

章丽珍, 韩晓云, 吴菁华, 等. 甜瓜实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 ( 11 ): 1179–1187.

ZHANG L Z, HAN X Y, WU J H, et al. Reference Gene Selection for RT-qPCR Analysis on *Cucumis melo* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 ( 11 ): 1179–1187.

## 甜瓜实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选

章丽珍<sup>1</sup>, 韩晓云<sup>1</sup>, 吴菁华<sup>1</sup>, GefuWANG-PRUSKI<sup>1,2</sup>, 张志忠<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学园艺学院/福建农林大学-戴尔蒙西大学联合实验室, 福建 福州 350002;

2. 加拿大戴尔蒙西大学农学院, 新斯科舍省 特鲁罗 B2N5E3)

**摘要:**【目的】筛选可分别在甜瓜不同组织器官和不同胁迫处理下稳定表达的内参基因, 用于对靶基因表达量的实时荧光定量分析, 保证相关试验的准确性及可靠性。【方法】以甜瓜品种新银辉为试验材料, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析 *18s rRNA*、*TUA*、*EF1a*、*Actin1*、*Actin2*、*Actin3*、*Actin4*、*CYC* 和 *UBI-ep* 共 9 个候选内参基因在甜瓜不同组织器官及不同胁迫处理下的表达稳定性, 包括甜瓜根、叶、种子和果实 4 种不同组织材料, 以及水分胁迫、肉桂酸胁迫、盐碱胁迫和 ABA 胁迫 4 种处理。同时使用 Best-Keeper、Norm Finder 和 ge Norm 软件对 9 个候选内参基因进行稳定性分析。【结果】对不同组织器官而言, Best-Keeper 评估排名前 5 的内参基因依次为 *CYC*> *18s rRNA*> *UBI-ep*> *EF1a*> *TUA*; Norm Finder 计算排名前 5 的内参基因依次为 *EF1a*> *UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *Actin3*; ge Norm 分析排名前 5 的基因依次为 *Actin4*=*Actin3*> *Actin1*> *EF1a*> *UBI-ep*。不同胁迫处理中, Best-Keeper 计算排名前 5 的基因依次为 *18s rRNA*> *Actin3*> *Actin4*> *EF1a*> *UBI-ep*; Norm Finder 分析排名前 5 的基因依次为 *EF1a*> *UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *18s rRNA*; ge Norm 分析排名前 5 的基因依次为 *EF1a*=*UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *Actin1*。总体而言 *EF1a* 在不同组织器官和不同胁迫处理中的综合排名均较为稳定; *Actin4*、*Actin3*、*Actin1* 和 *EF1a* 是不同组织器官中较为稳定的内参基因组合; *EF1a* 和 *UBI-ep* 是 4 种胁迫条件下较稳定的内参基因组合。【结论】*EF1a* 在甜瓜不同组织器官及不同胁迫条件下均可稳定表达, 是较为合适的内参基因; 同时可通过设置双内参基因进一步降低试验误差。

**关键词:** 甜瓜; 内参基因; 实时荧光定量 PCR; 组织器官; 胁迫

中图分类号: S 652

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 11-1179-09

## Reference Gene Selection for RT-qPCR Analysis on *Cucumis melo*

ZHANG Lizhen<sup>1</sup>, HAN Xiaoyun<sup>1</sup>, WU Jinghua<sup>1</sup>, Gefu WANG-PRUSKI<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhizhong<sup>1\*</sup>

(1. Joint FAFU-Dalhousie Lab, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Faculty of Agriculture, Dalhousie University, Truro, NS, Canada B2N5E3)

**Abstract:** 【Objective】In search for internal reference genes of *Cucumis melo* L. that could stably express in different tissues and under stress conditions to warrant accuracy and reliability of the RT-qPCR analysis on target gene expression. 【Method】Expression stabilities of 9 candidate genes, *18s rRNA*, *TUA*, *EF1a*, *Actin1*, *Actin2*, *Actin3*, *Actin4*, *CYC*, and *UBI-ep*, from the roots, leaves, seeds, and fruits of Xinyinhui melon being treated by water, cinnamic acid, saline alkali or ABA were determined by RT-qPCR and analyzed using the BestKeeper, NormFinder, and geNorm software. 【Result】In different tissues, the top 5 choice genes identified by BestKeeper ranked as *CYC*> *18s rRNA*> *UBI-ep*> *EF1a*> *TUA*, those by NormFinder *EF1a*> *UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *Actin3*, and those by geNorm *Actin4*=*Actin3*> *Actin1*> *EF1a*> *UBI-ep*. Under various stresses, they were *18s rRNA*> *Actin3*> *Actin4*> *EF1a*> *UBI-ep* as ranked by BestKeeper, *EF1a*> *UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *18s rRNA* by NormFinder, and *EF1a*=*UBI-ep*> *Actin4*> *CYC*> *Actin1* by geNorm. Overall, *EF1a* appeared to be most stable among the 9 genes. Insofar as variety of tissues is concerned, *Actin4*, *Actin3*, *Actin1*, and *EF1a* were more stable than the others; and, under stress, *EF1a* and *UBI-ep* tended to be superior. 【Conclusion】Stably expressed in the tissues

收稿日期: 2020-07-29 初稿; 2020-10-04 修改稿

作者简介: 章丽珍 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农艺与种业 (E-mail: 651260775@qq.com)

\* 通信作者: 张志忠 (1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 园艺植物逆境生理和生物技术 (E-mail: zezada2001@163.com)

基金项目: 福建省闽江学者科研基金 (116-114120019); 福建农林大学创新专项基金 (CXZX2016108, CXZX2017168)

under the stresses as tested, *EFla* was selected as the reference gene for studies on *C. melo* to reduce experimental errors. To further ensure accuracy, application of dual reference genes in RT-qPCR analysis might be considered.

