

高温胁迫下茄子 qRT-PCR 内参基因筛选及稳定性分析

庞强强^{1,2,3}, 李植良¹, 罗少波¹, 陈日远², 金庆敏¹, 黎振兴¹, 李德明³,
孙保娟^{1,*}, 孙光闻^{2,*}

(¹广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640; ²华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ³海南省农业科学院蔬菜研究所, 海口 570100)

摘要: 为筛选茄子 (*Solanum melongena* L.) 高温胁迫下稳定表达的内参基因, 以不同茄子品系 (种) 为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR 技术对来自茄子高温胁迫转录组数据库 8 个候选内参基因 (*SmEF1a*、*SmEF2*、*Sm40sRPS29*、*Sm60sRPL24*、*SmTRX*、*SmCK I*、*SmDAHPS I*、*SmUCP*) 和 *SmActin* 在不同试验情况下进行表达检测, 并结合 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 ReFinder 软件综合评价 9 个内参基因的表达稳定性。结果表明, 在茄子热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 经高温处理不同时间的样品和不同组织样品以及 10 个耐热性不同的茄子品系 (种) 中, 9 个内参基因的表达丰度及稳定性存在差异; 茄子热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 高温胁迫处理不同时间样品中表达稳定性最好的是 *SmEF1a* 和 *SmUCP*; 其不同组织中表达水平最稳定的是 *SmEF1a* 和 *SmTRX*; 高温胁迫下不同茄子品系 (种) 中以 *SmTRX* 和 *SmEF2* 的表达稳定性最好。综合来看, *SmEF1a* 和 *SmTRX* 在所有茄子试验样品中的表达稳定性最好, 而 *SmActin* 和 *SmCK I* 的表达稳定性较差。

关键词: 茄子; 高温胁迫; 内参基因; 表达稳定性; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 641.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 03-0475-12

Selection and Stability Analysis of Reference Gene for qRT-PCR in Eggplant Under High Temperature Stress

PANG Qiangqiang^{1,2,3}, LI Zhiliang¹, LUO Shaobo¹, CHEN Riyuan², JIN Qingmin¹, LI Zhenxing¹,
LI Deming³, SUN Baojuan^{1,*}, and SUN Guangwen^{2,*}

(¹Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²Horticultural College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ³Vegetable Research Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 570100, China)

Abstract: The present study aimed at selecting the stable reference genes to ensure the reliability and accuracy in gene expression analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) under high temperature stress. By real-time fluorescence quantitative RT-PCR technology, we investigated the expression stability of eight candidate reference genes (*SmEF1a*, *SmEF2*, *Sm40sRPS29*, *Sm60sRPL24*, *SmTRX*, *SmCK I*,

收稿日期: 2017-01-09; **修回日期:** 2017-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501755); 广东省自然科学基金项目 (2015A030313568); 广东省科技计划项目 (2016B070701010); 广州市科技计划项目 (2014J4100094, 201510010075)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sunbaojuan@hotmail.com; sungw1968@scau.edu.cn)

SmDAHPS I, *SmUCP*) from RNA-Seq database under high temperature stress and *SmActin*, and the stability of expression of nine reference genes were evaluated by GeNorm, NormFinder, BestKeeper and ReFinder, respectively. The results showed that, at different periods, different tissues and different lines of eggplant under high temperature, the expression abundance and stability of these nine reference genes are different. When analyzing the gene expression of thermo-sensitive line 05-1 and thermo-resistant line 05-4 under high temperature stress, *SmEF1a* and *SmUCP* were the best reference genes for different periods, and *SmEF1a* and *SmTRX* could be used as best reference genes for different tissues. Meanwhile, *SmTRX* and *SmEF2* could be used as best reference genes in lines or varieties with different thermo-tolerance. On the whole, *SmEF1a* and *SmTRX* exhibited the most stable expression among all of the tested samples, while *SmActin* and *SmCK I* exhibited the least stable expression under most of the experimental conditions. It was found to be feasible and efficient to identify stably expressed genes from transcriptome database under high temperature stress as candidate reference genes, which will be helpful for the study of expression of genes response to high temperature and the mechanisms of thermo-tolerance in eggplant.

Keywords: *Solanum melongena*; high temperature stress; reference gene; expression stability; real-time fluorescence quantitative PCR

茄子 (*Solanum melongena* L.) 喜温但不耐热, 高温是限制其生长发育的重要因素之一 (赵雪 等, 2014), 耐热资源筛选和基因挖掘是茄子育种的重要任务之一。在基于 RNA-Seq 比较基因表达差异以筛选耐热相关基因的研究过程中, 较多地涉及到应用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 技术验证和分析基因表达模式和水平。qRT-PCR 的相对定量分析中需要利用表达稳定的内参基因进行校正和标准化 (Artico et al., 2010; 万红建 等, 2012; Fu et al., 2013)。一个理想的内参基因应该是组成型表达的基因, 其表达不受生长发育阶段和试验条件的影响 (胡瑞波 等, 2009)。然而, 大量的研究表明, 任何一种看家基因所谓的恒定表达都只是在一定类型组织或试验下有范围的恒定, 没有表达绝对稳定的基因 (Huggett et al., 2005; Zhang et al., 2007)。筛选茄子高温胁迫条件下可用于基因表达分析的稳定内参基因对 qRT-PCR 结果可靠性具有关键作用。

