

技术与方法 Techniques and Methods

银杏实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择与验证

苏西娅¹, 石元豹¹, 杨晓明¹, 汪贵斌^{1,2}, 曹福亮^{1,2,*}¹南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 南京210037²江苏省农业种质资源保护与利用平台, 南京210014

摘要: 为了筛选出银杏中稳定的内参基因用于实时荧光定量PCR (qRT-PCR)分析, 本研究以银杏(*Ginkgo biloba*)的不同组织, 不同发育时期雌株、雄株叶片为材料, 使用3种软件geNorm, NormFinder和Bestkeeper综合评估银杏中常见的7个内参基因(*GbACT*、*GbUBQ*、*GbEF-1a1*、*GbEF-1a2*、*GbGAPDH*、*Gb18S*和*Gb26S*)的稳定性, 并用查尔酮合酶基因(*Chalcone synthase, CHS*)对内参基因稳定性进行验证。结果表明, 候选基因的稳定性各异, *GbUBQ*是所有测试样品和不同发育时期雄株叶片中表达最稳定的基因, *GbACT*是不同时期雌株叶片表达最稳定的内参基因, *GbGAPDH*是不同组织中表达最稳定的基因。

关键词: 银杏; 内参基因; 实时荧光定量PCR; 验证

实时荧光定量PCR (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)是一种在DNA扩增反应体系中加入荧光化学物质, 实时测定每次聚合酶链式反应(PCR)循环后的产物总量, 并通过标准曲线对待测基因进行定量分析的方法(Kulcheski等2010)。qRT-PCR具有重复性好、灵敏度强、定量精确度高、速度快、特异性强、可大范围内定量等优点(Wen等2012; Artico等2010), 已经成为分子生物学研究中检测和量化基因表达的有力工具(Artico等2010)。在对目标基因进行定量或定性分析时, 为了得到更为准确的结果, 通常需要引用内参基因对实验结果进行校正(Yoo等2009), 用来消除实验过程中RNA提取质量、反转录效率的差异以及实验操作中的差别(姜婷等2015), 从而获得目标基因表达量的真正差异。

内参基因, 又称管家基因、看家基因, 指不受外部环境因子及实验条件变化的影响, 能够在各类组织和细胞中恒定或相对稳定表达的一类基因。在植物学中, 研究基因表达水平常用的内参基因有肌动蛋白基因(*actin, ACT*)、 β 微管蛋白基因(*tubulin, TUB*)、核糖体RNA基因(如: *18S rRNA*、*26S rRNA*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH*)、多聚泛素酶基因(*ubiquitin, UBQ*)和转录延伸因子基因(*elongation factors 1 alpha, EF-1a*)等(Thomas等2003; Nicot等2005)。它们部分是作为生物体细胞骨架的基本组分(如*ACT*、*TUB*等), 部分参与细胞的基

本生化代谢途径(如*GAPDH*、*UBQ*、*EF-1a*等), 其产物是细胞生命活动所必需的(Libault等2008; Gutierrez等2008), 因此, 理论上它们能在任何条件下稳定表达。但是, 大量的实验研究表明, 在不同的植物及组织中, 不同生理状态条件下内参基因的表达量并不是始终稳定表达, 随着实验条件的改变, 稳定表达的内参基因也会不同(Czechowski等2005; Remans等2008)。研究者需要根据具体的物种和不同的处理方法选择合适的内参基因用来校正和标准化。

目前, 用来评估参考基因表达稳定性以及选择合适的参考基因的软件有geNorm (Vandesompele等2002)、NormFinder (Andersen等2004)和Best-Keeper (Pfaffl等2004)等一些软件, 这些软件从不同角度进行分析, 各具优点, 可以通过对三种软件实验结果比较, 从众多参考基因中筛选出最优的内参基因。使用这些软件, 已经鉴定了许多物种的参考基因, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Remans等2008)、水稻(*Oryza sativa*) (Jain等2006)、玉米(*Zea mays*) (姜婷等2015)、杨树(*Populus*) (Brunner等2004)和侧柏(*Platycladus orientalis*) (Chang等2012)。

收稿 2018-11-27 修定 2019-05-09

资助 国家重点研发计划课题(2017YFD0600701)和江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 通讯作者(fuliangcaonjfu@163.com)。