**Key words:** *Cucumis melo* L.; reference gene; RT-qPCR; Tissues and organs; stress

## 0 引言

【研究意义】实时荧光定量 PCR 技术 (Quantitative Real-time PCR, RT-qPCR) 因其具有简单、高效、低成本等特点, 在分子生物学研究领域被广泛应用。RT-qPCR 检测结果依样品来源和处理条件而异, 同时与样本品质、样品反转录效率、加样模板量等因素也密切相关, 一个能在不同样品中相对稳定表达的内参基因是对其结果进行标准化衡量的关键<sup>[1]</sup>。甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 具有较高的经济价值, 是世界各地广泛栽培和消费的重要瓜果作物<sup>[2]</sup>。目前关于甜瓜内参基因筛选的报道较少, 不同研究选用的内参基因不同, 导致研究结果间可比性和重复性较差, 限制了其分子生物学的深入。本研究旨在筛选适用于甜瓜不同组织器官和不同胁迫处理下的有效内参基因, 为甜瓜 RT-qPCR 检测提供可靠理论依据。【前人研究进展】内参基因的选择对于 RT-qPCR 检测至关重要, 有严格的标准和分析方法<sup>[3-4]</sup>。但必须注意的是没有一个内参基因能在不同物种及不同试验条件下恒定表达<sup>[5]</sup>。如 *18s rRNA* 是最广泛应用的内参基因之一, 研究显示其在野百合<sup>[6]</sup> (*Lilium brownie* F. E.) 和黄山栎树<sup>[7]</sup> (*Koeleria bipinnata* Franch.) 等物种中可稳定表达; 但在洪桐<sup>[8]</sup> (*Davidia involucrata* Baill.) 和鼠尾草<sup>[9]</sup> (*Salvia hispanica* Thunb.) 中表达稳定性均较差, 不适合作为二者相关研究中的内参基因。在对中国石蒜 (*Lycoris chinensis* Traub.) 的研究中发现, *Ubiquitin5* 基因可在不同花发育时期稳定表达, 但在不同组织中表达稳定性较差<sup>[10]</sup>。对内参基因的筛选受到研究者的广泛重视, 如已有关于牡丹<sup>[11]</sup> (*Paeonia suffruticosa* Andr.)、棉花<sup>[12]</sup> (*Gossypium hirsutum* L.) 和刺葡萄<sup>[13]</sup> (*Vitis davidii* Foëx.) 等重要植物内参基因筛选的报道, 这些报道将有利于提高相关试验的准确性和可重复性<sup>[14]</sup>。对甜瓜而言, *Actin3* 在总样品、根、茎叶样品中具有较好的稳定性, 但在高低温胁迫、不同激素胁迫下表达稳定性较差<sup>[15]</sup>。【本研究切入点】目前甜瓜内参基因筛选的报道较少, 前人筛选的甜瓜内参基因均是针对不同胁迫或是不同的组织器官分别筛选, 鲜少将两者结合考虑。【拟解决的关键问题】本研究以甜瓜不同组织器官以及水分胁迫、自毒胁迫、盐碱胁迫和 ABA

处理等多种胁迫处理样品为材料, 选择 *18s rRNA*、*TUA*、*EFla*、*Actin*、*Actin2*、*Actin3*、*Actin4*、*CYC* 和 *UBI-ep* 等 9 个内参基因, 综合利用 Best-Keeper、Norm Finder 和 ge Norm 软件对相关基因的稳定性进行分析, 并进行验证, 以期筛选出在甜瓜中稳定表达并适用于不同条件的内参基因或其组合。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为新银辉品种的甜瓜, 购于福建农嘉种业股份有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 甜瓜幼苗培育 选取颗粒饱满的甜瓜种子, 使用 10% 过氧化氢溶液进行浸种 10 min, 均匀撒到含有珍珠岩的培养皿 (90 mm) 中, 并加入 10 mL 无菌双蒸水 (保证充分浸湿珍珠岩), 盖上培养皿盖子, 放置于 28 °C 的恒温培养箱, 暗环境培养 3 d 后, 分别将单株苗转移至 500 g 基质 (蛭石、珍珠岩、草炭土比为 1:1:3) 中培育。在自然生长条件下, 选取长势一致的甜瓜三叶一心幼苗进行处理, 采用 5% PEG-6000 溶液模拟水分胁迫, 采用 0.6 mmol·L<sup>-1</sup> 肉桂酸溶液模拟自毒胁迫, 采用 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl+25 mmol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> 溶液模拟盐碱胁迫, 采用 4 mg·L<sup>-1</sup> ABA 溶液进行 ABA 处理, 以上溶液均采用双蒸水进行配制。每盆根灌 100 mL 上述不同处理液, ABA 处理采用叶面喷施方式进行。在第 3 d 取植株的第 3 叶作为甜瓜叶片不同胁迫处理的供试材料; 另选取未经过胁迫处理的甜瓜种子、根、叶、果实作为不同组织器官的供试材料对照。所有样品均设 3 次重复, 每个处理不少于 10 株幼苗。取样后迅速置于液氮中, 存放于 -80 °C 环境中用于提取 RNA。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 用天根多酚多糖总 RAN 提取试剂盒 (TIANGEN 公司) 提取供试材料总 RNA, 具体提取操作步骤按照说明书进行, 用 NanoDrop200 超微量分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 测定 RNA 的 OD 值和浓度, 用 1% 的凝胶琼脂检测 RNA 的完整性。利用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司) 反转录合成 cDNA, 置于 -20 °C 保存。

1.2.3 引物设计和特异性检测 选择 9 个功能不同的看家基因：*18s rRNA*、*TUA*、*EF1a*、*Actin1*、*Actin2*、*Actin3*、*Actin4*、*CYC*、*UBI-ep* 作为候选内参基因，通过 Primer Premier 5.0 软件设计内参基因引物（表 1），由福州尚亚生物技术有限公司合成引物。将所有样品的 cDNA 模板等量混合，对 10 个内参基因进行 PCR。PCR 反应采用 2×*Taq* Master Mix（上海近岸科

