



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115852014 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202210965870.7

(22) 申请日 2022.08.12

(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广汕一路233号

(72) 发明人 白青松 何波祥 蔡燕灵 汪迎利
张谦 梁东成 尧俊 连辉明

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

专利代理师 刘瑜

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

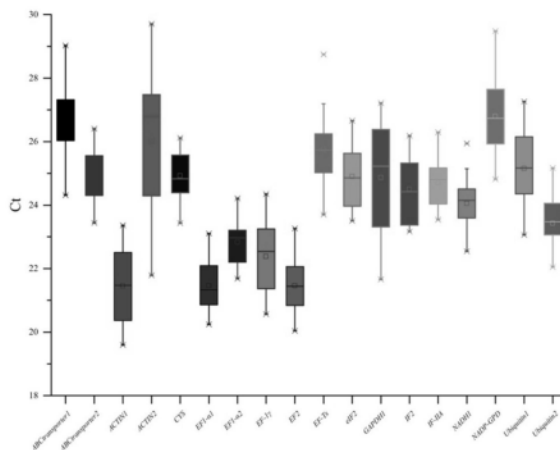
权利要求书2页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

木荷生长与开花相关内参基因筛选方法、引物及应用

(57) 摘要

本发明公开了木荷生长与开花相关内参基因筛选方法、引物及应用。该筛选方法包括如下步骤：(1) 分别取M个材积差异显著的木荷单株的成熟叶片和其他任意1个木荷单株的N个不同组织，然后对全部样本提取总RNA，并反转录cDNA；(2) 根据18个候选内参基因的核苷酸序列分别设计引物，得到PCR引物；(3) 稳定性评价：以cDNA为模板，利用PCR引物分别进行qRT-PCR扩增，获得CT值，并进一步计算得到平均标准差；然后利用不同方法对候选内参基因的稳定性进行评价，筛选得到木荷的内参基因或其组合。本发明评选出的内参基因具有较高的稳定性、且兼具针对性和广泛适用性，可为木荷相关生理过程基因功能研究提供重要参考。



1. 一种木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 材料选择:

分别取M个材积差异显著的木荷单株的成熟叶片,获得M个不同材积来源的实验材料;分别取其他任意1个木荷单株的N个不同组织,获得N个不同组织来源的实验材料;再将不同材积来源的实验材料和不同组织来源的实验材料共同组成全部样本材料,即共获得M+N个样本;最后分别对M+N个样本提取总RNA,并反转录cDNA;其中, $M \geq 10$, $N \geq 12$;

(2) 引物设计:

根据候选内参基因的核苷酸序列分别设计引物,得到特异性扩增候选内参基因的PCR引物;其中,所述候选内参基因包括EF1- $\alpha 1$ 、EF1- $\alpha 2$ 、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1和ACTIN2基因;

(3) 稳定性评价:

以cDNA为模板,利用特异性扩增候选内参基因的PCR引物分别进行qRT-PCR扩增,获得CT值,并进一步计算得到平均标准差;然后分别针对不同材积来源的实验材料、不同组织来源的实验材料以及全部样本材料,利用 ΔCt 、geNorm、NormFinder、BestKeeper和RefFinder方法中的至少三种对候选内参基因的稳定性进行评价;再根据稳定性评价结果,将所述候选内参基因按照稳定性由强到弱进行排序,筛选得到木荷的内参基因或内参基因组合。

2. 根据权利要求1所述的木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的不同组织包括成熟叶片、叶柄、芽、花瓣、雄蕊、雌蕊、未成熟果实、成熟果实、新生花器官以及不同发育阶段的枝条;

所述的不同发育阶段的枝条为从枝条的末端开始,从嫩枝到老枝,连续取3个以上不同发育阶段枝条;

步骤(2)中所述的特异性扩增候选内参基因的PCR引物分别如SEQ ID NO.1~36所示。

3. 根据权利要求1所述的木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,其特征在于:

步骤(2)中所述的EF1- $\alpha 1$ 、EF1- $\alpha 2$ 、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1和ACTIN2基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.37~54所示。

4. 根据权利要求1所述的木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,其特征在于:

步骤(2)中所述的内参基因为EF1- $\alpha 1$ 、EF1- $\alpha 2$ 、NADH1和eIF2,其基因序列分别如SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.49和SEQ ID NO.51所示。

5. 根据权利要求1所述的木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,其特征在于:

步骤(3)中所述的筛选为选择综合排序第一和/或第二的候选基因作为木荷的内参基因或内参基因组合;

步骤(3)中,对于不同材积来源的实验材料,其内参基因为NADH1和eIF2基因中的至少一种;

步骤(3)中,对于不同组织来源的实验材料,其内参基因为EF1- $\alpha 1$ 和EF1- $\alpha 2$ 基因中的至少一种;

步骤(3)中,对于全部样本材料,其内参基因为EF1- $\alpha 1$ 和eIF2基因中的至少一种。

6. 一种木荷生长与开花相关的内参基因,其特征在于,内参基因具体如下:

(i) 对于来自不同材积的木荷单株的实验材料,其内参基因为NADH1和eIF2基因中的至少一种;

(ii) 对于来自同一木荷单株的不同组织的实验材料,其内参基因为EF1- α 1和EF1- α 2基因中的至少一种;

(iii) 对于来自不同材积的木荷以及来自木荷的不同组织的实验材料,其内参基因为EF1- α 1和eIF2基因中的至少一种。

7. 根据权利要求6所述的木荷生长与开花相关的内参基因,其特征在于:

步骤(i)中所述的实验材料为材积差异显著的木荷单株的成熟叶片;

步骤(i)中,用于扩增NADH1基因的引物序列如SEQ ID NO.25~26所示,用于扩增eIF2基因的引物序列如SEQ ID NO.29~30所示;

步骤(ii)中所述的不同组织包括成熟叶片、叶柄、芽、花瓣、雄蕊、雌蕊、未成熟果实、成熟果实、新生花器官以及不同发育阶段的枝条;

所述的不同发育阶段的枝条为从枝条的末端开始,从嫩枝到老枝,连续取3个以上不同发育阶段的枝条;

步骤(ii)中,用于扩增EF1- α 1基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示,用于扩增EF1- α 2基因的引物序列如SEQ ID NO.3~4所示;

步骤(iii)中,用于扩增EF1- α 1基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示,用于扩增eIF2基因的引物序列如SEQ ID NO.29~30所示。

8. 权利要求6或7所述的木荷生长与开花相关内参基因在实时荧光定量PCR或木荷育种方面的应用。

9. 权利要求6或7所述的木荷生长与开花相关内参基因在木荷生长、开花和/或种子相关基因的表达分析中的应用。

10. 权利要求6或7所述的木荷生长与开花相关内参基因在筛选与木荷生长、开花和/或种子形成相关的基因中的应用。

木荷生长与开花相关内参基因筛选方法、引物及应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,特别涉及木荷生长与开花相关内参基因筛选方法、引物及应用。

背景技术

[0002] 木荷是广泛分布于我国南方地区重要的用材和森林防火树种,同时也是重要的林木花卉观赏树种。目前,国内研究人员已利用常规手段对该树种开展长时间的育种研究,选育了一系列林木良种。然而,随着分子生物学技术在林木育种的普及,该树种已初步进入分子育种行列。通过修饰特定基因的表达以获得人们所需林木重要性状是目前生物领域最有效的遗传改良手段,获得具有调控目标性状的功能基因是实现该技术的前提。

[0003] 利用荧光定量PCR (qRT-PCR) 方法进行候选基因的表达验证是常用的手段,该方法需要在不同材料表达稳定的内参基因进行目的基因的归一化分析。因此,针对不同材料筛选适宜的内参基因是开展候选基因表达研究的基础。

