

盐胁迫蜜环菌 Real-time PCR 内参 microRNA 的筛选

余祺瑞^{1,2}, 华中一², 周骏辉², 胡启跳², 袁媛^{2*}, 杨全¹, 黄璐琦^{1,2*}

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006;

2. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] 目的:在利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)进行 microRNA(miRNA)表达分析的过程中,选择合适的内参 miRNA 对数据标准化起到重要作用。方法:该文挑选了 13 个蜜环菌候选 miRNA 对其前体进行生物信息分析,PMRD 预测其前体相似序列,并用 RNAfold 对候选 miRNA 前体及其相似序列进行二级结构预测。利用 Real-time PCR 检测在受盐胁迫前后两种基因型蜜环菌(基因型 A,基因型 B)miRNA 的表达量,并结合 geNorm, NormFinder, BestKeeper 软件分析其表达稳定性,筛选合适的内参。结果:对候选 miRNA 的 9 条前体进行二级结构预测以及特征分析,证明预测的 miRNA 属于 miR 家族具有典型的茎-环结构且成熟的 miRNA 位于其前体的 5'或是 3'端;geNorm 分析表明,基因型 A 蜜环菌可选择 Novel-4*, Novel-9 作为内参组合,基因型 B 可选择 Novel-9, Novel-16 作为内参组合;NormFinder 分析结果显示, Novel-9 在基因型 A 蜜环菌和基因型 B 蜜环菌中都有较好的稳定性;BestKeeper 分析显示 Novel-12* 在基因型 A 蜜环菌中稳定性较好, Novel-2* 在基因型 B 蜜环菌中稳定性较好。结论:稳定性最优的内参 miRNA 为 Novel-9,为进一步开展蜜环菌 miRNA 调控机制研究奠定了基础。

[关键词] 蜜环菌; 盐胁迫; 内参 miRNA; 实时荧光定量聚合酶链式反应

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0035-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202062

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.0954.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-24 10:15

Selection of Reference Genes for microRNA Real-time PCR Under Salt Stress in *Armillaria gallica*

YU Qi-rui^{1,2}, HUA Zhong-yi², ZHOU Jun-hui², HU Qi-tiao², YUAN Yuan^{2*}, YANG Quan¹, HUANG Lu-qi^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** In the process of microRNA expression analysis by quantitative Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), the selection of miRNA plays an important role in data standardization. **Method:** In this paper, 13 *Armillaria gallica*. Candidate miRNAs were selected for bioinformatics analysis of their precursors, and the PMRD was used to predict similar sequences of their precursors, and the RNAfold was used to predict the secondary structure of the candidate miRNAs and their similar sequences. Real-time PCR was used to detect miRNAs expression in two genotypes of *Armillaria gallica*

[收稿日期] 20191228(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81891013, 81891010); 国家科技基础性工作专项(2015FY111500); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008); 中央本部级重大增减支项目(2060302); 广西科技重大专项(桂科 AA18242040)

[第一作者] 余祺瑞, 在读硕士, 从事中药资源与鉴定学研究, E-mail: 764384446@qq.com

[通信作者] * 袁媛, 研究员, 博士生导师, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com;

* 黄璐琦, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源与分子生药学研究, Tel: 010-64044340, E-mail: huangluqi01@263.net

(genotype A, genotype B) before and after salt stress, and geNorm, NormFinder and BestKeeper were used to analyze the stability of miRNAs expression. **Result:** Secondary structure prediction and characterization of 9 candidate miRNA precursors showed that the miRNA predicted belonged to the miR family with typical stem-loop structure and the mature miRNAs were at the 5' or 3' end of the miRNA precursors. geNorm analysis showed that genotype A *Armillaria gallica* could select Novel-4* and Novel-9 as reference gene, genotype B could select Novel-9 and Novel-16 as its reference gene. NormFinder analysis showed that Novel-9 was stable in both genotype A and B *Armillaria gallica*. BestKeeper analysis showed that Novel-12* was stable in genotype A *Armillaria gallica* and Novel-2* was stable in genotype B *Armillaria gallica*. **Conclusion:** miRNA Novel-9 is the best stable reference gene, which lays a foundation for further research on the regulation mechanism of miRNA in *Armillaria gallica*.

