



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117448478 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202311299411.0

C12N 15/54 (2006.01)

(22) 申请日 2023.10.09

(71) 申请人 广东省林业科学研究院

地址 510520 广东省广州市天河区龙洞街
道广汕一路233号

(72) 发明人 尧俊 石玲玲 何波祥 张谦
林善枝 蔡燕灵

(74) 专利代理机构 广州专理知识产权代理事务
所(普通合伙) 44493

专利代理师 何梓龙

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

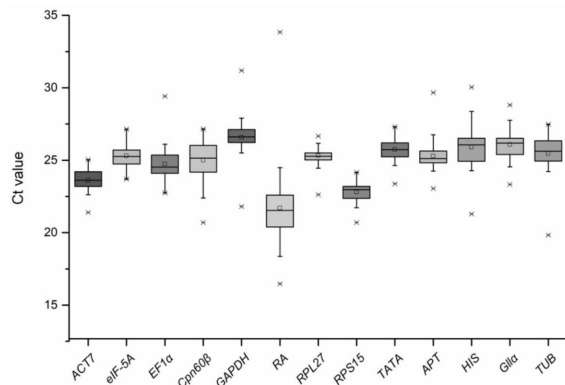
权利要求书1页 说明书10页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因及其应用

(57) 摘要

本发明属于阴香内参基因的技术领域,具体涉及一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因及其应用。通过选取13个阴香候选基因,采用不同的算法(ΔCt 、geNorm、NormFinder和BestKeeper)来评估候选内参基因的稳定性,并使用RefFinder进一步合并输出数据,筛选出*C. burmannii*在各种实验条件下的最佳内参基因。在盐处理和干旱处理的样品中,RPL27和RPS15是最佳的组合;冷处理条件下,RPL27和APT为最佳组合;其他最佳组合分别为不同组织的EF1 α 和ACT7、不同龙脑无性系的eIF-5A和G11 α 、不同发育阶段叶片的RPS15和ACT7和所有样品的RPS15和TATA。



1. 一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,所述内参基因包括ACT7、Cpn60 β 、EF1 α 、eIF-5A、GAPDH、G11 α 、HIS、RA、RPL27、RPS15、TATA、TUB、APT,在不同条件下的基因表达稳定性不同。

2. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香在盐胁迫(NaCl)处理和干旱(PEG)处理的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPL27和RPS15。

3. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香在冷处理的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPL27和APT。

4. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香在不同组织中的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为EF1 α 和ACT7。

5. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香不同龙脑无性系的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为eIF-5A和G11 α 。

6. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香在不同发育阶段的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPS15和ACT7。

7. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,阴香在综合条件下,综合表达表达稳定性最佳的内参基因组为RPS15和TATA。

8. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,所述各内参基因用于实时荧光定量PCR分析时所使用的引物对的核酸序列分别如SEQ ID NO.1~26所示。

9. 根据权利要求1所述的阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,其特征在於,所述内参基因的筛选方法为采用 Δ Ct、geNorm、NormFinder和BestKeeper对基因稳定性进行评价,并根据几何均值对结果进行进一步排序,筛选出不同实验条件下最优的内参基因。

10. 一种权利要求1-9任一项所述阴香在不同条件下稳定表达的内参基因在阴香分子遗传机制研究的应用。

一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于阴香内参基因的技术领域,具体涉及一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因及其应用。

背景技术

[0002] 阴香(*Cinnamomum burmannii*,*C.burmnnii*)是樟科肉桂属植物,是一种重要的芳香药用和绿化树种,主要分布于广东、广西和福建三省。阴香叶片中含有多种挥发性化合物,广泛的研究表明阴香具有潜在的健康益处,如抗菌、抗氧化、抗糖尿病和抗肿瘤等。这其中特别是冰片型精油由于冰片具有较好的渗透性和抗菌性能是化妆品和医药的重要原料。在过去的几十年里,对阴香的研究主要集中在化合物提取、成分分析和生物活性等方面,而对其基因调控的研究则比较有限,这在一定程度上阻碍了该作物的遗传改良。了解该作物的生物学功能对进一步的分子育种具有十分重要的意义,准确的基因表达分析将为了了解生长发育的分子生物学机制,以及信号转导和代谢提供有力而有价值的途径。而根据所知目前还没有关于阴香的系统的内参基因筛选的报道。

[0003] 理想情况下选定的内参基因在各种组织、细胞和实验条件下的表达水平应该是相对恒定的,然而多个报道表明很难找到一个适用于所有条件的单一内参基因,例如常用的内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)在*Carex rigescens*中盐处理条件下被选为稳定性最好的基因,但在*Salsola ferganica* 6种非生物胁迫下和在*Betula platyphylla*中盐和渗透胁迫条件下就不适合。此外,在UV-B胁迫下的*Solanum lycopersicum*中,肌动蛋白(ACT)作为叶片的最佳内参基因,但在大多数pecan实验中,其稳定性较差。这样的现象促使越来越多的研究者将重点放在一定条件下生物样品中内参基因的筛选上。

[0004] 因此,为了提高基因表达分析的可靠性,研究阴香的内参基因选择是非常有必要的。

发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因及其应用。

[0006] 本发明的技术内容如下:

[0007] 本发明提供了一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,所述内参基因包括ACT7、Cpn60 β 、EF1 α 、eIF-5A、GAPDH、GII α 、HIS、RA、RPL27、RPS15、TATA、TUB、APT,在不同条件下的基因表达稳定性不同,

[0008] 阴香在盐胁迫(NaCl)处理和干旱(PEG)处理的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPL27和RPS15;

[0009] 阴香在冷处理的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPL27和APT;

[0010] 阴香在不同组织中的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为EF1 α 和ACT7;

[0011] 阴香不同龙脑无性系的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为eIF-5A和GII α ;