银杏(*Ginkgo biloba*), 银杏科现存的唯一单属单种植物, 是世界著名的孑遗植物, 我国特有的珍稀树种, 被誉为植物界的“活化石”(曹福亮2007)。目前, *18S rRNA*、*GAPDH*等内参基因常被用于研究银杏相关基因的表达分析(许锋等2005; Cheng等2013; Wang等2013)。然而这些内参基因是否在银杏中表达稳定性最佳, 其他内参基因在银杏中的稳定性研究也未见报道, 因此在银杏中选择一个合适的内参基因尤为重要。

本研究以银杏的不同组织(一年生嫩枝、叶柄、外种皮、雌蕊、花粉)、不同发育时期的雌株和雄株的叶片为材料, 利用qRT-PCR技术对植物中常见的7个内参基因(*GbACT*、*GbUBQ*、*GbEF-1a1*、*GbEF-1a2*、*GbGAPDH*、*Gb18S*和*Gb26S*)进行表达量分析, 并使用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件对候选基因的表达稳定性进行分析评价, 筛选出银杏不同组织、不同发育时期雌、雄株叶片及本研究所有供试材料中合适的内参基因, 为进一步开展银杏相关基因表达调控等相关实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和组织准备

本研究的实验材料均采于南京林业大学校园内的2株银杏树。银杏(*Ginkgo biloba* L.)的不同组织嫩枝、叶柄、外种皮、雌蕊在5月份采集, 花粉在即将散粉状态于4月份采集。不同发育时期的叶片从萌芽期(3月)开始采集, 采样周期为1个月, 采集7个时期的雌株、雄株叶片。采样时遵循随机原则, 各个方向采集混匀, 每个样品设置3次生物学重复, 样品用液氮速冻, 贮存在 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.2 总RNA的提取与cDNA的合成

采用试剂盒法提取总RNA (Omega, R6827-02, 广州), 使用Thermo NanoDrop 2000C紫外/可见分光光度计测定总RNA浓度和纯度, 并且通过1%琼脂糖凝胶电泳验证总RNA完整性, A_{260}/A_{280} 比值在1.8~2.1之间的RNA样品用于下一步实验。按照反转录试剂盒(Takara, RR047A, 大连)的操作方法, 先将各样品总RNA消除DNA污染, 再反转录合成

cDNA第一链, 获得的cDNA产物直接用于PCR或 -20°C 贮藏备用。

1.3 内参基因的筛选与引物设计

银杏中已经发表(NCBI)的内参基因序列有*GbGAPDH*、*Gb18S*、*Gb26S*, 以植物中常见的内参基因为参考, 利用本地BLAST在银杏基因组(<http://dx.doi.org/10.5524/100209>)中搜索鉴定可能的银杏内参基因的序列, 筛选比对出5条内参基因, 分别命名为*GbACT*、*GbGAPDH*、*GbEF-1a1*、*GbEF-1a2*和*GbUBQ*。使用Primer Premier 3.0软件设计引物, 由擎科生物有限公司(Tsingke, 北京)合成。用cDNA进行PCR检测所有引物的特异性, 为了确认扩增序列, 在1%琼脂糖凝胶上分析产物大小, 对7个参考基因进行扩增后, 进一步用熔解曲线分析确定引物。

1.4 荧光定量PCR分析

在荧光定量PCR96孔板(Axygen)中按照qRT-PCR试剂盒(Tsingke, TSE202, 北京)方法加入正反引物各 $0.8\ \mu\text{L}$ 、生物用水 $7\ \mu\text{L}$ 、 $2\times\text{T5 Fast qPCR Mix (SYBR Green I)}$ $10\ \mu\text{L}$ 和ROX Reference DyeII $0.4\ \mu\text{L}$, 待测样品cDNA $1\ \mu\text{L}$, 总反应体系为 $20\ \mu\text{L}$, 每个样品重复3次。反应条件为: 95°C 预变性30 s, 95°C 变性5 s, 60°C 退火1 min, 40个循环, 然后进行 $60\sim 95^{\circ}\text{C}$ 的熔解曲线分析。

1.5 数据分析

利用Excle 2016软件绘制7个候选内参基因在所有样品中 C_t 值的分布箱线图, 对不同软件的分析结果绘制图表进行分析, 分别用geNorm、NormFinder和BestKeeper 3种软件对所有的候选内参基因的稳定性进行评价。

