

茅苍术内参基因筛选及其在活性成分生物合成研究中的应用

桑晓华, 谷巍*, 巢建国, 刘青芝, 蒋玲, 韩赟, 周乐章

南京中医药大学药学院, 南京210023

摘要: 本研究选取茅苍术转录组数据库中 *18S rRNA*、*β-Actin*、*EF-1α*、*GAPDH*、*UBQ1*和*UBQ2*作为候选内参基因, 运用实时荧光定量PCR技术分析6种候选内参基因在正常和干旱胁迫条件下不同组织中的表达, 并用Delta CT、geNorm、NormFinder、BestKeeper及RefFinder等方法评价候选内参基因的表达稳定性。结果表明, *UBQ2*和*EF-1α*在正常条件下不同组织中的表达均较稳定, 在干旱胁迫下*EF-1α*的表达最稳定。在此基础上, 以*UBQ2*作为内参基因, 研究正常条件下茅苍术活性成分生物合成关键酶*HMGR*、*FPPS*基因在其开花初期不同组织中的表达特性, 结果显示花中*HMGR*、*FPPS*基因相对表达量均最高, 根茎次之, 茎和叶中相对表达量均较低。

关键词: 茅苍术; 实时荧光定量PCR; 内参基因; 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶; 法尼基焦磷酸合酶

实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)是基因表达分析研究的重要手段, 具有高通量、灵敏度高、特异性强和重复性好等特点(Hashemi等2016; Sun等2016)。为确保定量分析结果的准确性和可靠性, 需选择一个稳定表达的基因作为内参基因, 在植物的qRT-PCR实验中, 常见的看家基因(housekeeping genes)如*β-Actin* (肌动蛋白基因)、*18S rRNA* (18S核糖体RNA)等, 通常被直接作为内参基因来使用, 但越来越多的研究表明, 看家基因在同植物不同细胞类型或不同处理条件下的表达不是绝对稳定的(付媛媛等2014; Auler等2016; Patankar等2016; Xiao等2016)。因此, 根据不同情况选择可靠、稳定表达的内参基因在基因差异表达分析中显得至关重要。

茅苍术为菊科多年生草本植物, 具有燥湿健脾、祛风明目的功效, 临床应用广泛(邵婧等2015)。江苏句容茅山是其道地药材产区, 近年来由于过度采挖、生境破坏及其自身生物学特性, 道地茅苍术已成为濒危物种, 而干旱等胁迫已成为影响其品质形成的重要限制因子(顾永华等2008)。茅苍术的主要成分为挥发油, 倍半萜类化合物是其中主要的活性成分, 这类成分通过甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)代谢途径中一系列的酶来合成, 其中3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, *HMGR*)是MVA途径中的第一个限速酶, 法尼基焦磷酸合酶(farnesyl pyrophosphate synthase, *FPPS*)则是其下游分支点生物合成的关键酶(Kim等2016; Kalita等2015; Zhao等2015; Zhang等2015)。在品质形成及胁迫对其造成影响的研究中, qRT-PCR分析

相关基因表达研究尤为重要, 而茅苍术内参基因筛选及基因表达分析相关研究鲜见报道。

本研究在课题组前期建立的茅苍术转录组数据平台中, 选取18S核糖体RNA (*18S rRNA*)、肌动蛋白基因(*β-Actin*)、转录延伸因子基因(*EF-1α*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)和多聚泛素酶基因(*UBQ1*、*UBQ2*)等6个常用的看家基因作为候选内参基因(周良云等2014; 涂冬萍等2015; 郭茜茜等2014; 苏晓娟等2013), 旨在筛选出用于分析正常条件和干旱胁迫下茅苍术不同组织中稳定表达的理想内参基因, 并研究茅苍术开花初期倍半萜类活性成分生物合成关键酶*HMGR*、*FPPS*基因的差异表达。研究结果为茅苍术活性成分生物合成机制研究提供参考, 也为进一步进行干旱等逆境条件下茅苍术品质评价研究提供奠定基础。

