

松叶猪毛菜干旱胁迫下实时定量PCR内参基因的筛选

闻志彬¹, 张明理^{1,2,*}

¹中国科学院新疆生态与地理研究所, 中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室, 乌鲁木齐830011; ²中国科学院植物研究所, 北京100093

摘要: 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)是研究植物基因定量表达的常用手段之一, 选择合适的内参基因是获得可信定量结果的前提。本文以不同干旱胁迫处理下松叶猪毛菜的叶片为材料, 应用qRT-PCR技术分析5个常用候选管家基因(*18S rRNA*、 *α -tubulin*、 *β -actin*、*EF1- α* 和*GAPDH*)的表达变化, 利用geNorm和NormFinder软件筛选出在干旱胁迫下表达最稳定的内参基因。结果表明, 以不同干旱胁迫处理的所有样品作为总样品池进行内参基因筛选时, 候选内参基因表达稳定性顺序依次是 β -actin> α -tubulin>GAPDH>EF1- α >18S rRNA。对同一干旱处理的样品进行内参基因筛选时, 5个候选内参基因表达稳定性存在明显差异, 其中 β -actin表达稳定度最高。因此, β -actin是研究松叶猪毛菜干旱胁迫下基因表达最合适的内参基因。

关键词: 松叶猪毛菜; 实时荧光定量PCR; 内参基因; 干旱胁迫; 藜科

Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative PCR in *Salsola laricifolia* under Soil Drought Stress

WEN Zhi-Bin¹, ZHANG Ming-Li^{1,2,*}

¹Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Urumqi 830011, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) is one of the common technologies used for gene expression analysis. Selection of a suitable reference gene is a prerequisite to obtain the reliable results. In this study, five housekeeping genes including ribosomal RNA 18S (*18S rRNA*), α -tubulin, β -actin, elongation factor 1 alpha (*EF1- α*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) of the desert plant, *Salsola laricifolia*, were selected as candidate reference genes in the qRT-PCR, and two softwares, geNorm and NormFinder, were used to evaluate their expression stabilities in the leaves of *S. laricifolia* under soil drought stress in order to obtain a reliable reference gene. The results showed that there were significant differences among the five candidate reference genes under different soil drought stress treatments. And the order of expression stability was β -actin> α -tubulin>GAPDH>EF1- α >18S rRNA. While this order of expression stability was different under the same soil drought stress treatment, but the expression stability of β -actin was highest. In a word, β -actin was the most stable gene for analysis gene expression in *S. laricifolia* under soil drought stress.

Key words: *Salsola laricifolia*; real-time quantitative PCR; reference gene; soil drought stress; Chenopodiaceae

松叶猪毛菜隶属于藜科(Chenopodiaceae)猪毛菜属(*Salsola*), 小灌木, 主要分布于中国(新疆、内蒙古、宁夏和甘肃)、蒙古、哈萨克斯坦和吉尔吉斯斯坦的砾质山坡和荒漠(Wen等2014)。我们的前期研究发现松叶猪毛菜是藜科中又一C₃-C₄中间型植物(Wen和Zhang 2015)。C₃-C₄中间型植物一直受到研究学者的关注, 与C₃植物相比, C₃-C₄中间型植物在叶片解剖结构和光合生理上具有很多中间型的性状, 研究它们有助于了解C₄植物的进化以及光呼吸减少的机制(Edwards和Ku 1987)。然而有关该荒漠特殊植物基因功能的研究方兴未艾。

实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)是在传统聚合酶链式反应基础上发展起来的一种新的核酸定量技术(Mackay 2004), 具有定量快速准确、重复性好、高灵敏度和特异