- [0012] 阴香在不同发育阶段的条件下表达稳定性最佳的内参基因组为RPS15和ACT7;
- [0013] 阴香在综合条件下,综合表达表达稳定性最佳的内参基因组为RPS15和TATA;
- [0014] 以上所述各组基因的ID如表1所示。
- [0015] 所述各内参基因用于实时荧光定量PCR分析时所使用的引物对的核酸序列分别如SEQ ID NO.1~26所示;
- [0016] ACT7的引物对
- [0017] F(SEQ ID NO.1):CAACCCAAAAGCCAACAGG
- [0018] R(SEQ ID NO.2):TCACCCGAGTCCAGAACAATAC
- [0019] Cpn60 β 的引物对
- [0020] F(SEQ ID NO.3):CAACAAGGATGGGCTGGCTA
- [0021] R(SEQ ID NO.4):TTGGCCACAGTCACTCCATC
- [0022] EF1 α 的引物对
- [0023] F(SEQ ID NO.5):GGTACAAGGGCCCAACTCTC
- [0024] R(SEQ ID NO.6):CTGGAGAGCTTCATGGTGCA
- [0025] eIF-5A的引物对
- [0026] F(SEQ ID NO.7):CCAAGTGTCACCTTGTGGCG
- [0027] R(SEQ ID NO.8):AGTGGGGAGCCTCAGATCAT
- [0028] GAPDH的引物对
- [0029] F(SEQ ID NO.9):AAGGGTGGTGCCAAGAAAGT
- [0030] R(SEQ ID NO.10):GTTGCAGTGATGGAGTGGACAG
- [0031] GII α 的引物对
- [0032] F(SEQ ID NO.11):CCTTATCGCCTTTTCAACCTT
- [0033] R(SEQ ID NO.12):AGCGTATCAATCCGCCCTC
- [0034] HIS的引物对
- [0035] F(SEQ ID NO.13):GGAGGGAAGGCTCCTAGGAA
- [0036] R(SEQ ID NO.14):CAACTGTTCCAGGGCGGTAT
- [0037] RA的引物对
- [0038] F(SEQ ID NO.15):ACAGACCGACAAGGACAAATGG
- [0039] R(SEQ ID NO.16):CGGAGACCCGTGCTCAAGTAT
- [0040] RPL27的引物对
- [0041] F(SEQ ID NO.17):GCCGTCATCGTACGATCCTT
- [0042] R(SEQ ID NO.18):TGCCGTCTTCTTTGCAGAGT
- [0043] RPS15的引物对
- [0044] F(SEQ ID NO.19):GCAGCCGAAGAGGAGAACA
- [0045] R(SEQ ID NO.20):GGCTTCCGCTTCAAACCAC
- [0046] TATA的引物对
- [0047] F(SEQ ID NO.21):CCGTAATGCAGAGTATAACCCC
- [0048] R(SEQ ID NO.22):TTTGACATCACAAGAGCCCAC
- [0049] TUB的引物对

[0050] F(SEQ ID NO.23):TGGGAATAACTGGGCTAAGGG

[0051] R(SEQ ID NO.24):AAGCATCATCCGATCAGGGTA

[0052] APT的引物对

[0053] F(SEQ ID NO.25):TGCTTGATCCCGAGGCATTT

[0054] R(SEQ ID NO.26):ACTTCGAACCAAGGGCCAAA

[0055] 所述内参基因的筛选方法为采用 ΔCt 、geNorm、NormFinder和BestKeeper对基因稳定性进行评价,并根据几何均值对结果进行进一步排序,筛选出不同实验条件下最优的内参基因。

[0056] 本发明还提供了一种阴香在不同条件下稳定表达的内参基因在阴香分子遗传机制研究的应用。

[0057] 本发明的有益效果如下:

[0058] 本发明阴香在不同条件下稳定表达的内参基因,通过选取13个阴香候选基因,采用不同的算法(ΔCt 、geNorm、NormFinder和BestKeeper)来评估候选内参基因的稳定性,并使用RefFinder进一步合并输出数据,筛选出*C. burmannii*在各种实验条件下的最佳内参基因。结果表明,在不同实验条件下适合基因标准化分析的最佳内参基因数为2个。在盐处理和干旱处理的样品中,RPL27和RPS15是最合适的组合;冷处理条件下,RPL27和APT为最佳组合;其他样品的最佳组合分别为不同组织的EF1 α 和ACT7、不同龙脑无性系的eIF-5A和G11 α 、不同发育阶段叶片的RPS15和ACT7和所有样品的RPS15和TATA。此外,对两个萜类合成相关基因(*CbWRKY4*和*CbDXS2*)进行标准化分析,验证所选内参基因在不同实验条件下的可行性。以上所有结果均提示在特定实验条件下选择合适的内参基因对q-PCR分析的重要性,也表明了本发明将有助于后续阴香的分子遗传机制研究。

附图说明

[0059] 图1为本发明候选参考基因特异扩增片段的Agrose电泳结果图(Marker:2000bp);

[0060] 图2为使用q-PCR对候选参考基因的熔解曲线进行特异性分析图;

[0061] 图3为本发明所述候选参考基因的Ct值结果图;

[0062] 图4为本发明所述参考基因表达水平的热图;

[0063] 图5为本发明参考基因的基因稳定性值和基于geNorm的q-PCR在不同实验条件下的最佳参考基因数量的结果图;

[0064] 图6为基于RefFinder评估的参考基因在不同实验条件下的综合稳定性排名结果图;

[0065] 图7为使用鉴定的参考基因对*CbWRKY4*和*CbDCS2*的相对表达水平进行标准化的结果图。

具体实施方式

[0066] 以下通过具体的实施案例以及附图说明对本发明作进一步详细的描述,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的保护范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定。

[0067] 若无特殊说明,本发明的所有原料和试剂均为常规市场的原料、试剂。

[0068] 实施例

[0069] 选取产自广东省林业科学院管理的苗圃中的阴香植物材料,选择1~2年生的树苗,在人工气候室(光/暗=16h/8h,相对湿度=65~75%)中培养。冷处理的幼苗在16℃下培养,盐处理(200mM NaCl)和干旱处理(20%PEG6000)的幼苗在25℃下培养。

[0070] 分别处理0、1、3、6、9、12和24h后,收集非生物胁迫下所有幼苗的叶片。此外,还收集了不同龙脑无性系(Cb-H(51.96%)、Cb-M(27.65%)和Cb-L(0.00%))、不同组织(成熟叶、茎和根)、不同发育阶段的叶片(Cb-S1、Cb-S2、Cb-S3和Cb-S4),从同一材料中采集。

[0071] 所有样品立即在液氮中冷冻,并在-80℃下保存,所有处理均为三个重复。

[0072] 1. 提取阴香植物的总RNA和合成cDNA

[0073] 总RNA的提取使用RNAprepPurePlantkit(天根);

[0074] RNA的完整性和纯度采用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop2000(Thermo,美国)检测;

