

毛叶芋兰不同组织 qRT-PCR 内参基因选择与验证

池珈仪, 刘舒璇, 向思诗, 詹若挺, 何 瑞*

广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/广州中医药大学岭南中药资源教育部重点实验室/广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006

摘 要: 毛叶芋兰 (*Nervilia plicata*) 是一种珍稀南药, 目前对其有效成分及其分子调控机理鲜有报道。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 在植物基因表达分析中得到了广泛应用, 但在毛叶芋兰中缺少研究, 限制了相关工作的开展。在前期工作基础上, 本研究从毛叶芋兰转录组数据库中筛选出 *Actin*、*GAPDH*、*TUA*、*UBC*、*UBQ*、*EF-1 α* 、*EF-1 β* 、*CYP*、*RPL* 共 9 个常见管家基因, 以毛叶芋兰叶片、叶柄和球茎 3 个组织部位为材料, 开展 qRT-PCR 内参基因的筛选工作。经过 9 个基因在不同组织的表达水平、稳定性和综合分析, 筛选出最适合的内参基因, 并选择毛叶芋兰花青素合成途径关键基因 *NpDFR*、*Np3GT* 进行验证。结果发现: *EF-1 α* 和 *CYP* 的表达稳定性相近, 整体稳定性最好。2 个内参基因单独或共同使用时, *NpDFR*、*Np3GT* 在不同组织的表达情况与转录组测序结果基本一致, 表明其均可用作 qRT-PCR 的内参基因。本研究结果为进一步开展毛叶芋兰药效相关基因的分子作用机理研究提供依据。

关键词: 毛叶芋兰; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; 表达稳定性

中图分类号: S567.2 文献标志码: A

Selection and Validation of qRT-PCR Reference Genes in Different Tissues of *Nervilia plicata*

CHI Jiayi, LIU Shuxuan, XIANG Sishi, ZHAN Ruoting, HE Rui*

Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine / Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou University of Chinese Medicine / School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China

Abstract: *Nervilia plicata* is a rare southern Chinese herb. The study on the plant at molecular level is hardly seen. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) has been widely used in plant gene expression analysis, but there is a lack of research on it in *N. plicata*, which limits the progress of related work. Based on the previous researches, nine candidate reference genes, including *Actin*, *GAPDH*, *TUA*, *UBC*, *UBQ*, *EF-1 α* , *EF-1 β* , *CYP* and *RPL*, were screened out from the transcriptomic sequencing data. In order to select suitable reference gene in *N. plicata*, qRT-PCR technique was employed to detect the expression levels of the candidate reference genes in leaf, petiole and corm tissues of the plant. After analyzing the expression levels, the stability and comprehensive analysis of nine genes in different tissues, the most suitable reference gene was obtained. Finally, the most suitable reference gene was validated using *NpDFR*, *Np3GT* that related to anthocyanin synthesis. Results showed that the expression stability of *EF-1 α* and *CYP* was similar, with the best overall stability. When using either *EF-1 α* or *CYP*, or the combination of them, as reference, the expression patterns of *NpDFR* and *Np3GT* in different tissues were consistent with the transcriptome sequencing results. This indicates that both *EF-1 α* and *CYP* can be used as reference genes in *N. plicata* for qRT-PCR. This study would provide a basis for further research on the molecular mechanism of genes related to the pharmacological effects of *N. plicata*.

收稿日期 2024-07-31; 修回日期 2024-08-30

基金项目 2022 年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目“广东省南药种业创新园项目”(No. 2022-NJS-00-002, 粤财农[2022]184 号)。

作者简介 池珈仪 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物资源研究及 GAP 关键技术。*通信作者 (Corresponding author): 何 瑞 (HE Rui), E-mail: ruihe@gzucm.edu.cn。

Keywords: *Nervilia plicata*; reference gene; qRT-PCR; expression stability

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.01.004

实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 是将聚合酶链式反应和荧光染料相结合的检测技术,能以较高的灵敏度和特异度实时监测模板扩增的反应进程^[1],是定量分析样品中核酸分子的最常用的分子生物学技术之一^[2]。因其快速简便,结果准确性高,qRT-PCR 技术被普遍应用于生命科学及其相关领域,具有广泛应用价值。常用于基因表达分析、突变检测、物种鉴定等^[3]。

qRT-PCR 结果的准确可靠性可能受到如 RNA 质量、逆转录、引物的特异性和实验者操作精准性等的影响^[4]。为了避免这些因素的影响,准确反映目的基因的表达水平,在 qRT-PCR 过程中使用一个或多个合适的基因进行标准化至关重要^[5]。这种能用于标准化 qRT-PCR 数据的基因即为内参基因 (reference gene),一般为管家基因。管家基因如 *GAPDH*、*Actin*、*18S rRNA*、*tubulin*、*EF-1 α* 、*ubiquitin* 等在各组织和细胞中的表达都相对稳定,可用作基因相对表达分析检测的参考。然而,内参基因的表达水平也会因物种差异、生物生长发育阶段的变化或实验条件的不同而发生变化,因此在特定条件下,必须对所选取的内参基因进行表达稳定性的验证^[6]。geNorm、NormFinder 和 Bestkeeper 为目前评估内参基因稳定性的 3 种主流软件^[7-8]。

毛叶芋兰 [*Nervilia plicata* (Andr.) Schitr.] 是兰科芋兰属珍稀药用植物。《中国植物志》^[9-10] 中记载该植物具利肺止咳、益肾、解毒止痛之功效,其主要药效化学成分为黄酮类物质^[10]。目前针对毛叶芋兰的研究非常少,基本只有关于其物种鉴定和化学成分研究的报道,缺少对其有效成分及其分子调控机理的研究。qRT-PCR 技术在植物基因表达分析中被广泛应用,但在毛叶芋兰中也缺乏相关研究,尚未见其内参基因筛选的报道,这限制了相关工作的进一步开展。

