

· 研究报告 ·

## 实时荧光定量PCR分析中毛果杨内参基因的筛选和验证

苏晓娟<sup>1,2</sup>, 樊保国<sup>1</sup>, 袁丽钗<sup>2</sup>, 崔秀娜<sup>2</sup>, 卢善发<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>山西师范大学生命科学学院, 临汾 041000; <sup>2</sup>中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要** 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术具有高灵敏性、高保真性和高特异性, 被广泛应用于基因表达的分析。在数据处理过程中, 选用稳定表达的基因作为内参基因对准确分析实验结果非常关键。以毛果杨(*Populus trichocarpa*)的不同组织以及锌胁迫下的组培苗为材料, 使用荧光定量PCR方法分析了TUA8、TUB6、ubiquitin、GAPDH、actin、18S rRNA和EF1 $\alpha$  7个看家基因的表达情况。通过geNorm、NormFinder和BestKeeper 3个程序的综合分析, 发现actin、ubiquitin、EF1 $\alpha$ 和18S rRNA的稳定性较好, 可用作毛果杨基因表达研究的内参基因; 而TUB6在不同组织中稳定性最差; GAPDH在锌胁迫下的组织中稳定性最差, 因此不宜作为内参基因。毛果杨NAC基因的表达分析, 进一步验证了上述结果。该研究对采用qRT-PCR方法分析毛果杨基因表达过程中内参基因的选择具有指导作用, 同时对揭示NAC基因的功能也有一定的意义。

**关键词** NAC基因, 毛果杨, 实时定量PCR, 内参基因, 锌胁迫

苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 崔秀娜, 卢善发 (2013). 实时荧光定量PCR分析中毛果杨内参基因的筛选和验证. 植物学报 48, 507–518.

杨树为杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*)植物落叶乔木的统称, 具有生长周期短、适应性强、分布广、容易改良和容易无性繁殖等特点, 是一种重要的经济作物。杨树木材可以用来生产家具、火柴梗、锯材、建筑材、人造板及纤维用品等。近几年来, 随着世界能源的消耗, 杨树木材作为一种潜在的生物新资源的来源备受关注。毛果杨(*Populus trichocarpa*)是一种重要的杨树。随着其全基因组的解码, 它已成为继拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)之后的第3种植物学研究的模式植物。有关毛果杨基因功能的研究方兴未艾。

最常用的检测基因表达水平的方法有DNA微阵列(DNA microarray)、Northern印迹(northern blot)、原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)和实时定量PCR(quantitative real-time polymerase chain, qRT-PCR)等。其中, qRT-PCR是定量分析mRNA表达中最通用、最快速且最简单的方法, 具有高灵敏性和特异性, 已被广泛应用于分子医学、生物科学、微生物学以及诊断学等领域(Bustin, 2002, Bustin et al., 2005; Nolan et al., 2006)。也正是这些优点使得它对RNA

的质量和完整性以及模板cDNA的质量和数量、引物的特异性、扩增效率、内参基因的选择等要求严格(Bustin, 2000; VanGuilder et al., 2008)。选择不合理的内参基因将会给实验结果带来很大误差。一个理想的内参基因应该在任何实验环境和条件下均能稳定表达。内参基因是细胞的基本转录组成分, 参与维持细胞的基本功能, 且与要分析的目标基因有相似的表达水平(Thellin et al., 1999; Schmittgen and Zakrajsek, 2000; Suzuki et al., 2000; Warrington et al., 2000; Dheda et al., 2004; Udvardi et al., 2008; 袁伟等, 2012)。目前, 常用的看家基因有很多, 包括甘油醛磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate, GAPDH)、肌动蛋白(actin)、泛素(ubiquitin, UBQ)、泛素结合酶(ubiquitin conjugating enzyme, UBC)、18S核糖体RNA(18S rRNA)、25S核糖体RNA(25S rRNA)、转录延伸因子(elongation factor 1 alpha, EF1 $\alpha$ )、微管蛋白(tubulin beta, TUB)和翻译延长因子(translation elongation factor, TEF)等的编码基因(Bustin, 2002; Kim et al., 2003)。不过, 许多看家基因的转录水平会随植物发育阶段和实验条件的不同

收稿日期: 2013-01-09; 接受日期: 2013-05-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(No.2012CB114502)和国家自然科学基金(No.31070534)

\* 通讯作者。E-mail: sflu@implad.ac.cn

而有所不同(Thellin et al., 1999; Dheda et al., 2004)。至今还没有发现一个适合作为所有条件下基因表达分析的内参基因的看家基因(Thellin et al., 1999; Schmittgen and Zakrajsek, 2000; Suzuki et al., 2000; Warrington et al., 2000)。例如, Mehdi Khanlou和Van Bockstaele(2012)研究发现, 红三叶(*Trifolium pratense*)的UBC2和UBQ10是叶中表达最稳定的2个看家基因, UBC2和YLS8在茎中表达比较稳定, EIF-4a和UBC2在根中表达稳定, 而GAPDH和SAND在各个组织中的稳定性均较低。此外, ACT、ubiquitin、18S rRNA、EF1 $\alpha$ 、TUB和TUA等已应用于杨树基因表达的分析中, 但在系统筛选方面尚有欠缺(Regier and Frey, 2010; Xu et al., 2011; Pettengill et al., 2012)。为了增加qRT-PCR数据的准确性, 系统分析这些常用看家基因的稳定性非常重要。

为此, 本研究系统分析了7个看家基因(TUA8、TUB6、ubiquitin、GAPDH、actin、18S rRNA和EF1 $\alpha$ )在8个毛果杨组织以及锌胁迫下的组培苗根、茎、叶中的表达。其中, actin、ubiquitin和EF1 $\alpha$ 曾被用于分析干旱胁迫条件下杨树基因的表达(Pettengill et al., 2012)。获得的数据经geNorm (Vandesompele et al., 2002)、NormFinder (Andersen et al., 2004)和Best-Keeper (Pfaffl et al., 2004)3个统计学软件评估决定各看家基因的稳定性。通过用上述看家基因比较分析毛果杨NAC基因的表达数据, 结合验证软件的评估结果所得的稳定性, 最终发现actin、ubiquitin、EF1 $\alpha$ 和18S rRNA的稳定性较好, 可用作毛果杨基因表达研究的内参基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)不同组织的材料取自中国医学科学院药用植物研究所人工气候室一年生毛果杨; 锌胁迫下不同组织的材料取自温室生长2个月且长势一致的毛果杨组培苗。

