

地黄实时定量PCR内参基因的筛选

侯维海^{1,2}, 孙鹏², 陈全家¹, 李先恩²

¹新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052;

²中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 笔者通过RT-qPCR分析了地黄中7个传统内参基因18S、EF-1 α 、ACT11、UBQ10、UBQ5、TUB5、GAPDH和4个新报道的内参基因PP2A、RP II、HSP90、TIP41的mRNA表达差异情况, 分别利用Ct值比较, GeNorm、NormFinder和BestKeeper软件分析它们在2个发育时期、8种不同组织器官中表达稳定性。结果表明: 在地黄花器官中(花瓣、花托、雄蕊、雌蕊、子房), TIP41和UBQ10表达稳定; 在地黄生殖生长期和营养生长期不同器官中(根、茎、叶), TIP41和UBQ5表达稳定。因此, 以上2组基因分别适宜作为不同营养器官的内参基因。

关键词: 实时定量PCR; 内参基因; GeNorm程序; 地黄

中图分类号: S-3

文献标志码: A

论文编号: 2010-3219

Selection of the Reference Genes for Gene Expression Studies in *Rehmannia glutinosa* by Real-time Quantitative PCR

Hou Weihai^{1,2}, Sun Peng², Chen Quanjia¹, Li Xian'en²

¹College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052;

²Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Abstract: A total of 11 reference genes were systematically compared in different tissues of *Rehmannia glutinosa* using RT-qPCR, including 7 traditional reference genes (ACT11, 18S, TUB5, GAPDH, EF-1 α , UBQ10 and UBQ5) and 4 novel candidates reference gene (HSP90, PP2A, RP II and TIP41) in this study. The mRNA levels of these genes were analyzed among the organs of flowers, roots, stems and leaves representing the vegetative growth phase and the generative growth phase. The stabilities of the 11 candidate reference genes were ranked by the Ct value comparison and three softwares (GeNorm, NormFinder and BestKeeper). The results showed that the expression of TIP41 and UBQ10 was stable in different tissues of sepals, petals, stamens, pistils, and ovary from flower. For the case of the roots, stems and leaves sampled in vegetative growth phase and generative growth phase, UBQ5 and TIP41 were expressed stably. As a result, the 2 groups of candidate genes were selected as reference genes for *Rehmannia glutinosa*.

Key words: real-time quantitative PCR; reference gene; GeNorm; *Rehmannia glutinosa*

0 引言

实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)凭借其定量准确、高重现性、高灵敏度和高

通量等特点, 已被广泛应用于微生物检测、单个核酸多态性分析和基因表达研究^[1-7]。尽管RT-qPCR是一种强有力的工具, 但是它最大的缺点在于数据的处理分

基金项目: 国家科技重大专项课题“中药材种子种苗和种植(养殖)标准平台”(2009ZX09308-002)。

第一作者简介: 侯维海, 男, 1985年出生, 甘肃张掖市高台县人, 硕士, 研究方向: 药用植物遗传育种。通信地址: 100193 北京市海淀区马连洼北路151号, 中国医学科学院药用植物研究所科研楼108, Tel: 010-62812675, E-mail: houwei.hai@163.com。

通讯作者: 李先恩, 男, 1964年出生, 江西吉安人, 研究员, 硕士, 主要从事药用植物种质资源与栽培技术的研究。通信地址: 100193 北京市海淀区马连洼北路151号 栽培中心, Tel: 010-62810019, E-mail: xeli@implad.ac.cn。

收稿日期: 2010-11-10, **修回日期:** 2011-05-06。

析^[8]。RT-qPCR数据处理和分析,结果往往会受到不同变量的影响,与目标基因特异性表达的真实值存在一定的差异,这些变量包括:起始材料的质量、RNA质量(纯度、完整性、DNA的污染)、反转录效率、扩增效率和内参基因的选择等^[9]。在基因表达分析中,为了控制样品之间和样品内部的差异,通常利用表达稳定的内参基因进行校正和标准化^[10],以减少样本之间的误差^[11]。