收稿 2015-09-15 修定 2015-11-09

资助 国家自然科学基金(31300217)和中国科学院西部之光项目(XBBS201209)。

致谢 中国科学院新疆生态与地理研究所研究生徐喆、张杰以及新疆大学干旱生态环境研究所的李岩博士在样品采集中给予帮助。

* 通讯作者(E-mail: zhangml@ibcas.ac.cn; Tel: 0991-7823151)。

性强等优点,已经成为当今分子生物学研究中检测基因表达水平的重要方法(Heid等1996; Bustin等2009)。qRT-PCR包含两种定量方式,即绝对定量和相对定量。相对变量是指在一定样本中,相对于另一个参照样本,靶序列的表达趋势和相对变化量,是科学研究中最常用到的定量方式(魏毅东等2013)。与传统的检测基因表达水平的研究方法(如Northern印记、原位杂交)相比,利用qRT-PCR方法计算基因相对表达量时,为了消除不同样品之间因RNA质量、酶促反应效率的不同以及其他因素引起的偏差,通常需要引入一个表达较为稳定的管家基因作为内参基因对其进行校正(张艳君等2007; Cruz等2009)。在目前植物学研究中,常用的稳定表达的管家基因有18S核糖体RNA (18S rRNA)、28S核糖体RNA (28S rRNA)、微管蛋白基因(*tubulin*)、肌动蛋白基因(*actin*)、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶基因(*GAPDH*)、延伸因子基因(*EF1- α*)以及泛素基因(*ubiquitin*)等(Shin和Schachtman 2004; Li等2005; Jeong等2006)。虽然管家基因被认为组成型表达(Czechowski等2005),但是许多研究表明这些管家基因在不同的植物、同一植物的不同组织器官、不同生长发育阶段都会有不同程度的表达差异(Suzuki等2000; Warrington等2000; 孙美莲等2010; 苏晓娟等2013; 魏毅东等2013; 王金星等2014; Xiao等2015),管家基因只是在一定条件下表达相对稳定,并非在任何条件下qRT-PCR中都通用的内参基因(Thellin等1999; Warrington等2000)。因此根据不同的材料,不同的实验设计选择合适的内参基因在qRT-PCR中就很有必要(Bustin等2009; 王彦杰等2012)。目前,已有不少关于植物内参基因评估的研究报道,如水稻(Kim等2003; 魏毅东等2013)、玉米(姜婷等2015)、盐角草(Xiao等2015)、毛果杨(苏晓娟等2013)、茶树(孙美莲等2010)、刺槐(王金星等2014)、牡丹(王彦杰等2012)、苹果(樊连梅等2014)、小麦(Paolacci等2009)、大豆(Jian等2008)、拟南芥(Remans等2008)等。

干旱缺水是我国西北干旱地区的典型生态特征(冯燕等2011),也是影响植物生长发育和限制植物分布的最关键因素之一(Biehler等1996; 肖春旺和周广胜2001),这主要是因为干旱胁迫引起植物

生理功能如光合作用和生长调控的改变(Carmo-Silva等2008; 闻志彬和张明理2015),相应地,植物基因的转录和翻译也会发生改变(Babayev等2014; Doubnerová Hýsková等2014)。近年来研究表明,不仅不同逆境处理下内参基因的表达量存在较大差异,甚至是不同的处理条件也需要不同的内参基因(Jian等2008; 魏毅东等2013)。因此,利用qRT-PCR进行干旱胁迫下松叶猪毛菜基因表达分析时,内参基因选择的问题就不容忽视了。为了更好地研究松叶猪毛菜在干旱胁迫下基因表达水平与调控,本研究选取qRT-PCR技术开展5个常用的候选内参基因(18S rRNA、 α -*tubulin*、 β -*actin*、*EF1- α* 和*GAPDH*)的表达量分析,并利用geNorm和NormFinder软件比较分析了5个内参基因的表达变化,以期筛选出在干旱胁迫下表达最稳定的内参基因,为进一步开展松叶猪毛菜的分子生物学研究奠定基础。

材料与方法

1 植物材料和处理

松叶猪毛菜(*Salsola laricifolia* Turcz. ex Litv.)种子于2013年9月采自新疆托里县铁厂沟镇,置于4℃条件下保存。试验于2014年在中国科学院新疆生态与地理研究所进行,盆栽所用塑料盆30 cm(高)×26 cm(内径),土壤采用3:1(V/V)混合的基质土与沙土,田间持水量为24.5%。4月份在室外播种松叶猪毛菜的种子,采取自然光照,盆栽苗上方设防雨棚,并对植物进行正常水分管理,确保植株生长良好。干旱胁迫处理前1周进行定苗,每盆保留3株。待松叶猪毛菜长至为10~12周,开始进行干旱胁迫试验。试验共设4个处理,分别为田间持水量的80%(对照)、60%(轻度干旱胁迫)、45%(中度干旱胁迫)和35%(重度干旱胁迫)(闻志彬和张明理2015),每处理重复3次。处理期间,每天用称重法补充损失的水分,使其维持在各预定胁迫条件,处理5 d后于2014年8月2日上午12:00收集植株健康叶片,液氮速冻后,-80℃贮藏备用。

