

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201710025

引文格式: 孙吉康, 王平, 贾浩, 等. 蚬壳花椒种子萌发时期内参基因的筛选与验证 [J]. 广西植物, 2018, 38(9): 1136–1145
SUN JK, WANG P, JIA H, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR during seed germination of *Zanthoxylum dissitum* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(9): 1136–1145

蚬壳花椒种子萌发时期内参基因的筛选与验证

孙吉康, 王平*, 贾浩, 周韬, 吴艳

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 长沙 410004)

摘要: 为了解蚬壳花椒种子萌发的分子机制, 需要筛选蚬壳花椒种子萌发时期表达稳定的内参基因。该研究通过赤霉素处理种子促进萌发, 以不同萌发阶段的蚬壳花椒种子为材料, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析了 6 个候选内参基因 *GAPDH*、*ACT*、*18S rRNA*、*UBQ5*、*TUA* 和 *CYP* 在蚬壳花椒种子萌发时期的表达稳定性。结果表明: (1) α -淀粉酶基因、*DELLA* 基因和异柠檬酸裂解酶基因分别反应了种子萌发阶段糖、激素和脂肪的代谢活动, 因此选择蚬壳花椒异柠檬酸裂解酶基因 (*Unigene0032088*)、 α -淀粉酶基因 (*Unigene0033597*) 和 *DELLA* 基因 (*Unigene0058868*) 作为验证基因进行相对表达量验证。(2) 综合 *geNorm*、*NormFinder* 和 *BestKeeper* 的分析结果显示在蚬壳花椒种子萌发过程中 *ACT* 表达稳定性最好, *UBQ5* 次之。(3) 以 *ACT*、*UBQ5* 基因为内参基因的结果显示验证基因的表达量与种子萌发生理状态一致, 初步揭示了 GA 处理的种子易于萌发而清水处理的种子在萌发第 3 天容易腐败这一现象出现的可能原因。综上所述, *ACT* 是蚬壳花椒种子萌发时期最合适的内参基因, 其次是 *UBQ5*。

关键词: 蚬壳花椒, 种子萌发, 实时荧光定量 PCR, 内参基因, 基因表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)09-1136-10

Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR during seed germination of *Zanthoxylum dissitum*

SUN Jikang, WANG Ping*, JIA Hao, ZHOU Tao, WU Yan

(School of Life & Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: In order to understand the molecular mechanism of the seed germination, we need to screen the reference genes of stable expression during the seed germination of *Zanthoxylum dissitum*. The seeds of *Z. dissitum* were treated with the gibberellins (GA) to promote germination. The samples were collected in 0, 1, 2, 3 and 5 d of germination. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to analyze the expression stabilities of six can-

收稿日期: 2018-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(31370612); 湖南省高校科技成果产业化繁育项目(15CY011) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370612); Program for Transfer of Scientific and Technological Achievements of Colleges and Universities in Hunan Province (15CY011)].

作者简介: 孙吉康(1976-), 男, 湖北汉川人, 博士研究生, 从事应用生物技术研究, (E-mail) 1825856598@qq.com。

*通信作者: 王平, 博士, 教授, 博士生导师, 从事应用生物技术研究, (E-mail) wangping@csuft.edu.cn。

didates such as *Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)*, *Actin (ACT)*, *18S ribosomal RNA (18SrRNA)*, *ubiquitin-40S ribosomal (UBQ5)*, α -*tubulin (TUA)* and *cyclophilin (CYP)* among the seeds of the different germination stages. The α -*amylase* gene, *DELLA* gene and *isocitrate lyase* gene respectively reflected the metabolic activities of the sugars, hormones and lipids during the germination of *Z. dissitum* seeds. Therefore, *isocitrate lyase (Unigene0032088)*, α -*amylase (Unigene0033597)* and *DELLA (Unigene0058868)* of *Z. dissitum* were selected as the validation genes for the relative expression verification during the seed germination. The comprehensive analysis of three softwares including geNorm, NormFinder and BestKeeper indicated that the expression stability of *ACT* was the best and the second was *UBQ5*. The expressions of the validation genes were consistent with the states of seeds germination when *ACT* and *UBQ5* were selected as the reference genes. Besides, when the *ACT* and *UBQ5* genes were selected as the reference genes, the relative expression levels of *isocitrate lyase*, α -*amylase* and *DELLA* of *Zanthoxylum* revealed the possible reasons that the seeds treated with GA were able to germinate successfully but the seeds treated with water easily spoiled in the 3rd day of germination. In conclusion, *ACT* is the preferred reference gene during the seed germination of *Z. dissitum*, followed by *UBQ5*.

Key words: *Zanthoxylum dissitum*, seed germination, quantitative real-time PCR (qRT-PCR), reference gene, gene expression

蚬壳花椒 (*Zanthoxylum dissitum*) 属于芸香科花椒属木质藤本植物, 主要生长于我国南方海拔 500~1 200 m 的山地林下、林缘以及灌木丛中, 是南方地区重要的林药资源。蚬壳花椒种子自然萌发率极低, 目前野生植株采伐数量超过自然生长率, 导致野生蚬壳花椒资源受到严重破坏, 药材原料匮乏 (马英姿和王平, 2008; 程鹏等, 2013)。因此开展蚬壳花椒种子萌发分子机理的研究有助于促进对蚬壳花椒资源的保护。