技有限公司）试剂，反应 20 μL 体系为：上、下游引物（10 μmol·L<sup>-1</sup>）分别 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，2×*Taq* Master Mix 10 μL，无菌水 8 μL。PCR 反应条件为：95 ℃ 预变性 3 min；98 ℃ 变性 20 s，60 ℃ 退火 20 s，72 ℃ 延伸 30 s，共 35 个循环；72 ℃ 延伸 5 min。最后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性。

表 1 9 个候选内参基因 RT-qPCR 引物序列及其扩增效率  
Table 1 RT-qPCR primer sequences and amplification efficiency of 9 candidate reference genes

| 登录号<br>GenBank ID | 基因<br>Gene      | 引物序列（5'-3'）<br>Primer sequence F/R（5'-3'） | 产物大小<br>Product size/bp | 扩增效率<br>Efficiency（E） |
|-------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| AF206894.1        | <i>18s rRNA</i> | TCTGCCCCGTGCTCTGATG                       | 130                     | 2.05                  |
|                   |                 | TCACCCGTCACCACCATAG                       |                         |                       |
| XM_008456199.2    | <i>TUA</i>      | ACGCTGTTGGTGGTGGTAC                       | 106                     | 2.06                  |
|                   |                 | GAGAGGGGTAAACAGTGAATC                     |                         |                       |
| XM_008459007.2    | <i>EF1a</i>     | ACTGTGCTGTCTCATATTG                       | 98                      | 1.98                  |
|                   |                 | AGGGTGAAAGCAAGAAGAGC                      |                         |                       |
| LN713255.1        | <i>CYC</i>      | GATGGAGCTCTACGCCGATGTC                    | 153                     | 1.97                  |
|                   |                 | CCTCCCTGGCACATGAAATTAG                    |                         |                       |
| NM_001282241.1    | <i>UBI-ep</i>   | CACCAAGCCCAAGAAGATC                       | 220                     | 2.10                  |
|                   |                 | TAAACCTA ATCACCACCAGC                     |                         |                       |
| XM_008442791.2    | <i>Actin1</i>   | TTCTGGTGATGGTGTGAGTC                      | 149                     | 2.09                  |
|                   |                 | GGCAGTGGTGGTGAACATG                       |                         |                       |
| XM_008449644.2    | <i>Actin2</i>   | GAAGGAATAACCACGCTCAG                      | 117                     | 2.02                  |
|                   |                 | ACACAGTTCCCATCTACGAG                      |                         |                       |
| XM_008449644.2    | <i>Actin3</i>   | GGCAGTGGTGGTGAACATG                       | 149                     | 1.99                  |
|                   |                 | TTCTGGTGATGGTGTGAGTC                      |                         |                       |
| LN713262.1        | <i>Actin4</i>   | TGGAAGCTGCAGGAATCCACGA                    | 165                     | 2.04                  |
|                   |                 | TGCTGGGAGCAAGGGCTGTG                      |                         |                       |

1.2.4 扩增效率及 qRT-PCR 分析 实时荧光定量 PCR 在伯乐公司的 CFX96Touch 实时荧光定量 PCR 仪上进行，按照 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒（上海翊圣生物科技有限公司）进行，反应体系为 20 μL：上、下游引物（10 μmol·L<sup>-1</sup>）分别为 0.4 μL，cDNA 模板 1 μL，Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL，无菌水 8.2 μL。反应程序：95 ℃ 预变性 5 min，变性 95 ℃ 10 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 20 s，共 45 个循环，每个样品设置 3 次重复；反应结束，根据熔解曲线分析基因的特异性。将所有样品的 cDNA 模板等量混合，按 10 倍进行稀释，稀释成 5 个浓度梯度，进行标准曲线制作，根据 Bio-Rad

CFX Manager 3.0（3.0.1224.1015）软件给出的 Ct 值（循环阈值，Cycle threshold）计算引物的扩增效率 E 值，计算公式为：E=（10<sup>-1/slope</sup>-1）×100%，Slope 为标准曲线的斜率。

1.3 数据分析

通过 Excel 对数据进行整理，参照 BestKeeper<sup>[14]</sup>、NormFinder<sup>[16]</sup> 和 geNorm<sup>[4]</sup> 软件使用说明，对 9 个候选内参基因稳定性进行分析筛选。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量、引物特异性检测及扩增效率分析

采用 NanoDrop 200 超微量分光光度计测定所提

取甜瓜不同组织 RNA 的 OD 值, 所提的总 RNA 浓度为  $1\ 028\sim 7\ 230\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,  $\text{OD}_{260/280}$  值在  $1.89\sim 2.10$ ; 经过 1% 的琼脂凝胶电泳检测, 18S 和 28S 的条带清晰, 且 28S 条带亮度约是 18S 条带的 2 倍, 表明所有样品的总 RNA 质量良好, 符合后续试验要求。将 8 个不同组织器官的模板等量混合, 在 1% 的琼脂凝胶电泳检测, 扩增出的条带均为单一条带, 无引物二聚体 (图 1)。所有引物的熔解曲线均只有单一峰且重复性好 (图 2), 进一步说明引物特异性好。通过 Ct 值计算引物的扩增效率 E 值, 9 个候选内参基因的扩增效率在  $1.97\sim 2.10$  (表 1), 符合荧光定量 PCR 要求。



注: M: Marker; 1~9 分别为内参基因 *Actin1*、*Actin2*、*Actin3*、*Actin4*、*CYC*、*UBI-ep*、*TUA*、*18s rRNA*、*EF1a*。

Note: M: marker; 1~9: candidate reference genes, *Actin1*, *Actin2*, *Actin3*, *Actin4*, *CYC*, *UBI-ep*, *TUA*, *18s rRNA*, and *EF1a*, respectively.