传统的管家基因常常作为内参基因,如18S核糖体RNA(18S),3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*),转录延伸因子基因(*EF*),多聚泛素酶基因(*UBQ*),肌动蛋白基因(*ACT*), α 微管蛋白和 β 微管蛋白基因(*TUA*, *TUB*)等,但是很多报道认为,这些基因在不同的环境条件下表达不尽稳定^[12-13],因此许多研究者着力寻找在特定环境条件下稳定表达的内参基因。还有许多研究^[14-15]认为,单个内参基因用来作标准可能导致相对误差增大,至少用2~3个内参基因作为标准可以减少标准化带来的误差。

目前,在植物分子生物学研究领域有许多关于筛选稳定的内参基因的报道,其中在模式植物、经济作物中研究较多,如拟南芥、烟草、大豆、白杨、水稻、大麦、咖啡、马铃薯、西红柿等植物^[16-23]。一些新的内参基因相继被鉴定,Ruibo Hu(2009)认为 *SKIP16* (*SKP1/Ask-Interacting Protein 16*)、*MTP* (*Metalloprotease, Insulin degrading Enzyme*)、*TIP41* 和 *UNK1* (*Hypothetical protein*)等基因在大豆发育的不同阶段,表达非常稳定。J.V. Die^[27]发现 *PP2A* 在豌豆中非常稳定。Huolin Luo^[28]研究发现 *CAP47* 在水仙中表达非常稳定。除此之外,还有许多新鉴定的内参基因,如 *RPII* (*RNA polymerase subunit*)、*UNK1* 和 *F-box* (*F-box protein*)及很多小RNA表达都较稳定,甚至优于传统的内参基因^[24-28]。目前,基于Excel程序开发出多种软件,用于评价内参基因的稳定性和变异系数,其中应用最普遍的3个软件是 GeNorm、NormFinder、BestKeeper^[29-31]。

地黄 [*Rehmannia glutinosa* (Gaertn) Libosch] 是玄参科地黄属多年生草本植物,以块根入药,具有清热凉血、益精填髓的功效,是一种市场用药量仅次于甘草的大宗中药材。随着地黄生物学研究不断深入,筛选稳定的内参基因在基因表达分析中起着关键的作用,但是目前国内外对地黄内参基因的筛选尚未见报道。基于此,本研究的目的是利用RT-qPCR方法评价7个传统内参基因和4个新的内参基因的表达稳定性,筛选在地黄不同组织器官中稳定表达的内参基因。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 供试地黄品种‘博爱-5’(种源来自河南博爱县),种植在中国医学科学院药用植物研究所试验田。

生殖生长阶段(开花期)取样:2009年5月10号,以营养繁殖的方式,将‘博爱-5’地黄块根切成小块,栽种在试验田,于次年开花期,选取6株生长发育状况一致的健康植株,每3株混合取8个不同组织器官,包括根、茎、叶、花托、花瓣、雄蕊、雌蕊、子房,液氮冷冻,-80℃冰箱保存。

营养生长阶段取样:2010年5月20号,在营养生长阶段(播种后80天,8月10号)选取6株生长发育状况一致的健康植株,每3株混合,分别取根、茎、叶3个器官,液氮冷冻,-80℃冰箱保存。

1.1.2 试剂及仪器 RNA提取试剂采用 Trizol Reagen (Invitrogen);反转录酶 RPrimeScript™ reagent kit (Perfect Real Time)购自 TAKARA公司;荧光定量试剂盒购自 TAKARA公司;荧光定量仪器为伯乐 (BIO-RAD)公司 CFX-96 实时荧光定量PCR仪;引物由生工生物工程(上海)有限公司北京分公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取与纯化 所有样品的总RNA提取按照 Trizol Reagen 试剂盒说明书要求进行,所获得的总RNA通过DNA酶处理,去除基因组DNA的污染。Nanodrop核酸分析仪测定总RNA的浓度和纯度, $A_{260/280} \approx 2.0 \sim 2.1$, $A_{260/230} \approx 2.0$, 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,条带清晰,无DNA和其他杂质污染,28S与18S条带比值约为2:1。