定量实时聚合酶链反应 (qRT-PCR) 技术常用于基因表达水平分析, 具有定量准确、高灵敏度、低成本以及高通量特性。内参基因用于标准化转录本的丰度, 是决定 qRT-PCR 结果准确性的主要因素 (Huggett et al, 2005)。理想的内参基因不受任何实验处理的影响并且在不同组织以及不同发育阶段表达稳定 (Czechowski et al, 2005)。实际上, 影响基因表达的因素很多, 如实验材料、样品量、细胞活性、RNA 完整性、cDNA 质量以及逆转录效率等 (Bustin, 2002)。相关研究也证实使用表达不稳定的内参基因将显著错估基因表达量并导致对数据的错误分析 (Ferguson et al, 2010; Mafra et al, 2012)。基因表达具有显著的组织特异性, 同时基因表达也会因为实验组织所处生理状态的不同或实验处理方式的不同而变化。目前, 还没有发

现有基因能作为通用的内参基因 (Nicot et al, 2005; Gutierrez et al, 2008; Gimeno et al, 2014)。RNA 测序 (RNA-seq) 广泛应用于各种物种的转录组分析 (Huggett et al, 2005; Czechowski et al, 2005; Ferguson et al, 2010), 同时也用于搜索内参基因。Zhuang et al (2015) 结合黄花棘豆转录组数据库从 18SrRNA、actin、tubulin、GAPDH 和 histone H3 (HIS) 等 12 个候选内参基因中筛选出 HIS 和 actin 是黄花棘豆在非生物胁迫下表达最稳定的基因。Li et al (2016) 通过转录组数据库在牡丹花的不同发育时期从 actin、tubulin、ubiquitin、GAPDH、EF-1 α 和 cyclophilin (CYP) 等 10 个候选参考基因中筛选出 GAPDH 和 ubiquitin 在花的不同发育时期表达稳定性最好。然而关于种子萌发过程中表达稳定的内参基因研究很少, 目前仅发现 Li et al (2012) 以大豆发芽种子为材料, 筛选出在大豆种子萌发过程最适合的内参基因是 Glyma05g37470 和 Glyma08g28550。迄今为止, 没有发现芸香科花椒属内参基因研究的相关报道。

基于我们的蚬壳花椒种子萌发过程中的基因转录组数据并参考相关文献, 我们选择 6 个常用内参基因 GAPDH、ACT、18SrRNA、UBQ5、TUA 和 CYP 作为候选内参基因。这些候选内参基因通过 qRT-PCR 进行表达稳定性分析, 采用 NormFinder,

BestKeeper 和 geNorm (Andersen et al, 2004; Vandesompele et al, 2002; Pfaffl, 2001) 软件对多个候选内参基因的相对表达稳定性并进行评价、排序, 并通过种子萌发过程中具有重要功能的异柠檬酸裂解酶基因、 α -淀粉酶基因和 *DELLA* 基因为验证基因进行相对表达量的验证分析, 以确定蚬壳花椒种子萌发时期表达最稳定的内参基因, 为更准确分析蚬壳花椒种子萌发过程中的基因表达数据提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本实验所用蚬壳花椒种子于 2016 年 12 月取自张家界地区采集种子, 晾干后置于 4 °C 保存。开始萌发前, 将去壳种子浸泡在赤霉素溶液 (1% w/v) 3.5 h。以无菌水浸泡的种子作为对照。在 9 cm 有机玻璃培养皿中, 将种子置于无菌双蒸去离子水浸透的无菌滤纸上, 然后在光照培养箱中 (白天温度 18 °C 16 h, 夜间温度 10 °C 8 h, 光强 103 W · m⁻²) 萌发。清水浸泡的种子在萌发第 3 天通常腐坏, 而 GA 浸泡种子可以继续萌发并且一周后胚根突出种皮 0.2~0.5 cm。在 GA 处理种子萌发的第 0 天、第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 5 天取样作为内参基因筛选的样本 (第 3 天重复取样), 标记为 0D、1D、2D、3-1D、3-2D、5D。验证基因的样本则在萌发开始的第 1 天和第 2 天取样, 得到 5 个验证样本, 即 C0-萌发 0 d, W1-清水处理后萌发 1 d, W2-清水处理后萌发 2 d, GA1-GA 处理后萌发 1 d, GA2-GA 处理后萌发 2 d。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。反转录试剂盒 TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DNA Marker 及实时定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司。引物由北京全式金生物技术有限公司合成。

1.2.2 仪器 智能光照培养箱-GZH-328A, ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 方 法

1.3.1 蚬壳花椒种子 RNA 的提取、纯化及 cDNA 合

成 将去除种皮的蚬壳花椒种子迅速置于液氮中研磨, 使用 RNA 植物试剂盒 (Tiangen Biotech, Beijing, China) 提取总 RNA。总 RNA 的浓度和纯度用 NanoDrop 2000 分光光度计检测, 总 RNA 的完整性用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检验。为进行 qRT-PCR, 使用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser (TaKaRa Bio Inc., Dalian, China) 按照使用说明配制 20 μ L 的反应体系 (总 RNA 1.5 μ g, 1 μ L dNTP mix (10 mmol · L⁻¹), 1 μ L 随机引物 (100 μ mol · L⁻¹)) 用于 cDNA 合成。最后用无核酸酶的水将 cDNA 稀释 40 倍用于 qRT-PCR。