[0004] 现有研究报道 (Zhongyi Yang, Rui Zhang, Zhichun Zhou. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis in *Schima superba*. 2021, 12, 732. doi:org/10.3390/genes12050732) 了木荷次生木质部、次生韧皮部、成熟叶、芽、一年生果实和组培苗继代培养的根等不同组织的内参基因筛选,最后筛选出SsuACT、SsuRIB作为适宜的内参基因组合。但这些内参基因使用范围有限,既不适用于材积性状存在显著差异的个体,也不适用于以花器官为主要材料的木荷不同组织。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种木荷生长与开花相关的内参基因,适用于木荷生长发育以及开花研究。

[0007] 本发明的再一目的在于提供所述木荷生长与开花相关内参基因的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0009] 一种木荷生长与开花相关内参基因的筛选方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 材料选择:

[0011] 分别取M个材积差异显著的木荷单株的成熟叶片,获得M个不同材积来源的实验材料;分别取其他任意1个木荷单株 (除已经取的M个材积差异显著的木荷单株外的其他任意单株) 的N个不同组织,获得N个不同组织来源的实验材料;再将不同材积来源的实验材料和不同组织来源的实验材料共同组成全部样本材料,即共获得 (M+N) 个样本;最后分别对 (M+N) 个样本提取总RNA,并反转录cDNA;其中, $M \geq 10$, $N \geq 12$;

[0012] (2) 引物设计:

[0013] 根据候选内参基因的核苷酸序列分别设计引物,得到特异性扩增候选内参基因的

PCR引物;其中,所述候选内参基因包括EF1- α 1、EF1- α 2、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1和ACTIN2基因;

[0014] (3) 稳定性评价:

[0015] 以cDNA为模板,利用特异性扩增候选内参基因的PCR引物分别进行qRT-PCR扩增,获得CT值,并进一步计算得到平均标准差(mSD);然后分别针对不同材积来源的实验材料、不同组织来源的实验材料以及全部样本材料,利用 Δ Ct、geNorm、NormFinder、BestKeeper和RefFinder方法中的至少三种对候选内参基因的稳定性进行评价;再根据稳定性评价结果,将所述候选内参基因按照稳定性由强到弱进行排序,筛选得到木荷的内参基因或内参基因组合。

[0016] 步骤(1)中所述的显著差异是通过计算方差分析(ANOVA)计算得到材积差异显著的家系子代,其中材积有固定计算公式为: $HT^{1.01545} \times DBH^{1.81296} \times 6.29692 \times 10^{-5}$,式中HT是树高,DBH是胸径。

[0017] 步骤(1)中所述的不同组织包括成熟叶片、叶柄、芽、花瓣、雄蕊、雌蕊、未成熟果实、成熟果实、新生花器官以及不同发育阶段的枝条。

[0018] 所述的新生花器官为刚形成但尚未展开的整个花器官。

[0019] 所述的不同发育阶段的枝条为从枝条的末端开始,从嫩枝到老枝,连续取3个以上不同发育阶段的枝条。

[0020] 步骤(1)中所述的M和N的取值范围可以根据实际需要进行,总样本量(M+N) \geq 22。

[0021] 步骤(2)中所述的特异性扩增候选内参基因的PCR引物根据内参基因的核苷酸序列进行设计,使得PCR产物片段大小在80~300bp(优选101~250bp)之间,然后根据凝胶电泳条带和qRT-PCR溶解曲线进行筛选,选择电泳条带单一且溶解曲线为单一峰所对应的引物作为特异性扩增候选内参基因的PCR引物;优选为分别如SEQ ID NO.1~36所示;进一步优选为如SEQ ID NO.1~4、SEQ ID NO.25~26以及SEQ ID NO.29~30所示。

[0022] 步骤(2)中所述的EF1- α 1、EF1- α 2、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1和ACTIN2基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.37~54所示。

[0023] 步骤(2)中所述的内参基因优选为EF1- α 1、EF1- α 2、NADH1和eIF2,其基因序列分别如SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.49和SEQ ID NO.51所示。

[0024] 步骤(3)中所述的筛选可以选择综合排序第一和/或第二的候选基因作为木荷的内参基因或内参基因组合。

[0025] 步骤(3)中,对于不同材积来源的实验材料,其内参基因优选为NADH1和eIF2基因中的至少一种。

[0026] 步骤(3)中,对于不同组织来源的实验材料,其内参基因优选为EF1- α 1和EF1- α 2基因中的至少一种。

[0027] 步骤(3)中,对于全部样本材料,其内参基因优选为EF1- α 1和eIF2基因中的至少一种。

[0028] 一种木荷生长与开花相关的内参基因,其内参基因具体如下:

[0029] (i) 对于来自不同材积的木荷单株的实验材料,其内参基因为NADH1和eIF2基因中

的至少一种；

[0030] (ii) 对于来自同一木荷单株的不同组织的实验材料,其内参基因为EF1- α 1和EF1- α 2基因中的至少一种；

[0031] (iii) 对于来自不同材积的木荷以及来自木荷的不同组织的实验材料(即对于所有样本材料),其内参基因为EF1- α 1和eIF2基因中的至少一种。

[0032] 步骤(i)中所述的实验材料优选为材积差异显著的木荷单株;更优选为材积差异显著的木荷单株的成熟叶片。

[0033] 步骤(i)中,用于扩增NADH1基因的引物序列如SEQ ID NO.25~26所示,用于扩增eIF2基因的引物序列如SEQ ID NO.29~30所示。

[0034] 步骤(ii)中所述的不同组织包括成熟叶片、叶柄、芽、花瓣、雄蕊、雌蕊、未成熟果实、成熟果实、新生花器官以及不同发育阶段的枝条。

[0035] 所述的不同发育阶段的枝条为从枝条的末端开始,从嫩枝到老枝,连续取3个以上不同发育阶段枝条。

[0036] 步骤(ii)中,用于扩增EF1- α 1基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示,用于扩增EF1- α 2基因的引物序列如SEQ ID NO.3~4所示。

[0037] 步骤(iii)中,用于扩增EF1- α 1基因的引物序列如SEQ ID NO.1~2所示,用于扩增eIF2基因的引物序列如SEQ ID NO.29~30所示。

[0038] 所述的木荷生长与开花相关内参基因在实时荧光定量PCR(qRT-PCR)中的应用。

[0039] 所述的木荷生长与开花相关内参基因在木荷生长、开花和/或种子(种实形成)相关基因的表达分析中的应用。

[0040] 所述的木荷生长与开花相关内参基因在筛选与木荷生长、开花和/或种子形成相关的基因中的应用。

[0041] 所述的木荷生长与开花相关内参基因在木荷育种方面的应用。

[0042] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0043] (1) 本发明针对材用、观赏花卉、种子形成等经济性状基因功能研究需求筛选表达稳定的内参基因,采用转录组初选、qRT-PCR验证、多种方法比较分析对候选内参基因进行筛选,该工艺流程简洁、高效,适于多数林木相关性状内参基因筛选需求,采用多种方法评选出的内参基因具有较高的稳定性且兼具针对性和广泛适用性,为木荷相关生理过程基因功能研究提供了重要参考。

[0044] (2) 本发明解决了木荷树种利用qRT-PCR方法进行目标基因表达量定量研究过程中内参基因缺乏的问题,主要涉及材积性状显著差异的个体及以花器官为主的不同组织,利用 Δ Ct、geNorm、NormFinder、BestKeeper、RefFinder等不同算法对18个候选内参基因的稳定性进行了评价,综合分析表明,NADH1和eIF2适用于不同材积木荷单株,EF1- α 1和EF1- α 2适用于不同的组织(包含花器官等),而EF1- α 1和eIF2是可适用于全部样本。