材料与方法

1 实验材料

实验所用茅苍术植株来源于江苏句容道地产区, 经南京中医药大学谷巍教授鉴定为菊科植物茅苍术[*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.], 引种在南京中医药大学仙林学院药苑。选取长势良好、株高基本一致的茅苍术植株移至花盆中, 每盆装土10.0 kg (土样经过自然风干捣碎并消毒处理, 过

收稿 2017-02-22 修定 2017-08-22

资助 国家自然科学基金(81573520)、江苏省中药资源产业化过程协同创新中心(ZDXM-3-24)、江苏省中药优势学科II期建设(ysxk-2014)、“六大人才高峰”高层次人才项目(2012-YY-009)和江苏省“333高层次人才培养工程”。

* 通讯作者(E-mail: guwei9926@126.com)。

2 mm筛)。实验分为3种处理, 分别为正常(对照组), 花盆土壤含水量保持16%; 轻度干旱胁迫, 花盆土壤含水量保持12%左右; 重度干旱胁迫, 花盆土壤含水量保持8%左右。每个实验组设3个重复, 分别于开花初期采集健壮叶片、根茎、茎及花, 剪成小块, 液氮速冻, -80°C 保存备用。

2 方法

2.1 茅苍术总RNA的提取和反转录反应

取出 -80°C 下保存的样品材料, 按照Tiangen公司总RNA提取试剂盒(Cat.#DP419)中操作步骤提取总RNA, 经1%的琼脂糖凝胶电泳并用Bio-Rad Gel Doc XR⁺凝胶成像系统观察拍照检测总RNA的完整性, 并确保无基因组污染。用Eppendorf蛋白核酸分析仪测定 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值来检测RNA的浓度和纯度。总RNA的 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0, A_{260}/A_{230} 大于2.0, 才可进行后续定量分析实验。按照Invitrogen公司反转录试剂盒(M-MLV Reverse Transcriptase Cat.# C28025021)中操作步骤反转录得到cDNA。所得cDNA稀释20倍用于qRT-PCR实验。

2.2 特异性引物设计与验证

参考付媛媛等(2014)、Auler等(2016)、Patankar等(2016)和Xiao等(2016)及本课题组前期已建立的茅苍术转录组数据库中选择6个候选内参基因 $18S\ rRNA$ 、 β -Actin、 EF -1 α (GenBank No. KY411966)、 $GAPDH$ 、 $UBQ1$ 和 $UBQ2$ (GenBank No. KY-411965)进行筛选实验, 并选择关键酶基因 $HMGR$ 和 $FPPS$ 进行后续表达分析实验。利用Primer Premier 5.0软件设计各特异性引物, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成。qRT-PCR中候选内参基因和关键酶基因引物序列见表1。通过qRT-PCR中的溶解曲线

来判断引物的特异性, 并建立标准曲线计算各引物的线性相关系数(R^2)和扩增效率(E)。

2.3 实时荧光定量PCR

采用美国invitrogen公司的实时荧光定量PCR试剂盒和美国ABI-7500实时荧光定量PCR仪进行定量分析。实验在冰浴中进行, 20 μL 反应体系: Forward和Reverse引物各1 μL (引物终浓度 $0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、10 μL qPCR SYBR Green SuperMix-UDG、2 μL cDNA, 用 ddH_2O 补足至20 μL 。反应程序为: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性30 s, 62°C 退火30 s, 72°C 延伸40 s, 40个循环。每个处理3个生物学重复, 同时每个样品3个技术重复, 并设置阴性对照。