1.3.2 内参基因的选择、引物设计及 PCR 反应 6 个候选内参基因分别是 *GAPDH*, *ACT*, *UBQ5*, *CYP*, *TUA* 和 *18S rRNA* 基因 (表 1)。引物通过网站 IDTdna 的 primerquest 工具设计, 参数进行如下设置: GC 含量 45%~55%, 扩增序列长度 100~200 个碱基对, 引物长度为 17~28 个碱基, 前导链与后随链引物的溶解温度值相差不超过 5 度。荧光定量分析采用大连宝生物工程有限公司的 SYBR Premix ExTaq™ II 试剂盒。使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪和 96 孔板。每个反应为 20 μ L 体系: 4 μ L 模板 cDNA, 前导链与后随链引物均 0.8 μ L (10 μ mol · L⁻¹), 10 μ L SYBR Premix Ex Taq™ II, 4.4 μ L ddH₂O。PCR 反应条件设定为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环反应。每个样品 3 次重复。

1.3.3 内参基因引物扩增效率 (*E*) 计算及特异性鉴定 将种子萌发 0、1、2、3、5 d 5 个样品的 cDNA 模板按照相同分量进行混合, 然后以 5 倍比例稀释成 4 个梯度, 则得到混合的 cDNA 模板浓度分别是 1、1/5、1/25、1/125 倍。每个反应重复 3 次。溶解温度通过软件 7500 Software v2.3 得到。在 EXCEL 中根据 *Ct* 值绘制标准曲线, 回归分析得到斜率 (*K*) 和线性相关系数 (*R*²); 利用公式 $E = 5^{-1/K} - 1$, 计算引物的扩增效率 (*E*)。引物的扩增特异性鉴定则将 qRT-PCR 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳以观察非特异性扩增条带是否存在。

1.3.4 内参基因筛选的数据处理与分析 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 三个软件被用来评价候选内参基因在蚬壳花椒种子萌发时期的表达稳定

表 1 候选内参基因及验证基因的名称、引物序列、产物长度

Table 1 Name, primer sequence, product length of candidate reference genes and validation genes

基因简称 Gene symbol	基因 ID Gene ID	基因全称 Gene name	拟南芥同源基因 Homologous gene	引物 Primer	产物长度 Product length (bp)
<i>GAPDH</i>	<i>CL1444.Contig2_All</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase</i>	<i>ath:AT3G04120</i>	Fw-GGACAAGGCTGCTGCTCACT Rv-TCAACAATGCCGAACCTATCA	196
<i>ACT</i>	<i>CL102.Contig4_All</i>	<i>Actin</i>	<i>ath:AT5G09810</i>	Fw-GTGCTGGATTCTGGTGATGG Rv-ATTTCCCGTTCCGGCTGTG	170
<i>UBQ5</i>	<i>Unigene8914_All</i>	<i>ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i>	<i>ath:AT3G62250</i>	Fw-CCCTAACGGGCAAGACCA Rv-CCCTAACGGGCAAGACCA	197
<i>18SrRNA</i>	<i>CL1802.Contig1_All</i>	<i>18S ribosomal RNA</i>	<i>gb X16077.1</i>	Fw-ATTTCGGTCTATTCTGTTGGC Rv-TGCTTTCGCACTGTGTTCTGC	127
<i>CYP</i>	<i>CL9346.Contig1_All</i>	<i>cyclophilin</i>	<i>ath:AT2G29960</i>	Fw-ACCGCTGGAAACGGAACC Rv-CAACGACTTGACCGAACACC	199
<i>TUA</i>	<i>CL3213.Contig3_All</i>	α - <i>tubulin</i>	<i>ath:AT5G19780</i>	Fw-CGCCTATCTGTGATTATGGA Rv-TCAAATTAGTGAAGTTGGCCTCT	217
<i>ICL</i>	<i>Unigene0032088</i>	<i>Isocitrate lyase</i>	<i>ath:AT3G21720</i>	Fw-GTCCGTGGCTGGCTTTT Rv-GCTTTGATTTTACGCCTTCG	106
α - <i>amylase</i>	<i>Unigene0033597</i>	α - <i>amylase</i>	<i>NP_567714.1</i>	Fw-CATCAAATAACGGATCTCAGGC Rv-GCGGCAAATGAAGGACGG	194
<i>DELLA</i>	<i>Unigene0058868</i>	<i>DELLA</i>	<i>CAA72178.1</i>	Fw-TTCATCGGCTCTTGGCTCG Rv-GGGCTATTGTGGTTCCGCTTC	112

表 2 候选内参基因的扩增效率

Table 2 Amplification efficiency of six candidate reference genes

基因 Gene	决定系数 Determination coefficient (R^2)	扩增效率 Amplification efficiency (E , %)
<i>GAPDH</i>	0.969	94.167
<i>ACT</i>	0.993	97.501
<i>UBQ5</i>	0.995	103.617
<i>CYP</i>	0.996	97.196
<i>TUA</i>	0.992	91.99
<i>18SrRNA</i>	0.989	96.964

Ct_{sample} 指的是基因的 Ct 值, Ct_{min} 指的是基因在所有组织中的最小 Ct 值。BestKeeper 软件直接输入 Ct 值进行计算分析。

2 结果与分析

2.1 蚬壳花椒候选内参基因的选择

以拟南芥中表达最稳定的基因和在 qRT-PCR 研究中常用的内参基因为参照, 与蚬壳花椒转录组数据进行 BLASTX 后得到蚬壳花椒同源的候选内参基因。表 1 描述了 6 个候选内参基因的 qRT-PCR 引物序列和扩增序列特征。候选内参基因按照拟南芥同源基因以及蚬壳花椒转录组 Nr 注释命名。

2.2 扩增效率和扩增特异性

根据已知的候选内参基因序列分析, 设计溶解温度值在 58~62 °C 之间的特异性引物。以 5 倍浓度梯度稀释的 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 扩增, 根据获得的数据作 6 个候选内参基因的标准