[0045] (3) 本发明方法所用材料来源广:本技术针对木荷材用这一最重要的经济性状,选择表型显著差异的试验材料,有助于高产木荷优良品系选育与基因功能研究;此外,花器官与种子形成密切相关,选择相关的组织材料有助于研究木荷开花和种实形成相关生理过程基因功能研究。以上所述为木荷最关注的研究热点,针对相关组织材料筛选内参基因有助于基因功能研究。

[0046] (4) 本发明方法中的内参基因种类丰富:本技术所涉及候选内参基因与现有技术存在明显差别,主要涉及EF1- α 1、EF1- α 2、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1、ACTIN2等18个基因,与现有报道相比,EF1- α 、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin、ABC transporter、IF、NADH、EF-1 γ 、eIF、IF-IIA为未曾报道的基因种类;其中,EF1- α 1、EF1- α 2、CYS、NADH1、eIF2为表达最稳定的候选内参基因,为未来的基因研究提供重要参考。

附图说明

[0047] 图1是本发明技术流程图。

[0048] 图2是18个候选内参基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图(DNA Marker:100~5000bp)。

[0049] 图3是18个候选内参基因的熔解曲线图。

[0050] 图4是候选内参基因在全部样本的CT值分布情况图(箱型图表示第25和75个百分点;正方形代表中值;×代表最大值和最小值)。

[0051] 图5是基于geNorm分析候选内参基因表达稳定性及最佳内参基因数量分析结果图;其中,a和d为不同材积木荷的分析结果;b和e为不同组织的分析结果;c和f为全部样本的分析结果。

[0052] 图6是基于RefFinder分析候选内参基因的表达稳定性测试结果图;其中,a为不同材积木荷的测试结果;b为不同组织的测试结果;c为全部样本的测试结果。

[0053] 图7是利用6个内参基因对目的基因SsCSL1与SsCSL2表达量的对比分析结果图;其中,a为目的基因SsCSL1;b为目的基因SsCSL2。

具体实施方式

[0054] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。下列实施例中未注明具体实验条件的试验方法,通常按照常规实验条件或按照制造厂所建议的实验条件。除非特别说明,本发明所用试剂和原材料均可通过市售获得。

[0055] 实施例1

[0056] (1) 植物材料选择和转录组测序(技术流程图如图1所示):

[0057] 随机选择10个材积差异显著的木荷单株(来自广东省林业科学研究院)(显著差异是通过计算方差分析(ANOVA)计算得到10个材积差异显著的家系子代。材积有固定计算公式为: $HT^{1.01545} \times DBH^{1.81296} \times 6.29692 \times 10^{-5}$,其中HT是树高,DBH是胸径。10个单株是每个家系选1个),收集其成熟叶片;同时选择其他任意一个木荷单株(并非来自上述10个木荷单株),收集其成熟叶片、叶柄、芽、花瓣、雄蕊、雌蕊、未成熟果实、成熟果实、新生花器官(即刚形成但尚未展开的整个花器官)以及不同发育阶段的枝条(从枝条的末端开始,从嫩枝到老枝,连续取3个不同发育阶段的枝条)等12个组织为材料,分别提取总RNA,反转录cDNA,然后委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序。

[0058] (2) 候选内参基因筛选、引物设计与特征分析

[0059] 利用木荷转录组测序获得的全部基因FPKM值,结合基因注释功能,初步选择表达最稳定的基因作为候选内参基因。具体利用FPKM计算各基因在22个样品(22个样本分别是上述10个木荷单株的成熟叶片样本(分别命名为:SS1-L、SS2-L……SS10-L)和1个单株的12个组织(分别命名为:成熟叶片(L)、叶柄(Pe)、芽(Pi)、花瓣(YF)、雄蕊(S)、雌蕊(Bu)、未成熟果实(F0)、成熟果实(Fr)、新生花器官(P)以及不同发育阶段的枝条(B1、B2、B3),其中这个单株并非来自上述10个木荷单株,为其他任意的木荷单株,每个组织取18份以上样本(平均分为3份,即3次重复))中的标准差和变异系数,结合文献报道的常见内参基因类型,初步确定18个候选内参基因(表1),包括EF1- α 1、EF1- α 2、GAPDH1、EF2、NADP-GPD、CYS、EF-Ts、Ubiquitin1、Ubiquitin2、ABC transporter1、ABC transporter2、IF2、NADH1、EF-1 γ 、eIF2、IF-IIA、ACTIN1和ACTIN2基因,其基因序列如SEQ ID NO.37~54所示。

[0060] 接着,利用Primer 3设计合适的引物,PCR产物长度通常在80~300bp,本技术设计的产物长度在101~250bp之间,利用PCR验证各基因扩增产物的长度,18个候选内参基因用于qRT-PCR分析的引物详细信息见表1。通过凝胶电泳条带(图2)和qRT-PCR溶解曲线(图3)评价引物特异性,电泳条带单一且溶解曲线为单一峰的为合适的引物。各引物扩增效率分布范围为77.9~118.1%之间,相关系数在0.995~0.999之间。

[0061] 表1 18个候选基因的引物信息及PCR扩增效率

基因名		上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物大小(bp)	扩增效率(%)	相关系数(R ²)
简称	全称					
<i>EF1-α1</i>	elongation factor 1- alpha1	ATGCTTGGCTTGCTTTCCT (SEQ ID NO.1)	TGGGATCTTATCAGGGTTGTA T (SEQ ID NO.2)	161	101.1	0.997
<i>EF1-α2</i>	elongation factor 1- alpha2	AGGCTGCTGAGATGAACAA A (SEQ ID NO.3)	CCACAAGGCAATATCAATAGT G (SEQ ID NO.4)	101	93.7	0.998
<i>GAPDH1</i>	glyceraldehyde-3-p hosphate dehydrogenase 1	TCTGTTGGTTTCAATCGCA (SEQ ID NO.5)	CTGTAGGAGGCATTTCAAGTAG C (SEQ ID NO.6)	151	94.4	0.999
<i>EF2</i>	elongation factor 2	GTTCTCAGTCTCACCCGTCG (SEQ ID NO.7)	CTCAAGATGCAGCTCTCCG (SEQ ID NO.8)	172	95.6	0.998
<i>NADP-GPD</i>	NADP-dependent glyceraldehyde-3-p hosphate dehydrogenase	TCAGGAGGAGAATGGAAGG T (SEQ ID NO.9)	GGCACTCAGAAATGGGCT (SEQ ID NO.10)	238	106.7	0.999
<i>CYS</i>	cys-based protein tyrosine phosphatase	GGTGGAGAGGAGTTGGAAA G (SEQ ID NO.11)	AAAGCGTAGGATAAAAACAGT GC (SEQ ID NO.12)	136	103.1	0.999
<i>EF-Ts</i>	elongation factor Ts	ATGCCAATCCATACCGCC (SEQ ID NO.13)	GACGCAAGAACCACCCT (SEQ ID NO.14)	205	87.5	0.999
<i>Ubiquitin1</i>	Ubiquitin-protein ligase 1	GGTGCGGAGGCAAAGACA (SEQ ID NO.15)	CGACTCCAAATCCATTCACAA A (SEQ ID NO.16)	164	97.3	0.997
<i>Ubiquitin2</i>	Ubiquitin-protein ligase 2	AAAGTGGGTGTCTCCCGT (SEQ ID NO.17)	ACCCAATCCAGTGCCAAC (SEQ ID NO.18)	120	83	0.997
<i>ABCtransporter1</i>	ABC-type transport 1	GCTGGAAAGAGTGTGCTAT TG (SEQ ID NO.19)	CATACACCTCTCTGCCGT (SEQ ID NO.20)	250	118.1	0.996
<i>ABCtransporter2</i>	ABC-type transport 2	AAGTCCGCTACAACGCAA (SEQ ID NO.21)	GGTGGTCTGGTCTGTCTC (SEQ ID NO.22)	143	94.3	0.997
<i>IF2</i>	translation initiation factor IF-2	AGGCTGCCAGGGTATCA (SEQ ID NO.23)	CCTCGCACTTTTATCAATC (SEQ ID NO.24)	162	77.9	0.995
<i>NADH1</i>	NADH dehydrogenase 1	GGCAGAGGCTAAATGACCC (SEQ ID NO.25)	TGACCAGCAACCCCTACAA (SEQ ID NO.26)	136	89.6	0.996
<i>EF-1γ</i>	elongation factor 1 gamma	TCAAGACTCATTTGCTGCG (SEQ ID NO.27)	CCATAAAGAGGGTTGTCAGGC (SEQ ID NO.28)	211	88.8	0.998
<i>eIF2</i>	eukaryotic translation initiation factor 2	ATGACGACGAATACACCCA A (SEQ ID NO.29)	GCTGCTGACTGCGAATC (SEQ ID NO.30)	195	102	0.997
<i>IF-IIA</i>	transcription initiation factor IIA	AGTCTGAACTCGCCATCC (SEQ ID NO.31)	CCCACCAACATTCTCCTG (SEQ ID NO.32)	193	93.5	0.998
<i>ACTIN1</i>	<i>ACTIN1</i>	GTGAAGGCTGGGTTTGCT (SEQ ID NO.33)	ACAATACCGTGCTCAATAGGA (SEQ ID NO.34)	179	93.6	0.999
<i>ACTIN2</i>	<i>ACTIN2</i>	TCAGCCACTCGTGTGTGATA A (SEQ ID NO.35)	GCTTGATTGAGCCTCGTC (SEQ ID NO.36)	170	99.8	0.997