图 1 9 个候选内参基因的引物扩增特异性与扩增长度

Fig. 1 Amplification specificities and lengths of 9 candidate reference genes

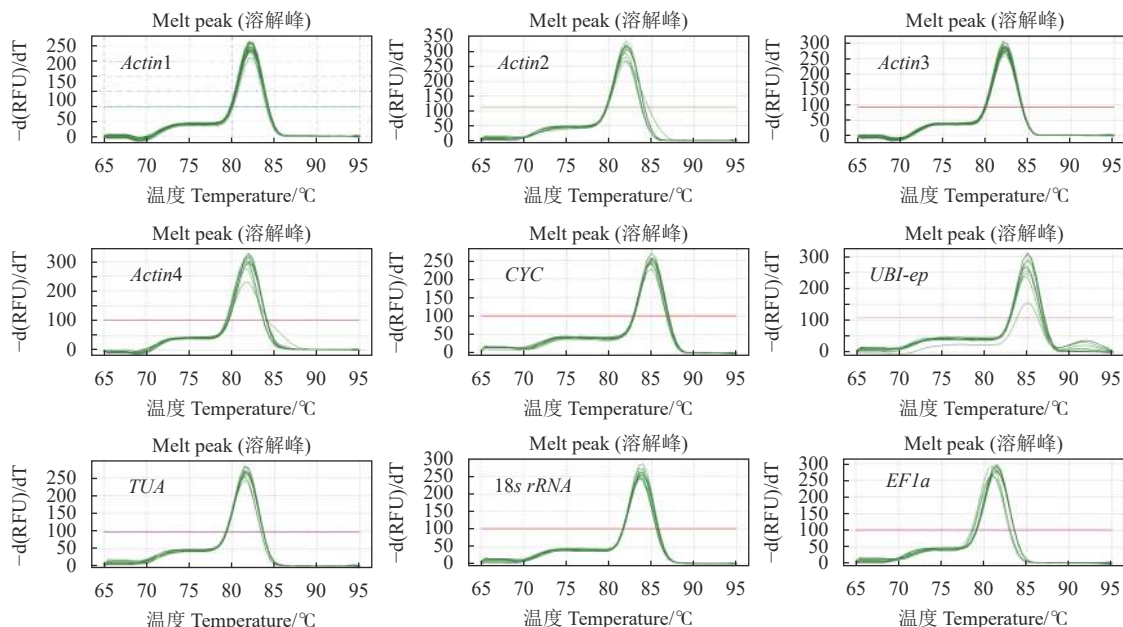


图 2 9 个候选内参基因的熔解曲线

Fig. 2 Melting curves for 9 candidate reference genes

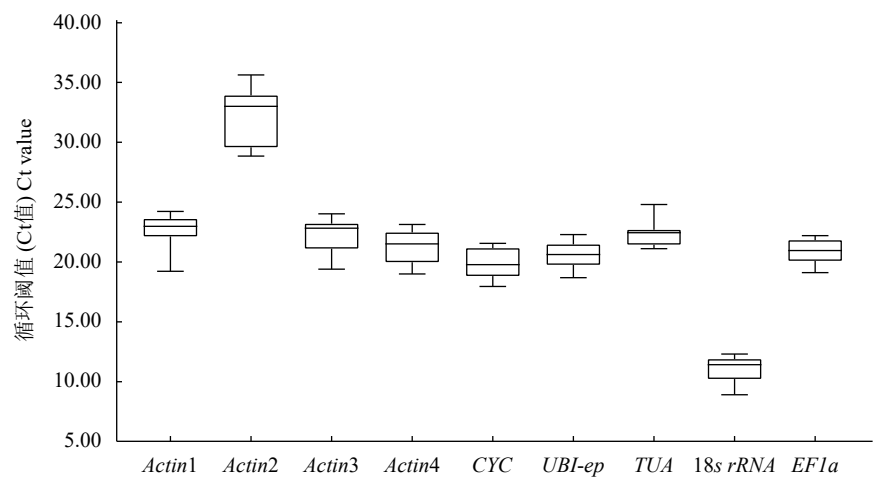
## 2.2 9 个候选参考基因表达稳定性分析

**2.2.1 9 个内参基因 Ct 值分析** 采用荧光定量 PCR 仪对 9 个候选内参基因进行扩增, 由图 3 可看出, 9 个候选内参基因的 Ct 值分布于  $9.02\sim 35.63$ , 其中 *18s rRNA* Ct 值最小, 表明其在样品中的转录水平最高; *Actin2* 分布范围最广, 且 Ct 值最大, 丰度低, 最大 Ct 值与最小 Ct 值相差 6.36; *EF1a* 分布范围最小, Ct 值相差 3.09; 其他内参基因 Ct 值的相差分布于  $3.40\sim 4.99$ 。

**2.2.2 Best-Keeper 稳定性分析** 使用 Best-Keeper 软件分析结果如表 2 所示, 在甜瓜不同组织器官中表达最稳定的前 5 个基因依次为 *CYC* > *18s rRNA* > *UBI-ep* > *EF1a* > *TUA*。CYC 在不同组织器官中表达最稳定, 其 SD 值 (标准差, Standard deviation) 为 0.57;

*Actin1*、*Actin2*、*Actin3* 和 *Actin4* 的 SD 值均超过 1, 表明 4 个内参基因在不同组织器官中表达稳定性较低。在不同胁迫处理中表达最稳定的前 5 个基因依次为 *18s rRNA* > *Actin3* > *Actin4* > *EF1a* > *UBI-ep*。*18s rRNA* 在不同胁迫处理中表达最稳定, 其 SD 值为 0.22; *Actin2* 的 SD 值为 1.86, SD 值超过 1, 说明 *Actin2* 在不同胁迫处理中的稳定性较差。

