

绿豆实时荧光定量PCR内参基因的筛选与验证

钱猛, 杨娜, 朱昌华, 夏妍*

南京农业大学生命科学学院生物学实验教学中心, 南京210095

*通信作者(yxia@njau.edu.cn)

摘要: 实时荧光定量PCR作为研究基因表达的重要手段, 在操作过程中需要内参基因作校正与标准化。本文以绿豆(*Vigna radiata*)野生型‘苏绿1号’(苏绿)及其突变体08 (08)为材料, 采用实时荧光定量PCR技术分析6个候选内参基因(*EF1α*、*TUA*、*TUB*、*CHS*、*GADPH*、*Actin*)在不同品种、不同部位(根、茎、叶)及镉诱导前后的表达趋势, 继而利用geNorm、NormFinder和BestKeeper这三款软件对候选内参基因的表达稳定性进行综合分析, 最后利用目的基因*Nramp5*进行验证。实验结果表明, *Actin*与*TUA*是所有样品中表达最稳定的内参基因, *CHS*表达稳定性最差。本研究为将来绿豆基因表达分析的相关研究提供了参考。

关键词: 绿豆; 实时荧光定量PCR; 内参基因; 镉

Selection and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in mung beans

QIAN Meng, YANG Na, ZHU Changhua, XIA Yan*

Experiment Teaching Center of Agriculture Biology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

*Corresponding author (yxia@njau.edu.cn)

Abstract: Real-time fluorescent quantitative PCR, as an important method to investigate gene expression, requires reference genes to be corrected and standardized in the process of operation. We used mung beans (Wild type Sulu and mutant 08) as materials. We investigated the expression stability of six candidate reference genes (*EF1α*, *TUA*, *TUB*, *CHS*, *GADPH* and *Actin*) in different varieties, with or without cadmium treatment, and in different parts, including roots, stems and leaves by real-time fluorescent quantitative PCR, and then the expression of candidate reference genes were analyzed by geNorm, NormFinder and BestKeeper. Finally, target gene *Nramp5* was used to verify the stability. The results showed that the expression stability of *Actin* and *TUA* was the best in different varieties, with or without cadmium treatment, and different parts, while *CHS* was the worst. The results of this study provide a reference for the future research of mung beans gene expression analysis.

Key words: mung bean (*Vigna radiata*); real-time fluorescence quantitative PCR; reference genes; cadmium

在进行qRT-PCR过程中, 为减少RNA逆转录效率、产量和质量等方面的差异对实验结果造成的影响, 通常会选择一定数量的内参基因进行校正和标准化。内参基因在扩增中的变化可以反映RNA产量、质量以及cDNA合成效率的变化, 因此选择合适的内参基因以减少检测样品间的差异至关重

要。内参基因的特点是不受外界环境的影响, 在不同类型样品中表达很稳定。以往研究者在研究

收稿 2021-04-29 修定 2021-08-09

资助 2020年江苏高校品牌专业建设工程二期(生物科学专业)项目和南京农业大学大学生创新创业训练专项(S201900002和202010307028Z)。

模式植物[玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等]的基因表达中,管家基因*Actin*、*18S rRNA*、*TUB*等作为内参基因被广泛应用。但后续研究发现管家基因的表达水平会受到细胞类型、培养条件或细胞周期等因素的影响,还可能在有丝分裂期间大大减少。例如*18S rRNA*常被用来作内参基因,其效果并不理想(张芳明2013): (1)目的基因丰度如果较低,而*18S rRNA*表达丰度过高,则准确性较差; (2)反转录时需设计随机引物,而目的基因反转录通常使用oligo dT,这可能会使二者的反转录效率不同而影响基因表达水平的可比性; (3)不同生理状态的组织器官中rRNA与mRNA的比例并不是恒定不变的, rRNA合成的调节独立于mRNA,且起转录过程易受到各种生物因素和药物的影响,其表达水平也并不是恒定不变的,在有丝分裂期间, *18S rRNA*明显减少或停止表达。这使得管家基因作为qRT-PCR内参基因的功能受到了质疑。因此,应根据研究对象和研究条件的不同选择二种或几种表达量稳定的内参基因。

随着内参基因筛选方法与稳定性分析方法的建立与创新,近年来有越来越多的关于内参基因的研究被报道。Su等(2020)评估了猪殃殃(*Galium spurium*)在不同生物(发育阶段和组织)和非生物(温度、区域和除草剂)条件下7个传统内参基因(*18S rRNA*、*28S*、*ACT*、*GAPDH*、*EF1 α* 、*RPL7*、*TBP*)的稳定性,经4种分析算法(*geNorm*、*NormFinder*、*BestKeeper*、 ΔC_t)分析并使用综合分析软件*RefFinder*对其进行排序,结果表明*28S*和*RPL7*在不同试验条件(发育阶段、组织、温度、区域和除草剂处理)下均为最佳; *28S*和*RPL7*在不同发育阶段中为最佳; *TBP*和*GAPDH*在不同组织中为最佳; *28S*和*GAPDH*在不同温度下相对稳定, *28S*和*TBP*适合在除草剂处理情况下使用。周琳等(2020)以不同品种彩色马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)的不同组织为材料,分析了6个候选内参基因(*ACT*、*18S rRNA*、*GAPDH*、*EF1 α* 、*TUB*、*LEU*),结合相关软件的分析结果发现, *GAPDH*、*18S rRNA*与*LEU* 3个内参基因的表达稳定性最好。Pu等(2020)以白车轴草(*Trifolium repens*)的根和叶为材料,分析了*ACT7*、*ACT101*、*TUA1109*、*TUB*、*CYP*、*60S rRNA*、*UBQ*、