1.6 验证内参基因的可靠性

根据筛选结果, 选择不同发育时期雌株叶片中筛选出来的最优和最差的内参基因做为标准化因子, 分别对银杏的查尔酮合成酶基因(*Chalcone synthase, CHS*)的表达水平进行分析。

2 实验结果

2.1 银杏RNA提取与质量检测

提取的RNA用1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像仪上显示各样品总RNA电泳图谱带型清

晰, 无弥散现象, 且 $28S$ $rRNA$ 条带和 $18S$ $rRNA$ 条带亮度高, $5.8S$ $rRNA$ 条带亮度很低或几乎没有, 证明提取的总RNA没有降解(图1)。用紫外分光光度计检测各样品的浓度及纯度, 结果显示, 各样品总RNA的峰图优良, A_{260}/A_{280} 值介于1.8~2.0之间, 证明RNA样品纯度较高, 满足后续实验要求。

2.2 引物特异性分析

7个候选内参基因及查尔酮合酶基因的引物如表1, 以五月份雌树叶片总RNA为模板RT-PCR扩增各内参基因片段, 经琼脂糖凝胶电泳结果显示如图2, 内参基因引物扩增出来的均是单一条带, 无杂带和二聚体现象, 大小与预期一致, 并且7个内参基因的熔解曲线中没有杂峰出现, 在不加模板的阴性对照中没有扩增出峰, 说明内参基因的引物特异性强。

2.3 候选内参基因表达谱分析

通过对箱线图(图3)分析, 可知7个内参基因的表达水平在大范围内波动, C_t 值的变化范围在15~34之间, 其中大多数值分布在18~24之间。在这些基因中, $GbACT$ 、 $GbGAPDH$ 和 $GbEF-1\alpha 1$ 基因的表达水平较为富集, 所有样本的平均 C_t 值分别是21.957、20.448和21.401; 而基因 $Gb18S$ 的表达水平最为分散, 平均 C_t 值是21.171。根据 C_t 值的变化范围大小分析, 基因 $Gb18S$ 和 $Gb26S$ 的 C_t 值变化范围大, 其余5个候选内参基因的 C_t 值的变化范围小, 可初步推测这两个基因的表达水平相比其他基因不稳定。

2.4 候选基因的稳定性表达分析

为了减少试验分析误差, 本文采用3种不同的内参基因测试软件geNorm、NormFinder和Best-

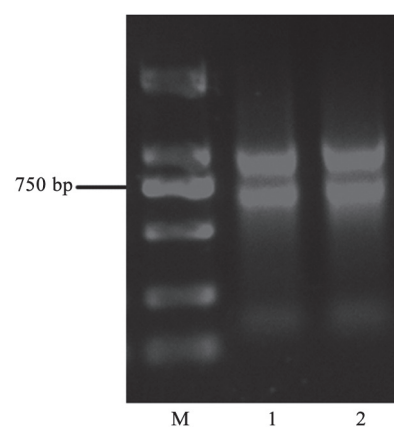


图1 银杏叶片总RNA提取的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig.1 Agarose gel electrophoresis detection of total RNA extraction from *G. biloba* leaves
M: DL2000 DNA marker; 1: 5月份雄株叶片; 2: 5月份雌株叶片。

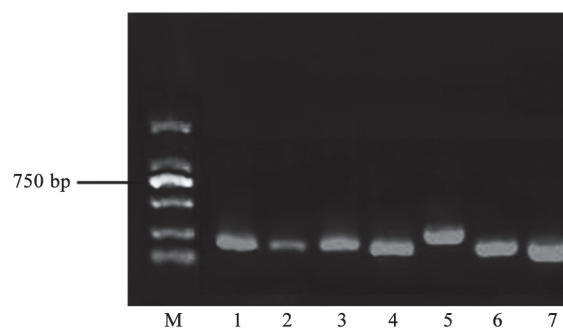


图2 银杏叶片cDNA为模板7个内参基因的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig.2 PCR amplification of seven reference genes based on the cDNA of *G. biloba* leaves
M: DL2000 DNA marker; 1: *GbACT*; 2: *GbUBQ*; 3: *GbGAPDH*; 4: *GbEF-1a1*; 5: *GbEF-1a2*; 6: *Gb18S*; 7: *Gb26S*。

