

## 穿心莲茉莉酸甲酯及非生物胁迫下 Real-time PCR 内参基因的筛选

李静宇<sup>1,2</sup>, 孙铭阳<sup>1,2</sup>, 徐世强<sup>1,2</sup>, 梅瑜<sup>1,2</sup>, 顾艳<sup>1,2</sup>, 周芳<sup>1,2</sup>, 孙伟<sup>3</sup>, 王继华<sup>1,2\*</sup>

1. 广东省农业科学院作物研究所/广东省农作物遗传改良重点实验室, 广州 510640;
2. 广东省道地南药资源保护与利用工程技术研究中心, 广州 510640;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:筛选合适的穿心莲茉莉酸甲酯(MeJA)和非生物胁迫下实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测的内参基因。方法:利用高温、干旱、紫外和MeJA处理的穿心莲转录组数据,挑选到7个候选内参基因肌动蛋白1(*ACT1*),肌动蛋白2(*ACT2*),转录延伸因子(*EF-1 $\alpha$* ),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*),微管蛋白(*TUB*),多聚泛素酶(*UBQ*)和18S核糖体RNA(18S),并以上述处理后的穿心莲叶片为实验材料,进行Real-time PCR验证。利用geNorm, NormFinder和BestKeeper 3种内参稳定性评估软件进行分析,再利用Refinder软件进行综合分析。结果:3种软件基于不同指标进行稳定性评估,结果并不相同,综合分析得出候选内参基因在高温胁迫下表达稳定性顺序依次为 *UBQ*>*18S*>*EF-1 $\alpha$* >*ACT2*>*ACT1*>*GAPDH*>*TUB*;干旱胁迫下表达稳定性顺序依次为 *ACT1*>*UBQ*>*EF-1 $\alpha$* >*18S*>*ACT2*>*GAPDH*>*TUB*;UV胁迫下表达稳定性顺序依次为 *EF-1 $\alpha$* >*TUB*>*ACT2*>*UBQ*>*18S*>*GAPDH*>*ACT1*;MeJA胁迫下表达稳定性顺序依次为 *ACT1*>*EF-1 $\alpha$* >*UBQ*>*ACT2*>*18S*>*TUB*>*GAPDH*。其中18S基因表达丰度较高,不适合作为内参基因。结合转录组数据对4种胁迫中穿心莲内酯合成相关基因酶羟甲基戊二酰辅酶A合成酶(*HMGS*)的相对表达水平验证,发现合适内参基因的Real-time PCR结果更可靠。结论:穿心莲高温、干旱、紫外和MeJA胁迫时,*UBQ*, *ACT1*和*UBQ*, *EF-1 $\alpha$* 和*TUB*, *ACT1*和*EF-1 $\alpha$* 分别为最适内参基因组合,为后期开展穿心莲高温、干旱、紫外和MeJA处理中基因的功能调控和表达研究提供了参考。

**[关键词]** 穿心莲; 内参基因; 实时荧光定量聚合酶链式反应

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0133-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220313

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211229.2039.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-30 15:17

### Screening of Reference Genes of *Andrographis paniculata* Under MeJA and Abiotic Stresses by Real-time Fluorescence-based Quantitative PCR

LI Jing-yu<sup>1,2</sup>, SUN Ming-yang<sup>1,2</sup>, XU Shi-qiang<sup>1,2</sup>, MEI Yu<sup>1,2</sup>, GU Yan<sup>1,2</sup>, ZHOU Fang<sup>1,2</sup>,  
SUN Wei<sup>3</sup>, WANG Ji-hua<sup>1,2\*</sup>

1. Crop Research Institute/Guangdong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. Guangdong Provincial Engineering & Technology Research Center for Conservation and Utilization of the Genuine Southern Medicinal Resources, Guangzhou 510640, China;
3. Institute of Chinese Meteria Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[收稿日期]** 20211105(006)

**[基金项目]** 广东省农业科学院作物研究所广东省农作物遗传改良重点实验室开放研究基金项目(202101);广东省农业科学院科技创新战略专项资金(高水平农科院建设)-金额之星项目(R2019PY-JX003);广东省重点领域研发计划项目(2020B020221001)

