *BpGAPDH* (10.00)。说明 *BpDOUB* (1.41) 和 *BpNADH* (2.34) 表达稳定性优于其它基因, 可作为 Cd 胁迫下构树 qRT-PCR 分析首选内参基因, 而 *BpGAPDH* (10.00) 基因表达最不稳定, 不宜作为 Cd 胁迫下构树的内参基因。

2.3.6 内参基因稳定性验证 为验证筛选出的内参基因可靠性, 采用 qRT-PCR 技术对 Cd 胁迫下 *BpDREB* 基因在构树叶片以及根部的表达模式进行研究, 使用筛选出的最佳内参基因 *BpDOUB*、*BpNADH* 及其组合 *BpDOUB* + *BpNADH* 作为标准化因子, 以最不稳定的内参基因 *BpGAPDH* 为

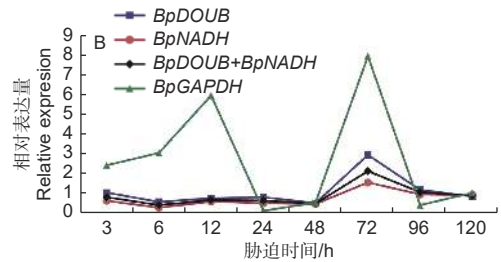
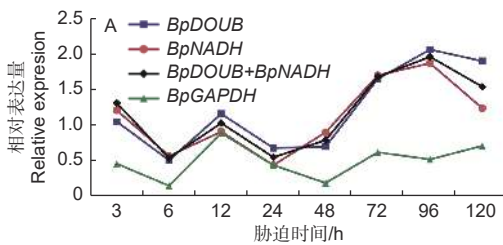
表 3 构树候选内参基因在 RefFinder 中的稳定性排名

Table 3 Rank of stability of candidate reference genes of *B. papyrifera* in RefFinder

方法 Method	Cd胁迫下构树内参基因稳定性排序 Ranking order under cdcl <sub>2</sub> treatment in <i>B. papyrifera</i> (Better-Good-Average)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BestKeeper	<i>BpNADH</i>	<i>BpHIS</i>	<i>BpUBE2</i>	<i>BpDOUB</i>	<i>BpActin</i>	<i>BpHSP</i>	<i>BpTUA</i>	<i>BpB-TUB</i>	<i>BpRPL8</i>	<i>BpGAPDH</i>
Normfinder	<i>BpDOUB</i>	<i>BpNADH</i>	<i>BpActin</i>	<i>BpHIS</i>	<i>BpUBE2</i>	<i>BpTUA</i>	<i>BpHSP</i>	<i>BpB-TUB</i>	<i>BpRPL8</i>	<i>BpGAPDH</i>
geNorm	<i>BpUBE2/BpDOUB</i>		<i>BpNADH</i>	<i>BpHIS</i>	<i>BpActin</i>	<i>BpTUA</i>	<i>BpHSP</i>	<i>BpRPL8</i>	<i>Bpβ-TUB</i>	<i>BpGAPDH</i>
推荐综合排名 Recommended comprehensive ranking	<i>BpDOUB</i>	<i>BpNADH</i>	<i>BpUBE2</i>	<i>BpHIS</i>	<i>BpActin</i>	<i>BpTUA</i>	<i>BpHSP</i>	<i>Bpβ-TUB</i>	<i>BpRPL8</i>	<i>BpGAPDH</i>

参照, 对 *BpDREB* 基因表达水平进行验证。结果 (图 7) 表明: 使用不同的内参基因得到的 *BpDREB* 表达量之间存在较大差异。分别以稳定性好的 *BpDOUB*、*BpNADH* 以及 *BpDOUB* + *BpNADH* 作为内参基因时, *BpDREB* 基因的表达模式一致。总体来看, 在 Cd 处理下, 构树叶片及根部的 *BpDREB* 表达量均呈上调趋势, 叶片中

*BpDREB* 的表达量在 96 h 达到最高点, 根部 72 h 达到最高点; 而用最不稳定的内参基因 *BpGAPDH* 为参照时, 会导致完全不同的结果。因此, 不合适的内参基因会导致目的基因表达水平偏差, 影响实验的准确性, 进一步验证了以 *BpDOUB* 和 *BpNADH* 作为内参基因的可靠性。



注: A, CdCl<sub>2</sub> 胁迫下构树的叶片; B, CdCl<sub>2</sub> 胁迫下构树的根部

Notes: A, the leaf of the *B. papyrifera* under cadmium stress; B, the leaf of the *B. papyrifera* under cadmium stress

图 7 用 *BpDREB* 验证构树 Cd 胁迫下筛选的内参基因的稳定性

Fig. 7 Validation of the stability of reference genes screened for cadmium stress in *B. papyrifera* with *BpDREB*