E3、*GAPDH1*、*GAPDH2*、*PP2A*、*BAM3*、*SAMDC*和*ABC*这14种内参基因在干旱、盐、高温、低温和重金属这5种非生物胁迫下的表达情况——发现在干旱胁迫下, *SAMDC*和*UBQ*分别是叶片和根系中最稳定的内参基因; *UBQ*、*SAMDC*和*60S rRNA*可作为盐胁迫的内参基因; 对于温度胁迫,在根和叶中最稳定最好的分别是*UBQ*和*60S rRNA*; *UBQ*和*ACT101*分别是重金属胁迫下叶和根中最稳定的基因。Ma等(2020)分析了冬油菜(*Brassica campestris*)中10个候选内参基因(*β -actin*、*GADPH*、*TIP41*、*F-box*、*UBC*、*SAND*、*RPL*、 *β -TUB*、*EF1 α* 、*PP2A*) 在4种非生物胁迫下根和叶中的表达稳定性。最稳定的内参基因组合如下: 低温胁迫叶片中的 *β -actin*和*SAND*, 低温胁迫根系中的 *β -actin*和*EF1 α* , 高温胁迫叶片中的*F-box*和*SAND*, 高温胁迫根系中的*PP2A*和*RPL*, NaCl胁迫叶片中的*SAND*和*PP2A*, NaCl胁迫根系中的*RPL*和*UBC*, PEG胁迫下叶片中的*RPL*和*PP2A*, 以及根系中的*PP2A*和*RPL*。Yin等(2021)第一次评估了Y病毒接种马铃薯(*Solanum tuberosum*)后编码和非编码基因表达谱的候选内参基因,在*sEF1 α* 、*sTUBb*、*sGAPDH*、*sU2af*、*seIF5*、*sPP2A*、*sGTP*、*sSUII*中*sEF1 α* 、*sTUBb*和*seIF5*具有较高的稳定性,最不稳定的是*sGAPDH*、*sPP2A*和*sSUII*。Chen等(2021)以丝瓜(*Luffa cylindrica*)为材料,在各种非生物胁迫下筛选表达稳定的内参基因,经*geNorm*、*BestKeeper*、*NormFinder*和*RefFinder*分析发现,高温、低温与ABA处理下*EF1 α* 的表达最稳定,盐处理下*UBQ*表达更稳定, *TUB*在过氧化氢与干旱处理下表达最稳定。Li等(2021)为筛选最适合研究植物体细胞胚胎发生(SE)的内参基因,对杂种鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)体细胞胚胎发生和后续萌发培养中的10个候选内参基因进行分析,经验证, *EF1g*、*HIS1*、*GAPDH*和*TUA*适合SE组织, *EF1g*和*ACT*适合萌发组织。Rossatto等(2021)从不同盐胁迫处理7 d后的耐盐逆境水稻栽培变种BRS AG的叶片、谷粒、花序轴、叶鞘中提取RNA,评估9个候选内参基因的表达水平(*ACT11*、*UBC-E2*、*Eef-1 α* 、*GADPH*、 *β -Tub*、*Eif-4- α* 、*UBQ10*、*UBQ5*、*TIP41-like*、*cyclophilin*),叶片中表达最稳定的为*UBC-2E*和*GAPDH*,叶鞘中为

UBQ5和UBQ10, 花序轴为TIP41和UBQ10, 谷粒为TIP41和cyclophilin。

绿豆(*Vigna radiata*)主要种植在温带及亚热带地区。作为我国的重要经济作物, 绿豆的种植面积和产量均位居世界前列。在我国, 绿豆种植历史悠久, 主要产区在黄河、淮河流域及东北地区。从播种面积看, 主要集中在内蒙古、吉林、安徽、河南、山西、陕西和湖南, 合计占全国播种总面积的78.8%; 从产量看, 吉林和内蒙古最多, 合计占总产量的42.2%, 其次是河南、湖南、山西、新疆、重庆、四川和湖北; 从单位面积产量看, 新疆、湖南和四川都在2 000 kg·hm⁻²以上, 位居全国前列。

但到目前为止, 国内外的关于Cd胁迫与绿豆的研究主要集中在Cd胁迫下绿豆生长发育状态、矿物元素、抗氧化系统、光合作用等生理生化状态的改变(Ashraf等2016)。

本研究以TUA、EF1 α 、CHS、TUB、GADPH、Actin为候选内参基因, 以绿豆野生型‘苏绿1号’及其突变体08 (Cd耐性)为材料, 采用qRT-PCR技术分析上述基因在3种不同组织器官以及Cd处理前后的表达水平, 并借助3款软件(NormFinder、Best-Keeper和geNorm)进行分析, 从而筛选出表达最稳定的内参基因, 并以Nramp5为目的基因, 进行表达水平验证。本实验为后续绿豆基因表达水平的研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究以绿豆[*Vigna radiata* (Linn.) Wilczk]野生型‘苏绿1号’(苏绿)及其突变体08 (为射线诱变获得)为供试材料, 种子由该课题组白马基地繁殖获得。

1.2 实验方法

1.2.1 植物材料培养

挑选饱满、胚芽完好的绿豆种子, 浸泡过夜。待第2天种皮胀开后播种到蛭石中, 放入培养箱中25℃培养。等子叶完全展开后, 将长势均匀的幼苗转移至培养杯, 并用1/2霍格兰营养液进行培养, pH调至5.5, 营养液2 d更换一次。设置3个生物学重复。相对湿度60%~80%, 白天时长16 h、温度

25℃, 夜间时长8 h、温度20℃。第一对三出复叶长出后, 向营养液中加入0 (CK)、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl₂处理12 h。12 h后取样, -80℃冰箱中保存。

1.2.2 提取总RNA及cDNA合成

绿豆不同部位的总RNA按照试剂盒法提取(Omega, Plant RNA Kit), 总RNA的完整性用琼脂糖凝胶电泳检测, 总RNA的纯度用微量分光光度计NanoDrop检测, 按照莫纳生物公司的MonScriptTM RTIII Super Mix with dsDNase (Two-Step)试剂盒方法进行反转录成cDNA, 置于-20℃保存备用。