**[第一作者]** 李静宇, 硕士, 助理研究员, 从事南药栽培与育种研究, Tel: 020-87541262, E-mail: 15527258440@163.com

**[通信作者]** \* 王继华, 博士, 研究员, 从事南药栽培与育种研究, E-mail: wangjihua@gdaas.cn

**[Abstract] Objective:** To screen the appropriate reference genes for real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) analysis of the *Andrographis paniculata* under methyl jasmonate (MeJA) and various abiotic stresses. **Method:** The actin 1 (*ACT1*), actin 2 (*ACT2*), elongation factor (*EF-1 $\alpha$* ), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), tubulin (*TUB*), polyubiquitin (*UBQ*), and 18S rRNA (*18S*) gene were selected as candidate reference genes based on the RNA-seq data of high temperature, drought, UV, and MeJA. The expression of seven candidate reference genes in the *A. paniculata* leaves was assessed by Real-time PCR, and the stability was analyzed by geNorm, NormFinder, BestKeeper, and Refinder. **Result:** The results of stability evaluated by geNorm, NormFinder, and BestKeeper were not the same due to different indicators. As analyzed by Refinder, for the stability of the expression, the genes were ranked as *UBQ* > *18S* > *EF-1 $\alpha$*  > *ACT2* > *ACT1* > *GAPDH* > *TUB* under high temperature stress, *ACT1* > *UBQ* > *EF-1 $\alpha$*  > *18S* > *ACT2* > *GAPDH* > *TUB* under drought stress, *EF-1 $\alpha$*  > *TUB* > *ACT2* > *UBQ* > *18S* > *GAPDH* > *ACT1* under UV stress, and *ACT1* > *EF-1 $\alpha$*  > *UBQ* > *ACT2* > *18S* > *TUB* > *GAPDH* under MeJA stress. Among them, *18S* gene was not suitable as an internal reference gene due to its high expressive abundance. This study also verified the relative expression level of andrographolide synthesis-related gene hydroxy-methylglutaryl-CoA synthase (*HMGS*) in the four stresses on the basis of transcriptome data, and found that the Real-time PCR results of appropriate internal reference genes were accurate and reliable. **Conclusion:** *UBQ-ACT1-UBQ*, *EF-1 $\alpha$ -TUB*, and *ACT1-EF-1 $\alpha$*  were the suitable combinations under stresses of high temperature, drought, UV, and MeJA. This study is expected to provide references for the research on function regulation and expression of genes in *A. paniculata* under high temperature, drought, UV, and MeJA stresses.

**[Keywords]** *Andrographis paniculata*; internal reference gene; real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR)

穿心莲为爵床科植物,是东亚地区广泛应用的重要中药材<sup>[1]</sup>,具有抗炎、抗菌、抗氧化、护肝和降血糖等作用<sup>[2-3]</sup>。随着穿心莲基因组测序的完成,其功能基因组学的研究,特别是活性成分穿心莲内酯积累的表达与调控是研究的热点。实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 具有定量准确、灵敏度高、特异性强和操作简单便捷等优点被广泛用于鉴定目标基因的表达水平<sup>[4]</sup>,选择合适的内参基因对获得目标基因的精确表达谱至关重要<sup>[5]</sup>。植物中常用的内参基因有肌动蛋白基因 (*ACT*), 转录延伸因子基因 (*EF*), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*), 微管蛋白基因 (*TUB*), 多聚泛素酶基因 (*UBQ*) 及 18S 核糖体 RNA 基因 (*18S*) 等<sup>[6-11]</sup>。作为理想的内参基因应在各种条件下均表达稳定,不受组织部位、发育阶段和外部处理的影响<sup>[12]</sup>。然而,内参基因在不同物种和生理环境条件下并非总是稳定的,目前尚未发现普遍适用于各种植物和环境条件的内参基因<sup>[7-8, 11, 13]</sup>。近年来对不同物种茉莉酸甲酯和非生物胁迫下的内参基因进行了筛选,但与样品的处理密切相关。杨阳等<sup>[14]</sup>发现茉莉酸甲酯处理后的多花黄精块茎中 *UBQ-E2-10* 和 *EF-1 $\alpha$*  2 个内参基因稳定性较好;郭元元等<sup>[15]</sup>对香葱叶片高温

胁迫下内参基因进行筛选,发现最适内参基因为 *ACT*;禾草野大麦在高温胁迫下, *EF-1 $\alpha$*  是最适内参基因,而在低温胁迫下, *18S rRNA-3* 被筛选为最适内参基因<sup>[13]</sup>。严海东等<sup>[16]</sup>发现多年生黑麦草在干旱和热胁迫处理下, *eIF4A* 基因表达稳定性最高;闻志彬等<sup>[17]</sup>发现在干旱胁迫下松叶猪毛菜叶片中  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 表达稳定度最高;曾礼芳等<sup>[18]</sup>发现黄草乌不同器官中的最佳内参基因为 *PP2A1* 和 *EF-1 $\alpha$* ;在 UV-B 胁迫下,紫花苜蓿幼苗根部、茎部和叶片中最适内参基因组合分别为 *MSC27* 和 *UBQ*, *MSC27* 和 *ACT2*, *ACT2* 和 *GAPDH*<sup>[19]</sup>。可以发现不同物种不同胁迫下稳定的内参基因并不相同,根据植物的具体情况筛选合适的内参基因具有重要意义。随着对穿心莲功能基因的深入研究,Real-time PCR 技术已广泛用于验证其基因的表达模式<sup>[4]</sup>。李竹君等<sup>[20]</sup>对穿心莲不同组织内参基因筛选发现,泛素连接酶 (*UBC*) 是最佳内参基因。然而,关于穿心莲不同试验条件下的内参基因的筛选研究尚未见报道。

穿心莲生长和有效成分的积累与产地温度、降水量和光照密切相关<sup>[21]</sup>。茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理穿心莲影响其内酯的合成与积累,是穿心莲内酯合

成研究中的常用处理方法<sup>[22-23]</sup>。稳定的内参基因是利用 Real-time PCR 进行这些胁迫下穿心莲基因表达分析的基础。本研究选取穿心莲 MeJA 处理和高温,干旱,UV 胁迫后的穿心莲叶片材料筛选合适的内参基因,以期穿心莲基因功能研究提供分子基础。

### 1 材料

CFX96 系列 Real-time PCR Detection System (美国 Bio-Rad); ETC 811 型 PCR 仪(东胜创新); SynGene GeneGenius 凝胶成像系统。

