

## 多重胁迫下玉米实时定量PCR内参基因的筛选与验证

姜婷, 苏乔\*, 安利佳

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024

**摘要:** 实时定量PCR (qPCR)技术广泛应用于基因表达量的检测, 为了保证其结果的准确性, 选择合适的内参基因是必不可少的环节。本研究分析了11个玉米候选内参基因的稳定性, 其中7个是常用内参基因(*GAPDH*、*ACT*、*EF-1 $\alpha$* 、 *$\gamma$ -TUB*、*18S rRNA*、*5S rRNA*和*U6 snRNA*), 4个是microRNA (*zma-miR171a*、*zma-miR171b*、*zma-miR172*和*zma-miR159a/b*)。通过计算11个基因在正常生长条件与干旱、盐和碱共胁迫条件下的循环阈值( $C_t$ ), 输入软件geNorm、NormFinder和BestKeeper中进行分析。结果表明, microRNA比其他候选内参基因稳定, 其中*zma-miR172*和*zma-miR171a*最稳定, *18S rRNA*最不稳定。另外, 选择*zma-miR397a*及其靶基因*LAC4*对候选内参基因进行验证, 发现不合适的内参基因可能会导致错误的结果。

**关键词:** 玉米; 内参基因; 实时定量PCR; 干旱胁迫; 盐胁迫; 碱胁迫

## Screening and Validation of Reference Genes of qPCR in Maize under Multiple Stresses

JIANG Ting, SU Qiao\*, AN Li-Jia

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

**Abstract:** qPCR is a powerful and widely used technique for the measurement of different gene expression levels. However, it is crucial to choose a suitable gene as an internal control for the proper analysis. In the present study, we analyzed the expression patterns of 11 genes which include seven common reference genes (*GAPDH*, *ACT*, *EF-1 $\alpha$* ,  *$\gamma$ -TUB*, *18S rRNA*, *5S rRNA* and *U6 snRNA*) and four microRNAs (*zma-miR171a*, *zma-miR171b*, *zma-miR172* and *zma-miR159a/b*) in maize (*Zea mays*) samples. Expression level of these genes was observed from two experimental conditions i.e. normal growth condition and co-stress of drought, salt and alkali. The threshold cycle ( $C_t$ ) values of each sample were analyzed using geNorm, NormFinder and BestKeeper. In this study, the expression of microRNAs was found to be more stable than other reference genes. The results revealed that *zma-miR172* and *zma-miR171a* were highly stable compared to other reference genes while *18S rRNA* was the most unstable one in both experimental conditions. The expression levels of *zma-miR397a* and its target gene *LAC4* (*laccase 4*) were used to confirm the effect of candidate reference genes, showing that the use of an inappropriate reference gene could induce erroneous results.

**Key words:** *Zea mays*; reference genes; qPCR; drought stress; salt stress; alkali stress

实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR), 是指在PCR反应体系中加入荧光基团的技术, 它具有特异性强、灵敏度高、重现性好以及可以在较宽范围内定量等特点(吴文凯等2009; Kulcheski等2010), 因此被广泛应用于基因功能的研究。在qPCR技术,  $C_t$ 值(threshold cycle)表示每个反应的荧光信号达到阈值时所经历的循环数,  $C_t$ 值的大小与起始模板中目的基因的拷贝数有关, 拷贝数越高,  $C_t$ 值越小。在基因功能的相关研究中, qPCR技术常用于比较分析基因在不同处理、组织或生长阶段的表达量。而导致基因表达量变化的原因主要包括以下两个方面: 第一, 由实验处理本

身引起的特异性变化; 第二, 由实验误差引入的非特异性变化, 例如初始RNA模板的质量和数量、cDNA合成的效率以及移液操作过程的精确性等(Vandesompele等2002)。为保证qPCR所获数据的准确性和可靠性, 尽可能避免非特异性变化, 需要选择合适的内参基因校正上样量和操作过程中的误差(樊连梅等2014)。