1.2.3 选择内参基因及设计引物

本实验在绿豆全基因组中挑选了6个传统的候选内参基因, 分别是EF1 α (转录延伸蛋白因子编码基因)、TUA (α -微管蛋白编码基因)、TUB (β -微管蛋白编码基因)、CHS (查尔酮合成酶编码基因)、GADPH (3-磷酸甘油醛脱氢酶编码基因)和Actin (肌动蛋白编码基因), 这6个候选内参基因的cDNA序列通过NCBI数据库查找所得。候选内参基因的引物使用Primer Premier软件设计, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成(序列详见表2)。

1.2.4 PCR扩增及扩增效率分析

为确认所设计的引物特异性, 普通PCR以合成的cDNA为模板, 反应体系15 μL : cDNA模板1 μL , Taq PCR Mix 7.5 μL , 上游引物和下游引物各0.6 μL , 灭菌去离子水5.3 μL 。反应程序: 95℃预变性5 min, 95℃变性15 s, 60℃退火15 s, 72℃延伸1 min, 进行35个循环, 最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。

把cDNA原液等量混合后再稀释5倍, 浓度梯度设置5个, 以稀释后的cDNA为模版进行qRT-PCR, 同时设置无模版的阴性对照, 用于制备标准曲线。每个样品作3次技术重复。程序结束后, 计算相关系数(R^2)与扩增效率(E) (公式 $E=2^{-1/k}-1$)。

1.2.5 实时荧光定量PCR

qRT-PCR实验试剂盒采用ChemoHS qPCR Mix (MonAmpTM), 在实时荧光定量PCR仪(ABI 7500)上进行。10 μL 反应体系: 上游引物和下游引物各0.4 μL , 5 μL MonAmpTM ChemoHS qPCR Mix, 0.1 μL Low ROX Dye, 1~2 μL cDNA模板, 最后加入Nuclease-Free Water至体系为10 μL 。PCR扩增程

序: 95℃ 5 min; 95℃ 5 s变性, 60℃ 34 s退火延伸, 40个循环。每个样品设置3次重复。分析熔解曲线。

1.3 数据处理与分析

qRT-PCR结束后, 6个候选内参基因在所有样品中 C_t 值的分布箱线图均用Excel软件进行绘制, 再分别用geNorm、BestKeeper、NormFinder三款软件对所有样品中候选内参基因的稳定性进行分析评价。

1.4 验证内参基因的可靠性

根据分析结果, 选择2个稳定性最佳与1个稳定性最差的候选内参基因作为内参基因。分别对绿豆的*Nramp5*基因的表达水平进行分析, 从而验证候选内参基因的稳定性。

2 实验结果

2.1 总RNA质量验证与引物特异性评价

经NanoDrop检测, 所有样品的 $A_{260}/280$ 均在2.15左右, 且浓度高, 可以用于后续实验(表1)。

普通PCR扩增实验以各样品的cDNA为模板, 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。电泳结果如图1所示。扩增产物呈单一条带, 且较为清晰, 无弥散、无杂带和引物二聚体, 同预期大小相符, 说明引物特异性良好。

6个候选内参基因扩增效率范围为91.968%~98.944%, 标准曲线的相关系数范围为0.980~0.998, 满足内参基因的基本要求, 可用于后续实验(表2)。如图2显示, 6个候选内参基因的各条扩增曲线具有良好重复性, 熔解曲线特异性良好, 且均为单一峰, 表明结果准确可靠。

2.2 内参基因 C_t 值表达谱分析

在荧光定量PCR技术中, C_t 值(cycle threshold)

代表每个反应管中的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。 C_t 值越大, 表示模板的浓度越小, 基因表达量越低, 反之亦然。分析6个候选内参基因 C_t 值的箱线图(图3), 可知*Actin*、*GADPH*、*TUA*的 C_t 值变化较小, 分别为18.839~23.930、26.107~33.812、18.997~24.281, 其次为*EF1 α* 与*TUB*, *CHS*的 C_t 值变化最大, 达19.814~38.933。从分布范围上来看, *Actin*、*GADPH*和*TUA*分布较集中, *CHS*分布较分散; 从表达水平来看, *Actin*、*TUA*和*EF1 α* 的表达水平较高, *CHS*与*GADPH*较低。因此可初步判断*Actin*、*GADPH*和*TUA*的表达水平较其他基因更稳定, 可作为候选内参基因。

2.3 候选内参基因表达稳定性分析

2.3.1 geNorm软件分析

从表3中分析可得: 6个候选内参基因的 M 值均小于1.5, 即理论上这6个基因均可作为内参基因。在无Cd情况下, 苏绿品种不同部位间比较, *TUA*的 M 值为0.176, *Actin*的 M 值为0.177, *TUA*的稳定性较*Actin*要稍好一些。而在其他情况下, 均是*Actin*的表达稳定性更好, *TUA*稳定性其次。而*CHS*的 M 值无论在不同品种、不同部位还是不同处理之间均是最大的, 即表明*CHS*的稳定性最差。由表4分析可知, V_n/V_{n+1} 均小于0.15, 说明应选取2个基因作为内参基因最为合理。综合上述分析, 选择*TUA*与*Actin*作内参基因最为可靠。

2.3.2 NormFinder软件分析

由图4的A、E可知, 未施加Cd时, 不同品种之间、苏绿的不同部位之间*TUA*的 M 值比*Actin*小, 即表达稳定性更好。在其他情况下*Actin*的表达稳定性优于*TUA*。而所有样品中*CHS*依旧是 M 值最高的基因, 则*CHS*的稳定性最差。NormFinder与geNorm的分析结果基本一致。