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(天根,批号 DP441); 2×Phanta<sup>®</sup> Master Mix, HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)(诺唯赞,批号分别为 P511, R312); TB Green<sup>®</sup> Fast qPCR Mix, DL2000 DNA Marker(日本 TaKaRa,批号分别为 RR430A, 3427A)。Real-time PCR 试剂盒(宝日生物试剂公司,批号 RR430A)。各引物均由生工生物(上海)股份有限公司合成。

本实验选用福建漳州产穿心莲种子,经王继华研究员鉴定为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculate* 的种子,种植于广东省农业科学院作物研究所广东省农作物遗传改良重点实验室。于 28 °C,光周期明/暗 16 h/8 h 和湿度 75% 条件下生长 60 d 后用于胁迫处理。采用自然干旱法进行干旱胁迫,对照组、轻度干旱(DS)和重度干旱(DM)叶片中相对

含水量分别为 90.45%, 80.81% 和 57.54%。利用高温培养箱(温度 50 °C)处理幼苗 0, 3, 6 h 作为高温胁迫,处理 0 h 叶片作为对照。利用辐射照度为 3.8 W·m<sup>-2</sup> 的 UV-C 紫外光处理穿心莲幼苗 2 h 作为 UV 处理,总辐射剂量为 27.36 kJ·m<sup>-2</sup>。白光培养 2 h 的幼苗叶片作为对照。利用浓度为 200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 MeJA 喷洒于穿心莲叶面作为 MeJA 处理,喷洒 ddH<sub>2</sub>O 幼苗作为对照。取样时间分别为喷洒后的 24, 48, 72 h。样品叶片为穿心莲倒三叶,剪取后置于 15 mL 离心管并迅速置液氮速冻,保存于 -80 °C 冰箱。所有样品均进行 3 次独立的生物学重复。将样本送至广州基迪奥生物科技有限公司进行总 RNA 提取和 RNA-Seq 实验。

### 2 方法

**2.1 候选内参基因的选择及引物设计** 根据转录组数据中的 FPKM 值和文献查阅,选择 7 个内参基因进行后续实验,利用 IDT 网站(<https://sg.idtdna.com/pages/tools/primerquest>)进行内参基因 Real-time PCR 引物设计,见表 1。其中 18S 基因使用文献[20]中引物。利用 Real-time PCR 引物进行 PCR 扩增,反应体系(50 μL): 2×Phanta Master Mix 25 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

表 1 穿心莲候选内参基因 Real-time PCR 引物序列及扩增效率

Table 1 Primers sequences and amplification efficiency of *Andrographis paniculate* candidate reference genes in Real-time PCR

基因	基因号	引物(5'-3')	长度/bp	扩增效率/%	相关系数(R <sup>2</sup> )
ACT1	CXN00002480	上游 AGGAGGAAGTCGCTAGAAAAG	119	100.09	0.999
		下游 CCCATCATCGTCGAGAAGTA			
ACT2	CXN00019080	上游 GAGCATCCAATCCTCTTGAC	126	100.40	1.000
		下游 GTACGACCACTCGCATAAAG			
EF-1α	CXN00011834	上游 GTAGAGTGCCGCATAGATTTG	126	93.80	0.995
		下游 GTCGATCCATTCGCTGTATATG			
GAPDH	CXN00004015	上游 CTTGAGGTAGCCGAATTCTC	122	100.19	1.000
		下游 CCAACAGTCTTGGGAGTAAG			
TUB	CXN00023342	上游 TTCGTAGAGAGAAGAGGAGAAG	114	98.80	0.998
		下游 CGAACTAGGTTTGAAGTGGTAG			
UBQ	CXN00002951	上游 GGTAACGAAGCAGGATCAAA	148	95.20	1.000
		下游 GATTGGGAAGTGGGTTAGTG			
18S	FJ002343	上游 GCAACAAACCCCGACTTCT	209	98.00	1.000
		下游 CGAACCTAATTCTCCGTC			

**2.2 候选内参基因的 Real-time PCR** 利用天根 RNA 提取试剂(DP441)进行30个样本的总 RNA 提取。利用诺唯赞反转录试剂盒进行反转录。进行 Real-time PCR 实验的反应体系制备,反应体系为 TB Green Fast qPCR Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 0.8  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 共 40 个循环。所有样品均进行 3 次独立的生物学重复和 2 次技术重复。利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达。

**2.3 候选内参基因引物特异性分析** 将 4 种处理的所有样本 cDNA 等量混合, 稀释 5 倍后作为常规 PCR 扩增模板, PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带的特异性。将所有样本 cDNA 原液等量混合, 稀释至 1/2, 1/16, 1/128, 1/1 024 和 1/8 192 5 个浓度梯度, 分别进行 Real-time PCR 分析。利用 Excel 2019 绘制标准曲线, 横坐标为模板稀释倍数的对数值, 纵坐标为  $C_t$  值, 得到标准曲线斜率  $K$ , 利用公式  $E=(8^{-1/K}-1)$  计算扩增效率。