[0075] cDNA使用PrimeScriptTMRTreagentKit与gDNAEraser(PerfectRealTime)(Takara,日本)合成,保存于-20℃,用于后续的q-PCR分析。

[0076] q-PCR扩增:在CFX ConnectTMreal-time系统(Bio-Rad,新加坡)上使用Biomike荧光定量SYBR试剂进行q-PCR,反应体系为:Biomarker2XSybrGreenFastqPCRMIX(10μL)、正向引物(0.4μL)、反向引物(0.4μL)、cDNA(1μL)、Nuclease-freeH₂O(8.2μL)。反应条件为:95℃,3min;40次循环:95℃,5s;60℃,30s;融化曲线:仪器默认。每种样品重复三种技术。

[0077] 2. 引物设计及PCR验证

[0078] 基于本实验组的转录组和其它常见的内参基因信息选择候选内参基因,见表1,使用Primer Premier 5.0设计q-PCR引物,引物设计标准为G+C(40%-60%)、PCR产物(80bp-300bp)、TM(58℃-62℃)、引物长度(17bp-25bp)。通过1%琼脂糖凝胶电泳和熔融曲线验证各引物的特异性。采用q-PCR的标准曲线(以5倍稀释序列cDNA为模板)计算候选基因的扩增效率(E) = $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100\%$ 。

[0079] 表1 13个参考基因的引物序列及PCR扩增特性

基因 ID	基因缩写	注释	振幅长度 bp	Tm(°C)	E	R ²
Cbur01G028330	<i>ACT7</i>	actin7	141	58.7/59.1	98.76%	0.9968
Cbur02G019900	<i>Cpn60β</i>	chaperonin 60subunit beta 2	156	60/60	98.05%	0.9979
Cbur01G001170	<i>EF1α</i>	elongation factor 1-alpha	236	60/60	89.99%	0.9983
Cbur05G032970	<i>eIF-5A</i>	eukaryotic translation initiation factor 5A	191	60/60	86.05%	0.9993
Cbur10G024220	<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosp hate dehydrogenase	215	58.6/60.2	92.81%	0.9917
[0080] Cbur06G016220	<i>GIIα</i>	glucan 1,3-alpha-glucosidase	221	58.3/59.9	90.63%	0.9983
Cbur08G011150	<i>HIS</i>	histone superfamily protein H3	106	60/60	96.01%	0.9985
Cbur10G000690	<i>RA</i>	rubisco activase	168	61.3/61.6	79.95%	0.9926
Cbur10G003920	<i>RPL27</i>	ribosomal protein L27	123	60.0/59.9	98.39%	0.9969
Cbur07G013210	<i>RPS15</i>	ribosomal protein S15	144	58.4//60.4	92.04%	0.9972
Cbur04G009020	<i>TATA</i>	TATA-box-binding protein	146	60.1/59.5	82.13%	0.9989
Cbur08G006150	<i>TUB</i>	tubulin β chain	205	60.9/59.5	95.11%	0.9964
Cbur02G028660	<i>APT</i>	adenine phosphoribosy ltransferase 1	141	60.1/60	89.03%	0.9993

[0081] 以上13个基因ACT7、Cpn60β、EF1α、eIF-5A、GAPDH、GIIα、HIS、RA、RPL27、RPS15、TATA、TUB、APT的引物对的序列分别如SEQ ID NO.1~26所示。

[0082] 3. 阴香候选基因的表达分析和稳定性分析

[0083] 采用ΔCt、BestKeeper、geNorm和NormFinder分析候选内参基因的稳定性。

[0084] 由图1可见,内参基因的PCR扩增产物与预期大小一致,且呈单一条带,由图2可见,q-PCR分析显示每对引物均为单峰。每对引物的扩增效率(E)和回归系数值R²见表1。以上结果表明本发明使用的候选基因引物可用于进一步的q-PCR分析。

[0085] 表2使用ΔCt分析的13个参考基因的稳定性评估

排序	综合	mSD	冷处理	mSD	Nacl 处理	mSD	干旱处理	mSD
1	<i>RPS15</i>	0.98	<i>RPL27</i>	0.43	<i>RPS15</i>	0.83	<i>RPS15</i>	0.47
2	<i>TATA</i>	1.04	<i>RPS15</i>	0.46	<i>RPL27</i>	0.85	<i>RPL27</i>	0.48
3	<i>RPL27</i>	1.05	<i>GAPDH</i>	0.49	<i>ACT7</i>	0.87	<i>EF1α</i>	0.49
4	<i>eIF-5A</i>	1.1	<i>APT</i>	0.49	<i>Glla</i>	0.90	<i>TATA</i>	0.49
5	<i>Glla</i>	1.13	<i>ACT7</i>	0.51	<i>TATA</i>	0.92	<i>TUB</i>	0.51
6	<i>ACT7</i>	1.21	<i>TATA</i>	0.57	<i>eIF-5A</i>	0.95	<i>eIF-5A</i>	0.55
7	<i>EF1α</i>	1.22	<i>eIF-5A</i>	0.58	<i>TUB</i>	0.97	<i>ACT7</i>	0.62
8	<i>APT</i>	1.29	<i>Glla</i>	0.62	<i>HIS</i>	1.14	<i>APT</i>	0.64
9	<i>HIS</i>	1.31	<i>EF1α</i>	0.63	<i>APT</i>	1.14	<i>GAPDH</i>	0.68
10	<i>TUB</i>	1.34	<i>Cpn60β</i>	0.63	<i>GAPDH</i>	1.24	<i>Glla</i>	0.75
11	<i>GAPDH</i>	1.37	<i>HIS</i>	0.66	<i>Cpn60β</i>	1.37	<i>HIS</i>	0.81
12	<i>Cpn60β</i>	1.61	<i>RA</i>	0.71	<i>EF1α</i>	1.41	<i>RA</i>	0.98
13	<i>RA</i>	3.01	<i>TUB</i>	0.89	<i>RA</i>	1.61	<i>Cpn60β</i>	1.09
[0086]	排序	不同组织	mSD	不同发育阶 段的叶子	mSD	不同的龙 脑克隆	mSD	
	1	<i>EF1α</i>	1.29	<i>RPS15</i>	0.93	<i>RPS15</i>	0.90	
	2	<i>ACT7</i>	1.30	<i>RPL27</i>	0.93	<i>Glla</i>	0.93	
	3	<i>TATA</i>	1.31	<i>Glla</i>	0.94	<i>eIF-5A</i>	0.94	
	4	<i>RPL27</i>	1.32	<i>ACT7</i>	0.94	<i>HIS</i>	1.01	
	5	<i>RPS15</i>	1.36	<i>TATA</i>	0.95	<i>TUB</i>	1.05	
	6	<i>eIF-5A</i>	1.52	<i>EF1α</i>	1.10	<i>EF1α</i>	1.10	
	7	<i>GAPDH</i>	1.67	<i>APT</i>	1.14	<i>TATA</i>	1.11	
	8	<i>HIS</i>	1.73	<i>HIS</i>	1.14	<i>APT</i>	1.22	
	9	<i>Cpn60β</i>	1.81	<i>eIF-5A</i>	1.32	<i>RA</i>	1.26	
	10	<i>Glla</i>	1.91	<i>Cpn60β</i>	1.43	<i>RPL27</i>	1.30	
	11	<i>APT</i>	1.93	<i>GAPDH</i>	1.67	<i>ACT7</i>	1.56	
	12	<i>TUB</i>	2.03	<i>TUB</i>	2.16	<i>GAPDH</i>	1.69	
[0087]	13	<i>RA</i>	6.61	<i>RA</i>	3.17	<i>Cpn60β</i>	2.72	