2.4 稳定性分析

qRT-PCR实验结束后, 得到各样品的 C_t , 运用Delta CT、geNorm、Normfinder、BestKeeper和RefFinder 5个软件对各内参基因的稳定性进行分析。geNorm和Normfinder软件分析数据时, 需将 C_t 转化为相对定量的 Q 值, Q 值转化公式为 $Q=2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t=C_{t\ \text{sample}}-C_{t\ \text{min}}$); $C_{t\ \text{sample}}$ 为该看家基因在植物各组织中的 C_t 值, $C_{t\ \text{min}}$ 为该看家基因在植物所有组织中的最小 C_t 值), 计算出每个候选内参基因的稳定性值(M)。Delta CT和BestKeeper无需转换, 直接根据 C_t 值进行稳定性分析。最后利用RefFinder综合整理上述4种分析方法, 对每个基因单独用4种分析方法的排名求几何平均数, 得到综合排名指数。指数越小, 内参基因越稳定。

实验结果

1 候选内参基因和关键酶基因引物特异性及扩增效率评估

经qRT-PCR分析, 得到各基因的PCR产物溶解

表1 qRT-PCR中候选内参基因和关键酶基因引物序列

Table 1 The primer sequences of candidate reference genes and key enzyme genes in qRT-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度/bp
<i>18S rRNA</i>	GTAGTTGGGCTTTGGGTTG	AGCGTAGGCTTGCTTTGAG	165
<i>β-Actin</i>	GATGGCTGGAACAAAACCT	TTGAAACCGCAAAAAGTAG	115
<i>EF-1α</i>	ACCAACTGGGTTGACAAGTGAAGT	AGCCTCGGTAAGGGCTTCAT	64
<i>GAPDH</i>	CCTCCTGCACCACCAACTG	TCCGAATTTTGGTCGATGAC	59
<i>UBQ1</i>	CCCACCAGATCAGCAAAGGC	CGAACCAACATCATCAACAC	194
<i>UBQ2</i>	GGTTGAGGGGAGGAATGC	AGACGAAGGACAAGGTGA	232
<i>FPPS</i>	CTGCCCTTGGTTGGTGCCTT	TTCTTGGGACATGGTTGCGA	206
<i>HMGR</i>	AAACAACATAAATCCGGCGAACT	AGGCGTCGATGGCTTTTG	61

曲线, 结果显示只有单一信号峰, 表明引物特异性好。将扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳并用Bio-Rad Gel Doc XR⁺凝胶成像系统观察拍照, 观察分析产物扩增长度与目标一致、无非特异性扩增产物(图1)。

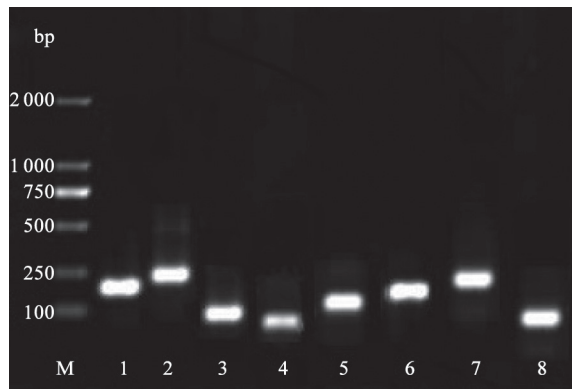


图1 候选内参基因和关键酶基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Agarose gel analysis of candidate reference genes and key enzyme genes

M: DNA marker; 1: *UBQ1*; 2: *UBQ2*; 3: *EF-1α*; 4: *GAPDH*; 5: *β-Actin*; 6: *18S rRNA*; 7: *FPPS*; 8: *HMGR*。

将样品cDNA按照一定倍数进行5个梯度稀释。横坐标为lg(起始cDNA浓度), 对应的C_t值为纵坐标绘制标准曲线, 计算标准曲线的斜率(k), 并根据公式 $E=10^{-1/k}-1$ 计算扩增效率(E)。理论的扩增效率为100%, 相应斜率约为-3.322, 实际扩增效率应在95%~105%之间, 各引物扩增效率均达到要求(表2)。