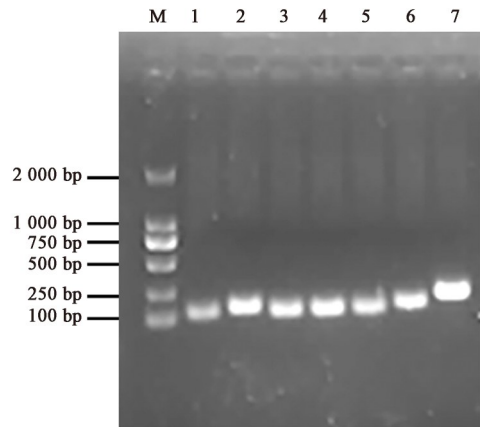
**2.4 候选内参基因  $C_t$  值分析** 将每种处理候选内参基因在该处理中所有样本的  $C_t$  值, 利用 Graphpad Prism 8 绘制箱型图。干旱, 高温, UV 和 MeJA 处理每个箱型图中分别包含 18, 18, 12, 24 个样本数据。

**2.5 候选内参基因稳定性分析** 利用 GeNorm (version 3.4)<sup>[24]</sup>, NormFinder (version 0.953)<sup>[25]</sup> 和 BestKeeper (version 1.0)<sup>[26]</sup> 软件分析基因表达稳定性。利用 RefFinder (<http://bloege.cn/RefFinder/?type=reference>) 对 3 软件分析结果进行排序, 评估候选内参基因的综合稳定性, 并利用 Microsoft Excel 2016 绘制表格。

### 3 结果与分析

**3.1 候选内参基因引物特异性和扩增效率** 基于穿心莲的干旱, 高温, UV 和 MeJA 处理的转录组数据及文献查阅, 选择 7 个 FPKM 值稳定的候选基因, 分别为 *ACT1*, *ACT2*, *EF-1 $\alpha$* , *GAPDH*, *TUB*, *UBQ* 和 18S。利用混合 cDNA 模板进行常规 PCR 扩增, 结果表明产物条带单一, 且与目标条带大小一致。在 Real-time PCR 实验中, 基因扩增熔解曲线呈现显著的单一峰, 说明引物特异性强。7 个候选基因引物的扩增效率介于 95.20%~100.40%, 相关系数均 > 99%, 符合 Real-time PCR 实验要求, 用于进行后续稳定性评估。见图 1。

**3.2 候选内参基因  $C_t$  值分析**  $C_t$  与起始拷贝数的对数呈线性关系, 起始拷贝数越小,  $C_t$  越大。18S 基



M. DL2000; 1. *ACT1*; 2. *ACT2*; 3. *EF-1 $\alpha$* ; 4. *GAPDH*; 5. *TUB*; 6. *UBQ*; 7. 18S(图 2 同)

图 1 穿心莲候选内参基因引物 PCR 电泳

Fig. 1 Primers verification of *Andrographis paniculate* candidate reference genes

因在 4 种非生物胁迫条件下的表达丰度均较高, 不适宜作为内参基因; 而其他 6 个基因的  $C_t$  均在 20~30, 适合用于做内参基因。同一组样本中基因  $C_t$  变化越小, 表明该基因稳定性越好。箱型图中箱的高度可反映数据的波动程度。因此, 在胁迫下  $C_t$  变化较大的基因, 不适宜作为内参基因, 如高温胁迫中 *ACT1*, *GAPDH* 和 *TUB*, 干旱胁迫中 *GAPDH* 和 *TUB*, UV 胁迫中 *ACT1*, MeJA 处理中 *ACT2*。见图 2。

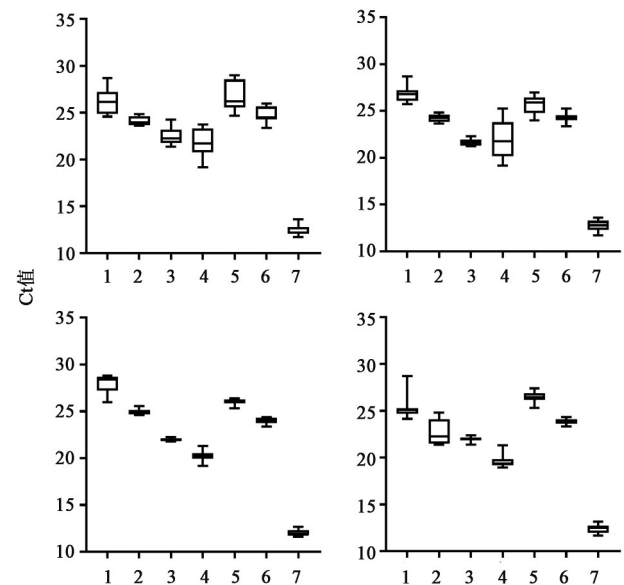


图 2 穿心莲不同胁迫下候选内参基因的  $C_t$  值分布箱型

Fig. 2 Box plot of  $C_t$  value distribution of *Andrographis paniculate* candidate reference genes under different stresses

### 3.3 候选内参基因稳定性分析

#### 3.3.1 GeNorm 软件对于候选内参基因稳定性的分

析 GeNorm 软件通过计算平均表达稳定性值 M 来进行评估内参基因的稳定性。M 值不超过 1.5, 且 M 值越小, 表明该内参基因越稳定。4 种胁迫处理下的 7 个候选内参基因 M 值均 < 1.5。高温和干旱胁迫

下, 稳定性最好的候选内参基因为 *EF-1α* 和 *UBQ*。UV 胁迫处理后, 稳定性最好的是 *TUB* 和 *UBQ*。MeJA 处理后, 稳定性最好的是 *ACT1* 和 *EF-1α*。见表 2。