本研究以毛叶芋兰的叶、叶柄、球茎 3 个部位为材料,从前期获得的转录组数据库中选取 9 个常见管家基因 (*Actin*、*GAPDH*、*TUA*、*UBC*、*UBQ*、*EF-1 α* 、*EF-1 β* 、*CYP*、*RPL*) 作为候选内参基因,利用 qRT-PCR 检测它们在 3 个不同部位的表达情况,结合 ΔC_t 法分析,采用 geNorm、

NormFinder 和 Bestkeeper 软件以及 RefFinder 程序分析并筛选出毛叶芋兰不同组织部位表达最稳定的内参基因,为进一步采用分子生物学技术研究毛叶芋兰及其他兰科植物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用植物材料种植于广州中医药大学中药学院资源中心植物培养室,经相关参考文献并结合《中国植物志》^[9-11] 中形态描述及其来源地等鉴定为毛叶芋兰 (*Nervilia plicata*)。选择叶片完全伸展的 3 株毛叶芋兰植株,于 2023 年 8 月采集叶片、叶柄和球茎,用 DEPC 水将采摘的样本清洗干净,立即液氮速冻,转移并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取以及 cDNA 合成 使用 RNA 提取试剂盒 (CW2598S, CWBIO) 按说明书提取毛叶芋兰的 RNA,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所获 RNA 的完整性;使用反转录试剂盒 (R223, Vazyme) 将检验合格的 RNA 样品反转录成 cDNA,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.2 内参基因的筛选及其引物设计 参考已发表的近缘物种内参基因序列,对已完成测序的毛叶芋兰不同组织部位的转录组数据 (未发表) 进行本地蛋白序列 blast,结合从数据库中筛选出的注释为 9 个基因的所有转录本,进一步以每千个碱基的转录每百万映射读取的碎片 (FPKM 值) >100 且变异系数 (coefficient of variation, CV) 最小为筛选标准,获得 9 个候选内参基因,根据其各自核苷酸序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计对应引物 (表 1)。

1.2.3 引物特异性检测 以反转录后得到的总 cDNA 原液为模板,使用 Premix Taq (TaKaRa Taq™ version 2.0 plus dye) (RR902Q) 进行普通 PCR 扩增,反应体系: Premix Taq (TaKaRa Taq version 2.0 plus dye) $12.5\text{ }\mu\text{L}$,上游引物 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,下游引物 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,添加 ddH₂O 至 $25\text{ }\mu\text{L}$,PCR 反应程序参照试剂盒说明书设置。所设计的引物其特异性通过 3.0 % 琼脂糖凝胶电泳初步检测,并在 qRT-PCR 后观察熔解曲线进一步确认。

表 1 9 个候选内参基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences for nine candidate reference genes

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段长度 Product length/bp
<i>Actin</i>	F: ATGGTTAAGGCTGGTT R: TTAGATTGGGCTTCGTCA	139
<i>GAPDH</i>	F: ACGCAATCACTGCCACTC R: TCCCTCAGACTCTTCCTTTAT	270
<i>TUA</i>	F: GTTCAGCATCAACCGACTC R: ACCACAGCATCCACCTTT	140
<i>UBC</i>	F: GGAAGAGGTTGATGAGGGAC R: ACAGTTGGCGGCTTATTT	193
<i>UBQ</i>	F: GGCTCCAATTCTGTAATCC R: TTTGCCAGTGAGGGTCTT	291
<i>EF-1α</i>	F: GCGGAGATCCTGACCAAG R: CGTCTGCCTCATATCCCTGA	210
<i>EF-1β</i>	F: ATGGCTATCTCCTTCACAA R: GTTACAGCGGCATAAACT	131
<i>CYP</i>	F: CTGGCGGTGAGTCTATTT R: CTGTGACCCATTCGTGTT	116
<i>RPL</i>	F: GCGTTCACCGCAAGCACA R: GGGACCAGTAACCAGAAGCAA	147

1.2.4 qRT-PCR 以及引物扩增效率检测 使用伯乐 CFX96 real-time PCR 定量分析仪和 Biosharp universal SYBR qPCR Master Mix (BL697A) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测。参照说明书配制反应体系：cDNA 模板 1 μL（以 cDNA 原液 5 倍稀释液为模板），上游引物 0.4 μL，下游引物 0.4 μL，2×universal SYBR green master mix 10 μL，ddH₂O 8.2 μL。参照说明书设置 2 步法 qRT-PCR 反应程序。

将毛叶芋兰的叶、叶柄、球茎的 cDNA 等量混匀成 1 份总 cDNA 模板，依次稀释 5⁰、5¹、5²、5³、5⁴ 倍共 5 个浓度梯度，进行 qRT-PCR 检测。使用 Excel 软件，以 5 个稀释倍数的对数为横坐标、其对应的 C_t 值为纵坐标进行线性拟合，得到标准曲线及其斜率（K），利用公式 $E=(10^{-1/K}-1) \times 100\%$ 计算^[12]，得到各内参引物的扩增效率（E）。

1.2.5 内参基因的 qRT-PCR 及其数据分析 以毛叶芋兰各样品 cDNA 的 5 倍稀释液为模板，对各候选内参基因进行 qRT-PCR 检测，反应体系和程序同 1.2.4，每个样品进行 3 次技术重复。

首先对各候选内参基因的表达水平进行分析，将每组 qRT-PCR 获得的各部位所有 C_t 值绘制成箱线图。稳定性分析是使用 ΔC_t 法对原始数据进行计算，同时将原始数据输入到 BestKeeper 软件进行分析。各内参基因的相对表达量通过 2^{-ΔΔC_t} 法计算获得，将数据转化后，再分别输入到 geNorm 和 NormFinder 软件进行分析，最后使用 RefFinder

在线程序对所有结果进行综合评估，筛选出在毛叶芋兰不同组织中表达最稳定的内参基因。

1.2.6 内参基因稳定性验证 通过综合评估筛选的最优的 2 个基因被选作为内参基因。利用 qRT-PCR 检测毛叶芋兰叶片与球茎中（转录组未测叶柄）花青素代谢途径关键酶基因 *NpDFR*、*Np3GT* 的表达情况，结合转录组数据，验证这 2 个最优内参基因的表达稳定性。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测