[Key words] *Armillaria gallica*; salt stress; miRNA reference; Real-time PCR

microRNAs(miRNAs)是一种单链非编码的小RNA(sncRNA),长度约为20~24个核苷酸^[1],在转录后水平调控基因表达。近年来越来越多的研究表明,miRNA在对生物或非生物胁迫反应中发挥着重要的调控作用^[1-3]。利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)进行miRNA表达水平分析是一种常用的方法^[4],但使用Real-time PCR首先需要选择合适的内参miRNA。

理想的内参miRNA表达量应不受组织、实验条件等因素的影响^[5-7],目前研究中大多使用U6 snRNA(U6),18S rRNA等作为miRNA内参^[8-9],但越来越多的实验表明,这些miRNA在适用性、准确性等方面还存在一定缺陷^[10]。因此,从一些生物保守或新的miRNA中筛选获得单个miRNA或组合内参,可能比U6,5SrRNA^[11],5.8S rRNA和蛋白编码基因^[12]表达更加稳定。

蜜环菌是一种药食兼用真菌^[13],其以菌索形态去侵染天麻,是天麻赖以生存的外源营养源^[14]。我国晋代医学家葛洪在《抱朴子》中记载“此草为物,下根如芋魁,有游子十二枚,周环之,去大魁数尺,皆有细根如白发,虽相须而不相连,但以气相属耳”,这是世界上天麻与蜜环菌菌索共生关系的最早记录。为了探讨miRNA在蜜环菌菌索生长及其与天麻共生过程中的调控作用,本课题组前期已通过高通量测序获得了大量miRNA。本研究选取其中11个稳定表达的成熟miRNA以及2个常用miRNA内参作为候选miRNA,采用geNorm, NormFinder和BestKeeper软件对不同盐浓度、不同基因型蜜环菌菌索中候选miRNA的表达稳定性进行分析,并筛选出适合用于蜜环菌Real-time PCR的内参miRNA,为后续蜜环菌miRNA调控研究提供基础。

1 材料

5810R型高速冷冻离心机(Eppendorf公司);VORTEX-2 GENIE型漩涡振荡仪(Scientific Industries公司);PowerPac™型电泳仪(Bio-Rad公司);HE99X-15-1.5型电泳槽(Hoefer公司);SYNGENE型凝胶成像系统(GENE公司);Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪(Thermo Scientific公司);ABI 7500型Real-time PCR仪(Roche公司)。

miRcute miRNA型提取分离试剂盒,miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒,miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为DP501, KR211, FP411];2 000 bp DNAMarker(北京全式金生物技术有限公司,批BM101);其余试剂均为国产分析纯。

高卢蜜环菌 *Armillaria gallica* 为中国中医科学院中药资源中心实验室保存菌种。根据糖苷酶基因基因型差异被分为基因型A(纯合子)和基因型B(杂合子)蜜环菌^[15]。将其菌索分别在马铃薯琼脂糖培养基(PDA培养基),含0.1%NaCl的PDA培养基,含0.2%NaCl的PDA培养基上培养15~18 d,每组3个重复,收集菌索后液氮速冻,-80℃保存。

2 方法

2.1 miRNA的提取, cDNA第一链的合成以及Real-time PCR miRNA提取采用miRcute miRNA提取分离试剂盒,按照产品说明书进行操作。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,利用Nanodrop 2000核酸蛋白仪检测总RNA浓度。

采用Poly(A)加尾法进行miRNA第一链cDNA合成,使用miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒完成反转录。使用miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒进行荧光定量实验。

2.2 候选内参 miRNA 的选择与引物设计 通过对蜜环菌 miRNA 转录组测序,从中选取 11 个成熟且表达量较为丰富的 miRNA (Novel-1*, Novel-2, Novel-2*, Novel-3, Novel-3*, Novel-4*, Novel-9, Novel-10, Novel-12*, Novel-16, Novel-37) 及 2 个常用内参 miRNA (18S rRNA 和 U6) 作为候选 miRNA。Plant microRNA database (PMRD) 对候选 miRNAs 的前体序列进行 blast 获得其同源序列, RNAfold 在线软件 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 对其二级结构进行预测判断其是否符合 miRNA 的重要特征。采用 Primer 5.0 设计引物,上海生工公司合成。反向引物采用天根荧光定量试剂盒 (FP411) 中的通用引物。

2.3 Real-time PCR 分析 以不同条件培养的 2 种基因型蜜环菌 cDNA 为模板进行定量分析。反应体系 20 μL , 包括模板 cDNA 1 μL , SYBR Green I Premix 10 μL , 正反引物各 0.4 μL , RNA-Free ddH₂O 8.2 μL 。Real-time PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 5 循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 45 循环。熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将混样 cDNA 稀释 10 倍, 再等比稀释 5 个浓度梯度, 制作每个 miRNA 的标准曲线。每个反应重复 3 次, 分析扩增效率 (E) 和相关系数 (R^2)。