[0064] (3) 候选内参基因的表达稳定性评价

[0065] 通过qRT-PCR获得18个候选内参基因在上述22个样品中的CT值,即以上述cDNA为模板,采用表1中的引物进行qPCR扩增,获得CT值,三次重复;其中,ACTIN1的平均CT值最低(21.45),NADP-GPD的平均CT值最高(26.79),各内参基因之间的转录水平存在明显差异(图4)。

[0066] 采用 $\log_2^{\text{Fold Change}}$ 方法计算22个样本中18个基因的转录水平,其结果显示候选基因在不同组织类型中的表达水平存在不规律性差异变化。因此,需继续利用其它内参基因分析软件候选内参基因表达稳定性。

[0067] 内参基因CT值在各样本的平均标准差 (Mean standard deviation, mSD) 可以用于评价内参基因的稳定性, mSD越低其稳定性越好, 本研究中候选内参基因在不同组织中的稳定性排名见表2。

[0068] 表2 ΔCt 对18个候选基因的稳定性评价

[0069]

排名	不同材积	mSD	不同组织	mSD	全部	mSD
1	NADH1	0.28	EF1- α 1	0.54	EF1- α 1	0.55
2	eIF2	0.28	EF1- α 2	0.55	eIF2	0.57
3	EF2	0.29	EF2	0.57	EF2	0.59
4	EF1- α 1	0.3	CYS	0.58	ABCtransporter2	0.59
5	IF2	0.31	ABCtransporter2	0.59	IF2	0.59
6	Ubiquitin1	0.31	Ubiquitin1	0.6	NADH1	0.59
7	ACTIN1	0.32	eIF2	0.6	IF-IIA	0.64
8	EF1- α 2	0.32	IF-IIA	0.62	Ubiquitin1	0.64
9	Ubiquitin2	0.33	IF2	0.62	Ubiquitin2	0.64
10	EF-1 γ	0.34	NADH1	0.63	CYS	0.65
11	ABCtransporter1	0.38	ACTIN1	0.67	EF1- α 2	0.66
12	ABCtransporter2	0.38	Ubiquitin2	0.68	ABCtransporter1	0.69
13	IF-IIA	0.39	ABCtransporter1	0.7	EF-Ts	0.69
14	GAPDH1	0.42	EF-Ts	0.71	EF-1 γ	0.7
15	CYS	0.43	EF-1 γ	0.79	ACTIN1	0.74
16	EF-Ts	0.45	GAPDH1	1.18	GAPDH1	1.18
17	NADP-GPD	0.57	NADP-GPD	1.45	NADP-GPD	1.23
18	ACTIN2	0.64	ACTIN2	1.54	ACTIN2	1.73

[0070] 利用geNorm软件通过计算内参基因的表达稳定度M值来评估基因的表达稳定性, M值越小说明表达稳定性越高。结果显示, eIF2|NADH1 (0.127) 为不同材积木荷最适宜的内参基因组合 (表3; 图5a), EF1- α 1|EF1- α 2 (0.158) 为木荷不同组织最佳内参基因组合 (表3; 图5b), 而eIF2|IF2 (0.228) 时全部样本最适内参基因组合 (表3; 图5c)。此外, 通过geNorm进一步分析结果显示V2/V3在不同组织类型中均小于0.15, 说明最适合归一化的基因数量为2 (图5d、图5e、图5f)。

[0071] 表3基于geNorm分析18个候选内参基因的稳定性

[0072]

排名	不同材积	M	不同组织	M	全部	M
1	<i>eIF2</i> <i>NADH1</i>	0.127	<i>EF1-α1</i> <i>EF1-α2</i>	0.158	<i>eIF2</i> <i>IF2</i>	0.228
2	<i>Ubiquitin1</i>	0.147	<i>ABCtransporter2</i>	0.227	<i>EF1-α1</i>	0.235
3	<i>EF2</i>	0.163	<i>eIF2</i>	0.251	<i>EF2</i>	0.26
4	<i>IF2</i>	0.171	<i>IF2</i>	0.267	<i>NADH1</i>	0.278
5	<i>EF1-α1</i>	0.179	<i>EF2</i>	0.278	<i>Ubiquitin2</i>	0.294
6	<i>EF1-α2</i>	0.189	<i>IF-IIA</i>	0.3	<i>IF-IIA</i>	0.306
7	<i>ACTIN1</i>	0.195	<i>NADH1</i>	0.32	<i>ABCtransporter2</i>	0.319
8	<i>EF-1γ</i>	0.206	<i>CYS</i>	0.334	<i>EF1-α2</i>	0.327
9	<i>Ubiquitin2</i>	0.219	<i>Ubiquitin2</i>	0.347	<i>CYS</i>	0.343

[0073]

10	<i>ABCtransporter2</i>	0.236	<i>Ubiquitin1</i>	0.36	<i>Ubiquitin1</i>	0.38
11	<i>ABCtransporter1</i>	0.25	<i>ABCtransporter1</i>	0.388	<i>ABCtransporter1</i>	0.41
12	<i>IF-IIA</i>	0.267	<i>ACTIN1</i>	0.413	<i>EF-1γ</i>	0.438
13	<i>GAPDH1</i>	0.283	<i>EF-Ts</i>	0.441	<i>EF-Ts</i>	0.46
14	<i>CYS</i>	0.297	<i>EF-1γ</i>	0.474	<i>ACTIN1</i>	0.485
15	<i>EF-Ts</i>	0.314	<i>GAPDH1</i>	0.56	<i>NADP-GPD</i>	0.567
16	<i>NADP-GPD</i>	0.341	<i>NADP-GPD</i>	0.659	<i>GAPDH1</i>	0.639
17	<i>ACTIN2</i>	0.375	<i>ACTIN2</i>	0.757	<i>ACTIN2</i>	0.76