**2.2.3 Norm Finder 及 ge Norm 稳定性分析** 在 Norm Finder 软件分析结果 (表 3) 中, 在不同组织器官中表达最稳定的前 5 个基因依次为 *EF1a* > *UBI-ep* > *Actin4* > *CYC* > *Actin3*。*EF1a* 在不同组织器官中表达最稳定, M 值 (稳定值, Stability value) 为 0.107; *Actin2* 表达最不稳定, M 值为 0.423。在不同胁迫处理中表达最稳定的前 5 个基因依次为 *EF1a* > *UBI-ep* > *Actin4* >



注：箱线图箱体代表 Ct 值主要集中范围；上边表示上四分线；中线表示中位数；下边表示下四分线；上边缘表示本组数据最大值；下边缘表示本组数据最小值。

Note: Box: range of concentrated Ct values; top line: upper quarter line; middle line: median value; bottom line: lower quarter line; top edge: maximum value of group; bottom edge: minimum of group.

图 3 9 个候选内参基因 Ct 值箱线图

Fig. 3 Box plot of Ct values of 9 reference genes

表 2 Best-Keeper 软件分析 9 个候选内参基因稳定性

Table 2 Stabilities of 9 reference genes analyzed by BestKeeper software

| 样品分组<br>Sample group                  | 基因<br>Gene | 几何平均值<br>Geometric<br>mean value | 最大值<br>Max | 最小值<br>Mix | 标准差<br>Stardand<br>deviaton (SD) | 变异差<br>Coefficient<br>ofvariation (CV) | 稳定性排名<br>Ranking of<br>stable value |
|---------------------------------------|------------|----------------------------------|------------|------------|----------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| 不同组织器官<br>Different tissues           | CYC        | 20.88                            | 21.55      | 19.72      | 0.57                             | 2.72                                   | 1                                   |
|                                       | 18s rRNA   | 10.21                            | 11.46      | 8.90       | 0.77                             | 7.55                                   | 2                                   |
|                                       | UBI-ep     | 20.12                            | 22.10      | 18.69      | 0.94                             | 4.67                                   | 3                                   |
|                                       | EF1a       | 20.42                            | 22.03      | 19.11      | 0.95                             | 4.65                                   | 4                                   |
|                                       | TUA        | 22.69                            | 24.80      | 21.10      | 0.98                             | 4.31                                   | 5                                   |
|                                       | Actin1     | 21.92                            | 23.98      | 19.23      | 1.37                             | 6.21                                   | 6                                   |
|                                       | Actin4     | 20.63                            | 23.14      | 18.99      | 1.38                             | 6.65                                   | 7                                   |
|                                       | Actin3     | 21.61                            | 24.03      | 19.39      | 1.50                             | 6.92                                   | 8                                   |
|                                       | Actin2     | 31.38                            | 33.95      | 29.40      | 1.86                             | 5.92                                   | 9                                   |
| 不同胁迫处理<br>Different stress conditions | 18s rRNA   | 11.82                            | 12.31      | 11.16      | 0.22                             | 1.86                                   | 1                                   |
|                                       | Actin3     | 22.85                            | 23.30      | 21.54      | 0.37                             | 1.62                                   | 2                                   |
|                                       | Actin4     | 21.85                            | 22.77      | 21.23      | 0.43                             | 1.97                                   | 3                                   |
|                                       | EF1a       | 21.24                            | 22.20      | 20.36      | 0.46                             | 2.18                                   | 4                                   |
|                                       | UBI-ep     | 21.38                            | 22.29      | 20.49      | 0.46                             | 2.14                                   | 5                                   |
|                                       | Actin1     | 23.20                            | 24.22      | 22.28      | 0.54                             | 2.35                                   | 6                                   |
|                                       | CYC        | 18.87                            | 19.89      | 17.95      | 0.59                             | 3.44                                   | 7                                   |
|                                       | TUA        | 22.05                            | 23.35      | 21.27      | 0.60                             | 2.71                                   | 8                                   |
|                                       | Actin2     | 36.68                            | 35.63      | 28.84      | 1.86                             | 5.67                                   | 9                                   |

CYC> 18s rRNA, EF1a 在不同胁迫处理中表达最为稳定，M 值为 0.023；Actin2 表达最不稳定，M 值为 0.264。

使用 ge Norm 分析结果如表 3 所示，在不同组织

表 3 Norm Finder 和 ge Norm 软件分析候 9 个选内参基因稳定性  
Table 3 Stabilities of 9 reference genes analyzed by NormFinder and geNorm software