### 1.2 实验试剂与仪器

#### 1.2.1 试剂

RNA提取试剂采用百泰克公司的裂解液PL。反转录

试剂盒SuperScript III Reverse Transcriptase购自美国Invitrogen公司。DNA消化酶、DNA Marker及实时定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司。引物由生物工程(上海)有限公司北京分公司合成。

#### 1.2.2 仪器

荧光定量仪器为CFX-96实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 杨树RNA的提取与纯化

从一年生毛果杨植株上由上向下取第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片、第2-3节间(St2-3)及第4-6节间正分化的木质部(Xy4-6)和韧皮部(Ph4-6)组织、第12-25节间正分化的木质部(Xy12-25)和韧皮部(Ph12-25)组织以及幼根(Rt), 迅速置于液氮中保存。参照RNA裂解液试剂盒提取使用说明提取总RNA。获得的总RNA用DNA酶处理, 去除基因组DNA污染。之后, 用Nanodrop核酸分析仪测定总RNA的浓度和纯度。再用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。

取生长2个月且长势一致的毛果杨组培苗顶芽(1-2 cm), 分别在含有0、1、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ZnSO<sub>4</sub>的WPM培养基中培养20天。收集根、茎、叶, 置于液氮中保存。RNA提取的具体步骤参照崔秀娜等(2012)所述方法。

#### 1.3.2 cDNA第1链的合成

cDNA链的合成按照SuperScript III (Invitrogen)试剂盒说明书要求进行。配制20  $\mu\text{L}$ 的反应体系: 总RNA 1.5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{L}$ 随机引物(100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  dNTP mix (10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 加DEPC水补足至20  $\mu\text{L}$ 。65  $^{\circ}\text{C}$ 加热5分钟后, 迅速放在冰上2分钟, 然后于4 000  $\times g$ 离心10秒。加入4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ First stand Buffer, 1  $\mu\text{L}$  DTT (100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  RRI, 1  $\mu\text{L}$  Super script III, 再于4 000  $\times g$ 离心15秒。最后, 50  $^{\circ}\text{C}$ 反应45分钟。终止反应采用70  $^{\circ}\text{C}$ 加热15分钟。稀释40倍后放入-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

#### 1.3.3 看家基因的选择和引物设计

7个看家基因分别是 $\alpha$ 微管蛋白、 $\beta$ 微管蛋白、泛素、甘油醛磷酸脱氢酶、肌动蛋白、18S核糖体RNA和转

录延伸因子的编码基因, 即 *TUA8*、*TUB6*、*ubiquitin*、*GAPDH*、*actin*、*18S rRNA*和*EF1α*(表1)。目标基因 *NAC*的序列在毛果杨基因组数据库(release2.0, <http://www.phytozome.net/poplar>)中查寻。引物通过网站 IDTdna (<http://www.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/results.aspx>)设计, 参数设置如下: 扩增长度80–200个碱基对, 引物序列长度17–25个碱基, GC含量45%–55%, Forward引物与Reverse引物的TM值不能相差太大。

### 1.3.4 PCR反应条件

采用大连宝生物工程有限公司的SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>II实时定量PCR试剂盒进行定量分析。使用Bio-Radi Cyclser IQ实时定量PCR仪和96孔板。每个孔按照20 μL体系加样: 4 μL模板cDNA, 0.8 μL For-

ward引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.8 μL Reverse引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>), 10 μL SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>II, 4.4 μL 无菌水。每个样品重复3次。扩增反应程序为: 95°C预变性30秒; 95°C变性5秒, 60°C退火18秒, 72°C延伸15秒, 39个循环。采集溶解曲线荧光信号。实验数据采用相对定量法分析。

### 1.3.5 引物扩增效率的计算

等量取8个样品的cDNA模板, 混合后依次稀释6个梯度, 每个梯度稀释5倍, 则浓度分别为1、1/5、1/25、1/625、1/3125和1/15625倍。每个反应设4个重复。溶解温度通过PCR仪自带的计算软件CFX Manager<sup>TM</sup> Software得到。根据所得CT值绘制标准曲线, 得到斜率*k*和线性相关系数*R*<sup>2</sup>。根据公式 $E=5^{-1/k}-1$ , 计算得出扩增效率*E*。

**表1** 看家基因和*NAC*目标基因的名称、登录号、引物序列、引物位置及扩增效率

**Table 1** The name, accession number, primer sequence, primer location and amplification efficiency of seven housekeeping and four *NAC* genes

Gene name	Accession number	Primer sequence (5'–3')	PL	TM (°C)	AL (bp)	AE (%)	<i>R</i> <sup>2</sup>
<i>actin</i>	EF418792.1	(F)TCATCGGAATGGAAGCTGCTGGTA (R)TAGTGGAACCACTGAGCACAA	954–978 1 046–1 070	79.5	117	102.98	0.998 1
<i>ubiquitin</i>	FJ438462.1	(F)AAGATCCAGGACAAGGAGGGCATT (R)TCTTGCCAGTGAGGGTCTTCACAA	365–389 518–542	86.0	178	103.92	0.999 2
<i>EF1α</i>	GQ253565.1	(F)ATTGACAGGCGGTCTGGTAAGGAA (R)AAACGACCAAGTGGAGGATACGCT	70–94 182–206	83.5	137	100.57	0.998 2
<i>18S rRNA</i>	AY652861.1	(F)TTAACGAGGATCCATTGGAGGGCA (R)ACCCAACCCAAAGTCCAACCTACGA	503–527 596–620	82.5	118	102.16	0.999 3
<i>TUA8</i>	XM_002325386	(F)ATACAGCCTGATGGAACGATGCCT (R) ATAGCTCTCGGCACATGCTTTCT	179–183 264–288	81.5	110	99.48	0.999 4
<i>TUB6</i>	XM_002323509	(F) TCTGACCTCACGTGGTTCACAACA (R)GTCTGCTGCGCACATCATGTTCTT	826–850 898–922	82.8	97	104.22	1
<i>GAPDH</i>	FN396887.1	(F)TAGGCTGTTGGAAAGGTTCTGCCA (R) TGCCTTCTTCTCAAGCCTGACAGT	299–323 391–415	82.5	117	99.88	0.998 3
<i>PNAC041</i>	POPTR_0005s101 00.1	(F)TCAACAAGTGTGAGCCGTGGGATA (R)TTTCTCATGCCAACAAGAGTGCCC	164–188 329–353	83.5	190	98.59	0.998 0
<i>PNAC042</i>	POPTR_0007s084 20.1/POPTR_0007 s08430.1	(F)TACGTAAGGGAACCTTGTGGCA (R) GTTTGGCCACAACCTTCTCTGGTGT	323–347 481–505	82.5	183	103.16	0.998 9
<i>PNAC154</i>	POPTR_0015s021 70.1	(F)AAGCCACAGGGAAAGACAAGGAGA (R)ACACCCTGCAGATCACCCATTTCAT	296–320 469–493	81.5	198	102.32	0.998 7
<i>PNAC155</i>	POPTR_0012s016 10.1	(F)AGCTCGGCTGGAAAGAAGACCTAT (R)ATGGTGGCAGACCATAAGGGCTAA	502–526 565–589	78.5	88	101.56	0.998 3