[0074] 利用NormFinder软件通过计算内参基因的表达稳定值(stability value,SV)筛选内参基因,SV越小说明稳定性越好。利用NormFinder软件对18个候选基因的稳定性进行分析(表4),结果表明在不同材积木荷中NADH1排名第一(SV=0.08),ACTIN2排名最后(SV=0.594);在不同组织中EF1- α 1为最佳选择(SV=0.2),ACTIN2最不稳定(SV=1.458);EF1- α 1在所有样本中的表达稳定性最高(SV=0.233),ACTIN2稳定性最低(SV=1.668)。

[0075] 表4基于NormFinder分析18个候选内参基因的稳定性

[0076]

排名	不同材积	SV	不同组织	SV	全部	SV
1	NADH1	0.08	EF1- α 1	0.2	EF1- α 1	0.233
2	eIF2	0.114	EF1- α 2	0.218	eIF2	0.283
3	EF2	0.126	CYS	0.233	Ubiquitin1	0.292
4	EF1- α 1	0.148	EF2	0.256	ABCtransporter2	0.294
5	IF2	0.161	Ubiquitin1	0.272	NADH1	0.327
6	Ubiquitin1	0.175	ABCtransporter2	0.287	EF2	0.336
7	ACTIN1	0.187	ACTIN1	0.348	IF2	0.336
8	Ubiquitin2	0.188	eIF2	0.381	ABCtransporter1	0.379
9	EF1- α 2	0.199	IF-IIA	0.386	EF-Ts	0.385
10	EF-1 γ	0.211	NADH1	0.393	EF-1 γ	0.408
11	ABCtransporter1	0.268	IF2	0.395	CYS	0.412
12	IF-IIA	0.27	EF-Ts	0.42	IF-IIA	0.412
13	ABCtransporter2	0.282	ABCtransporter1	0.442	Ubiquitin2	0.414
14	GAPDH1	0.332	Ubiquitin2	0.463	ACTIN1	0.433
15	CYS	0.339	EF-1 γ	0.548	EF1- α 2	0.467
16	EF-Ts	0.368	GAPDH1	1.03	GAPDH1	1.031
17	NADP-GPD	0.515	NADP-GPD	1.372	NADP-GPD	1.123
18	ACTIN2	0.594	ACTIN2	1.458	ACTIN2	1.668

[0077] 利用BestKeeper软件通过计算标准差(SD)和变异系数(CV)来评估基因的稳定性。一般来说,基因的稳定性由SD值决定,SD值越低其稳定性越好。结果如表5所示,Bestkeeper对18个基因的稳定性分析结果显示,EF1- α 2适用于不同材积木荷,CYS在不同组织及总样本中稳定性最高,ACTIN2在三种样本组合中均表达最不稳定。

[0078] 表5基于BestKeeper分析18个候选内参基因的稳定性

排名	不同材积	SD (+/- CP)	不同组织	SD (+/- CP)	全部	SD (+/- CP)
[0079]	1	<i>EF1-α2</i>	<i>CYS</i>	0.39	<i>CYS</i>	0.57
	2	<i>ACTIN1</i>	<i>IF-IIA</i>	0.4	<i>EF1-α2</i>	0.58
	3	<i>CYS</i>	<i>ACTIN1</i>	0.42	<i>IF-IIA</i>	0.6
	4	<i>IF-IIA</i>	<i>EF-Ts</i>	0.45	<i>NADH1</i>	0.68
	5	<i>ABCtransporter2</i>	<i>ABCtransporter2</i>	0.47	<i>Ubiquitin2</i>	0.69
	6	<i>Ubiquitin2</i>	<i>EF1-α2</i>	0.47	<i>EF2</i>	0.7
[0080]	7	<i>EF1-α1</i>	<i>Ubiquitin1</i>	0.48	<i>EF1-α1</i>	0.73
	8	<i>eIF2</i>	<i>EF1-α1</i>	0.48	<i>ABCtransporter2</i>	0.75
	9	<i>NADP-GPD</i>	<i>NADH1</i>	0.48	<i>eIF2</i>	0.78
	10	<i>EF2</i>	<i>Ubiquitin2</i>	0.51	<i>IF2</i>	0.8
	11	<i>EF-1γ</i>	<i>eIF2</i>	0.52	<i>NADP-GPD</i>	0.85
	12	<i>Ubiquitin1</i>	<i>EF2</i>	0.52	<i>EF-1γ</i>	0.91
	13	<i>IF2</i>	<i>ABCtransporter1</i>	0.53	<i>EF-Ts</i>	0.91
	14	<i>NADH1</i>	<i>EF-1γ</i>	0.54	<i>ABCtransporter1</i>	0.93
	15	<i>GAPDH1</i>	<i>IF2</i>	0.56	<i>Ubiquitin1</i>	0.98
	16	<i>ABCtransporter1</i>	<i>GAPDH1</i>	0.62	<i>ACTIN1</i>	1.07
	17	<i>EF-Ts</i>	<i>NADP-GPD</i>	0.65	<i>GAPDH1</i>	1.48
	18	<i>ACTIN2</i>	<i>ACTIN2</i>	0.85	<i>ACTIN2</i>	2.05

[0081] 最后,利用RefFinder软件评估18个候选内参基因的稳定性。结果表明,NADH1和eIF2在不同材积木荷中表达相对稳定(图6a),EF1- α 1和EF1- α 2在不同组织中是最合适的选择(图6b),EF1- α 1和eIF2在总样本中的稳定性优于其他基因(图6c)。

[0082] (4) 目的基因验证

[0083] 综合各软件分析结果选择CYS、NADH1、eIF2、EF1- α 1、EF1- α 2等表达稳定的内参基因,以及表达最不稳定的ACTIN2进行两个目的基因SsCSL1(SEQ ID NO.55)与SsCSL2(SEQ ID NO.56)在上述22个样本中的表达对比分析(利用Excel计算基因在各样本的平均值和标准差,并用柱形图展示),三次重复。其中,用于扩增SsCSL1与SsCSL2基因的引物序列如SEQ ID NO.57~60所示。

[0084] 结果如图7所示:结果显示,目的基因SsCSL1与SsCSL2在以ACTIN2为内参基因进行分析时,其表达模式与其它内参基因存在明显差异,表明CYS、NADPH1、eIF2、EF1- α 1、EF1- α 2等内参基因具有明显的优势。