表1 候选内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of candidate reference gene

基因名称	基因登录号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	$T_m/^\circ C$	片段大小/bp
<i>GbACT</i>	Gb_22033	TGAATCCCAAGGCAAATAGAGAG	CCCCAGAATCCAAAACAATACC	80.54	180
<i>GbUBQ</i>	Gb_15027	TCAAGACAAGGAGGGAATC	TCTCAAACGAAGCACCAG	82.22	133
<i>GbGAPDH</i>	L26924.1	ATCCACGGGAGTCTTCAC	GACCTTCAACAATGCCAAAC	83.72	230
<i>GbEF-1a1</i>	Gb_17471	GAAAGCTGAGCGAGAACG	ATCAATAATCAAAACTGCACA	80.54	163
<i>GbEF-1a2</i>	Gb_22919	GCAGAGCGTGAGCGTGGTAT	ATCAAGACAGCGCAGTCGG	82.78	152
<i>Gb18S</i>	D16448.1	CGAAGACGATCAGATACCG	TCAGCCTTGCGACCATAC	83.90	142
<i>Gb26S</i>	AY095475.1	GCCCTCAGAGCCAATCCTT	GACCGAGTACCGTTCACGC	83.72	143
<i>GbCHS</i>	AY563038.1	CCTTGAGCAGATGAAAAGTGAGC	CAGCAGCCGTTATCGTTGG	84.89	156

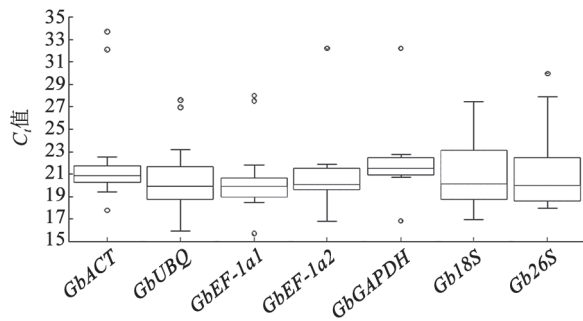


图3 候选内参基因在样品中的表达谱

Fig.3 Expression profile of candidate reference genes in samples
小圆圈是数据中的异常值。

Keeper进行分析比较,用于评价候选基因的表达稳定性,筛选出适合该试验处理的内参基因,提供有利参考便于后续研究。

2.4.1 geNorm软件分析

geNorm是Vandesompele等(2002)编写的用来筛选实时荧光定量PCR中合适的内参基因及确定最适内参基因数目的软件。该软件通过计算表达每个内参基因稳定性大小的 M 值来筛选稳定性较好的内参基因, M 值是由某一基因的 C_t 值与其他剩余基因的 C_t 值两两比对,通过对数变换计算其平均标准差得到的数值, M 值越小说明内参基因稳定性越好。该软件也可以通过标准化因子的成对变异值(V),确定合适数目的内参基因,并最终挑选出2个或2个以上的内参基因组合来校正数据,可使相对定量的结果更为精确。

geNorm软件分析结果如表2所示,不同条件下候选内参基因的稳定性排序不同,在对所有样品分析时,这七个内参基因的表达稳定性由高到低的

排序为 $GbACT/GbUBQ > GbGAPDH > GbEF-1a2 > GbEF-1a1 > Gb18S > Gb26S$,可以推测,在银杏中 $GbACT$ 和 $GbUBQ$ 是表达较稳定的基因。对不同发育时期雌株叶片分析筛选出的最稳定基因和所有样品的最稳定基因($GbACT$)相同。在对不同组织分析时,表达较稳定的基因是 $GbGAPDH$ 和 $GbEF-1a2$ 。 $GbEF-1a1$ 、 $GbEF-1a2$ 是对不同发育时期雌株叶片分析时最稳定的基因,除不同组织筛选出最不稳定基因 $GbACT$ 之外,不同发育时期雌株、雄株及所有样品中不稳定的基因均为 $Gb18S$ 和 $Gb26S$,预测在银杏中这两个基因表达稳定性不高。通过geNorm软件计算成对变化值(V_n/V_{n+1})分析(图4),对不同组织分析时, V_2/V_3 小于临界阈值(0.15),认为在该实验组处理中,需要使用2个内参基因共同作为标准化因子,才能确保定量的准确性。可以选择稳定性排序最高的内参基因 $GbGAPDH$ 和 $GbEF-1a2$ 作为参考基因,其余值均大于0.15,故不做分析。

