

## 肉桂和大叶清化桂内参基因的筛选和验证

许丹芸, 张辉菊, 刘基柱, 高弘扬\*, 杨全\*  
(广东药科大学, 广州 510000)

**[摘要]** 目的:筛选适用于肉桂和大叶清化桂不同部位进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分析的稳定内参基因,为肉桂和大叶清化桂皮枝叶3个不同部位的基因表达分析提供稳定的内参基因。方法:以肉桂和大叶清化桂两种植物的皮、枝、叶等6个不同组织器官为实验材料,使用Real-time PCR技术对甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),肌动蛋白(actin),泛素结合酶(UBE),组蛋白(histone)和微管蛋白(TUB)共5个内参基因的表达情况进行分析,进而使用3个常用的内参基因分析软件geNorm, NormFinder, BestKeeper,对候选内参基因的稳定性进行分析评价。结果:5个内参基因在2种植物的皮、枝、叶中均有表达,但稳定性存在差异,综合分析得出候选内参基因表达稳定性顺序依次为GAPDH>actin>UBE>histone>TUB。对2种植物的内参基因分别进行分析,最优内参基因依然是GAPDH,表明GAPDH是最合适的内参基因。TUB和histone在3个软件中的排名均靠后,在内参基因的筛选中应被剔除,不适合在肉桂和大叶清化桂基因表达分析中使用。结论:肉桂和大叶清化桂皮、枝、叶不同部位最适的内参基因为GAPDH,为后期开展这两种植物不同部位有效成分积累过程中基因的功能调控和表达研究提供了理论依据。

**[关键词]** 实时荧光定量聚合酶链式反应; 肉桂; 大叶清化桂; 内参基因

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0137-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210219

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201215.0854.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-12-15 9:44

### Selection and Validation of Appropriate Reference Genes of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum cassia* var. *macrophyllum*

XU Dan-yun, ZHANG Hui-ju, LIU Ji-zu, GAO Hong-yang\*, YANG Quan\*  
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen out stable internal reference genes suitable for real-time quantitative polymerase chain reaction(Real-time PCR) analysis of different parts of *Cinnamomum cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum*, in order to provide stable internal reference genes for gene expression analysis of three different parts of and *C. cassia* var. *macrophyllum* branches and leaves. **Method:** With 6 different tissues and organs, such as bark, branches and leaves of two plants of *C. cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum* as experimental materials, Real-time PCR technology was used to detect the five internal reference genes, namely glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), actin, ubiquitin-ligase enzymes(UBE), histone and tubin(TUB). The analysis of the expression of the data. Furthermore, three commonly used internal reference gene analysis software, namely geNorm, NormFinder and BestKeeper, was used to analyze and evaluate the stability of the candidate internal reference gene. **Result:** The internal five reference genes were expressed in the bark,

**[收稿日期]** 20200605(024)

**[基金项目]** 罗定肉桂产业发展基础研究项目(2018-082);广东省普通高校青年创新人才类项目(2019KQNCX057);广东省基础和应用基础研究基金联合基金项目(2019A1515111043)

**[第一作者]** 许丹芸,在读硕士,从事中药资源和分子生物学研究工作, Tel:020-39252353, E-mail: xudanyun01@qq.com

**[通信作者]** \*高弘扬,博士,讲师,从事植物逆境生理与分子生物学研究, Tel:020-39252353, E-mail: 240521141@qq.com;

\*杨全,博士,教授,从事中药资源开发与品质评价研究, Tel:020-39252353, E-mail: yangquan7208@vip.163.com

branches and leaves of the two plants, but with differences in stability. Comprehensive analysis showed that the expression stability of candidate internal reference genes was in the order of GAPDH>actin>UBE>histone>TUB. The internal reference genes of the two plants were analyzed separately, and the optimal internal reference gene was still GAPDH, indicating that GAPDH was the most suitable internal reference gene. TUB and histone ranked low in the three software, and should be eliminated in the screening of reference genes. They were not suitable for gene expression analysis of *C. cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum*. **Conclusion:** The most suitable internal reference gene for different parts of cinnamon, branches, and leaves of *C. cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum* was GAPDH. In this study, a screening system for internal reference genes of Real-time PCR of *C. cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum* was established to provide theoretical basis for studying functional regulation and expression of genes during the accumulation of effective components in different parts.

