

· 技术方法 ·

## 黄梁木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择

张登, 李景剑, 张梦洁, 包钰韬, 杨霄, 徐武云, 欧阳昆唏, 陈晓阳\*

华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642

**摘要** 为筛选黄梁木(*Neolamarckia cadamba*)实时定量PCR最佳内参基因, 该研究以黄梁木的根、芽、叶、花、果、皮及形成层为材料, 利用RT-qPCR技术对ACT、CAC、CYP和EF1 $\alpha$ 等21个管家基因家族43个候选内参基因进行表达量分析, 并利用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件进行内参基因稳定性分析。geNorm的分析结果显示, UPL基因的稳定性最高(M=0.443), UBQ基因的稳定性最低(M=2.859); NormFinder的分析结果显示, UPL基因的稳定性最高(E=0.223), UBQ基因的稳定性最低(M=4.759); BestKeeper分析显示, UPL基因的标准偏差(SD=0.513)最低。研究结果表明, UPL基因作为内参基因稳定性最高, UBQ基因的稳定性最低。因此可以选择UPL基因作为黄梁木不同组织中RT-qPCR定量分析的内参基因。

**关键词** 黄梁木, 实时荧光定量PCR, 内参基因

张登, 李景剑, 张梦洁, 包钰韬, 杨霄, 徐武云, 欧阳昆唏, 陈晓阳 (2018). 黄梁木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报 53, 829–839.

实时荧光定量PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)因具有重复性好、灵敏度高、定量准确以及反应速度快等优点, 已成为RNA靶标检测和定量的标准, 是确定基因表达水平的最常用方法(Gibson et al., 1996; Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Die et al., 2016)。利用RT-qPCR分析基因的相对表达量时, 通常需要引入1个表达较为稳定的管家基因(house-keeping gene)作为内参基因(reference gene), 以消除不同组织细胞间初始模板量、RNA质量及酶促反应效率等的偏差(Vandesompele et al., 2002; 吴文凯等, 2009; Martins et al., 2017)。传统上, 包括18S核糖体RNA (18S RNA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、延伸因子(EF)、泛素结合酶(UBCE)、 $\alpha$ 微管蛋白(Tub- $\alpha$ )和 $\beta$ 微管蛋白(Tub- $\beta$ )的管家基因, 它们被广泛用作RT-qPCR数据标准化的内源对照, 但是在所有实验条件下均稳定表达的参考基因不可能存在(Thellin et al., 1999; Vandesompele et al., 2002; Zhou et al., 2006)。因此, 为了得到更可靠的实验结果, 研究过程中需要选择较为合适的1个或多个内参基因进行校正(孙美莲等, 2010; 姜琼等, 2015)。

黄梁木(*Neolamarckia cadamba*), 又名团花树, 隶属茜草科(Rubiaceae)团花属, 常绿大乔木, 广泛分布于南亚和华南地区(Li et al., 2017)。由于黄梁木生长十分迅速, 在1972年的第7届世界林业大会上, 被各国专家誉为“奇迹树”。该树种材质好, 是胶合板和面板的理想原料, 亦可作为纤维板和制浆造纸原料(邓小梅等, 2011)。此外, 黄梁木中含有丰富的次生代谢产物, 如酚类化合物、黄酮类化合物和生物碱(Chandel et al., 2016; Pandey and Negi, 2018), 具有治疗眼睛感染、皮肤疾病、消化不良、牙龈出血、口腔炎、咳嗽、发烧、贫血和胃痛等一系列药理功能(Pandey and Negi, 2016)。由于黄梁木重要的经济价值和社会价值, 对其开展的分子生物学研究越来越多(Ho et al., 2014; Ouyang et al., 2014; Zhao et al., 2014; Li et al., 2017)。但目前关于黄梁木内参基因的选择却未见报道, 这将严重影响基于定量PCR分析基因表达的准确性。本研究以黄梁木不同组织(根、芽、叶、花、果、皮及形成层)为材料, 利用RT-qPCR技术对肌动蛋白(ACT)、网格蛋白连接复合物介质(CAC)、亲环素(CYP)、延伸因子1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ )、真核起始因子(eIF)、焦磷酸法尼酯合成酶1 (FPS1)、F-盒基

收稿日期: 2018-01-03; 接受日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(No.31600525)和广东省科技计划(No.2017B020201008)

\* 通讯作者。E-mail: xychen@scau.edu.cn

重复蛋白(FBK)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、GTP结合核蛋白(RAN)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶相关激酶1(PEPCK1)、蛋白磷酸酶2A(PP2A)、核糖体蛋白L(RPL)、核糖体蛋白S(RPS)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBP)、S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)、翻译延伸因子(TEF)、 $\alpha$ 微管蛋白(Tub- $\alpha$ )、 $\beta$ 微管蛋白(Tub- $\beta$ )、泛素结合酶(UBCE)、泛素(UBQ)和泛素蛋白连接酶(UPL) 21个家族43个候选内参基因的表达量进行分析,并利用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件进行内参基因稳定性分析,旨在找出适合黄梁木不同组织中稳定表达的内参基因,为后续黄梁木中重要基因的表达分析提供可靠内参。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

本研究以黄梁木(*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser)的根、芽、叶、花、果、皮及形成层为材料。每个样品设3次生物学重复。样品采集后放入液氮速冻,置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