[0088] 由表2可见,采用 Δ Ct评价内参基因的稳定性,最低平均标准差(mSD)的基因为最佳基因。 Δ Ct分析结果显示,RPS15基因在盐处理、干旱处理、不同发育阶段叶片和总样品中最稳定,RPL27基因在冷处理样品中最稳定,EF1 α 基因在不同组织中稳定性最好。

[0089] 由图3(图中方框表示所有样本中的第25个和第75个百分位数;正方形表示中位数;×表示最大值和最小值)可见,通过Ct值确定候选内参基因在不同样品中的转录水平,不同样品的基因表达不同,其中RA的表达水平在所有材料中最高平均Ct为21.70,而GAPDH的表达丰度最低平均Ct为26.57。研究结果表明基因表达水平在所有样品中都存在明显的差异。同时内参基因的转录水平也可反应出基因表达的稳定性,其中ACT7、RPL27、RPS15、TATA和eIF-5A的Ct范围相对较窄,说明这些基因可能表达更为稳定。进一步采用Log₂Fold方法计算候选基因在所有材料中的表达水平分析其表达稳定性,由图4可见,热图可以清晰地显示每个样品中每个基因的表达水平。

[0090] geNorm根据M值(阈值为1.5)分析候选基因的表达稳定性,结果如表3所示:

[0091] 表3基于NormFinder的13个参考基因的稳定性评价

	排序	综合	M	冷处理	M	Nacl 处理	M	干旱处理	M
[0092]	1	<i>RPS15 TATA</i>	0.411	<i>GAPDH RPL</i>	0.230	<i>RPL27 RP</i>	0.250	<i>EF1α R</i>	0.146
		<i>A</i>		<i>27</i>		<i>S15</i>		<i>PL27</i>	
	2	<i>RPL27</i>	0.448	<i>APT</i>	0.238	<i>TATA</i>	0.280	<i>TATA</i>	0.195
	3	<i>ACT7</i>	0.530	<i>RPS15</i>	0.283	<i>ACT7</i>	0.335	<i>RPS15</i>	0.204
	4	<i>eIF-5A</i>	0.601	<i>eIF-5A</i>	0.316	<i>Glla</i>	0.412	<i>TUB</i>	0.248
	5	<i>Glla</i>	0.655	<i>ACT7</i>	0.341	<i>eIF-5A</i>	0.449	<i>eIF-5A</i>	0.281
	6	<i>EF1α</i>	0.753	<i>Cpn60β</i>	0.394	<i>TUB</i>	0.475	<i>APT</i>	0.330
	7	<i>APT</i>	0.823	<i>HIS</i>	0.430	<i>HIS</i>	0.660	<i>GAPDH</i>	0.371
	8	<i>TUB</i>	0.883	<i>Glla</i>	0.453	<i>APT</i>	0.771	<i>ACT7</i>	0.407
	9	<i>HIS</i>	0.932	<i>TATA</i>	0.477	<i>GAPDH</i>	0.853	<i>Glla</i>	0.457
	10	<i>GAPDH</i>	0.978	<i>EF1α</i>	0.504	<i>EF1α</i>	0.927	<i>HIS</i>	0.510
	11	<i>Cpn60β</i>	1.058	<i>RA</i>	0.535	<i>Cpn60β</i>	0.998	<i>RA</i>	0.580
	12	<i>RA</i>	1.358	<i>TUB</i>	0.589	<i>RA</i>	1.092	<i>Cpn60β</i>	0.658
	排序	不同组织	M	不同发育阶 段的叶子	M	不同的龙 脑克隆	M		
[0093]	1	<i>ACT7 EF1α</i>	0.117	<i>ACT7 RPS15</i>	0.126	<i>eIF-5A Gl</i>	0.276		
						<i>la</i>			
	2	<i>RPL27</i>	0.310	<i>TATA</i>	0.220	<i>RPS15</i>	0.300		
	3	<i>TATA</i>	0.342	<i>RPL27</i>	0.282	<i>TUB</i>	0.364		
	4	<i>RPS15</i>	0.376	<i>Glla</i>	0.313	<i>EF1α</i>	0.423		
	5	<i>eIF-5A</i>	0.455	<i>APT</i>	0.397	<i>HIS</i>	0.539		
	6	<i>HIS</i>	0.615	<i>EF1α</i>	0.472	<i>TATA</i>	0.597		
	7	<i>GAPDH</i>	0.738	<i>HIS</i>	0.544	<i>RA</i>	0.702		
	8	<i>APT</i>	0.839	<i>eIF-5A</i>	0.623	<i>APT</i>	0.777		
	9	<i>Cpn60β</i>	0.946	<i>Cpn60β</i>	0.730	<i>RPL27</i>	0.831		
	10	<i>Glla</i>	1.059	<i>GAPDH</i>	0.869	<i>ACT7</i>	0.903		
	11	<i>TUB</i>	1.142	<i>TUB</i>	1.044	<i>GAPDH</i>	1.033		
	12	<i>RA</i>	1.983	<i>RA</i>	1.371	<i>Cpn60β</i>	1.292		