表 2 GeNorm 分析穿心莲内参基因稳定性

Table 2 Analysis of expression stability of *Andrographis paniculate* candidate reference genes by GeNorm

排序	高温胁迫		干旱胁迫		UV 胁迫		MeJA 胁迫	
	内参基因	M	内参基因	M	内参基因	M	内参基因	M
1	<i>EF-1α/UBQ</i>	0.329	<i>EF-1α/UBQ</i>	0.178	<i>TUB/UBQ</i>	0.164	<i>ACT1/EF-1α</i>	0.210
3	<i>ACT1</i>	0.489	<i>ACT1</i>	0.402	<i>EF-1α</i>	0.215	<i>GAPDH</i>	0.371
4	18S	0.860	18S	0.753	<i>ACT2</i>	0.261	<i>ACT2</i>	0.524
5	<i>ACT2</i>	0.982	<i>ACT2</i>	0.953	18S	0.319	18S	0.636
6	<i>TUB</i>	1.103	<i>GAPDH</i>	1.166	<i>GAPDH</i>	0.421	<i>UBQ</i>	0.768
7	<i>GAPDH</i>	1.240	<i>TUB</i>	1.383	<i>ACT1</i>	0.634	<i>TUB</i>	0.836

### 3.3.2 NormFinder 软件分析候选内参基因稳定性

NormFinder 软件结合组内方差和组间方差分析候选内参基因的稳定性值 M。M 值越小, 该基因越稳定。高温胁迫时, *UBQ* 基因稳定性较好。干旱胁迫时, *ACT1* 和 *UBQ* 基因稳定性较好。UV 胁迫时, *EF-1α* 和 *ACT2* 稳定性较好。MeJA 胁迫时, *ACT1* 和 *EF-1α* 稳定性最好。见表 3。

### 3.3.3 BestKeeper 软件分析候选内参基因稳定性

BestKeeper 软件通过计算变异系数 (CV) 和标准偏差 (SD) 值评估内参基因的稳定性, SV 值和 SD 值越小, 内参基因越稳定。BestKeeper 软件分析表明, 高温胁迫下, 稳定性较好又可作为内参基因的为 *UBQ*; 干旱胁迫下, *ACT1* 稳定性较好; UV 胁迫下, *EF-1α* 和 *TUB* 稳定性较好, *ACT1* 稳定性最差; MeJA 胁迫下, *ACT2* 基因稳定性较好, *TUB* 稳定性最差, 18S 因丰度过高不适宜作为内参基因。结果见表 4。

### 3.3.4 候选内参基因稳定性综合评价 通过对比 3

表 3 NormFinder 分析穿心莲内参基因稳定性

Table 3 Analysis of expression stability of *Andrographis paniculate* candidate reference genes by NormFinder

排序	高温胁迫		干旱胁迫		UV 胁迫		MeJA 胁迫	
	内参基因	SV	内参基因	SV	内参基因	SV	内参基因	SV
1	<i>UBQ</i>	0.524	<i>ACT1</i>	0.295	<i>EF-1α</i>	0.191	<i>ACT1</i>	0.016
2	18S	0.524	<i>UBQ</i>	0.547	<i>ACT2</i>	0.209	<i>EF-1α</i>	0.105
3	<i>EF-1α</i>	0.667	<i>EF-1α</i>	0.605	<i>TUB</i>	0.245	<i>UBQ</i>	0.336
4	<i>ACT2</i>	0.776	18S	0.668	<i>UBQ</i>	0.305	<i>TUB</i>	0.533
5	<i>ACT1</i>	1.131	<i>ACT2</i>	1.101	18S	0.418	<i>ACT2</i>	0.582
6	<i>GAPDH</i>	1.244	<i>GAPDH</i>	1.553	<i>GAPDH</i>	0.454	<i>GAPDH</i>	0.765
7	<i>TUB</i>	1.686	<i>TUB</i>	1.908	<i>ACT1</i>	0.871	18S	0.895

种内参分析软件结果发现, 3 种软件基于不同指标进行稳定性评估, 稳定内参基因排序不尽相同。为筛选出综合稳定性最高的内参基因, 利用 RefFinder 网站综合 geNorm, Normfinder, BestKeeper 和比较

表 4 BestKeeper 分析穿心莲内参基因稳定性

Table 4 Analysis of expression stability of *Andrographis paniculate* candidate reference genes by BestKeeper