2 总RNA的提取和cDNA合成

利用RNA植物提取试剂盒(QIAGEN)提取叶片总RNA,并用DNase I (RNase free)消化去除DNA污染。总RNA质量用1.5%琼脂糖凝胶电泳检

测, 紫外透射光下观察并拍照。随后, 按照AMV First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(Sangon)操作方法, 将各样品总RNA反转录合成cDNA第一条链。获得的cDNA产物直接用于PCR或-20 °C贮藏备用。

3 内参基因的选择及特异性引物的设计

选取松叶猪毛菜5种管家基因(*18S rRNA*、*α-tubulin*、*β-actin*、*EFl-α*和*GAPDH*)作为候选的内参基因, 这5种基因均为本实验室自行克隆得到, 尚未登录信息。所得序列与GenBank已注册的基因序列经比对同源性都很高。根据实时荧光定量PCR的引物设计原则, 利用Primer Premier v5.0软件设计各内参基因的qPCR引物(表1)。

4 内参基因目的片段的普通PCR扩增

反应体系为25 μL, 包括12.5 μL 2×GC缓冲液、0.2 μL 10 mmol·L⁻¹ dNTP、0.5 μL 10 μmol·L⁻¹上游引物、0.5 μL 10 μmol·L⁻¹下游引物、0.2 μL Taq DNA聚合酶、1 μL cDNA模板和10.1 μL ddH₂O。反应条件为95 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 33个循环; 72 °C延伸10 min。最后用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测

扩增产物。

5 内参基因的qRT-PCR分析

采用CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)进行各内参基因的qPCR分析。反应体系20 μL, 包括SYBR Green Fast qPCR Master Mix (BBI) 10 μL、10 μmol·L⁻¹上游引物0.4 μL、10 μmol·L⁻¹下游引物0.4 μL、cDNA 2 μL和ddH₂O 7.2 μL。每个样品重复3次, 并设置不加模板的阴性对照。反应条件为95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火10 s, 72 °C延伸15 s, 40个循环。采集溶解曲线荧光信号。实验数据采用相对定量法分析。

6 数据分析

用geNorm v3.5和NormFinder v20软件, 根据5个常用内参基因在不同干旱胁迫下的相对表达量(Q)对各个内参基因的表达稳定性进行统计学分析, 从而筛选出表达相对稳定的内参基因。根据公式 $Q = E^{\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量, 其中E为基因扩增效率, 一般默认为2, 即扩增效率为100%; $\Delta C_t = C_{t(\min)} - C_{t(\text{样品})}$, $C_{t(\min)}$ 为所有样品中最低的C_t值, $C_{t(\text{样品})}$ 为每个样品的C_t值(孙美莲等2010; 苏晓娟等2013)。

表1 qRT-PCR中5种候选内参基因的引物序列

Table 1 The primers of candidate reference genes used in qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物大小/bp
<i>18S rRNA</i>	正向: GGGCATTTCGTATTTTCATAGTCA; 反向: CGGCATCGTTTATGGTTGA	159
<i>α-tubulin</i>	正向: CCATACCCAGGATTCCTTC; 反向: CACACTTGCCATCATAGACGA	136
<i>β-actin</i>	正向: TCCACGAAACAACCTACAACCTC; 反向: CAGCAATACCGGGGAACAT	111
<i>EFl-α</i>	正向: TCAGTTTGGTGGTTATTGGACA; 反向: ACCTCTTGTTTCATCTCAGCAGC	135
<i>GAPDH</i>	正向: AACGAGCACGAATACAAGTCAG; 反向: AGCCCTCAAGAATACCGA	116

实验结果

1 RNA样品的质量检测

1.5%琼脂糖凝胶电泳显示, 各样品总RNA电泳图谱带型清晰, 没有弥散现象, 且28S rRNA带比18S rRNA带更亮(图1), 说明RNA完整良好, 没有降解。再用Nanodrop检测RNA的浓度和纯度, 结果表明 A_{260}/A_{280} 以及 A_{260}/A_{230} 均在2.0左右, 说明RNA的纯度较高, 符合后续实验的要求。

2 内参基因片段的PCR扩增

以叶片总RNA为模板扩增各内参基因片段,

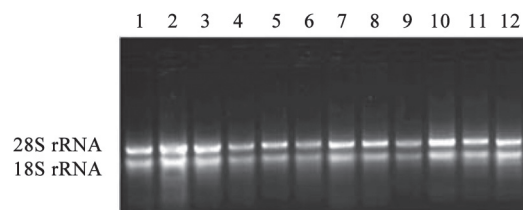


图1 松叶猪毛菜各试验样品总RNA电泳分析
Fig.1 Agarose gel analysis of total RNA extracted from different samples of *S. laricifolia*