目前, 在茄科作物上常用的有肌动蛋白 (Actin)、转录延伸因子 1 (EF1)、18S 核糖体 RNA (18S rRNA)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)、亲环蛋白基因 (CYP)、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 (RuBP)、腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (APRT) 和 α 微管蛋白基因 (TUA) 等内参基因 (Exposito-Rodriguez et al., 2008; Wan et al., 2011; Wang et al., 2012; Gantasala et al., 2013; Lopez-Pardo et al., 2013)。在茄子上, Gantasala 等 (2013) 通过对茄子 6 个常用内参基因 (*18sRNA*、*APRT*、*GAPDH*、*CYP*、*ACTIN*、*RuBP*) 的检测发现, *18sRNA*、*CYP* 和 *APRT* 在茄子不同组织中的表达稳定性最好。周晓慧等 (2014) 在茄子近缘野生种喀西茄 (*Solanum aculeatissimum*) 的研究中发现, *TUA* 和 *18sRNA* 在不同组织中表达稳定性最好, *18sRNA* 和 *ACTIN* 在不同植物生长调节剂处理条件下表达水平最稳定, *EF1* 和 *GAPDH* 在干旱和盐条件下表达稳定性最好, *TUA* 和 *EF1* 在所有测试样品中表达稳定性最高。前期作者在采用 qRT-PCR 验证茄子热敏品系和耐热品系高温胁迫前后基因表达水平时发现, *Actin* 作为内参基因易受高温胁迫的影响, 导致试验结果误差较大。因此, 本研究基于热敏和耐热茄子样本的 RNA-Seq 数据, 从中挖掘稳定表达的基因作为候选内参, 并利用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 ReFinder 等 4 种软件分析候选内参基因在不同材料中的表达稳定性, 以期筛选出高温胁迫下茄子中稳定表达的内参基因, 为后续的耐热性相关基因表达研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与处理

试验在广东省农业科学院蔬菜新技术研究重点实验室进行。试验材料为广东省农业科学科学院蔬菜研究所经过多年多代自交纯化或创制的稳定遗传的材料(孙保娟等, 2012)。采用穴盘育苗, 当幼苗具有4片真叶时移至27℃, 16 h/8 h(昼/夜)光照培养箱预培养3 d, 之后开始处理。

试验共分3组, 第1组为热敏品系05-1和耐热品系05-4用42℃处理0、0.5、1、2、4、6、12和24 h, 分别取其第2片真叶; 第2组为热敏品系05-1和耐热品系05-4用42℃分别处理0和6 h, 分别取其根、茎、叶; 第3组为热敏感品系05-1、T10、T18、T20和T22与耐热品系05-4、T5、T24、T38和农夫长茄, 用42℃处理0、6和12 h, 取第2片真叶。每个处理设3次生物学重复。从未进行任何高温处理的材料作为对照。样品用液氮速冻, 以备RNA提取。

1.2 RNA-Seq 数据库建立

根据前期试验结果, 将热敏品系05-1和耐热品系05-4未经高温胁迫处理的对照样品和42℃高温胁迫处理6 h的样品委托广州基迪奥生物科技有限公司进行测序分析。每个样品测序量约为2 Gb。通过oligo(dT)磁珠法提取mRNA序列, 建立测序文库。构建好的文库使用Illumina HiSeq 2000™进行测序。测序的结果(reads)使用Trinity软件组装得到Unigenes, 并将组装结果在数据库进行了注释。以转录组序列作为参考, 对各样本进行表达谱分析。将各样品的测序结果比对到参考序列上, 得到了不同样品中各Unigene的表达量信息。

1.3 总RNA提取和cDNA合成

采用TransZol Plant试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取样品总RNA, 以各样品的1 μg总RNA为模板, 利用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(宝生物工程有限公公司, TaKaRa)去除基因组DNA并反转录合成cDNA第一链, 于-20℃储藏备用。

1.4 内参基因目的片段的PCR扩增检测

扩增体系20 μL: ddH₂O 12.8 μL, 10× PCR buffer(含Mg²⁺)2 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol·L⁻¹)2 μL, 正向引物与反向引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL, cDNA模板1 μL, TaKaRa Taq(5 U)0.2 μL。PCR反应程序为: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 57℃退火10 s, 72℃延伸1 min, 循环35次; 72℃再延伸7 min。反应结束后, 分别取20 μL产物在1.2%琼脂糖上电泳, Goldview染色后用凝胶成像系统观察拍照。

1.5 内参基因荧光定量PCR扩增

反应程序按照宝生物公司的SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书要求进行, 反应在CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)扩增仪上完成, 反应条件为: 95℃预变性30 s; 95℃变性5 s, 60℃退火15 s, 72℃延伸15 s, 39个循环。熔解曲线程序: 65℃加热至90℃, 5 s。通过熔解曲线分析确定扩增产物的特异性。

1.6 引物设计

从茄子RNA-Seq表达谱数据库中挑选8个表达相对稳定的基因, 包括转录延伸因子1(elongation factor 1a, EF1a)、转录延伸因子2(elongation factor 2, EF2)、蛋白激酶I(casein kinase I, CK I)、

硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX)、40s 核糖体蛋白 (40s ribosomal protein S29, 40sRPS29)、60s 核糖体蛋白 (60s ribosomal protein L24, 60sRPL24)、磷酸二羟丙酮合酶 I (phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase I, DAHPS I) 和一个未知功能的 (uncharacterized protein, UCP) 基因作为候选内参基因, 以肌动蛋白 (Actin) 作为对照内参。根据候选内参基因的核苷酸序列和 qRT-PCR 设计原则, 运用 Primer5.0 软件设计 9 对特异性引物 (表 1), 由上海生工生物公司合成。

表 1 选取的内参基因引物及扩增长度

Table 1 List of primers and amplified lengths of reference genes under investigation

引物 Primer	Unigene/bp	引物序列 (5'-3') Primers sequence	长度/bp Length
SmActin	JX524155 (333)	F: TTACTCATTACCACCACAGC; R: ACCATCGGGAAGCTCATAGC	145
SmEF1a	Unigene 0033899 (876)	F: CCACACTTCTCATATTGCTGTCA; R: ACCAGCATCACCATTCTTCAAAA	145
SmEF2	Unigene 0032941 (3 457)	F: TCATGGGTGGTGTGAGATTATA; R: CTAGCTTCCATGTACAAACGGTT	130
SmCK I	Unigene 0033027 (1 758)	F: CAGGAAGTAGATGGCAATTGTT; R: CCTCCTATGGATCCCTTCACTAG	101
SmTRX	Unigene 0035968 (857)	F: TATCTTCAAGTTTTCTCGGCGG; R: GCTTGGAGGAGTTGAAATGAAGT	133
Sm40sRPS29	Unigene 0052057 (840)	F: CTCTTCTGCCTGTGAAAGATGG; R: CTGCAGCACATGAGTCCATAC	138
Sm60sRPL24	Unigene 0027788 (781)	F: GAACTTGTGCTTTTAGTGGTGC; R: TGTGTGGAAGTAGTGTTCAT	118
SmDAHPS I	Unigene 0008432 (2 031)	F: CAGGGCAAATGTAAGTGAATGC; R: TCGGCTACAATGAAGGAAAGTTC	136
SmUCP	Unigene 0048390 (748)	F: CAACATCAGAAAATCCAGCAGC; R: TGTTCTTTGGGTTGGTCAGAAG	108