### 1.2 总RNA的提取

结合十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和植物RNA试剂盒(Omega, Cat No.R6827-01)来提取黄梁木总RNA(Ouyang et al., 2014)。操作步骤如下:取适量材料于液氮中研磨成粉末,然后转移到不含RNA酶的1.5 mL离心管中,加入600  $\mu\text{L}$ 预热的CTAB和10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -巯基乙醇,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10分钟,中间进行颠倒混匀。将等体积的氯仿/异戊醇(24:1, v:v)加入匀浆中,然后震荡使其完全混合。4 $^{\circ}\text{C}$  16 260  $\times g$ 离心10分钟,将上清液转移到新管中,重复上述步骤。将上清液与等体积试剂盒中的RB缓冲液混匀;加入等体积的无水乙醇,其余步骤按试剂盒说明书操作。最后用40  $\mu\text{L}$ 的DEPC水洗脱RNA, $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.3 cDNA合成和普通PCR扩增

根据PrimeScript TM RT Master Mix试剂盒(Takara, Cat No.RR047A)说明书,将总RNA (0.5  $\mu\text{g}$ )反转录为第1链cDNA。将单链cDNA稀释15倍进行常规PCR扩增,用2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。常规PCR总体积25  $\mu\text{L}$ 的反应体系如下:12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Es

Taq Master Mix, 1  $\mu\text{L}$ 引物F (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$ 引物R (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 8.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 3分钟;94 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,58 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 15秒,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10分钟。10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 1.4 内参基因的荧光定量PCR分析

RT-qPCR在罗氏(Roche) LC480定量PCR仪上进行。每个样品3次技术重复,并取平均值计算分析,以ddH<sub>2</sub>O代替模板作为实验的空白对照。荧光定量PCR总体积20  $\mu\text{L}$ 的反应体系如下:10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II, 1  $\mu\text{L}$ 引物F (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$ 引物R (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 6  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30秒;95 $^{\circ}\text{C}$ 5秒,56 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 30秒,40个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 2分钟。进行56–95 $^{\circ}\text{C}$ 的熔解曲线分析。40 $^{\circ}\text{C}$ 冷却30秒。

### 1.5 数据处理和分析

利用软件geNorm (Vandesompele et al., 2002)、NormFinder (Andersen et al., 2004)和BestKeeper (Pfaffl et al., 2004)综合分析候选内参基因在不同实验条件下的表达稳定性。以3次生物学重复的平均CT (Cycle Threshold)值作为每个基因在各样品中的表达水平,在此基础上进行3种软件分析前的数据转换。对于某个基因,先找到该基因在所有样品中最小的CT值(表达量最高),表达水平设为1;再用其它样品的CT值减去最低CT值,从而得到 $\Delta\text{CT}$ 值,则该基因在该样品的表达水平即为 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 。用经此换算后的数据进行geNorm和NormFinder分析。通过geNorm和NormFinder程序计算出每个内参基因稳定性的M值,从而筛选出稳定性较好的内参基因。M值越小内参基因稳定性越好,反之,则稳定性越差。此外,geNorm还给出确定所需最适内参基因的数目。对经geNorm和NormFinder分析得到的稳定性好的前9个基因进行BestKeeper分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RNA样品质量检测

将提取的各组织样品总RNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果(图1)显示,28S和18S RNA条带无拖尾现象,表明RNA样品没有降解。使用分光光度计

(NanoDrop 1000, USA)检测的结果(表1)显示,各样品  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8–2.2 之间,  $A_{260}/A_{230}$  在 1.84–2.22 之间,表明RNA的纯度高,没有多酚和多糖的污染,能满足后续实验的要求。

## 2.2 PCR引物设计、合成和检测

将拟南芥管家基因序列与已有的黄梁木转录组数据 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA232-616>) (Ouyang et al., 2016)以E值为  $10^{-5}$  进行TBlastn 比对,查找管家基因,并在NCBI数据库中通过BlastX进行核实。根据定量PCR引物设计原则,利用Premier 5.0软件,设计所有候选内参基因的定量PCR引物,引物序列见表2,由上海生工生物科技有限公司合成。以叶组织的cDNA为模板,通过常规PCR扩增各内参基因片段,经2%琼脂糖凝胶电泳检测(图2),片段大小与目的基因一致,并经测序确定序列正确。利用RT-qPCR进一步检测这些引物,其溶解曲线只有1个信号峰(附图1),说明RT-qPCR反应的特异性高,结果可靠。

## 2.3 候选内参基因的稳定性分析

### 2.3.1 7个组织中43个内参基因CT值分析

图3显示本研究中选取的43个候选内参基因在黄梁木7个不同组织中CT值的分布范围。内参基因的平均CT值为19.4–29.3。g7是该组中表达量最高的内参基因(平均CT=19.4),而g11是表达量最低的内参基因(平均CT=29.36)。表现最稳定的是g42,其CT值在27.84–29.90之间,且CT值的分布集中。表现最不稳定的是g41,其CT值在11.88–28.43之间,且CT值分布最分散。而一些常用的稳定内参基因(如UBQ及GAPDH)在黄梁木中的表现并不稳定。

### 2.3.2 geNorm分析

利用geNorm软件对43个候选基因在黄梁木7个不同组织中的表达水平进行分析(表3)。由表3可知,在43个候选内参基因中,g25和g42的M值(0.443)最低,稳定性最高。在43个候选内参基因中,共有16个候选内参基因的M值小于本软件的阈值1.5,都可以考虑将其作为内参基因。