2 内参基因稳定性分析

研究表明, 看家基因的C_t值与该基因的表达量成反比。看家基因的C_t值越大, 则表明该基因的表达丰度越低, 反之则越高。根据qRT-PCR实验得到的C_t值结果表明, 各看家基因的C_t值均在5~31之间; 其中*18S rRNA*的C_t值最低, 在5~8之间, 表明该看家基因的表达丰度很高; *UBQ1*的C_t值较低, 在11~14之间; *UBQ2*和*EF-1α*的C_t值较高, 在15~20之间; *GAPDH*和*β-Actin*的C_t值最高, 在22~31之间, 说明表达丰度较低。各看家基因的C_t值高低分布结果表明各看家基因的表达丰度存在差异。各候选内参基因的稳定性分析见下文。

2.1 Delta CT分析

Delta CT法通过计算各基因的平均标准偏差

表2 候选内参基因特异性引物参数

Table 2 The primer parameters of candidate reference genes and key enzyme genes

基因	斜率(k)	R ²	扩增效率(E)%	稀释倍数	T _m /°C
<i>18S rRNA</i>	-3.263	0.998	102.519	10	88.342
<i>β-Actin</i>	-3.332	0.996	99.581	5	80.358
<i>EF-1α</i>	-3.316	0.998	100.248	5	79.774
<i>GAPDH</i>	-3.343	0.998	99.128	5	79.384
<i>UBQ1</i>	-3.337	0.997	99.375	5	83.474
<i>UBQ2</i>	-3.286	0.999	101.521	5	83.863
<i>FPPS</i>	-3.339	0.998	99.292	5	80.798
<i>HMGR</i>	-3.254	0.998	102.915	5	79.428

(SD), 对基因的表达稳定性进行评价, 数值越小稳定性越高。结果(图2)表明, 正常条件下, 6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *UBQ2*>*EF-1α*>*UBQ1*>*18S rRNA*>*β-Actin*>*GAPDH*, 即*UBQ2*表达最稳定, *EF-1α*和*UBQ1*也较稳定, *GAPDH*表达稳定性最差。轻度干旱胁迫下, 6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *EF-1α*>*UBQ2*>*18S rRNA*>*UBQ1*>*β-Actin*>*GAPDH*, 即*EF-1α*表达最稳定, *GAPDH*表达稳定性最差。重度干旱胁迫下, 6个内

参基因的稳定性由高到低依次为: *EF-1α*>*UBQ2*>*18S rRNA*>*UBQ1*>*β-Actin*>*GAPDH*, 即*EF-1α*表达最稳定, *GAPDH*表达稳定性最差。

2.2 geNorm分析

使用geNorm V3.4软件分析各内参基因的表达稳定性, 通过计算表达稳定性指数M值, 对基因的表达稳定性进行排序, M值越小越稳定, 反之则表达稳定性差。结果(图3)表明, 正常条件下, 6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *UBQ2*>*EF-1α*>

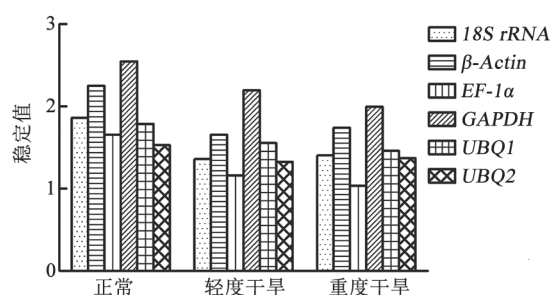


图2 Delta CT法分析候选内参基因的表达稳定性
Fig.2 The stability analysis of candidate genes by ΔC_t method

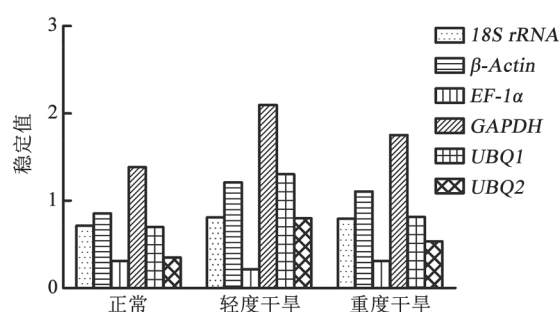


图4 Normfinder分析候选内参基因的表达稳定性
Fig.4 The stability analysis of candidate genes by Normfinder