1~3: 对照; 4~6: 轻度干旱胁迫; 7~9: 中度干旱胁迫; 10~12: 重度干旱胁迫。

经1.5%琼脂糖凝胶电泳显示,在100~250 bp之间存在较亮的特异条带,与预期的片段大小一致(图2),并且没有引物二聚体及非特异性条带,表明扩增反应具有较高的专一性,可用于qRT-PCR分析。

3 内参基因 C_t 值分析

基因的 C_t 值大小是与其表达量成反比,即 C_t 值越小,表达量越大,反之亦然。qRT-PCR的结果表明,5个内参基因的 C_t 值在10~33之间,其中18S rRNA的 C_t 值最小,在10~13之间,GAPDH的 C_t 值在15~20之间, α -tubulin和 β -actin的 C_t 值相差不大,在20~25之间,而EF1- α 的 C_t 值最大,在25~33之间(图3)。表明这5个内参基因的表达量不同,存在一定的差异。

4 内参基因的qRT-PCR分析

将反转录的cDNA混合样品以5倍的浓度梯度进行稀释,并以此为模板进行qRT-PCR扩增,制作5种内参基因的标准曲线,结果表明,5个内参基因的

引物的扩增效率在95.3%~104.1%之间,线性相关系数(R^2) ≥ 0.980 (表2),符合qRT-PCR对扩增效率的要求。5个内参基因的熔解曲线都只有明显的单一信号峰,且重复样品间扩增曲线的重复性好(图4),说明qRT-PCR反应具有较高的特异性,结果准确可信。

5 内参基因的稳定性分析

将所有处理的样品一起进行内参基因表达分析,利用geNorm和NormFinder软件对各内参基因的相对表达量进行统计分析的结果一致,即在干旱胁迫下5个候选内参基因表达稳定性由高到底排序为 β -actin $>$ α -tubulin $>$ GAPDH $>$ EF1- α $>$ 18S rRNA(表3)。表明 β -actin和 α -tubulin稳定性较好,18S rRNA稳定性最差。

另外,对同一干旱处理下5个内参基因的稳定性进行分析,结果显示,同一处理下的两个软件分析结果基本一致, β -actin表达均最稳定,但是不同处理之间内参基因表达稳定性存在差异。在对照、轻度干旱胁迫(T1)、中度干旱胁迫(T2)、重度干旱胁迫(T3)中,5个候选内参基因表达稳定性由高到底排序分别为 β -actin $>$ EF1- α $>$ α -tubulin $>$ GAPDH $>$ 18S rRNA、 β -actin $>$ α -tubulin=GAPDH $>$ EF1- α $>$ 18S rRNA、 β -actin $>$ GAPDH $>$ α -tubulin $>$ EF1- α $>$ 18S rRNA、 β -actin= α -tubulin $>$ GAPDH $>$ EF1- α $>$ 18S rRNA(表4)。这表明在同一处理条件以及不同处理之间,候选的内参基因的稳定性均存在差异。

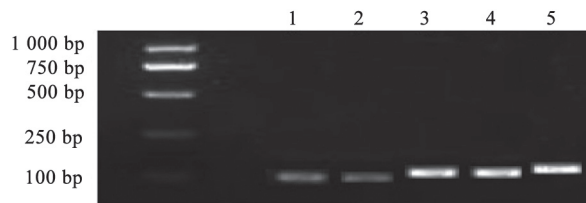


图2 五种候选内参基因的PCR扩增产物

Fig.2 PCR products of five candidate reference genes
1: β -actin; 2: GAPDH; 3: EF1- α ; 4: α -tubulin; 5: 18S rRNA。

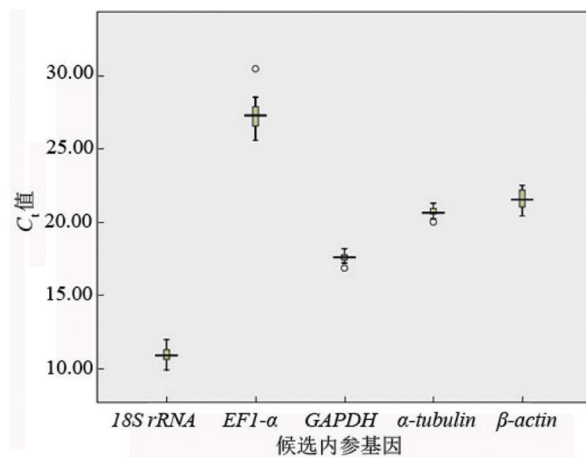


图3 五种候选内参基因的 C_t 值分布

Fig.3 Distribution of C_t values of five candidate reference genes across all samples