此外,geNorm还通过计算新的内参基因引入后标准化因子的配对变异值( $V_{n/n+1}$ ),并根据此比值来

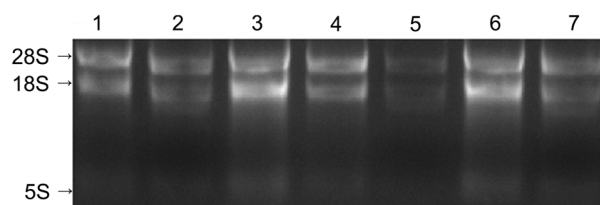


图1 黄梁木不同组织总RNA电泳检测

1: 皮; 2: 花; 3: 形成层; 4: 叶; 5: 根; 6: 芽; 7: 果

Figure 1 Electrophoresis of total RNA extracted from different tissues of *Neolamarckia cadamba*

1: Bark; 2: Flower; 3: Cambium; 4: Leaf; 5: Root; 6: Bud; 7: Fruit

表1 黄梁木不同组织总RNA的质量

Table 1 The quality of total RNA extracted from different tissues of *Neolamarckia cadamba*

Tissues	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	Yield ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )
Root	2.19	2.1	107.5
Bud	2.12	2.14	410.6
Leaf	2.13	1.96	258.5
Flower	2.19	2.22	114.8
Fruit	2.11	1.84	156.8
Bark	2.17	1.89	299.7
Cambium	2.14	2.11	331.8

确定内参基因的最佳数目。软件默认的 $V_{n/n+1}$ 值为0.15,如果比值小于0.15,表明n个内参基因已经稳定,能够满足相对定量的要求,否则需引入第n+1个内参基因。根据表3中分析的表达稳定值,考虑用作内参基因的16个候选基因( $M < 1.5$ )的配对差异值。如图4所示, $V_{2/3}$ 的比值为0.14,小于程序的阈值0.15,说明在黄梁木的不同组织中,2个内参基因组合的稳定性已能满足要求,不必引入第3个内参基因进行校正。最稳定的2个内参基因分别是g25和g42。

### 2.3.3 NormFinder分析

采用NormFinder软件对黄梁木不同组织中的43个候选内参基因进行分析(表4),结果表明,在不同组织中最稳定的基因是g42,与geNorm分析结果一致。且在NormFinder分析结果中,稳定性排在前10的基因与geNorm分析排在前10的基因有9个是一致的,分别是

表2 候选内参基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of the candidate reference genes

Name	UniGene ID	Reference gene (Rg) ID	F primer (5'-3') R primer (5'-3')	Amplicator length (bp)
Actin	comp52737_c0	g1	TGTAGTGGATGAATGCTTCTGTTAT CTTCCTCCTACCAACTTCAAATG	95
	comp79635_c0	g2	CTTCTGAGGTTATGGAGCAATCT CGATAAATCAAACCTTCAAGCC	101
Clathrin adaptor complexes medium	comp48976_c0	g3	CTCAGAGAACGCTGCTGACTAC GAGCCAAGGGAAACAAGATAA	161
Cyclophilin	comp67418_c0	g4	GGGGTCTCACGCTCTTTACT GGATTGGATTGGGTTGGTT	83
	comp75463_c0	g5	CCCCAGCAAGAAGACCACT TTGACCATGAATCCCAACCA	213
	comp77969_c0	g6	ATAGCATCCCAACCGAACA CCCTCTTGCCTCCTGTGTAT	187
Elongation factor 1 $\alpha$	comp87079_c1	g7	ACCAGCATCACCGTTCTTCA GTCCTCGATTGCCACACCT	123
	comp87526_c0	g8	AATCAGACAGAAACCCCTCAA GAACCTCTCAATCACACGCTT	245
Eukaryotic initiation factor	comp6386_c0	g9	GTTGAACTTCTTGGACATCG CTTGAGACACTGATTTGTATGAGA	250
Farnesyl pyrophosphate synthase 1	comp72548_c0	g10	TGATAATCTGGCTTCCACCTT TGGGAGGAACTCAATCTCCTAC	112
	comp75377_c0	g11	TATCAGGCTCAGCATTCCACT TTGCCACAATAACACATCCAT	212
F-boxkelch-repeat protein	comp78454_c0	g12	AAGGCCAATTCTGTTCAAGC CCTAGAGGGAAAGACATGACTG	143
	comp78817_c0	g13	GCAAACGGGGTAAAAGGA AAAGGGTAAGAGTGACGACAGC	102
GAPDH	comp78593_c0	g14	TGTTCCAAGTGGGCATTTAC CGCTCTGAGGTGTTAATAAGTG	247
	comp80828_c1	g15	CTGAGCATTTTTTAGGCTTGTG TCAGATTCATGTGGCAGTCG	151
GTP-binding nuclear protein	comp85262_c0	g16	TCTCGCAACCTGCCTCTT TATCACTCCCATCTTCGCAC	257
Phosphoenolpyruvate carboxylase-related kinase 1	comp75525_c0	g17	CGACCTCACATTCCTCATTAC ACATAGACCATCCAGAGCCCA	291
	comp80613_c0	g18	TACATAGACCATCCAGAGCCA GCAAAAGGGCAAGCAACAG	112
Protein phosphatase 2A	comp81334_c1	g19	GGGCTTTCATCCCATACC AGCCTTAGGGGGATTGGAA	128
	comp52412_c0	g20	ATGTTGGATGATATTAGTGGTGTG TCATAGGAAAATAGACCTCTGGTT	161
Ribosomal protein L	comp46755_c0	g21	CTGAGGATTGTTAGCAGTTGAC ACCAGAAAACAGACCACCTAAG	119
	comp52434_c0	g22	AAGGAAGGTAAAGCAGGGAA GCATGGGCAGGGATATAAAC	177
	comp87976_c0	g23	CACGCAGCATAGCCAAAC AGGCAGTTCTCTGATTCTTTG	157