性。通过他们的综合比较分析筛选出表达最稳定的内参基因。在 geNorm 和 NormFinder 软件处理数据之前, 需要先将 Ct 值转化成 Q 值后进行分析。转化公式: $Q = E^{Ct_{min} - Ct_{sample}}$, E 为引物的扩增效率, 当引物扩增效率接近 100% 时, E 值一般为 2。

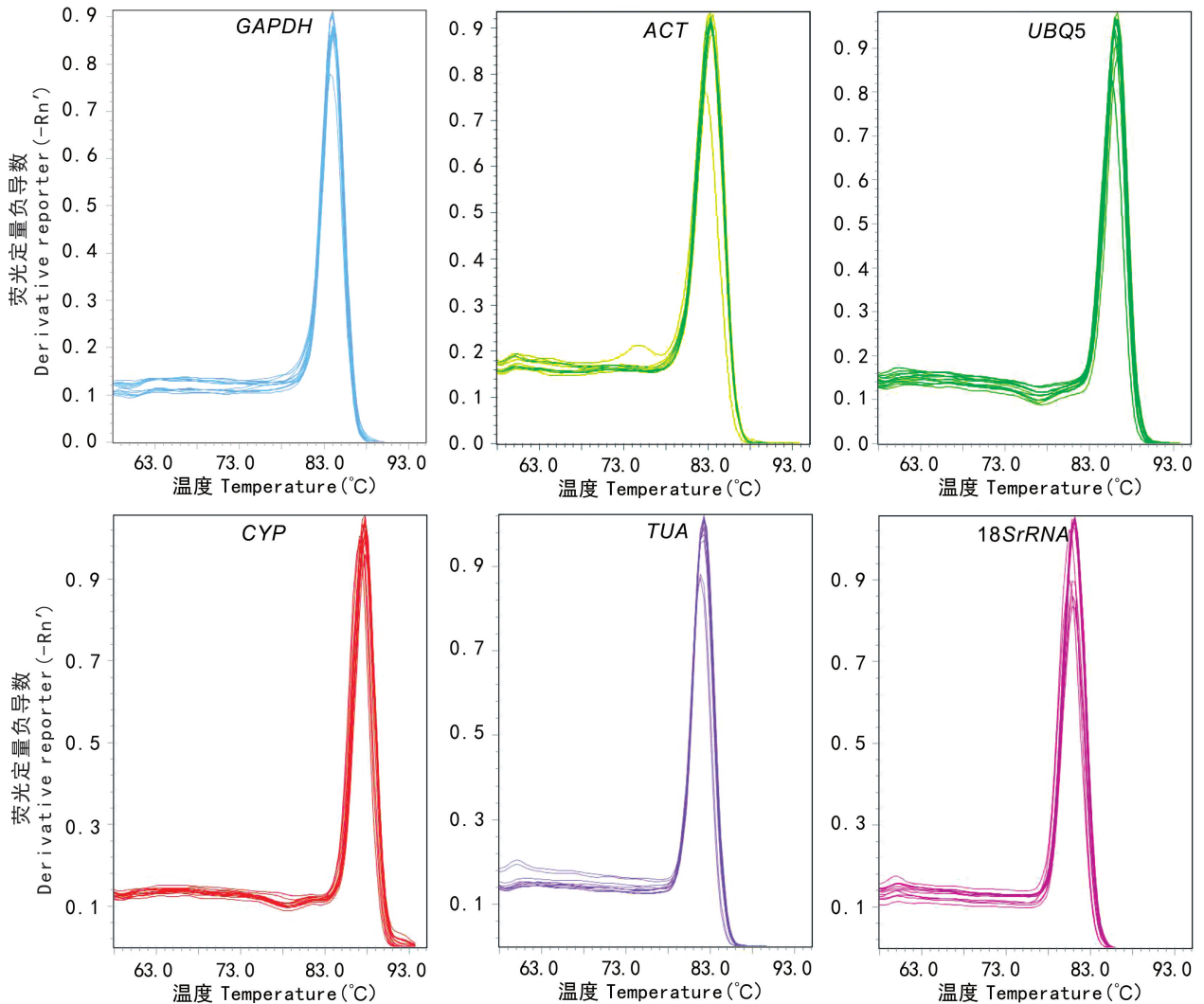


图 1 6 个候选内参基因的溶解峰

Fig. 1 Melting curves produced from qRT-PCR products of six candidate reference genes

曲线。结果显示各候选内参基因的决定系数 $R^2 \geq 0.969$, 引物的扩增效率在 91.99%~104.0% 之间, 均符合 qRT-PCR 对扩增效率的要求(表 2)。分析溶解曲线发现各内参基因都只产生单一的溶解峰, 各重复样品间的曲线重复性好(图 1)。上述结果说明所设计引物的特异性良好, qRT-PCR 反应专一性高, 结果准确可靠。

2.3 内参基因 C_t 值分析

C_t 值与基因的表达量成反比关系, 即 C_t 值越小, 表达量越大。qRT-PCR 的结果表明, 6 个候选内参基因的 C_t 值在 10~30 之间, 其中 18SrRNA 的 C_t

值最低, 在 10~14 之间; TUA 的 C_t 值较高, 在 26~30 之间; ACT 、 $GAPDH$ 、 $UBQ5$ 和 CYP 的 C_t 值则在 22~28 之间(表 3)。表 3 结果表明, 18SrRNA 在蚬壳花椒种子萌发早期的不同发育时期表达丰度最高, 其次是 CYP 、 $UBQ5$ 、 ACT , 而 TUA 的表达丰度最低。同时, $GAPDH$ 、 TUA 在不同发育时期表达丰度变异较大。可见, 这些内参基因在不同发育时期表达丰度的变化规律较为复杂, 有必要采用内参基因分析软件对内参基因表达的稳定性进行评估。