**[Key words]** quantitative real-time polymerase chain reaction; *Cinnamomum cassia*; *C. cassia* var. *macrophyllum*; reference gene

肉桂收载于2020年版《中华人民共和国药典》,收录有桂皮、桂枝、桂油,其中最常用的药用部位是桂皮。肉桂中主要含有挥发油、多糖类、多酚类、香豆素以及无机元素等化学成分,具有抗胃溃疡、抗炎、抗菌、抗肿瘤、预防糖尿病以及镇静、解痉、解热等药理作用<sup>[1-4]</sup>。大叶清化桂原产越南,是肉桂的唯一变种。大叶清化桂与肉桂外观相近,功效认为与肉桂相同,常作为肉桂使用。达到采收要求的大叶清化桂与同年的肉桂相比,精油含量和树皮厚度都高于肉桂。肉桂和大叶清化桂均具有重要的经济、社会价值。近年来,关于这两种植物在化学成分、药理活性、栽培技术研究比较多,而这两者的分子机制研究甚少,尤其缺少内参基因筛选相关研究。

实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)是研究基因表达的常规技术,具有高灵敏度、重复性高和适合批量检测样品等技术优点<sup>[5-7]</sup>。Real-time PCR技术分为相对定量与绝对定量,两种定量方式中相对定量更普遍使用。相对定量分为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法和相对标准曲线法。本实验采用的是 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,检测目的基因和内参基因的表达量,对目的基因的表达量进行相对定量。目的基因表达分析结果的准确性受提取的RNA质量、反转录的效率以及其它阻碍因素影响,因此选择合适的内参基因对实验结果进行校正和标准化是必要的。

在现代研究中,已经有很多中药筛选出了其合适的内参基因作为后续Real-time PCR实验的研究依据。内参基因的研究作为中药研究的另一种途径,从分子的角度出发,可以更好地为后续中药的生长、发育以及药效成分的培优做出贡献。植物中常用的内参基因有甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),肌动蛋白(actin),微管蛋白(TUB),延伸

因子-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )和多聚泛素酶(UBQ)等<sup>[5-6]</sup>。近年来对不同物种不同部位的内参基因筛选很多,蒲小秋等<sup>[8]</sup>对3个品种梨的花露红期、盛花期的花托和授粉后的梨果肉进行内参基因筛选,发现使用TUB1和TUB2在不同品种中作为内参基因,目标基因的表达模式完全不一致;陈国松等<sup>[9]</sup>对板栗不同组织器官进行内参筛选,发现actin作为内参基因在不同组织中的表达最为稳定;陈莹等<sup>[10]</sup>对金线兰根茎叶的不同发育时期进行内参基因筛选,发现EF-1 $\alpha$ 在不同的组织器官中表达最稳定;张佳佳等<sup>[11]</sup>对经过非生物胁迫处理的香樟进行内参筛选,发现EF1 $\alpha$ 表达最为稳定。内参基因在不同植物、不同部位、不同处理<sup>[12-15]</sup>的表达都不一样,内参基因的选择不存在通用性。因此本研究需要筛选稳定的内参基因用于比较不同组织部位中基因的表达差异,为进一步挖掘肉桂和大叶清化桂的化学差异分子机制奠定研究基础。

## 1 材料

样品采集于广东省茂名市(北纬22°27'44",东经111°08'17"),选取树龄7年,树体健康、生长条件一致的樟科乔木肉桂(*Cinnamomum cassia*),及其变种大叶清化桂(*C. cassia* var. *macrophyllum*),由广东药科大学刘基柱副教授鉴定。肉桂和大叶清化桂各取3株,采集其新鲜的皮、枝和叶,每3株混合取样,每个样品3个生物学重复。迅速用液氮快速降温冷冻后,-80℃超低温冰箱保存备用。

MiniBEST Plant RNA Extraction Kit(批号AK1701)植物RNA提取试剂盒;PCR试剂Premix Taq™(Ex Taq™ Version 2.0 plus dye,批号AIF2269A);SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus,批号AJ12454A),DL2000 DNA Marker(批号

AJ91887A),以上试剂均购自宝日生物技术(北京)有限公司。

## 2 方法

**2.1 总RNA提取及cDNA合成** 使用MiniBEST Plant RNA Extraction Kit植物总RNA提取试剂盒提取样品总RNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳,核酸分析仪检测RNA的浓度和纯度。选取 $A_{260/280}$ 在1.8~2.0的RNA为模板,使用PrimeScript™ RT reagent Kit with

gDNA Eraser将总RNA转录为cDNA,-20℃保存备用。

**2.2 候选内参基因选择与引物设计** 根据本课题组对肉桂和大叶清化桂的转录组测序结果,候选内参基因选用了5个表达量较为稳定的基因actin,TUB,泛素结合酶(UBE),histone,GAPDH,使用Integrated DNA technologies在线软件设计引物,各引物序列见表1。引物由擎科生物科技有限公司合成。

表1 内参基因的引物的序列

Table 1 Primer pairs of candidate reference genes

基因名称	上游(5'-3')	长度/bp	下游(5'-3')	长度/bp
actin	GTGATCTGACTGATGCCCTTAT	22	GAGCTTCTCCTTCATGTCTCTC	22
TUB	CTCAGTTGACTATGGCAAGAA	21	GGAGAGAACGCTGTTGTAAG	20
UBE	TCTTGGGTTGGGAACATAAC	20	CCCGACCAACCACATAAAT	19
histone	TATCTTGCCGCTGTTCTTG	19	CCTCACTGCGAGTTGTATATG	21
GAPDH	GTTGCTGTCTTTGGTCTCA	19	CAGCAGCCTTGTCTTATC	19