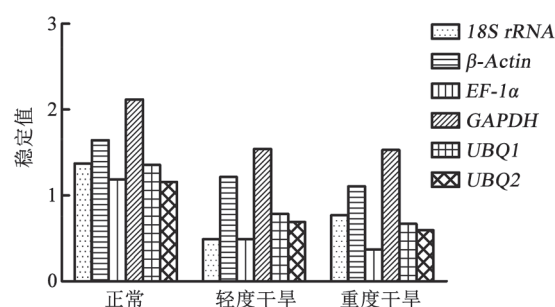


图3 geNorm分析候选内参基因的表达稳定性
Fig.3 The stability analysis of candidate genes by geNorm

$UBQ1 > 18S rRNA > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $UBQ2$ 表达最稳定, $EF\text{-}1\alpha$ 表达较稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。轻度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $18S rRNA = EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > UBQ1 > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $18S rRNA$ 和 $EF\text{-}1\alpha$ 表达稳定性均较高, $GAPDH$ 表达稳定性最差。重度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > UBQ1 > 18S rRNA > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $EF\text{-}1\alpha$ 表达最稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。

2.3 Normfinder分析

使用 Normfinder V20 软件分析计算各看家基因的表达稳定性, 计算稳定性值, 表达越稳定稳定性值小。结果(图4)表明, 正常条件下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > UBQ1 > 18S rRNA > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $EF\text{-}1\alpha$ 表达最稳定, $UBQ2$ 表达较稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。轻度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > 18S rRNA > \beta\text{-Actin} > UBQ1 > GAPDH$, 即 $EF\text{-}1\alpha$ 表达最稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。重度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > 18S rRNA > UBQ1 >$

$\beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $EF\text{-}1\alpha$ 表达最稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。

2.4 BestKeeper分析

使用 BestKeeper V1 软件分析计算得到各看家基因 Ct 值的标准偏差 SD 。标准偏差 $SD < 1$ 且值越小, 表明该看家基因的稳定性越好, 反之则表明该看家基因不稳定。分析结果(图5)显示, 各组中 $GAPDH$ 和 $\beta\text{-Actin}$ 的 $SD > 1$, 表明不稳定; 其余均小于 1。正常条件下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $UBQ2 > EF\text{-}1\alpha > UBQ1 > 18S rRNA > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $UBQ2$ 表达最稳定, $EF\text{-}1\alpha$ 次之。轻度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $18S rRNA > EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > UBQ1 > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $18S rRNA$ 表达最稳定, $EF\text{-}1\alpha$ 次之, $GAPDH$ 表达稳定性最差。重度干旱胁迫下, 6 个内参基因的稳定性由高到低依次为: $EF\text{-}1\alpha > UBQ2 > 18S rRNA > UBQ1 > \beta\text{-Actin} > GAPDH$, 即 $EF\text{-}1\alpha$ 表达最稳定, $GAPDH$ 表达稳定性最差。

2.5 RefFinder分析

RefFinder 是在线分析工具, 包含 Delta CT、

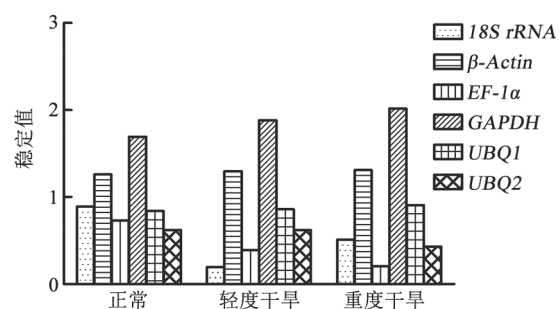


图5 BestKeeper分析候选内参基因的表达稳定性
Fig.5 The stability analysis of candidate genes by BestKeeper