2.4 数据处理与分析 根据荧光定量的结果, 获得各样品的平均 C_t 值, 分别采用 geNorm^[16], NormFinder^[17] 和 BestKeeper^[18] 3 种软件对不同条件培养的 2 种基因型蜜环菌中 13 个候选 miRNA 的表达量稳定性进行综合分析。geNorm 和 NormFinder 软件的算法是先将 Real-time PCR 得到 C_t 值转换成相对定量数据, $Q = E^{\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_{t_{\min}} - C_{t_{\text{sample}}}$ (E 为扩增效率, 默认值为 2; $C_{t_{\min}}$ 为样品中的最小 C_t 值; $C_{t_{\text{sample}}}$ 为基因在样品中的 C_t 值) 转化为 Q 值后, 再进行表达稳定性分析^[1]。BestKeeper 软件不用将 C_t 值转化成 Q 值, 可以直接用各样本中候选内参基因的平均 C_t 值进行分析^[19]。

软件 geNorm 主要根据 M 值判定 miRNA 的稳定性, M 值 < 1.5, 且值越小、表达越稳定, 并给出单个 miRNA 以及多个 miRNA 的稳定性组合。当配对变异数 $V_n/V_{n+1} < 0.15$, 只需要对 n 个 miRNA 进行数据标准化, 直到找到最小的 n 。软件 Normfinder 与 geNorm 的判定方法一样, 稳定值越小, miRNA 表达越稳定, 但 NormFinder 只给出一个最稳定的 miRNA。

3 结果与分析

3.1 miRNA 质量检测 提取的 miRNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后 100 bp 处有一条清晰的条带, 没有降解和污染, $A_{260/280}$ 在 1.8 ~ 2.1, 提取的总 RNA 质量较好, 可用于后续试验。

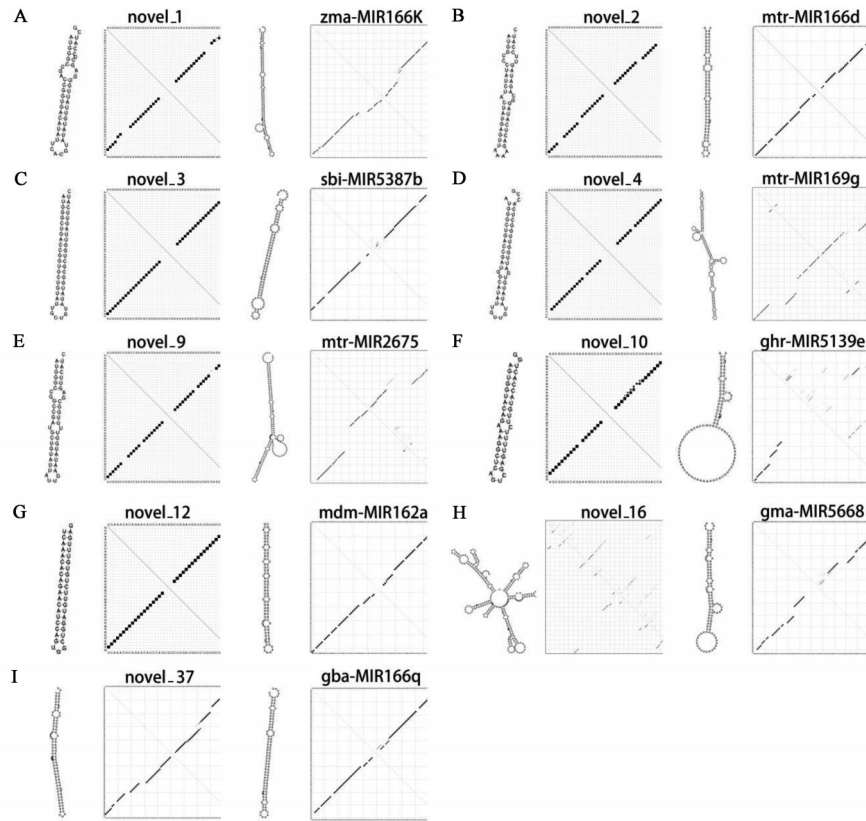
3.2 候选 miRNAs 前体的生物信息学分析 miRNA 与 miRNA* 来自于同一条前体的两条臂, 仅仅是表达量有所差异。因此, 候选的 11 条 miRNA 来自于 9 条前体。为了区分 miRNA 与其他的小分子 RNA (tRNA, siRNA, rRNA), 对其进行特征分析。蜜环菌的候选 miRNA 前体变化很大, 在 42~290 nt, 与小麦 miRNA 前体 (49~252 nt) 类似。早先有报道, miRNA 前体 G+C 含量低于 A+U 使其更加稳定。9 条候选 miRNA 前体 G+C 含量低于 A+U 含量, 平均值 48.07%。另外一个重要特征为 MFEI, 其计算公式为 $MFEI = (100 \times MEF/LP)/(G+C)\%$ 先前报道的 miRNA 前体的 MFEI 的平均值应在 1.0 左右, 候选 miRNA 前体除了 novel_16 剩余都符合此条件。RNAfold 对 9 条 miRNA 前体及其同源序列进行二级结构预测。候选 miRNA 都具有典型的茎-环结构, 且成熟的 miRNA 位于其前体的 5' 或是 3' 端。虽然候选 miRNA 前体与其同源序列相似度不高, 但是其二级结构类似且 novel_1, novel_2, novel_37 其同源序列都属于 miR166 家族。有趣的是, novel_16 的 MFEI 值不高可能与其二级结构侧臂过多有关。由此可以推测候选 miRNA 可能具有其他未知功能。见图 1, 表 1。