使用超微量分光光度计（型号：Nanodrop Lite）检测提取获得的 RNA 的浓度和纯度，各样品浓度为 69.0~133.7 ng/μL，A₂₆₀/A₂₈₀ 值均在 2.0~2.2 范围，说明其纯度较好，电泳检测均具有 28S RNA、18S RNA 2 个条带，且未出现弥散现象，满足后续试验的要求。

2.2 内参基因引物特异性检测及扩增效率分析

按照 1.2.2 方法，从毛叶芋兰转录组数据库中筛选出 9 个候选内参基因 *Actin*、*GAPDH*、*TUA*、*UBC*、*UBQ*、*EF-1α*、*EF-1β*、*CYP*、*RPL*，其普通 PCR 产物经电泳检测，结果显示清晰单一的条带，各内参基因扩增出 116~291 bp 符合预期大小的特异性片段（图 1），表明设计的引物可用于后续 qRT-PCR 分析。

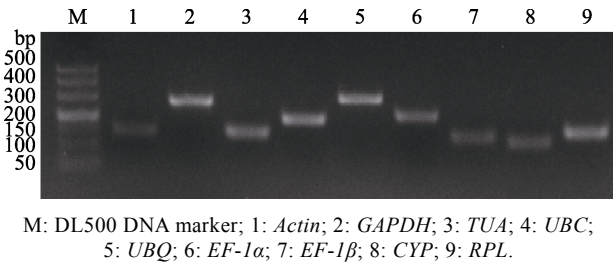
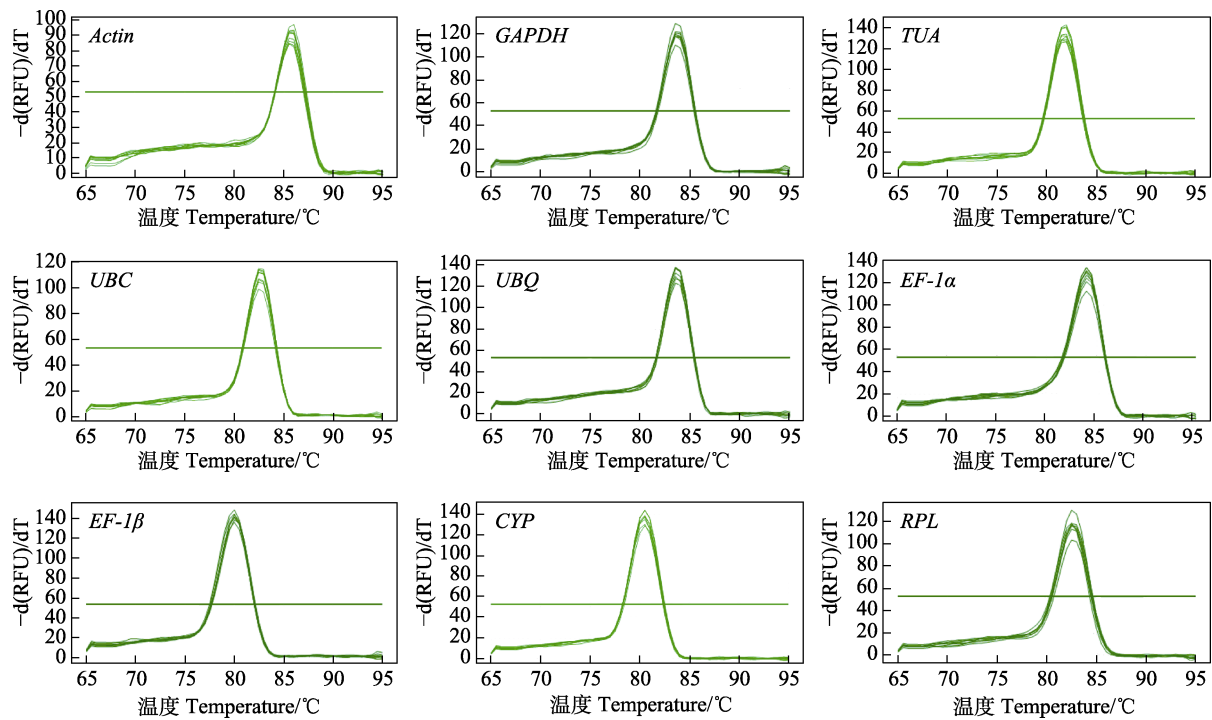


图 1 9 个候选内参基因普通 PCR 产物电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplification products of nine candidate reference genes

进一步验证所设计引物的特异性并分析其扩增效率，9 个候选内参基因的熔解曲线均呈现出清晰的单一峰值特征，说明无引物二聚体形成或非特异性扩增，熔解曲线的 T_m 值均在 80~85 ℃ 之间（图 2）；按 1.2.4 方法在 Excel 中计算得到标准曲线的相关系数（R²）介于 0.9906~0.9969 之间，线性关系良好，扩增效率（E）介于 91.21%~120.60% 之间（表 2），9 个内参基因的引物均符合后续分析要求。



–d(RFU)/dT 表示温度每变化 1 °C 荧光强度的变化值。
–d(RFU)/dT indicates the change in fluorescence intensity for every 1 °C change in temperature.