1.7 数据分析

实时荧光定量 PCR 后, 仪器自动得出各样品 C_t 值, 用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行各内参基因稳定性分析, 结合分析结果运用 ReFinder 计算出候选内参基因稳定性综合排名。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因在 RNA-Seq 结果中的相对表达量

从 4 个样本的转录组测序结果来看, 8 个 (*SmActin* 未检测到) 候选内参基因在高温胁迫前后的表达量相当且具有一定表达丰度, 可用于进一步分析 (表 2)。

表 2 候选内参基因对应的 Unigene 及其在 RNA-Seq 表达谱中相对表达量 (RPKM 值)

Table 2 Corresponding Unigenes of candidate reference genes and their RPKM values in samples by RNA-Seq

候选内参基因 Candidate reference gene	Unigene 序列号 Unigene accession	05-1 (热敏 thermo-sensitive)		05-4 (耐热 thermo-resistant)	
		对照 Control	42 °C 6 h	对照 Control	42 °C 6 h
<i>SmEF1a</i>	Unigene 0033899	243.84	246.75	254.33	243.27
<i>SmEF2</i>	Unigene 0032941	262.76	291.02	268.28	274.45
<i>SmCK I</i>	Unigene 0033027	32.12	32.18	34.34	32.66
<i>SmTRX</i>	Unigene 0035968	65.64	64.73	64.93	62.42
<i>Sm40sRPS29</i>	Unigene 0052057	333.27	333.92	335.37	336.15
<i>Sm60sRPL24</i>	Unigene 0027788	74.52	72.66	78.45	76.78
<i>SmDAHPS I</i>	Unigene 0008432	314.64	312.43	311.21	301.99
<i>SmUCP</i>	Unigene 0048390	233.83	240.15	226.74	224.44
<i>SmActin</i>	None	-	-	-	-

2.2 茄子内参基因的 PCR 检测

由图 1 可以看出, 9 个候选内参基因的 PCR 结果均可见与预期大小相同的产物, 且条带单一, 说明不存在引物二聚体和非特异性扩增, 可用于后续 qRT-PCR 分析。

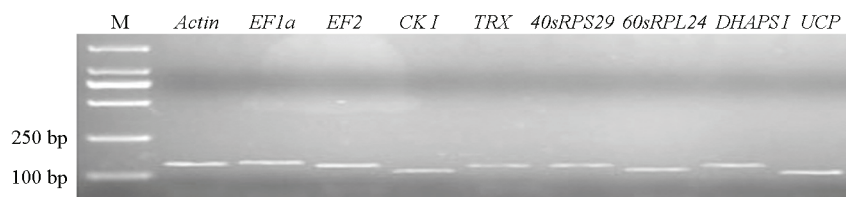


图 1 茄子 9 个候选内参基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Specificity of 9 candidate reference genes for RT-PCR amplification

2.3 茄子内参基因的荧光定量 PCR 分析

以茄子 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明, 9 个候选内参基因在不同试验条件下的熔解曲线都只有单一主峰, 没有其他杂峰出现, 重复样品之间扩增曲线重复性高 (图 2)。

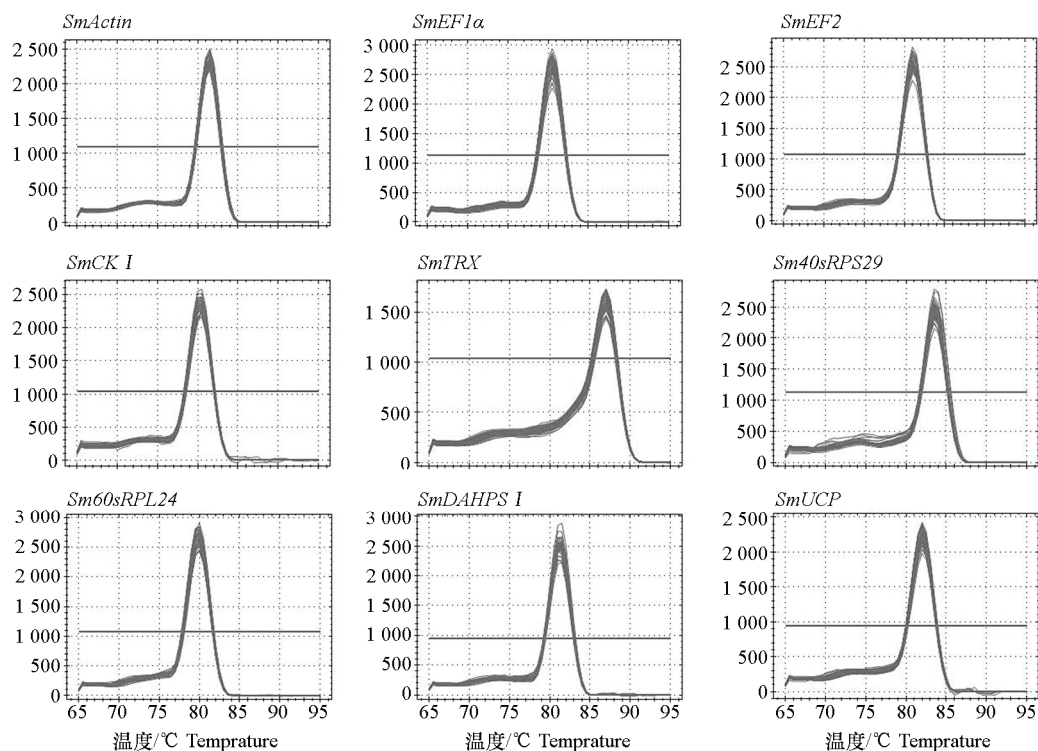


图 2 9 个候选内参基因 qRT-PCR 熔解曲线

Fig. 2 Melting curves of 9 candidate reference genes for qRT-PCR amplification

内参基因 C_t 值在不同样品中表达稳定性是选择内参的重要标准。通过分析发现, 每个内参基因在不同处理样品中的表达丰度均存在差异。基因的 C_t 值越小, 其表达丰度越高, 反之越低。在试验所涉及到的所有茄子样品中, 候选内参基因的平均 C_t 值在 19.15 ~ 28.35。