3.3 引物特异性及 Real-time PCR 反应效率 根据 miRNA 成熟体的序列设计引物, 候选 miRNA 扩增效率 (E) 在 0.86~1.14, 相关性系数在 0.981 2~0.999 8, 见表 2。熔解曲线显示, 所有曲线均是单一峰, 说明引物特异性好, 可进行下一步实验分析。

3.4 候选 miRNA 的 C_t 值分析 Real-time PCR 可通过 C_t 值对起始模板进行定量分析, 即起始模板量越多, 荧光达到设定阈值的循环数越少。通过对本实验结果分析发现, 18S 保持着较高的表达量, 其 C_t 值在两种基因型蜜环菌中的变化为 7.91~15.76; 其他 12 个候选 miRNAs 在基因型 A 蜜环菌中的 C_t 在 15.62~28.07, 在基因型 B 中的 C_t 在 14.24~28.76, 见图 2。13 个候选 miRNAs 的 C_t 值变化在 3.5~6.5, 不能直观反映其 miRNA 表达的稳定性, 还需结合相关评价软件对各个候选 miRNA 进行稳定性评价。

3.5 候选 miRNA 表达稳定性分析

3.5.1 geNorm 分析 利用 geNorm 软件对候选



A.novel_1及其相似序列 zma-MIR166k的二级结构;B.novel_2及其相似序列 mtr-MIR166d的二级结构;C.novel_3及其相似序列 sbi-MIR5387b的二级结构;D.novel_4及其相似序列 mtr-MIR169g的二级结构;E.novel_9及其相似序列 mtr-MIR2675的二级结构;F.novel_10及其相似序列 ghr-MIR5139e的二级结构;G.novel_12及其相似序列 mdm-MIR162a的二级结构;H.novel_16及其相似序列 gma-MIR5668的二级结构;I.novel_37及其相似序列 gba-MIR166q的二级结构

图1 PMRD预测9个候选miRNA前体及其相似序列的二级结构

Fig. 1 Prediction of secondary structure of 9 candidate miRNA precursors and their similar sequences by PMRD

miRNA的稳定值(M 值)进行分析,见图3。结果表明PDA上培养的基因型A蜜环菌13个候选miRNA内参 M 值均 <1.5 ,其中Novel-4*, Novel-3*的组合最稳定, Novel-3稳定性次之; Novel-16, U6为最不稳定和次不稳定的2个miRNA。盐胁迫条件下基因型A的13个候选miRNA的 M 值也 <1.5 ,其中Novel-4*(0.673)和Novel-9(0.659)的组合最稳定; Novel-16, T6仍是 M 值最大的2个miRNA,显示其不稳定性。

除18S外, PDA上培养的基因型B蜜环菌12个候选miRNA内参 M 均 <1.5 ,其中Novel-9和Novel-10组合最稳定。除18S, Novel-3*外,在盐胁迫条件下基因型B的11个候选miRNA内参 M 均 <1.5 ,其中Novel-9和Novel-16组合最稳定,而Novel-10则表现出较差的稳定性。

利用geNorm软件还可以通过配对变异系数 V_n/V_{n+1} 判定最适内参的数目。13个候选miRNA内参的 $V2/V3$ 值均 <0.15 ,因此选择2个 M 值高的内参进

行组合即可使miRNA表达量计算更加准确。基于上述分析结果,基因型A蜜环菌可选择Novel-4*, Novel-9作为内参组合,基因型B可选择Novel-9, Novel-16作为内参组合。

3.5.2 NormFinder分析 基于NormFinder的分析结果见表3, PDA上培养的基因型A蜜环菌表达最稳定的miRNA是Novel-3*; 盐胁迫后最稳定的miRNA是Novel-2*, 而Novel-3*的 M 值则从0.038变为0.563; Novel-16, U6在不同条件下都表现出较低稳定性。