合适的内参基因应具备两个条件, 即在所有

收稿 2015-03-12 修定 2015-09-08

资助 辽宁省科学技术计划项目(2011208001)。

\* 通讯作者(E-mail: dsuqiao@dlut.edu.cn; Tel: 13940903690)。

样本中保持恒定的表达量,不随实验条件的改变而改变。目前,在研究中广泛使用的内参基因大多是一些管家基因,如甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、肌动蛋白(actin, ACT)、延伸因子(elongation factor 1-alpha, EF-1 $\alpha$ )和微管蛋白(tubulin, TUB)的基因等。这些管家基因在所有细胞中均表达,并且是维持细胞基本生命活动所必需的(张玉芳等2014; Nicot等2005)。但在最近的研究中发现,某些管家基因的表达量存在显著的变化(Czechowski等2005; Nicot等2005; Gutierrez等2008)。因此,挖掘新的或更稳定的内参基因很有必要。另外,在进行实验之前,会经常忽视对内参基因进行评估和验证(Bustin等2009)。目前,常用的内参基因评估方法是基于qPCR的C<sub>t</sub>值进行软件的综合分析。采用的软件有geNorm、NormFinder和BestKeeper,它们被广泛应用于植物和动物内参基因的研究中(Chen等2012; Manoli等2012)。

玉米广泛种植于世界各地,是一种重要的谷类作物。它的生长和产量会受到多种非生物胁迫的影响(Jiao等2011),其中干旱、盐和碱胁迫较为常见。目前的研究主要集中在单一非生物胁迫对玉米的生长发育、生理生化和基因表达等方面的影响,而对多种胁迫共同作用的研究较少。这可能是由于多种胁迫共同作用是一种非常复杂的生理过程,但是这种作用方式更接近于自然条件。在自然环境中,植物遭受干旱胁迫时,往往伴随着盐和碱胁迫的出现(Frazier等2011; Gong等2014),并且它们存在某些共同的生理变化机制。

在玉米基因表达量的研究中,常以18S rRNA和 $\gamma$ -TUB作为内参基因;而研究microRNA的表达量时,U6 small nuclear RNA (U6 snRNA)和5S rRNA常作为内参基因,有少数研究以zma-miR172作为内参基因(Ding等2009; Wei等2014)。目前,已有一些关于玉米内参基因稳定性分析的报道:Chen等(2012)评价了8个常用内参基因在玉米种子萌发过程中的稳定性;Manoli等(2012)分析了12个内参基因在20个不同处理的玉米组织中的稳定性;Lin等(2014)分析了10个玉米内参基因在不同胁迫和激素处理下的稳定性。在这些研究中,所选取的内参基因均为蛋白质编码基因或rRNA,而最近的研究表明microRNA也可以作为内参基因,有的甚至

比常用内参基因更稳定(Kulcheski等2010)。因此,本研究分析了11个候选内参基因在正常生长及干旱、盐和碱胁迫条件下的稳定性,其中7个为玉米常用内参基因:GAPDH、ACT、EF-1 $\alpha$ 、 $\gamma$ -TUB、18S rRNA、5S rRNA和U6 snRNA (Kulcheski等2010; Chen等2012; Manoli等2012),另外4个是玉米microRNA:zma-miR171a、zma-miR171b、zma-miR172和zma-miR159a/b,它们在其他植物中被广泛评价是稳定的内参基因(Kulcheski等2010; Feng等2012; Lin和Lai 2013; Borowski等2014; Luo等2014)。

## 材料与方法

### 1 植物材料及处理

2014年3~6月,在大连市农业科学研究所的温室内,将玉米(*Zea mays* L.)自交系‘郑58’种子用0.1% NaClO消毒15 min,再用无菌水清洗3遍。将消毒后的种子种在装有等量混合土(原土:丹麦品氏托普泥炭=1:1)的花盆(口×底×高=19 cm×14 cm×17 cm)中。培养条件为:光周期16h/8h(昼/夜),温度27℃/23℃(昼/夜),湿度60%~70%。待玉米幼苗长到三叶一心期时,将玉米材料分为2组:(1)进行干旱、盐和碱胁迫,首先浇灌600 mL的NaCl (100 mmol·L<sup>-1</sup>)和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mmol·L<sup>-1</sup>)混合溶液,之后不再浇灌其他溶液,自然干旱;(2)对照为正常生长的材料,首先浇灌600 mL水,之后每隔4 d浇灌200 mL水,保持正常的水分供应。待处理组玉米材料的叶片相对含水量(leaf relative water content, LRWC) (Marulanda等2010)和土壤相对含水量(soil relative water content, SRWC) (Xu和Zhou 2006)分别达到轻度干旱(80%≤LRWC<90%; 40%≤SRWC<50%, 10 d)、中度干旱(70%≤LRWC<80%; 30%≤SRWC<40%, 14 d)和重度干旱(60%≤LRWC<70%; 20%≤SRWC<30%, 18 d)时取样,3种处理及其对照(90%≤LRWC<100%; 50%≤SRWC<60%)均取5棵苗,分别收集经不同处理植物材料及对照的地上部分和地下部分,将每部分分别等量混样,用液氮速冻,之后冻存于-80℃冰箱中用于RNA的提取。