PL: 引物在CDS序列上的位置; TM: 溶解温度; AL: 扩增长度; AE: 扩增效率; *R*<sup>2</sup>: 确定系数

PL: Primer location in coding sequence; TM: Melting temperature; AL: Amplification length; AE: Amplification efficiency; *R*<sup>2</sup>: Co-efficient of determination

### 1.3.6 内参基因引物特异性鉴定

将qRT-PCR反应产物进行琼脂糖(2%)凝胶电泳, 分析扩增长度、电泳条带数及是否有非特异性扩增等。

### 1.3.7 数据处理与分析

使用geNorm、Normfinder和BestKeeper3个软件分析看家基因在毛果杨8个组织以及胁迫下的组培苗根、茎、叶中的表达稳定性指数。其中geNorm和Normfinder程序需要将CT值转化成Q值后, 方可进行分析。转化公式为 $Q = E^{ct_{min} - ct_{sample}}$  ( $E$ 为基因的扩增效率。当扩增效率接近100%时,  $E$ 通常默认为2。ct sample为该基因在各个组织中的CT值, ct min为该基因在所有组织中最小的CT值)。BestKeeper软件可以直接对各看家基因的CT值进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 毛果杨RNA的分离与纯化

用裂解液提取毛果杨8个组织的总RNA, DNA酶消化处理后用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 发现电泳条带清晰, 没有弥散现象, 且28S rRNA带比18S rRNA带亮, 说明RNA的完整性良好, 没有降解(图1)。再用Nanodrop检测RNA的浓度和纯度, 结果表明A260/280和A260/230均在2.0–2.1之间, 说明RNA的纯度较高, 符合后续实验的要求。用Trizol试剂提取胁迫下的毛果杨组培苗的根、茎、叶总RNA, 经检测完整性较好。具体操作方法参见崔秀娜等(2012)所述。

### 2.2 扩增效率和扩增特异性分析

根据已知的看家基因序列, 设计TM值在78.5–86°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7个看家基因的标准曲线。结果显示各看家基因的决定系数 $R^2 \geq 0.990$ , 引物的扩增效率在95.0%–105.0%之间, 均符合qRT-PCR对扩增效率的要求(表1)。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明所得目的条带大小与理论值一致, 且没有发现其它条带, 不存在非特异性扩增(图2)。进一步分析溶解曲线, 发现各看家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, 未加模板的对照组无对应信号(图3)。上述结果说明所设计引物的特异性良好, qRT-PCR反应的

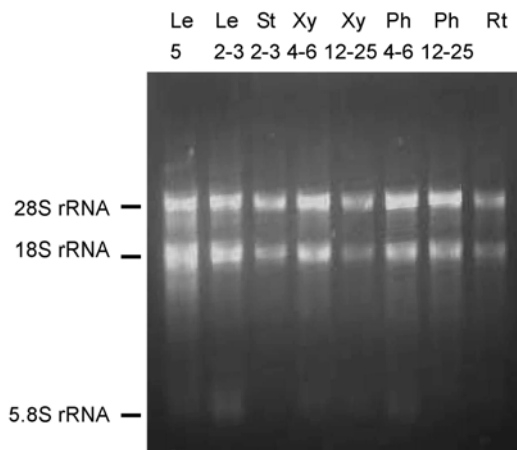


图1 毛果杨总RNA的电泳检测图谱

用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测一年生毛果杨植株由上往下的第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片、第2–3节间(St2-3)、第4–6节间正分化的木质部(Xy4-6)和韧皮部(Ph4-6)组织、第12–25节间正分化的木质部(Xy12-25)和韧皮部(Ph12-25)组织以及幼根(Rt)中提取的总RNA。

Figure 1 Agarose gel analysis of total RNA extracted from various tissues of *Populus trichocarpa*

Total RNA extracted from various tissues, including the 2nd, 3rd (Le2-3) and 5th (Le5) leaves, stem internodes from the leaf plastochron index (LPI) 2–3 (St2-3), developing xylem (Xy4-6) and phloem (Ph4-6) tissues from LPI 4–6, developing xylem (Xy12-25) and phloem (Ph12-25) tissues from LPI 12–25 and young roots (Rt), was separated on a 1.2% agarose gel.

专一性高, 结果准确可靠。

### 2.3 看家基因CT值分析

CT值与基因的表达量成反比, 即CT值越大, 表达量越小, 反之亦然。qRT-PCR的结果表明, 7个看家基因的CT值在10–33之间, 其中18S rRNA的CT值最低, 在10–14之间; TUA8和TUB6的CT值较高, 在25–33之间; actin、ubiquitin和EF1α的CT值则在21–29之间(图4), 说明各看家基因的表达量不同, 有的差别较大。

### 2.4 看家基因稳定性分析

我们用BestKeeper、geNorm和NormFinder3个软件对7个看家基因的稳定性进行统计学分析。这3个软件均基于qRT-PCR后得到的CT值进行分析。其中best-

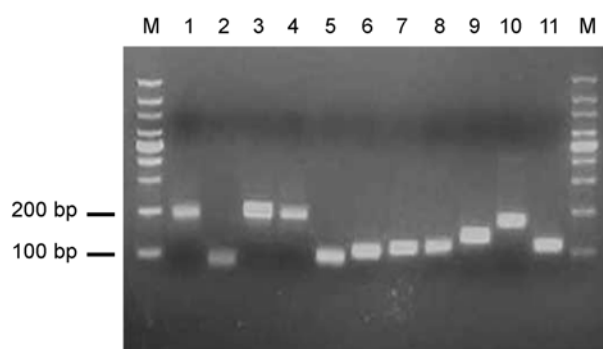


图2 qRT-PCR扩增产物的特异性

用2%琼脂糖凝胶电泳分析7个看家基因和4个NAC基因的qRT-PCR扩增产物。M: 100 bp DNA ladder marker; 1: *PNAC154*; 2: *PNAC155*; 3: *PNAC042*; 4: *PNAC041*; 5: *actin*; 6: *ubiquitin*; 7: *EF1α*; 8: *18S rRNA*; 9: *GAPDH*; 10: *TUA8*; 11: *TUB6*