2.4 候选内参基因稳定性分析

BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 软件常被用

表 3 6 个候选内参基因在蚬壳花椒不同发育时期的平均 Ct 值Table 3 Average Ct values of six candidate reference genes at different developmental stages ($\bar{x} \pm s$)

取样时间点 Sampling time	基因 Gene					
	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>UBQ5</i>	<i>CYP</i>	<i>TUA</i>	18S <i>rRNA</i>
D0	27.52 ± 0.006	25.19 ± 0.007	25.83 ± 0.052	22.90 ± 0.047	26.88 ± 0.005	12.89 ± 0.053
D1	26.42 ± 0.033	25.55 ± 0.051	25.29 ± 0.035	24.68 ± 0.026	26.70 ± 0.039	13.06 ± 0.009
D2	24.01 ± 0.071	26.02 ± 0.177	24.20 ± 0.064	22.63 ± 0.184	30.12 ± 0.017	13.26 ± 0.015
D3-1	23.33 ± 0.037	25.21 ± 0.056	24.84 ± 0.018	24.79 ± 0.038	29.74 ± 0.060	11.43 ± 0.047
D3-2	23.51 ± 0.225	24.95 ± 0.059	24.79 ± 0.056	25.02 ± 0.027	29.41 ± 0.049	11.46 ± 0.006
D5	24.04 ± 0.067	24.96 ± 0.011	24.61 ± 0.043	23.96 ± 0.025	27.23 ± 0.007	10.87 ± 0.017

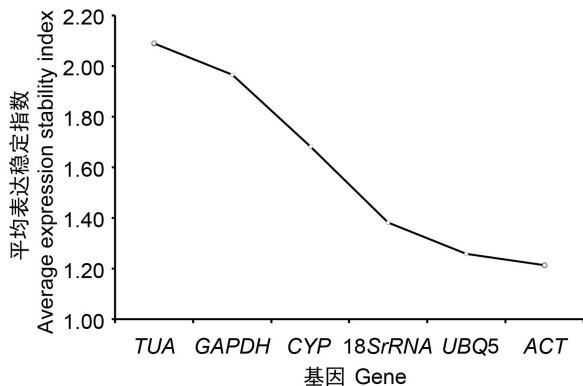


图 2 geNorm 程序分析 6 个候选内参基因的平均表达稳定性指数 (M)

Fig. 2 Average expression stability index (M) of six candidate reference genes calculated by geNorm

于对候选内参基因进行评价。其中 BestKeeper 程序直接输入 Ct 值进行表达的稳定性分析; 而 geNorm 和 NormFinder 软件在处理数据前需要先将 Ct 值转换成相对表达量再进行稳定性分析。我们用这 3 个软件对 *GAPDH*、*ACT*、*UBQ5*、*CYP*、*TUA* 和 18S*rRNA* 候选内参基因在蚬壳花椒种子萌发早期的表达稳定性进行统计学分析。

2.4.1 geNorm 分析 geNorm V3.5 软件根据平均表达稳定指数 M 值确定在不同条件下表达最稳定的内参基因。M 值越大, 基因的表达稳定性越低, 反之越高。M 值小于 1.5 的候选内参基因才被认为

表达相对稳定。本研究分析结果表明, 6 个候选内参基因中 3 个的 M 值均小于 1.5, 分别是 *ACT*、*UBQ5*、18S*rRNA*, 说明这 3 个候选内参基因都较为稳定。在 3 个候选内参基因中, *ACT* 的 M 值最低, 说明它的稳定性最好。6 个候选内参基因的稳定性从高到低依次为 *ACT* > *UBQ5* > 18S*rRNA* > *CYP* > *GAPDH* > *TUA* (图 2)。另外, M 值都偏大, 估计与种子萌发时期表达丰度的变异程度较大有关。

2.4.2 BestKeeper 分析 BestKeeper 分析的原理是直接内参基因的 Ct 值用 EXCEL 软件计算标准差 (s)。一般 s 值越小, 基因的表达稳定性越好。当 s 值 > 1 时表明该基因表达不稳定。本研究分析结果 (表 4) 显示, *GAPDH* 和 *TUA* 的 s 值大于 1, 其余都小于 1; 其中 *ACT* 的 s 最小, 表明 *ACT* 的表达稳定性最好。按照稳定性从高到低排序依次为 *ACT* > *UBQ5* > *CYP* > 18S*rRNA* > *TUA* > *GAPDH*。

2.4.3 NormFinder 分析 NormFinder 程序依据相对表达量用 EXCEL 软件计算基因的稳定性 M。M 值越低, 则该基因越稳定。6 个候选内参基因的 M 值如表 5 所示。表 5 结果表明, *UBQ5* 的 M 值最低, 说明它是所选内参基因中稳定性最好的; *TUA* 的 M 值最高, 说明它的稳定性最差。6 个候选内参基因按照稳定性从高到低排序依次为 *UBQ5* > *ACT* > 18S*rRNA* > *CYP* > *GAPDH* > *TUA*。

2.5 内参基因的综合稳定性分析

使用 BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 3 个软

表 4 用 BestKeeper 软件分析 6 个候选内参基因的表达稳定性
Table 4 Expression stability of six candidate reference genes analyzed by BestKeeper