[0094] 结合图5可见, $M < 1.5$ 的候选基因可用于标准化分析, M 值越小, 基因稳定性越好。在本发明中, *RPL27|RPS15* 在 NaCl 处理下的 M 值最低表示稳定性最高, *RA* 的 M 值最高表示稳定性最低。在 peg 处理下, *EF1α|RPL27* 的表达最稳定, *Cpn60β* 的表达最不稳定。冷处理中, *GAPDH|RPL27* 是最合适的组合, 而 *TUB* 最不合适。在植物组织中, *ACT7|EF1α* 为最佳组合, *RA* 最不稳定。在不同冰片无性系中, *eIF-5A|Glla* 的稳定性高于其他基因。*ACT7|RPS15* 在不同发育阶段的叶片中排名最好, *RA* 最差。利用 geNorm 综合评价总样本时发现 *RPS15|TATA* 的稳定性最好, *RA* 的稳定性最差。除了确定候选内参基因的表达稳定性外, geNorm 还可以通过分析两两变异 (V_n/V_{n+1}) 来确定内参基因的最佳数量。在本发明中, $V_2/3$ 均小于 0.15, 说明使用两个内参基因可以满足阴香 q-PCR 的标准化分析 (图 5H)。

[0095] 此外, NormFinder 通过 SV 进一步确定了候选基因的稳定性。SV 越低越稳定, 见表 4:

[0096] 表4基于NormFinder的13个参考基因的稳定性评价

排序	综合	SV	冷处理	SV	Nacl 处理	SV	干旱处理	SV
1	<i>RPS15</i>	0.210	<i>RPL27</i>	0.115	<i>RPL27</i>	0.328	<i>RPS15</i>	0.082
2	<i>TATA</i>	0.344	<i>RPS15</i>	0.171	<i>RPS15</i>	0.34	<i>EF1α</i>	0.102
3	<i>eIF-5A</i>	0.436	<i>APT</i>	0.247	<i>Glla</i>	0.429	<i>TATA</i>	0.107
4	<i>RPL27</i>	0.467	<i>GAPDH</i>	0.255	<i>ACT7</i>	0.438	<i>RPL27</i>	0.114
5	<i>Glla</i>	0.564	<i>ACT7</i>	0.285	<i>eIF-5A</i>	0.559	<i>TUB</i>	0.194
6	<i>EF1α</i>	0.745	<i>TATA</i>	0.378	<i>TATA</i>	0.570	<i>eIF-5A</i>	0.308
7	<i>ACT7</i>	0.811	<i>eIF-5A</i>	0.427	<i>TUB</i>	0.601	<i>ACT7</i>	0.401
8	<i>HIS</i>	0.834	<i>Glla</i>	0.473	<i>HIS</i>	0.899	<i>APT</i>	0.448
9	<i>APT</i>	0.877	<i>EF1α</i>	0.476	<i>APT</i>	0.934	<i>GAPDH</i>	0.521
10	<i>TUB</i>	0.969	<i>Cpn60β</i>	0.506	<i>GAPDH</i>	1.082	<i>Glla</i>	0.603
11	<i>GAPDH</i>	0.995	<i>HIS</i>	0.545	<i>Cpn60β</i>	1.114	<i>HIS</i>	0.673
12	<i>Cpn60β</i>	1.314	<i>RA</i>	0.593	<i>EF1α</i>	1.311	<i>RA</i>	0.887

[0097]

排序	不同组织	SV	不同发育阶段的叶子	SV	SV	
1	<i>EF1α</i>	0.058	<i>RPS15</i>	0.063	<i>eIF-5A</i>	0.128
2	<i>ACT7</i>	0.058	<i>ACT7</i>	0.063	<i>Glla</i>	0.138
3	<i>RPS15</i>	0.099	<i>TATA</i>	0.119	<i>RPS15</i>	0.153
4	<i>TATA</i>	0.099	<i>Glla</i>	0.131	<i>TUB</i>	0.426
5	<i>RPL27</i>	0.126	<i>RPL27</i>	0.131	<i>EF1α</i>	0.499
6	<i>eIF-5A</i>	0.208	<i>EF1α</i>	0.439	<i>HIS</i>	0.542
7	<i>HIS</i>	0.948	<i>APT</i>	0.547	<i>TATA</i>	0.700
8	<i>GAPDH</i>	1.205	<i>HIS</i>	0.617	<i>RA</i>	0.760
9	<i>APT</i>	1.380	<i>eIF-5A</i>	0.834	<i>APT</i>	1.007
10	<i>Glla</i>	1.390	<i>Cpn60β</i>	1.034	<i>RPL27</i>	1.134
11	<i>Cpn60β</i>	1.445	<i>GAPDH</i>	1.448	<i>GAPDH</i>	1.440
12	<i>TUB</i>	1.644	<i>TUB</i>	2.086	<i>ACT7</i>	1.482

[0098] 由上可见,在盐处理的样品中,*RPL27* (0.328) 的表达最稳定,*RA* (1.499) 的表达最不稳定。在干旱处理的样品中,*RPS15* (0.082) 最稳定,*Cpn60β* (1.005) 最不稳定。在冷处理样品中,*RPL27* (0.115) 表达最优,*TUB* (0.803) 表达最不稳定。*EF1α* (0.058) 在不同组织中表达最稳定,*RA* (6.568) 表达最不稳定。在不同龙脑无性系中,*eIF-5A* (0.128) 的稳定性最稳定,*Cpn60β* (2.66) 最不稳定。*RPS15* (0.063) 在不同发育阶段的叶片中表达最稳定,*RA* (3.132) 表达最不稳定。总样本的NormFinder分析结果显示,*RPS15* (0.21) 表达最稳定,*RA* (2.918) 表达最不稳定。

[0099] 此外,BestKeeper计算了所有候选基因Ct值的标准变异系数(SD)和变异相关系数(CV),SD值相对较低(小于1)通常被认为在可接受范围内,结果见表5:

[0100] 表5 BestKeeper分析了13个参考基因的排名

排序	综合	M	冷处理	M	Nacl 处理	M	干旱处理	M
1	<i>RPL27</i>	0.47	<i>APT</i>	0.27	<i>TATA</i>	0.38	<i>RPL27</i>	0.35
2	<i>RPS15</i>	0.53	<i>RPL27</i>	0.35	<i>RPL27</i>	0.44	<i>RPS15</i>	0.36
3	<i>ACT7</i>	0.56	<i>EF1α</i>	0.36	<i>RPS15</i>	0.45	<i>TUB</i>	0.37
4	<i>TATA</i>	0.57	<i>GAPDH</i>	0.37	<i>ACT7</i>	0.52	<i>EF1α</i>	0.38
5	<i>eIF-5A</i>	0.64	<i>eIF-5A</i>	0.42	<i>TUB</i>	0.65	<i>Cpn60β</i>	0.38
6	<i>APT</i>	0.73	<i>TATA</i>	0.48	<i>eIF-5A</i>	0.66	<i>eIF-5A</i>	0.40
7	<i>Gllα</i>	0.76	<i>RA</i>	0.53	<i>RA</i>	0.68	<i>TATA</i>	0.43
8	<i>EF1α</i>	0.78	<i>RPS15</i>	0.55	<i>Gllα</i>	0.75	<i>APT</i>	0.54
9	<i>TUB</i>	0.83	<i>TUB</i>	0.55	<i>Cpn60β</i>	0.83	<i>GAPDH</i>	0.57
10	<i>GAPDH</i>	0.96	<i>Cpn60β</i>	0.56	<i>APT</i>	1.13	<i>ACT7</i>	0.58
11	<i>Cpn60β</i>	1.00	<i>ACT7</i>	0.58	<i>GAPDH</i>	1.21	<i>Gllα</i>	0.59
12	<i>HIS</i>	1.09	<i>Gllα</i>	0.67	<i>HIS</i>	1.21	<i>HIS</i>	0.71
[0101]								
排序	不同组织	M	不同发育阶段的叶子	M	不同的龙脑克隆	M		
1	<i>ACT7</i>	0.19	<i>eIF-5A</i>	0.46	<i>HIS</i>	0.10		
2	<i>EF1α</i>	0.26	<i>APT</i>	0.60	<i>TATA</i>	0.26		
3	<i>GAPDH</i>	0.32	<i>ACT7</i>	0.79	<i>APT</i>	0.32		
4	<i>TATA</i>	0.52	<i>TATA</i>	0.79	<i>RPS15</i>	0.41		
5	<i>RPL27</i>	0.53	<i>RPS15</i>	0.87	<i>RPL27</i>	0.43		
6	<i>RPS15</i>	0.56	<i>RPL27</i>	1.01	<i>ACT7</i>	0.53		
7	<i>Cpn60β</i>	0.61	<i>EF1α</i>	1.03	<i>Gllα</i>	0.62		
8	<i>HIS</i>	0.79	<i>Gllα</i>	1.09	<i>eIF-5A</i>	0.63		
9	<i>eIF-5A</i>	0.83	<i>RA</i>	1.20	<i>TUB</i>	0.80		
10	<i>APT</i>	0.85	<i>HIS</i>	1.38	<i>RA</i>	0.89		
11	<i>Gllα</i>	1.04	<i>Cpn60β</i>	1.43	<i>EF1α</i>	0.96		
12	<i>TUB</i>	1.05	<i>GAPDH</i>	1.80	<i>GAPDH</i>	1.45		
[0102]								

[0103] 由上可见,在盐处理的样品中,TATA(0.38)最稳定,EF1 α (1.28)最不稳定。在干旱处理的样品中,RPL27(0.35)稳定,而RA(0.8)最不稳定。在冷处理样品中,APT(0.27)表达最稳定,而HIS(0.74)表达最不稳定。ACT7(0.19)在不同组织中表达稳定,RA(4.74)表达最不稳定。在不同龙脑无性系中,HIS(0.1)表达最好,Cpn60 β (2.37)表达最差。在不同发育阶段的叶片中,eIF-5A(0.46)最稳定,TUB(2.38)最不稳定。总样本的BestKeeper分析结果显示,RPL27(0.47)最稳定,RA(1.87)最不稳定。

[0104] 最终,RefFinder进一步合并输出数据,筛选出不同实验材料中最优的内参基因(图6,图中(A)冷处理样品;(B)PEG处理的样品;(C)Nacl处理过的样品;(D)不同的组织;(E)处于不同发育阶段的叶子;(F)不同的龙脑克隆(G)样本总数。),在盐处理和干旱处理的样品中,RPL27|RPS15的表达稳定性高于其他基因。RPL27|APT在冷处理中排名最佳,EF1 α |ACT7在不同组织中是最合适的组合。eIF-5A|Gll α 适用于不同龙脑无性系,RPS15|ACT7适用于不同发育阶段的叶片。在对总样本进行分析时,RPS15|TATA是所有样品的最佳组合。

[0105] RPS15在总样品、干旱处理和不同发育阶段的叶片中表达最稳定(图6B、E和G),RPL27在冷处理、干旱处理和盐处理中表现出相对较高的稳定性(图6A、B和C)。在一定的实验条件下,对内参基因进行评价和筛选是非常重要的,不同内参基因归一化后靶基因的表

达模式不同,这进一步揭示了可靠的基因表达分析依赖于稳定的内参基因,筛选内参基因对于q-PCR结果准确性的必要性。这一在各种实验条件下进行内参基因筛选的过程,可以为研究阴香的遗传育种提供指导。

[0106] 4. 参考基因验证

[0107] 为了验证所选内参基因的稳定性和准确性,分别使用两个稳定内参基因和不稳定内参基因,在上述不同的实验条件下,评估两个萜烯相关基因CbWRKY4和CbDXS2的表达水平。

[0108] 研究结果显示,在所有实验处理中使用不同内参基因进行q-PCR归一化处理,CbDXS2和CbWRKY4的表达模式存在显著差异(图7,(A)CbDXS2用于不同发育阶段的叶片;(B)CbWRKY4用于不同发育阶段的叶片;(C)CbDXS2用于组织;(D)CbWRKY4用于组织;(E)CbDXS2用于不同的冰片克隆;(F)CbWRKY4;(G)冷处理样品的CbDXS2;(H)CbWRKY4,用于冷处理样品;(I)CbDXS2,用于PEG处理的样品;(J)CbWRKY4,用于PEG处理的样品;(K)NaCl处理样品的CbDXS2;(L)NaCl处理样品的CbWRKY4;a、b、c、d、e差异有统计学意义($P < 0.05$))。使用稳定内参基因和最佳组合内参基因时,CbDXS2和CbWRKY4的表达模式相似。但使用不稳定内参基因进行归一化处理后,CbDXS2和CbWRKY4的表达模式与其存在显著差异。例如,经ACT7和EF1 α 归一化处理后,CbDXS2和CbWRKY4在根中的表达水平最低,而经RA在不同组织中归一化处理后,CbDXS2和CbWRKY4在根中的表达水平最高(图7C和D),用RPL27和RPS15进行q-PCR归一化处理后,CbDXS2在1h时表达最高,而在盐处理的样品中,用EF1 α 处理后,CbDXS2在1h时几乎不表达(图7K)。所有结果表明,选择合适的内参基因对于基因表达的准确规范化至关重要。