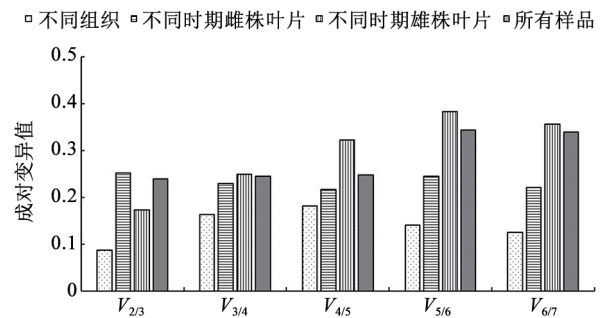


图4 geNorm软件确定最优内参基因数目

Fig.4 Number of optimal reference genes determined by geNorm software

表2 geNorm软件分析计算各候选基因的表达稳定值(M)

Table 2 Expression stability values of candidate reference genes calculated by geNorm software

排序	基因名	表达稳定值(M)			
		不同组织	不同发育时期雌株叶片	不同发育时期雄株叶片	所有样品
1	<i>GbGAPDH</i>	0.090	0.874	0.565	0.752
2	<i>GbEF-1a2</i>	0.090	0.594	0.803	0.909
3	<i>GbEF-1a1</i>	0.174	0.594	1.156	1.085
4	<i>GbUBQ</i>	0.419	0.874	0.529	0.675
5	<i>Gb26S</i>	0.628	1.000	2.110	1.751
6	<i>Gb18S</i>	0.723	1.337	1.634	1.447
7	<i>GbACT</i>	0.798	0.738	0.529	0.675

2.4.2 NormFinder软件分析

NormFinder是Prgomet等人(2004)编写的软件, 该软件可以比较候选内参基因的表达差异, 还可以计算样品组间的变异, 但该软件只能根据稳定值的大小筛选出一个最合适的内参基因, 稳定值越小, 内参基因越稳定。由表3分析可知, 对所有样品分析时, 候选内参基因的表达稳定性由高到低分别是*GbUBQ*、*GbGAPDH*、*GbEF-1a2*、*GbACT*、*GbEF-1a1*、*Gb18S*和*Gb26S*, 稳定性最高的内参基因*GbUBQ*, 表达稳定值是0.436, *Gb26S*表达稳定值为1.617, 稳定性最低。和geNorm软件分析结果一致, 在对银杏不同组织、不同发育时期雌株叶片、不同发育时期雄株叶片分析中, 内参基因*GbUBQ*的稳定性都很高, 其表达稳定性值分别为0.136、0.480和0.418; 内参基因*Gb18S*稳定性都很低, 其表达稳定性值分别为0.593、1.043和1.255。其中, 在对银杏不同发育时期雌株叶片分析中, 表达稳定性最高

的内参基因是*GbACT*, 其表达稳定值是0.269。对银杏不同发育时期雌株叶片和不同发育时期雄株叶片分析中最不稳定内参基因和geNorm软件分析一致, 进一步推测内参基因*Gb18S*和*Gb26S*相较于其他候选内参基因, 稳定性不高。

2.4.3 BestKeeper软件分析

BestKeeper是Michael等(2005)人编写另外一种筛选内参基因的软件, 该软件通过计算两两基因的标准偏差(SD)和相关系数(r), 再通过比较各个值的大小, 选择稳定性较好的内参基因。当 $SD > 1$ 时, 表明该内参基因表达不稳定, 可以排除; 其次对剩余内参基因的相关系数排序, 相关系数越大则内参基因的稳定性越强。根据以上两个条件, 筛选出合适的内参基因。由表4可知, 所有样品、不同发育时期雄株叶片和不同发育时期雌株叶片中, 内参基因*Gb18S*和*Gb26S*的标准偏差变动大($SD > 1$)排除; 在不同组织中, 所有候选内参基因

表3 NormFinder软件分析计算各候选基因的表达稳定值

Table 3 Expression stability values of candidate reference genes calculated by NormFinder software