**Figure 2** The specificity of qRT-PCR amplification  
qRT-PCR products of seven housekeeping and four NAC genes were analyzed on a 2% agarose gel. M: 100 bp DNA ladder marker; 1: *PNAC154*; 2: *PNAC155*; 3: *PNAC042*; 4: *PNAC041*; 5: *actin*; 6: *ubiquitin*; 7: *EF1α*; 8: *18S rRNA*; 9: *GAPDH*; 10: *TUA8*; 11: *TUB6*

Keeper程序可以直接对CT值进行分析; 而geNorm和NormFinder软件则需要将CT值转换成相对表达量再进行分析。

#### 2.4.1 geNorm分析

geNorm V3.5软件根据平均表达稳定指数M值确定最稳定的看家基因。M值越大, 基因的稳定性越低, 反之则越高。以M=1.5为上限, 只有小于1.5的才被认为相对较为稳定。geNorm分析结果表明, 7个看家基因的M值均小于1.5, 说明7个看家基因都较为稳定。在7个看家基因中, *actin*和*ubiquitin*的M值最低, 说明它们的稳定性较好; *TUB6*的M值最高, 稳定性也是所选看家基因中最差的; 其余4个看家基因的M值则介于它们之间。7个看家基因的稳定性从高到低依次为: *actin*=*ubiquitin*>*18S rRNA*>*EF1α*>*GAPDH*>*TUA8*>*TUB6* (图5)。

#### 2.4.2 BestKeeper分析

BestKeeper程序依据看家基因的CT值用EXCEL软

件计算标准偏差SD。SD值越小, 基因的稳定性越好。若SD>1, 则认为该基因不稳定。分析结果(表2)显示, *TUA8*、*TUB6*和*GAPDH*的SD值大于1, 其余都小于1。按照稳定性从高到低排序依次为*EF1α*>*ubiquitin*>*18S rRNA*>*actin*>*GAPDH*>*TUA8*>*TUB6*。

#### 2.4.3 NormFinder分析

NormFinder程序用EXCEL软件计算基因的稳定性M。M值越低, 则该基因越稳定。经计算获得7个看家基因的M值。如表3所示, *actin*的M值最低, 说明它是所选看家基因中稳定性最好的; *TUB6*的M值最高, 说明它的稳定性最差。7个看家基因按照稳定性从高到低排序依次为: *actin*>*18S rRNA*>*ubiquitin*>*TUA8*>*GAPDH*>*EF1α*>*TUB6*。

### 2.5 锌胁迫下看家基因的稳定性分析

使用BestKeeper、geNorm和NormFinder 3个软件对锌胁迫下毛果杨组培苗根、茎、叶中7个看家基因的稳定性进行统计学分析(表4)。geNorm软件分析结果显示, *EF1α*和*18S rRNA*的M值最低, 说明它们的稳定性较好; *GAPDH*的M值最高, 稳定性较差; 7个看家基因按照稳定性从高到低排序依次为: *EF1α*=*18S rRNA*>*ubiquitin*>*actin*>*TUA8*>*TUB6*>*GAPDH*。BestKeeper软件分析结果显示, *ubiquitin*的SD值最低, 稳定性较好; *GAPDH*的SD值大于1, 稳定性最差; 7个看家基因的稳定性排序为*ubiquitin*>*18S rRNA*>*actin*>*EF1α*>*TUA8*>*TUB6*>*GAPDH*。NormFinder软件分析结果显示, *EF1α*的M值最低, 说明其稳定性较好; 稳定性排序为*EF1α*>*actin*>*18S rRNA*>*TUA8*>*ubiquitin*>*TUB6*>*GAPDH*。综合3个软件的分析结果表明, *ubiquitin*、*EF1α*、*18S rRNA*和*actin*的稳定性较好, *GAPDH*的稳定性最差。

### 2.6 看家基因稳定性验证

为了验证上述结果, 研究不同的看家基因作为qRT-PCR分析基因表达时的内参基因对实验结果的影响, 我们采用qRT-PCR法分析了4个受微小RNA(miR-164)调控且功能未知的毛果杨NAC转录因子家族基因的表达(Lu et al., 2008)。分别以7个看家基因为内参基因分析4个NAC家族基因的相对表达量, 发现以*actin*、*ubiquitin*、*EF1α*和*18S rRNA*为内参基因时在

