

基于转录组测序的斑地锦内参基因筛选及验证

许建丰¹, 桂明明², 张永康¹, 尧子钊¹, 黄胜和², 饶泽昌^{1*}

1. 南昌大学抚州医学院, 江西抚州 344000; 2. 江西中医药高等专科学校医学基础部, 江西抚州 344000

摘要: 斑地锦 (*Euphorbia maculata*) 是一种常用中药材, 其中黄酮类化合物槲皮素是其主要药效成分之一。目前斑地锦槲皮素生物合成基因研究鲜见报道, 而实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 是基因研究的常用方法之一, 但具有合适的内参基因是 RT-qPCR 相对定量的前提条件。为了获得适合的斑地锦内参基因, 本研究基于转录组测序结果, 筛选出斑地锦 *EmSE*、*EmUBC*、*EmGDII*、*EmLSM12*、*EmGBP*、*EmSYP22*、*EmTRII*、*EmRSZ21*、*EmRPL7* 以及课题组前期得到的 *EmUBQ* 共 10 个基因作为候选内参基因。通过 RT-qPCR 检测 10 个候选内参基因在斑地锦营养生长期和生殖生长期的根、茎、叶及果中的表达情况, 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件分析候选基因的表达稳定性, 通过几何平均值法对不同软件所得结果进行整合并明确综合排名, 即 *EmGDII*>*EmUBQ*>*EmSE*>*EmUBC*>*EmLSM12*=*EmGBP*>*EmTRII*>*EmSYP22*>*EmRSZ21*=*EmRPL7*。以 *EmGDII* 为内参基因, 对槲皮素生物合成过程中的一个关键酶基因 *EmC4H* 进行表达分析, *EmC4H* 在不同生长期不同组织内的表达差异与转录组测序结果趋势基本一致。本研究开发的内参基因 *EmGDII* 可作为斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究中适合的内参基因。

关键词: 斑地锦; 内参基因; 转录组测序; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S567.219 文献标识码: A

Selection and Verification of the Reference Genes of *Euphorbia maculata* Based on Transcriptome Sequencing

XU Jianfeng¹, GUI Mingming², ZHANG Yongkang¹, YAO Zizhao¹, HUANG Shenghe², RAO Zechang^{1*}

1. Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou, Jiangxi 344000, China; 2. Department of Basic Medicine, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Jiangxi 344000, China

Abstract: The flavonoid quercetin is one of the main active ingredients in Chinese medicinal herb, *Euphorbia maculata*. At present, there are few reports on quercetin biosynthesis gene, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) is one of the common methods in gene research. But it is a prerequisite for relative quantitative RT-qPCR to have suitable reference genes. In order to obtain a suitable reference gene, this experiment was based on the results of transcriptome sequencing, *EmSE*, *EmUBC*, *EmGDII*, *EmLSM12*, *EmGBP*, *EmSYP22*, *EmTRII*, *EmRSZ21*, *EmRPL7* and *EmUBQ* obtained by our research group in the early stage were selected as candidate reference genes. RT-qPCR was used to detect the expression of the candidate reference genes in roots, stems, leaves and fruits of *E. maculata* during vegetative and reproduction stages. The expression stability of the candidate genes was analyzed using geNorm, NormFinder and BestKeeper software. The results of different software were integrated and ranked by the geometric mean method. The ranking was in the order *EmGDII*>*EmUBQ*>*EmSE*>*EmUBC*>*EmLSM12*=*EmGBP*>*EmTRII*>*EmSYP22*>*EmRSZ21*=*EmRPL7*. *EmC4H*, a key enzyme gene in quercetin biosynthesis, was analyzed using *EmGDII* as the reference gene. The difference of *EmC4H* expression in different tissues at different stages was consistent with the trend of transcriptome sequencing. The reference gene *EmGDII* developed in this study could be used as a suitable reference gene for tissue-specific expression studies of different stages of *E. maculata*.

收稿日期 2022-09-19; 修回日期 2022-11-17

基金项目 江西省教育厅科学技术研究项目 (No. GJJ218111, No. GJJ213308); 江西省抚州市青年科技领军人才项目 (No. 2020ED66)。

作者简介 许建丰 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 药用植物生物技术。*通信作者 (Corresponding author): 饶泽昌 (RAO Zechang), E-mail: rzc2005010@163.com。

Keywords: *Euphorbia maculata*; reference gene; transcriptome sequencing; RT-qPCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.016

斑地锦 (*Euphorbia maculata* L.) 是一年生大戟科 (Euphorbiaceae) 大戟属 (*Euphorbia* L.) 草本植物, 分布于江西、新疆、河南和浙江等地区^[1], 具有清热解毒功效, 主治痢疾、泄泻、尿血、便血、疮疖肿痛、湿热黄疸等^[2]。斑地锦主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等成分, 目前已开发有肠炎宁片、三七止血片、泻痢宁片等中成药, 其主要药效成分之一为黄酮类物质槲皮素^[3], 研究槲皮素等药用植物有效成分生物合成途径基因及其调控已成为热点之一^[4]。