排序	基因名	表达稳定值			
		不同组织	不同发育时期雌株叶片	不同发育时期雄株叶片	所有样品
1	<i>GbUBQ</i>	0.136	0.480	0.418	0.436
2	<i>GbEF-1a1</i>	0.261	0.717	1.342	1.036
3	<i>GbEF-1a2</i>	0.384	0.615	0.527	0.587
4	<i>GbGAPDH</i>	0.384	0.655	0.507	0.563
5	<i>Gb26S</i>	0.449	0.802	2.187	1.617
6	<i>GbACT</i>	0.584	0.269	0.830	0.591
7	<i>Gb18S</i>	0.593	1.043	1.255	1.107

表4 BestKeeper软件分析计算候选内参基因的稳定性

Table 4 Expression stability values of candidate reference genes calculated by BestKeeper software

基因	不同组织		不同发育时期雌株叶片		不同发育时期雄株叶片		所有样品	
	标准偏差	相关系数	标准偏差	相关系数	标准偏差	相关系数	标准偏差	相关系数
<i>GbACT</i>	0.68	0.507	0.57	0.782	0.84	0.436	0.70	0.549
<i>GbUBQ</i>	0.37	0.812	0.95	0.824	0.78	0.751	0.86	0.766
<i>GbEF-1a1</i>	0.52	0.912	0.62	0.226	0.85	0.246	0.77	0.058
<i>GbEF-1a2</i>	0.69	0.979	0.68	0.498	0.68	0.614	0.70	0.524
<i>GbGAPDH</i>	0.69	0.979	0.66	0.342	0.50	0.578	0.59	0.453
<i>Gb18S</i>	0.34	0.387	1.42*	0.738	2.22*	0.921	1.82*	0.860
<i>Gb26S</i>	0.15	0.016	1.26*	0.878	2.83*	0.859	2.09*	0.849

*表示标准偏差大于1被排除的基因。

的标准偏差均小于1,可进行下一步分析。通过对相关系数排序,在所有样品中稳定性表达由高到低的内参基因分别是*GbUBQ*、*GbACT*、*GbEF-1 α 2*、*GbGAPDH*、*GbEF-1 α 1*。因此认为内参基因*GbUBQ*是银杏不同组织中表达最稳定的基因,该结果和geNorm软件和NormFinder软件分析结果一致。在不同发育时期的雌株叶片和雄株叶片中,最稳定的内参基因为*GbUBQ*,这和对所有样品分析筛选结果相同。对不同组织分析筛选出最稳定的内参基因是*GbGAPDH*。

2.5 候选内参基因的可靠性评价

利用NormFinder和BestKeeper软件筛选出来不同发育时期雌株叶片中稳定内参基因*GbUBQ*和*GbACT*和最不稳定的内参基因*Gb18S*,分别对目的基因*GbCHS*在不同时期叶片中的表达进行分析。结果(图5)显示,用*GbUBQ*和*GbACT*作为标准化因子时,*GbCHS*的表达量相似。而用内参基因*Gb18S*对其分析时,在4月份相对表达量过高,在6月、7月和9月相对表达量过低。证明筛选出来的内参基因可靠,选择合适的内参基因可以减少分析误差。

3 讨论

实时荧光定量PCR技术已经成为分子生物学研究的重要工具,选择一个适合该研究材料与处理方法的内参基因对于提高实验精确度至关重要。

本研究使用geNorm、NormFinder和BestKeeper三种软件筛选银杏中合适的内参基因。不同的软

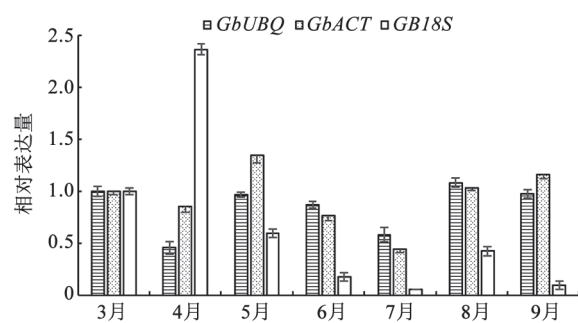


图5 选择不同内参分析*GbCHS*在银杏不同时期雌株叶片中的相对表达量

Fig.5 Relative quantification of *GbCHS* gene using various reference genes for normalization at different stages of *G. biloba*