1.2.2 cDNA第1链合成 cDNA第1链的合成,按照 Primescript™ RT reagent kit 试剂盒说明书要求进行 (TAKARA),1.5 mL Eppendorf管中配制20 μ L的反应体系:总RNA 1.5 μ g, oligo(d)T引物(50 μ M) 1 μ L,随机引物(100 μ M) 1 μ L,加RNA-free的水补足20 μ L,70℃加热2 min,迅速放在冰上2 min,4000转离心10 s,加入5 \times Buffer 4 μ L, PrimeScript™ RT enzyme Mix 1 μ L,4000转离心15 s,42℃ 30 min,80℃变性10 s,反应结束后加130 μ L的双蒸水,放入-20℃保存。

1.2.3 内参基因的选择和引物设计 所有候选内参基因序列由本实验室通过地黄块根转录组454测序获得,通过Primer6.0软件设计引物,如表1所示,所有扩增子预计长度在85~140 bp之间,引物退火温度均为59℃。

1.2.4 荧光定量PCR反应条件 RT-qPCR反应按照

表1 所有候选内参基因的EST序列通过BLASTX比对来确定基因类型

gene	Gene discription	Primer sequence	homology Arabidopsis thaliana/%
<i>ef1a</i>	elongation factor 1-alpha	F: CCCTGTTCTCGACTGCCACACT R: ATCTTGACCATCCCAGCGTCCC	85
18S	18S ribosomal RNA	F: TGCCCGTTGCTGCGATGATTC R: CGTCACCCGTCACCACCATAGT	—
<i>ACT11</i>	structural constituent of cytoskeleton	F: CCCGACATACAGGTGTGATGGT R: TCGCTGGAAAGCAGTTGGAGGA	86
<i>UBQ10</i>	protein binding (UBQ10)	F: TCGCTGGAAAGCAGTTGGAGGA R: ACGGAGACGGAGGACAAGGTGA	87
<i>UBQ5</i>	structural constituent of ribosome	F: GAGGTGCAATCGAGCGACACCA R: ATCTGCGAGTGTCCGGCCATCT	85
<i>TUB6</i>	structural constituent of cytoskeleton	F: AGCACGAAAGAGTGGACGA R: CGTCGGCGGAATGTCACAGA	82
<i>HSP90</i>	heat shock protein	F: AGTGGTGATGAGATGACCAGCT R: CAACAGCCTTCTTGCTCTCACC	86
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	F: TGCCTTGCTCCTTTGGCGAAGG R: AAGCCGCTCTCCACCTCTCCA	83
<i>PP2A</i>	phosphoprotein phosphatase 2A	F: GGGAGGAGAGGACTCGAAAGGAG R: TCAGCCATAGCAAGCAGCACCT	80
<i>RP II</i>	DNA-directed RNA polymerase II	F: ACAGTCGAGACAACCTGGCGC R: CCACAGTGTCAGCTGACAAGCG	77
<i>TIP41</i>	TIP41-like family protein	F: TGGCTCAGAGTTGATGGAGTGCT R: CTCTCCAGCAGCTTTCTCGGAGA	74

SYBR premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书要求进行, 模板、引物浓度及引物退火温度通过梯度 qPCR 的扩增曲线和标准曲线, 不断调试, 获得最佳 PCR 反应条件。RT-qPCR 反应在 CFX-1000 型荧光定量 PCR 仪上 (Bio-Rad) 运行, 1.5 mL 的 Eppendorf 管中配制 20 μ L 的反应体系: 2 \times PrimeScript™ Buffer 10 μ L, 5' 引物 (5 μ M) 1 μ L, 3' 引物 (5 μ M) 1 μ L, cDNA 模板 (\approx 10 ng) 1 μ L, 补水到 20 μ L。RT-qPCR 的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 退火温度 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环, 延伸阶段收集信号, 从 56 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每个循环增加 0.5 $^{\circ}$ C, 持续 0.05 s 获得解链温度, 采集融解曲线荧光信号。

1.2.5 内参基因引物特异性鉴定 RT-qPCR 反应产物在 4% 的琼脂糖凝胶电泳检测表明, 所有内参基因扩增长度与预期的结果一致, 电泳条带无引物二聚体, 无非特异性扩增。融解曲线分析显示为单一峰, 提示 PCR 产物具有特异性, 不加模板的阴性对照没有采集到任何荧光信号。