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 是分子生物学中研究基因表达的重要工具之一, 具有定量准确、特异性强、灵敏度高、重复性好等优点, 常用于基因表达定量分析^[5]。然而, 合适的内参基因是获得可信相对定量结果的前提^[6]。研究表明, 不经筛选评价而以一种基因作为任何条件下的内参基因可能会大大降低结果的精确度^[7-8]。基因芯片及转录组测序技术等已被用于筛选传统的或新的内参基因, 以利于 RT-qPCR 的开展^[9]。转录组测序是对某一物种的 mRNA 进行高通量测序, 反映特定条件或特定时间点的基因表达情况, 通过分析转录组测序结果可以初步筛选出候选内参基因^[10]。目前评价内参基因表达稳定性的软件较多, 其中应用较广泛的有 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper^[11-12]。为筛选适用于斑地锦不同生长期不同组织 RT-qPCR 检测的内参基因, 本研究以前期筛选出的内参基因 *EmUBQ*^[13] 和通过转录组测序数据初步筛选出的 9 个表达相对稳定的基因 *EmRSZ21*、*EmSE*、*EmTRII*、*EmGDII*、*EmSYP22*、*EmLSM12*、*EmGBP*、*EmRPL7*、*EmUBC* 为候选内参基因进行 RT-qPCR, 分析其在营养生长期和生殖生长期的根、茎、叶、果中的表达模式, 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等软件综合分析其表达稳定性排名, 并用 *EmC4H* (槲皮素生物合成过程中的关键酶基因之一) 进行验证, 为斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究提供可靠的内参基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料采自江西中医药高等

专科学校实验田, 经其药学系中药教研室鉴定为斑地锦。分别采集营养生长期 (未开花且地上部分有 2 个及以上分枝) 植株的根、茎、叶和生殖生长期 (结 3 个及以上的果) 植株的根、茎、叶、果, 7 种样品皆为来源于 3 株以上植株的混合样, 样品采集后立即置于 -80 °C 冰箱备用。

1.1.2 主要试剂与仪器 RNA 提取试剂盒 (Spin Column Plant Total RNA Purification Kit) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser)、荧光定量 PCR 试剂 (PrimeScript™ RT Master Mix)、Pfu 酶 (TransStart FastPfu DNA Polymerase)、Taq 酶等购自宝生物工程 (大连) 有限公司。普通 PCR 仪 (T100™ Thermal Cycler)、荧光定量 PCR 仪 (CFX96 Real-Time) 等购自美国 Bio-Rad 公司。超微量分光光度计 (NanoDrop One) 购自美国 Thermo Scientific 公司。引物合成、测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 参照试剂盒说明书, 提取斑地锦不同生长期根、茎、叶、果总 RNA, 通过超微量分光光度计测定 RNA 浓度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。cDNA 的合成按相应试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 候选内参基因的筛选 根据课题组斑地锦转录组测序结果, 选取 FPKM 值大于 10 且变异系数小于 0.1 的 9 个基因 *EmSE*、*EmUBC*、*EmGDII*、*EmLSM12*、*EmGBP*、*EmSYP22*、*EmTRII*、*EmRSZ21*、*EmRPL7* 以及课题组前期筛选的 *EmUBQ* 共 10 个基因为候选基因。

1.2.3 引物设计及特异性检测 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 9 个候选内参基因及 *EmC4H* 基因定量 PCR 引物, *EmUBQ* 定量 PCR 引物参考文献^[13], 各引物序列见表 1。为排除引物二聚体, 检验引物特异性及非特异性扩增产物对结果的影响, 用相应引物进行普通 PCR 扩增。

1.2.4 RT-qPCR 溶解曲线分析 以 cDNA 作为模板, 进行 RT-qPCR 扩增, 加热 RT-qPCR 产物从 65 °C 到 95 °C, 每隔 0.5 °C 停留 5 s 检测 1 次荧光强度以获得溶解曲线。RT-qPCR 反应体系 (25 μL): 2×TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL,

表 1 内参基因及 *EmC4H* 基因的引物设计Tab. 1 Primer design for reference genes and *EmC4H* gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C
UBQ-qF	ATAACCCTCGAGGTCGAGTC	57
UBQ-qR	TGGAGAGTGGACTCCTTCTG	
RSZ21-qF	TCTCTGCTTCTCTGCACGTC	57
RSZ21-qR	CATAACACGCGCTCTGTTGC	
SE-qF	CCCCAGTGTGTATGCCTGTT	57
SE-qR	GCCTTGCATTCTGCCACC	
TRI1-qF	AAGCCGTCAAGCAGATTG	57
TRI1-qR	CCAGGAACCCGACTTCTCT	
GDI1-qF	TCTAGGTCCCGTTGACGAGT	57
GDI1-qR	TCGAGAGCCTTCCCAGTGAT	
SYP22-qF	ACCCTTCTCAAGCTGTAGCC	57
SYP22-qR	ACCAGATCGCCAATTCGTTG	
LSM12-qF	TGCAGTCAAAGAACAGCCAC	57
LSM12-qR	GGTACACACCCTTCACTGGT	
GBP-qF	CGCTAAGGTCGATGCAGTTG	57
GBP-qR	AAAGCGGAGCTCGTCTTCTG	
RPL7-qF	ATTTTGCAGCTGTTGCGCTT	57
RPL7-qR	TGGTTCACCTTCCCAGTAGCC	
UBC-qF	GCAGTGTCAACACAACCGTC	57
UBC-qR	AATAACCTGTGCTGCTCGCT	
C4H-qF	GTA AACCATCCCAGATT CAG	57
C4H-qR	CATGTGTGGTACAAGCAGC	