表2 (续) Table 2 (continued)

Name	UniGene ID	Reference gene (Rg) ID	F primer (5'-3') R primer (5'-3')	Amplicator length (bp)
Ribosomal protein S	comp65909_c1	g24	GCTATGGTAGTCTCCCGAAAG GGGGGAACAAGACTAAGGGT	182
	comp67276_c0	g25	TTTTGTTTCCCCTCTTTGC AACCTTGAACAACCTGTGTAGAA	97
	comp71526_c0	g26	CGGTTACACAAGGTTGAATGA AGAGGGTCTGGATTTGAGTGA	117
Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	comp47386_c0	g27	CAGCACCGTAATCCATAAAAC CAAGCAGCCCAGCAAGTC	226
	comp88001_c0	g28	ACAGGATGGGTAGAAAGAGGC AGGATTGAGCCGAATACAACG	210
S-adenosylmethionine decarboxylase	comp44802_c0	g29	TCTTCGTGGCACTTCTCTCC ACAGGGTGTGACTTGTTTCC	133
	comp71874_c0	g30	ATAAGGTCTTCTTGTTCGTGTAG GACTGAACAGCAACAGGAATAAT	178
	comp80075_c0	g31	GCTGCCTGTGGGTCTCCTA GTAAACCCCAATGCTACTCCT	85
Translation elongation factor	comp65909_c1	g32	GCTATGGTAGTCTCCCGAAAG CTGGGGGAACAAGACTAAGG	184
	comp70791_c0	g33	TCAACCAACCGTTCCTACC ACAACAGTCCTTTGCCACC	195
Tubulin $\alpha$	comp70323_c2	g34	GGTGGTGGAAGTGGCTCTG GGCAAATGTCATAGATGGCTT	217
	comp76448_c4	g35	AAGGAGGGAATGAGTGGAG ACTATGGCAAGAAGTCAAAGC	107
Tubulin $\beta$	comp66056_c0	g36	GCAAGAAAGCCTTCCTCCTAA TTCCCAACAATGTCAAATCAA	153
	comp79707_c1	g37	TTCAGGAGAGTCAGCGAGC CATCGTCTTCATATCCCCTT	187
Ubiquitin conjugating enzyme	comp79182_c1	g38	TCCTTGCTTGTGGCGTCA CACGGGTGTCAAATCTGGC	213
Ubiquitin	comp67366_c0	g39	GACGGGAGGACCTTAGCA CTCGGAGACGGAGAACAA	298
	comp82561_c0	g40	GCATTTGTGTCTTGCTCTTTAT GCGATGAGCAACATTCCTTTA	186
	comp68357_c0	g41	TTTTTCAGCAAAGAACAACCG TGAAGACCCTCACTGGAAAGA	135
Ubiquitin-protein ligase	comp87122_c0	g42	GGTTGGTGGTAGAGTTGTGACTC CGAGCACTACCACGACACG	182
	comp87211_c0	g43	GCCCCCTCCGTAAACTCG GCCATACTCCCACCGAAAT	122

g1–g43分别代表43个候选内参基因。g1–g43 represent the 43 candidate reference genes, respectively.

g42、g15、g25、g43、g21、g33、g18、g8和g29。

### 2.3.4 BestKeeper分析

BestKeeper基于相关系数( $r$ )、标准偏差(SD)和变异系

数(CV)来评价内参基因的稳定性,即相关系数越大、标准偏差和变异系数越小,表明内参基因越稳定。由于BestKeeper同时最多只能分析10个基因的相互关系,我们选取经geNorm和NormFinder两个软件分析

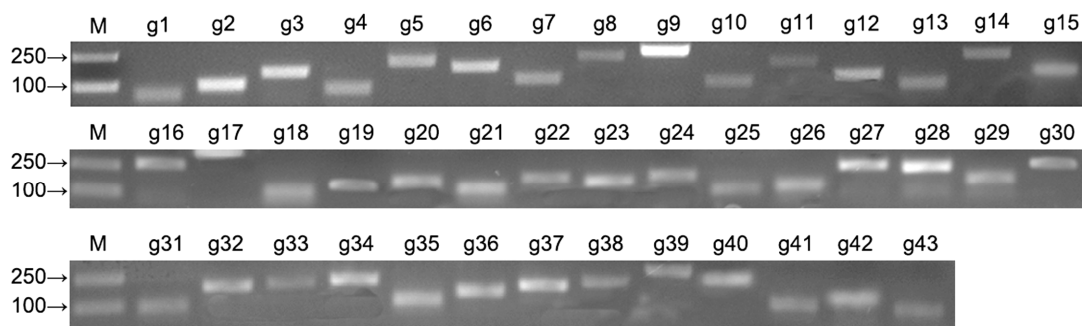


图2 黄梁木43个候选内参基因的常规PCR扩增产物

M: Marker; g1-g43同表2。

Figure 2 PCR products of 43 candidate reference genes in *Neolamarckia cadamba*

M: Marker; g1-g43 see Table 2.