参数 Parameter	基因 Gene					
	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>UBQ5</i>	<i>CYP</i>	<i>TUA</i>	<i>18SrRNA</i>
GM [CP]	24.76	25.31	24.92	23.98	28.31	12.13
AM [CP]	24.81	25.31	24.93	24	28.35	12.16
min [CP]	23.33	24.95	24.2	22.63	26.7	10.87
max [CP]	27.52	26.02	25.83	25.02	30.12	13.26
<i>s</i> [±CP]	1.44	0.31	0.42	0.83	1.41	0.91
<i>CV</i> [%CP]	5.82	1.24	1.69	3.47	4.97	7.47

表 5 用 NormFinder 软件分析 6 个候选内参基因的表达稳定性

Table 5 Expression stability of six candidate reference genes analyzed by NormFinder

基因 Gene	稳定指数 Stability index
<i>GAPDH</i>	1.244
<i>ACT</i>	0.255
<i>UBQ5</i>	0.022
<i>CYP</i>	0.868
<i>TUA</i>	1.323
<i>18SrRNA</i>	0.473

件对蚬壳花椒中 6 个候选内参基因的稳定性进行统计学综合分析(表 6)。geNorm 软件分析结果显示, *ACT* 和 *UBQ5* 的 M 值最低, 说明它们的稳定性较好, 6 个候选内参基因按照稳定性从高到低排序依次为 *ACT*>*UBQ5*>*18SrRNA*>*CYP*>*GAPDH*>*TUA*。BestKeeper 软件分析结果显示, *ACT* 的 *s* 值最低, 稳定性较好; *GAPDH* 和 *TUA* 的 *s* 值大于 1, 稳定性最差, 6 个候选内参基因的稳定性排序为 *ACT*>*UBQ5*>*CYP*>*18SrRNA*>*TUA*>*GAPDH*。NormFinder 软件分析结果显示, *UBQ5* 的 M 值最低, 说明其稳定性较好, 稳定性排序为 *UBQ5*>*ACT*>*18SrRNA*>*CYP*>*GAPDH*>*TUA*。3 个软件的分析结果一致性较好, 结果可靠度高。从综合分析结果来看, *ACT*、

UBQ5 和 *18SrRNA* 适合作为内参基因, 但 *ACT* 和 *UBQ5* 表达更稳定且表达丰度也适中。因此, 优先选择 *ACT* 和 *UBQ5* 作为内参基因。

2.6 内参基因稳定性验证

以 *ACT*、*UBQ5*、*18SrRNA* 和 *GAPDH* 作为内参基因, 分析异柠檬酸裂解酶基因 *Unigene0032088*、 α -淀粉酶基因 *Unigene0033597*、*DELLA* 基因 *Unigene0058868* 在种子萌发初始阶段的相对表达量, 以研究不同内参基因对实验结果的影响。3 个验证基因分别是与种子萌发时期糖代谢、脂代谢、激素密切相关的重要基因, 能够较好地反应种子萌发时期的生理状态。

图 3 结果表明, 以 *ACT*、*UBQ5*、*18SrRNA* 为内参基因时 3 个验证基因在各样本中的表达趋势基本一致, 而且在 GA 处理种子萌发的第 1 天、第 2 天都活跃表达, 这与种子萌发的生理过程相一致。以 *GAPDH* 为内参基因时验证基因的表达趋势则明显不同。进一步分析发现以 *GAPDH* 为内参基因时验证基因表达量在 GA 种子萌发的第 1 天、第 2 天普遍偏小, 反而在第 0 天高表达, 这显然与 GA 种子萌发趋势不一致, 而且表 3 也显示 *GAPDH* 的表达趋势是在萌发的第 0 天、第 1 天、第 2 天表达量明显增大, 因此当以 *GAPDH* 为内参基因时验证基因在第 1 天、第 2 天的相对表达量会明显偏小。*GAPDH* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 是参与糖酵解的一种关键酶。在种子萌发早期, 外源 GA 促进 α -淀粉酶表达

表 6 用 geNorm、BestKeeper 和 NormFinder 统计学软件分析候选内参基因的表达稳定性

Table 6 Expression stability of six candidate reference genes analyzed by geNorm, BestKeeper and NormFinder

基因 Gene	geNorm		BestKeeper		NormFinder	
	稳定指数 Stability index	稳定性排序 Stability rank	标准偏差 s [±CP]	稳定性排序 Stability rank	稳定指数 Stability index	稳定性排序 Stability rank
<i>GAPDH</i>	1.964	5	1.44	6	1.244	5
<i>ACT</i>	1.213	1	0.31	1	0.255	2
<i>UBQ5</i>	1.258	2	0.42	2	0.022	1
<i>CYP</i>	1.681	4	0.83	4	0.868	4
<i>TUA</i>	2.089	6	1.41	5	1.323	6
<i>18SrRNA</i>	1.381	3	0.91	3	0.473	3

以加强对糖的分解利用,可见 *GAPDH* 表达量并不稳定,因此 *GAPDH* 不适合为内参基因。综上所述,在用 qRT-PCR 分析基因表达时,选择不恰当的内参基因将可能导致错估目标基因的相对表达量,由此可见内参基因选择的重要性。