上游引物、下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), cDNA 溶液 2 μ L, 灭菌 ddH₂O 8.5 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

1.2.5 候选内参基因的筛选 分别将各样品总 RNA 的反转录产物 cDNA 作为模板, 以各定量 PCR 引物进行 RT-qPCR 扩增。将 Ct 值按公式 $Q = E^{(\min Ct - \text{sample Ct})}$ (E 为扩增效率, 默认值为 2; minCt 为基因在各样品中的最小 Ct 值; sampleCt 为基因在某样品中的 Ct 值) 进行计算, Q 值导入 geNorm 和 NormFinder 软件中进行稳定性分析。将各样品得到的 Ct 值输入 BestKeeper 软件中, 得到候选内参基因的表达稳定性变异系数 (CV) 和标准差 (SD)。最后运用几何平均值算法进行综合排名, 得出最适合斑地锦不同生长期基因组织特异性表达研究的内参基因。

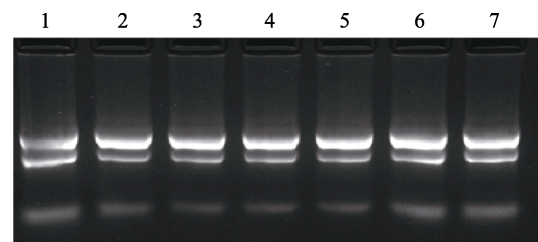
1.2.6 内参基因稳定性验证 以综合分析排名表达稳定性最优的基因为内参基因, 对槲皮素生物合成过程中的 *EmC4H* 基因的表达情况进行分析,

RT-qPCR 方法参照 1.2.4, 结合 *EmC4H* 基因的转录组数据, 对内参基因进行表达稳定性验证。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取与质量检测

所有样品总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 及 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值, 利用 Nanodrop 检测均在 2.0 左右, 说明所提取 RNA 纯度较好。所有 RNA 样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示 28S 和 18S 条带明显 (图 1), 说明总 RNA 完整性较好, 均可用于后续试验。



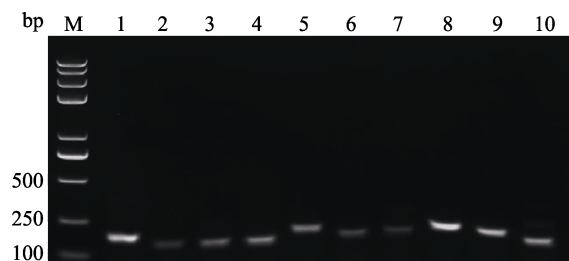
1~3: 分别为营养生长期根、茎、叶;
4~7: 分别为生殖生长期根、茎、叶、果。
1-3: Root, stem and leaf of vegetative stage; 4-7: Root, stem, leaf and fruit of reproduction stage.

图 1 斑地锦各生长期不同组织样品中的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in various tissues at different stages of *E. maculata*

2.2 内参基因引物的特异性与熔解曲线分析

内参基因引物 PCR 扩增出单一且较亮的条带, 条带大小与预期相符, 无引物二聚体 (图 2), 引物特异性强, 可用于后续检测分析。对 10 个候选内参基因在不同时期各个样品的 RT-qPCR 分析表明, 各基因 Ct 值均在 22~31 之间, 各基因引物的熔解曲线均显示单峰 (图 3), 表明 RT-qPCR 所用引物可与模板 cDNA 特异性结合并扩增靶基因。



M: Trans2K Plus II; 1: *EmUBQ*; 2: *EmRSZ21*; 3: *EmSE*;
4: *EmTRI1*; 5: *EmGDI1*; 6: *EmSYP22*; 7: *EmLSM12*;
8: *EmGBP*; 9: *EmRPL7*; 10: *EmUBC*.

图 2 10 个内参基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products of ten reference genes