件中候选内参基因的稳定性排序不同,林玉玲(2011)在对龙眼(*Dimocarpus longan*)的相关研究中也发现相同结论。NormFinder软件考虑了内参基因在不同样本表达水平之间存在差异,适合在样本基因转录水平波动很大的情况下使用(Pfaffl等2004; Andersen等2004)。geNorm软件对所有样本及不同发育时期雌株、雄株叶片进行分析时,其 V_n/V_{n+1} 均大于0.15,其原因可能是样本本身处理时间长,器官差异大(包含不同组织及叶的不同时期)等,在石蒜(*Lycoris radiata*)、换棉花(*Lycoris sprengeri*)等植物的内参研究中,基因表达差异大也出现过 V_n/V_{n+1} 的值均大于0.15的情况(蒋婷婷等2015)。

从分析结果还可得知,从银杏基因组文库比对出的2条内参基因*GbEF-1 α 1*和*GbEF-1 α 2*的表达稳定性不一致,在对所有样品进行分析时,用3个软件分析都得出*GbEF-1 α 2*基因的表达稳定性高于*GbEF-1 α 1*的表达稳定性的结论,证明功能相同的内参基因其表达稳定性不一定相同。例如,在柑橘(*Citrus*)有关研究中,筛选出来最稳定的内参基因是*UBC21*,其同源基因*UBC9*则是最不稳定的内参基因(Mafra等2012)。三个软件都分析筛选出*Gb18S*是候选内参基因中不稳定的基因,*18S*也被证明在牡丹(*Paeonia suffruticosa*) (王彦杰等2012)和西瓜(*Citrullus lanatus*) (Kong等2014)中是不稳定的基因。但在银杏中表达不稳定的26S基因在小麦种子发育过程中的表达量却稳定(Ali-Benali等2005),进一步验证部分内参基因在不同条件下都能稳定表达。

肌动蛋白*ACT*基因是植物中被广泛应用的内参基因。张计育等人(2018)以猕猴桃的根、茎、叶等不同组织为材料,分析了常见*ACT*等6个内参基因支持*ACT*基因是猕猴桃中表达最为稳定的内参基因。在本研究中对不同发育时期雌株叶片进行分析时,*ACT*是表达稳定性很高的基因,与上述研究结果一致。Brunner等(2004)以杨树不同组织为材料,对10个内参基因的的表达稳定性进行分析,结果发现*UBQ*是该研究中所有材料中表达稳定性最高的基因;而在本文中对所有样品进行分析时,同样也得到*UBQ*是稳定性最优的基因。

综上所述,本研究分析了常见的7个内参基因

在银杏不同条件下的表达稳定性, 结合三个软件的分析结果, 发现*GbUBQ*是所有测试样本中及不同发育时期雌雄株叶片中表达最稳定的基因, *GbACT*在不同发育时期雌株叶片中表达稳定性最高, 对不同组织分析时, 可以选择*GbGAPDH*作为标准化因子, *Gb18S*在银杏所有测验材料中表达稳定性不高。这为开展银杏基因表达分析提供了参考依据。

参考文献(References)