**2.3 Real-time PCR扩增** 以反转录合成的cDNA为模板,使用荧光定量试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™ II在CFX96 Touch(美国Bio-Rad)仪上进行片段扩增。该反应需先制作反应液,在冰上展开实验。在CFX96 Touch仪器上进行操作,根据TaKaRa试剂盒说明书,总体积25μL,SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (2×) 12.5 μL, PCR Forward Primer (10 mol·L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, PCR Reverse Primer (10 mol·L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, RT反应液(cDNA溶液) 2 μL,灭菌水8.5 μL。

反应方法:进行Real-time PCR反应,在定量分析仪中反应,按照两步法PCR扩增技术标准管理程序进行,预变性,95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃,30~60 s,重复40次;分裂。之后根据生成的溶解曲线判断内参基因的扩增特异性,并得到各个候选基因的循环阈值( $C_t$ )值。

**2.4 数据分析** 统计实时荧光定量检测得到的 $C_t$ 值,利用geNorm, NormFinder和BestKeeper对5个候选内参稳定性进行分析,筛选出本次实验合适的内参基因。geNorm是用的较多的Real-time PCR分析内参基因的软件,选出2个或以上的内参基因用于定量分析,计算出候选基因稳定性( $M$ ), $M$ 越小,则获得的内参基因更稳定;NormFinder测定原理类似geNorm,计算出每个候选基因的表达稳定值,稳定值越小则越稳定,能筛选出适合实验要求的最佳内参基因。前两个软件的数据处理相似,通常都要对Real-time PCR得到的数据转换成相对表达量,但

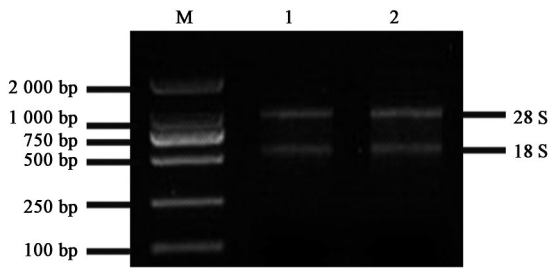
BestKeeper不需要进行转换,可直接采用 $C_t$ 值;BestKeeper软件技术则是可以依据各组样品的候选内参基因的 $C_t$ 值,得到标准偏差( $SD$ ),变异系数( $CV$ )和相关系数( $r$ )。 $SD$ 和 $CV$ 越小, $r$ 越大,则基因表达越稳定。根据各软件得出的稳定性排名,利用Microsoft Excel 2016计算5个候选内参基因排名的几何平均数,筛选出综合排名最稳定的候选内参基因。在转录组数据中随机挑选8个基因,对筛选出的最稳定内参基因进行稳定性验证,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量。

## 3 结果分析

**3.1 RNA提取质量检测** 提取总RNA进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,28S和18S条带清晰完整,表明总RNA无降解或降解较少,完整性良好。超微量紫外分光光度计测定所有待测样品RNA浓度满足实验要求,18S和28S条带清晰明亮, $A_{260}/A_{280}$ 均在1.8~2.1, $A_{260}/A_{280}$ 表明提取RNA纯度较高,无蛋白质污染,可以满足后续试验要求。见图1。

**3.2 内参基因特异性溶解曲线分析** 样品cDNA稀释倍为模板,分别用5个内参引物进行Real-time PCR扩增,获得各基因在不同部位的溶解曲线。结果表明,5个候选内参溶解曲线均为明显的单一峰,无明显杂峰,认为引物特异性较好,未产生引物二聚体或非特异扩增,可用于后续的Real-time PCR试验。

**3.3 备选内参基因的表达谱** 为分析5个备选内参基因在不同组织中的表达情况,对6个样品进行



M. DL 2 000 DNA marker; 1. 肉桂; 2. 大叶清化桂

图1 肉桂和大叶清化桂总RNA的电泳检测

Fig. 1 Test result of genomic DNA of *Cinnamomum cassia* and *C. cassia* var. *macrophyllum*

检测,每个样品3个生物学重复。 $C_t$ 值越小说明表达量越大,这5个备选内参基因的 $C_t$ 值在19.99~28.53,见图2。其中GAPDH的表达丰度最高,UBE表达丰度最低。actin变异性最小,其次是GAPDH。综合来说,GAPDH的表达丰度高,且变异性较小。为了进一步评估所选择的5个备选内参基因,对其在实验样品中的稳定性进行一个稳定性的分析,需将 $C_t$ 值转化为相应的数据输入3个内参分析软件进行分析。