### 2 候选内参基因的选择和引物设计

11个候选内参基因的序列信息来自NCBI数据库和miRBase 21,用Primer 3设计引物(表1),由上海英俊生物技术有限公司合成引物,纯度级别为PAGE。

表1 候选内参基因和目的基因的引物序列及扩增特点

Table 1 Primer sequences and amplicon characteristics of candidate reference genes and target genes

基因(登录号)	引物序列(5'→3')	$T_m/^\circ\text{C}$	片段大小/bp	扩增效率/%	$r^2$
<i>GAPDH</i> (X07156.1)	F: CCATCACTGCCACACAGAAAAC R: AGGAACACGGAAGGACATACCAG	86.20	170	95.0	0.994
<i>ACT</i> (J01238.1)	F: CAACAGAGAGAAAATGACGCAGA R: CACCTGAATCCATCACAATACCA	81.86	128	93.0	0.994
<i>EF-1<math>\alpha</math></i> (NM_001112117.1)	F: TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA R: ACATACCCACGCTTCAGATCCT	83.82	135	92.4	0.990
$\gamma$ - <i>TUB</i> (X83696.1)	F: AAACGACGGTATTGGATGTTATGAG R: CACCTCCCCTTGAATGATGTT	80.02	131	122.8	0.999
<i>18S rRNA</i> (AF168884.1)	F: CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT R: CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC	84.97	151	109.6	0.997
<i>U6 snRNA</i> (X52315.1)	F: GATGACACGCACAAATCGAGAAATG	78.92		95.6	0.995
<i>5S rRNA</i> (AF273104.1)	F: GATCCCATTCGACCTCGATATA	81.77		90.0	0.987
<i>zma-miR172</i>	F: AGAATCTTGATGATGCTGCA	77.93		92.6	0.999
<i>zma-miR171a</i>	F: TGATTGAGCCGCGCCAATAT	79.54		127.0	0.996
<i>zma-miR171b</i>	F: TTGAGCCGTGCCAATATCAC	78.77		108.5	0.994
<i>zma-miR159a/b</i>	F: TTTGGATTGAAGGAGCTCTG	78.54		94.9	0.989
<i>zma-miR397a</i>	F: TCATTGAGCGCAGCGTTGATG	80.80		123.0	0.989
<i>LAC4</i> (GRMZM2G164467)	F: TCTGCCAAAGACACGTACAA R: GTTGGCGACGGAGAAGAA	85.70	105	93.0	0.999

### 3 总RNA提取以及cDNA合成

采用Trizol法提取总RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, NanoDrop 2000c进行纯度检测以及浓度的定量。将地上部分和地下部分的RNA样品等量混匀。采用SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR Kit试剂盒(TaKaRa)对microRNA、5S rRNA和U6 snRNA进行反转录; 用PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)对其余5个基因进行反转录。

### 4 qPCR反应

以cDNA为模板, 分别以表1中各对引物进行qPCR反应, 反应在实时定量仪Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa)中进行。采用两步PCR法, 反应条件为: 95 °C 30 s预变性; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环。反应使用的试剂为SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)和SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR Kit (TaKaRa)。不同基因在进行qPCR时, 所用的模板cDNA量18S rRNA和5S rRNA分别为0.05和0.4 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ , 其余基因10 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ , 以保证荧光信号在稳定的范围内 $C_t$ 值在15~30。进行3次生物学重复和3次技术重复, 并设阴性对照。

## 实验结果

### 1 引物的扩增效率和特异性

经PCR反应后, 用4%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 出现大小与预期一致的单一条带; 经熔解曲线分析得到明显的单峰, 这两项分析均表明引物具有很好的特异性。采用标准曲线法对引物的扩增效率进行分析, 对模板进行5倍梯度的稀释, 共设6个梯度, 所有引物的相关系数(correlation coefficient,  $r^2$ )均在0.987~0.999, 引物的扩增效率均在90.0%~127.0% (表1)。由此可见, 本研究所用的引物均具有良好的特异性与扩增效率, 可以用于qPCR分析。