geNorm、Normfinder和BestKeeper 4种软件分析方法,得到各内参基因稳定性的综合排名。结果(图6)表明,正常条件下,6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *UBQ2*>*EF-1 α* >*UBQ1*>*18S rRNA*> *β -Actin*>*GAPDH*, 即*UBQ2*表达最稳定, *EF-1 α* 次之。轻度干旱胁迫下,6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *EF-1 α* >*18S rRNA*>*UBQ2*>*UBQ1*> *β -Actin*>*GAPDH*, 即*EF-1 α* 表达最稳定。重度干旱胁迫下,6个内参基因的稳定性由高到低依次为: *EF-1 α* >*UBQ2*>*18S rRNA*>*UBQ1*> *β -Actin*>*GAPDH*, 即*EF-1 α* 表达最稳定。

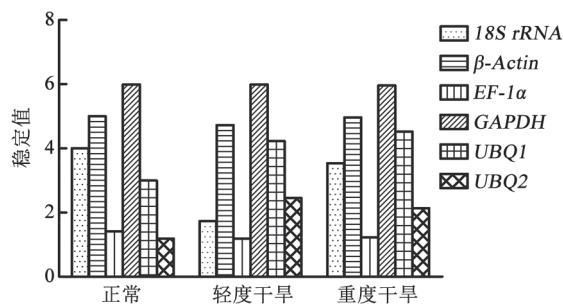


图6 RefFinder分析候选内参基因的表达稳定性
Fig.6 The stability analysis of candidate genes by RefFinder

经过综合分析表明,分析茅苍术正常条件下不同组织中基因差异表达时, *UBQ2*和*EF-1 α* 均可作为内参基因, *UBQ2*更佳;分析茅苍术干旱胁迫条件下不同组织中基因差异表达时, *EF-1 α* 作为内参基因最佳。

3 活性成分生物合成关键酶基因的表达分析

根据筛选结果选择*UBQ2*作为内参基因,分析茅苍术中生物合成关键酶*HMGR*和*FPPS*基因在其正常生长条件下开花初期不同组织中的相对表达量情况。经qRT-PCR分析得到各组织部位的 C_t 值,以根茎的 C_t 值作为参照,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算*HMGR*、*FPPS*在各组织中的相对表达量。结果(图7)显示, *HMGR*和*FPPS*在不同组织中的相对表达量差异明显。 *HMGR*在茅苍术各组织中的相对表达量由高到低顺次为: 花>根茎>茎>叶, *FPPS*在茅苍术各组织中的相对表达量由高到低顺次为: 花>根茎>叶>茎。其中*HMGR*和*FPPS*在花中的相对表达量均明显高于其它组织,在茎和叶中的相对表达量均较低。

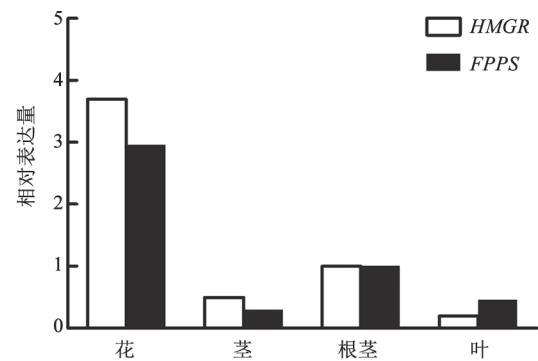


图7 *HMGR*和*FPPS*基因在茅苍术不同组织中的相对表达量
Fig.7 The relative expression of *HMGR* and *FPPS* gene in different tissues of *A. lancea*

讨 论

在qRT-PCR实验中, *β -Actin*、*18S rRNA*、*GAPDH*等常见的看家基因普遍被直接当作基因表达分析的内参基因来使用(付媛媛等2014; Euler等2016; Patankar等2016; Xiao等2016), 本研究结果显示,上述几种看家基因在茅苍术中不能稳定表达,而多聚泛素酶基因*UBQ2*和转录延伸因子基因*EF-1 α* 能稳定表达,其中*UBQ2*基因在细胞的蛋白质修饰、结合、降解中发挥重要作用, *EF-1 α* 基因则能促进基因转录不断进行。表明看家基因在植物不同细胞类型中表达不同,内参基因的选择不是固定不变的,同时,在不同处理条件下,内参基因的选择也有可能不同,要根据具体情况加以选择。