讨论

实时荧光定量PCR技术已经成为分子生物学中研究基因表达的重要工具(Heid等1996; Bustin等2009)。应用qRT-PCR技术分析基因表达时,使用

表2 qRT-PCR分析中5种候选内参基因的相关系数

Table 2 The parameters derived from qRT-PCR analysis of five candidate reference genes

基因名称	扩增效率/%	斜率	R^2
18S rRNA	104.1	-3.228	0.9972
α -tubulin	99.5	-3.334	0.9862
β -actin	95.3	-3.441	0.9991
EF1- α	97.7	-3.378	0.9991
GAPDH	99.5	-3.334	0.9986

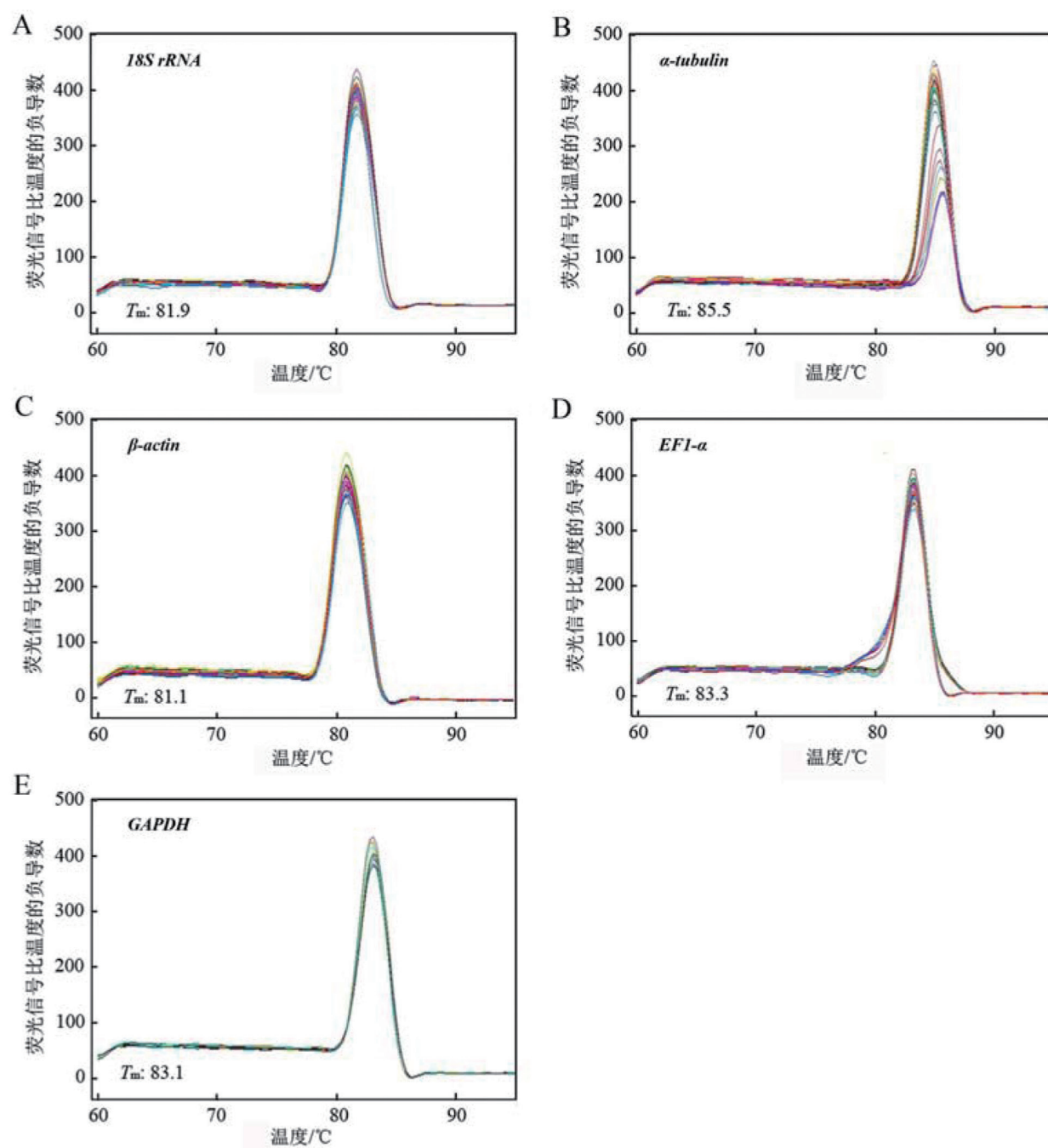


图4 松叶猪毛菜5个候选内参基因的qRT-PCR溶解曲线
Fig.4 qRT-PCR melting curves of five candidate reference genes of *S. laricifolia*

稳定的内参基因是获得可信定量结果的前提(Bustin等2009; 王彦杰等2012)。近来的研究表明, 没有任何一个管家基因是通用的内参基因, 若不经筛选而以一种管家基因作为任何条件下的内参, 得到的结果精确度大大降低, 甚至是错误的(Suzuki等2000; Vandesompele等2002; Bustin等2009)。因

此, 在分析目标基因表达之前, 很有必要对特定材料的管家基因进行筛选。

目前, 可用于评价内参基因稳定的软件较多, 其中geNorm和NormFinder是经常被用到的, 它们的运行原理类似, 将运算后产生的表达稳定值排序, 最后将表达稳定值最小的基因视为最稳定的

表3 所有样品中5种候选内参基因的表达稳定性值(SV)

Table 3 The expression stability value (SV) of candidate reference genes in all samples

分析软件	<i>β-actin</i>	<i>α-tubulin</i>	<i>GAPDH</i>	<i>EF1-α</i>	<i>18S rRNA</i>
NormFinder	0.004	0.009	0.013	0.047	0.049
geNorm	0.041	0.044	0.045	0.073	0.076

内参基因(魏毅东等2013; 王金星等2014)。本研究采用geNorm和NormFinder软件分析比较了干旱胁迫下松叶猪毛菜5个常用候选管家基因的表达稳定性。以不同干旱处理的所有样品作为总样品池进行内参基因筛选时, 经2种软件计算得出一致的结果, 即 β -actin和 α -tubulin稳定性较好, *18S rRNA*