### 2 内参基因的 $C_t$ 值分析

对11个候选内参基因的所有生物学重复和技术重复得到的 $C_t$ 值进行分析, 整体变化范围在15~27, 其中18S rRNA的 $C_t$ 值最小, zma-miR171a的 $C_t$ 值最大。每个候选内参基因的 $C_t$ 值变化均小于3, 变化范围相对较小, 其中 $C_t$ 值变化较大的是zma-miR171b (2.68)和zma-miR159a/b (2.62), 变化较小的是GAPDH (0.92)和EF-1 $\alpha$  (1.02) (图1)。

### 3 geNorm软件分析

geNorm软件以平均变异度M值作为衡量内参基因稳定性的指标, M值越低, 表明稳定性越好



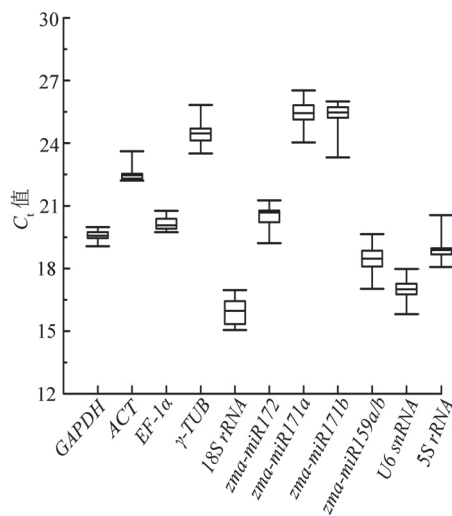


图1 候选内参基因 $C_t$ 值的箱形图

Fig.1 Box plot of the  $C_t$  values of the candidate reference genes

每个盒代表一个候选内参基因, 盒中的横线代表中位数, 盒的上下边分别代表上四分位数和下四分位数, 两端的盒须代表最大值与最小值。

(Chen等2012)。由图2可见, 11个玉米候选内参基因的 $M$ 值均小于上限1.5。相对稳定的候选内参基因在对照组中为zma-miR172、zma-miR171b和zma-miR171a (图2-A), 在处理组中为zma-miR171a、zma-miR171b和EF-1 $\alpha$  (图2-B), 在所有样本(对照和处理)中为zma-miR171a、zma-miR171b和zma-miR172 (图2-C), 而18S rRNA最不稳定。

geNorm软件可以通过配对变异分析 $V_n/V_{n+1}$ 来确定合适的内参基因数, 选择阈值为 $V < 0.15$ 。在本研究中, 配对变异分析的 $V$ 值均小于0.15 (图2-D), 表明选择2个内参基因进行分析即可。geNorm软件推荐的最佳候选内参基因组合是zma-miR171a和zma-miR171b。

#### 4 NormFinder软件分析

采用NormFinder软件进行分析时, 候选内参基因的稳定性与稳定值呈负相关(Andersen等2004)。因此, 相对稳定的内参基因在对照组中为GAPDH、5S rRNA和EF-1 $\alpha$ , 在处理组中为zma-miR172、zma-miR171a和U6 snRNA, 在所有样本中为GAPDH、zma-miR172和U6 snRNA (表2)。NormFinder和geNorm软件的分析结果有3个共同点: (1)在处理组中, zma-miR171a是相对稳定的候选内参基因之一; (2)在所有样本中, zma-miR172是相对稳定的候

选内参基因之一; (3) 18S rRNA在2个软件中均最不稳定。

#### 5 BestKeeper软件分析

BestKeeper软件依据每个样本的平均 $C_t$ 值进行分析(Pfaffl等2004), 该软件最多只能同时分析10个候选内参基因, 所以在进行分析之前去除了geNorm和NormFinder一致评价为最不稳定的18S rRNA。稳定的内参基因在BestKeeper中应具有较低的假定值( $P$ 值)、标准偏差(standard deviation,  $s$ )和变异系数(coefficient of variation,  $CV$ ), 以及高的相关系数(pearson correlation coefficient,  $r$ ) (Rueda-Martinez等2014; Zhou等2014)。结果显示, GAPDH、ACT、EF-1 $\alpha$ 、 $\gamma$ -TUB、zma-miR171b和5S rRNA的 $P$ 值大于0.01且 $r$ 值较低, zma-miR159a/b的 $s$ 和 $CV$ 较高, 所以以上这些基因不是相对稳定的内参基因。最终, BestKeeper选择的稳定内参基因是zma-miR172、zma-miR171a和U6 snRNA (表3)。