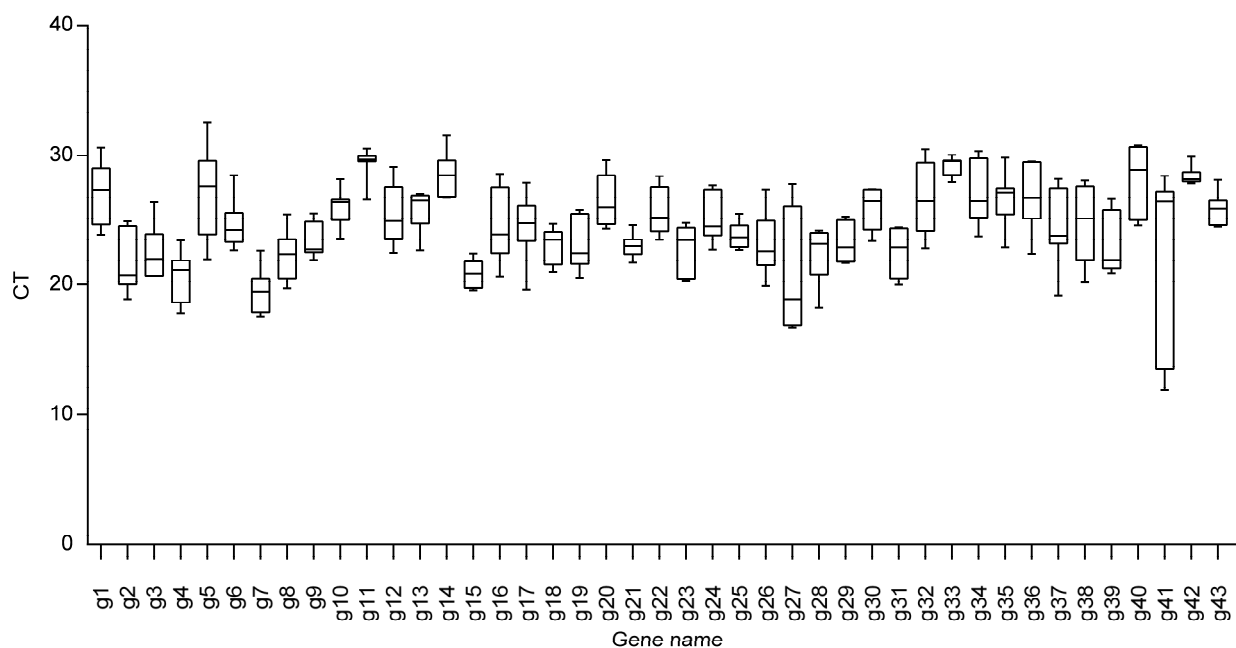


图3 候选内参基因在黄梁木7个组织中的CT值

g1-g43同表2。

Figure 3 CT values of the candidate reference genes in 7 tissues of *Neolamarckia cadamba*

g1-g43 see Table 2.

得到稳定性都排在前10的9个基因(g42、g15、g25、g43、g21、g33、g18、g8和g29)进行稳定性分析。从BestKeeper软件分析结果(表5)可知,这9个内参基因中,g42的标准偏差(SD=0.513)最小,相关系数( $r$ )和变异系数(CV)分别为0.851和1.804,表明g42的表

达稳定性最高。其次为g15和g25;g18、g8和g29这3个候选基因的标准偏差(SD)值均大于1,不适合用作内参基因。

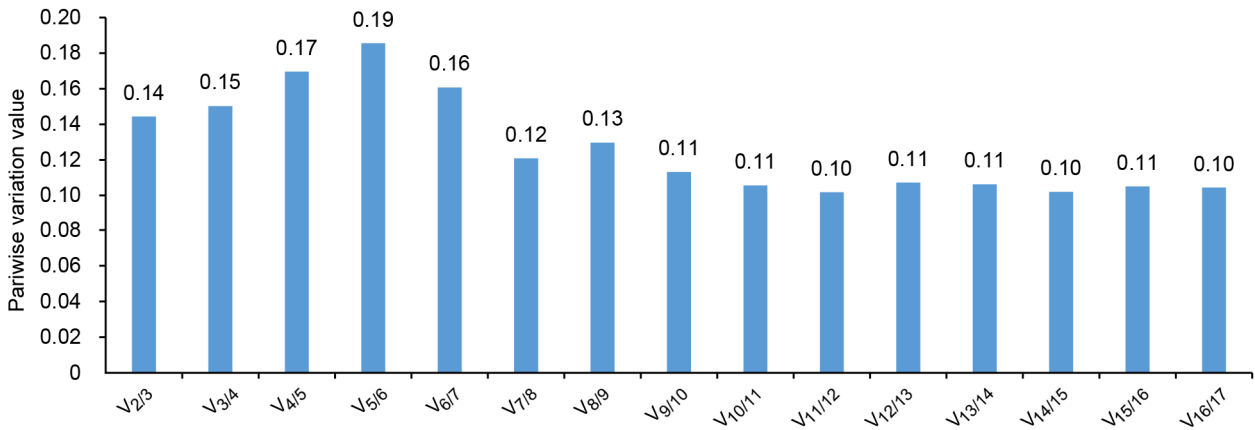
为了进一步评价候选内参基因的可靠性,我们对这3个软件的分析结果进行排序,选取经这3个软件