[0085] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

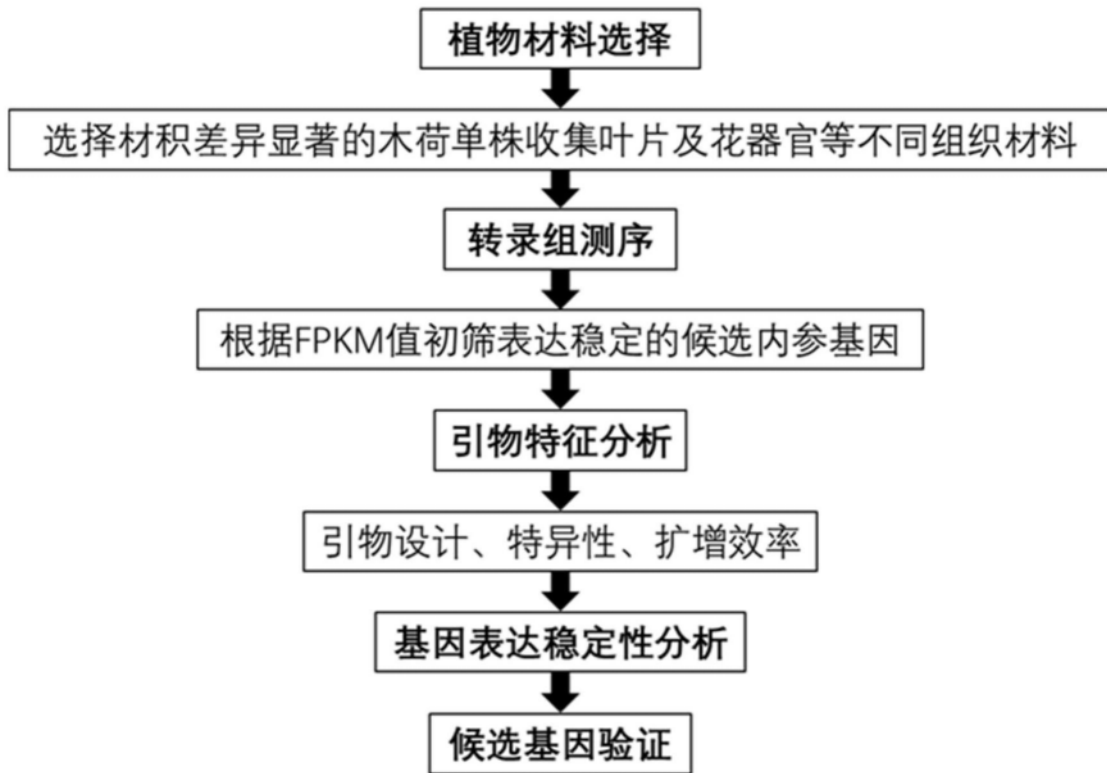


图1

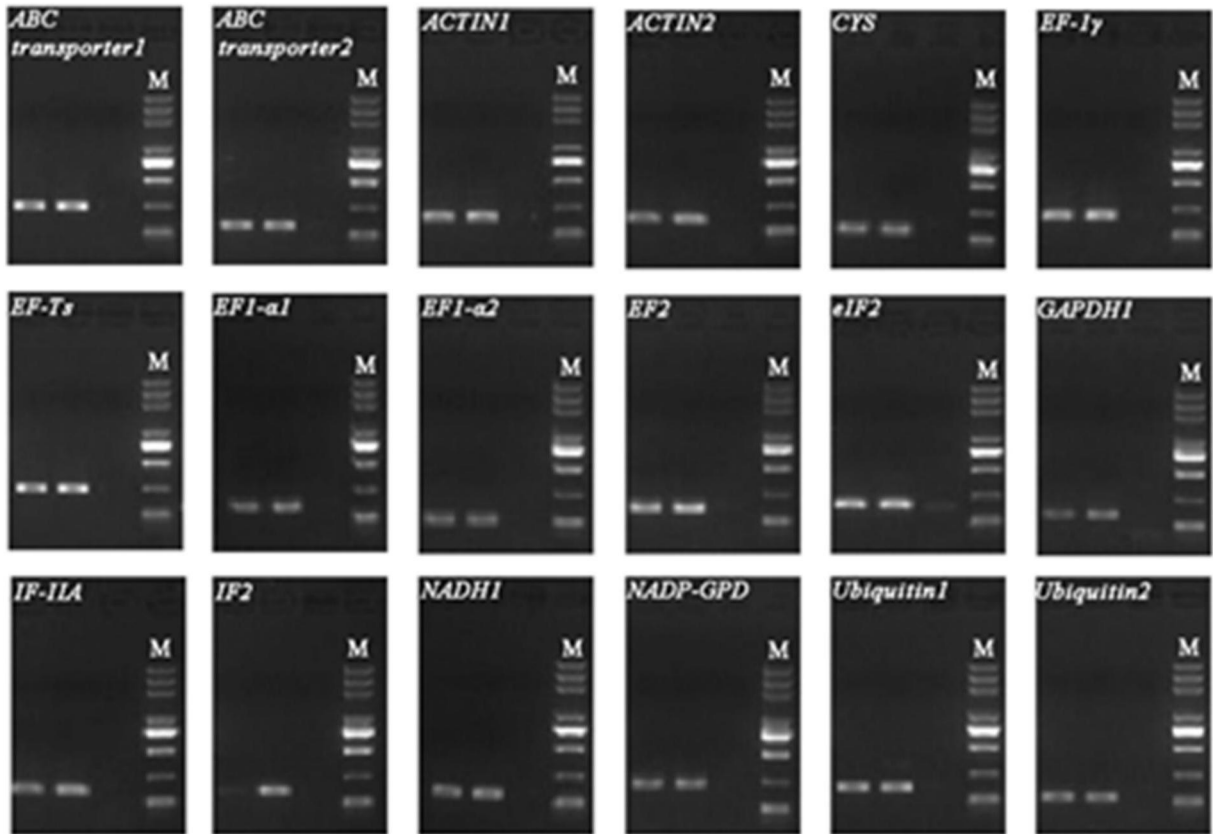