1.2.6 引物扩增效率验证和标准曲线的绘制 引物扩增

效率 (E) 与标准曲线的斜率相关, 计算方程式为: $E = 10^{-(1/\text{斜率})}$ 。标准曲线制作时, 将第 1 链 cDNA 模板依次稀释 4 个梯度, 每个梯度稀释 5 倍, cDNA 初始浓度分别为 1 \times 、1/5、1/25、1/125, 每个反应 2 个重复, 通过 RT-qPCR 分析, 相关系数, 解链温度等系列参数通过伯乐定量 PCR 仪自带的计算软件 CFX Manager™ Software 得到, 详细结果如表 2 所示。

2 结果与分析

将花瓣、花托、雄蕊、雌蕊、子房和 2 个不同发育时期的根、茎、叶的 cDNA 作为模板, 每个组织器官 3 个生物学重复, 每个生物学重复 2 个技术重复, 按照已经摸索好的 RT-qPCR 反应条件, 经 PCR 扩增, 根据检测到的荧光信号的强弱来判断基因的表达丰度。

2.1 Ct 值比较

基因表达丰度越高, Ct 值越小, 反之, Ct 值越大。11 个候选内参基因的 Ct 值比较表明, 所有组织中或同一组织不同发育时期, 每个内参基因的表达水平都有一定的变化。一些传统内参基因的表达丰度相对较高, 比如 18S 表达丰度最高, 其 Ct 值在 8.14~9.21 之间,

表2 11个候选内参基因标准曲线斜率,相关系数及PCR扩增效率

Gene	Melt Temp/°C	R ²	PCR efficiency(E)/%	slope	Amplicon Length/bp
<i>ef1α</i>	83	0.98	101.40	-3.288	138
18S	85	0.976	100.10	-3.319	134
<i>ACT11</i>	81.5	0.982	106.60	-3.324	188
<i>UBQ10</i>	82	0.970	90.94	-3.56	89
<i>UBQ5</i>	84.5	0.978	101.30	-3.29	129
<i>TUB6</i>	82	0.981	104.50	-3.218	115
<i>HSP90</i>	80.5	0.979	98.40	-3.36	100
<i>GAPDH</i>	84	0.992	98.60	-3.357	143
<i>PP2A</i>	81	0.976	98.10	-3.367	85
<i>RP11</i>	81.5	0.98	98.30	-3.364	142
<i>TIP41</i>	80	0.991	88.90	-3.62	106