基于NormFinder的分析结果见表4, PDA上培养的基因型B蜜环菌最稳定的miRNA是Novel-1*; 盐胁迫后最稳定的miRNA是Novel-16, 而Novel-1*仍然有着较高的稳定性; Novel-9在不同条件下都表现出较好的稳定性, 稳定值从0.149变为0.113; 18S和U6在不同条件下都表现出较低稳定性。

3.5.3 BestKeeper分析 利用BestKeeper软件对比两种基因型蜜环菌各个候选miRNA的 C_t 值标准差

表1 候选miRNAs前体以及相似序列前体的特征分析

Table 1 characterization of candidate miRNAs and similar sequence precursors

成熟miRNA	miRNA前体	LP/nt	(G+C)%	MFEs /kJ·mol ⁻¹
Novel-1*	novel_1	50	50	84.43
Novel-2/Novel-2*	novel_2	50	40	92.34
Novel-3/Novel-3*	novel_3	49	51.02	123.01
Novel-4*	novel_4	50	48	108.37
Novel-9	novel_9	C49	46.94	83.14
Novel-10	novel_10	42	47.62	91.42
Novel-12*	novel_12	42	45.24	128.11
Novel-16	novel_16	290	48.28	317.19
Novel-37	novel_37	99	55.56	215.31
Zma-miR166k	zma-MIR166k	168	55.95	372.59
Mtr-miR166d	mtr-MIR166d	91	47.25	222.13
Sbi-miR5387b	sbi-MIR5387b	109	57.8	263.28
Mtr-miR169g	mtr-MIR169g	211	42.18	345.60
Mtr-miR2675	mtr-MIR2675	173	22.75	226.15
Ghr-miR5139e	ghr-MIR5139e	110	42.73	90.42
Mdm-miR162a	mdm-MIR162a	93	46.24	179.83
Gma-miR5668	gma-MIR5668	113	39.82	104.56
Gba-miR166q	gba-MIR166q	101	44.55	233.51

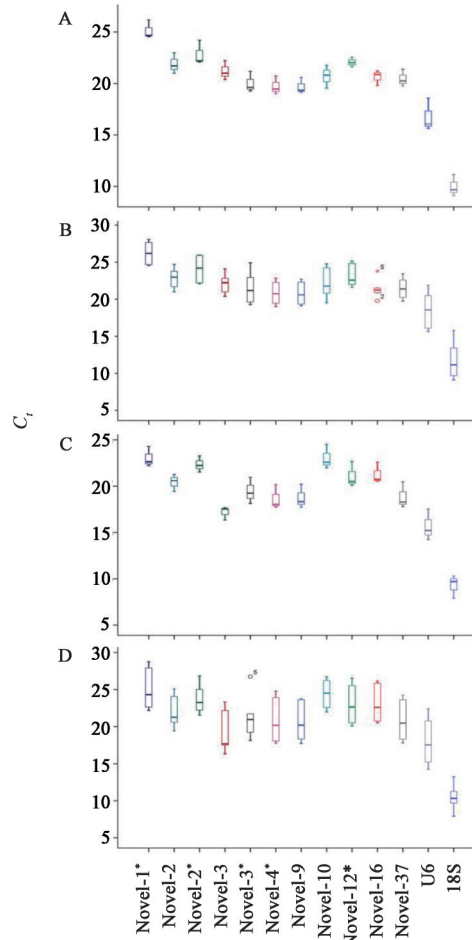
注:LP.前体长度;(G+C)%.前体的G+C碱基含量;MFE.最小折叠自由能;MFEIs.最小折叠自由能指数。

表2 候选miRNA内参基因的引物序列和扩增特性

Table 2 Primer sequences and amplification characteristics of candidate miRNA reference genes

miRNA名称	引物序列(5'-3')	PCR效率	R ²
Novel-1*	ATGGGCTGACCGGTGCTGT	0.98	0.999 3
Novel-2	ATGGCCCTACTACTATGAGT	1.14	0.996 7
Novel-2*	TCATAGGCAGATAGTTCCATC	0.91	0.994 9
Novel-3	TATGGCGCTGGTTAGTTCATC	0.90	0.981 2
Novel-3*	ATGGGCTGACCGGTGCTGTATT	0.86	0.994 9
Novel-4*	GGATGGGCTGACCGATGGC	1.14	0.995 8
Novel-9	GGATGGGCTGGCCGATGG	0.93	0.999 8
Novel-10	ACGGGCTGTACTGTTGTGTGGTTC	0.99	0.999 8
Novel-12*	CGCTATGGTTTTGGCGAGTTCA	0.95	0.995 9
Novel-16	ACGGTGATCTGTATGTCGCTGCT	0.92	0.997 5
Novel-37	AGGATGGGCTGACCGATGG	1.06	0.996 9
U6	CTCGCTTCGGCAGCACACA	1.10	0.983 2
18S rRNA	GACTAGGGATCGGGCAACCT	0.88	0.993 2