排序	高温胁迫				干旱胁迫				UV 胁迫				MeJA 胁迫			
	SD		CV		SD		CV		SD		CV		SD		CV	
	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值	内参基因	均值
1	18S	0.396	<i>UBQ</i>	2.423	<i>ACT1</i>	0.333	<i>ACT1</i>	1.260	<i>EF-1α</i>	0.110	<i>EF-1α</i>	0.502	18S	0.291	<i>ACT2</i>	1.919
2	<i>UBQ</i>	0.612	<i>ACT2</i>	2.727	18S	0.442	<i>UBQ</i>	2.936	<i>TUB</i>	0.238	<i>TUB</i>	0.919	<i>ACT2</i>	0.422	<i>EF-1α</i>	1.962
3	<i>ACT2</i>	0.636	<i>EF-1α</i>	2.877	<i>UBQ</i>	0.734	<i>EF-1α</i>	3.339	<i>ACT2</i>	0.250	<i>ACT2</i>	1.002	<i>EF-1α</i>	0.437	<i>ACT1</i>	2.215
4	<i>EF-1α</i>	0.655	<i>ACT1</i>	3.036	<i>EF-1α</i>	0.742	<i>ACT2</i>	3.464	18S	0.258	<i>UBQ</i>	1.240	<i>ACT1</i>	0.559	18S	2.350
5	<i>ACT1</i>	0.793	18S	3.177	<i>ACT2</i>	0.807	18S	3.466	<i>UBQ</i>	0.298	<i>GAPDH</i>	2.126	<i>UBQ</i>	0.796	<i>UBQ</i>	3.269
6	<i>GAPDH</i>	0.990	<i>GAPDH</i>	4.430	<i>GAPDH</i>	1.334	<i>TUB</i>	5.805	<i>GAPDH</i>	0.429	18S	2.151	<i>GAPDH</i>	0.900	<i>TUB</i>	3.385
7	<i>TUB</i>	1.425	<i>TUB</i>	5.149	<i>TUB</i>	1.572	<i>GAPDH</i>	5.944	<i>ACT1</i>	0.863	<i>ACT1</i>	3.088	<i>TUB</i>	0.922	<i>GAPDH</i>	4.504

$\Delta C_t$ 法对候选内参基因的综合稳定性进行排序,避免单个软件分析结果的局限性。高温胁迫时,*UBQ*综合稳定性最好。干旱胁迫时,*ACT1*和*UBQ*综合稳定性较好。UV处理后,*EF-1 $\alpha$* 和*TUB*综合稳定

性较好。MeJA处理后,综合稳定性最好的是*ACT1*和*EF-1 $\alpha$* 。4种胁迫所有样本综合稳定性最好的基因为*UBQ*和*EF-1 $\alpha$* 。穿心莲内参基因稳定性分析见表5。

表5 RefFinder分析穿心莲内参基因稳定性

Table 5 Analysis of expression stability of *Andrographis paniculate* candidate reference genes by RefFinder

排序	高温胁迫		干旱胁迫		UV胁迫		MeJA胁迫		总样本	
	内参基因	稳定性	内参基因	稳定性	内参基因	稳定性	内参基因	稳定性	内参基因	稳定性
1	<i>UBQ</i>	1.19	<i>ACT1</i>	1.32	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	1.32	<i>ACT1</i>	1.41	<i>UBQ</i>	1.32
2	<i>18S</i>	2.00	<i>UBQ</i>	1.86	<i>TUB</i>	1.86	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	1.86	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	1.68
3	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	2.45	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	2.45	<i>ACT2</i>	2.91	<i>UBQ</i>	3.41	<i>18S</i>	2.28
4	<i>ACT2</i>	3.46	<i>18S</i>	3.36	<i>UBQ</i>	2.99	<i>ACT2</i>	4.16	<i>ACT1</i>	4.00
5	<i>ACT1</i>	5.00	<i>ACT2</i>	5.00	<i>18S</i>	4.73	<i>18S</i>	4.30	<i>ACT2</i>	5.00
6	<i>GAPDH</i>	6.00	<i>GAPDH</i>	6.00	<i>GAPDH</i>	6.00	<i>TUB</i>	4.60	<i>TUB</i>	6.24
7	<i>TUB</i>	7.00	<i>TUB</i>	7.00	<i>ACT1</i>	7.00	<i>GAPDH</i>	5.73	<i>GAPDH</i>	6.74

3.4 候选内参基因稳定性验证 选择稳定性靠前和靠后的内参基因分别对穿心莲内酯合成通路中的关键酶羟甲基戊二酰-辅酶A合成酶(*HMGS*)进行测序表达模式分析,选择*UBQ*,*ACT1*,*GAPDH*,*EF-1 $\alpha$* 和*TUB*5个基因,验证稳定性不同的内参基因对基因表达模式的重要影响。高温胁迫时,*UBQ*和*EF-1 $\alpha$* 为内参基因,*HMGS*表达量随着高温处理时间增加而下调,与转录组数据中变化趋势相同,而稳定性差的*ACT1*和*GAPDH*为内参基因时,H6h相比H3h时表达上调与转录组数据和其他稳定内参趋势相反。干旱胁迫时,使用*UBQ*,*EF-1 $\alpha$* 和

*ACT1*为内参基因时DS和DM时*HMGS*表达量均下调和转录组数据中变化趋势大致相同,而稳定性差的*GAPDH*中表达量显著上调。UV处理时,5个内参基因中表达趋势均与转录组相同,而UV胁迫中稳定性好的内参基因*EF-1 $\alpha$* 和*TUB*中表达量变化倍数与转录组数据更接近。MeJA处理时,以综合稳定性最好的*ACT1*为内参基因时,表达趋势与转录组数据基本相似,而以稳定性差的*TUB*为内参基因,M72h时明显上调与转录组变化趋势相反。由此可知,不同胁迫处理时选择合适的内参基因对获得正确的基因表达谱至关重要。见表6。

表6 5种内参基因对*HMGS*的相对表达水平验证

Table 6 Verification of relative expression levels of *HMGS* by five internal reference genes