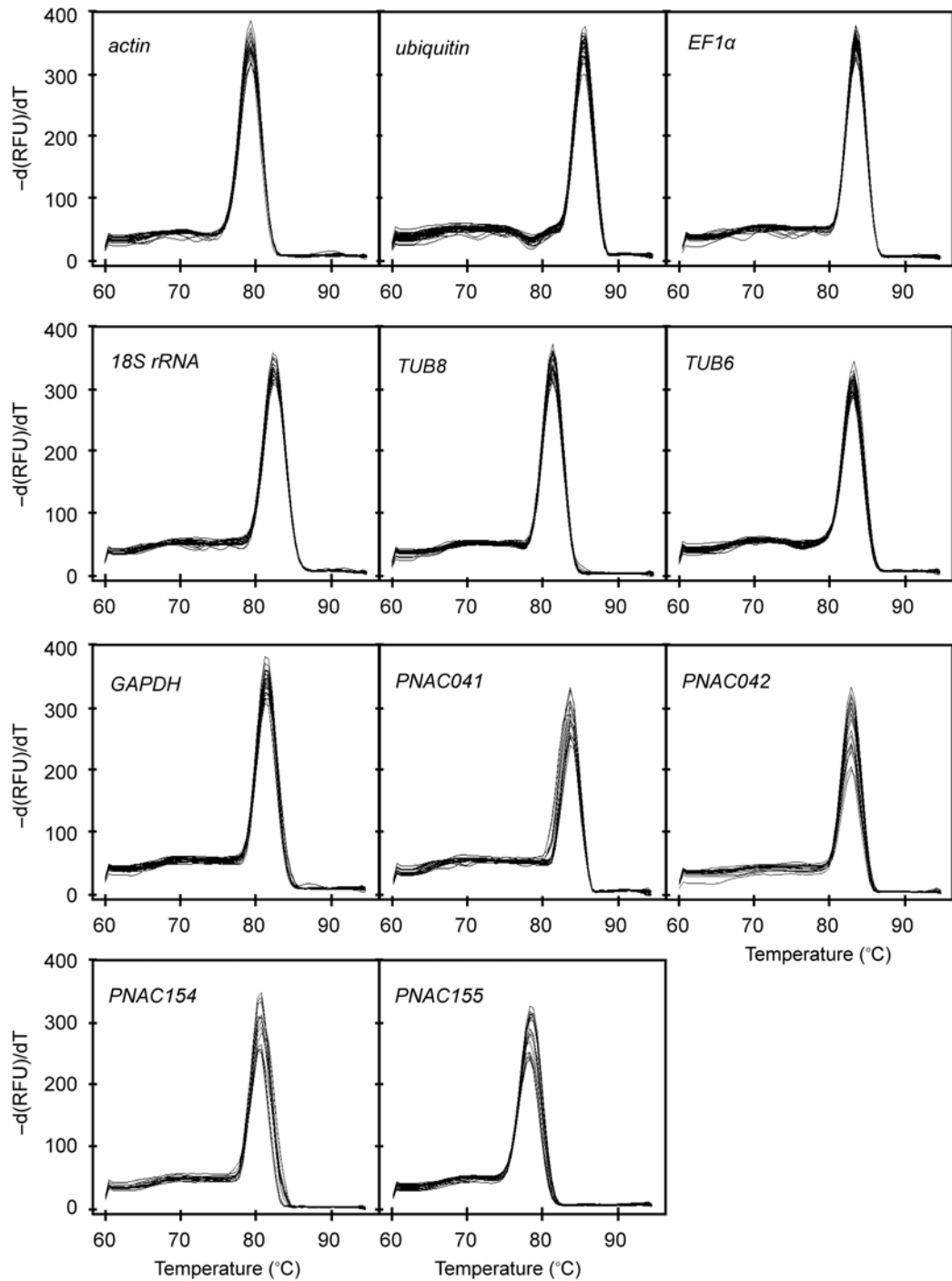
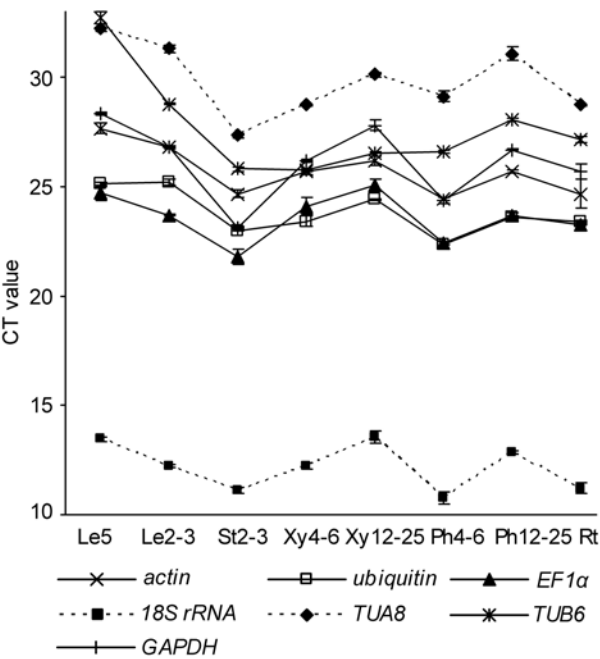


图3 7个看家基因和4个NAC目标基因的溶解峰

Figure 3 Melting curves produced from qRT-PCR products of seven housekeeping and four NAC target genes

各组织中的表达趋势基本一致；而以*GAPDH*、*TUA8*和*TUB6*为内参基因时的表达趋势则与前几个明显不同。其中*PNAC041*在第5个叶片(Le5)，*PNAC042*在

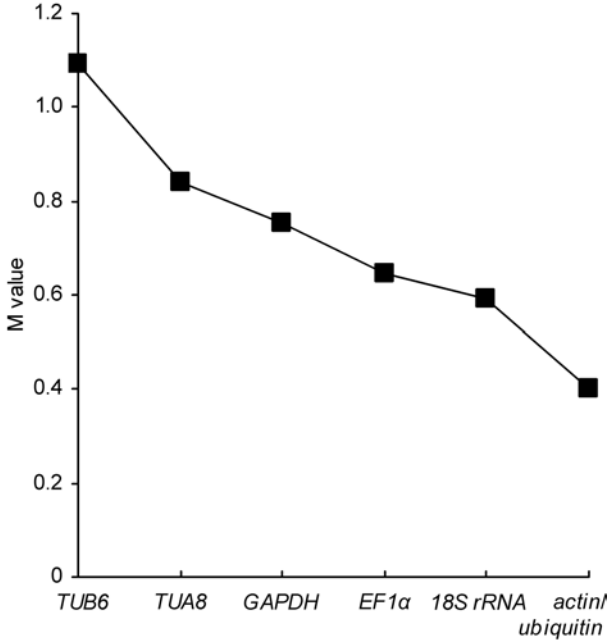
第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片以及嫩茎(St2-3)中的表达显著不同，在其它组织部位的趋势基本一致。*PNAC154*和*PNAC155*在第5(Le5)个叶片中的表达量



**图4** 看家基因的CT值  
图中显示7个看家基因18S rRNA、actin、ubiquitin、GAPDH、TUA8、TUB6和EF1α在1年生毛果杨植株由上向下的第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片、第2–3节间(St2-3)及第4–6节间正分化的木质部(Xy4-6)和韧皮部(Ph4-6)组织、第12–25节间正分化的木质部(Xy12-25)和韧皮部(Ph12-25)组织以及幼根(Rt)中表达的qRT-PCR分析结果

**Figure 4** The CT value of housekeeping genes  
It shows the results from qRT-PCR analysis of seven housekeeping genes, including 18S rRNA, actin, ubiquitin, GAPDH, TUA8, TUB6 and EF1α, in one-year-old *Populus trichocarpa* tissues, including the 2nd, 3rd (Le2-3) and 5th (Le5) leaves, stem internodes from the leaf plastochron index (LPI) 2–3 (St2-3), developing xylem (Xy4-6) and phloem (Ph4-6) tissues from LPI 4–6, developing xylem (Xy12-25) and phloem (Ph12-25) tissues from LPI 12–25 and young roots (Rt)

不同(图6)。上述结果说明,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误估计目标基因的相对表达量,由此可见内参基因选择的重要性。此外,我们发现所分析的PNAC041和PNAC154基因在根中的表达量很高,在其它部位基本不表达,说明它们特异地调控根的发育。PNAC042在第4–6节间正分化的木质部(Xy4-6)表达量很高,在第2、3(Le2-3)和



**图5** geNorm程序分析7个看家基因的平均表达稳定性指数M  
**Figure 5** The average expression stability value (M) of seven housekeeping genes calculated by geNorm

第5(Le5)个叶片及嫩茎次之,其它部位较低;PNAC-155在根中最高,在第4–6节间(Ph4-6)及第12–25节间(Ph12-25)正分化韧皮部组织的表达量次之,其它部位较低。这些结果与Hu等(2010)的研究结果基本一致,将为进一步研究该家族基因的功能奠定基础。