- Ali-Benali MA, Alary R, Joudrier P, et al (2005). Comparative expression of five *Lea* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta*, 1730 (1): 56–65
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF et al (2004). 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. *Cancer Res*, 64 (15): 5245–5250
- Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, et al (2010). Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biol*, 10: 49
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4 (1): 14
- Cao FL (2007). Chinese Ginkgo. Beijing: China Forestry Publishing House, 14–27 (in Chinese with English abstract) [曹福亮(2007). 中国银杏志. 北京: 中国林业出版社, 14–27]
- Chang E, Shi S, Liu J, et al (2012). Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR. *PLoS One*, 7 (3): e33278
- Cheng H, Li LL, Cheng SY, et al (2013). Molecular cloning and characterization of three genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Ginkgo biloba* in anthocyanin biosynthetic pathway. *PLoS One*, 8 (8): e72017
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (1): 5–17
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, et al (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotech J*, 6 (6): 609–618
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, et al (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (2): 646–651
- Jiang T, Su Q, An LJ (2015). Screening and validation of reference genes of qPCR in maize under multiple stresses. *Plant Physiol J*, 51 (9): 1457–1464 (in Chinese with English abstract) [姜婷, 苏乔, 安利佳(2015). 多重胁迫下玉米实时定量PCR内参基因的筛选与验证. 植物生理学报, 51 (9): 1457–1464]
- Jiang TT, Gao YH, Tong ZK (2015). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris*. *Acta Horticult Sin*, 42 (6): 1129–1138 (in Chinese with English abstract) [蒋婷婷, 高燕会, 童再康(2015). 石蒜属植物实时荧光定量PCR内参基因的选择. 园艺学报, 42 (6): 1129–1138]
- Kong Q, Yuan J, Gao L, et al (2014). Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon. *PLoS One*, 9 (2): e90612
- Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, et al (2010). The uses of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Anal Biochem*, 406 (2): 185–192
- Libault M, Thibivilliers S, Bilgin DD, et al (2008). Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *Plant Geno*, 1 (1): 44–54
- Lin YL (2011). Study on cloning, expression and regulation of *SOD* gene family during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. (dissertation). Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [林玉玲(2011). 龙眼体胚发生过程中 *SOD* 基因家族的克隆及表达调控研究(学位论文). 福州: 福建农林大学]
- Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, et al (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One*, 7 (2): e31263
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, et al (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Plant Biotechnol J*, 56 (421): 12387
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6): 509–515
- Remans T, Smeets K, Opdenakker K, et al (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227 (6): 1343–1349

- Thomas C, Meyer D, Wolff M, et al (2003). Molecular characterization and spatial expression of the sunflower *ABPI* gene. *Plant Molecular Biol*, 52 (5): 1025–1036
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): research0034
- Wang H, Cao F, Zhang W, et al (2013). Cloning and expression of Stearoyl-ACP desaturase and two oleate desaturases genes from *Ginkgo biloba* L. *Plant Mol Biol Report*, 31 (3): 633–648
- Wang YJ, Dong L, Zhang C, et al (2012). Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *J Agric Biotech*, 20 (5): 521–528 (in Chinese with English abstract) [王彦杰, 董丽, 张超等(2012). 牡丹实时定量PCR分析中内参基因的选择. *农业生物技术学报*, 20 (5): 521–528]
- Wen L, Tan B, Guo WW (2012). Estimating transgene copy number in precocious trifoliolate orange by TaqMan real-time PCR. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 109 (2): 363–371
- Xu F (2005). Molecular cloning and expression of chalcone synthase gene and phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba* (dissertation). Wuhan: Huazhong Agriculture University (in Chinese with English abstract) [许锋(2005). 银杏查尔酮合成酶基因和苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及表达(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Yoo WG, Kim TI, Li S, et al (2009). Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR. *Parasitol Res*, 104 (2): 321–328
- Zhang JY, Huang SN, Wang T, et al (2018). Screening of reference of genes for reverse transcription quantitative real-time PCR in *Atinidia deliciosa*. *Acta Agric Shanghai*, 34 (1): 84–88 (in Chinese with English abstract) [张计育, 黄胜男, 王涛等(2018). 金魁猕猴桃RT-qPCR内参基因的筛选. *上海农业学报*, 34 (1): 84–88]

Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Ginkgo biloba*

SU Xi-Ya¹, SHI Yuan-Bao¹, YANG Xiao-Ming¹, WANG Gui-Bin^{1,2}, CAO Fu-Liang^{1,2,*}

¹College of Forestry, Nanjing Forestry University; Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southeast China, Nanjing 210037, China

²The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China

Abstract: In order to screen out stable reference genes in *Ginkgo biloba* for real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis, we used different tissues, the leaves of female plants and male plants at different developmental stages of *G. biloba* as materials. The stability of the seven genes (*GbACT*, *GbUBQ*, *GbEF-1a1*, *GbEF-1a2*, *GbGAPDH*, *Gb18S*, *Gb26S*) were evaluated by three software (geNorm, NormFinder and Bestkeeper) and *GbCHS* was used to verify it. The results showed that candidate genes varied in stability. *GbUBQ* was the most stable reference gene in all samples and male leaves of different periods. *GbACT* was the most stable reference gene in female leaves in different periods. *GbGAPDH* was the most stable gene in different tissues.

Key words: *Ginkgo biloba*; reference gene; qRT-PCR; verification

Received 2018-11-27 Accepted 2019-05-09

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0600701) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institution (PAPD).

*Corresponding author (fuliangcaonjfu@163.com).