在热敏品系 05-1 和耐用品系 05-4 中, 候选内参基因在热处理不同时间段的 C_t 值在 19.33 ~ 28.04 之间 (图 3), 其中 *SmCK I* 的 C_t 值最大, 表达丰度最低, 这与 RNA-seq 表达谱中相对表达量 (RPKM 值) 结果 (表 2) 相符。

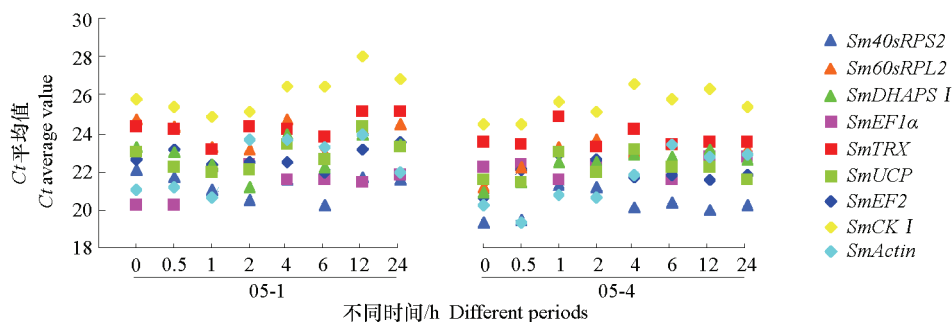


图3 候选内参基因在茄子热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 高温处理不同时间中的 Ct 平均值
 Fig. 3 The average Ct values of thermo-sensitive line 05-1 and thermo-resistant line 05-4 at different period of high temperature treatment

如图 4 所示, 内参基因在高温处理 0 和 6 h 在热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 不同组织(根、茎、叶)中的 Ct 介于 19.15 ~ 28.35 之间, 其中以 *Sm40sRPS29* 的 Ct 值最小, 表达丰度最大。

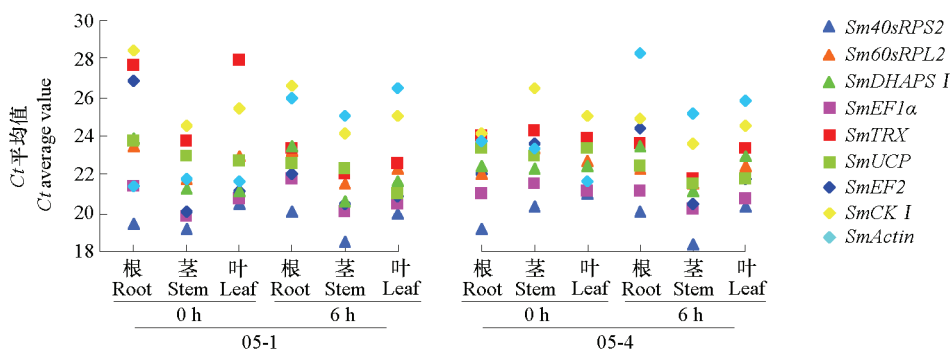


图4 候选内参基因在茄子热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 高温处理 0 和 6 h 不同组织中的 Ct 平均值
 Fig. 4 The average Ct values of different tissues of thermo-sensitive line 05-1 and thermo-resistant line 05-4 treated with high temperature for 0 and 6 h

如图 5 所示, 10 个茄子品系(种)中候选内参基因在高温处理不同时间的 Ct 值介于 19.56 ~ 27.26 之间, 其中 *SmCK I* 最大, 表达丰度最小。此外还发现, 这些内参基因在这 3 组处理样品中的表达变化并没有一定的规律性。

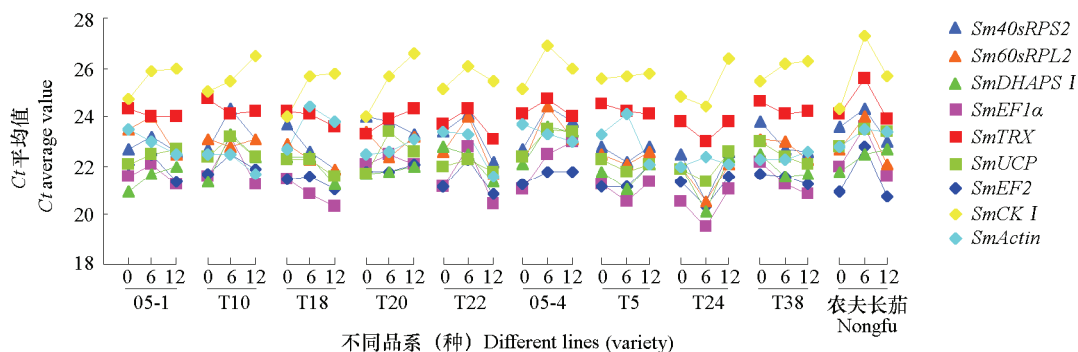


图5 候选内参基因在 10 个茄子品系(种) 高温处理 0、6 和 12 h 的 Ct 平均值
 Fig. 5 The average Ct values of ten eggplant lines (varieties) treated with high temperature for 0, 6 and 12 h

2.4 内参基因的表达稳定性评价

2.4.1 GenNorm 软件分析

GenNorm 是常用的内参分析软件, 根据计算出的候选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, M 值越大, 表明稳定性越低; M 值越小, 稳定性越高, 其中 $M = 1.5$ 是上限 (Vandesompele et al., 2002)。