### 3 讨论

土壤重金属污染已成为目前亟待解决的环境问题之一, Cd 是最具威胁的重金属元素, 对植物生长和人体健康都造成严重威胁。作为重金属区群落恢复的先锋树种, 构树对重金属 Cd 具有极高的富集能力<sup>[6]</sup>, 研究构树抗逆机制, 解析其响应 Cd 的基因表达调控网络, 挖掘构树相关抗逆基因, 有助于阐明构树 Cd 胁迫适应机制。实时荧光定量 PCR 是分析基因表达水平和调控模式的主要手段之一, 选择表达稳定的内参基因是准确分析目的基因表达量的前提, 以往研究表明, 内参基因不具有绝对通用性, 若不经筛选而以常见管家基因为内参基因, 得到的结果精确度大幅度降低, 甚至得到错误结果<sup>[23]</sup>。以往构树基因表达研究常直接以

*Actin*<sup>[24-25]</sup> 为内参, 可能存在一定误差。近年来, 随着构树基因组测序的完成<sup>[26]</sup> 和构树转录调控水平研究的深入, 开展构树内参基因筛选能够为后续功能基因的表达分析提供重要的基础。

在非模式植物中, 结合植物转录组数据库进行内参基因筛选是有效的方法之一, 目前已在杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.)<sup>[27]</sup>、麦缘锦楸 (*Catalpa fargesii* Bur.)<sup>[28]</sup>、福建柏 (*Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas.)<sup>[29]</sup> 等多种植物中应用。有研究发现, 在甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 转录组数据库挖掘到的内参基因 *UXS3*、*SAP5*、*ARFA1E* 的表达稳定性优于传统内参基因 *Actin7*<sup>[30]</sup>。本研究结合构树转录组数据库, 初步选择 10 个常见管家基因作为候选内参

基因, 通过 qRT-PCR 技术, 并结合 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对构树 Cd 胁迫下不同组织器官表达稳定性进行评估。由于各软件的运算逻辑及使用的统计学方法不同, 各分析软件中内参基因表达稳定性排名略有差异, 如 geNorm 与 NormFinder 软件分析结果均显示 *BpDOUB* 基因表达稳定性最好, 而 Bestkeeper 软件分析结果则显示 *BpNADH* 基因表达较稳定。这种现象在杨树 (*Populus deltoides*)<sup>[31]</sup>、扇脉杓兰 (*Cypripedium japonicum* Thunb.)<sup>[32]</sup> 以及其它植物内参基因研究中也出现。RefFinder 是一种候选内参基因稳定性综合分析的程序, 已被广泛用于内参基因筛选研究中<sup>[13,27]</sup>。为对内参基因稳定性进行综合评价, 本研究利用 RefFinder 对 10 个候选内参基因稳定性进行综合评估, 基因表达稳定性从高到低依次为 *BpDOUB*、*BpNADH*、*BpUBE2*、*BpHIS*、*BpActin*、*BpTUA*、*BpHSP*、*Bpβ-TUB*、*BpRPL8*、*BpGAPDH*。为避免单个内参基因造成实验误差, 通常选择 2 个或多个基因作为内参基因调整系统偏差, 得到更准确的基因表达定量结果, 本研究中用 geNorm 软件确定了内参基因最佳数量, 各候选内参基因的变异系数 ( $V_{2/3}$ ) 均 < 0.15, 说明在 Cd 胁迫下构树仅需要 2 个内参基因即可得到可靠结果。最终确定 *BpDOUB* 和 *BpNADH* 为 Cd 胁迫条件下构树荧光定量结果标准化分析的最佳内参基因组合。

DREB 是植物中特有的转录因子, 植物遭受逆境胁迫后, DREB 通过与逆境抗性基因启动子区的 DRE/CRT (脱水反应元件) 顺式元件发生特异性相互作用, 调节一系列下游基因 (包含 DRE/CRT 元件) 的表达, 增强植物逆境的抗性<sup>[19]</sup>, 已经在构树<sup>[8]</sup>、甘薯 (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill)<sup>[33]</sup>、刚毛怪柳 (*Tamarix hispida* Willd.)<sup>[34]</sup> 等多种植物研究中发现 *DREB* 基因可以被重金属 Cd 诱导上调表达, 可用于验证筛选出的内参基因的可靠性。本研究分别使用筛选出的最佳内参基因 *BpDOUB*、*BpNADH* 及其组合为内参基因, 同时以稳定性最差的基因 *BpGAPDH* 为参照, 分析 Cd 胁迫下 *BpDREB* 基因在构树根部以及叶片中的表达模式, 结果显示: 使用表达稳定的基因 (*BpDOUB*、*BpNADH*) 进行基因表达水平归一化时, 逆境胁迫响应基因 *BpDREB* 在 Cd 处理下构树的根部和叶部表达模式基本一致, 均为上调表达, 而用不稳定的 *BpGAPDH* 基因为参照时, 基