表1 样品总RNA检测
Table 1 Total RNA detection of samples

样品	苏绿CK			苏绿Cd			08 CK			08 Cd		
	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶
$A_{260}/280$	2.18	2.12	2.18	2.11	2.16	2.17	2.17	2.08	2.14	2.18	2.12	2.13
浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	975.0	524.9	794.1	610.2	340.3	1 198.8	760.5	510.9	1 909.0	1 129.5	370.6	705.3

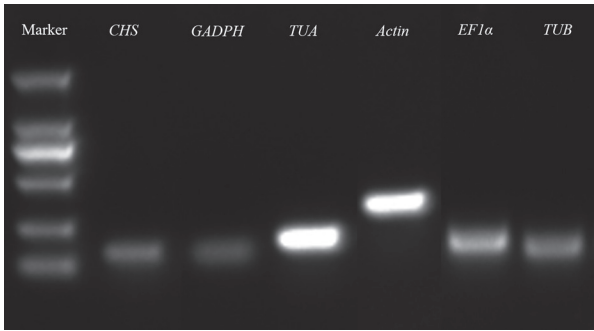


图1 以cDNA为模版6个内参基因的PCR产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of six reference genes using cDNA as template

2.3.3 BestKeeper软件分析

分析表5中各个内参基因的标准偏差可知, 所有样品、不同品种、不同部位和不同处理中, 内参基因GADPH、*EF1α*、*TUB*与*CHS*的标准偏差变动大($SD>1$), 故排除; 而内参基因*Actin*、*TUA*的标准偏差均小于1, 其中*Actin*的标准偏差最小, 表明*Actin*基因的稳定性最好。

2.4 验证内参基因稳定性

综合NormFinder、geNorm和BestKeeper三个软件的分析结果, 所选的6个候选内参基因中, 表达最稳定的是*Actin*, 其次是*TUA*, 而表达稳定性最差的是*CHS*。

为进一步确认筛选到的内参基因的稳定性,

根据上述分析, 选择了稳定性最好的*Actin*与*TUA*以及稳定性最差的*CHS*基因进行验证。分别以上述3个基因为内参基因, 分析目的基因*Nramp5*在不同条件下的表达模式。

结果显示, 目的基因在08中的相对表达量高于苏绿, 在同一品种中的含量从根到茎到叶逐步递减(图5)。并且当用*Actin*与*TUA*作内参基因时, 目的基因的表达量相似, 变化趋势也相同。而用*CHS*作内参基因时, 发现目的基因不管在哪种样品中含量都非常低, 说明其不适作内参基因。该结果进一步验证了筛选出的*Actin*与*TUA*基因作为内参基因的稳定性。

3 讨论

qRT-PCR作为一项能快速定量分析未知模板的技术手段, 自发明以来发展迅速, 目前已广泛应用于医疗研究、生物、食品安全、国防军事等领域。标准化是正确检测基因表达的先决条件, 对于qRT-PCR来说, 用内参基因进行标准化是最常用的校正策略。由于管家基因是维持细胞基本生命活动所不可缺少的, 在所有的细胞类型中都有表达, 并且表达水平较稳定, 因此常被用作内参基因。常用的内参基因有转录延伸因子编码基因*EF1α*、肌动蛋白编码基因*Actin*、泛素编码基因*UBQ*、*18S rRNA*和*28S rRNA*等(张玉芳等2014)。但随着进一步研

表2 候选内参基因的引物信息
Table 2 Primer sequence of candidate reference genes

基因	引物序列(5'→3')	$T_m/^{\circ}C$	片段长度/bp	线性相关系数(R^2)	扩增效率/%
<i>Actin</i>	正向: GGCGGTGTTCCCTAGCATTG	88.4	246	0.996	91.968
	反向: AGCGGTGCCTCGGTAAGAAG				
<i>CHS</i>	正向: CGTTCTGAGCGAATATGGAAAC	86.2	137	0.980	98.040
	反向: GTCCGAACCCAAATAAAACCC				
<i>EF1α</i>	正向: AGCGTGAAAGAGGAATTACCATCG	83.8	153	0.998	98.944
	反向: CAATAATAAGGACAGCACAATCAGC				
<i>GADPH</i>	正向: CGTTTTACCCCTTTTCCG	86.1	258	0.994	98.290
	反向: CGTGATGCTTCCAGTGTCCG				
<i>TUA</i>	正向: GGTCAAATGCCAAGTGACAAAACAG	86.6	150	0.989	97.800
	反向: GTAAGGTCCAGTCCTAACCTCATCG				
<i>TUB</i>	正向: GCTTATGGATCTTGAACCTGGAA	87.5	136	0.994	94.242
	反向: GCCTTCGGTATAATGACCTTTCG				