如表 3 所示, 9 个内参在不同的茄子样品中稳定性存在差异。热敏品系 05-1 和耐用品系 05-4 在 42 °C 高温处理不同时间段, 表达最为稳定的内参基因是 *SmEF1a* 和 *SmUCP*; 在其高温处理 0 和 6 h 的根、茎和叶中, 表达最稳定的是 *SmCK I* 和 *SmEF1a*; 在 10 个不同品系 (种) 高温处理 0、6 和 12 h 中表达稳定性最好的是 *SmEF2* 和 *SmTRX*。在所有试验条件下, 内参基因 *SmActin* 的表达稳定性较差。

表 3 GeNorm 软件分析 9 个候选内参基因在茄子不同试验条件下的表达稳定性
 Fig. 3 GeNorm ranking of the 9 candidate reference genes with respect to their expression stability under different experimental conditions

内参基因 Reference gene	不同时间 Different periods		不同组织 Different tissues		不同品系 (种) Different lines (varieties)	
	M	排序 Rank	M	排序 Rank	M	排序 Rank
<i>SmActin</i>	1.345	9	1.339	4	0.959	9
<i>SmEF1a</i>	0.664	1	1.140	2	0.719	6
<i>SmEF2</i>	0.760	6	1.774	7	0.650	1
<i>SmCK I</i>	0.789	8	1.127	1	0.871	8
<i>SmTRX</i>	0.768	7	1.961	8	0.651	2
<i>Sm40sRPS29</i>	0.733	4	1.370	6	0.698	4
<i>Sm60sRPL24</i>	0.725	3	1.266	3	0.716	5
<i>SmDAHPS I</i>	0.733	4	1.360	5	0.742	7
<i>SmUCP</i>	0.697	2	2.814	8	0.655	3

2.4.2 NormFinder 软件分析

NormFinder 软件是结合组内方差与组间方差计算候选内参基因的稳定性来对其进行评价, 稳定性越小, 内参基因表达就越稳定; 反之则越不稳定 (Andersen et al., 2004)。

如表 4 所示, 在热胁迫处理不同时间段, 表达最为稳定的内参基因是 *SmEF1a*, 其次是 *SmUCP*; 不同组织中, *SmEF1a* 的稳定性最好, 其次是 *Sm60sRPL24*; 不同品系 (种) 中表达稳定性最好的是 *SmTRX* 和 *SmUCP*。

表 4 NormFinder 软件分析 9 个候选内参基因在茄子不同试验条件下的表达稳定性
 Fig. 4 NormFinder ranking of the 9 candidate reference genes with respect to their expression stability under different experimental conditions

内参基因 Reference gene	不同时间 Different periods		不同组织 Different tissues		不同品系 (种) Different lines (varieties)	
	M	排序 Rank	M	排序 Rank	M	排序 Rank
<i>SmActin</i>	0.880	9	1.872	9	0.036	9
<i>SmEF1a</i>	0.197	1	0.123	1	0.025	7
<i>SmEF2</i>	0.379	8	0.965	7	0.016	2
<i>SmCK I</i>	0.363	7	0.542	6	0.029	8
<i>SmTRX</i>	0.360	5	1.195	8	0.015	1
<i>Sm40sRPS29</i>	0.360	5	0.489	4	0.021	4
<i>Sm60sRPL24</i>	0.331	4	0.123	2	0.022	5
<i>SmDAHPS I</i>	0.308	3	0.275	3	0.024	6
<i>SmUCP</i>	0.263	2	0.541	5	0.016	2

2.4.3 BestKeeper 软件分析

BestKeeper 可通过计算标准偏差 (*SD*) 和变异系数 (*CV*) 来筛选最稳定的内参基因, 其中标准差和变异系数越小, 稳定性越好; 反之, 稳定性越差 (Pfaffl et al., 2004)。

如表 5 所示, 不同时间条件下候选内参基因 *SmActin*、不同组织条件下的 *SmActin*、*SmEF2* 和 *SmTRX* 的标准差都大于 1, 根据 BestKeeper 的选择标准, 这些基因的表达都不稳定。在不同时间段表达最为稳定的候选内参基因是 *SmTRX*, 其次是 *SmEF2*; 在不同组织中 *SmEF1a* 的表达稳定性最好, 其次是 *Sm60sRPL24*; 不同品系 (种) 中表达稳定性最好的是 *SmTRX* 和 *SmEF2*。

表 5 BestKeeper 软件分析 9 个候选内参基因在茄子不同试验条件下的表达稳定性
 Fig. 5 BestKeeper ranking of the 9 candidate reference genes with respect to their expression stability under different experimental conditions

内参基因 Reference gene	不同时间段 Different periods			不同组织 Different tissues			不同品系 (种) Different lines (varieties)		
	<i>SD</i>	<i>CV</i>	排序 Rank	<i>SD</i>	<i>CV</i>	排序 Rank	<i>SD</i>	<i>CV</i>	排序 Rank
<i>SmActin</i>	1.240	5.647	9	1.937	8.002	9	0.588	2.571	5
<i>SmEF1a</i>	0.622	2.845	3	0.485	2.328	1	0.720	3.338	9
<i>SmEF2</i>	0.575	2.578	2	1.404	6.348	8	0.437	2.024	2
<i>SmCK I</i>	0.733	2.844	7	0.979	3.878	6	0.603	2.357	6
<i>SmTRX</i>	0.543	2.261	1	1.305	5.434	7	0.335	1.390	1
<i>Sm40sRPS29</i>	0.740	3.562	8	0.654	3.310	4	0.673	2.916	8
<i>Sm60sRPL24</i>	0.701	2.995	6	0.559	2.490	2	0.630	2.770	7
<i>SmDAHPS I</i>	0.661	2.926	4	0.886	3.987	5	0.567	2.573	4
<i>SmUCP</i>	0.664	2.954	5	0.625	2.773	3	0.473	2.107	3

2.4.4 ReFinder 分析

对 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 软件分析得到的稳定性排名采用 ReFinder 软件求几何平均值, 得到综合指数排名, 指数越小, 说明内参基因表达越稳定。