| 样品分组<br>Sample group                  | Norm Finder     |                        |                                  | ge Norm         |                        |                                  |
|---------------------------------------|-----------------|------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------|----------------------------------|
|                                       | 基因<br>Gene      | 稳定值<br>Stability value | 稳定性排名<br>Ranking of stable value | 基因<br>Gene      | 稳定值<br>Stability value | 稳定性排名<br>Ranking of stable value |
| 不同组织器官<br>Different tissues           | <i>EF1a</i>     | 0.107                  | 1                                | <i>Actin4</i>   | 0.526                  | 1                                |
|                                       | <i>UBI-ep</i>   | 0.153                  | 2                                | <i>Actin3</i>   | 0.526                  | 2                                |
|                                       | <i>Actin4</i>   | 0.228                  | 3                                | <i>Actin1</i>   | 0.640                  | 3                                |
|                                       | <i>CYC</i>      | 0.243                  | 4                                | <i>EF1a</i>     | 0.794                  | 4                                |
|                                       | <i>Actin3</i>   | 0.291                  | 5                                | <i>UBI-ep</i>   | 0.894                  | 5                                |
|                                       | <i>18s rRNA</i> | 0.315                  | 6                                | <i>18s rRNA</i> | 0.961                  | 6                                |
|                                       | <i>Actin1</i>   | 0.319                  | 7                                | <i>CYC</i>      | 1.101                  | 7                                |
|                                       | <i>TUA</i>      | 0.345                  | 8                                | <i>TUA</i>      | 1.318                  | 8                                |
|                                       | <i>Actin2</i>   | 0.423                  | 9                                | <i>Actin2</i>   | 1.462                  | 9                                |
| 不同胁迫处理<br>Different stress conditions | <i>EF1a</i>     | 0.023                  | 1                                | <i>EF1a</i>     | 0.138                  | 1                                |
|                                       | <i>UBI-ep</i>   | 0.053                  | 2                                | <i>UBI-ep</i>   | 0.138                  | 2                                |
|                                       | <i>Actin4</i>   | 0.059                  | 3                                | <i>Actin4</i>   | 0.145                  | 3                                |
|                                       | <i>CYC</i>      | 0.078                  | 4                                | <i>CYC</i>      | 0.207                  | 4                                |
|                                       | <i>18s rRNA</i> | 0.128                  | 5                                | <i>TUA</i>      | 0.242                  | 5                                |
|                                       | <i>TUA</i>      | 0.128                  | 6                                | <i>18s rRNA</i> | 0.321                  | 6                                |
|                                       | <i>Actin1</i>   | 0.214                  | 7                                | <i>Actin1</i>   | 0.373                  | 7                                |
|                                       | <i>Actin3</i>   | 0.236                  | 8                                | <i>Actin3</i>   | 0.445                  | 8                                |
|                                       | <i>Actin2</i>   | 0.264                  | 9                                | <i>Actin2</i>   | 0.781                  | 9                                |

器官中稳定值前 5 名的依次为 *Actin4*=*Actin3*>*Actin1*>*EF1a*>*UBI-ep*。*Actin4* 和 *Actin3* 的 M 值均为 0.526。*CYC*、*TUA* 和 *Actin2* 的 M 值大于 1，这 3 个基因在不同组织器官中表达不稳定。不同胁迫处理中表达最稳定的依次为 *EF1a*=*UBI-ep*>*Actin4*>*CYC*>*Actin1*，*EF1a* 和 *UBI-ep* 的 M 值为 0.138。最不稳定的基因是 *Actin2*，M 值为 0.781。

2.2.4 候选内参基因组合分析 基于 ge Norm 软件 V 值（配对变异值，Pairwise variation value）可计算出最适内参基因组合的数量（图 4）。在甜瓜不同组织器官中 V4/5=0.148，V 值小于 0.15，最佳基因组合数目为 4 个，*Actin4*、*Actin3*、*Actin1* 和 *EF1a* 可作为最佳内参基因组合。在不同胁迫处理中的 V2/3=0.043，小于 0.15，最佳基因组合数目为 2，*EF1a* 和

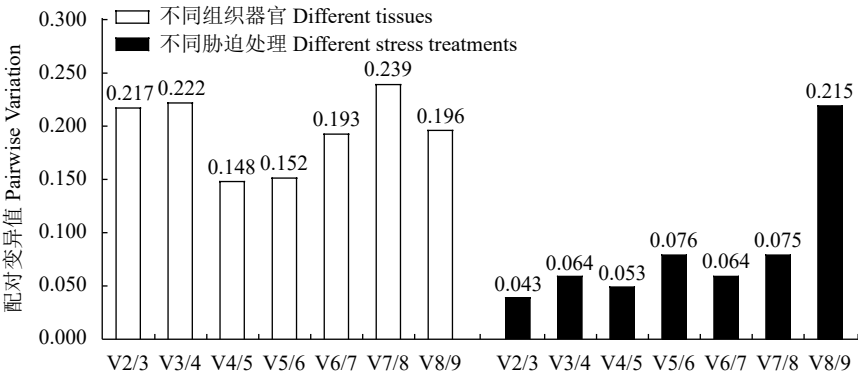


图 4 9 个候选内参基因的配对数变异指数  
Fig. 4 Calculated pairwise variations (V) of 9 candidate reference genes

*UBI-ep* 可作为最佳内参基因组合。

2.2.5 候选内参基因表达稳定性综合排名 3 款软件算法不同导致候选内参基因排名有所不同，可通过几何平均值来综合评估内参基因的稳定性。根据 3 款软件分析结果，确定了 9 个候选内参基因的综合排名（表 4）。不同器官组织测试中排名前三的内参基因依次是 *EF1a*>*Actin4*>*CYC*，ge Norm 软件计算出

的最佳基因组合为 *Actin4*、*Actin3*、*Actin1* 和 *EF1a*。不同胁迫处理中排名前 3 的基因依次为 *EF1a*>*UBI-ep*>*Actin4*，ge Norm 软件评估 *EF1a* 和 *UBI-ep* 稳定性优于其他基因，为最佳组合基因。总体而言 *EF1a* 在甜瓜不同组织器官和不同胁迫处理中均能稳定表达，可作为甜瓜 RT-qPCR 分析首选内参基因。