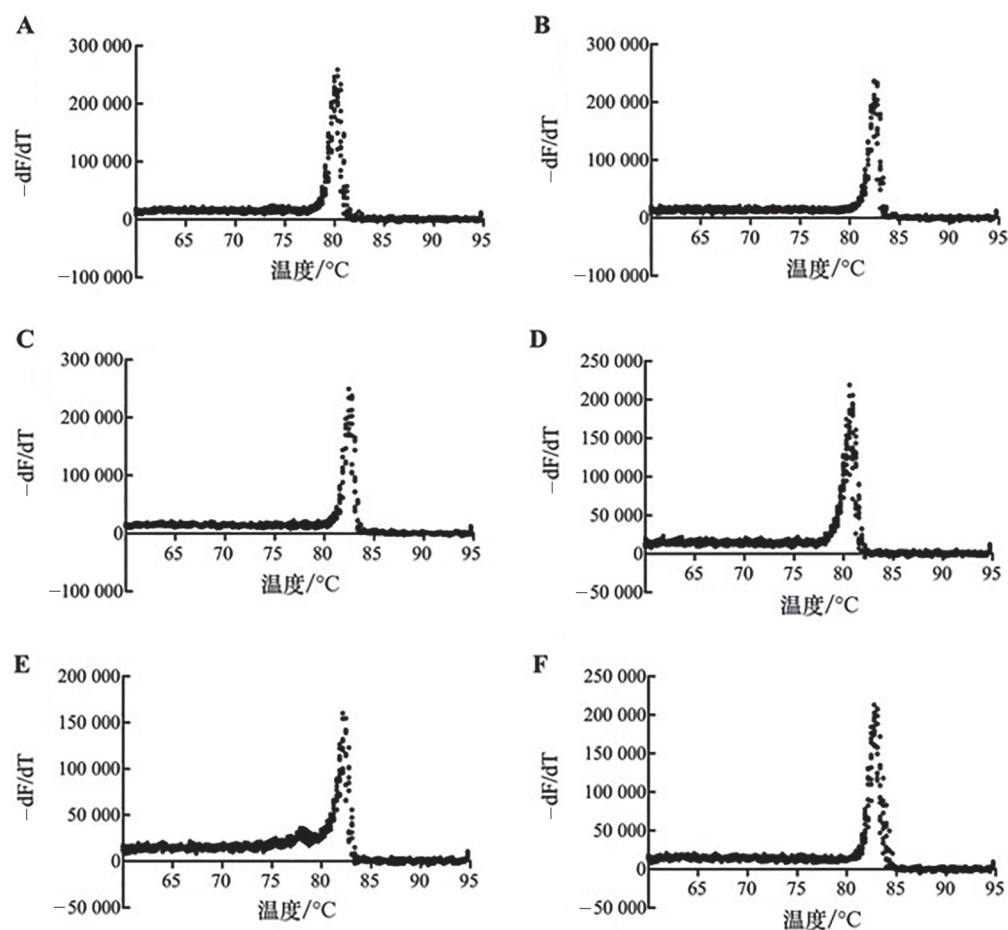


图2 候选内参基因的熔解曲线
Fig. 2 Melting curves of candidate reference genes

A、B、C、D、E、F分别为*EF1α*、*TUA*、*TUB*、*CHS*、*GADPH*、*Actin* 6个候选内参基因的熔解曲线。

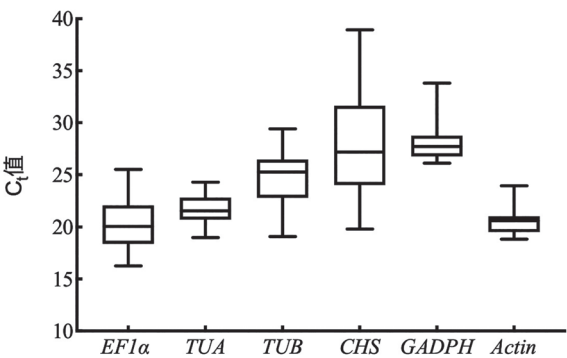


图3 候选内参基因在样品中的表达谱
Fig. 3 Expression profile of candidate reference genes in samples

究发现,发育时期、物种、实验条件及组织器官的不同均可能影响管家基因的表达水平,即管家基因的稳定性是相对的。例如,从不同非生物胁迫及不同激素处理下,对玉米内参基因的筛选结果来看,不同条件下应选择不同的内参基因:低温胁迫下应选择*CYP*、*EIF4A*、*EF1α*;高温胁迫下应选择*CYP*、*EIF4A*、*EF1α*、*ACT2*;盐胁迫下应选择*CYP*、*EIF4A*、*EF1α*、*ACT2*、*TUB*、*GADPH*;铝毒胁迫下应选择*CYP*、*EIF4A*;赤霉素诱导下应选择*ACT2*、*TUB*;乙烯诱导下应选择*EF1α*、*TUB*(齐月爱2012)。

绿豆作为一种重要的传统农作物,作为日常饮食,可为机体提供优质的植物蛋白质,在增强免

表3 geNorm软件分析候选内参基因的表达稳定性

Table 3 Analysis of expression stability values of candidate reference genes by geNorm software

基因	表达稳定值(<i>M</i>)								所有样品
	不同品种		不同部位				不同处理		
	CK	Cd	CK (08)	Cd (08)	CK (苏绿)	Cd (苏绿)	08	苏绿	
<i>Actin</i>	0.146	0.148	0.115	0.135	0.177	0.152	0.131	0.161	0.149
<i>TUA</i>	0.147	0.159	0.135	0.138	0.176	0.168	0.161	0.167	0.154
<i>GADPH</i>	0.166	0.167	0.177	0.143	0.203	0.179	0.133	0.187	0.169
<i>EF1α</i>	0.192	0.201	0.152	0.186	0.245	0.213	0.167	0.223	0.201
<i>TUB</i>	0.213	0.210	0.117	0.171	0.214	0.216	0.143	0.206	0.211
<i>CHS</i>	0.282	0.301	0.138	0.210	0.350	0.355	0.187	0.337	0.293

表4 geNorm软件确定内参基因最适数目

Table 4 Number of optimal reference genes determined by geNorm software

内参基因配对数 (V_n/V_{n+1})	配对变异值								所有样品
	不同品种		不同部位				不同处理		
	CK	Cd	CK (08)	Cd (08)	CK (苏绿)	Cd (苏绿)	08	苏绿	
$V_{2/3}$	0.034	0.035	0.023	0.033	0.044	0.036	0.029	0.037	0.034
$V_{3/4}$	0.041	0.034	0.033	0.027	0.035	0.035	0.037	0.034	0.038
$V_{4/5}$	0.031	0.033	0.044	0.036	0.042	0.033	0.036	0.037	0.032
$V_{5/6}$	0.045	0.048	0.036	0.032	0.056	0.058	0.034	0.054	0.047