2.7 讨论

近年来,qRT-PCR技术凭借其特异性强、灵敏度高、重复性好和快速高效等优点被广泛用于基因表达的研究(Udvardi et al., 2008)。应用qRT-PCR技术分析基因表达时,内参基因的选择很重要。如果选用不恰当的内参基因,有可能得出错误的结论。因此,正式分析目标基因的表达之前,很有必要对看家基因进行筛选。本研究系统分析了α微管蛋白(TUA8)、β微管蛋白(TUB6)、泛素(ubiquitin)、甘油醛磷酸脱氢酶(GAPDH)、肌动蛋白(actin)、18S核糖体RNA(18S rRNA)和转录延伸因子(EF1α)7个看家基因在8个毛果杨组织中以及锌处理的毛果杨组培苗根、茎、叶中的表达。经geNorm、NormFinder和BestKeeper 3个常用于分析看家基因稳定性的软件评估(Vandesom-

表2 用BestKeeper软件分析看家基因的表达稳定性

Table 2 Expression stability of housekeeping genes analyzed by BestKeeper

	<i>EF1α</i>	<i>ubiquitin</i>	<i>18s rRNA</i>	<i>actin</i>	<i>GAPDH</i>	<i>TUA8</i>	<i>TUB6</i>
Geo mean [CP]	23.558	23.787 893 7	12.139 4	25.690 950 78	26.062 62	29.795 88	27.591 72
Ar mean [CP]	23.580 83	23.807 083 3	12.180 42	25.712 916 67	26.113 33	29.835 42	27.669 58
Min [CP]	21.753 33	22.316 666 7	10.79	24.41	23.113 33	27.343 33	25.736 67
Max [CP]	25.08	25.193 333 3	13.546 67	27.66	28.32	32.263 33	32.723 33
SD [± CP]	0.823 125	0.832 187 5	0.855 313	0.875 312 5	1.294 167	1.357 083	1.633 646
Stability rank	1	2	3	4	5	6	7

CP: CT值; Geo mean: 几何平均值; Ar mean: 算数平均值; SD: 标准差

CP: CT value; Geo mean: Geometric mean; Ar mean: Arithmetic mean; SD: Standard deviation

表3 用NormFinder软件分析看家基因的表达稳定性

Table 3 Expression stability of housekeeping genes analyzed by NormFinder

Gene name	M	Stability rank
<i>actin</i>	0.226 753 77	1
<i>18s rRNA</i>	0.409 391 14	2
<i>ubiquitin</i>	0.429 235 82	3
<i>TUA8</i>	0.432 697 45	4
<i>GAPDH</i>	0.485 544 35	5
<i>EF1α</i>	0.501 105 54	6
<i>TUB6</i>	1.131 130 31	7

pele et al., 2002; Andersen et al., 2004; Pfaffl et al., 2004), 结果表明这些内参基因的排序略有不同, 这种不一致性可能是由于计算机软件的统计学算法不同造成的(Hu et al., 2010)。这种现象在柑橘(*Citrus reticulata*)以及其它植物看家基因的研究中也曾出现(Hong et al., 2008; Wan et al., 2010; Huis et al., 2010; Mafrá et al., 2012)。

综合来看, *actin*、*ubiquitin*和*EF1α*的稳定性较好。*actin*是细胞骨架的主要成分, 几乎在所有真核细

表4 用geNorm、BestKeeper和NormFinder统计学软件分析看家基因的表达稳定性

Table 4 Expression stability of housekeeping genes analyzed by geNorm, BestKeeper, and NormFinder

Gene name	geNorm		BestKeeper		NormFinder	
	M value	Stability rank	SD[±CP]	Stability rank	M value	Stability rank
<i>ubiquitin</i>	0.445 006	3	0.170 123	1	0.377 571	5
<i>18s rRNA</i>	0.380 386	1	0.325 679	2	0.282 673	3
<i>actin</i>	0.483 390	4	0.366 996	3	0.263 997	2
<i>EF1α</i>	0.380 386	2	0.383 374	4	0.131 832	1
<i>TUA8</i>	0.536 548	5	0.542 798	5	0.367 552	4
<i>TUB6</i>	0.590 513	6	0.696 626	6	0.380 906	6
<i>GAPDH</i>	0.814 547	7	1.188 313	7	0.907 506	7

图6 以不同的看家基因为内参基因分析目标基因NAC的表达

分别以*actin*、*ubiquitin*、*EF1α*、*18S rRNA*、*GAPDH*、*TUA8*和*TUB6*为内参基因分析*PNAC041*、*PNAC042*、*PNAC154*和*PNAC155*四个NAC家族基因在1年生毛果杨植株由上向下的第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片、第2-3节间(St2-3)及第4-6节间正分化的木质部(Xy4-6)和韧皮部(Ph4-6)组织、第12-25节间正分化的木质部(Xy12-25)和韧皮部(Ph12-25)组织以及幼根(Rt)中的表达。纵坐标为NAC基因表达倍数的变化。在Le5中的表达设为1。