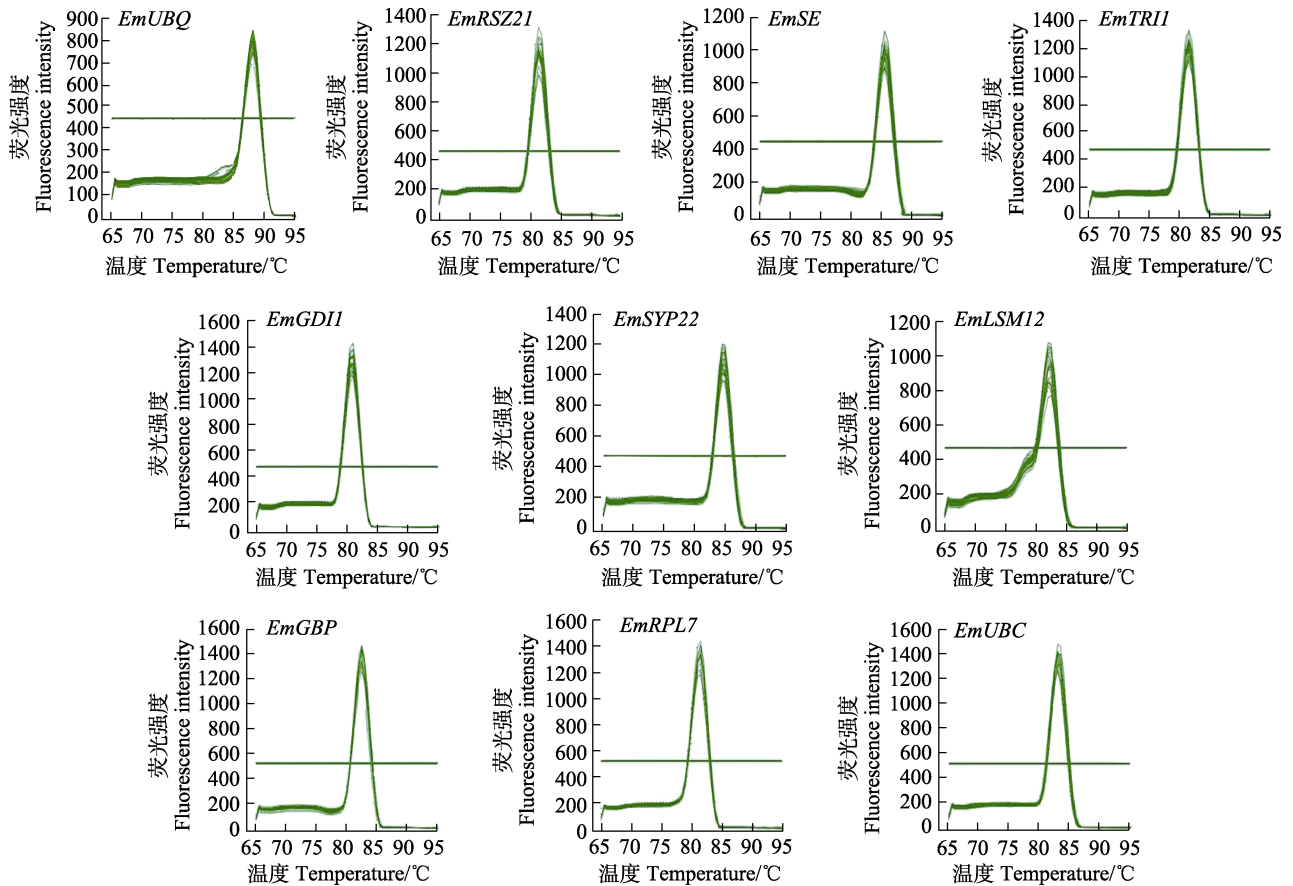


图 3 候选内参基因溶解曲线

Fig. 3 Melting curves of candidate reference genes

2.3 候选内参基因表达稳定性分析

2.3.1 候选内参基因的表达丰度分析 10 个候选内参基因中, *EmRSZ21* 的平均 Ct 值最大, 为 28.82, 说明该基因的表达丰度最低; *EmUBQ* 的平均 Ct 值最小, 为 22.26, 说明该基因的表达丰度最高。10 个候选内参基因的平均 Ct 值利用 Excel 中的 *t* 检验分析显著性差异, 表达丰度排序依次是 *EmUBQ*>*EmGBP*=*EmGD11*>*EmTR11*=*EmRPL7*=*EmUBC*>*EmLSM12*=*EmSE*>*EmSYP22*>*EmRSZ21* (图 4)。