因表达水平明显不同, 进一步验证了筛选出的内参基因的准确性。综上表明, 选择适合的内参基因对于分析目的基因表达变化至关重要。

## 4 结 论

本研究通过 qRT-PCR 技术并结合内参基因稳定性分析软件 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 对候选内参基因的表达稳定性进行评价, 确定 *BpDOUB* 和 *BpNADH* 为构树 Cd 胁迫条件下最适内参基因组合, 并通过逆境胁迫响应基因 *BpDREB* 进一步验证筛选的内参基因的准确性。本研究结果为构树 Cd 胁迫下目的基因表达分析提供了可靠的内参基因, 为开展构树耐 Cd 机理研究和重要功能基因发掘奠定基础。

## 参 考 文 献:

- [1] YALLEY M K, ADUSU D, BUNYAMIN A R, et al. Natural regeneration of indigenous tree species in *Broussonetia papyrifera* invaded sites in pra-anum forest reserve[J]. International Journal of Forestry Research, 2020, 2020: 6347962.
- [2] JIAO P, CHAO Y L, WEN H Z, et al. Integrative metabolome and transcriptome analysis of flavonoid biosynthesis genes in *Broussonetia papyrifera* leaves from the perspective of sex differentiation[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 900030.
- [3] FENG J, DONG P, LI R M, et al. Effects of wood fiber properties on mold resistance of wood polypropylene composites[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 140: 152-159.
- [4] GUO F J, FENG L, HUANG C, et al. Prenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera*, inhibit the growth of breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. Phytochemistry Letters, 2013, 6(3): 331-336.
- [5] PARK J Y, YUK H J, RYU H W, et al. Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2017, 32(1): 504-515.
- [6] 刘 洋. 组织培养条件下构树对重金属镉和锰的耐受性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021: 42-46.
- [7] ZENG P, GUO Z H, XIAO X Y, et al. Tolerance capacities of *Broussonetia papyrifera* to heavy metal(loid)s and its phytoremediation potential of the contaminated soil[J]. International Journal of Phytoremediation, 2022, 24(6): 580-589.
- [8] XU Z G, DONG M, PENG X Y, et al. New insight into the molecular basis of cadmium stress responses of wild paper mulberry plant by transcriptome analysis[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171(APR.): 301-312.