样本	转录组 <i>HMGS</i>		<i>UBQ/HMGS</i>		<i>EF-1<math>\alpha</math>/HMGS</i>		<i>ACT1/HMGS</i>		<i>TUB/HMGS</i>		<i>GAPDH/HMGS</i>	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
CK	5.730	1.245	1.059	0.385	1.059	0.385	1.059	0.385	1.059	0.385	1.059	0.385
H3h	3.267	0.046	0.213	0.070	0.196	0.065	0.003	0.001	0.635	0.210	0.264	0.087
H6h	1.095	0.078	0.054	0.008	0.033	0.005	0.027	0.004	0.027	0.004	1.241	0.190
DS	3.249	0.203	0.392	0.141	0.212	0.076	0.112	0.040	0.397	0.142	2.032	0.729
DM	3.521	0.073	0.144	0.061	0.065	0.028	0.042	0.018	0.049	0.021	5.408	2.294
UV	8.267	0.105	59.357	13.792	63.032	14.646	173.463	40.305	71.906	16.707	76.319	17.733
M24h	1.849	0.109	0.189	0.038	0.263	0.053	0.020	0.004	0.569	0.114	0.128	0.026
M48h	2.922	0.017	0.238	0.099	0.306	0.127	0.024	0.010	0.555	0.231	0.134	0.056
M72h	2.299	0.248	0.481	0.176	0.613	0.225	0.039	0.014	1.120	0.411	0.316	0.116

#### 4 讨论

穿心莲有“中药抗生素”的美誉<sup>[1-2,27]</sup>,主要的药用活性成分为穿心莲内酯,常作为抗炎药物治疗发

烧、感冒、腹泻和炎症等<sup>[23]</sup>。随着分子生物学技术在药用植物中的广泛应用,功能基因的表达研究逐渐成为热点。Real-time PCR广泛应用于基因表

达分析,但其结果准确性与内参基因的选择密切相关<sup>[28]</sup>。穿心莲内参基因的筛选具有必要性。

本研究基于转录组数据初步筛选7个候选内参基因,主要验证候选内参基因在穿心莲高温,干旱,UV和MeJA胁迫中的稳定性并筛选合适的内参基因。对候选内参基因的 $C_t$ 值进行分析发现,18S表达丰度过高在目的基因表达量低时不适宜作为内参基因,其他6个基因 $C_t$ 值在20~30,适宜作为内参基因。本研究利用GeNorm, Normfinder和BestKeeper软件分别评估7个候选内参基因在4种胁迫下的表达稳定性。其中,3种软件基于不同指标进行稳定性评估,评估结果并不完全相同,例如GeNorm分析中, $EF-1\alpha$ 和 $UBQ$ 是干旱胁迫中最稳定的内参基因,而BestKeeper分析中, $ACT1$ 是最稳定的内参基因。为了对内参基因的稳定性进行综合性评价,本研究采用RefFinder软件对3种软件的结果进行综合评估,穿心莲高温胁迫时, $UBQ$ 综合稳定性最好。 $UBQ$ 也是砵山酥梨和冬瓜高温胁迫中最稳定的内参基因<sup>[29-30]</sup>。 $EF-1\alpha$ 和 $ACT$ 是管花肉苁蓉愈伤组织干旱胁迫中最合适的内参基因<sup>[31]</sup>。大豆干旱胁迫中 $ACT11$ 最为稳定<sup>[32]</sup>。本实验也发现穿心莲干旱胁迫时, $ACT1$ 和 $UBQ$ 是最稳定的内参基因。本研究穿心莲UV胁迫下, $EF-1\alpha$ 和 $TUB$ 综合稳定性较好, $GAPDH$ 和 $ACT1$ 稳定性最差。然而在紫花苜蓿UV-B胁迫中 $ACT2$ 和 $GAPDH$ 表达最稳定<sup>[19]</sup>。本文MeJA胁迫后,综合稳定性最好的是 $ACT1$ 和 $EF-1\alpha$ 。在其他研究中发现剑麻MeJA胁迫<sup>[33]</sup>、多花黄精MeJA胁迫<sup>[14]</sup>、黄草乌不同组织<sup>[18]</sup>、棉花干旱和盐胁迫<sup>[34]</sup>中 $EF-1\alpha$ 也被筛选为最适内参基因。管花肉苁蓉MeJA处理样本中最合适的内参基因有 $\alpha-TUB2$ 和 $GAPDH$ <sup>[31]</sup>,而本研究MeJA胁迫中 $GAPDH$ 和 $TUB$ 基因最不稳定。这些结果表明不同植物和不同条件下内参基因表达稳定性相似和差异并存,穿心莲不同处理下内参基因的筛选具有重要意义。

本文结合4种胁迫下穿心莲HMGS基因转录组数据,在Real-time PCR实验中,挑选稳定性不同的内参基因对HMGS基因进行表达趋势分析,发现稳定性好的内参基因获得的表达谱更可靠,而稳定性差的内参基因则可能获得错误的基因表达趋势。合适的内参基因的选择非常重要。

本研究基于穿心莲高温胁迫、干旱胁迫,UV处理和MeJA处理转录组数据,利用Real-time PCR实验和geNorm, Normfinder, BestKeeper软件和