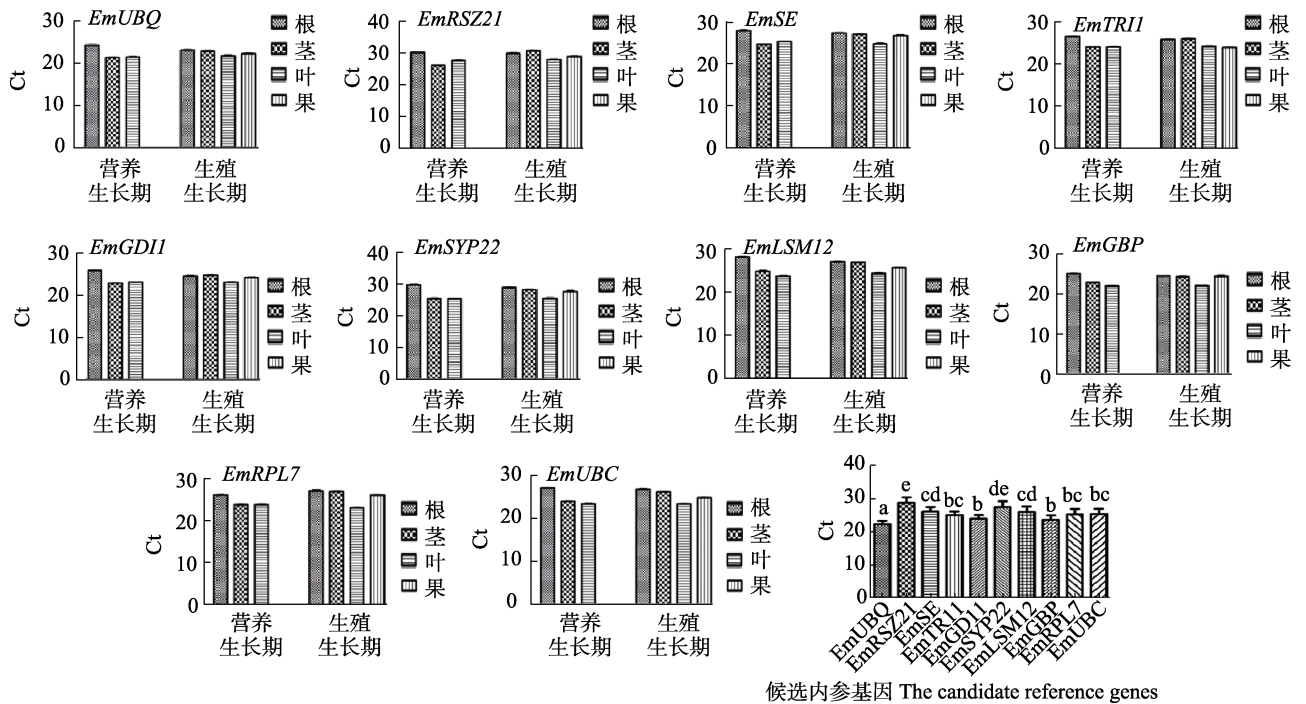
2.3.2 geNorm 软件分析 geNorm 软件通过计算稳定系数 *M*, 以确定表达最稳定的内参基因。该软件以 *M*=1.5 作为临界点, *M* 值越小, 稳定性越好。10 个候选内参基因在不同组织中表达的 *M* 值均小于 1.5, 稳定性排名为 *EmSE*>*EmUBC*>*EmGD11*>*EmLSM12*>*EmUBQ*>*EmGBP*>*EmSYP22*>*EmTR11*>*EmRSZ21*>*EmRPL7* (表 2)。

2.3.3 NormFinder 软件分析 NormFinder 软件与 geNorm 类似, 也是基于各候选内参基因的 *M*, 通过方差评估其表达稳定性。NormFinder 分析结果

显示, 10 个候选内参基因在各组织中的表达稳定程度存在差异, 按 *M* 值大小排序依次为 *EmGD11*>*EmUBQ*>*EmUBC*>*EmSYP22*>*EmSE*>*EmRPL7*>*EmLSM12*>*EmGBP*>*EmTR11*>*EmRSZ21* (表 3)。

2.3.4 BestKeeper 软件分析 BestKeeper 软件直接根据各基因的 Ct 值, 通过计算变异系数 (CV) 和标准偏差 (SD) 来评估各内参基因的稳定性, 且 CV 和 SD 值与基因的稳定性呈负相关, 即稳定的内参基因具有较小的 CV 值和 SD 的值。BestKeeper 分析结果显示, 10 个候选内参基因的 SD 值只有 *EmUBQ* 和 *EmGD11* 小于 1.0 (默认阈值) (表 4)。

2.3.5 综合性分析 BestKeeper 分析结果与 geNorm 和 NormFinder 软件分析结果差异明显, 采用几何平均值算法进行各候选内参基因的综合排名, 内参基因稳定性越好则几何平均值越低。10 个候选内参基因在斑地锦不同生长期的不同组织中表达稳定性综合排名为 *EmGD11*>*EmUBQ*>*EmSE*>*EmUBC*>*EmLSM12*=*EmGBP*>*EmTR11*>*EmSYP22*>*EmRSZ21*=*EmRPL7* (表 5)。



候选内参基因 The candidate reference genes

不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Different lowercase letters represent significant difference at 0.05 level.

图 4 候选内参基因在不同时期不同组织样品中 RT-qPCR 的 Ct 值

Fig. 4 Ct values of RT-qPCR for candidate reference genes in various tissues at different stages

表 2 geNorm 分析候选内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Tab. 2 Expression stability of candidate reference genes analyzed by geNorm

基因 Gene	M 值 M value	排序 Rank	基因 Gene	M 值 M value	排序 Rank
<i>EmSE</i>	0.605	1	<i>EmGBP</i>	0.703	6
<i>EmUBC</i>	0.645	2	<i>EmSYP22</i>	0.734	7
<i>EmGDI1</i>	0.650	3	<i>EmTRII</i>	0.801	8
<i>EmLSM12</i>	0.673	4	<i>EmRSZ21</i>	0.861	9
<i>EmUBQ</i>	0.701	5	<i>EmRPL7</i>	0.886	10

表 3 NormFinder 分析候选内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Tab. 3 Expression stability of candidate reference genes analyzed by NormFinder