表4 干旱胁迫下5种候选内参基因的稳定性

Table 4 The expression stability value (SV) of candidate reference genes under drought stress

处理	分析软件	各内参基因的稳定性				
		<i>β-actin</i>	<i>α-tubulin</i>	<i>GAPDH</i>	<i>EF1-α</i>	<i>18S rRNA</i>
对照	NormFinder	0.003	0.013	0.019	0.004	0.049
	geNorm	0.028	0.030	0.035	0.030	0.058
轻度干旱	NormFinder	0.005	0.010	0.010	0.042	0.058
	geNorm	0.045	0.046	0.046	0.088	0.094
中度干旱	NormFinder	0.003	0.005	0.004	0.012	0.017
	geNorm	0.012	0.016	0.013	0.018	0.069
重度干旱	NormFinder	0.001	0.001	0.011	0.078	0.093
	geNorm	0.060	0.060	0.068	0.087	0.098

稳定性最差(表3)。而对同一干旱处理的样品进行内参基因筛选时, 结果略有不同(表4)。对照、轻度干旱胁迫、中度干旱胁迫以及重度干旱胁迫的各个样品中表现较稳定的内参基因分别是 β -actin和 $EF1-\alpha$, β -actin、 α -tubulin和 $GAPDH$, β -actin和 $GAPDH$, β -actin、 α -tubulin和 $GAPDH$, 稳定性最差的内参基因都是 $18S rRNA$ 。

*actin*基因编码的肌动蛋白是真核生物普遍存在的一种重要蛋白质, 参与细胞分裂、形态维持以及生长等多种重要的生理活动, 几乎在所有真核细胞中均有表达(苏晓娟等2013)。除了基因序列高度保守外, 还具有mRNA表达数量高、数量稳定等特点(颜凤霞等2013), 被认为是qRT-PCR中内参基因的最佳选择(Santella和Chun 2011)。如 β -actin在茶树的不同器官组织(孙美莲等2010)和荔枝果实发育不同阶段以及外源生长调节剂处理后(魏永赞等2012)表达最稳定; *actin*是黄花蒿叶片在不同浓度镉处理下表达稳定性最好的(周良云等2014); 在刺槐不同植株、不同器官间*actin*、 $GAPDH$ 和 $18S rRNA$ 表达相对稳定(王金星等2014); 在杨树叶片及根组织中*actin*表达最稳定(Xu等2011); 在毛果杨的不同组织以及锌胁迫下, *actin*、*ubiquitin*、 $EF1-\alpha$ 和 $18S rRNA$ 的稳定性较好(苏晓娟