由表 6 可见, 基于 RNA-Seq 数据开发得到的 8 个候选内参基因, 在茄子热敏和耐热品系不同高温胁迫时间、不同组织及总体表现均优于对照内参基因 *SmActin*; 就高温胁迫不同时间而言, 排名前 2 位的内参基因为 *SmEF1a* 和 *SmUCP*, 对高温胁迫下不同组织而言, 排名前 2 位的内参基因是 *SmEF1a* 和 *SmTRX*; 就不同茄子品系 (种) 而言, 排名前两位的内参基因是 *SmTRX* 和 *SmEF2*。综合所有样品来看, 候选内参基因表达稳定性最好的是 *SmEF1a*, 其次是 *SmTRX* 和 *SmUCP*。

表 6 ReFinder 软件分析 9 个候选内参基因在茄子不同试验条件下的表达稳定性
 Fig. 6 ReFinder ranking of the 9 candidate reference genes with respect to their expression stability under different experimental conditions

处理 Treatment	表达稳定基因 Stable gene	表达最不稳定基因 Least stable gene
不同时间段 Different periods	<i>SmEF1a</i> , <i>SmUCP</i>	<i>SmActin</i> , <i>SmCK I</i>
不同组织 Different tissues	<i>SmEF1a</i> , <i>SmTRX</i>	<i>SmActin</i> , <i>Sm60s RPL24</i>
不同品系 (种) Different lines (varieties)	<i>SmTRX</i> , <i>SmEF2</i>	<i>SmActin</i> , <i>SmCK I</i>
所有样品 Total samples	<i>SmEF1a</i> , <i>SmTRX</i> , <i>SmUCP</i>	<i>SmActin</i> , <i>SmCK I</i>

3 讨论

稳定的内参基因是提高 qRT-PCR 结果可靠性的先决条件, 早期内参基因的选择主要基于看家基

因的功能, 如 *Actin* 和 *TUB* 基因等是细胞器骨架的基本组分, *GAPDH*、*EF1a* 和 *UBQ* 等参与了生物体的基本生化代谢过程, 推测这些基因应该在所有的细胞和生理状态下稳定表达 (苏晓娟 等, 2013; 张玉芳 等, 2014)。后期的研究发现, 看家基因的表达并不是稳定不变的 (Die et al., 2010), 已不能满足定量分析对内参基因的要求。例如, 本研究中的内参基因 *SmActin* 在所有试验条件下的稳定性均最差, 而且前人研究同样表明 *Actin* 基因在不同非生物胁迫 (高温、涝害、蚜虫) 下的菊花 (顾春笋, 2012)、冷驯化前后野生马铃薯 (李飞 等, 2012) 中也不适合作为内参基因。因此, 新内参基因的挖掘已经成为重中之重。随着高通量测序技术的日益成熟, 利用 RNA-Seq 数据库为筛选稳定表达的内参基因尤其是新的内参基因提供更多便利。桑健 (2014) 利用生物信息学方法从超积累型东南景天转录组数据库中筛选出两个稳定表达的内参基因 *UBC9* 和 *TUB*, 可作为最佳内参基因完成对靶标基因在 4 种重金属 (镉、铅、锌、铜) 胁迫下的 qRT-PCR 结果的标准分析。李雪艳 (2015) 结合转录组表达谱分析了兰州百合小鳞茎形成与发育 3 个阶段中表达比较稳定的 9 个传统内参基因 (*18S rRNA*、 α -*TUB*、 β -*TUB*、*Actin*、*eIF*、*GAPDH*、*UBQ*、*UBC* 和 *60S rRNA*) 和 3 个新型候选基因 (*AP4*、*FP*、*RH2*) 的稳定性, 获得了 2 个表达稳定的新内参基因 (*FP*、*AP4*) 和 1 个传统内参基因 (*GAPDH*)。另外, 利用转录组数据库来筛选最佳内参基因还在油茶 (宋志波 等, 2014)、瓜叶菊 (金雪花, 2013)、樱桃 (朱友银 等, 2015) 和牡丹 (刘洪峰 等, 2015) 等植物上得到应用。本研究中以前期构建的茄子高温胁迫前后 RNA-Seq 数据库为基础, 最终得到了在茄子正常生长温度和高温胁迫下不同时间、不同组织和不同品系 (种) 中最稳定表达的 1 个常用内参基因 (*SmEF1a*) 和 2 个未见报道基因 (*SmTRX* 和 *SmUCP*), 这一结果对今后提高茄子高温胁迫条件下基因表达分析研究的稳定性和可靠性具有重要意义, 同时也为发现新的表达稳定内参基因提供了参考。

选择正确的内参基因很大程度上取决于所研究的组织、细胞及试验条件等, 不同的组织器官、生长发育阶段、生物或非生物胁迫和激素影响等都会引起内参基因的特异性表达。在植物内参基因研究中, 没有任何一种内参基因在不同的试验条件下表达是恒定的。例如, 在葡萄浆果中表达稳定性较好的 *GAPDH* 在小麦中的表达稳定性则最差 (Reid et al., 2006; Long et al., 2010), 而在小麦中表达稳定性较好的 *Actin* 和 *UBI* 在番茄中的表达稳定性最差 (Long et al., 2010; Mascia et al., 2010)。Hu 等 (2009) 分析了大豆 7 个常用内参基因和 7 个新候选基因在不同的生长发育阶段、组织器官、光周期处理和栽培种中的表达稳定性, 结果表明新的内参基因 *SKIP16*、*UKN1* 和 *UKN2* 较常用的内参基因表达稳定性更高。在植物高温胁迫下的最佳内参基因筛选方面, 严海东等 (2014) 的研究表明, *eIF4A*、*TBP-1* 和 *E2* 可作为多年生黑麦草在高温胁迫下的内参基因。高温处理后小麦和玉米中表达量最稳定的内参基因分别是 *26S rRNA* (Paolacci et al., 2009) 和 *EF1a* (齐月爱, 2012)。由此可见, 每一特定条件下都有特定的稳定表达的内参基因, 内参基因的选择是否合适需要在不同的试验系统和试验材料中进行评价与鉴定。目前, 茄科类作物如马铃薯 (Nicot et al., 2005)、番茄 (Mascia et al., 2010)、辣椒 (Wang et al., 2012) 等都鉴定出了在各自不同的试验条件下表达最稳定的内参基因。茄子在不同组织 (Gantasala et al., 2013)、茄子近缘野生种喀西茄在生物 (黄萎病) 和非生物胁迫 (干旱、盐) (周晓慧 等, 2014) 等试验条件下最佳内参基因筛选也有相关报道, 然而这些研究采用的是传统看家基因, 并且局限于少数的试验处理, 对于茄子其他研究方向尤其是茄子耐热研究的参考价值非常有限。本研究选取了茄子热敏品系 05-1 和耐热品系 05-4 高温胁迫不同时间和不同组织 (根、茎、叶) 以及高温胁迫前后不同茄子品系 (种) 共 58 份材料, 利用 qRT-PCR 检测了来自于转录组数据库的 8 个候选内参基因 (包括 2 个已知内参基因和 6 个未报道基因) 在不同试验条件下的表达水平, 并利用软件对各基因进行稳定性评价。结果表明在茄子热敏品系 05-1 和耐热