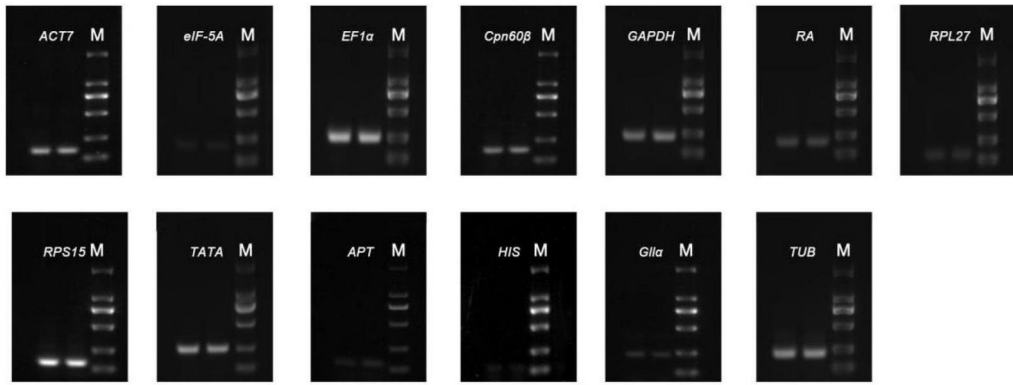


图1

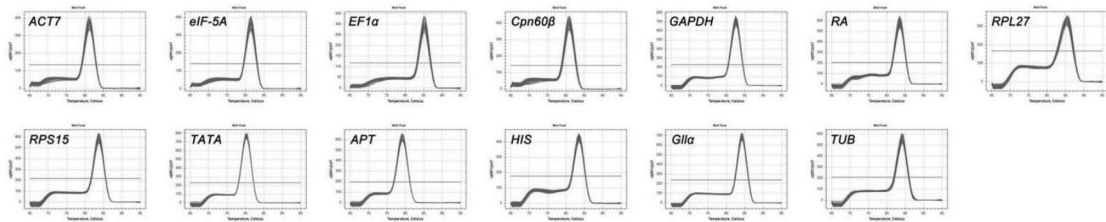


图2

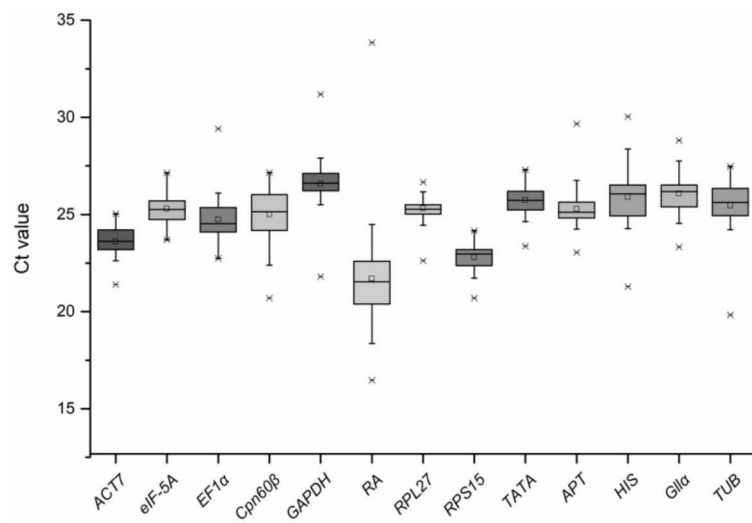


图3

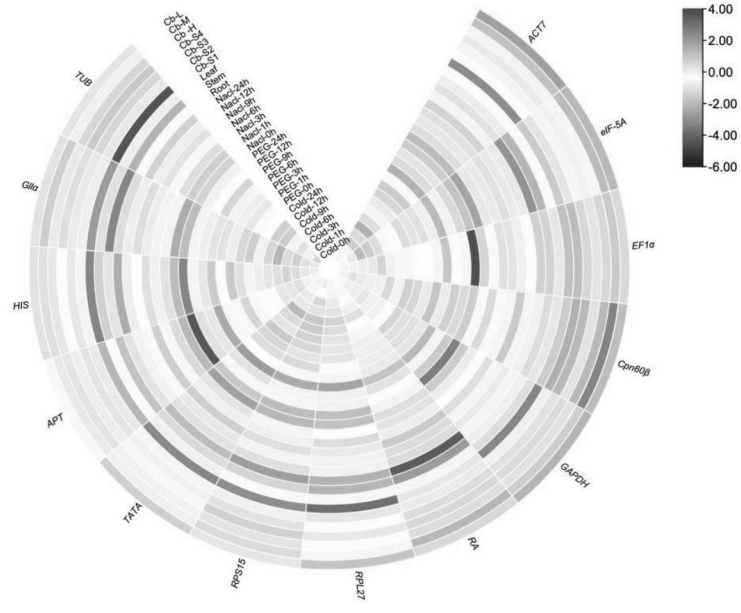