等2013); 盐角草在氮处理干旱胁迫或不同发育阶段, *actin*都是最佳的内参基因选择(Xiao等2015)。本研究结果也表明, 在各处理中 β -actin是最合适的内参基因(表3和4)。

本研究各试验中最不合适作为内参基因的是 $18S rRNA$ (表3和4)。而关于该基因作为内参基因的使用, 目前还是存在较大的争议。这是因为 $18S rRNA$ 与目的mRNA相比表达丰富过高, 在qRT-PCR进行数据分析时基线值对其影响过大且很难扣除(Vandesompele等2002), 更重要的是, $18S rRNA$ 的末端没有poly (A)加尾, 当使用oligo-dT进行反转录或以mRNA为模板时, $18S rRNA$ 就不能作为内参(Stürzenbaum和Kille 2001)。但是也有不少研究表明 $18S rRNA$ 表达也是相对稳定的, 可作为内参基因(Xu等2011; 苏晓娟等2013; 王金星等2014; 周良云等2014)。

另外, 本研究中 α -tubulin、 $GAPDH$ 和 $EF1-\alpha$ 在不同处理下表达的稳定性不一致(表4)。王彦杰等(2012)在研究牡丹不同组织和切花开放不同时期花瓣中、Migock和Papierniak (2011)在研究黄瓜不同组织及遭受不同生物胁迫时均发现*tubulin*表达不稳定。虽然在本试验中 $EF1-\alpha$ 和 $GAPDH$ 表达相对不稳定, 但它们在毛果杨(苏晓娟等2013)、小麦

不同器官以及不同试验条件下(袁伟等2012)、茶树不同成熟度叶片和愈伤组织(孙美莲等2010)中却表现出较高的表达稳定性。这表明*tubulin*、*GAPDH*和*EF1- α* 在不同处理下缺乏稳定性,在某些条件下不适合选作内参基因。

综上所述,对松叶猪毛菜进行干旱胁迫下实时荧光定量PCR时可以选用 β -*actin*作为内参对目的基因的表达进行校正。由于geNorm和Norm-Finder软件分析所得到的结果一致,这在一定程度上也说明本研究筛选出的内参基因可靠。在同一干旱处理下松叶猪毛菜叶片中的候选内参基因表达稳定性存在差异,表明即使在同一处理条件下也有必要对内参基因进行评估。本研究为开展干旱胁迫下松叶猪毛菜功能基因的表达分析奠定了基础,同时也可对其他植物内参基因的筛选提供参考。