图 2 9 个候选内参基因熔解曲线

Fig. 2 Melting curves of nine candidate reference genes

表 2 9 个候选内参基因扩增效率

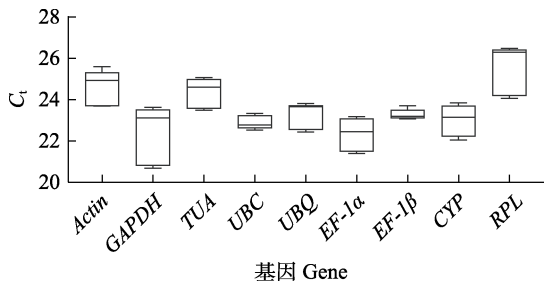
Tab. 2 Amplification efficiency of nine candidate reference genes

基因 Gene	扩增效率 <i>E</i> /%	斜率 <i>K</i>	相关系数 <i>R</i> ²
<i>Actin</i>	120.60	–2.9071	0.9949
<i>GAPDH</i>	100.10	–3.3192	0.9932
<i>TUA</i>	99.58	–3.3320	0.9959
<i>UBC</i>	93.72	–3.4823	0.9944
<i>UBQ</i>	91.36	–3.5481	0.9906
<i>EF-1α</i>	99.64	–3.3306	0.9908
<i>EF-1β</i>	91.96	–3.5309	0.9917
<i>CYP</i>	91.21	–3.5524	0.9932
<i>RPL</i>	97.49	–3.3836	0.9969

2.3 内参基因的表达水平分析

C_t 值代表内参基因的表达水平，基因的 C_t 值若较低，则通常指示其具有较高的表达水平，反之则表达水平较低。毛叶芋兰的 3 个组织部位中 9 个候选内参基因的 C_t 值范围为 20.686~26.470，其中平均 C_t 值最大与最小的基因分别是 *RPL*（25.631）和 *EF-1α*（22.342），说明 *RPL* 表达丰度最低，*EF-1α* 最高。9 个候选内参基因在表达丰度上的排序为：*EF-1α*>*GAPDH*>*UBC*>*CYP*>*UBQ*>*EF-1β*>*TUA*>*Actin*>*RPL*。

C_t 值的波动反映稳定性，波动越小表示基因表达越稳定。将 C_t 值绘制成箱线图，以初步评估各候选内参基因表达水平的离散程度。其中 *GAPDH* 的箱线最长，说明其表达丰度变异性最大，稳定性最差，而 *EF-1β* 箱线最短，其 C_t 值为 23.072~23.710，波动小（图 3）。从表达丰度来看 *EF-1β* 基因可能是毛叶芋兰不同组织中较为稳定的内参基因。



箱体中的横线表示中位数，箱体的上、下边线分别表示第三四分位数、第一四分位数，箱体上、下方横线分别表示上限、下限。

The line inside the box indicates median, the upper and lower edges of the box indicate the third quartile and the first quartiles respectively, and the horizontal line above and below the box indicates the maximum and minimum limits respectively.

图 3 9 个候选内参基因 C_t 值分布

Fig. 3 C_t values distribution of nine candidate reference genes

2.4 内参基因稳定性分析

2.4.1 ΔC_t 法分析 将候选内参基因两两配对，计算对应的各样本中配对的 2 个内参基因的 ΔC_t 值（图 4），再算出配对的 2 个内参基因于所有样本间 ΔC_t 值的标准偏差（standard deviation, SD），最后分别得到 9 个候选内参基因 ΔC_t 值的平均标准偏差（SD mean）。

将 *TUA* 和 *CYP* 分别与其他 8 个基因进行比较

时，它们与较小偏离量相关（SD mean 分别为 0.359 和 0.363），因此这 2 个基因的变异性较小。但将 *GAPDH* 和 *EF-1 β* 分别与其他 8 个基因进行比较时，偏差（SD mean 分别为 0.725 和 0.744）明显增加，表明其变异大。*EF-1 α* 、*Actin*、*UBQ*、*UBC* 和 *RPL* 都显示出中等水平的偏差（SD mean 分别为 0.371、0.372、0.419、0.564 和 0.593）。SD mean 越小预示着基因越稳定，由此可见最稳定的