单一的分析软件评价内参基因的稳定性存在一定局限性,必须通过综合评价分析来确保分析结果的可靠性和准确性。Delta CT法根据各候选内参基因的 C_t ,对候选内参基因进行两两配对,计算配对基因在所有样品中的 ΔC_t 、平均 ΔC_t 、标准偏差(SD),然后计算某一内参基因与其他内参配对后的平均标准偏差(mean SD),最后根据平均标准偏差值评估内参基因的稳定性。geNorm软件先计算出每个候选内参基因的稳定性值(M),然后计算某一内参与其他内参的配对变异系数(pairwise variation),即 $V_{n/n+1}$ 。通过 M 对候选内参基因的稳定性进行排序以及 $V_{n/n+1}$ 判定所需内参基因的最适数目。NormFinder软件结合组内方差与组间方差,计算出稳定值(stability value),根据稳定值的大小对内参基因的稳定性进行评价。BestKeeper软件根据

各组样品候选内参基因的 C_t , 对样品进行配对相关分析, 计算标准偏差(SD)、变异系数(CV)及各基因间的配对相关系数(泊松相关系数), 根据SD评估内参基因的稳定性。本研究运用Delta CT、geNorm、NormFinder和BestKeeper等4种分析方法分别进行茅苍术正常和干旱胁迫条件下不同组织中的候选内参基因的稳定性分析, 并用RefFinder分析方法进行综合评价, 筛选得到理想的内参基因, 确保了茅苍术内参基因筛选的准确性和可靠性。

运用qRT-PCR技术研究植物中关键酶基因的表达分析是其品质评价的重要手段。本研究中用UBQ2作为内参基因, 研究正常条件下茅苍术开花期不同组织部位中萜类活性物质合成关键酶HMGR和FPPS基因的相对表达情况。结果显示花中的HMGR和FPPS的相对表达量均为最高, 根茎中含量次之, 茎和叶中的相对表达量均较低。茅苍术开花初期, 花为生长中心, 代谢旺盛, 有效物质需求和积累增多, 促进花中萜类有效成分相关关键酶基因的表达, 从而满足代谢需求。HMGR是其萜类合成途径甲羟戊酸(MVA)路径中的第一个限速酶, 控制整条代谢路径的代谢合成和速率, 对倍半萜类活性成分生物合成过程起着至关重要的作用。FPPS催化2个异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)分子和1个二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)分子生成法呢基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP), FPP为倍半萜类等化合物提供C15骨架, 是催化倍半萜类化合物生物合成的关键调控位点(Kim等2016; Kalita等2015; Zhao等2015; Zhang等2015)。研究结果为茅苍术活性成分生物合成中关键酶基因表达分析奠定基础。

茅苍术是濒危药用植物, 近年来有文献研究报道, 逆境条件会对其活性成分组成及含量造成影响。其中, 干旱是制约茅苍术生长和品质形成的重要因素, 研究在干旱胁迫下茅苍术活性成分合成关键酶基因的表达情况, 有利于揭示干旱胁迫下的品质形成影响的机制。本实验筛选了干旱胁迫下茅苍术不同组织中稳定表达的内参基因, 为研究干旱胁迫下茅苍术基因表达分析提供了科学依据。

参考文献

Auler PA, Benitez LC, do Amaral MN, Vighi IL, dos Santos Rodrigues G, da Maia LC, Braga EJB (2016). Evaluation of stabil-

ity and validation of reference genes for RT-qPCR expression studies in rice plants under water deficit. *J Appl Genet*, 58 (2): 1-15