3 讨论与结论

种子萌发是一个复杂的植物生理发育过程,其中许多植物激素在种子萌发过程中具有重要作用;如赤霉素 GA、油菜素内脂 BR 促进种子萌发,而脱落酸 ABA、茉莉酸 JA 抑制萌发,但可以增强植物抗氧化和抗微生物感染能力。GA 是促进种子萌发的激素,在谷物种子萌发早期 GA 诱导糊粉层中的 α -淀粉酶基因转录表达 (Ye et al, 2011)。DELLA 蛋白抑制 GA 信号传导通路 (徐恒恒等, 2014), 并负调节 BR 信号途径 (Iliev et al, 2002), 同时促进 JA 信号通路应答基因表达 (Aleman et al, 2016)。由此可见,DELLA 蛋白是多种激素间相互作用的关键调控因子。蚬壳花椒种子富含油脂,油脂在种子萌发过程中可以提供碳源与能量。种子油脂一般先分解为脂肪酸,并经过 β -氧化途径转变为乙酰辅酶 A, 然后通过乙醛酸循环生成糖加以利用。异柠檬酸裂解酶是乙醛酸循环途径关键酶,通过对异柠檬酸裂解酶的表达情况可以了解种子萌发过程中油脂动员情况。因此, α -淀粉

酶基因、*DELLA* 基因和异柠檬酸裂解酶基因可以较好地反映种子萌发阶段糖、激素和脂肪的相关代谢活动。

本研究结果表明,蚬壳花椒种子萌发时期的合适内参基因是 *ACT*、*UBQ5* 和 *18SrRNA*。当以 *ACT*、*UBQ5* 和 *18SrRNA* 为内参基因时,3 个验证基因具有相似的相对表达量,且在清水处理种子萌发第 2 天表达量都极低,表明此时种子糖、脂、激素相关代谢活动几乎处于停滞状态,显示清水处理种子的萌发过程在萌发第 2 天被中断。这一现象可能与清水处理种子在第 3 天容易腐坏有关。考虑到 *18SrRNA* 表达丰度远高于大多数基因,因此 *ACT* 是蚬壳花椒种子萌发时期最合适的内参基因,其次是 *UBQ5*。

本研究中,当以 *ACT*、*UBQ5* 为内参基因时,异柠檬酸裂解酶基因的表达量在 GA 处理的种子萌发第 2 天具有极大提高,表明在 GA 处理的种子萌发第 2 天乙醛酸循环旺盛,此时种子油脂的动员也非常活跃。 α -淀粉酶基因在 GA 处理种子萌发第 1 天、第 2 天均有高表达,同时清水种子在萌发第 1 天也有一定程度的表达,表明无论是 GA 处理种子或是清水种子,在萌发早期糖代谢都较为活跃。*DELLA* 基因在 GA 处理种子萌发的第 1 天高表达,但是在第 2 天显著下调,表明 *DELLA* 对于 GA 信号通路的抑制作用减弱,有利于诱导谷物种子的糊粉层中 α -淀粉酶的转录和种子萌发。可见,以 *ACT*、