RefFinder网站对7个候选内参基因稳定性进行综合评估,结果表明,高温,干旱,UV和MeJA胁迫时, $UBQ$ , $ACT1$ 和 $UBQ$ , $EF-1\alpha$ 和 $TUB$ , $ACT1$ 和 $EF-1\alpha$ 分别为最适内参基因组合;其中 $UBQ$ 和 $EF-1\alpha$ 在4种胁迫所有样本中最稳定。该研究结果有利于穿心莲基因功能及转基因育种等方面的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LIM J C, CHAN T K, NG D S, et al. Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(3): 300-310.
- [2] YU B, DAI C Q, JIANG Z Y, et al. Andrographolide as an anti-H1N1 drug and the mechanism related to retinoic acid-inducible gene- I -like receptors signaling pathway [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(7): 540-545.
- [3] ZHANG R, CHEN Z, ZHANG L, et al. Genomic characterization of WRKY transcription factors related to andrographolide biosynthesis in *Andrographis paniculata* [J]. Front Genet, 2020, 11: 601689.
- [4] NOLAN T, HANDS R E, BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1559-1582.
- [5] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. Methods, 2010, 50(4): 227-230.
- [6] 马璐琳, 段青, 崔光芬, 等. 钝裂银莲花花色色素合成相关基因qRT-PCR内参基因的筛选 [J]. 园艺学报, 2021, 48(2): 377-388.
- [7] HOU S, ZHAO T, YANG D, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in *Corylus heterophylla* Fisch. × *Corylus avellana* L. [J]. Plants (Basel), 2021, 10(1): 159-165.
- [8] HUANG Y, TAN H, YU J, et al. Stable internal reference genes for normalizing real-time quantitative PCR in *Baphicacanthus cusia* under hormonal stimuli and UV irradiation, and in different plant organs [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 668.
- [9] WANG W, HU S, CAO Y, et al. Selection and evaluation of reference genes for qRT-PCR of *Scutellaria baicalensis* Georgi under different experimental conditions [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(2): 1115-1126.
- [10] XIE H, LI B, CHANG Y, et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Spinacia oleracea* under abiotic stress [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 4853632.

- [11] ZHANG K, FAN W, CHEN D, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression normalization in *Taxus* spp. [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):22205-22215.
- [12] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4):611-622.
- [13] ZHANG L, ZHANG Q, JIANG Y, et al. Reference genes identification for normalization of qPCR under multiple stresses in *Hordeum brevisubulatum* [J]. *Plant Methods*, 2018, 14(3):110-124.
- [14] 杨阳,叶碧欢,宋其岩,等. 多花黄精块茎发育和胁迫条件下qPCR内参基因的筛选与验证[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24):5967-5975.
- [15] 郭元元,蒋月喜,车江旅,等. 高温胁迫香葱内参基因筛选与稳定表达分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 5(19):1-28.
- [16] 严海东,蒋晓梅,张新全,等. 非生物胁迫下多年生黑麦草qRT-PCR分析中内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2014(12):1494-1501.
- [17] 闻志彬,张明理. 松叶猪毛菜干旱胁迫下实时定量PCR内参基因的筛选[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(11):2031-2038.
- [18] 曾礼芳,李国栋,王宝婕,等. 黄草乌实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(12):3116-3122.
- [19] 张薇,崔为体,段星亮,等. UV-B胁迫下紫花苜蓿qRT-PCR内参基因的筛选[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(2):248-254.
- [20] 李竹君,郭健雄,李永文,等. 穿心莲实时定量PCR分析中内参基因的选择[J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(2):240-244, 286.
- [21] 王启超,许玲,王飞扬,等. 穿心莲两个主产区品质差异的初步解析[J]. *浙江理工大学学报:自然科学版*, 2021, 45(3):62-68.
- [22] SINGH A, DWIVEDI P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review [J]. *J Pharmacognosy Phytochem*, 2018, 7(1):750-757.
- [23] SUN W, LENG L, YIN Q, et al. The genome of the medicinal plant *Andrographis paniculata* provides insight into the biosynthesis of the bioactive diterpenoid neoandrographolide [J]. *Plant J*, 2019, 97(5):841-857.
- [24] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7):RESEARCH0034.1.
- [25] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTTOFT T F. 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 [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15):5245-5250.
- [26] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6):509-515.
- [27] 曾吴静,许玲,何秋伶,等. 穿心莲农艺性状及其与二萜内酯成分相关性研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15):3233-3238.
- [28] XU L, XU H, CAO Y, et al. Validation of reference genes for quantitative Real-time PCR during bicolor tepal development in asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8:669-679.
- [29] 叶新如,朱海生,林琚,等. 冬瓜实时荧光定量PCR内参基因的筛选与评价[J]. *核农学报*, 2019, 33(3):473-481.
- [30] 陈杨杨,吴潇,谷超,等. '砀山酥梨'实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *中国果树*, 2018, 10(1):16-22, 35.
- [31] 李铁铮,王金铃,刘晓,等. 管花肉苁蓉实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择和验证[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(4):969-981.
- [32] 刘伟灿,王骐,周永刚,等. 大豆干旱胁迫下miRNA与mRNA荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2016, 44(2):61-67.
- [33] 张燕梅,王瑞芳,杨子平,等. 剑麻内参基因筛选与稳定表达分析[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(11):2166-2173.
- [34] WANG M, WANG Q, ZHANG B. Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Gene*, 2013, 530(1):44-50.

[责任编辑 顾雪竹]