疫力、预防肌肉衰竭等方面具有显著的功能; 作为一种药物, 绿豆可清热消暑、利水通尿。此外, 研究绿豆在不同条件下的基因表达模式与功能机制, 可推动人们利用遗传育种、基因突变等手段增加绿豆产量。本文结合前人研究结果, 在绿豆全基因组数据库中挑选了*EF1α*、*TUA*、*TUB*、*CHS*、*GADPH*、*Actin* 6个候选内参基因, 通过qRT-PCR得到各个基因 C_t 值, 然后用geNorm、BestKeeper、NormFinder这三款软件进行分析。结果显示不同软件对6个内参基因表达稳定性的评估并不完全一致, 这种现象在龙眼(*Dimocarpus longan*) (林玉玲2011)、柑橘(*Citrus reticulata*) (Mafra等2012)等其他研究中也有存在, 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。但对3款软件的结果进行综合分析来看, 表达最稳定的基因是*Actin*和*TUA*, 表达最不稳定的是*CHS*。据报道Nramp家族是植物中和Cd吸收相关的转运蛋白, Wu等(2016)研究表明大麦(*Hordeum vulgare*)根部HvN-

ramp5蛋白主要分布于表皮细胞的细胞膜, 负责Mn和Cd的吸收及地上部转运。因此, 本文分别以*Actin*、*TUA*、*CHS*这三个基因为内参基因分析目的基因*Nramp5*的表达模式, 发现*Actin*与*TUA*参照下的目的基因表达模式基本一致, 而*CHS*则相差较大且相对表达量非常低, 该结果进一步证实了*Actin*与*TUA*作为内参基因的可靠性。但耐镉型突变体08的耐镉表型是否由基因*Nramp5*降低了Cd的吸收及转运而导致的, 还有待进一步验证。

Cui等(2016)研究表明, 选择2个或多个基因作为内参基因使用, 这有助于调整系统偏差, 从而得到更加准确的基因定量结果。Bai等(2021)认为在虎坚果地下贮藏器官的不同发育时期的分析中应使用*TUB4*和*UCE2*, 在不同的组织间应使用*UCE2*和*UBL5*。Wang等(2019)发现在蒜瓣中, *Actin*和*SAND*的表达稳定性最好, 适合盐胁迫下的基因表达研究, 并且鼓励使用多个稳定的内参基因, 如*Actin*与*SAND*, 去标准化基因表达。结合上述分析,

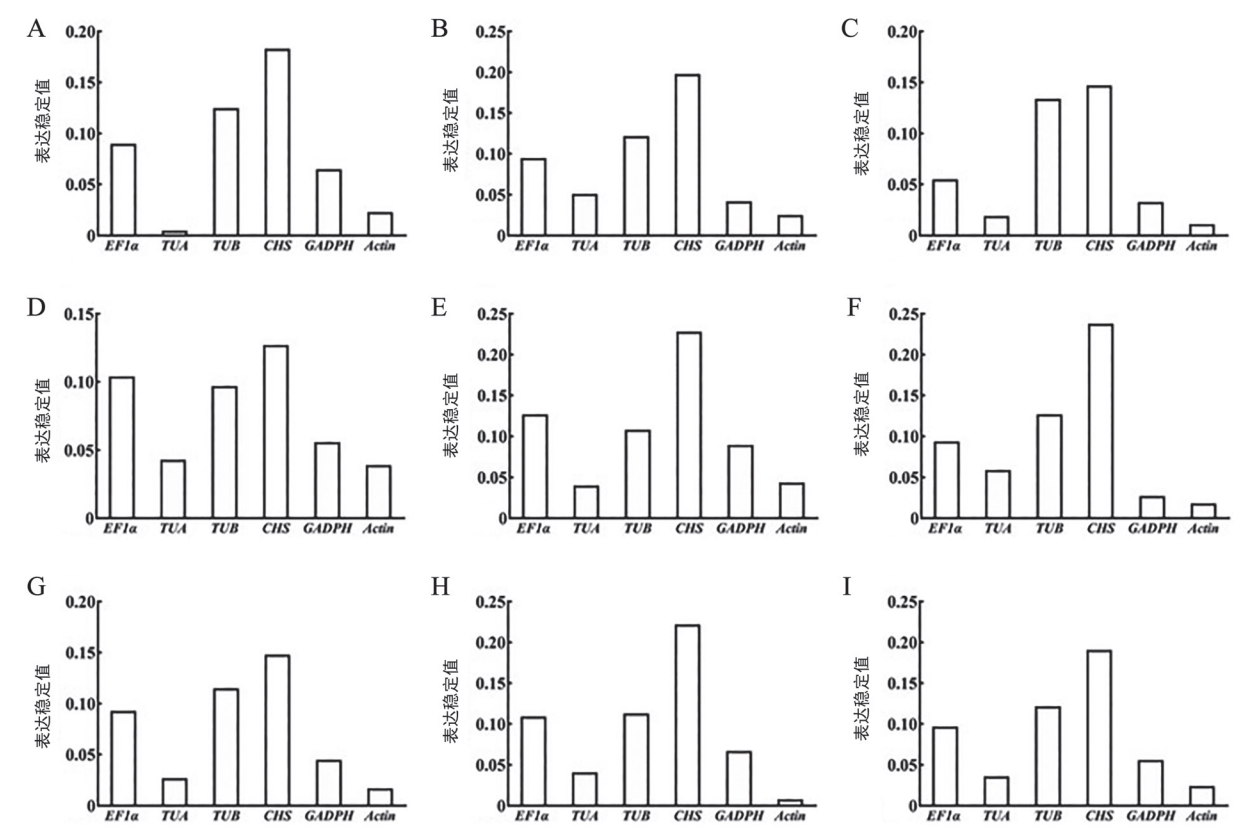


图4 NormFinder软件分析候选内参基因的表达稳定值

Fig. 4 Analysis of expression stability values of candidate reference genes by NormFinder software