品系 05-4 高温胁迫不同时间段时表达稳定性最好的是 *SmEF1a* 和 *SmUCP*, 不同组织中表达最稳定的是 *SmEF1a* 和 *SmTRX*, 不同茄子品系(种)中最稳定表达的则是 *SmTRX* 和 *SmEF2*。综合来看, 在所有样品中 *SmEF1a*、*SmTRX*、*SmUCP* 表达稳定性较好, 这与不同冷藏条件下马铃薯(Lopez-Pardo et al., 2013)、不同试验条件下的辣椒(Wang et al., 2012)和着色期的苹果(樊连梅等, 2014)中最佳内参基因是 *EF1a* 的结果也类似。

本研究结果为茄子耐热相关基因表达分析提供了合适的内参基因, 也间接为茄子耐热分子机制的研究奠定了基础, 同时也为其他植物高温胁迫下内参基因的筛选提供参考和借鉴。

References

- Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. 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 Research*, 64 (15): 5245 - 5250.
- Artico S, Nardeli S M, Brilhante O, Grossi-De-Sa M F, Alves-Ferreira M. 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 1 - 12.
- Die J V, Román B, Nadal S, González-Verdejo C I. 2010. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 232: 145 - 153.
- Exposito-Rodriguez M, Borges A A, Borges-Perez A, Pérez J A. 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8 (6): 443 - 447.
- Fan Lian-mei, Wang Chao, Liu Geng-sen, Yuan Yong-bing. 2014. Screening and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative pcr during coloring period in apple (*Malus domestica*). *Plant Physiology Journal*, 50 (12): 1903 - 1911. (in Chinese)
- 樊连梅, 王超, 刘更森, 原永兵. 2014. 苹果着色期实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证. *植物生理学报*, 50 (12): 1903 - 1911.
- Fu W, Xie W, Zhang Z, Wang S L, Wu Q J, Liu Y, Zhou X M, Zhou X G, Zhang Y J. 2013. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (*Lepidoptera: Plutellidae*). *International Journal of Biological Sciences*, 9 (8): 792 - 802.
- Gantasala N P, Papolu P K, Thakur P K, Kamaraju D, Sreevathsa R, Rao U. 2013. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L.). *BMC Research Notes*, 6 (1): 1 - 11.
- Gu Chun-sun. 2012. Cloning and functional analysis of *CmNRTs* in chrysanthemum [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 顾春笋. 2012. 菊花 *CmNRTs* 基因的克隆及功能鉴定 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Hu Rui-bo, Fan Cheng-ming, Fu Yong-fu. 2009. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11 (6): 30 - 36. (in Chinese)
- 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 2009. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择. *中国农业科技导报*, 11 (6): 30 - 36.
- Hu R B, Fan C M, Li H Y, Zhang Q Z, Fu Y F. 2009. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol Biol*, 10: 93.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6 (4): 279 - 284.
- Jin Xue-hua. 2013. The study of anthocyanidins biosynthesis pathway in *Senecio cruentus* based on the high-throughput RNA sequencing technique [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 金雪花. 2013. 基于高通量测序的瓜叶菊花青素苷合成途径研究 [博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Li Fei, Xu Jian-fei, Liu Jie, Duan Shao-guang, Lei Zun-guo, Jiwan Palta, Jin Li-ping. 2012. Selection of reference genes from wild potato *Solanum acaule* before and after cold acclimation. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 25 (5): 1592 - 1595. (in Chinese)
- 李飞, 徐建飞, 刘杰, 段绍光, 雷尊国, Jiwan Palta, 金黎平. 2012. 冷驯化前后野生马铃薯 *Solanum acaule* 内参基因的筛选. *西南农业学报*, 25 (5): 1592 - 1595.