**表3** 用geNorm软件分析内参基因的稳定性

**Table 3** Analysis of expression stability of reference genes by geNorm

Rg ID	M	Rg ID	M	Rg ID	M	Rg ID	M	Rg ID	M
g25	0.443	g23	1.142	g36	1.649	g6	2.045	g40	2.365
g42	0.443	g31	1.183	g34	1.693	g4	2.080	g17	2.412
g21	0.471	g24	1.229	g28	1.737	g2	2.113	g16	2.458
g33	0.565	g13	1.287	g7	1.789	g32	2.148	g38	2.503
g15	0.704	g22	1.348	g12	1.836	g39	2.184	g5	2.566
g43	0.862	g14	1.404	g10	1.881	g19	2.217	g27	2.652
g29	0.966	g26	1.467	g11	1.927	g37	2.251	g41	2.859
g18	1.014	g9	1.533	g30	1.967	g1	2.285		
g8	1.090	g35	1.597	g3	2.007	g20	2.321		

g1-g43同表2。g1-g43 see Table 2.



**图4** geNorm软件分析内参基因的最佳数目

**Figure 4** Analysis of optional number of reference genes by geNorm

**表4** NormFinder分析内参基因表达的稳定性

**Table 4** Stability analysis of reference gene expression by NormFinder

Rg ID	Stability value	Rg ID	Stability value	Rg ID	Stability value	Rg ID	Stability value	Rg ID	Stability value
g42	0.223	g8	0.787	g28	1.249	g6	1.441	g40	1.937
g15	0.298	g23	0.871	g35	1.264	g4	1.460	g17	2.023
g25	0.343	g31	0.951	g10	1.316	g19	1.496	g38	2.062
g43	0.505	g9	1.007	g12	1.354	g2	1.518	g16	2.099
g21	0.517	g13	1.021	g36	1.371	g39	1.545	g5	2.350
g33	0.554	g22	1.108	g3	1.372	g32	1.574	g27	2.750
g18	0.567	g14	1.136	g34	1.384	g1	1.657	g41	4.759
g29	0.590	g7	1.141	g11	1.397	g37	1.709		
g24	0.724	g26	1.160	g30	1.411	g20	1.733		

g1-g43同表2。g1-g43 see Table 2.

**表5** BestKeeper分析内参基因表达的稳定性**Table 5** Stability analysis of reference gene expression by BestKeeper

Parameter	Genes								
	g42	g15	g25	g43	g21	g33	g18	g8	g29
SD±CP	0.513	0.736	0.840	0.966	0.692	0.610	1.153	1.477	1.280
CV (% CP)	1.804	3.530	3.522	3.745	3.008	2.091	5.015	6.600	5.474
coeff. of corr. ( <i>r</i> )	0.851	0.871	0.833	0.737	0.297	0.520	0.846	0.966	0.849
<i>p</i> -value	0.015	0.011	0.020	0.059	0.515	0.232	0.016	0.001	0.016

g42、g15、g25、g43、g21、g33、g18、g8和g29分别代表候选内参基因。

g42, g15, g25, g43, g21, g33, g18, g8 and g29 represent the candidate reference genes, respectively.

分析均适宜用作内参基因的6个基因进行排序, 根据这6个基因在各软件中的排名分别打分(1–6), 将3个软件的分数相加作为总分, 然后再根据总分的大小排序。结果(表6)显示, 其排序的结果与geNorm软件的基本一致, 且这3个软件分析结果排第1的基因均为g42, 表明g42在黄梁木中最适合作为内参基因。

## 2.4 内参基因稳定性验证

选用*NcEXPA8*基因来对筛选的稳定内参基因的准确性进行验证。本研究用geNorm筛选的内参基因(1个稳定表达的内参基因*UPL*, 2个稳定表达的内参基因组合*RPS+UPL*, 1个不稳定表达的内参基因*UBQ*)以及欧阳昆啼等(2013)在黄梁木中曾使用过的1个内参基因*CYC* (HQ832564)来定量*NcEXPA8*基因的表达(图5)。结果表明, *NcEXPA8*基因在形成层中的表达量最高。同时, 在使用1个或2个最稳定内参基因时, *NcEXPA8*基因在各组织间的表达趋势一致, 而使用*CYC*基因来定量时, 与最稳定内参基因定量结果存在较大差异(叶、花和果), 表明我们筛选的内参基因比之前在黄梁木中使用的内参基因稳定性好。在所有组织中, 当使用最不稳定的内参基因时, *NcEXPA8*基因的表达水平与使用最稳定内参基因时的定量结果都相差很大。

## 2.5 讨论

基因表达分析为理解生物学调控机制提供了重要手段, 但是质量数据的获取和再现, 以及数据确认和验证仍然具有挑战性(Liu and Slininger, 2007)。因此, 为了尽可能获得准确的数据, 在定量分析的每一个环节都需要注意, 尤其是在特定的实验条件下稳定表

**表6** 3种分析软件的总分排序**Table 6** The rank of total score by 3 analysis softwares

Genes	G	N	B	O
g42	1	1	1	1
g25	1	3	5	2
g21	3	5	3	3
g33	4	6	2	4
g15	5	2	4	3
g43	6	4	6	5

G、N、B和O分别代表geNorm、NormFinder、BestKeeper和总分排序; g42、g25、g21、g33、g15和g43分别代表候选内参基因。

G, N, B and O represent the rank of gene stability in geNorm, NormFinder, BestKeeper and total score, respectively; g42, g25, g21, g33, g15 and g43 represent the candidate reference genes, respectively.