A: 未施加Cd时苏绿与08之间的比较; B: Cd处理下苏绿与08之间的比较; C: 未施加Cd时08的不同部位之间比较; D: Cd处理下08的不同部位之间比较; E: 未施加Cd时苏绿的不同部位之间的比较; F: Cd处理下苏绿的不同部位之间的比较; G: 08中不同处理间样品的比较; H: 苏绿中不同处理间样品的比较; I: 所有样品之间的比较。

表5 BestKeeper软件分析候选内参基因的稳定性

Table 5 Expression stability values of candidate reference genes calculated by BestKeeper

基因	标准偏差(SD)								所有样品
	不同品种		不同部位				不同处理		
	CK	Cd	CK (08)	Cd (08)	CK (苏绿)	Cd (苏绿)	08	苏绿	
<i>Actin</i>	0.50	0.59	0.55	0.56	0.65	0.50	0.52	0.57	0.56
<i>TUA</i>	0.59	0.53	0.81	0.96	0.69	0.78	0.71	0.73	0.73
<i>GADPH</i>	1.39	1.40	0.84	1.70	1.89	1.05	1.25	1.63	1.46
<i>EF1α</i>	1.95	2.07	1.24	2.04	2.58	1.70	2.12	2.14	2.13
<i>TUB</i>	2.56	1.86	2.48	1.52	2.42	1.83	1.89	2.16	2.22
<i>CHS</i>	3.84	4.27	2.77	3.54	4.21	4.87	3.19	4.61	4.10

本研究认为同时使用*Actin*与*TUA*作内参基因可使实验结果更加准确。

肌动蛋白(*Actin*)由375~377个氨基酸残基组

成, 参与了细胞极性、细胞器运动、细胞分裂、信号转导、维持细胞形态、物质运输等重要的生命活动, 表达水平稳定, 是真核生物细胞中的重要蛋

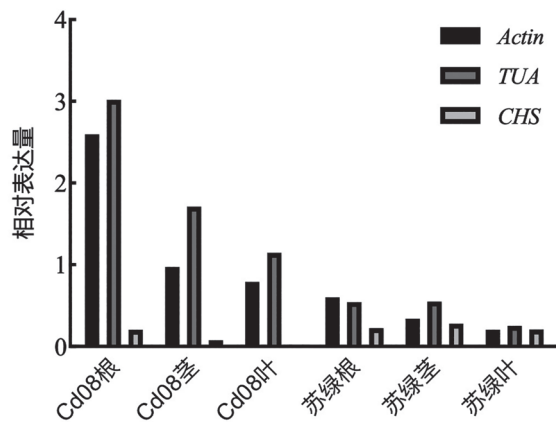


图5 以Actin、TUA、CHS作为内参基因分析目的基因Nrp55的表达量

Fig. 5 Expression analysis of Nrp55 using Actin, TUA and CHS as references

白质。因此Actin常被用作内参基因,并且目前已在杉木(*Cunninghamia lanceolata*) (张颖等2019)、芹菜(*Apium graveolens*) (Feng等2019)等物种中得到验证与应用。但在核桃(*Juglans regia*) (李雪等2017)、多花兰(*Cymbidium floribundum*) (张玥等2019)的研究中发现Actin并不适合作内参基因。TUA (α -微管蛋白)是细胞骨架的组成部分,使细胞内部结构有序排列,为细胞提供支撑作用,也参与了信号识别、细胞分化、物质运输等重要生命活动。与肌动蛋白一样, α -微管蛋白作为维持细胞生命活动的重要蛋白质,也常被作为内参基因使用,目前已在海带(*Laminaria japonica*) (于淼2013)、喀西茄(*Solanum khasianum*) (周晓慧等2014)等物种中得到验证,但在小报春(*Primula forbesii*) (Jia等2020)与虎杖(*Reynoutria japonica*) (Wang等2019)等物种中并不适用。查尔酮合成酶(CHS)是类黄酮类物质合成途径的关键酶,广泛存在于各种植物中,与花色变化、抵御逆境、花粉发育等生理生化活动有着重要作用。目前为止关于将CHS作为内参基因的研究并不常见,这可能是由于虽然CHS基因的起源时间早,并且广泛遍布于植物界,但CHS基因编码的蛋白主要作用于次生代谢途径,其功能涉及了植物生长发育的各个阶段,例如抗逆反应、颜色改变等,组织器官和表达时间均可能有所不同。

因此看来,CHS基因表达水平不稳定,易受不同发育时间、不同组织器官、不同实验条件等的影响,不满足理想内参基因所应满足的条件。本研究中以CHS为内参基因时目的基因相对表达水平低,可能也是这个原因所致。

综上所述,本研究分析了6种候选内参基因在绿豆不同品种、不同部位及Cd处理前后的表达稳定性,结合3款软件的分析结果显示,在所有样品中,Actin和TUA是表达稳定性最佳的内参基因,而CHS表达稳定性最差。该结果为将来绿豆基因表达分析的研究提供了参考。

参考文献(References)