#### 6 内参基因验证

综合3个软件的分析结果显示, zma-miR172和zma-miR171a是相对稳定的候选内参基因组合, 18S rRNA最不稳定。为进一步验证结果的准确性, 以这3个候选基因作为内参, 分析zma-miR397a及其靶基因LAC4的相对表达量。结果表明, 当以zma-miR172和zma-miR171a作为内参联合分析时, zma-miR397a在共胁迫条件下显著下调表达( $P \leq 0.05$ ), 其靶基因LAC4显著上调表达( $P \leq 0.05$ ), 二者呈现明显的负相关。而以18S rRNA作为内参分析时, zma-miR397a虽然下调表达, 但差异不显著( $P \leq 0.05$ ), 而且其靶基因LAC4也下调表达(图3)。

## 讨 论

以microRNA作为候选内参基因进行分析最早应用在动物的研究中, 直到2010年才在植物中有相关的研究(Kulcheski等2010), 目前已报道的植物有大豆(*Glycine max*)、小麦(*Triticum aestivum*)、柑橘(*Citrus sinensis*)、龙眼(*Dimocarpus longan*)、桃(*Prunus persica*)和生菜等(Kulcheski等2010; Feng等2012; Kou等2012; Lin和Lai 2013; Borowski等2014; Luo等2014)。虽然在玉米中有候选内参基因稳定性的研究, 但目前没有以microRNA作为候选内参基因的报道。