图2

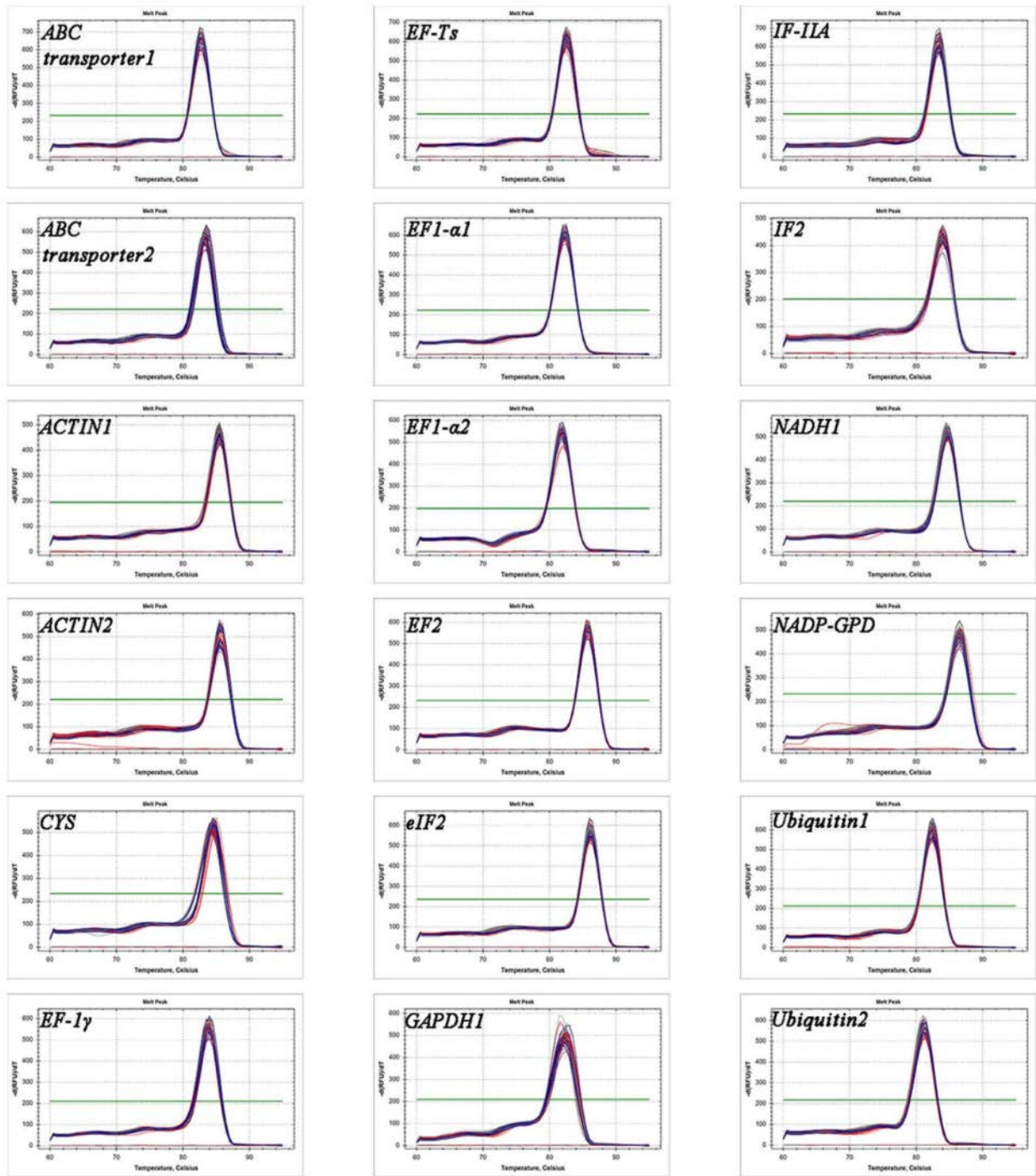


图3

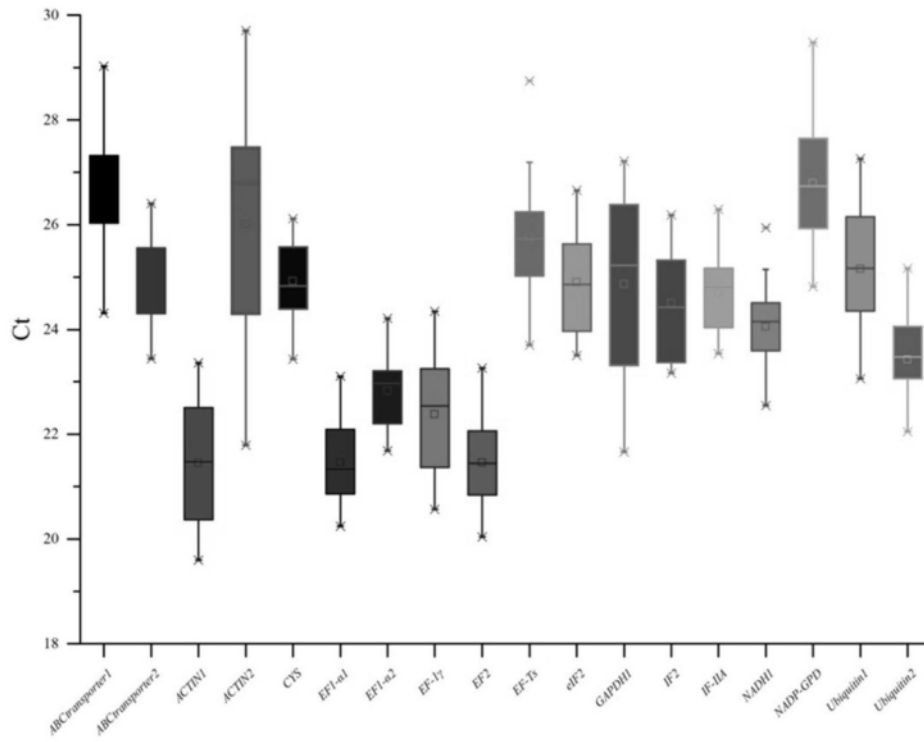


图4