基因 Gene	M 值 M value	排序 Rank	基因 Gene	M 值 M value	排序 Rank
<i>EmGDI1</i>	0.049	1	<i>EmRPL7</i>	0.148	6
<i>EmUBQ</i>	0.092	2	<i>EmLSM12</i>	0.160	7
<i>EmUBC</i>	0.124	3	<i>EmGBP</i>	0.169	8
<i>EmSYP22</i>	0.132	4	<i>EmTRII</i>	0.242	9
<i>EmSE</i>	0.135	5	<i>EmRSZ21</i>	0.264	10

表 4 BestKeeper 分析候选内参基因在各生长期不同组织中的表达稳定性

Tab. 4 Expression stability of candidate reference genes analyzed by BestKeeper

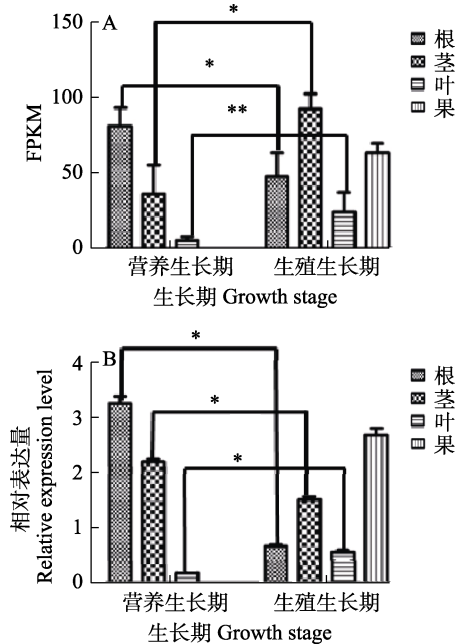
基因 Gene	SD	CV	排序 Rank	基因 Gene	SD	CV	排序 Rank
<i>EmUBQ</i>	0.816	3.666	1	<i>EmRSZ21</i>	1.283	4.451	6
<i>EmGDI1</i>	0.849	3.544	2	<i>EmLSM12</i>	1.333	5.129	7
<i>EmTRII</i>	1.009	4.035	3	<i>EmUBC</i>	1.377	5.432	8
<i>EmGBP</i>	1.121	4.737	4	<i>EmRPL7</i>	1.456	5.764	9
<i>EmSE</i>	1.143	4.377	5	<i>EmSYP22</i>	1.574	5.738	10

表 5 候选内参基因在各生长期不同组织中表达稳定性综合排名
Tab. 5 Overall ranking of expression stability of candidate reference genes

基因 Gene	geNorm rank	NormFinder rank	BestKeeper rank	几何平均值 Geometrical mean	综合排名 Comprehensive rank
<i>EmGDII</i>	3	1	2	2.000	1
<i>EmUBQ</i>	5	2	1	2.667	2
<i>EmSE</i>	1	5	5	3.667	3
<i>EmUBC</i>	2	3	8	4.333	4
<i>EmLSM12</i>	4	7	7	6.000	5
<i>EmGBP</i>	6	8	4	6.000	5
<i>EmTRII</i>	8	9	3	6.667	7
<i>EmSYP22</i>	7	4	10	7.000	8
<i>EmRSZ21</i>	9	10	6	8.333	9
<i>EmRPL7</i>	10	6	9	8.333	9

2.4 内参基因稳定性验证

以 *EmGDII* 为内参基因, 分析槲皮素生物合成过程中关键基因之一 *EmC4H* 的表达量差异, 以验证软件分析结果的可靠性。结果表明, 以 *EmGDII* 为内参基因, *EmC4H* 在营养生长期的表达差异与转录组测序结果趋势完全一致, 在生殖生长期的表达差异与转录组测序结果趋势基本一致 (图 5)。因此, 使用 *EmGDII* 基因为内参基因, 能够较为准确地校准斑地锦不同生长期不同组织中的 RT-qPCR 检测结果。



A: 转录组测序结果; B: RT-qPCR 结果。*代表处理间差异显著 ($P < 0.05$); **代表处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

A: The results of transcription sequencing; B: The results of RT-qPCR. * represents significant difference among treatments ($P < 0.05$); ** represents the extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 5 *EmC4H* 基因在斑地锦各生长期不同组织中表达差异
Fig. 5 Expression differences of *EmC4H* in various tissues of *E. maculata* at different stages