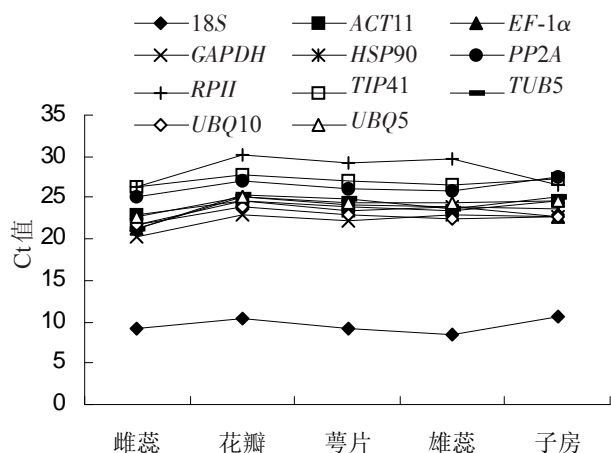


图1 所有候选内参基因在花器官的不同组织中Ct值比较

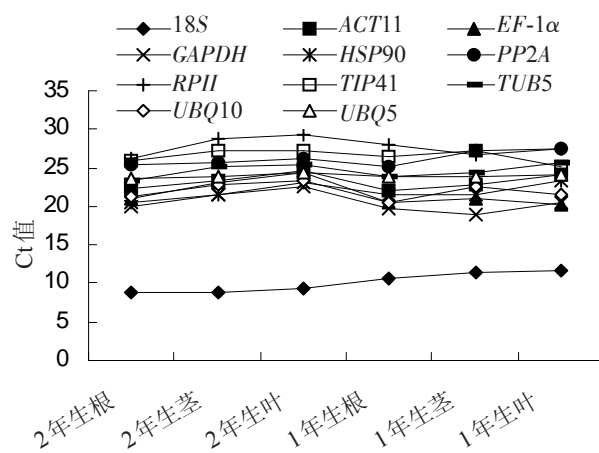


图2 所有候选内参基因在2个发育时期根、茎、叶器官中的Ct值比较

GAPDH、*UBQ10*、*EF-1α*的Ct值居中,而一些新内参基因的表达丰度则较低。如图1、图2所示,值得一提的是,在花器官的不同组织中,除了*EF-1α*和*RP11*以外其他候选内参基因的表达丰度变化呈现一个趋势,从雌蕊-雄蕊-花托-花瓣-子房,这些基因的表达丰度依次升高;在2个不同发育时期的根、茎、叶组织中,11个内参基因的表达没有一定规律。这些内参基因表达丰度的高低可能与细胞类型和发育时期有关^[20]。

2.2 BestKeeper软件分析

BestKeeper软件分析主要以标准变异系数(*SD*)和变异相关系数(*CV*)来判断内参基因的稳定性,*SD*越小,*CV*值越小,表明该基因越稳定。从表3中加粗的数据可以看出,在生殖生长期花器官的不同组织中,*TIP41*和*UBQ10*基因最稳定,其次是*UBQ5*和*ACT11*。从表4中加粗的数据可以看出,不同发育时期的根、茎、叶组织中,*TIP41*和*UBQ5*基因最稳定。

表3 BestKeeper分析11个候选内参基因在花器官的不同组织中的表达稳定性

	18S	<i>ACT11</i>	<i>EF-α</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HSP90</i>	<i>PP2A</i>	<i>TIP41</i>	<i>TUB5</i>	<i>UBQ10</i>	<i>UBQ5</i>
GM(CP)	9.56	23.92	23.38	22.18	23.46	26.34	26.97	24.03	22.79	24.21
Min(CP)	8.46	22.98	21.32	20.23	21.78	25.13	26.7	21.32	21.77	22.66
Max(CP)	10.7	24.71	25.07	23.04	24.67	27.6	27.61	25.42	23.97	25.12
<i>SD</i> [±CP]	0.75	0.62	1.14	0.79	0.69	0.8	0.44	1.28	0.56	0.62
<i>CV</i> [%CP]	7.77	2.57	3.34	3.56	2.92	3.05	1.63	5.31	2.47	2.58

注:CP:交叉点。下同。

表4 BestKeeper分析11个候选内参基因在不同发育时期的根、茎、叶器官中的表达稳定性

	18S	ACT11	EF- α	GAPDH	HSP90	PP2A	TIP41	TUB5	UBQ10	UBQ5
GM(CP)	8.88	23.26	2.46	21.48	22.44	28.05	26.62	23.91	22.15	23.87
Min(CP)	7.4	20.99	19.45	19.62	19.06	26.13	25.64	4.32	20.45	22.48
Max(CP)	10.68	24.61	25.01	23.02	24.57	30.14	27.67	25.42	23.94	25.13
SD[\pm CP]	0.98	0.96	1.41	1.18	1.4	1.41	0.53	1.17	0.99	0.73
CV[%CP]	10.34	4.11	6.25	5.47	6.23	5.02	1.99	4.87	4.46	3.05

2.3 Genorm 软件分析

Genorm 软件通过分析内参基因在不同样品中的表达稳定性(M)来确定最稳定的内参基因,该软件默认 $M=0.5$ 为取舍值,内参基因的 M 值小于0.5,被认为可以考虑作为内参基因, M 值越大,稳定性越差。反之,稳定性越好。生殖生长期花器官的不同组织(花瓣、花托、雄蕊、雌蕊、子房)和生殖生长期、营养生长期的不同组织器官(根、茎、叶)相对定量值分别输入 GeNorm 软件,根据 GeNorm 软件计算结果如图3所示,纵坐标表示 M 值,花器官的5种组织中 $TIP41$ 和 $ACT11$ M 值最小,表明这2个基因表达稳定性最好,其次是 $UBQ10$ 和 $UBQ5$,这4个基因的 M 值都小于0.5, $RP11$ 和 $EF-1\alpha$ 稳定性最差。如图4所示,在生殖生长