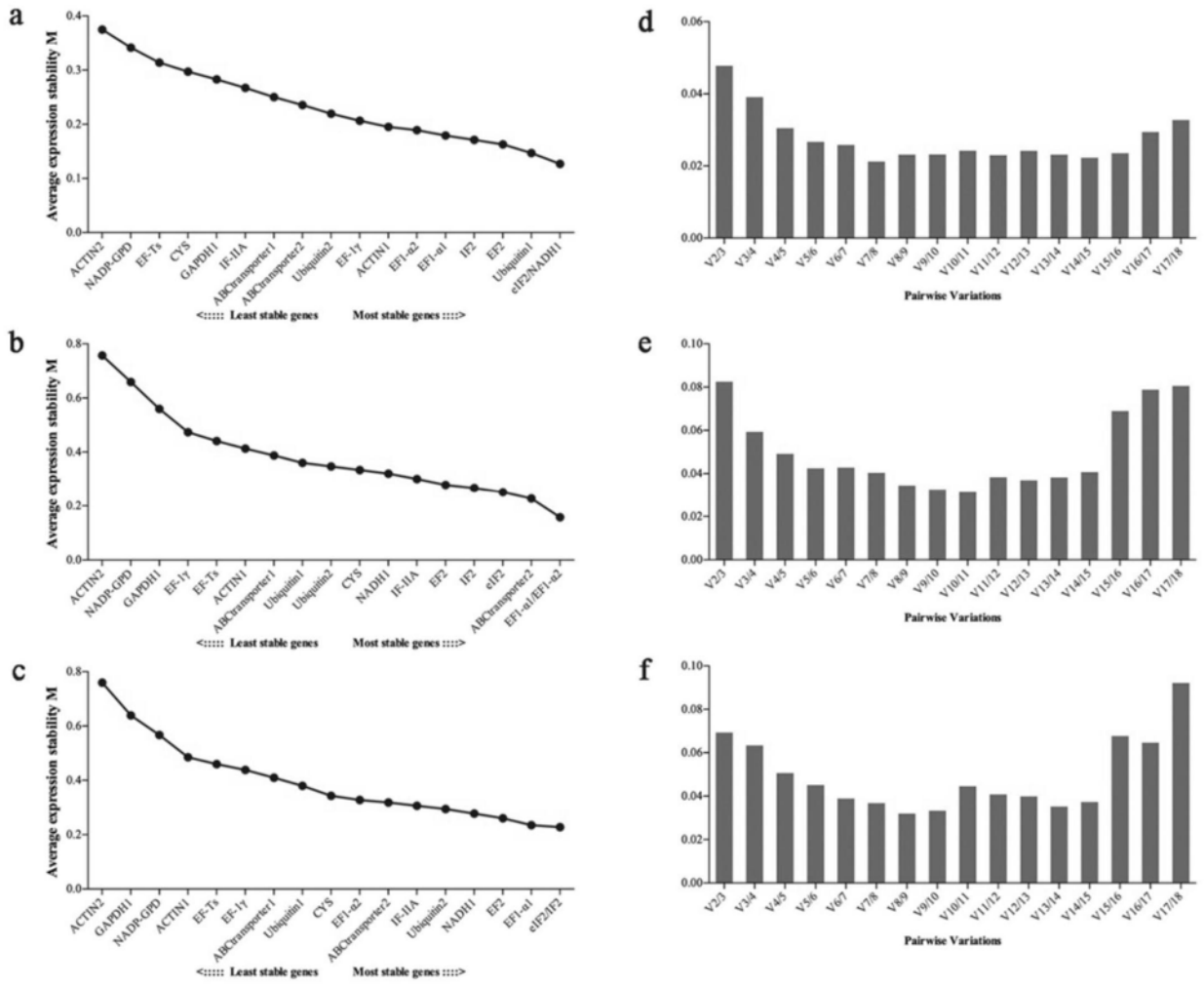


图5

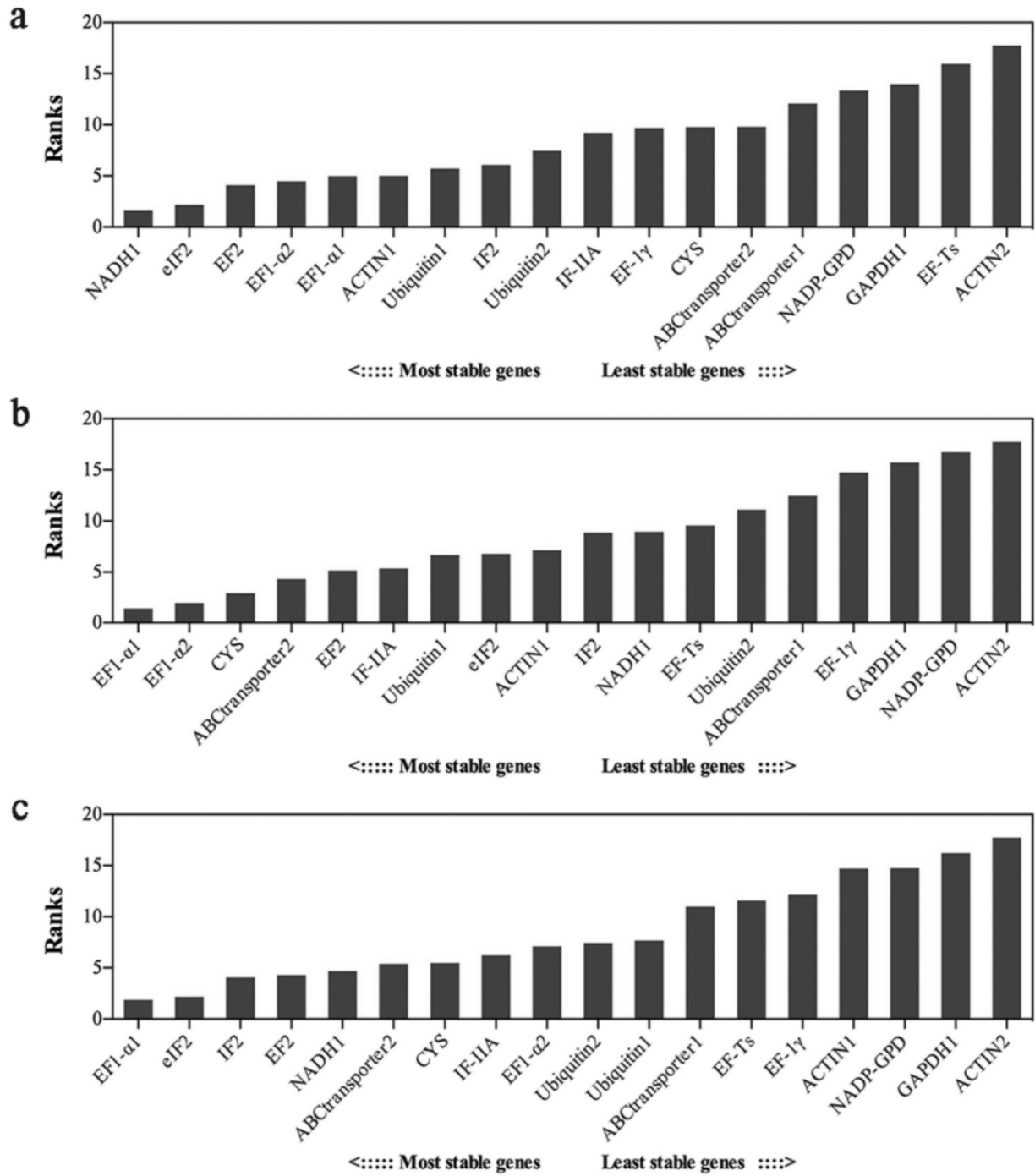


图6

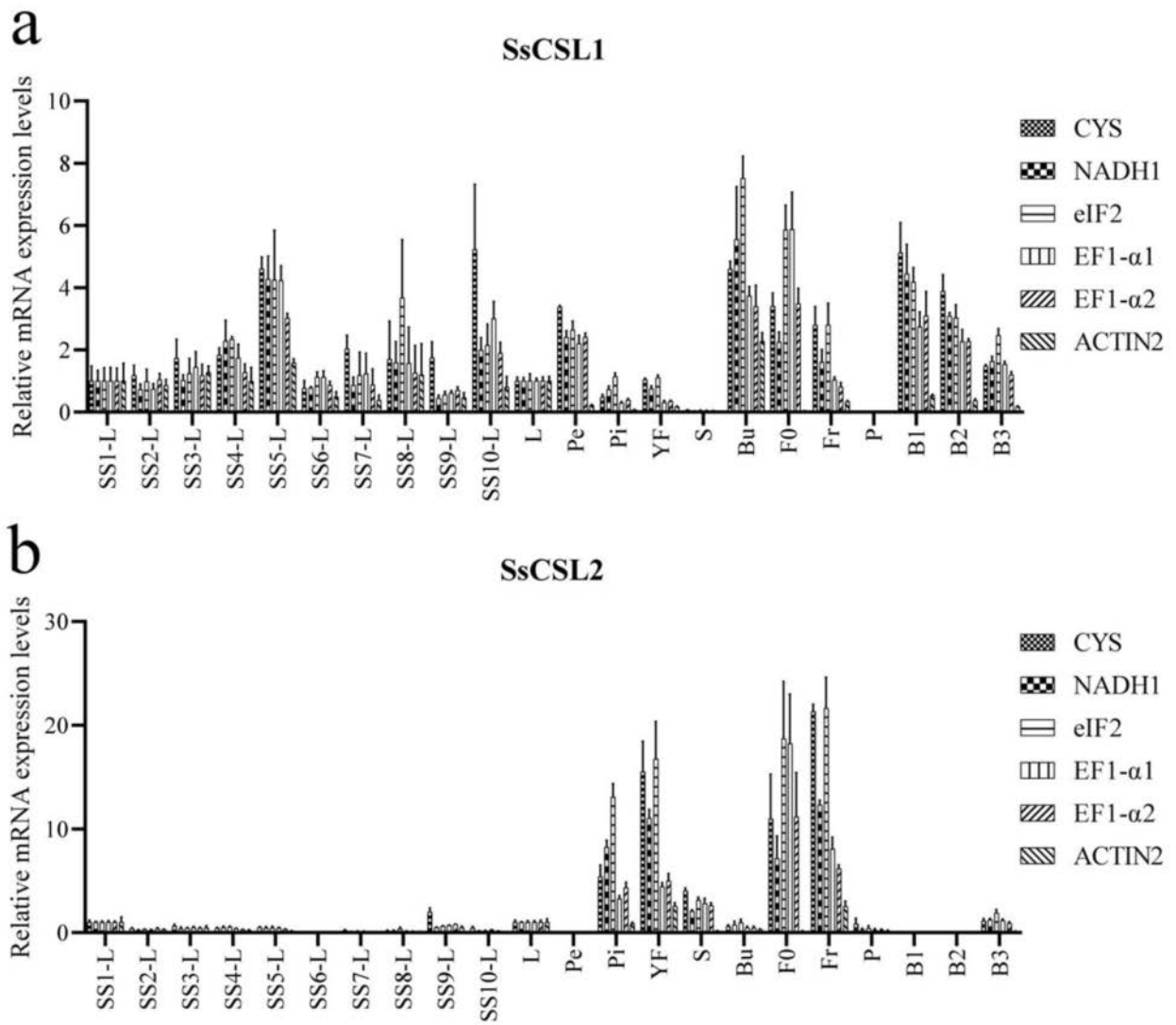


图7