3 讨论

随着药用植物分子生物学研究的不断深入, 药用活性成分生物合成的关键酶基因表达与调控逐渐成为研究热点。荧光实时定量 PCR 是检测基因表达模式的高效手段之一, 而具有合适、稳定的内参基因是荧光实时定量 PCR 的基础。*Act*、*GAPDH*、*UBQ*、*18S rRNA* 等传统内参基因被广泛应用, 但在不同组织、不同生长期以及不同处理条件下均稳定表达的内参基因并不存在^[7], 因此需要根据试验条件的改变筛选出可靠的内参基因, 或应用内参基因组合以减少基因表达误差^[14]。基于转录组测序的 RT-qPCR 内参基因筛选是近年来发展的一个新的有效策略, 在酿酒酵母中已筛选鉴定出一套全新的内参基因^[15], 也已成功应用于一些丝状真菌、植物和动物中^[16-18], 例如在马尔尼菲青霉菌中, *Actin* 基因在不同细胞类型中表达最稳定^[19], 而基于转录组测序获得的 *FacpA* 和 *DigA* 基因在双相转换过程中表达稳定性最高^[20]。本研究根据斑地锦转录组测序结果, 筛选出 *EmSE*、*EmUBC*、*EmGDII*、*EmLSM12*、*EmGBP*、*EmSYP22*、*EmTRII*、*EmRSZ21*、*EmRPL7* 和课题组前期利用同源克隆法获得的内参基因 *EmUBQ*, 共 10 个候选内参基因进行 RT-qPCR, 分别用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件评价其在各生长期 (营养生长期、生殖生长期) 根、茎、叶和果中的表达稳定性。结果显示, 不同软件对 10 个内参基因表达稳定性的评估并不完全一致。*EmUBQ* 在 BestKeeper 评价时表达最稳定, 而在 geNorm 和 NormFinder 评估中排序居中; *EmSE* 在 geNorm 中排序最好, 而在其他 2 种软件中排序较差。这种现象在地苳 (*Melastoma dodecandrum*)^[21]、扇脉杓兰 (*Cypripedium japonicum*)^[22]

和阳桃(*Averrhoa carambola*)^[23]等研究中也存在,可能是由于软件的算法不同导致内参基因稳定性排序不同^[24]。因此,需要几何平均值算法进行综合分析得到最适合的内参基因。同时,为了验证筛选出的内参基因表达稳定性,选取槲皮素生物合成过程中的关键基因 *EmC4H* 作为目的基因进行了验证,结果表明,以综合分析结果最好的 *EmGDII* 为内参基因, *EmC4H* 在斑地锦不同生长期各组织中的表达差异与转录组测序结果趋势一致^[25],进一步证明 *EmGDII* 内参基因的可靠性。

GDI1 是 GDP 解离抑制因子,属于 Rab 蛋白家族,普遍表达在各种组织中,能与 Rab GTPase 结合在膜上,参与调节囊泡形成、囊泡沿着微管和微丝运输以及膜融合等多个方面的膜运输过程。在甘蓝型油菜新开发的内参基因中, *GDI1* 也是最稳定的内参基因之一^[26]。10 个候选内参基因中, *EmUBQ* 表达也较稳定,仅次于 *EmGDII*,如果采取内参基因组合,则 *EmGDII* 和 *EmUBQ* 较为合适。但是若试验情况发生了变化,例如研究光照条件对斑地锦基因表达的影响等,可能需要重新筛选评估以获得合适的内参基因。

本研究根据课题组前期研究及转录组测序数据筛选出 10 个候选基因,结合 RT-qPCR 技术及 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等内参基因分析软件对各候选基因进行稳定性分析,以槲皮素生物合成过程中的 *EmC4H* 基因进一步验证,确定 *EmGDII* 为较适合斑地锦不同生长期不同组织基因表达模式研究的内参基因,为斑地锦分子生物学研究提供了便利条件。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第三分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 44: 49-50.
Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agenda Academiae Sinicae Edita. Flora reipublicae popularis sinicae (Vol. 3)[M]. Beijing: Science Press, 1997, 44: 49-50. (in Chinese)
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 127.
Chinese Pharmacopoeia Commission. The pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science Press: 2015: 127. (in Chinese)
- [3] 安惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提, 斯拉甫·艾白. 地锦草的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2866-2868.
- [4] AN H X, LI Z J, GULINA D W T, SILAFU A B. Research advance of the uighur medicine dijincao[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 29(12): 2866-2868. (in Chinese)
- [4] 李丹丹, 胡博, 王庆, 吴卫. 药用植物内参基因研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 903-910.
LI D D, HU B, WANG Q, WU W. The research on reference genes in medicinal plant[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(3): 903-910. (in Chinese)
- [5] WANG Y Z, DAI M S, CAI D Y, SHI Z B. Screening for quantitative real-time PCR reference genes with high stable expression using the mRNA-sequencing data for pear[J]. Tree Genet Genomes, 2019, 15(4): 54.
- [6] SHAKEEL M, RODRIGUEZ A, TAHIR U B, JIN F. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects[J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(2): 227-236.
- [7] ZHU L F, YANG C Q, YOU Y H, LIANG W, WANG N N, MA F W, LI C Y. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malus domestica*) at diverse stages of fruit development[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 244: 165-171.
- [8] MO Z H, CHEN Y Q, LOU W R, JIA X D, ZHAI M, XUAN J P, GUO Z R, LI Y R. Identification of suitable reference genes for normalization of real-time quantitative PCR data in pecan (*Carya illinoensis*)[J]. Tree, 2020, 34(2): 1233-1241.
- [9] 丁戈, 黄杨, 陈伦林, 李书宇, 宋来强, 熊洁. 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.
DING G, HUANG Y, CHEN L L, LI S Y, SONG L Q, XIONG J. RNA-seq based discovery of new reference genes and primers in *Brassica napus* under aluminum stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(1): 1-9. (in Chinese)
- [10] 慧芳, 刘秀岩, 李宗谕, 刘福顺, 杨世海. 转录组测序技术在药用植物研究中的应用[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6149-6155.
HUI F, LIU X Y, LI Z Y, LIU F S, YANG S H. Application of transcriptome sequencing in study of medicinal plants[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(24): 6149-6155. (in Chinese)
- [11] KIARASH J G, DAYTON W H, AMIRMAHANI F, MEHDI M M, ZABOLI M, NAZARI M, SAEED M S, JAMALVANDI M. Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses[J]. Journal of Genetics, 2018, 97(5): 1433-1444.
- [12] ZHONG S L, ZHOU S Y, YANG S J, YU X N, XU H Z, WANG J Y, ZHANG Q, LV M M, FENG J F. Identification