达的内参基因是定量分析获得准确结果的必要条件(Bustin et al., 2010)。在许多植物中, 传统上常把管家基因(如*18S RNA*、*GAPDH*和*EF1 $\alpha$* )用作RT-qPCR数据定量分析的内参基因, 但是在所有实验条件下都稳定表达的内参基因不可能存在。Chen等(2011)在对香蕉(*Musa nana*)进行的8个不同实验处理中分别筛选出不同的稳定内参基因。Jian等(2008)从大豆(*Glycine max*)的7个不同实验处理中筛选的各自稳定内参也不相同。因此要根据具体的实验要求选择表达相对稳定的内参基因。

此外, 理想的内参基因应具有高度或中度的表达水平, 应排除太高(CT<15)或低(CT>30)表达的内参基因(Jian et al., 2008)。在本研究中, 43个候选内参基因的CT平均值都在19.4–29.3范围内, 均可参与稳定内参基因的筛选。

从geNorm和NormFinder软件分析结果可以看出, 在黄梁木7种不同组织中, 用2种软件得出的分析

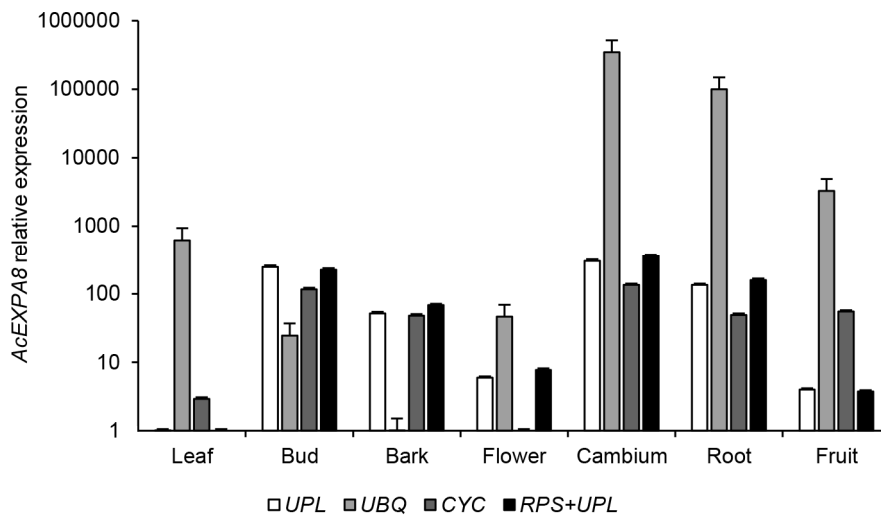


图5 用不同内参基因定量黄梁木*NcEXPA8*基因的表达谱

Figure 5 Screening the reference gene for quantification of the *NcEXPA8* gene of *Neolamarckia cadamba*

结果虽然在稳定性排名上存在差异, 但最稳定的同为 *UPL* (g42), 且在稳定性各自排名前10位的候选内参基因中, 有9个一致; 用2个软件分析得出最不稳定的同为 *UBQ* (g41)。已有研究表明, 利用 *geNorm* 和 *NormFinder* 软件分析得到的稳定性排名会存在较小差异 (Chen et al., 2011; Galeano et al., 2014), 可能是由于2种不同软件的算法不同所致。在本研究中, 对利用 *geNorm* 和 *NormFinder* 软件分析获得的排名都靠前的9个内参基因进行 *BestKeeper* 软件分析, 最稳定的仍为 *UPL* (g42)。因此, 此基因为3个软件一致认为的最稳定内参基因。为了进一步验证本研究中筛选的最佳内参基因 (*UPL*) 的准确性, 我们对目的基因 *NcEXPA8* 在7个不同组织中的表达量进行分析, 结果显示单个内参基因 (*UPL*) 与2个内参基因组合 (*RPS+UPL*) 的标准化结果相似, 且优于原有的内参基因 (*CYC*), 但由最不稳定的内参基因 (*UBQ*) 得到的标准化数据明显不准确。因此, *UPL* 基因可作为内参基因在黄梁木不同组织中开展基因表达的荧光定量分析。

## 参考文献

邓小梅, 欧阳昆啼, 张倩, 黄浩, 陈晓阳 (2011). 团花研究现

状及发展思考. 中南林业科技大学学报 31, 90–95.

姜琼, 王幼宁, 王利祥, 孙政玺, 李霞 (2015). 盐胁迫下大豆根组织定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报 50, 754–764.

欧阳昆啼, 李俊成, 黄浩, 刘明睿, 陈晓阳 (2013). 团花树 $\alpha$ -扩展蛋白基因的克隆及表达分析. 林业科学 49, 62–71.

孙美莲, 王云生, 杨冬青, 韦朝领, 高丽萍, 夏涛, 单育, 骆洋 (2010). 茶树实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报 45, 579–587.

吴文凯, 刘成前, 周志刚, 卢山 (2009). 用于莱茵衣藻荧光定量PCR分析的内参基因选择. 植物生理学通讯 45, 667–672.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft 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. *Cancer Res* 64, 5245–5250.

Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169–193.

Bustin SA (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods* 50, 217–226.