### 3.4 内参基因稳定性分析

**3.4.1 geNorm分析** geNorm软件通过每个候选内参基因表达稳定性的 $M$ 值评价基因稳定性, $M$ 值越小表达稳定性越好。利用geNorm软件分析本研究5个内参基因在两种植物的皮枝叶的Real-time PCR数据,获得5个内参数据的平均 $M$ 。结果表明

表2 候选内参基因稳定性分析

Table 2 Comprehensive ranking of 5 reference genes

排序	geNorm		NormFinder		BestKeeper				Excel			
	内参基因	$M$	内参基因	$SV$	内参基因	$SD$	内参基因	$CV$	内参基因	$r$	内参基因	平均值
1	actin	1.028	GAPDH	0.024	GAPDH	0.57	UBE	2.62	TUB	0.932	GAPDH	2.08
2	GAPDH	1.041	actin	0.115	actin	0.70	GAPDH	2.70	actin	0.928	actin	2.15
3	UBE	1.352	UBE	0.725	UBE	0.70	actin	2.93	GAPDH	0.902	UBE	2.47
4	histone	1.620	histone	0.910	histone	1.26	histone	4.97	histone	0.671	histone	2.71
5	TUB	1.913	TUB	1.205	TUB	1.64	TUB	7.17	UBE	0.473	TUB	2.76

**3.4.3 BestKeeper程序分析** 对Real-time PCR反应后的 $C_t$ 值处理,计算出各候选内参基因的 $CV$ 和 $SD$ ,对 $CV$ 和 $SD$ 进行加减计算,因为值越小,则表明该基因在肉桂细胞中表达就越平稳。当内参基因 $SD$ 超过1,则该基因的表达不平稳。TUB和histone的 $SD$ 值都>1,说明TUB和histone在肉桂中表达不稳定,而GAPDH的稳定值最好, $SD$ 也是最小的。

BestKeeper软件对这5个内参基因稳定性进行

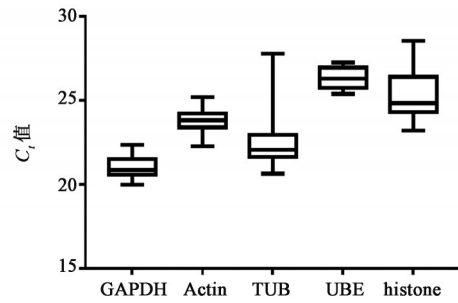


图2 内参基因原始 $C_t$ 值数据

Fig. 2  $C_t$  value distribution of five candidate internal reference genes

GAPDH( $M=1.041$ )和actin( $M=1.028$ )两个基因 $M$ 最小,其次为UBE( $M=1.352$ ),histone和TUB的 $M$ 最大,稳定性最差。将5个内参基因由稳定到不稳定排序为GAPDH/actin>UBE>histone>TUB。GAPDH和actin的表达更稳定,是优选的稳定的内参基因。

**3.4.2 NormFinder程序分析** 根据NormFinder内参基因软件得出的结果表明,5个候选内参基因的表达水平均不相同,见表2。肉桂和大叶清化桂中候选基因的稳定性大小排序为GAPDH>actin>UBE>histone>TUB,这说明肉桂中内参基因UBE的表达最稳定,histone则表达最差。NormFinder软件通过计算各个内参基因的表达稳定值来评价其稳定性,并筛选出稳定性最好的一个内参基因。5个内参基因表达稳定值不同,最稳定的前3个内参基因依次为GAPDH,actin和UBE,稳定值分别为0.024,0.115,0.725。

分析,计算各内参基因 $SD$ , $CV$ 和 $r$ 。 $SD$ 和 $CV$ 越小则内参基因稳定性越好。而 $SD>1$ 时则基因稳定性较差。GAPDH,actin和UBE3个内参基因均<1,其中 $SD$ 和 $CV$ 由小到大前三名都是UBE,actin和GAPDH。相关性分析表明,TUB>actin>GAPDH>histone>UBE,其中TUB,actin和GAPDH3个基因相关性强,histone和UBE相关性差。因此综合BestKeeper软件的 $SD$ 和 $CV$ ,稳定性最好且相关性

强的前3个内参基因为UBE, actin和GAPDH。

综合3个软件的分析结果, 3个软件分析获得的最稳定的内参基因虽然排名略有差异。对3个软件得出的排名进行几何平均数计算, 得出综合排名为GAPDH>actin>UBE>histone>TUB, 见表2, 最稳定的内参基因为GAPDH。

**3.4.4 两种植物各自的最优内参基因** 同时对肉桂和大叶清化桂的内参基因分别进行分析, 两种植

物的最优内参基因一致, 均为GAPDH, 其他内参基因的排名略有不同。肉桂的内参基因综合排名为GAPDH>actin>UBE>histone>TUB, 见表3。大叶清化桂的内参基因综合排名为GAPDH>TUB>actin>UBE>histone, 见表4。可以看出GAPDH和actin在两种植物中都比较稳定, TUB在大叶清化桂中比较稳定, 但在肉桂中表现不佳; UBE和histone作为内参基因在两种植物中表达均不稳定。