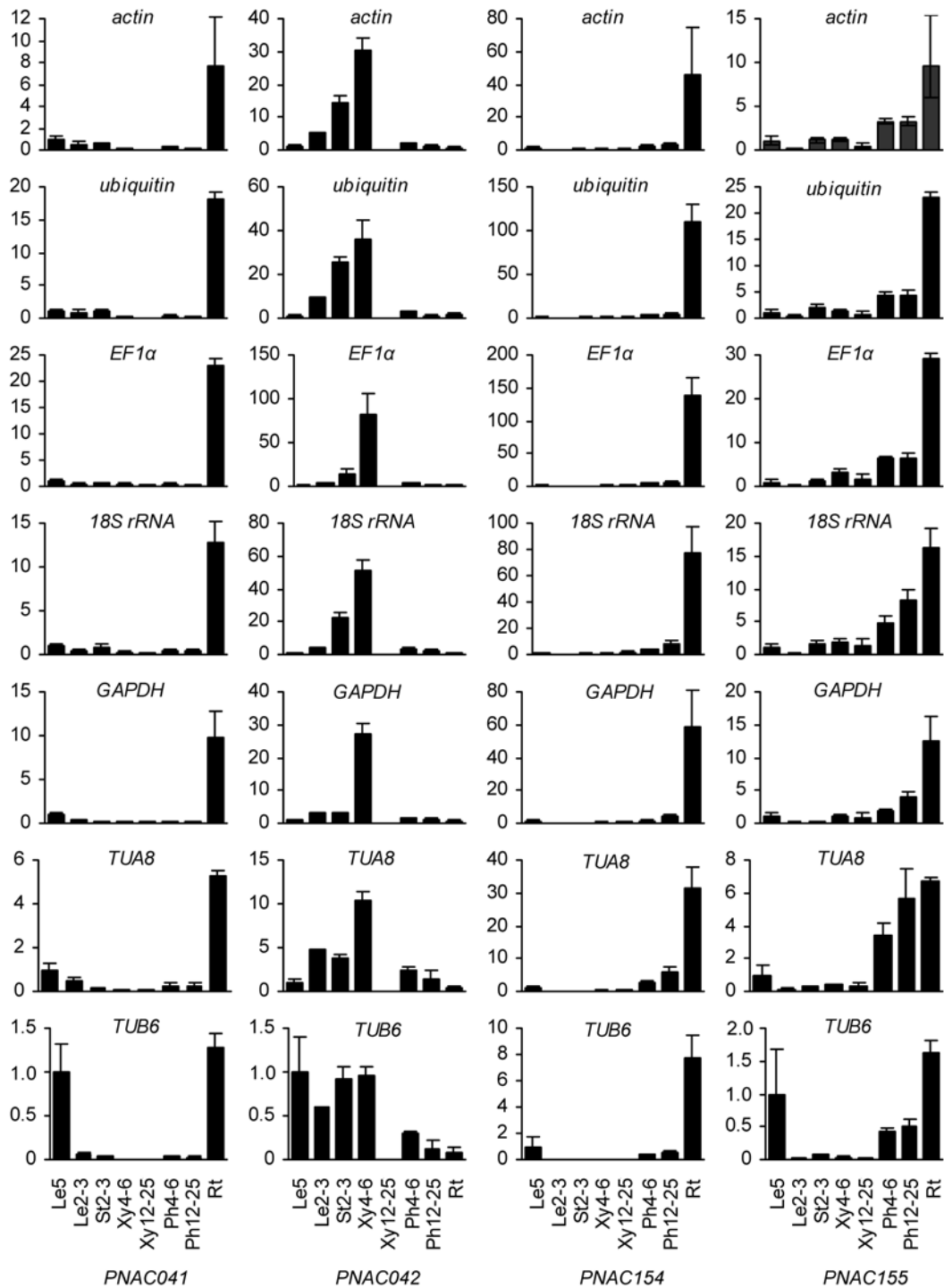
Figure 6 The expression of NAC genes analyzed using various housekeeping genes as references

Relative expression of four NAC genes, including *PNAC041*, *PNAC042*, *PNAC154* and *PNAC155*, in one-year-old *Populus trichocarpa* tissues, including the 2nd, 3rd (Le2-3) and 5th (Le5) leaves, stem internodes from the leaf plastochron index (LPI) 2-3 (St2-3), developing xylem (Xy4-6) and phloem (Ph4-6) tissues from LPI 4-6, developing xylem (Xy12-25) and phloem (Ph12-25) tissues from LPI 12-25 and young roots (Rt), was analyzed using the qRT-PCR method. Housekeeping genes, including *actin*, *ubiquitin*, *EF1α*, *18S rRNA*, *GAPDH*, *TUA8* and *TUB6*, were used as references. Fold changes of NAC gene expression are shown. The level of each gene in Le5 was arbitrarily set to 1.



胞中均有表达, 是RT-PCR内参基因的最佳选择 (Santella and Chun, 2011)。Ubiquitin是广泛存在于真核细胞中的热稳定多肽, 进化上高度保守, 在介导蛋白质降解、转录调节和应激反应中发挥重要作用 (Hochstrasser, 2000)。EF1 $\alpha$ 是一种重要的多功能蛋

白, 参与许多重要的细胞学过程, 包括信号转导、翻译控制、凋亡、细胞骨架组成、病毒复制及癌基因转化等(Zhou et al., 2007)。在干旱胁迫下的杨树组织中, 这3个基因的表达也很稳定(Pettengill et al., 2012)。此外, ACT7、EF1 $\alpha$ 和UBQ在梧桐(*Firmiana*



*simplex*)种子不同发育阶段中的表达比较稳定(Han et al., 2012);  $\beta$ -*actin*在茶树(*Camellia sinensis*)不同器官组织中的表达较稳定(孙美莲等, 2010); *actin*和*ubiquitin*是丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中稳定性最好的2个看家基因(Yang et al., 2010); *ACT11*和*EF1 $\alpha$* 在荷花(*Nelumbo nucifera*)中表达较为稳定(Luo et al., 2010); *ACT7*是油菜(*Brassica campestris*)胚胎中最稳定的看家基因(Chen et al., 2010); 在菊苣(*Cichorium endivia*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*)叶子及根组织中*ACT*最为稳定(Løvdal and Lillo, 2009; Maroufi et al., 2010; Xu et al., 2011); 在黑麦草(*Lolium perenne*)和葡萄(*Vitis vinifera*)浆果的不同发育阶段、黄瓜(*Cucumis sativus*)和杨树的多个组织中*EF1 $\alpha$* 最稳定(Reid et al., 2006; Martin, 2008; Basa et al., 2009; Boava et al., 2010)。诸多研究进一步说明*actin*、*ubiquitin*和*EF1 $\alpha$* 三个看家基因均适合作为杨树基因表达研究中的内参基因。另外, 从本研究结果看, *18S rRNA*的CT值最低, 表达丰度很高, 但这并未影响其稳定性。以*18S rRNA*为内参基因分析*NAC*基因的表达, 发现总体表达趋势与使用其它内参基因的结果一致。Brunner等在对杨树不定根基因表达的研究中(Xu et al., 2011), 也得出类似的结论。说明*18S rRNA*同样适合作为杨树的内参基因。

本研究中*GAPDH*、*TUA8*和*TUB6*的稳定性排在最后3位。在其它实验中也发现了类似的结果。*GAPDH*在桉树(*Eucalyptus* spp.)和矮牵牛(*Petunia hybrida*)中均不稳定(Boava et al., 2010; Mallona et al., 2010); 在柑橘和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的研究中, 发现*TUB6*的稳定性最差(Carvalho et al., 2010; Ponton et al., 2011; Mafra et al., 2012)。从本研究中*NAC*的表达结果来看, 以*actin*、*ubiquitin*、*EF1 $\alpha$* 和*18S rRNA*为内参基因时, 其在各组织中的表达趋势基本一致; 而以*GAPDH*、*TUA8*和*TUB6*为内参基因时其表达趋势与前几个明显不同, 说明*TUA8*、*TUB6*和*GAPDH* 3个基因不适合作杨树的内参基因。另外, *PNAC041*和*PNAC154*基因在根中的表达量很高, 初步预测该基因可能与根的发育有关。*PNAC042*在第4–6节间正分化的木质部(Xy4-6)表达量很高, 在第2、3(Le2-3)和第5(Le5)个叶片及嫩茎中次之, 说明该基因可能参与调控初生木质部和叶片的发育。*PNAC155*在根中的表达量最高, 在第4–6