表 4 9 个选内参基因稳定性综合排名  
Table 4 Overall ranking on expression stabilities of 9 reference genes

| 样品分组<br>Sample group                  | 基因<br>Gene      | Best-Keeper | Norm-Finder | ge Norm | 几何平均值<br>Geometric mean value | 综合排名<br>Comprehensive rankings |
|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|---------|-------------------------------|--------------------------------|
| 不同组织器官<br>Different tissues           | <i>EF1a</i>     | 4           | 1           | 4       | 2.520                         | 1                              |
|                                       | <i>Actin4</i>   | 7           | 3           | 1       | 2.759                         | 2                              |
|                                       | <i>CYC</i>      | 1           | 4           | 7       | 3.037                         | 3                              |
|                                       | <i>UBI-ep</i>   | 3           | 2           | 5       | 3.107                         | 4                              |
|                                       | <i>18s rRNA</i> | 2           | 6           | 6       | 4.160                         | 5                              |
|                                       | <i>Actin3</i>   | 8           | 5           | 2       | 4.309                         | 6                              |
|                                       | <i>Actin1</i>   | 6           | 7           | 3       | 5.013                         | 7                              |
|                                       | <i>TUA</i>      | 5           | 8           | 8       | 6.840                         | 8                              |
|                                       | <i>Actin2</i>   | 9           | 9           | 9       | 9.000                         | 9                              |
| 不同胁迫处理<br>Different stress conditions | <i>EF1a</i>     | 4           | 1           | 1       | 1.587                         | 1                              |
|                                       | <i>UBI-ep</i>   | 5           | 2           | 2       | 2.714                         | 2                              |
|                                       | <i>Actin4</i>   | 3           | 3           | 3       | 3.000                         | 3                              |
|                                       | <i>18s rRNA</i> | 1           | 5           | 6       | 3.107                         | 4                              |
|                                       | <i>CYC</i>      | 7           | 4           | 4       | 4.820                         | 5                              |
|                                       | <i>Actin3</i>   | 2           | 8           | 8       | 5.040                         | 6                              |
|                                       | <i>TUA</i>      | 8           | 6           | 5       | 6.214                         | 7                              |
|                                       | <i>Actin1</i>   | 6           | 7           | 7       | 6.649                         | 8                              |
|                                       | <i>Actin2</i>   | 9           | 9           | 9       | 9.000                         | 9                              |

3 讨论与结论

多数研究把传统管家基因直接作为内参基因，常见的如 *Actin*（肌动蛋白基因）、*EF1a*（转录延伸因子）、*18s rRNA*（18s 核糖体 RNA）等<sup>[17]</sup>。但内参基因的表达会因为植物不同器官组织和不同外界条件而产生差异性，在对人参<sup>[18]</sup>（*Panax ginseng* C.A. Meyer）、蒲公英<sup>[19]</sup>（*Taraxacum officinale* F.H.Wigg.）、核桃<sup>[20]</sup>（*Juglans reiga* L.）和马铃薯<sup>[3]</sup>（*Solanum tuberosum* L.）等的相关研究中均证实了这一问题，进行相关分析前筛选出合适内参基因无疑是必要的。Best-Keeper、Norm Finder 和 ge Norm 是公认的内参基因筛选软件。Best-Keeper 分析流程简便，但

分析数量仅限 3~10 个<sup>[14]</sup>。Norm Finder 可处理组内及组间差异，但无法消除样品间误差，且每次只能给出一个最适基因，无法确定最佳内参基因组合<sup>[16]</sup>。ge Norm 与 Norm Finder 类似，优点在于可计算最佳组合，但给出的基因组合具有相似表达谱<sup>[20]</sup>。为了筛选在甜瓜不同组织及胁迫均能稳定表达的内参基因，本研究采取 3 款评测软件同时对候选内参基因进行分析，并结合 Excel 进行综合评估，结果更具有可靠性。

本研究发现 9 个候选内参基因在不同部位及不同胁迫处理条件下稳定性不同。其中 *EF1a* 在甜瓜盐碱胁迫、ABA 处理及叶片中表达最稳定，*EF1a* 是不同甜瓜组织及胁迫处理中表达最稳定的内参基因，

这与 *EF1a* 在夜香树<sup>[21]</sup> (*Cestrum nocturnum* L.) 和羊草<sup>[22]</sup> (*Leymus chinensis* Tzvel.) 中的鉴定结果类似。*Actin2* 是 3 款软件分析共同认为表达最不稳定的内参基因, 这可能与样品种类、组织及不同胁迫有关, 在蒙古冰草<sup>[23]</sup> (*Agropyron mongolicum* Keng.) 的干旱胁迫和剑麻 (*Agave sisalana* Perr.) 的水杨酸处理<sup>[24]</sup> 的研究中同样发现 *Actin2* 的稳定性低, 不适合选为内参基因。在试验中引入 2 个或 2 个以上内参基因可降低实验误差<sup>[25]</sup>。基于 ge Norm 分析发现针对甜瓜不同组织器官而言最佳内参基因组合数目是 4 个, 同时使用 *Actin4*、*Actin3*、*Actin1* 和 *EF1a* 为内参基因组合来分析目的基因在不同组织器官中的表达可提高试验准确性; 但这样可能会使试验设计较为复杂, 操作流程繁琐, 具体分析时应适当加以选择, 缩减数量。对不同胁迫而言可采用 *EF1a* 和 *UBI-ep* 作为组合, 可使结果更加准确和稳定, 也不会产生较多试验设计冗余。

本研究综合利用 Best-Keeper、Norm Finder 和 ge Norm 软件对甜瓜内参基因进行评估及筛选, 3 款软件分析结果存在一定差异, 这与在蒲公英<sup>[19]</sup>、核桃<sup>[20]</sup>、黄山栎树<sup>[5]</sup> 和刺葡萄<sup>[13]</sup> 等研究中的情况类似, 3 款软件算法不同可能是导致这一问题的主要原因<sup>[26]</sup>。综上所述, 在甜瓜不同组织器官的基因定量分析中可选 *EF1a* 为内参基因, *Actin4*、*Actin3*、*Actin1* 和 *EF1a* 为内参基因组合; 在不同胁迫处理研究中推荐使用 *EF1a* 为内参基因, *EF1a* 和 *UBI-ep* 可作为内参基因组合。