注:Novel表示预测到的成熟miRNA。



A. PDA上培养的基因型A蜜环菌; B. 盐胁迫下的基因型A蜜环菌; C. PDA上培养的基因型B蜜环菌; D. 盐胁迫下的基因型B蜜环菌

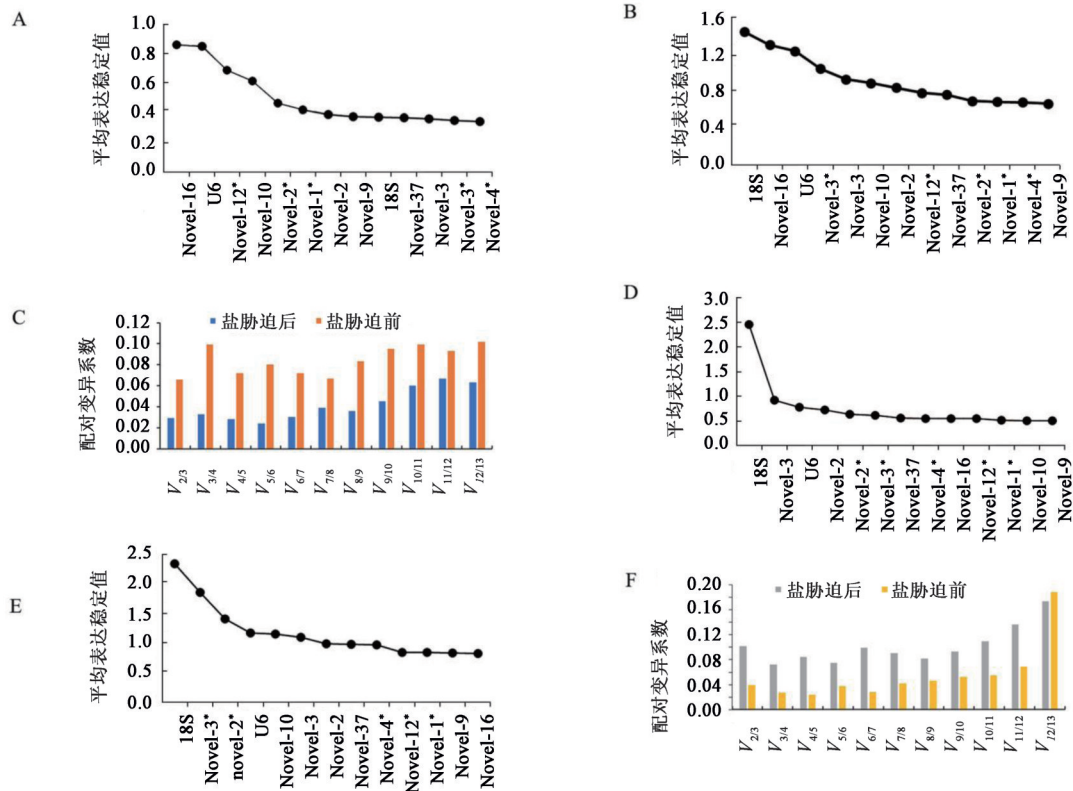
图2 候选miRNA内参基因C_t值分布

Fig. 2 Distribution of C_t value of candidate miRNA reference genes in samples

(SD), 变异系数(CV), 对候选miRNA的稳定性进行综合分析^[20]。结果显示, 在基因型A蜜环菌中表达最稳定的miRNA是Novel-12*, 受盐胁迫后最稳定的miRNA变为Novel-16, Novel-12*的稳定值次之。最不稳定的是18S, U6在盐胁迫前后稳定性均较差, 见表5。在基因型B蜜环菌中最稳定的是Novel-3, 而在受盐胁迫后Novel-3没有表现出很好的稳定性, 18S的稳定性较好, 最不稳定的是U6, 见表6。

4 总结

Real-time PCR因其具有准确、快速、灵敏的特点, 在miRNA表达研究中具有着重要的地位。真核生物对非生物胁迫条件的适应受到多种信号通路的影响, 造成其相关miRNA表达量存在差异。miRNA精确表达归一化, 有助于调整Real-time PCR分析中样本间的变异、RNA完整性的变异,



A. PDA上培养的基因型A蜜环菌; B. 盐胁迫下的基因型A蜜环菌; D. PDA上培养的基因型B蜜环菌; E. 基因型B盐胁迫下的基因型B蜜环菌; C. 基因型A蜜环菌的配对变异分析; F. 基因型B蜜环菌的配对变异分析

图3 基于geNorm的候选miRNA内参的表达稳定性(M)和配对变异分析(V_n/V_{n+1})