- [9] LI C, XU J, DENG Y, *et al.* Selection of reference genes for normalization of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) gene expression under different experimental conditions[J]. PLoS ONE, 2019, 14(11): e0224798.
- [10] XIAO F, ZHENG Y F, CHEN J L, *et al.* Selection and validation of reference genes in all-red Amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) seedlings under different culture conditions[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2021, 96(5): 1-10.
- [11] 胡宁宁, 郭慧琴, 李西良, 等. 羊草不同组织实时定量PCR内参基因的筛选[J]. 草业科学, 2017, 34(7): 1434-1441.
- [12] 齐香玉, 陈双双, 冯景, 等. 茉莉花实时荧光定量PCR内参基因的筛选与验证[J]. 华北农学报, 2020, 35(6): 22-30.
- [13] 华雅洁, 岳远征, 杨秀莲, 等. 海州常山叶片实时荧光定量PCR的内参基因选择[J]. 林业科学研究, 2022, 35(2): 194-202.
- [14] SHAKEEL M, RODRIGUEZ A, TAHIR U B, *et al.* Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects[J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(2): 227-236.
- [15] VANDESOMPELE J, PRETER K D, 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.
- [16] ANDERSEN C L, JENSEN J L, RNTTOFT 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]. American Association for Cancer Research, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [17] 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.
- [18] CHEN W R, FENG Y, CHAO Y E. Genomic analysis and expression pattern of *OsZIP1*, *OsZIP3*, and *OsZIP4* in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different zinc efficiency[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2008, 55(3): 400-409.
- [19] LI X S, LIANG Y Q, GAO B, *et al.* *ScDREB10*, an A-5c type of *DREB* gene of the desert moss *Syntrichia caninervis*, confers osmotic and salt tolerances to *Arabidopsis*[J]. Genes, 2019, 10(2): 146.
- [20] 朱灵英, 王一博, 王宝婕, 等. 越南参变种实时荧光定量PCR内参基因的筛选和验证[J]. 植物生理学报, 2020, 56(2): 327-335.
- [21] 李铁铮, 王金玲, 刘晓, 等. 管花肉苁蓉实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择和验证[J]. 植物生理学报, 2021, 57(4): 969-981.
- [22] 杨坤, 黄超, 卢山, 等. 铜胁迫下紫鸭跖草根组织实时定量PCR内参基因的选择[J]. 植物生理学报, 2021, 57(1): 195-204.
- [23] ZHU L F, YANG C Q, YOU Y H, *et al.* Validation of reference genes for qRT-PCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malus domestica*) at diverse stages of fruit development[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 244: 165-171.
- [24] 何毅, 张欣, 谢牧洪, 等. 构树BpbHLH149转录因子转录酵母的Cd胁迫响应功能[J]. 东北林业大学学报, 2022, 50(6): 21-26.
- [25] 陈思思, 谢牧洪, 崔茂凯, 等. 构树转录因子BpbZIP1的鉴定及镉胁迫响应分析[J]. 植物研究, 2022, 42(3): 394-402.
- [26] PENG X J, LIU H, CHEN P L, *et al.* A Chromosome-Scale genome assembly of paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) provides new insights into its forage and papermaking usage[J]. Molecular Plant, 2019, 12(5): 661-677.
- [27] 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.
- [28] 杨英英, 赵林姣, 杨桂娟, 等. '麦缘锦楸'叶色表型qRT-PCR内参基因筛选及验证[J]. 林业科学研究, 2022, 35(1): 123-131.
- [29] 周成城, 荣俊冬, 谢德金, 等. 福建柏实时荧光定量PCR内参基因的选择[J]. 林业科学研究, 2021, 34(1): 137-145.
- [30] 丁戈, 黄杨, 陈伦林, 等. 基于转录组测序的铝胁迫下甘蓝型油菜新内参基因的发掘与引物开发[J]. 华北农学报, 2021, 36(1): 1-9.
- [31] 储文渊, 王玉娇, 朱东悦, 等. 盐和干旱胁迫下杨树新内参基因的筛选[J]. 林业科学, 2017, 53(10): 70-79.
- [32] 段国敏, 李田园, 田敏, 等. 扇脉构兰实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. 核农学报, 2021, 35(3): 576-585.
- [33] KIM Y H, YANG K S, RYU S H, *et al.* Molecular characterization of a cDNA encoding DRE-binding transcription factor from dehydration-treated fibrous roots of sweetpotato[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(2): 196-204.
- [34] 冯德明, 温佩颖, 赵畅, 等. 刚毛怪柳*ThDREB*基因在酵母中的表达及抗逆能力分析[J]. 植物研究, 2017, 37(1): 63-68.

# Selection and Validation of Reference Genes of *Broussonetia papyrifera* for qRT-PCR under Cadmium Stress

LI Hong-ying<sup>1</sup>, CHEN Meng-di<sup>1</sup>, WANG Zheng-bo<sup>1</sup>, HAO Zi-yuan<sup>1</sup>,  
LIU Long-chang<sup>1</sup>, ZHAO Xi-ping<sup>1</sup>, NI Jian-we<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China; 2. National Park (Nature Reserve) Development Center of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100714, China)

**Abstract:** [Objective] To provide insights into the subsequent research on the molecular mechanism of *Broussonetia papyrifera* resistance to cadmium(Cd) toxicity, stably expression of reference genes in *B. papyrifera* under Cd treatment were screened. [Method] The expression of ten candidate reference genes, including *BpUBE2*, *BpRPL8*, *BpActin*, *BpGAPDH*, *BpHSP*, *BpTUA*, *BpDOUB*, *Bpβ-TUB*, *BpHIS* and *BpNADH* were detected by real-time PCR (qRT-PCR) technology using root and leaf tissues of *B. papyrifera* under Cd stress. The geNorm, NormFinder, Bestkeeper and RefFinder reference analysis software were used to analyze the expression stability of ten candidates reference genes. Furthermore, the selected reference genes were verified by the stress response gene *BpDREB*. [Result] Gene expression of *BpDOUB* and *BpNADH* was relatively stable in different tissues of *B. papyrifera* under Cd stress, while *BpGAPDH* expression was the least stable. When the stability of the internal reference was verified with the target gene *BpDREB*, it was found that the target genes showed similar trends when normalized by the two reference genes *BpDOUB* and *BpNADH*, while it is failed to standardize the expression data with *BpGAPDH*. [Conclusion] *BpDOUB* and *BpNADH* genes as well as the combination of *BpDOUB* + *BpNADH* genes can be used as suitable internal reference genes to improve the reliability of gene expression levels analysis under Cd stress in *B. papyrifera*.

**Keywords:** *Broussonetia papyrifera*; reference genes; cadmium stress; qRT-PCR.

(责任编辑: 张 研)