及第12–25节间正分化的韧皮部(Ph4-6)组织的表达次之, 说明该基因可能参与调控初生和次生韧皮部的发育。由于这4个*NAC*基因是*miR164*的靶基因, 因此上述研究结果不仅为了解*NAC*基因的功能且为进一步阐明*miR164*的作用奠定了基础。

## 参考文献

- 崔秀娜, 袁丽钗, 苏晓娟, 吴祥云, 王海英, 卢善发 (2012). *miR1444a*参与毛果杨对锌胁迫的响应. 中国科学: 生命科学 42, 850–860.
- 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.
- 袁伟, 万红建, 杨悦俭 (2012). 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择. 植物学报 47, 427–436.
- 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.
- Basa B, Solti Á, Sárvári É, Tamás L (2009). Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Funct Plant Biol* 36, 1079–1087.
- Boava LP, Laia ML, Jacob TR, Dabbas KM, Gonçalves JF, Ferro JA, Ferro MIT, Furtado EL (2010). Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC Res Notes* 3, 43.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169–193.
- Bustin SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23–39.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597–601.
- Carvalho K, de Campos MKF, Pereira LFP, Vieira LGE (2010). Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction normalization in “Swingle” citrumelo under drought stress. *Anal Biochem* 402, 197–199.
- Chen X, Truksa M, Shah S, Weselake RJ (2010). A survey

- of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*. *Anal Biochem* **405**, 138–140.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A** (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* **37**, 112–114, 116, 118–119.
- Han XJ, Lu MZ, Chen YC, Zhan ZY, Cui QQ, Wang YD** (2012). Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development. *PLoS One* **7**, e43084.
- Hochstrasser M** (2000). Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* **2**, E153–E157.
- Hong SY, Seo PJ, Yang MS, Xiang FN, Park CM** (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biol* **8**, 112.
- Hu RB, Qi G, Kong YZ, Kong DJ, GQ, Zhou GK** (2010). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* **10**, 145.
- Huis R, Hawkins S, Neutelings G** (2010). Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol* **10**, 71.
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SL, Chang YJ** (2003). Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* **25**, 1869–1872.
- Løvdaal T, Lillo C** (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal Biochem* **387**, 238–242.
- Lu SF, Sun YH, Chiang VL** (2008). Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant J* **55**, 131–151.
- Luo HL, Chen SM, Wan HJ, Chen FD, Gu CS, Liu ZL** (2010). Candidate reference genes for gene expression studies in water lily. *Anal Biochem* **404**, 100–102.
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM, Machado MA** (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One* **7**, e31263.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M** (2010). Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol* **10**, 4.
- Maroufi A, van Bockstaele E, de Loose M** (2010). Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol* **11**, 15.
- Martin RC, Hollenbeck VG, Dombrowski JE** (2008). Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium perenne*. *Crop Sci* **48**, 1881–1887.
- Mehdi Khanlou K, Van Bockstaele E** (2012). A critique of widely used normalization software tools and an alternative method to identify reliable reference genes in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Planta* **236**, 1381–1393.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA** (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559–1582.
- Pettengill EA, Parmentier-Line C, Coleman GD** (2012). Evaluation of qPCR reference genes in two genotypes of *Populus* for use in photoperiod and low-temperature studies. *BMC Res Notes* **5**, 366.
- 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.
- Ponton F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ** (2011). Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* **57**, 840–850.
- Regier N, Frey B** (2010). Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol* **11**, 57.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST** (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol* **6**, 27.
- Santella L, Chun JT** (2011). Actin, more than just a housekeeping protein at the scene of fertilization. *Sci China Ser C* **54**, 733–743.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA** (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**, 69–81.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR** (2000). Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques* **29**, 332–337.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, de Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Lgout A, Heinen E** (1999). House-

- keeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**, 291–295.
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR** (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *J Plant Cell* **20**, 1736–1737.
- 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.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM** (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* **44**, 619–626.
- Wan H, Zhao Z, Qian C, Sui Y, Malik AA, Chen J** (2010). Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal Biochem* **399**, 257–261.
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M** (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* **2**, 143–147.
- Xu M, Zhang B, Su XH, Zhang SG, Huang MR** (2011). Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. *Anal Biochem* **408**, 337–339.
- Yang YF, Hou S, Cui GH, Chen SL, Wei JH, Huang LQ** (2010). Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep* **37**, 507–513.
- Zhou B, Cao C, Liu CX** (2007). Advances in research on translation elongation factor 1 alpha. *Lett Biotechnol* **18**, 281–284.

## Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative RT-PCR Analysis of Gene Expression in *Populus trichocarpa*

Xiaojuan Su<sup>1,2</sup>, Baoguo Fan<sup>1</sup>, Lichai Yuan<sup>2</sup>, Xiuna Cui<sup>2</sup>, Shanfa Lu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041000, China; <sup>2</sup>Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract** Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) has been widely used in gene expression analysis because of its sensitivity, specificity, and reproducibility. Application of suitable reference genes to normalize qRT-PCR data is critical in analyzing PCR results. We analyzed the expression patterns of 7 housekeeping genes, including *TUA8*, *TUB6*, *ubiquitin*, *GAPDH*, *actin*, *18S rRNA* and *EF1α*, in various tissues of greenhouse-grown *Populus trichocarpa* and Zn-treated *in vitro* plantlets. The stability of housekeeping gene expression was analyzed with use of 3 software packages, including geNorm, NormFinder, and BestKeeper. The genes *actin*, *ubiquitin*, *EF1α* and *18S rRNA* were suitable reference genes for efficient normalization of qRT-PCR data, whereas *TUB6* and *GAPDH* were not suitable for analysis of greenhouse-grown plants and Zn-treated plantlets, respectively. These findings were confirmed by comparative profiling of 4 *P. trichocarpa* NAC genes. This study provides useful information for reference gene selection in qRT-PCR analysis of gene expression in *P. trichocarpa*. It is also helpful to elucidate the function of *P. trichocarpa* NAC genes.

**Key words** NAC, *Populus trichocarpa*, qRT-PCR, reference gene, Zn stress

**Su XJ, Fan BG, Yuan LC, Cui XN, Lu SF** (2013). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa*. *Chin Bull Bot* **48**, 507–518.

\* Author for correspondence. E-mail: sflu@implad.ac.cn