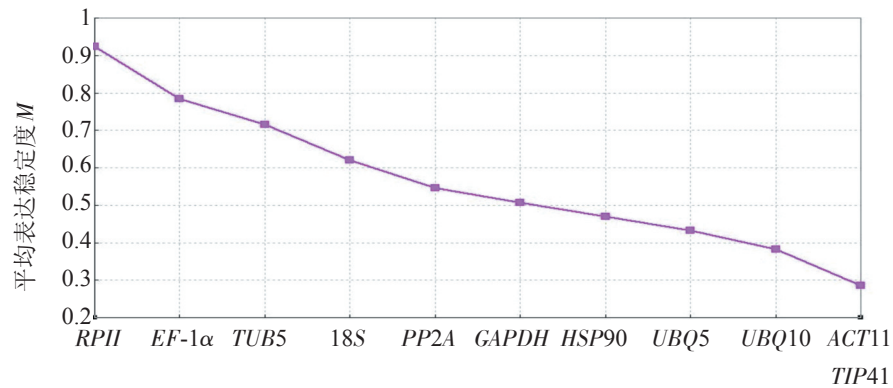
期与营养生长期的根、茎、叶组织中, $TIP41$ 和 $UBQ10$ 表达最稳定, $ACT11$ 和 $UBQ5$ 表达稳定性略差。结果表明,在2个发育时期,8个不同组织中表达最稳定的是 $TIP41$,其次是 $UBQ10$ 、 $ACT11$ 和 $UBQ5$ 。

2.4 NormFinder 软件分析

NormFinder 软件分析结果与 BestKeeper 和 GeNorm 软件分析结果基本一致,如图5所示,从图中可以看出,在生殖生长期的花器官的不同组织中, $UBQ10$ 和 $UBQ5$ 最稳定, $TIP41$ 稳定性稍差。在不同发育时期的根、茎、叶组织中, $TIP41$ 表现最稳定,其次是 $UBQ5$ 和 $ACT11$ 。