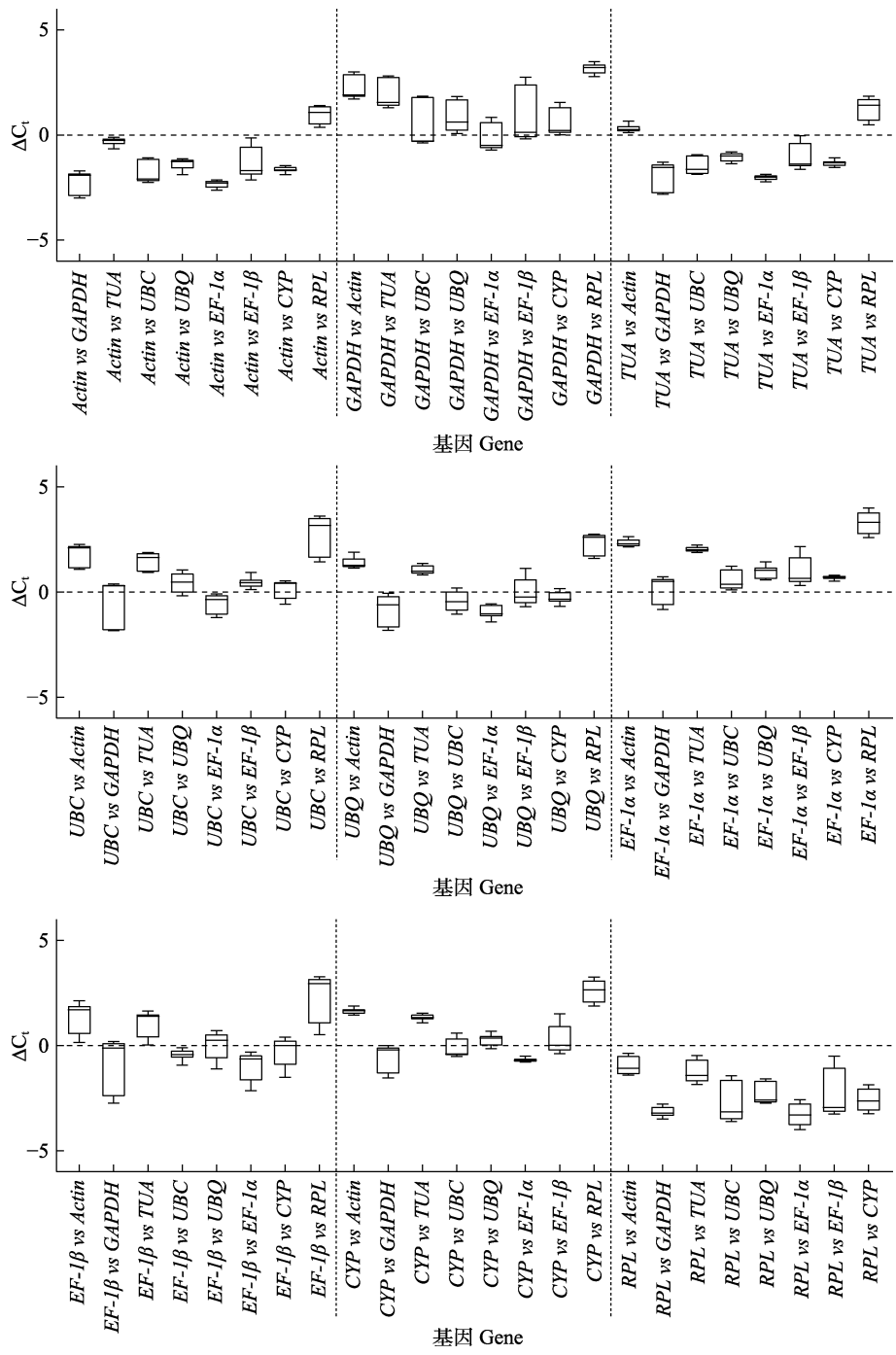


图 4 配对候选内参基因 ΔC_t 值分布
Fig. 4 ΔC_t values distribution of paired candidate reference genes

基因为 *TUA*, 最不稳定的基因为 *EF-1 β* 。

2.4.2 geNorm 分析 结果显示 9 个候选内参基因表达稳定 *M* 值均在 1.5 以下, 说明它们的稳定性均较好, 9 个候选基因都可以用作毛叶芋兰的内参基因 (图 5)。9 个候选内参基因的稳定性由 geNorm 软件分析排序依次为 *EF-1 α* =*CYP* (0.092) > *TUA* (0.120) > *Actin* (0.141) > *UBQ* (0.189) > *UBC* (0.279) > *RPL* (0.360) > *GAPDH* (0.432) > *EF-1 β* (0.501)。

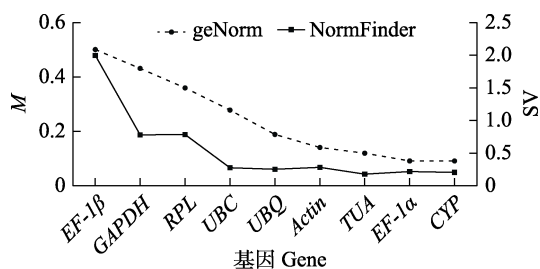


图 5 geNorm 与 NormFinder 软件分别计算 9 个候选内参基因表达 *M* 值与 SV

Fig. 5 Average expression stability *M* and stability values of nine candidate reference genes analyzed by geNorm and NormFinder respectively

geNorm 软件对输入的数据进行二次自动分析, 分析内参基因平均稳定性的变化水平, 通过计算配对变异值 (V_n/V_{n+1}) 来预测最佳内参基因的个数。在本研究中, 配对变异分析结果显示 (图 6), 所有配对变异值均小于 0.15, 即从图中最稳定的 2 个基因 (最左边) 开始, $V_2/V_3 < 0.15$, 表明在毛叶芋兰各组织样品中使用 2 个内参基因可以达到理想的校正效果, 综合第一次分析结果, geNorm 软件的结论是可选择 *EF-1 α* 和 *CYP* 2 个基因作为毛叶芋兰的内参基因。

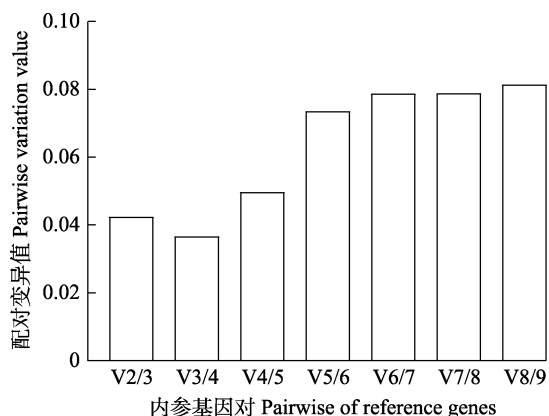


图 6 geNorm 软件计算配对变异值

Fig. 6 Pairwise variation values calculated by geNorm

2.4.3 NormFinder 分析 NormFinder 软件的分析与 geNorm 相似, 其分析所得结果稳定值 (stability value, SV) 越低的候选基因, 则表示拥有更高的内参基因稳定性。

在该软件分析中, 候选内参基因稳定性依次为 *TUA* (0.181) > *CYP* (0.208) > *EF-1 α* (0.220) > *UBQ* (0.255) > *UBC* (0.278) > *Actin* (0.285) > *GAPDH* (0.762) > *RPL* (0.786) > *EF-1 β* (1.999), 与 geNorm 软件分析的结果排名趋势相似 (图 5)。其中 *TUA*、*CYP*、*EF-1 α* 的 SV 最小, 说明这 3 个基因稳定性最高, *TUA* 被 NormFinder 软件选为最优内参基因。

2.4.4 Bestkeeper 分析 BestKeeper 通过计算 CV 与 SD, 来反映内参基因的稳定性。当 CV 与 SD 的值都较低时, 则说明该基因具有更高的稳定性。其中 SD 的默认阈值为 1.0, 当 SD 低于 1.0 时则认为该基因表达稳定。分析结果显示, 在毛叶芋兰不同组织中, *GAPDH* 的 SD (1.14) 高于默认阈值, 提示不宜作为此物种的内参基因, 其余 8 个基因的 SD 均小于默认阈值, 说明它们的表达也均较为稳定; 其中 *EF-1 β* 的 CV 与 SD 都最低, 稳定性最好 (图 7)。