表3 肉桂候选内参基因稳定性分析

Table 3 Comprehensive ranking of 5 reference genes in *Cinnamomum cassia*

排序	geNorm		NormFinder		BestKeeper					Excel		
	内参基因	M	内参基因	SV	内参基因	SD	内参基因	CV	内参基因	r	内参基因	平均值
1	actin	0.930	GAPDH	0.002	GAPDH	0.53	UBE	2.14	GAPDH	0.98	GAPDH	1.912
2	GAPDH	0.940	actin	0.002	UBE	0.57	GAPDH	2.46	actin	0.98	actin	2.154
3	histone	1.150	histone	0.015	actin	0.61	actin	2.53	TUB	0.98	UBE	2.519
4	UBE	1.197	UBE	0.036	TUB	0.79	histone	3.09	histone	0.85	histone	2.668
5	TUB	2.536	TUB	0.103	histone	1.26	TUB	11.61	UBE	0.68	TUB	2.714

表4 大叶清化桂候选内参基因稳定性分析

Table 4 Comprehensive ranking of 5 reference genes in *Cinnamomum cassia* var. *macrophyllum*

排序	geNorm		NormFinder		BestKeeper					Excel		
	内参基因	M	内参基因	SV	内参基因	SD	内参基因	CV	内参基因	r	内参基因	平均值
1	GAPDH	0.903	actin	0.009	GAPDH	0.36	GAPDH	0.77	actin	0.93	GAPDH	2.08
2	TUB	0.930	GAPDH	0.01	TUB	0.54	TUB	2.46	TUB	0.89	TUB	2.224
3	actin	0.983	TUB	0.011	actin	0.66	UBE	2.62	histone	0.83	actin	2.289
4	UBE	1.310	UBE	0.046	UBE	0.69	actin	2.85	GAPDH	0.74	UBE	2.714
5	histone	1.879	histone	0.07	histone	1.65	histone	4.97	UBE	0.09	histone	2.844

**3.5 内参基因稳定性的验证** 为了进一步验证筛选得到的内参基因的稳定性, 在转录组中随机选取8个基因作为目的基因进行验证。将肉桂作为处理组, 大叶清化桂作为未处理组, 根据5个备选内参基因的表达量, 对3个不同组织的8个目的基因进行相对表达量计算。分析5个备选内参基因在皮枝叶3个不同组织的表达模式。

GAPDH, actin, UBE的表达模式相近, 而histone, TUB的相对表达量与前三者大相径庭。证明筛选出来的内参基因可靠, 得出的数据趋势稳定。见表5。

**3.6 目标基因的Real-time PCR分析** 稳定性综合评价得到GAPDH作为内参基因, 在肉桂和大叶清化桂的转录组随机挑选15个差异基因, 在两种植物的不同部位进行验证, 见表6。结果表明Real-time PCR分析结果与转录组测序分析结果存在高度相

关性, 也证明了转录组数据的可靠性。

#### 4 结论与讨论

研究表明, 内参基因并不具有通用性, 因此选择合适的内参基因是实验得出稳定、准确结论的重要前提。在对目的基因进行表达情况分析前, 需对内参基因进行稳定性评价。在转录组数据中寻找可靠的内参基因, 是有效的方法。GAPDH编码糖酵解和糖异生途径的关键酶, 在植物细胞中高水平表达<sup>[16]</sup>, 在三叶青<sup>[17-18]</sup>、翼手草<sup>[19]</sup>、黄山栌树<sup>[20]</sup>等均能稳定表达。actin编码肌动蛋白, 在动植物中细胞中维持着基本的生理活动, 因此常作为内参基因使用。在板栗<sup>[9]</sup>、杉木<sup>[15]</sup>中进行稳定性评价时, 发现actin基因在组织中的表达较为稳定。本实验选取的5个内参基因均参与植物的基本生理生化活动, 在细胞中均能较稳定地表达。

本实验通过肉桂和大叶清化桂转录组数据, 筛

表5 5个候选内参基因标定下不同组织8个目的基因的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Relative expression levels of eight target gene normalizing with different reference gene ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