本研究采用geNorm、NormFinder和Best-

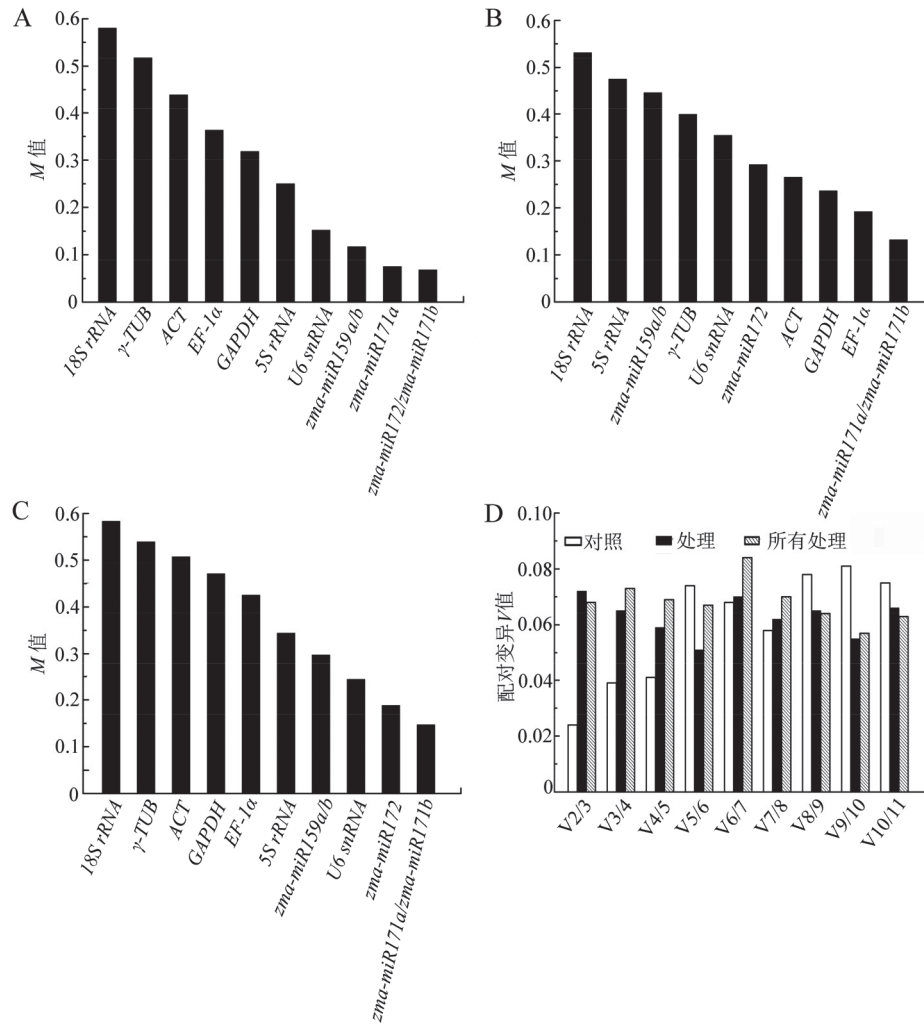


图2 geNorm软件分析候选内参基因的稳定性

Fig.2 The stability of candidate reference genes analyzed by geNorm software

A: 对照; B: 处理; C: 所有样本(对照和处理); D: 配对变异分析 $V_n/V_{n+1}$ 

表2 NormFinder软件分析候选内参基因的稳定性

Table 2 The stability of candidate reference genes analyzed by NormFinder software

排名	对照		处理		所有样本(对照和处理)	
	基因	稳定值	基因	稳定值	基因	稳定值
1	<i>GAPDH</i>	0.050	<i>zma-miR172</i>	0.076	<i>GAPDH</i>	0.099
2	<i>5S rRNA</i>	0.053	<i>zma-miR171a</i>	0.123	<i>zma-miR172</i>	0.105
3	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	0.112	<i>U6 snRNA</i>	0.151	<i>U6 snRNA</i>	0.107
4	<i>U6 snRNA</i>	0.219	$\gamma$ - <i>TUB</i>	0.220	<i>5S rRNA</i>	0.115
5	<i>zma-miR171a</i>	0.279	<i>zma-miR171b</i>	0.238	<i>zma-miR171a</i>	0.116
6	<i>zma-miR172</i>	0.286	<i>GAPDH</i>	0.292	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	0.125
7	<i>zma-miR171b</i>	0.335	<i>ACT</i>	0.310	<i>zma-miR171b</i>	0.165
8	<i>ACT</i>	0.348	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	0.322	<i>ACT</i>	0.190
9	<i>zma-miR159a/b</i>	0.402	<i>5S rRNA</i>	0.344	$\gamma$ - <i>TUB</i>	0.208
10	$\gamma$ - <i>TUB</i>	0.501	<i>zma-miR159a/b</i>	0.347	<i>zma-miR159a/b</i>	0.216
11	<i>18S rRNA</i>	0.564	<i>18S rRNA</i>	0.494	<i>18S rRNA</i>	0.306

表3 BestKeeper软件分析候选内参基因稳定性

Table 3 The stability of candidate reference genes analyzed by BestKeeper software

	<i>GAPDH</i>	<i>ACT</i>	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	$\gamma$ - <i>TUB</i>	<i>zma-miR171b</i>	<i>5S RNA</i>	<i>U6 snRNA</i>	<i>zma-miR171a</i>	<i>zma-miR172</i>	<i>zma-miR159a/b</i>
<i>P</i> 值	0.918	0.528	0.400	0.216	0.023	0.014	0.004	0.004	0.002	0.002
<i>r</i>	0.054	-0.326	0.427	0.592	0.874	0.902	0.951	0.974	0.966	0.965
<i>s</i>	0.100	0.130	0.170	0.420	0.400	0.450	0.430	0.410	0.460	0.590
<i>CV</i>	0.530	0.560	0.850	1.730	1.590	2.380	2.540	1.630	2.240	3.190

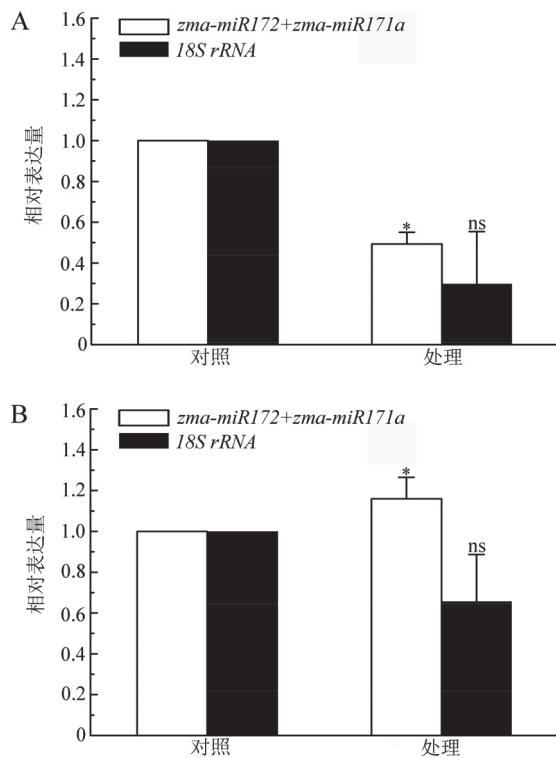


图3 *zma-miR397a* (A)及其靶基因*LAC4* (B)的表达水平  
Fig.3 The expression levels of *zma-miR397a* (A) and its target gene *LAC4* (B)