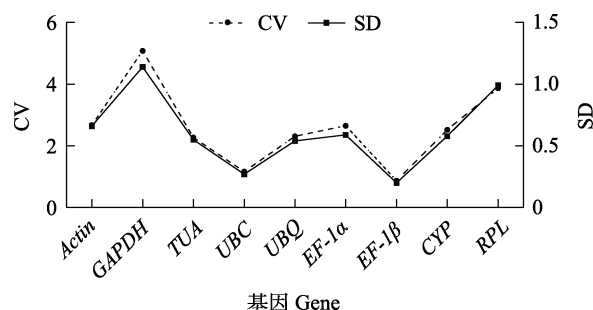


图 7 BestKeeper 软件计算 9 个候选内参基因 CV 与 SD

Fig. 7 CV and SD of nine candidate reference genes calculated by BestKeeper

2.4.5 RefFinder 分析 使用 RefFinder 在线分析网站进行综合评估。结果显示 (图 8), 各内参基因在不同组织中的表达稳定性综合排序由高到低依次为 *EF-1 α* 、*CYP*、*TUA*、*UBQ*、*UBC*、*Actin*、*EF-1 β* 、*RPL*、*GAPDH*。其中 *EF-1 α* 和 *CYP* 的表达稳定性相近, 整体稳定性最好, 适合作为毛叶芋兰的内参基因; 而稳定性最差的是 *GAPDH*, 提示该基因不适合作为毛叶芋兰荧光定量 PCR 的内参基因。

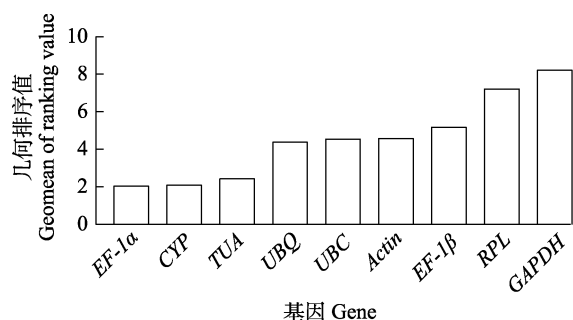


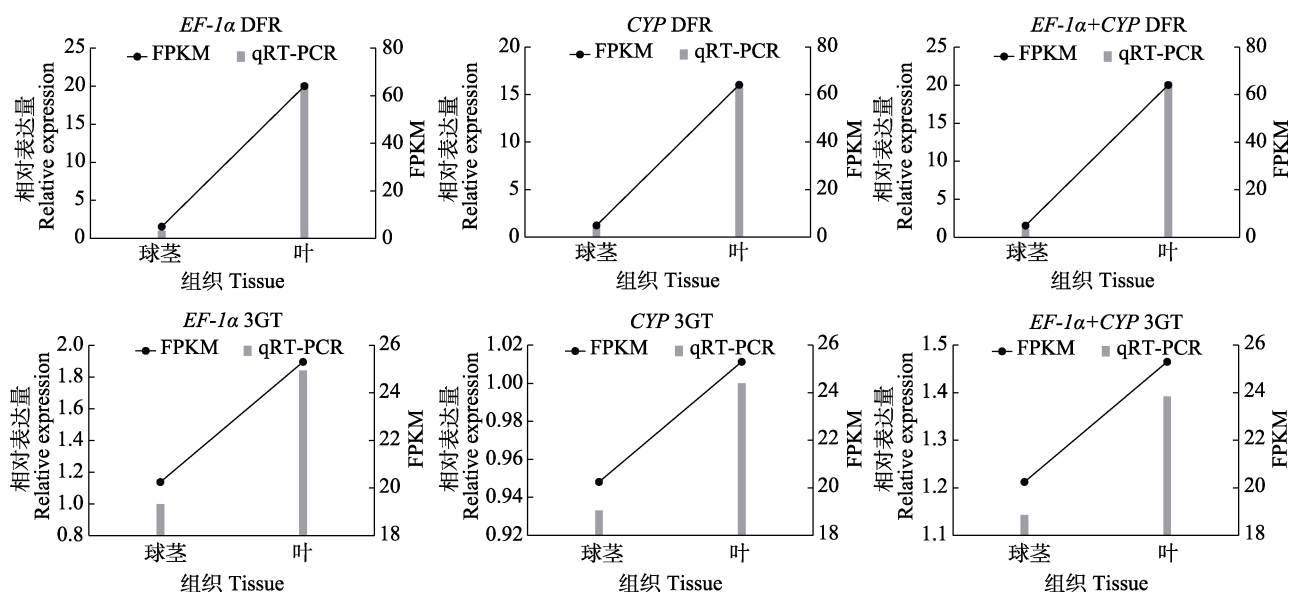
图 8 RefFinder 程序综合分析

Fig. 8 Comprehensive analysis by RefFinder

2.5 内参基因稳定性验证

单独使用和组合使用综合排名最靠前的 2 个

内参基因 *EF-1α* 和 *CYP*, 对毛叶芋兰的叶片和球茎 2 个组织部位中花青素代谢途径关键基因 *NpDFR*、*Np3GT* 的表达差异进行分析, 并与转录组数据进行比较, 验证所选的这 2 个内参基因的稳定性。结果显示, 单独或者组合使用 *EF-1α* 和 *CYP* 作为内参基因时, 同一目的基因在不同器官中的表达情况相同, 即 2 个目的基因在毛叶芋兰叶片中的相对表达均高于在球茎中的表达, 这与转录组所测得的这 2 个目的基因在 2 个器官中 FPKM 值的大小是一致的 (图 9)。说明单独或者组合使用 *EF-1α* 和 *CYP* 作为 qRT-PCR 的内参基因都能够较准确得出毛叶芋兰各部位中各基因的相对表达量。