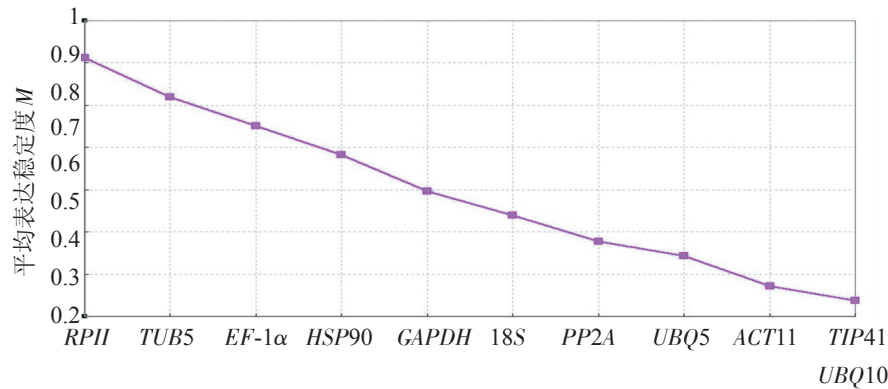
3 结论与讨论

理想的内参基因应具备下列特性:(1)在所有组织



GeNorm 软件分析所有候选内参基因在花器官的不同组织中的表达稳定性, M 值越小,表明该基因越稳定

图3 地黄花器官的不同组织中,候选内参基因平均表达稳定值比较



GeNorm 软件分析所有候选内参基因在不同发育时期的根、茎、叶组织中的表达稳定性, M 值越小,表明该基因越稳定

图4 地黄不同发育时期的根、茎、叶组织中,候选内参基因比较

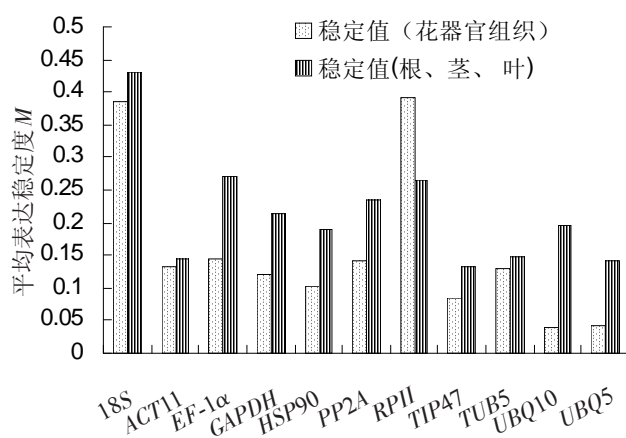


图5 NormFinder软件分析所有候选内参基因在花器官和不同发育时期的根茎叶组织中的表达稳定性

和细胞类型中表达,构成了细胞基本的转录成分,维持细胞基本的功能。(2)在所有的环境和试验条件下稳定表达,不受任何外源和内源因素的影响。(3)具有与目标基因相似的稳定表达水平^[1,32-39]。RT-qPCR试验中,一些传统的管家基因18S、*GAPDH*、*EF-1α*等被认为在不同的环境条件下均能稳定表达而被作为内参基因^[40-44]。本试验通过BestKeeper、GeNorm、NormFinder软件分析结果可以看出,在不同的组织器官和发育阶段,这些传统的管家基因mRNA表达水平都有一定的变化,个别传统内参基因表达丰度太高,不适合做内参基因,如18S rRNA高丰度表达,远远高于其他基因mRNA水平,在定量PCR数据分析时难于扣除基线。多聚泛素酶基因(*UBQ10*)在桃、拟南芥和亚麻中表达最稳定,肌动蛋白基因(*ACT11*)在水仙中表达最稳定。而在本试验中,这些基因都不能作为内参基因。新发现的内参基因*HSP90*、*PR II*、*PP2A*在鹰嘴豆和桃中表达稳定,被认为可以作为内参基因^[24-27],而在本试验中,这些基因的表达均不稳定,*TIP41*在黄瓜中表达非常稳定^[45],这与本试验结果相一致,*TIP41*在地黄不同发育时期的组织器官中表达都很稳定。

BestKeeper、GeNorm和NormFinder软件分析结果可以看出,所有地黄的组织器官中,*TIP41*、*UBQ10*、*UBQ5*、*ACT11*表达都很稳定,但在3个软件的分析结果中,这些基因稳定性排序并不完全一致,如在花器官的各组织中,BestKeeper软件稳定性排序为*TIP41*>*UBQ10*>*ACT11*>*UBQ5*,而GeNorm软件分析排序为*TIP41*和*ACT11*>*UBQ10*>*UBQ5*,NormFinder软件分析结果为*UBQ10*>*UBQ5*>*TIP41*>*ACT11*。很多文献中都报道关于这3个软件计算结果不同的原因可能是GeNorm软件比其他2个软件的计算方法更合理。由

这3个软件的分析结果可知在花器官不同组织中,*TIP41*和*UBQ10*2个内参基因组合起来作为内参基因更合理;在不同发育时期的根、茎、叶组织中,将*TIP41*和*UBQ5*组合可作为地黄内参基因。

地黄不同发育时期和不同组织器官中,11个候选内参基因都有一定的表达变化,这与很多文献报道的结果一致,没有任何1个基因的表达能符合管家基因的定义,随着环境条件、组织特异性、发育时期,内参基因的表达会发生变化。

参考文献

- [1] Bustin S A, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005,34(3):597-601.
- [2] Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Mol Aspects Med,2006,27(2-3): 95-125.
- [3] VanGuilder H D, Vrana K E, Freeman W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis[J]. Biotechniques, 2008, 44(5):619-626.
- [4] Wong M L, Medrano J F. Real-time PCR for mRNA quantitation[J]. Biotechniques,2005,39(1):75-85.
- [5] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J].Mol Endocrinol, 2002,29:23-39.
- [6] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream[J]. Exp Hematol, 2002,30:503-512.
- [7] Chen R, Mayumi G, Yoshihisa N, et al. Selection of Housekeeping Genes for Transgene Expression Analysis in *Eucommia ulmoides* Oliver Using Real-Time RT-PCR[J]. Journal of Botany, 2010:1-8.
- [8] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. Journal of Biotechnology, 1999,75: 291-295.
- [9] Pfaffl M W, Ales T, Christian P, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. Biotechnology Letters, 2004,26:509-515.
- [10] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantization[J]. Biotechniques,2000,29(2):332-7.
- [11] Tunbridge E M, Eastwood S L, Harrison P J. Changed Relative to What? Housekeeping Genes and Normalization Strategies in Human Brain Gene Expression Studies [J].Biological Psychiatry, 2010.
- [12] Radoni A, Thulke S, Mackay I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2004,313:856-862.
- [13] Pearce M, Jurinke C, Oeth P. Reference gene selection for gene expression studies[J]. Sequenom QGE QuickGuide.
- [14] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. Journal of Biotechnology,1999,75:

- 291-295.
- [15] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002,3(7).
- [16] Hong S M, Bahn S C, Aram L, et al. Identification and Testing of Superior Reference Genes for a Starting Pool of Transcript Normalization in Arabidopsis[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(10):1694-706.
- [17] Brunner A M, Yakovlev I A, Strauss S H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies[J]. *BMC Plant Biology*, 2004,134(1):224-236.
- [18] Kim B R, Nam H Y, Kim S U, et al. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice[J]. *Biotechnology Letters*, 2003,25(21):1869-1872.
- [19] Burton R A, Shirley N J, King B J, et al. The CesA Gene Family of Barley. Quantitative Analysis of Transcripts Reveals Two Groups of Co-Expressed Genes [J]. *Plant Physiology*, 2004,134(1):224-236.
- [20] Volkov R A, Panchuk I I, Schoffl F, et al. Heat-stress dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003,54(391):2343-2349.
- [21] Løvdaal T, Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009,387(2):238-242.
- [22] Hu R, Fan C M, Li H Y, et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009,10(1):93.
- [23] Yang L T, Pan A H, Jia J W, et al. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes[J]. *Agric, Food Chem*, 2005,53:183-190.
- [24] Chen X, Truksa M, Shah S, et al. A survey of quantitative real-time polymerase chain reaction internal reference genes for expression studies in *Brassica napus*[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010,405(1): 138-140.
- [25] Artico S, Nardeli S M, Brilhante O, et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data[J]. *BMC Plant Biology*, 2010,10(1):49.
- [26] Barsalobres-Cavallari C F, Severino F E, Maluf M P, et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009,10(1):1.
- [27] Die J V, Roman B, Nadal S, et al. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions[J]. *Planta*, 2010,232(1):145-153.
- [28] Luo H I, Chen S M, Wan H, et al. Candidate reference genes for gene expression studies in water lily[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 404:100-102.
- [29] geNorm Software. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>.
- [30] NormFinder Software. <http://www.mdl.dk/publication/snornfinder.html>.
- [31] BestKeeper Software. <http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>.
- [32] Schmittgen T, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2000, 46:69-81.
- [33] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. *Mol Endocrinol*, 2000,25:169-193.
- [34] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R, et al. Control selection for RNA quantitation[J]. *BioTechniques*, 2000,29(2):332-337.
- [35] Vandesompele J K, Preter D, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002,3(7).
- [36] Warrington J A, Nair A, Mahadevappa M, et al. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping maintenance genes[J]. *Physiol Genomics*, 2000,2: 143-147.
- [37] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. *Biotechnol*, 1999,75:291-295.
- [38] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. *Biochem Biophys Methods*, 2000,46:69-81.
- [39] Tong Z, Gao Z, Wang F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2009,10(1):71.
- [40] Papini-Terzi F S, Rocha F R, Vêncio R Z, et al. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues [J]. *DNA Res*, 2005,12(1):27-38.
- [41] Vicentini R, Sasaki F T, Gimenes M A, et al. In silico evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2005,28:487-495.
- [42] Ohl F, Jung M, Radonic A, et al. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer[J]. *Urol* 2006, 175(5):1915-1920.
- [43] Perez S, Royo L, Astudillo A, et al. Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors[J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8(1):114.
- [44] Willems E, Mateizel I, Kemp C, et al. Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells, *Int*[J]. *Dev. Biol*, 2006, 50:627-635.
- [45] M. Migocka, Papierniak A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators[J]. *Molecular Breeding*, 2010.