- Ashraf MY, Roohi M, Iqbal Z, et al (2016). Cadmium (Cd) and lead (Pb) induced changes in growth, some biochemical attributes, and mineral accumulation in two cultivars of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Commun Soil Sci Plant*, 47: 405–413
- Bai X, Chen T, Wu Y, et al (2021). Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis in the oil-rich tuber crop tiger nut (*Cyperus esculentus*) based on transcriptome data. *Int J Mol Sci*, 22: 2569
- Chen MD, Wang B, Li YP, et al (2021). Reference gene selection for qRT-PCR analyses of luffa (*Luffa cylindrica*) plants under abiotic stress conditions. *Sci Rep*, 11: 3161
- Cui BT, Peter MS, Duncan AR, et al (2016). Selection of suitable reference genes for gene expression studies in *Staphylococcus capitis* during growth under erythromycin stress. *Mol Genet Genomics*, 291: 1795–1811
- Feng K, Liu JX, Xing GM, et al (2019). Selection of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis under abiotic stress and hormone treatment in celery. *PeerJ*, 7: e7925
- Jia Y, Liu SC, Zhao J, et al (2020). Reference gene selection and validation by qRT-PCR during flower development and in different organs of *Primula forbesii*. *J Hort Sci Biotech*, 95: 383–394
- Li TT, Yuan WG, Qiu S, et al (2021). Selection of reference genes for gene expression analysis in *Liriodendron hybrids*' somatic embryogenesis and germinative tissues. *Sci Rep*, 11: 4957
- Li X, Pan XJ, Zhang WE, et al (2017). Stability evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in walnut (*Juglans* spp.). *Plant Physiol J*, 53: 1795–1802 (in Chinese with English abstract) [李雪, 潘学军, 张文娥等 (2017). 核桃内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价. *植物生理学报*, 53: 1795–1802]
- Lin YA (2012). Reference gene selection for quantitative re-

- al-time PCR in maize treated with abiotic stresses and hormones (dissertation). Yaan, Sichuan: Sichuan Agriculture University (in Chinese with English abstract) [齐月爱(2012). 玉米在非生物胁迫和激素处理条件下实时荧光定量PCR内参基因的选择(学位论文). 四川雅安: 四川农林大学]
- Lin YL (2011). Studies on cloning expression and regulation of SOD family during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour (dissertation). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [林玉玲(2015). 龙眼体胚发生过程中SOD基因家族的克隆及表达调控研究(学位论文). 福州: 福建农林大学]
- Ma L, Wu JY, Qi WL, et al (2020). Screening and verification of reference genes for analysis of gene expression in winter rapeseed (*Brassica rapa* L.) under abiotic stress. *PLOS One*, 15: e0236577
- Pu Q, Li Z, Nie G, et al (2020). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in white clover (*Trifolium repens* L.) involved in five abiotic stresses. *Plants*, 9: 996
- Rossatto T, Auler PA, Amaral MN, et al (2021). Selection of reference genes for qRT-PCR studies in different organs of rice cultivar BRS AG submitted to recurrent saline stress. *Russ J Plant Physiol*, 68: 254–265
- Su X, Lu LY, Li YS, et al (2020). Reference gene selection for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) expression analysis in *Galium aparine* L. *PLOS One*, 15: e0226668
- MafraV, Kubo KS, Alves-ferreira M, et al (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLOS One*, 7: e31263
- Wang GL, Tian C, Wang YP, et al (2019). Selection of reliable reference genes for quantitative RT-PCR in garlic under salt stress. *PeerJ*, 7: e7319
- Wang XW, Wu ZJ, Bao WQ, et al (2019). Identification and evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Polygonum cuspidatum* based on transcriptome data. *BMC Plant Biol*, 19: 498–509
- Wu D, Yamaji N, Yamane M, et al (2016). The HvNramp5 transporter mediates uptake of cadmium and manganese, but not iron. *Plant Physiol*, 172: 1899–1910
- Yin ZM, Xie FL, Michalak K, et al (2021). Reference gene selection for miRNA and mRNA normalization in potato in response to potato virus Y. *Mol Cell Probe*, 55: 101691
- Yu M (2013). The selection of reference genes in *Saccharina japonica* and phylogenetic analysis of partial housekeeping genes (dissertation). Qingdao, Shandong: Ocean University of China (in Chinese with English abstract) [于淼(2013). 海带(*Saccharina japonica*)内参基因筛选及部分管家基因的系统进化分析(学位论文). 山东青岛: 中国海洋大学]
- Zhang FM (2013). Selection of reference genes in sweet cherry (dissertation). Zhengzhou: Henan Agriculture University (in Chinese with English abstract) [张芳明(2013). 甜樱桃内参基因的筛选(学位论文). 郑州: 河南农业大学]
- Zhang Y, Chen J, Xie TX (2019). Reference gene selection of real-time quantitative PCR in *Cymbidium floribundum*. *Mol Plant Breed*, 17: 8163–8169 (in Chinese with English abstract) [张玥, 陈娟, 谢泰祥等(2019). 多花兰实时荧光定量PCR内参基因的筛选. *分子植物育种*, 17: 8163–8169]
- Zhang Y, Chen WT, Chen RH (2019). Quantitative real-time RCR analysis of *Cunninghamia lanceolata* in the selection of the reference genes. *For Res*, 32: 65–72 (in Chinese with English abstract) [张颖, 陈婉婷, 陈冉红等(2019). 杉木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. *林业科学研究*, 32: 65–72]
- Zhang YF, Zhao LJ, Zeng YL (2014). Selection and application of reference genes for gene expression studies. *Plant Physiol J*, 50 (8): 1119–1125 (in Chinese with English abstract) [张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲(2014). 基因表达研究中内参基因的选择与应用. *植物生理学报*, 50: 1119–1125]
- Zhou L, Zhang YC, Cai YM, et al (2020). Screening of qRT-PCR reference genes in different varieties and tissues of *Zantedeschia hybrida*. *Mol Plant Breed*, 18: 3971–3979 (in Chinese with English abstract) [周琳, 张永春, 蔡友铭等(2020). 彩色马蹄莲不同品种和组织qRT-PCR内参基因筛选. *分子植物育种*, 18: 3971–3979]
- Zhou XH, Liu J, Zhuang Y (2014). Selection of appropriate reference genes in *Solanum aculeatissimum* for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. *Acta Horti Sin*, 41: 1731–1738 (in Chinese with English abstract) [周晓慧, 刘军, 庄勇(2014). 喀西茄内参基因实时荧光定量PCR表达稳定性评价. *园艺学报*, 41: 1731–1738]