图 9 毛叶芋兰不同内参基因对 *NpDFR*、*Np3GT* 基因在叶片、球茎中表达水平验证Fig. 9 Relative expression levels of *NpDFR* and *Np3GT* normalized by different reference genes in *N. plicata*

3 讨论

合适的内参基因对于分析目标基因表达情况的准确性和可靠性非常重要。*β-tubulin* 可作为毛唇芋兰 (*Nervilia plicata*) qRT-PCR 的校正内参基因^[13]。适于铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 不同组织的内参基因为 *EF-1α* 或 18S rRNA^[14], 其中前者在铁皮石斛叶色突变体中被验证为稳定且可靠^[15]; 而在其原球茎时期的所有样本中, 传统的管家基因表达稳定性均较差, 研究筛选得到的内参基因组合不是常用的管家基因, 而是 *ASS+APHIL*^[15-16]; 蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 中可以选用 *ACT*、*UBQ3* 或 *GAPDH* 作为其所有时期所有器官的内参基因使用, 但单独分析某器官或者某生长期的目标基因表达情况时, 采用其中 2

个内参基因进行归一化处理能得到更为准确的数据^[17]; 蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.) 的整个发育阶段各组织的最适内参基因是 *ACT*^[18], 而低温胁迫条件下, *PhPP2Aa* 基因最适合作为目的基因转录水平研究的内参基因^[19]。内参基因的稳定性因物种及其组织部位、生长发育阶段和胁迫条件的不同而有所变化, 因此应该为研究的特定的物种或新的试验条件选择最稳定的参考基因^[20]。

球茎是毛叶芋兰的繁殖器官, 其主要为圆球或椭圆形, 球茎上长有细弱的匍匐茎或根状茎, 每个球茎上每年只长 1~2 片叶, 极少见开花。且芋兰属植物即便开花也多为先开花, 花落后才长出叶子, 仅有个别物种可以同时见到花和叶子^[21]。本研究所种植的毛叶芋兰均未能观察到开花者,

且植物材料个体少而小、根和根茎细小,也无法获得足够质量的根和根茎,故选取叶片、叶柄和球茎作为研究材料。前期研究发现 β -tubulin (*TUB*) 可用作近源物种毛茛芋兰的 qRT-PCR 研究中的内参基因^[13],但本研究前期发现该基因在毛茛芋兰中表达水平较低(以 5^1 倍总 cDNA 稀释液作为模板时 C_t 值最小值为 27.820),制作标准曲线试验中以 5^3 倍总 cDNA 稀释液作为模板时已无法检测到相应 C_t 值,因此未选择该内参基因进行后续分析。

经稳定性分析,发现 Bestkeeper 筛选出排行第一位的基因为 *EF-1 β* ,而使用其他 3 种方法所得结果中 *EF-1 β* 排在最后一位,Bestkeeper 与其他分析方法所得结果不一样的情况在其他植物的内参基因筛选研究中也报道过^[22-23]。不同软件的统计学算法不同,结果亦不同:Bestkeeper 是将测得的所有 C_t 值直接输入软件中,计算目的基因的组内差异,比较不同基因的 CV 与 SD 并进行稳定性排序,稳定性与其在各样品中 C_t 值的离散程度密切相关, C_t 值的变化范围越小,则基因的稳定性通常越高。 ΔC_t 法也是对原始数据直接计算,比较每个样本中“成对基因”的相对表达量,若 ΔC_t 有波动,说明其中 1 个或 2 个基因都是可变的,可引入更多的基因继续比较,综合比较哪个基因的变异性更小^[24]。从图 4 可见若引入 *EF-1 β* ,其他与之匹配的组合 ΔC_t 值的波动幅度增大。geNorm 和 NormFinder 与前 2 个方法不同的是,首先都要将 C_t 值转化成相对定量数据,再输入到各软件自动寻找各候选基因在不同样本中的最高 C_t 值,再将所有测得的各基因的 C_t 值减去所找到的最高 C_t 值,最后计算表达水平比率,结合组内和组间的差异进行分析。可见对所有软件得出的结果需要进行综合评估,结合并验证,才能筛选到最适合的内参基因。

4 结论

本研究利用 qRT-PCR 技术,使用 ΔC_t 法初步分析,并结合 3 种常用软件 geNorm、NormFinder、Bestkeeper 与 RefFinder 程序,综合评估能用于标准化 qRT-PCR 数据的 9 个候选内参基因(*Actin*、*GAPDH*、*TUA*、*UBC*、*UBQ*、*EF-1 α* 、*EF-1 β* 、*CYP*、*RPL*) 在毛茛芋兰不同组织部位的稳定性,结果表明 9 个内参基因综合排序为 *EF-1 α* >*CYP*>

TUA>*UBQ*>*UBC*>*Actin*>*EF-1 β* >*RPL*>*GAPDH*。其中单独或联合使用 *EF-1 α* 和 *CYP* 作为内参基因,*NpDFR* 与 *Np3GT* 在不同组织的表达情况与转录组测序结果基本一致。*EF-1 α* 和 *CYP* 皆可作为毛茛芋兰 qRT-PCR 的内参基因,用于不同组织间基因表达的差异性分析试验。