Fig. 3 Expression stability (M) and paired variation analysis (V_n/V_{n+1}) of candidate miRNA reference genes based on geNorm analysis

表3 基于NormFinder分析基因型A蜜环菌候选miRNA内参基因的稳定性

Table 3 Stability of candidate miRNA reference genes of genotype A *Armillaria gallica* based on NormFinder analysis

稳定性排序	PDA		盐胁迫	
	基因名称	稳定值	基因名称	稳定值
1	Novel-3*	0.038	Novel-2*	0.071
2	Novel-9	0.043	Novel-1*	0.116
3	Novel-4*	0.052	Novel-9	0.147
4	Novel-1*	0.099	Novel-4*	0.188
5	Novel-37	0.107	Novel-12*	0.278
6	Novel-3	0.127	Novel-37	0.333
7	18S	0.128	Novel-2	0.368
8	Novel-2	0.171	Novel-10	0.385
9	Novel-2*	0.195	Novel-3	0.510
10	Novel-10	0.390	Novel-3*	0.563
11	Novel-12*	0.418	U6	0.734
12	U6	0.548	Novel-16	0.810
13	Novel-16	0.563	18S	0.914

表4 基于NormFinder分析基因型B蜜环菌候选miRNA内参基因的稳定性

Table 4 Stability of candidate miRNA reference genes of genotype B *Armillaria gallica* based on NormFinder analysis

稳定性排序	PDA		盐胁迫	
	基因名称	稳定值	基因名称	稳定值
1	Novel-1*	0.039	Novel-16	0.073
2	Novel-2*	0.083	Novel-9	0.113
3	Novel-16	0.093	Novel-12*	0.161
4	Novel-9	0.149	Novel-1*	0.174
5	Novel-10	0.188	Novel-2	0.249
6	Novel-2	0.232	Novel-37	0.383
7	Novel-4*	0.242	Novel-4*	0.421
8	Novel-12*	0.259	Novel-3	0.465
9	Novel-3*	0.282	Novel-10	0.500
10	Novel-37	0.287	U6	0.644
11	Novel-3	0.430	Novel-2*	0.776
12	U6	0.491	Novel-3*	1.183
13	18S	1.689	18S	1.553

PCR效率的变异以及cDNA装载量的差异,从而提高Real-time PCR实验结果的准确性^[21]。但是越来

越多的实验证明,内参miRNA稳定性在不同的实验条件下会存在一定的差异,如在低温胁迫下PC-3-

表5 基于BestKeeper分析的基因型A蜜环菌miRNA候选内参基因的稳定性

Table 5 Stability of candidate miRNA reference genes of genotype A *Armillaria gallica* based on BestKeeper analysis

候选 miRNA	PDA			盐胁迫		
	SD(C_t)	配对变异系数	排名	SD(C_t)	配对变异系数	排名
Novel-1*	0.70	2.79	7	1.31	5.00	5
Novel-2*	0.92	4.01	12	1.54	6.41	9
Novel-16	0.56	2.71	2	0.97	4.52	1
Novel-9	0.60	3.06	3	1.35	6.48	7
Novel-10	0.78	3.76	10	1.82	8.19	10
Novel-2	0.73	3.31	8	1.18	5.18	3
Novel-4*	0.67	3.38	6	1.35	6.46	6
Novel-12*	0.34	1.52	1	1.39	5.98	8
Novel-3*	0.76	3.82	9	1.87	8.68	11
Novel-37	0.62	3.01	4	1.23	5.72	4
Novel-3	0.68	3.22	5	1.13	5.12	2
U6	1.21	7.20	13	2.14	11.60	12
18S	0.78	7.81	11	2.22	18.70	13

注:配对变异系数用% C_t 计算。

表6 基于BestKeeper分析的基因型B蜜环菌miRNA候选内参基因的稳定性

Table 6 Stability of candidate miRNA reference genes of genotype B *Armillaria gallica* based on BestKeeper analysis

候选 miRNA	PDA			盐胁迫		
	SD(C_t)	配对变异系数	排名	SD(C_t)	配对变异系数	排名
Novel-1*	0.84	3.66	4	2.54	10.1	10
Novel-2*	0.61	2.74	2	1.72	7.25	3
Novel-16	0.87	4.10	5	2.27	9.78	5
Novel-9	0.96	5.14	7	2.37	11.4	8
Novel-10	0.99	4.31	8	1.71	6.99	2
Novel-2	0.66	3.25	3	1.99	9.01	4
Novel-4*	1.02	5.44	10	2.74	13.1	12
Novel-12*	1.05	4.96	11	2.37	10.3	7
Novel-3*	1.01	5.17	9	2.30	10.8	6
Novel-37	1.08	5.70	12	2.44	11.7	9
Novel-3	0.56	3.25	1	2.67	13.8	11
U6	1.25	7.96	13	2.84	15.7	13
18S	0.93	9.99	6	1.40	13.4	1