目的基因	实验部位	GAPDH	actin	UBE	histone	TUB
CL9519	皮	1.46±0.93	1.21±0.84	0.80±0.54	0.25±0.19	13.65±8.79
CL956		0.92±0.13	0.71±0.19	0.48±0.05	0.20±0.14	8.42±1.38
Unigene30678		7.35±3.13	5.30±1.44	3.79±1.42	1.81±1.57	65.48±23.29
CL7125		2.89±0.86	2.12±0.08	1.49±0.30	0.68±0.59	25.94±5.46
CL15836		1.49±0.37	1.11±0.09	0.77±0.10	0.34±0.29	13.49±2.33
CL14924	枝	1.59±0.60	1.20±0.45	0.82±0.26	0.36±0.33	14.51±5.31
CL2397		1.61±0.58	1.17±0.23	0.83±0.25	0.39±0.32	14.36±4.06
CL21684		0.95±0.30	0.70±0.06	0.49±0.10	0.23±0.20	8.59±2.03
CL9519		0.83±0.61	1.12±0.86	0.42±0.32	0.82±0.61	0.28±0.22
CL956		12.42±0.76	16.73±0.78	6.66±1.74	15.36±9.96	3.98±0.10
Unigene30678		2.36±0.65	3.17±0.81	1.21±0.18	2.58±0.88	0.77±0.24
CL7125		6.29±0.59	8.46±0.15	3.34±0.65	7.57±4.45	2.02±0.16
CL15836		1.36±0.17	1.82±0.15	0.71±0.10	1.59±0.82	0.44±0.06
CL14924		1.99±1.25	2.70±1.75	1.16±0.99	3.05±3.52	0.63±0.36
CL2397		1.23±0.37	1.66±0.56	0.65±0.23	1.45±0.74	0.40±0.16
CL21684	叶	0.47±0.09	0.62±0.08	0.24±0.02	0.53±0.26	0.15±0.03
CL9519		0.18±0.05	0.57±0.05	0.15±0.05	0.31±0.10	0.17±0.18
CL956		1.41±0.15	4.60±0.27	1.15±0.11	2.45±0.14	1.32±1.39
Unigene30678		5.15±0.79	16.76±1.12	4.22±0.57	9.01±1.54	4.87±3.92
CL7125		0.49±0.12	1.59±0.12	0.41±0.11	0.87±0.26	0.47±0.31
CL15836		0.88±0.17	2.90±0.26	0.72±0.09	1.53±0.24	0.83±0.81
CL14924		0.83±0.16	2.66±0.08	0.69±0.18	1.46±0.38	0.78±0.65
CL2397		0.94±0.48	3.11±0.58	0.76±0.35	1.64±0.82	0.90±0.58
CL21684		0.77±0.04	2.50±0.12	0.63±0.02	1.34±0.08	0.72±0.67

选出5个备选内参基因 GAPDH, actin, UBE, histone 和 TUB。分析其在肉桂和大叶清化桂的皮枝叶的表达水平变化和表达稳定性。结果表明这5个候选内参基因的 C<sub>t</sub>值并不相同,可能与内参基因在不同组织的参与的代谢途径不同有关。

通过3个内参分析软件进行进一步分析,3款软件对内参基因的稳定性排名有所差别,这可能与所用的统计学方法不同有关,这种情况在桂花<sup>[21]</sup>中也有出现。因此在筛选稳定性更好的内参基因的时候,通过几何平均数对3个软件的排名进行整合后排名,该排名可以在一定程度上反应内参基因的稳定性趋势。综合3个软件和几何平均数的数据,排名前三的是 GAPDH, actin, UBE,最佳内参基因都指向了 GAPDH,这也说明了 GAPDH 在肉桂和大

叶清化桂不同组织器官水平表达的稳定性。histone 和 TUB 在各项排名中都靠后,且在内参基因验证中发现 GAPDH, actin, UBE 的表达模式相近,而 histone, TUB 的表达模式与前三者差距很远,说明这两个候选内参基因稳定性较差,不适合作为肉桂的内参基因。5种内参基因在8个随机选取的目的基因作为参照,发现 GAPDH, actin, UBE 参照下8个目的基因的表达模式相近,与软件分析结果一致,这进一步验证了筛选出来的内参基因可靠性。

本研究根据肉桂和大叶清化桂的转录组测序结果,筛选了5个备选内参基因,并利用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 分析了候选内参基因在肉桂和大叶清化桂的皮枝叶中的稳定性,得到最稳定的内参 GAPDH。在转录组中随机筛选出15个差