## 参考文献:

- [1] GINZINGER D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream [J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30 (6): 503–512.
- [2] ZHANG Z Z, FAN J R, WU J H, et al. Alleviating effect of silicon on melon seed germination under autotoxicity stress [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 188: 109901.
- [3] 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]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (6): 509–515.
- [4] 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 Biology*, 2002, 3 (7): 1–12.
- [5] TANG X, ZHANG N, SI H J, et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress [J]. *Plant Methods*, 2017, 13: 85.
- [6] LUO H L, LUO L P, GUAN B C, et al. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR in lily (*Lilium brownii*) [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2014, 89 (3): 345–351.
- [7] 吕运舟, 董筱昀, 黄利斌. 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.
- LÜ Y Z, DONG X Y, HUANG L B. The screening of reference genes for real-time fluorescent quantitative PCR of *Koeleria bipinnata* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17 (2): 553–560. (in Chinese)
- [8] 任锐, 戴鹏辉, 李萌, 等. 珙桐实时定量PCR内参基因的筛选及稳定性评价 [J]. *植物生理学报*, 2016, 52 (10): 1565–1575.
- REN R, DAI P H, LI M, et al. Selection and stability evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR in dove tree (*Davidia involucrata*) [J]. *Plant Physiology Communications*, 2016, 52 (10): 1565–1575. (in Chinese)
- [9] GOPALAM R, RUPWATE S D, TUMANAY A W. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Salvia hispanica* [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (11): e0186978.
- [10] 蒋婷婷, 高燕会, 童再康. 石蒜属植物实时荧光定量PCR内参基因的选择 [J]. *园艺学报*, 2015, 42 (6): 1129–1138.
- JIANG T T, GAO Y H, TONG Z K. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42 (6): 1129–1138. (in Chinese)
- [11] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量PCR分析中内参基因的选择 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20 (5): 521–528.
- WANG Y J, DONG L, ZHANG C, et al. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* andr.) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20 (5): 521–528. (in Chinese)
- [12] FAUSTO A K S, SILVA T D F, ROMANEL E, et al. microRNAs as reference genes for quantitative PCR in cotton [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (4): e0174722.
- [13] 潘红, 赖呈纯, 张静, 等. 不同光质条件下刺葡萄红色愈伤组织的 RT-qPCR内参基因筛选 [J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25 (6): 1407–1413.
- PAN H, LAI C C, ZHANG J, et al. Selection of reference genes for RT-qPCR from the red callus of *Vitis davidii* (Rom. Caill.) Fo(ë)x under different light qualities [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2019, 25 (6): 1407–1413. (in Chinese)
- [14] GONZÁLEZ-VERDEJO C I, DIE J V, NADAL S, et al. Selection of housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR: Analysis of Or-MYB1 gene expression in *Orobancha ramosa* development [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 379 (2): 176–181.
- [15] 史长青. 甜瓜生长发育和胁迫条件下实时荧光定量PCR内参基因的筛选 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- SHI X Q. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time RT-PCR studies in *Cucumis melo* under growth and development process, biotic and abiotic stresses [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016. (in Chinese).
- [16] 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 Research*, 2004, 64 (15): 5245–5250.
- [17] SUDHAKAR REDDY P, SRINIVAS REDDY D, SIVASAKTHI K, et al. Evaluation of *Sorghum* [*Sorghum bicolor* (L.)] reference genes in various tissues and under abiotic stress conditions for quantitative real-time PCR data normalization [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 529.
- [18] LI L, WANG K Y, ZHAO M Z, et al. Selection and validation of reference genes desirable for gene expression analysis by qRT-PCR in MeJA-treated ginseng hairy roots [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (12): e0226168.
- [19] 乔永刚, 王勇飞, 曹亚萍, 等. 药用蒲公英低温和高温胁迫下内参基因筛选与相关基因表达分析 [J]. 园艺学报, 2020, 47 (6): 1153–1164.
- QIAO Y G, WANG Y F, CAO Y P, et al. Reference genes selection and related genes expression analysis under low and high temperature stress in *Taraxacum officinale* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47 (6): 1153–1164. (in Chinese)
- [20] 宋晓波, 常英英, 刘昊, 等. 核桃不定根发生阶段内参基因筛选与关键基因表达分析 [J]. 园艺学报, 2019, 46 (10): 1907–1918.
- SONG X B, CHANG Y Y, LIU H, et al. Reference gene selection and genes expression analysis during adventitious root formation in walnut [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46 (10): 1907–1918. (in Chinese)
- [21] 刘涛, 熊青, 许颖妍, 等. 夜香树花期荧光定量PCR内参基因的筛选 [J]. 植物科学学报, 2017, 35 (4): 534–542.
- LIU T, XIONG Q, XU Y Y, et al. Selection of reference genes for qRT-PCR normalization in *Cestrum nocturnum* during flowering [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35 (4): 534–542. (in Chinese)
- [22] 胡宁宁, 郭慧琴, 李西良, 等. 羊草不同组织实时定量PCR 内参基因的筛选 [J]. 草业科学, 2017, 34 (7): 1434–1441.
- HU N N, GUO H Q, LI X L, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR of *Leymus chinensis* in different tissues [J]. *Pratacultural Science*, 2017, 34 (7): 1434–1441. (in Chinese)
- [23] 黄文华. 蒙古冰草干旱胁迫下内参基因的筛选及P5CS基因定量表达分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- HUANG W H. Selection of control gene in quantitative PCR and analysis of differential expression of P5CS gene in *Agropyron mongolicum* Keng under drought stress [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014. (in Chinese).
- [24] 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.
- ZHANG Y M, WANG R F, YANG Z P, et al. Screening of suitable reference genes for qRT-PCR normalization in sisal [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40 (11): 2166–2173. (in Chinese)
- [25] XIAO Z, SUN X B, LIU X Q, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. don [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1547.
- [26] HU R, QI G, KONG Y, et al. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10 (1): 145–158.

(责任编辑: 张梅)