参考文献

- [1] CHEN Z, HALFORD N G, LIU C. Real-time quantitative PCR: primer design, reference gene selection, calculations and statistics[J]. *Metabolites*, 2023, 13(7): 806.
- [2] TAYLOR S C, NADEAU K, ABBASI M, LACHANCE C, NGUYEN M, FENRICH J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(7): 761-774.
- [3] ARTIKA I M, DEWI Y P, NAINGGOLAN I M, SIREGAR J E, ANTONJAYA U. Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis[J]. *Genes*, 2022, 13(12): 2387.
- [4] ZHANG P L, CHEN S Y, CHEN S Y, ZHU Y M, LIN Y Q, XU X Y, LIU Z J, ZOU S Q. Selection and validation of qRT-PCR internal reference genes to study flower color formation in *Camellia impressinervis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 3029.
- [5] KOZERA B, RAPACZ M. Reference genes in real-time PCR[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2013, 54(4): 391-406.
- [6] CHEN C B, WU J Y, HUA Q Z, TEL-ZUR N, XIE F F, ZHANG Z K, CHEN J Y, ZHANG R, HU G B, ZHAO J T, QIN Y H. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya[J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 1-12.
- [7] HELLEMANS J, VANDESOMPELE J. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis[J]. *Methods and Protocols*, 2014, 1160: 19-26.
- [8] DE SPIEGELAERE W, DERN-WIELOCH J, WEIGEL R, SCHUMACHER V, SCHORLE H, NETTERSHEIM D, BERGMANN M, BREHM R, KLIESCH S, VANDEKERCKHOVE L, FINK C. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122515.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第十八卷, 被子植物门 单子叶植物纲兰科 2[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 27-28.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China: Volume 18, Orchidaceae 2 in the class monocotyledons of the phylum angiosperms*[M]. Beijing: Science Press, 1999: 27-28. (in Chinese)

- [10] 刘主洁, 程银平, 林朝展, 祝晨蓁. 青天葵及其近缘种毛叶青天葵的 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J]. 中药材, 2015, 38(12): 2514-2517.
- LIU Z J, CHENG Y P, LIN Z Z, ZHU C C. HPLC fingerprints of *Nerviliae fordii* and *Nervilia plicata*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2015, 38(12): 2514-2517. (in Chinese)
- [11] 文和群, 许兆然, VILLA-LOBOS J, SKOG L E. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J]. 广西植物, 1993, 13(2): 110-127.
- WEN H Q, XU Z R, VILLA-LOBOS J, SKOG L E. A list of threatened limestone plants in south China[J]. Guihaia, 1993, 13(2): 110-127. (in Chinese)
- [12] 王浩, 蔡启忠, 刘露, 杨全, 周良云. 何首乌实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 80-85.
- WANG H, CAI Q Z, LIU L, YANG Q, ZHOU L Y. Reference gene screening for real-time quantitative PCR in *Polygonum multiflorum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(1): 80-85. (in Chinese)
- [13] 黄琼林, 梁凌玲, 何瑞, 詹若挺, 陈蔚文. 青天葵实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中草药, 2013, 44(14): 1979-1983.
- HUANG Q L, LIANG L L, HE R, ZHAN R T, CHEN W W. Selection of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Nervilia Fordii* Folium[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(14): 1979-1983. (in Chinese)
- [14] 张岗, 赵明明, 张大为, 郭顺星. 铁皮石斛实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1664-1668.
- ZHANG G, ZHAO M M, ZHANG D W, GUO S X. Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of *Dendrobium officinale*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48(19): 1664-1668. (in Chinese)
- [15] CAO H, LI H, LU L, JI Y L, MA L L, LI S C. Screening and validation of internal reference genes for quantitative real-time PCR analysis of leaf color mutants in *Dendrobium officinale*[J]. Genes, 2023, 14(5): 1112.
- [16] AN H Q, ZHU Q K, PEI W, FAN W, LIANG L, CUI Y H, LYU N, WANG W J. Whole-transcriptome selection and evaluation of internal reference genes for expression analysis in protocorm development of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0163478.
- [17] 田云芳. 蕙兰内参基因的筛选与 A 类花发育基因的表达特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- TIAN Y F. Study on selection of reference genes and A-class floral development gene expression pattern from *Cymbidium faberi*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [18] YUAN X Y, JIANG S H, WANG M F, MA J, ZHANG X Y, CUI B. Evaluation of internal control for gene expression in *Phalaenopsis* by quantitative real-time PCR[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(6): 1431-1445.
- [19] 梁芳, 许申平, 张燕, 王默霏, 崔波. 蝴蝶兰 *PhPP2Aa* 基因作为低温胁迫内参基因的研究[J]. 热带作物学报, 2022, 43(7): 1338-1346.
- LIANG F, XU S P, ZHANG Y, WANG M F, CUI B. *Phpp2Aa* as reference gene in *Phalaenopsis* under low-temperature stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(7): 1338-1346. (in Chinese)
- [20] MAROUFI A, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M. Validation of reference genes for gene ex-pression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR[J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11: 1-12.
- [21] GALE S W, LI J H, KINOSHITA A, YUKAWA T. Stuides in Asian *Nervilia* (Orchidaceae) V: *Nervilia futago*, a cryptic new species from southwest Japan confirmed by morphological, cytological, and molecular analyses[J]. Systematic Botany, 2015, 40(2): 413-425.
- [22] 章杨婷, 张燕萍, 黄静妍, 王文君, 童妍, 赵凯, 周育真. 一心维纳斯蝴蝶兰花香物质合成相关基因 RT-qPCR 内参基因筛选[J]. 热带作物学报, 2023, 44(11): 2188-2195.
- ZHANG Y T, ZHANG Y P, HUANG J Y, WANG W J, TONG Y, ZHAO K, ZHOU Y Z. Selection of suitable RT-qPCR reference genes for floral scent biosynthesis in *Phalaenopsis* I-Hsin Venus[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(11): 2188-2195. (in Chinese)
- [23] 曹映辉, 郑燕, 张燕萍, 胡美娟, 童妍, 朱尾银, 徐建球, 赵凯, 彭东辉, 周育真. 建兰花香物质合成相关基因 RT-qPCR 内参基因筛选[J]. 分子植物育种, 2023, 21(10): 3282-3289.
- CAO Y H, ZHENG Y, ZHANG Y P, HU M J, TONG Y, ZHU W Y, XU J Q, ZHAO K, PENG D H, ZHOU Y Z. Selection of suitable RT-qPCR reference genes for floral scent biosynthesis in *Cymbidium ensifolium*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(10): 3282-3289. (in Chinese)
- [24] SILVER N, BEST S, JIANG J, THEIN S L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR[J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 1-9.