表6 目标基因的Real-time PCR分析

Table 6 Real-time quantitative PCR analysis results of target genes

目的基因	大叶清化桂皮/肉桂皮		大叶清化桂枝/肉桂枝		大叶清化桂叶/肉桂叶	
	RNA-seq	Real-time PCR( $\bar{x}\pm s$ )	RNA-seq	Real-time PCR( $\bar{x}\pm s$ )	RNA-seq	Real-time PCR( $\bar{x}\pm s$ )
CL9519	1.38	1.46±0.93	1.311	0.83±0.61	1.866	0.18±0.05
Unigene7165	1.755	3.10±2.36	0.41	1.56±0.15	-1.43	-1.64±0.17
CL956	1.53	0.91±0.13	1.68	12.42±0.76	0.04	1.41±0.15
Unigene30678	2.399	7.35±3.13	0.76	2.36±0.65	2.87	5.15±0.79
CL7125	1.30	2.89±0.86	1.36	6.29±0.59	1.66	0.49±0.12
CL1269	-1.42	0.61±0.46	-1.13	-2.92±0.36	-1.33	-2.69±0.43
CL1120	1.30	0.23±1.36	2.15	2.34±0.23	2.42	2.89±0.17
CL1154	-1.65	-1.29±0.22	-0.52	-0.42±0.17	-6.83	-2.46±1.33
CL1338	-1.64	-2.28±1.88	-2.12	-1.32±0.16	-1.06	-1.77±0.32
CL15836	1.37	1.49±0.37	1.21	1.36±0.17	0.97	0.88±0.17
CL14924	1.15	1.59±0.60	1.54	1.99±1.25	2.52	0.83±0.16
CL2397	3.03	1.61±0.58	1.55	1.23±0.37	3.36	0.94±0.48
CL21684	4.51	0.95±0.30	1.54	0.47±0.09	2.48	0.77±0.04
CL11293	1.87	0.52±0.30	0.73	-1.70±0.09	2.17	0.89±0.88
CL14645	1.02	1.44±0.83	1.27	-0.24±0.48	2.64	-1.44±0.50

异基因进行验证,以肉桂作为对照,Real-time PCR验证结果与转录组测序数据基本一致。后续将对肉桂和大叶清化桂的转录组数据进行挖掘,以期找出肉桂和大叶清化桂化学差异的分子机制。

[参考文献]

[1] KOPPIKAR S J, SNEHALA S, S A, et al. Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential [J]. BMC Cancer, 2010, 10(1):210.

[2] PRASAD N K, BAO Y, DONG X H, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species [J]. Innov Food Sci Emerg, 2009, 10(4): 627-632.

[3] CHANG W L, CHENG F C, WANG S P, et al. *Cinnamomum cassia* essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC - 3 cells [J]. Environ Toxicol, 2017, 32(2): 456-468.

[4] YUN J W, YOU J R, KIM Y S, et al. *In vitro* and *in vivo* safety studies of cinnamon extract (*Cinnamomum cassia*) on general and genetic toxicology [J]. Regul Toxicol Pharm, 2018, 95:115-123.

[5] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. Genes Immun, 2005, 6(4):279-284.

[6] KOU X K, ZHANG L, YANG S Z, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in peach fruit under different experimental conditions [J]. Sci Hortic-Amsterdam, 2017, 225: 195-203.

[7] HUANG L, YAN H, JIANG X, et al. Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in orchardgrass subjected to various abiotic stresses [J]. Gene, 2014, 553(2):158-165.

[8] 蒲小秋,田嘉,李疆,等. 梨果实细胞分裂期内参基因表达稳定性分析 [J]. 经济林研究, 2020, 38(1): 66-74.

[9] 陈国松,李靖同,刘阳,等. 板栗实时定量PCR内参基因的筛选与验证 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(3): 378-386.

[10] 陈莹,余佳瑶,潘王韵,等. 金线兰根茎叶内参基因的筛选 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(18):5930-5938.

[11] 张佳佳,张力维,李勇鹏,等. 不同非生物胁迫下香樟实时定量PCR内参基因的选择 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(10):205-211.

[12] 刘雅琳,朱昀昊,盛芷薇,等. 垂序商陆 PaAACT 基因克隆和表达分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21):124-131.

[13] 陈凌艳,谢德金,荣俊冬,等. 花叶唐竹4种叶色表型

- qRT-PCR内参基因筛选[J]. 分子植物育种, 2019, 17(14):4592-4599.
- [14] 郭军, 张慧, 郭巧生, 等. 沙氏鹿茸草实时荧光定量PCR内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1887-1892.
- [15] 张颖, 陈婉婷, 陈冉红, 等. 杉木实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2):65-72.
- [16] DANSHINA P V, SCHMALHAUSEN E V, AVETISYAN A V, et al. Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis [J]. IUBMB Life, 2001, 51(5):309-314.
- [17] 袁莉霞, 吴浩, 彭昕, 等. 三叶青块根发育时期 RT-qPCR内参基因的筛选与体系建立[J]. 分子植物育种, 2020, 20:6785-6792.
- [18] 李士敏, 孙崇鲁, 张煜炯, 等. 不同月份三叶青中8种有效成分含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19):117-123.
- [19] 何焱, 李忠玥, 刘江, 等. 翼首草实时荧光定量PCR内参基因筛选[J]. 分子植物育种, 2020, 18(9):2987-2993.
- [20] 吕运舟, 董筱昀, 黄利斌, 等. 黄山栎树实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. 分子植物育种, 2019, 17(2):553-560.
- [21] 王千千, 蒋琦妮, 付建新, 等. 不同光周期和温度处理下桂花内参基因的筛选[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(5):928-934.
- [责任编辑 顾雪竹]