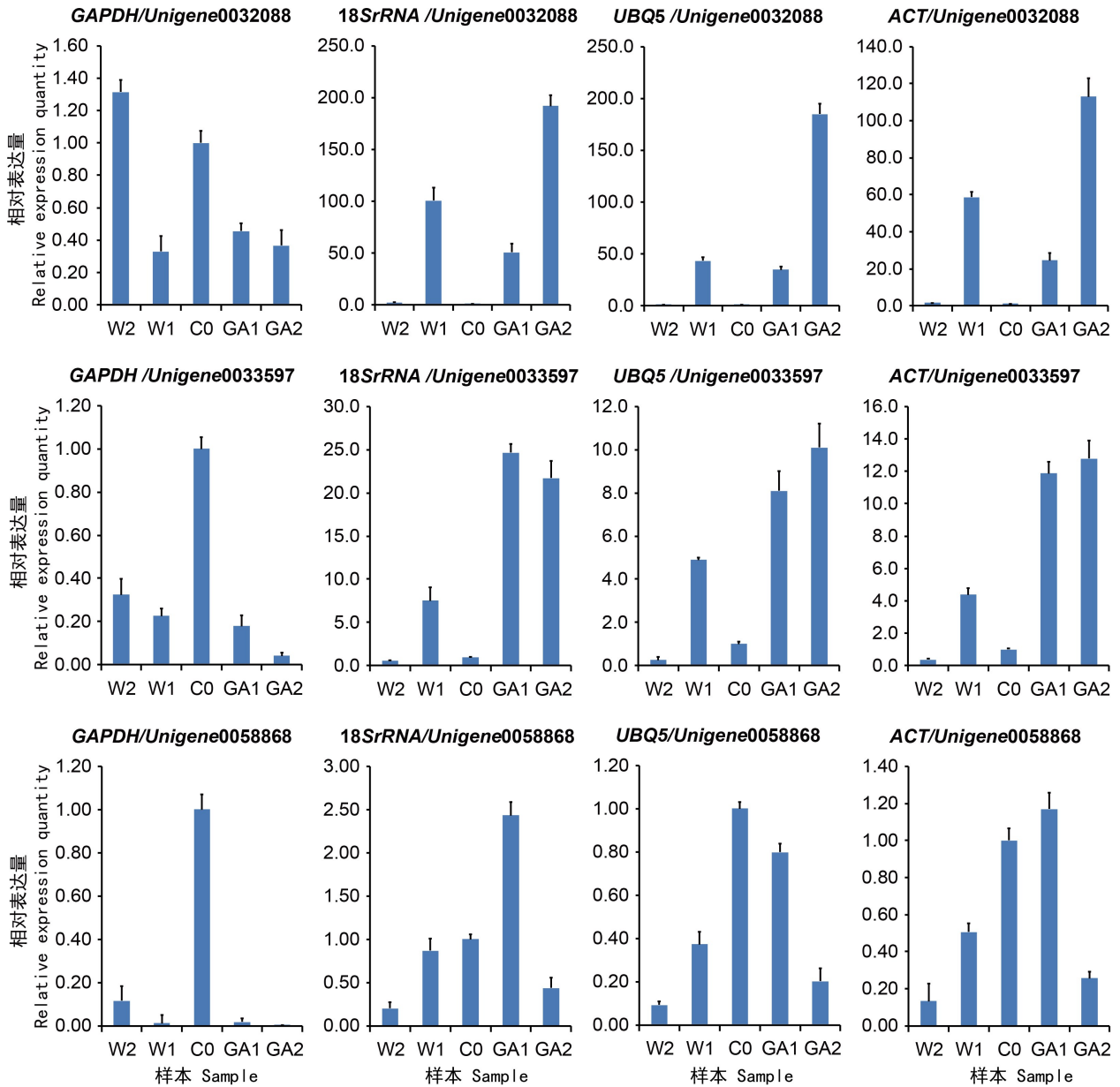


图 3 qRT-PCR 分析基因表达量时不同内参基因对实验结果的影响
Fig. 3 Effects of different candidate reference genes on gene expression quantities in qRT-PCR

UBQ5 为内参基因的相对表达量分析初步揭示了 GA 处理的种子易于萌发而清水处理的种子在萌发第 3 天容易腐败这一现象出现的可能原因。

总之,本研究以不同萌发阶段的蚬壳花椒种子为材料,分析了 6 个候选内参基因 *GAPDH*、*ACT*、*18SrRNA*、*UBQ5*、*TUA* 和 *CYP* 在蚬壳花椒种子萌发时期的表达稳定性。综合 *geNorm*、*Norm-Finder* 和 *BestKeeper* 的分析结果并结合基因的相

对表达量分析验证,结果表明蚬壳花椒种子萌发时期最合适的内参基因是 *ACT*,其次是 *UBQ5*。这个结果为蚬壳花椒种子萌发过程中的荧光定量 PCR 分析提供了详尽的内参基因参考。

参考文献:

ALEMAN F, YAZAKI J, LEE M, et al, 2016. An ABA-

- increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 transcription factor: A putative link of ABA and JA signaling [J]. *Sci Rep*, 30(6):28941–28958.
- ANDERSEN CL, JENSEN JL, ORNTOFT TF, 2004. 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*, 64(15):5245–50.
- BUSTIN S, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *J Mol Endocrinol*, 29(1):23–39.
- CHENG P, WANG P, SUN JK, et al, 2013. Research progresses on regulation mechanisms of plant seeds dormancy and germination [J]. *J Centr S Univ For Technol*, 33(5):52–58. [程鹏, 王平, 孙吉康, 等, 2013. 植物种子休眠与萌发调控机制研究进展 [J]. *中南林业科技大学学报*, 33(5):52–58.]
- CZECHOWSKI T, STITT M, ALTMANN T, et al, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 139(1):5–17.
- FERGUSON BS, NAM H, HOPKINS RG, et al, 2010. Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in *Adipocytes* [J]. *PLoS ONE*, 5(12):e15208–19.
- GIMENO J, EATTOCK N, DEYNZE AV, et al, 2014. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR [J]. *PLoS ONE*, 9(3):e91474–80.
- GUTIERREZ L, MAURIAT M, GUENIN S, et al, 2008. 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 Biotechnol J*, 6(6):609–618.
- HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al, 2005. Real-time RT-PCR normalisation, strategies and considerations [J]. *Genes Immun*, 6(4):279–284.
- ILIEV EA, XU W, POLISENSKY DH, et al, 2002. Transcriptional and posttranscriptional regulation of *Arabidopsis* TCH4 expression by diverse stimuli. Roles of cis regions and brassinosteroids [J]. *Plant Physiol*, 130(2):770–83.
- LI J, HAN J, HU Y, et al, 2016. Selection of reference genes for quantitative real-time pcr during flower development in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Front Plant Sci*, 21(7):516–527.
- LI Q, FAN CM, ZHANG XM, et al, 2012. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds [J]. *Plant Cell Rep*, 31(10):1789–1798.
- MA YZ, WANG P, 2008. Evaluation of threatened degree and sustainable utilization countermeasures of *Zanthoxylum Dissitum* resource [J]. *Nonw For Res*, 26(1):91–94. [马英姿, 王平, 2008. 蚬壳花椒受威胁程度评价及其可持续利用对策 [J]. *经济林研究*, 26(1):91–94.]
- MAFRA V, KUBO KS, ALCWS-FERREIRA M, et al, 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions [J]. *PLoS ONE*, 7(2):e31263–70.
- NICOT N, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, et al, 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 56(421):2907–2914.
- PFAFFL MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 29(9):e45–53.
- VANDESOMPLETE J, PRETER KD, PATTYN F, et al, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 3(7):1–12.
- XU HH, LI N, LIU SJ, et al, 2014. Research progress in seed germination and its control [J]. *Acta Agron Sin*, 40(7):1141–1156. [徐恒恒, 黎妮, 刘树君, 等, 2014. 种子萌发及其调控的研究进展 [J]. *作物学报*, 40(7):1141–1156.]
- YE N, ZHU G, LIU Y, et al, 2011. ABA controls H₂O₂ accumulation through the induction of OsCATB in rice leaves under water stress [J]. *Plant Cell Physiol*, 52(4):689–98.
- ZHUANG H, FU Y, HE W, et al, 2015. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments [J]. *Front Plant Sci*, 30(6):475–487.