Chandel M, Kumar M, Sharma U, Kumar N, Singh B, Kaur S (2016). Isolation and characterization of flavanols from *Anthocephalus cadamba* and evaluation of their antioxi-

- dant, antigenotoxic, cytotoxic and COX-2 inhibitory activities. *Rev Bras Farmacogn* **26**, 474–483.
- Chen L, Zhong HY, Kuang JF, Li JG, Lu WJ, Chen JY** (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* **234**, 377–390.
- Die JV, Roman B, Flores F, Rowland LJ** (2016). Design and sampling plan optimization for RT-qPCR experiments in plants: a case study in blueberry. *Front Plant Sci* **7**, 271.
- Galeano E, Vasconcelos TS, Ramiro DA, de Fátima De Martin V, Carrer H** (2014). Identification and validation of quantitative real-time reverse transcription PCR reference genes for gene expression analysis in teak (*Tectona grandis* L.f.). *BMC Res Notes* **7**, 464.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM** (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**, 995–1001.
- Ginzinger DG** (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* **30**, 503–512.
- Ho WS, Pang SL, Abdullah J** (2014). Identification and analysis of expressed sequence tags present in xylem tissues of kelampayan (*Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser). *Physiol Mol Biol Plants* **20**, 393–397.
- Jian B, Liu B, Bi YR, Hou WS, Wu CX, Han TF** (2008). Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* **9**, 59.
- Li JC, Hu XS, Huang XL, Huo HQ, Li JJ, Zhang D, Li P, Ouyang KX, Chen XY** (2017). Functional identification of an *EXPA* gene (*NcEXPA8*) isolated from the tree *Neolamarckia cadamba*. *Biotechnol Biochem* **31**, 1116–1125.
- Liu ZL, Slininger PJ** (2007). Universal external RNA controls for microbial gene expression analysis using microarray and qRT-PCR. *J Microbiol Meth* **68**, 486–496.
- Martins MQ, Fortunato AS, Rodrigues WP, Partelli FL, Campostrini E, Lidon FC, DaMatta FM, Ramalho JC, Ribeiro-Barros AI** (2017). Selection and validation of reference genes for accurate RT-qPCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate changes context of interacting elevated [CO<sub>2</sub>] and temperature. *Front Plant Sci* **8**, 307.
- Ouyang KX, Li JC, Huang H, Que QM, Li P, Chen XY** (2014). A simple method for RNA isolation from various tissues of the tree *Neolamarckia cadamba*. *Biotechnol Biochem* **28**, 1008–1013.
- Ouyang KX, Li JC, Zhao XH, Que QM, Li P, Huang H, Deng XM, Singh SK, Wu AM, Chen XY** (2016). Transcriptomic analysis of multipurpose timber yielding tree *Neolamarckia cadamba* during xylogenesis using RNA-Seq. *PLoS One* **11**, e0159407.
- Pandey A, Negi PS** (2016). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Neolamarckia cadamba*: a review. *J Ethnopharmacol* **181**, 118–135.
- Pandey A, Negi PS** (2018). Phytochemical composition, *in vitro* antioxidant activity and antibacterial mechanisms of *Neolamarckia cadamba* fruits extracts. *Nat Prod Res* **32**, 1189–1192.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP** (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509–515.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E** (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**, 291–295.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.
- Zhao XH, Ouyang KX, Gan SM, Zeng W, Song LL, Zhao S, Li JC, Doblin MS, Bacic A, Chen XY, Marchant A, Deng XM, Wu AM** (2014). Biochemical and molecular changes associated with heteroxylan biosynthesis in *Neolamarckia cadamba* (Rubiaceae) during xylogenesis. *Front Plant Sci* **5**, 602.
- Zhou X, Tarver MR, Bennett GW, Oi FM, Scharf ME** (2006). Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene* **376**, 47–58.

## Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative RT-PCR Analysis in *Neolamarckia cadamba*

Deng Zhang, Jingjian Li, Mengjie Zhang, Yutao Bao, Xiao Yang, Wuyun Xu  
Kunxi Ouyang, Xiaoyang Chen

Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract** In this study, root, shoot, leaf, flower, fruit, peel and cambium tissue of *Neolamarckia cadamba* was sampled to analyze the expression of 43 candidate reference genes in 21 housekeeping gene families, such as *ACT*, *CAC*, *CYP*, and *EF1 $\alpha$* , by RT-qPCR. The software geNorm, NormFinder and BestKeeper were used to analyze expression stability of these candidate reference genes in the seven different tissues. geNorm analysis revealed that the stability of the *UPL* gene was the highest (M=0.443) and the stability of *UBQ* was the lowest (M=2.859). NormFinder analysis revealed that the stability of *UPL* was the highest (E=0.223), *UBQ* was the lowest (M=4.759). BestKeeper analysis revealed that the standard deviation of *UPL* (SD=0.513) was the lowest. These findings suggest that *UPL* has the highest stability, and *UBQ* has the lowest stability. *UPL* gene could be selected as an internal reference gene for analysis of gene expression among different tissues of *N. cadamba*.

**Key words** *Neolamarckia cadamba*, real-time quantitative PCR, reference gene

**Zhang D, Li JJ, Zhang MJ, Bao YT, Yang X, Xu WY, Quyang KX, Chen XY** (2018). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Neolamarckia cadamba*. *Chin Bull Bot* **53**, 829–839.

---

\* Author for correspondence. E-mail: xychen@scau.edn.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

**附图1** 候选内参基因PCR产物的溶解曲线

**Appendix figure 1** The PCR product melting curve of the candidate reference genes  
<http://www.chinbullbotany.com/fileup/PDF/t18003-1.pdf>