· 书讯 ·

## 重症医学的镇静评估检测及护士护理规范化操作 ——评《医学检验项目选择与临床应用》

与其他类型的患者不同,重症患者的病情有急性发作以及病情较为严重的特征,这些疾病一般会对患者造成极大的痛苦以及困扰,导致患者出现焦虑以及其他类型的情绪。此外,诸如机械通气以及气管插管之类的外部侵入性的手术也会使患者极度地痛苦,增加他们对疾病的恐惧,降低对治疗的信心,对医务人员的信心以及依从性也会降低。基于这种情况,可以寻找合适的对重症患者镇静方法。但是,当前治疗中经常出现滥用镇静剂的情形,导致疾病将被误判,患者将很大程度上依赖镇静药物。因此,进行规范化的护理工作对于评估重症监护医学中的疼痛缓解以及镇静治疗至关重要。《医学检验项目选择与临床应用》一书,进一步完善以及增加新发展的、具有较高临床应用价值的临床检验项目内容,如肿瘤标志的临床应用与选择,临床分子诊断的应用等内容,为广大临床工作者在重症医学的镇静评估检测以及进行规范化护理操作提供更多帮助。

《医学检验项目选择与临床应用》于2013年人民卫生出版社出版,王兰兰著。该书凝结了著作者多年的临床经验结晶,并充分融合当前最新的国内外研究成果,使该书的实用价值、指导价值较高。全书从三个方面进行探讨,第一方面,对临床中常见的疾病进行系统分析,包括红细胞、代谢、出血性疾病以及心脏、肾脏、肝脏功能检查与肾脏疾病等,为后文对这些疾病的镇静评估检测提供基础。第二方面,对这些疾病相关的实验室诊断进行剖析,包括自身免疫性疾病、神经系统疾病、病毒性肝炎、细菌感性、真菌及其他病毒感性的实验室诊断。第三方面,对重症医学疾病的评估检测方法进行探究,包括性激素水平、血管外体液检查、法医DNA鉴定、血液免疫与输血相关分析以及器官移植的组织配型等内容。该书结构紧凑,层层递进,一经出版就得到广大读者的追捧。

《医学检验项目选择与临床应用》一书中针对各种重症医学疾病,提出实验室检查路径、相关实验、结果判断与分析,针对作者多年来的临床实践经验分析典型病例,并得到相应的启示以及护理规范性操作措施。在治疗之前,医生需要确定患者治疗的进展,重症监护室的人员需要签署知情同意书,并观察患者的镇痛以及镇静作用。同时,对患者最初的镇痛以及镇静治疗的效果进行记录,并检查是否发生循环系统、呼吸道以及其他类型的并发症。还应对镇静不足等情况进行记录,并应对过量的镇静镇痛药的详细数据进行保留。实验组需要跟踪新的镇痛以及镇静疗法的评估,包括设定治疗的目标,建立新型的镇痛以及镇静临床试验方面的标准,并对新标准进行实施以及管理,观察治疗中发生的不良反应并及时地进行治疗调整。

在重症医学的镇静评估以及测试中,应注意患者的焦虑以及疼痛状况进行评估。这一评估必须基于客观且全面的原则。在对病人的疼痛进行评估的同时,还要理解以及尽量避免病人的焦虑。止痛药以及镇静剂使用不足会导致治疗效果低下。此外,需要对使用的止痛药以及镇静剂的剂量进行控制,使患者在治疗阶段不会发生过度治疗现象。在使用药物时,需要密切地注意患者的病情发展并及时处理患者的副作用,而不是随意地增减药物的使用量。重症监护室应该派遣主要的医生组成一个镇静作用的评估以及测试团队,以确定以及测试镇静的实际作用。

在护理的实际操作中,需要注意护士操作的规范化及标准化。选择恰当的静脉通路,进行严格的无菌操作并使患者处于一个舒适的治疗环境。护理人员需要集中完成各类操作,保持安静的治疗环境,并避免强光及噪音对患者的刺激。需要定期为患者提供心理方面的咨询及慰藉,减少患者情绪上的不适,使患者内心保持平静,积极配合医护人员工作。在检测疗效及镇静效果时,根据不同患者的具体情况制定个性化方案。对各种身体状况以及病情的患者进行治疗及镇静,规范化器官功能的变化及镇静目标。为了确保各个患者的某种程度的安全性,有必要在综合各种环境因素后设计规范化的治疗以及护理策略。

《医学检验项目选择与临床应用》作为医学检验项目选择与临床护理人员的工作指导用书,将重点放在了各种临床重症的检测以及实验室的诊断操作技术的详细讲解方面。编写过程中参考了国内外的优秀素材,结合了国内的管理现状,为现代重症病学医护人员提供了更为科学、系统、全面的操作技能参考资料,可以应用在临床医学以及护理专业学生的学习当中,也可以作为在职临床医学以及护理人员的工作应用参考资料使用。

(作者敬思远,陈媛媛,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)