参考文献

- 樊连梅,王超,刘更森,原永兵(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
- 冯燕,王彦荣,胡小文(2011). 水分胁迫对幼苗期霸王叶片生理特性的影响. 草业科学, 28 (4): 577~581
- 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
- 苏晓娟,樊保国,袁丽钗,崔秀娜,卢善发(2013). 实时荧光定量PCR分析中毛果杨内参基因的筛选和验证. 植物学报, 48 (5): 507~518
- 孙美莲,王云生,杨冬青,韦朝领,高丽萍,夏涛,单育,骆洋(2010). 茶树实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择. 植物学报, 45 (5): 579~587
- 王金星,张利军,廖资亿,张运根,邱乾栋,孙鹏,孙宇涵,胡瑞阳,卢楠,李云(2014). 刺槐实时定量PCR分析中内参基因的选择. 林业科学, 50 (9): 167~172
- 王彦杰,董丽,张超,王晓庆(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
- 魏毅东,陈玉,郭海萍,谢华安,张建福,王宗华(2013). 水稻缺素胁迫下实时荧光定量RT-PCR的内参基因的选择. 农业生物技术学报, 21 (11): 1302~1312
- 魏永赞,赖彪,胡福初,李晓静,胡桂兵,王惠聪(2012). 用于荔枝qPCR分析的内参基因克隆及稳定性分析. 华南农业大学学报, 33 (3): 301~306
- 闻志彬,张明理(2015). 干旱胁迫对2种光合类型C₄荒漠植物叶片光合特征酶和抗氧化酶活性的影响. 西北植物学报, 35 (9): 1815~1822
- 肖春旺,周广胜(2001). 毛乌素沙地中间锦鸡儿幼苗生长、气体交换和叶绿素荧光对模拟降水量变化的响应. 应用生态学报, 12 (5): 692~696
- 颜凤霞,文晓鹏,高国丽,陶金(2013). 火龙果Actin及UBQ内参基因片段的克隆及序列分析. 贵州农业科学, 41 (9): 1~4
- 袁伟,万红建,杨悦俭(2012). 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择. 植物学报, 47 (4): 427~436
- 张艳君,朱志峰,陆融,徐琼,石琳熙,简序,刘俊燕,姚智(2007). 基因转达表达分析中内参基因的选择. 生物化学与生物物理进展, 34 (5): 546~550
- 周良云,莫歌,王升,唐金富,岳红,黄璐琦,邵爱娟,郭兰萍(2014). 基于实时荧光定量PCR对镉处理下黄花蒿内参基因稳定性的分析. 中国中药杂志, 39 (5): 777~784
- Babayev H, Mehvaliyeva U, Aliyeva M, Feyziyev Y, Guliyev N (2014). The study of NAD-malic enzyme in *Amaranthus cruentus* L. under drought. Plant Physiol Bioch, 81: 84~89
- Biehler K, Fock H (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. Plant Physiol, 112: 265~272
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Helleman 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
- Carmo-Silva AE, Bernardes da Silva A, Keys AJ, Parry MAJ, Arrabaça MC (2008). The activities of PEPC carboxylase and the C₄ acid decarboxylases are little changed by drought stress in three C₄ grasses of different subtypes. Photosynth Res, 97: 223~233
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LMG, Romano E, Grossi-de-Sá MF, Vaslin M, Alves-Ferreira M (2009). Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. Mol Breeding, 23: 607~616
- 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: 5~17
- Doubnerová Hýsková V, Miedzińska L, Dobrá J, Vankova R, Ryšlavá H (2014). Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. J Plant Physiol, 171: 19~25
- Edwards GE, Ku MSB (1987). Biochemistry of C₃-C₄ intermediates. In: Hatch MD, Boardman NK (eds). The Biochemistry of Plants. Vol. 10. New York: Academic Press Inc, 275~325
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. Genome Res, 6: 986~994
- Jeong YM, Mun JH, Lee I, Woo JC, Hong CB, Kim SG (2006). Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members. Plant Physiol, 140: 196~209
- Jian B, Liu B, Bi YS, Hou WS, Wu CX, Han TF (2008). Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. BMC Mol Biol, 9: 59
- Kim BR, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003). Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. Biotechnol Lett, 25 (21): 1869~1872
- Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW (2005). Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. Plant Cell, 17: 2738~2753
- Mackay IM (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory.

- Clin Microbiol Infec, 10: 190~212
- Migocka M, Papierniak A (2011). Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Mol Breeding, 28: 343~357
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. BMC Mol Biol, 10: 11
- Remans T, Smeets K, Opendakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. Planta, 227: 1343~1349
- Santella L, Chun JT (2011). Actin, more than just a housekeeping protein at the scene of fertilization. Sci China Life Sci, 54 (8): 733~743
- Shin R, Schachtman DP (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. Proc Natl Acad Sci USA, 101 (23): 8827~8832
- Stürzenbaum SR, Kille P (2001). Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 130 (3): 281~289
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. Biotechniques, 29 (2): 332~337
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol, 75 (2-3): 291~295
- 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): research0034
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. Physiol Genomics, 2 (3): 143~147
- Wen ZB, Zhang ML (2015). *Salsola laricifolia*, another C₃-C₄ intermediate species in tribe Salsoleae s.l. (Chenopodiaceae). Photosynth Res, 123: 33~43
- Wen ZB, Zhang ML, Meng HH (2014). *Salsola arbusculiformis* and *S. laricifolia* (Chenopodiaceae) in China. Nord J Bot, 32: 167~175
- Xiao XL, Ma JB, Wang JR, Wu XM, Li PB, Yao YA (2015). Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte *Salicornia europaea* by real-time quantitative PCR. Front Plant Sci, 5: 788
- Xu M, Zhang B, Su XH, Zhang SG, Huang MR (2011). Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. Anal Biochem, 408 (2): 337~339