- Li Xue-yan. 2015. Characterization of genes encoding SuSy and INV key enzymes for starch-sucrose metabolism in *Lilium davidii* var. *unicolor* using RNA-seq [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 李雪艳. 2015. 基于 RNA-Seq 的兰州百合鳞茎淀粉-蔗糖代谢关键酶 SuSy 和 INV 基因的挖掘 [博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Lin Yue-ai. 2012. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in maize treated with abiotic stresses and hormones [M. D. Dissertation]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 吝月爱. 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 [硕士论文]. 雅安: 四川农业大学.
- Liu Hong-feng, Gao Le-xuan, Hu Yong-hong. 2015. Reference genes discovery and selection for quantitative real-time PCR in tree peony seed and petal tissue of different development stages. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 23 (12): 1639 - 1648. (in Chinese)
- 刘洪峰, 高乐旋, 胡永红. 2015. 牡丹不同发育阶段种子和花瓣组织实时荧光定量 PCR 中内参基因的挖掘与筛选. *农业生物技术学报*, 23 (12): 1639 - 1648.
- Long X Y, Wang J R, Ouellet T, Rocheleau H, Wei Y M, Pu Z E, Jiang Q T, Lan X J, Zheng Y L. 2010. Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol Biol*, 74: 307 - 311.
- Lopez-Pardo R, Galarreta J, Ritter E. 2013. Selection of housekeeping genes for q RT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *Molecular Breeding*, 31 (1): 39 - 45.
- Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F. 2010. Evaluation of reference genes for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Mol Plant Pathol*, 11: 805 - 816.
- Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, Evers D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*, 56: 2907 - 2914.
- Paolacci A R, Tanzarella O A, Porceddu E, Ciaffi M. 2009. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10 (10): 11 - 37.
- Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26 (6): 509 - 515.
- Reid K E, 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.
- Sang Jian. 2014. Validation of reference genes and analysis of HSF gene family based on RNA-Seq in Hyper-accumulation *Sedum alfredii* Hance [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 桑健. 2014. 基于转录组测序的超积累型东南景天内参基因筛选与 HSF 基因家族初步分析 [博士论文]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Song Zhi-bo, Liu Min, Jia Bao-guang, Tian Lei, Zeng Yan-ling, Zhou Jun-qin, Tan Xiao-feng, Zhang Lin. 2014. RNA extraction and primary screening of reference genes in *Camellia oleifera*. *Nonwood Forest Research*, 32 (2): 93 - 98. (in Chinese)
- 宋志波, 刘敏, 贾宝光, 田雷, 曾艳玲, 周俊琴, 谭晓风, 张琳. 2014. 油茶总 RNA 的提取与内参基因的初选. *经济林研究*, 32 (2): 93 - 98.
- Su Xiao-juan, Fan Bao-guo, Yuan Li-chai, Cui Xiu-na, Lu Shan-fa. 2013. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *populus trichocarpa*. *Chinese Bulletin of Botany*, 48 (5): 507 - 518. (in Chinese)
- 苏晓娟, 樊保国, 袁丽钊, 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 (5): 507 - 518.
- Sun Bao-juan, Li Zhen-xing, Luo Shao-bo, Jin Qing-ming, Li Zhi-liang. 2012. Evaluation of heat-tolerance on different eggplants. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 33 (10): 1841 - 1845. (in Chinese)
- 孙保娟, 黎振兴, 罗少波, 金庆敏, 李植良. 2012. 不同茄子材料的耐热性鉴定评价. *热带作物学报*, 33 (10): 1841 - 1845.
- Vandesompele J, Preter K D, Pattyn F, Poppe B, Roy N V, Paeppe A D, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): research 0034.1-0034.11.
- Wan H J, Yuan W, Ruan M, Ye Q, Wang R, Li Z, Zhou G, Yao Z, Zhao J, Liu S, Yang Y. 2011. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416 (416): 24 - 30.
- Wan Hong-jian, Yuan Wei, Yang Yue-jian. 2012. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants.

- Chinese Bulletin of Botany, 47 (4): 427 - 436. (in Chinese)
- 万红建, 袁伟, 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 (4): 427 - 436.
- Wang S B, Liu K W, Zhi L, Ge W, Liu J B, Pan B G, Wan H J, Chen J F. 2012. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. *Molecular Breeding*, 30 (3): 1393 - 1400.
- Yan Hai-dong, Jiang Xiao-mei, Zhang Xin-quan, Huang Lin-kai. 2014. Reference genes for q RT-PCR in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under various abiotic stresses. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 22 (12): 1494 - 1501. (in Chinese)
- 严海东, 蒋晓梅, 张新全, 黄琳凯. 2014. 非生物胁迫下多年生黑麦草 qRT-PCR 分析中内参基因的选择. 农业生物技术学报, 22 (12): 1494 - 1501.
- Zhou Xiao-hui, Liu Jun, Zhuang Yong. 2014. Selection of appropriate reference genes in solanum aculeatissimum for quantitative gene expression studies under different experimental conditions. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (8): 1731 - 1738. (in Chinese)
- 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 (8): 1731 - 1738.
- Zhang Yu-fang, Zhao Li-juan, Zeng You-ling. 2014. Selection and application of reference genes for gene expression studies. *Plant Physiology Journal*, 50 (8): 1119 - 1125. (in Chinese)
- 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 (8): 1119 - 1125.
- Zhang Y J, Zhu Z F, Lu R. 2007. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 34 (5): 546 - 550.
- Zhao Xue, Luo Ying, Wang Zhi-min, Tang Qing-lin, Wang Yong-qing, Yang Yang, Tian Shi-bing, Song Ming. 2014. Research progress of effects of high temperature stress on eggplant. *Journal of Changjiang Vegetables*, 20: 8 - 11. (in Chinese)
- 赵雪, 罗英, 王志敏, 汤青林, 王永清, 杨洋, 田时炳, 宋明. 2014. 高温胁迫对茄子影响的研究进展. 长江蔬菜, 20: 8 - 11.
- Zhu You-yin, Wang Yue, Zhang Hong, Shao Xu, Li Yong-qiang, Guo Wei-dong. 2015. Selection and characterization of reliable reference genes in chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 23 (5): 690 - 700. (in Chinese)
- 朱友银, 王月, 张弘, 邵姁, 李永强, 郭卫东. 2015. 中国樱桃实时定量 PCR (qRT-PCR) 内参基因的筛选与鉴定. 农业生物技术学报, 23 (5): 690 - 700.

征稿

《Horticultural Plant Journal》

(《园艺学报》英文版) 征稿

《园艺学报》英文版《Horticultural Plant Journal》由中国科学技术协会主管, 中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办, 于 2015 年 7 月创刊, 国内统一连续出版物编号 CN10-1305/S, 国际标准连续出版物编号 ISSN 2095-9885, Online ISSN 2468-0141, 双月刊, 大 16 开, 与国际出版商 Elsevier 合作, 在 ScienceDirect 网络出版平台实现全文开放存取 (主页网址 <http://www.journals.elsevier.com/horticultural-plant-journal/>)。

办刊宗旨: 准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展, 反映学科研究水平和发展动向, 为学术交流服务, 为促进学科发展作贡献。

刊载范围: 有关园艺作物种质资源、遗传育种、栽培技术、生理生化、生态、基因组学、生物技术、植物保护、采后处理与利用等原创性研究论文、研究简报及综述等。

欢迎投稿: 投稿网址 https://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=HPJ。同时请将纸质稿件 (连同作者授权协议) 挂号信寄至: 北京中关村南大街 12 号, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部 (邮编 100081)。联系电话: 010-82109523; 010-62192388。