- of internal control genes for circular RNAs[J]. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(10): 1111-1119.
- [13] 宋美玲, 黄胜和, 陈祖杰, 邹嘉轩, 刘欢胜, 全文军. 斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选[J]. *广西植物*, 2022, 42(2): 340-348.
- SONG M L, HUANG S H, CHEN Z J, ZOU J X, LIU H S, QUAN W J. Screening of reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculate*[J]. *Guihaia*, 2022, 42(2): 340-348. (in Chinese)
- [14] NGUYEN N, SUOKAS M, KARPPINEN K, VUOSKU J, JAAKOLA L, HÄGGMAN H. Recognition of candidate transcription factors related to bilberry fruit ripening by de novo transcriptome and qRT-PCR analyses[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-12.
- [15] AYCA C C, ELIF D, SERPIL E, ERKAN K, DUYGU D, BETUL K. A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38351.
- [16] ANA V, ANA C, JOANA F, HELENA G A, ANDREIA L, PEDRO T, ANA S P, VITOR V, PILAR M, HELENA O, MARIA D C S, OCTÁVIO S P, DORA B. Comparative validation of conventional and RNA-Seq data-derived reference genes for qPCR expression studies of *Colletotrichum kahawae*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150651.
- [17] MARINA A P, YI Z, ZHANG J F, GREGORY B M, HERNAN G R. Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44905.
- [18] ZHAN C, ZHANG Y X, MA J, WANG L, JIANG W, SHI Y, WANG Q. Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(4): 330-337.
- [19] WIYADA D, MONSICHA P, NONGNUCH V. Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffeii*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 118: 42-50.
- [20] 陶玉婷, 卢姗, 王超, 王俊杰, 康雪晴, 蓝秀万, 梁晓乐, 梁莹, 何志义. 基于转录组测序的马尔尼菲青霉菌实时荧光定量 PCR 内参基因筛选与鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1042-1048.
- TAO Y T, LU S, WANG C, WANG J J, KANG X Q, LAN X W, LIANG X L, LIANG Y, HE Z Y. Selection and identification of reference genes for qRT-PCR in *Penicillium marneffeii* based on RNA-seq[J]. *Genomics and Applied Biotechnology*, 2016, 35(5): 1042-1048. (in Chinese)
- [21] 郝杨, 陈斌, 苏鹏峰, 周育真, 彭东辉. 地苣 (*Melastoma dodecandrum*) 实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J/OL]. *分子植物育种*: 1-12 [2023-11-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20211203.0033.004.html>.
- HAO Y, CHEN B, SU P F, ZHOU Y Z, PENG D H. Selection of internal reference genes in *Melastoma dodecandrum* by real-time fluorescence quantitative PCR[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*: 1-12 [2023-11-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20211203.0033.004.html>. (in Chinese)
- [22] 段国敏, 李田园, 田敏, 王彩霞, 张莹. 扇脉杓兰实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *核农学报*, 2021, 35(3): 576-585.
- DUAN G M, LI T Y, TIAN M, WANG C X, ZHANG Y. Reference gene selection of real-time fluorescence quantitative PCR in *Cypripedium japonicum*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(3): 576-585. (in Chinese)
- [23] 李笑平, 朱雅婷, 赵亚梅, 陈蕾, 任惠, 吴沙沙, 翟俊文. 阳桃 (*Averrhoa carambola*) 实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证[J/OL]. *分子植物育种*: 1-17 [2023-11-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210610.1828.018.html>.
- LI X P, ZHU Y T, ZHAO Y M, CHEN L, REN H, WU S S, ZHAI J W. Selection and validation of reference genes of *Averrhoa carambola* by quantitative real-time PCR[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*: 1-17 [2023-11-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210610.1828.018.html>. (in Chinese)
- [24] 张芷睿, 张耀华, 王秋实, 于慧, 杨素欣. 大豆实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(9): 1963-1973.
- ZHANG Z R, ZHANG Y H, WANG Q S, YU H, YANG S X. Screening and validation of reference genes for real-time quantitative PCR in soybean[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(9): 1963-1973. (in Chinese)
- [25] KATERINA J, HANA R, JAN K, MARYNA V, BARBORA B, PETRA P, IVO P, KAREL S. Identification and validation of reference genes in *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 for RT-qPCR using RNA-Seq data[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 640054.
- [26] YANG H L, LIU J, HUANG S M, GUO T T, DENG L B, HUA W. Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in *Brassica napus* L.[J]. *Gene*, 2014, 538(1): 113-122.