图4

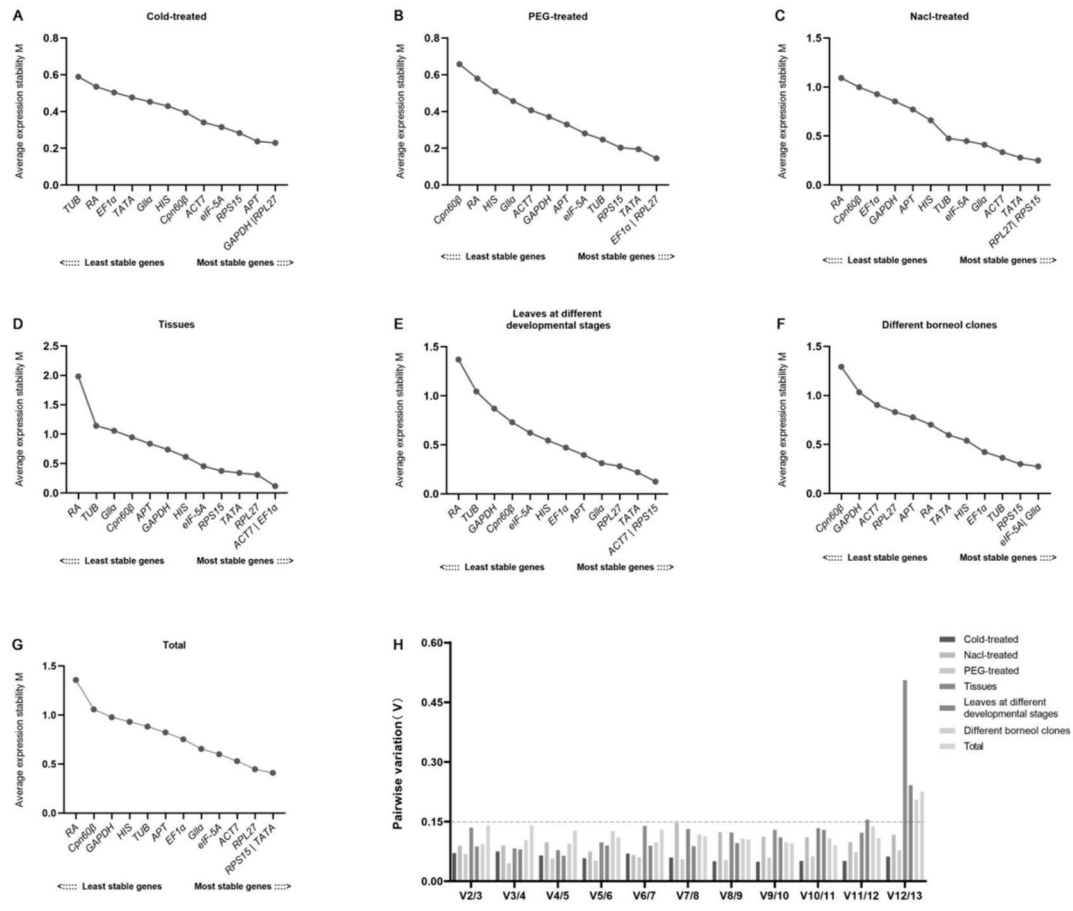


图5

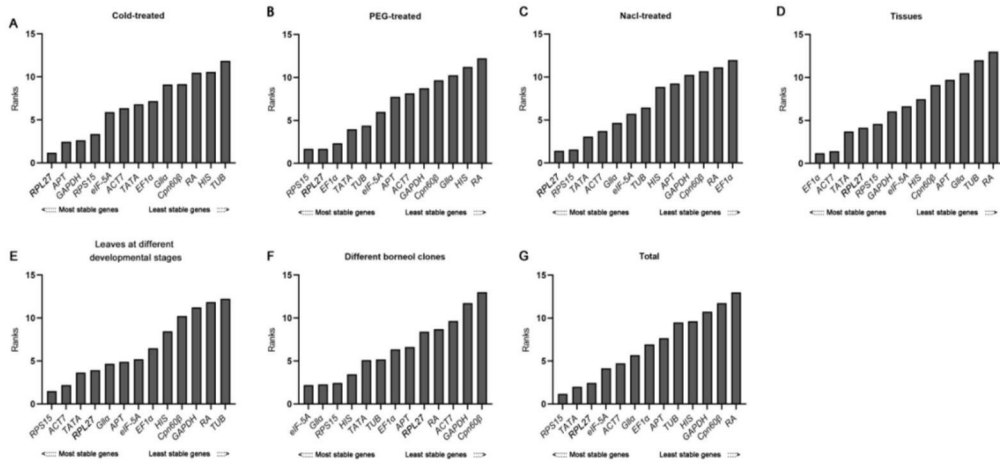


图6

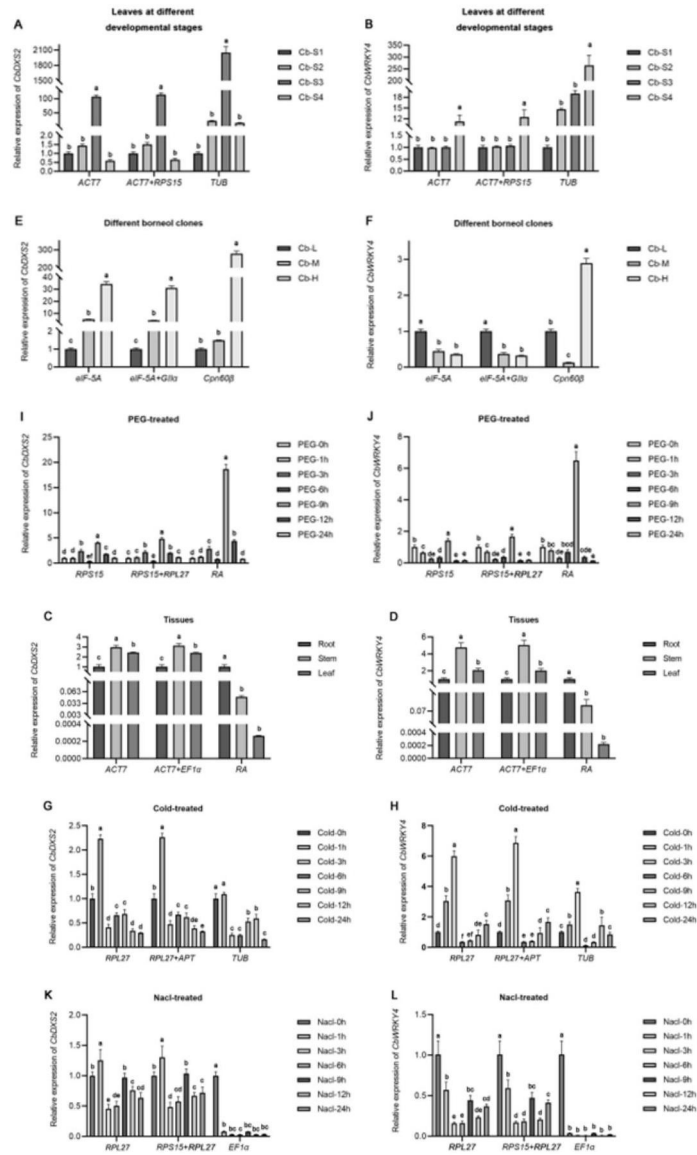


图7