\*: 差异显著( $P \leq 0.05$ ); ns: 差异不显著。

Keeper软件,系统地对玉米的11个候选内参基因进行不同条件下的稳定性评估,结果表明microRNA要比其他候选内参基因表现得更稳定,这与大豆、桂圆和小麦等研究中的分析结果一致(Kulcheski等2010; Feng等2012; Lin和Lai 2013)。在3个软件的分析结果中,均发现*zma-miR172*是相对稳定的内参基因,这与Kong等(2010)和Borowski等(2014)的研究结果一致。Kong等(2010)发现在干旱和盐胁迫下,*zma-miR172*的表达没有显著变化。Borowski等(2014)采用geNorm和NormFinder软件分析生菜的内参基因,结果表明在干旱和盐胁迫

下*miR172*相对稳定,但在大豆和桃的研究中(Kulcheski等2010; Luo等2014),*miR172*在非生物胁迫下的稳定性排名居中。

geNorm和NormFinder软件分析结果均表明*18S rRNA*是最不稳定的内参基因,这与Manoli等(2012)对玉米内参基因的评估结果一致。另外,在西瓜(*Citrullus lanatus*)和白菜(*Brassica rapa*)的研究中,*18S rRNA*同样被评价为非生物胁迫下最不稳定的内参基因之一(Qi等2010; Kong等2014)。在生物体内,*18S rRNA*的表达丰度高,而其他基因的表达丰度低,表达丰度的不一致可能会影响qPCR结果的准确性(Manoli等2012)。

在棉花(*Gossypium hirsutum*)、杨树(*Populus cathayana*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的microRNA研究中,发现*miR397*对干旱和盐胁迫均有响应,并且与其靶基因*LAC*的表达呈现明显的负相关,符合microRNA的调控规律(Yin等2012; Zhou等2012; Sunkar和Zhu 2004)。在本课题组构建的玉米microRNA文库中,发现*zma-miR397a*在干旱、盐和碱共胁迫中显著下调表达,并且预测得到的靶基因是*LAC4*(数据未发表)。因此,选择*zma-miR397a*及其靶基因*LAC4*对内参基因评估结果进行验证。当采用*zma-miR172*和*zma-miR171a*作为内参进行分析时,*zma-miR397a*在共胁迫条件下显著下调表达,其靶基因*LAC4*显著上调表达,符合预期且与Wang等(2014)和Liang等(2006)的研究结果一致。Wang等(2014)发现*zma-miR397*在干旱胁迫下会显著下调表达;而Liang等(2006)发现玉米*LAC*的转录水平会随NaCl浓度的升高而增高。当以*18S rRNA*作为内参进行分析时,这两个基因的表达量均未有显著变化,说明不合适的内参基因可能会导致错误的分析结果。