3p-222的稳定性比18S和U6高^[21];而在葡萄非生物胁迫环境下,U6的稳定性不如miR160e^[6];核桃中miR394a和miR159a的内参组合比5.8S rRNA和U6

稳定^[10];U6在龙眼中的稳定性最差^[22]。

目前对蜜环菌内参miRNA研究较少,常用U6作为内参^[23]。本研究采用Real-time PCR分析了13个特异性较好的候选miRNA,并为了避免不同软件和算法可能导致分析结果存在偏差,利用geNorm, NormFinder和BestKeeper软件分别对其稳定性进行了评价。结果表明,U6和18S稳定性较差,不适用于作为蜜环菌内参miRNA。综合3个软件的分析结果,发现稳定性最优的内参miRNA为Novel-9。尽管geNorm, NormFinder, BestKeeper分析结果略有不同,但是Novel-9都具有较好的稳定性。本研究为进一步开展蜜环菌miRNA调控机制研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] CHEN L, REN Y, ZHANG Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in *Populus tomentosa* [J]. *Gene*, 2012, 504(2):160-165.
- [2] RUI L, BIAO L, BING H, et al. Identification of microRNAs and their target genes related to the accumulation of anthocyanins in *Litchi chinensis* by high-throughput sequencing and degradome analysis [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7:2059.
- [3] NAING A H, LEE J H, PARK K I, et al. Transcriptional control of anthocyanin biosynthesis genes and transcription factors associated with flower coloration patterns in *Gerbera hybrida* [J]. *3 Biotech*, 2018, 8(1):65-75.
- [4] 赵香娜,胡亚平,张鹏,等. 蜜环菌的特性及其对天麻生长的影响[J]. *中国果菜*, 2016, 36(6):57-59.
- [5] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments [J]. *Clinical Chem*, 2009, 55(4):611-622.
- [6] 陈旭,史菊,蒋敏,等. miRNA定量检测中内参基因的选择[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(11):1338-1340.
- [7] SONG H, ZHANGX, SHI C, et al. Selection and verification of candidate reference genes for mature MicroRNA expression by quantitative RT-PCR in the tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Genes*, 2016, 7(6):25.
- [8] JAIN M, NIJHAWAN A, UYAGI A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR

- [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(2): 646-651.
- [9] MAROUFI A, BOCKSTAELE E V, LOOSE M D. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2010, 11(15):1-12.
- [10] 周丽, 全绍文, 马丽, 等. 核桃(*Juglans regia* L.) MicroRNA 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的筛选[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(7):2070-2278.
- [11] 王尧龙. 金银花产地鉴定 miRNA 及 SNP 标记的筛选[D]. 昆明:昆明理工大学, 2016.
- [12] LUO M, GAO Z, LI H, et al. Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4444.
- [13] 王锐, 张诗悦, 穆青. 蜜环菌的化学成分及生物活性研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(11):1992-1999.
- [14] 徐锦堂. 中国天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学和协和医科大学联合出版社, 1993:54-1006.
- [15] 梁宇庭, 蒋超, 周骏辉, 等. 高卢蜜环菌 PCR-RFLP 快速鉴别方法研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(17): 3622-3626.
- [16] 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):0034. 1.
- [17] TONG Z, GAO Z, WANG F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10:71.
- [18] TAKLE G W, TOTH I K, BRURBERG M B. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7(1):50-60.
- [19] 马鑫瑞, 李亮, 杨梦洁, 等. 梨花芽休眠进程中 microRNA 实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(14):4696-4704.
- [20] ZHANG Y, CHEN Y T, CHEN R H, et al. Selection of reference genes in quantitative real-time PCR analysis of Chinese fir[J]. *J Forestry Sci*, 2019, 32(2):65-72.
- [21] 谢小芳, 添先凤, 江昌俊, 等. 茶树低温胁迫下 microRNA 实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *茶叶科学*, 2015, 35(6):596-604.
- [22] LIN Y L, LAI Z X. Evaluation of suitable reference genes for normalization of microRNA expression by real-time reverse transcription PCR analysis during longan somatic embryogenesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 66:20-25.
- [23] 谭或文, 包焱, 操璟璟, 等. 蜜环菌与天麻共生分子机制的转录组分析[J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4125-4130.

[责任编辑 顾雪竹]