综上所述,本研究采用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件分析了11个玉米候选内参基因

在不同条件下的稳定性,发现microRNA表现更稳定,而常用的*18S rRNA*最不稳定。

### 参考文献

- 樊连梅, 王超, 刘更森, 袁永兵(2014). 苹果着色期实时定量PCR内参基因的筛选和验证. 植物生理学报, 50 (12): 1903~1911
- 吴文凯, 刘成前, 周志刚, 卢山(2009). 用于莱茵衣藻荧光定量PCR分析的内参基因选择. 植物生理学报, 45 (7): 667~672
- 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲(2014). 基因表达研究中内参基因的选择与应用. 植物生理学报, 50 (8): 1119~1125
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (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
- Borowski JM, Galli V, Messias Rda S, Perin EC, Buss JH, dos Anjos e Silva SD, Rombaldi CV (2014). Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta*, 239 (6): 1187~1200
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL et al (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4): 611~622
- Chen K, Fessehaie A, Arora R (2012). Selection of reference genes for normalizing gene expression during seed priming and germination using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea*. *Plant Mol Biol Rep*, 30 (2): 478~487
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (1): 5~17
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Ann Bot*, 103 (1): 29~38
- Feng H, Huang X, Zhang Q, Wei G, Wang X, Kang Z (2012). Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant Physiol Biochem*, 51: 116~122
- Frazier TP, Sun G, Burklew CE, Zhang B (2011). Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Mol Biotechnol*, 49 (2): 159~165
- Gong B, Zhang C, Li X, Wen D, Wang S, Shi Q, Wang X (2014). Identification of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress responsive proteins in tomato roots using iTRAQ-based analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 446 (1): 417~422
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C 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 Biotechnol J*, 6 (6): 609~618
- Jiao Y, Song W, Zhang M, Lai J (2011). Identification of novel maize miRNAs by measuring the precision of precursor processing. *BMC Plant Biol*, 11: 141~154
- Kong Q, Yuan J, Gao L, Zhao S, Jiang W, Huang Y, Bie Z (2014). Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon. *PLoS ONE*, 9 (2): e90612
- Kong YM, Elling AA, Chen B, Deng XW (2010). Differential expression of microRNAs in maize inbred and hybrid lines during salt and drought stress. *Am J Plant Sci*, 1: 69~76
- Kou SJ, Wu XM, Liu Z, Liu YL, Xu Q, Guo WW (2012). Selection and validation of suitable reference genes for miRNA expression normalization by quantitative RT-PCR in citrus somatic embryogenic and adult tissues. *Plant Cell Rep*, 31 (12): 2151~2163
- Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R (2010). The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Anal Biochem*, 406 (2): 185~192
- Liang M, Haraldsen V, Cai X, Wu Y (2006). Expression of a putative laccase gene, *ZmLAC4*, in maize primary roots under stress. *Plant Cell Environ*, 29 (5): 746~753
- Lin Y, Zhang C, Lan H, Gao S, Liu H, Liu J, Cao M, Pan G, Rong T, Zhang S (2014). Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PLoS ONE*, 9 (5): e95445
- Lin YL, Lai ZX (2013). Evaluation of suitable reference genes for normalization of microRNA expression by real-time reverse transcription PCR analysis during longan somatic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem*, 66: 20~25
- Luo X, Shi T, Sun H, Song J, Ni Z, Gao Z (2014). Selection of suitable inner reference genes for normalization of microRNA expression response to abiotic stresses by RT-qPCR in leaves, flowers and young stems of peach. *Sci Hortic*, 165: 281~287
- Manoli A, Sturaro A, Trevisan S, Quaggiotti S, Nonis A (2012). Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *J Plant Physiol*, 169 (8): 807~815
- Marulanda A, Azeón R, Chaumont F, Ruiz-Lozano JM, Aroca R (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*, 232 (2): 533~543
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*, 56 (421): 2907~2914
- 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
- Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D (2010). Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep*, 28 (4): 597~604
- Rueda-Martínez C, Lamas O, Mataró MJ, Robledo-Carmona J, Sánchez-Espín G, Jiménez-Navarro M, Such-Martínez M, Fernández B (2014). Selection of reference genes for quantitative real time PCR (qPCR) assays in tissue from human ascending aorta. *PLoS ONE*, 9 (5): e97449

- Sunkar R, Zhu JK (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (8): 2001~2019
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): 1~12
- Wang YG, An M, Zhou SF, She YH, Li WC, Fu FL (2014). Expression profile of maize microRNAs corresponding to their target genes under drought stress. *Biochem Genet*, 52 (11~12): 474~493
- Wei K, Wang Y, Zhong X, Pan S (2014). Protein kinase structure, expression and regulation in maize drought signaling. *Mol Breeding*, 34 (2): 583~602
- Xu ZZ, Zhou GS (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224 (5): 1080~1090
- Yin Z, Li Y, Yu J, Liu Y, Li C, Han X, Shen F (2012). Difference in miRNA expression profiles between two cotton cultivars with distinct salt sensitivity. *Mol Biol Rep*, 39 (4): 4961~4970
- Zhou J, Liu M, Jiang J, Qiao G, Lin S, Li H, Xie L, Zhuo R (2012). Expression profile of miRNAs in *Populus cathayana* L. and *Salix matsudana* Koidz under salt stress. *Mol Biol Rep*, 39 (9): 8645~8654
- Zhou ZJ, Zhang JF, Xia P, Wang JY, Chen S, Fang XQ, Fan SW (2014). Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time polymerase chain reaction in human cartilage endplate of the lumbar spine. *PLoS ONE*, 29 (2): e88892