Fu YY, Mu CS, Gao HW, Li J, Wang XM (2014). Cloning of 18S rRNA gene and stability evaluation of reference genes in *Medicago sativa*. *Plant Physiol J*, 50 (12): 1809-1815 (in Chinese with English abstract) [付媛媛, 穆春生, 高洪文, 李俊, 王学敏 (2014). 紫花苜蓿 18S rRNA 基因的克隆及内参基因表达稳定性评价. *植物生理学报*, 50 (12): 1809-1815]

Gu YH, Feng X, Xia B (2008). Effect of water stress on growth and essential oil content of *Atractylodes lancea* rhizome. *J Plant Resour Environ*, 17 (3): 23-27 (in Chinese with English abstract) [顾永华, 冯煦, 夏冰(2008). 水分胁迫对茅苍术根茎生长及挥发油含量的影响. *植物资源与环境学报*, 17 (3): 23-27]

Guo QQ, Ma XJ, Bai LH, Pan LM, Feng SX, Mo CM (2014). Screening of reference genes in *Siraitia grosvenorii* and spatio-temporal expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 45 (15): 2224-2229 (in Chinese with English abstract) [郭茜茜, 马小军, 白隆华, 潘丽梅, 冯世鑫, 莫长明(2014). 罗汉果内参基因筛选和3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶时空表达分析. *中草药*, 45 (15): 2224-2229]

Hashemi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M (2016). Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for quantitative real-time PCR normalization. *J Biol Res-Thessalon*, 23 (1): 18

Kalita R, Patar L, Shasany AK, Modi MK, Sen P (2015). Molecular cloning, characterization and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Centella asiatica* L.. *Mol Biol Rep*, 42 (9): 1431-1439

Kim SK, Han GH, Seong W, Kim H, Kim SW, Lee DH, Lee SG (2016). CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production. *Metab Eng*, 38: 228-240

Patankar HV, Assaha DV, Al-Yahyai R, Sunkar R, Yaish MW (2016). Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) subjected to drought and salinity. *PLoS One*, 11 (11): e0166216

Shao J, Gu W, Chao JG, Geng C, Sun HM, Li MY (2015). Molecular identification of *Atractylodes lancea* and its closely related species based on ITS2 sequence. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 46 (8): 1209-1215 (in Chinese with English abstract) [邵婧, 谷巍, 巢建国, 耿超, 孙红梅, 李孟洋(2015). 基于ITS2序列的茅苍术及其近缘种DNA分子鉴定. *中草药*, 46 (8): 1209-1215]

Su XJ, Fan BG, Yuan LC, Cui XN, Lu SF (2013). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa*. *Acta Bot Sin*, (5): 507-518 (in Chinese with English abstract) [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*, (5): 507-518]

Sun H, Li F, Ruan Q, Zhong XH (2016). Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in *Hedera helix* L. *Plant Physiol Bioch*, 108: 286-294

Tu DP, Mo CM, Ma XJ, Zhao H, Tang Q, Huang J, Pan LM, Wei RC

- (2014). Selection of reference genes of *Siraitia grosvenorii* by real-time PCR. *Chin J Chin Mater Med*, 40 (2): 204–209 (in Chinese with English abstract) [涂冬萍, 莫长明, 马小军, 赵欢, 唐其, 黄杰, 潘丽梅, 韦荣昌(2015). 罗汉果实时荧光定量PCR内参基因的选择. *中国中药杂志*, 40 (2): 204–209]
- Xiao Z, Sun X, Liu X, Li C, He L, Chen S, Su J (2016). Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. Don. *Front Plant Sci*, 7: 1547
- Zhang Y, Li ZX, Yu XD, Fan J, Pickett JA, Jones HD, Zhao GY (2015). Molecular characterization of two isoforms of a farnesyl pyrophosphate synthase gene in wheat and their roles in sesquiterpene synthesis and inducible defence against aphid infestation. *New Phytol*, 206 (3): 1101–1115
- Zhao YJ, Chen X, Zhang M, Su P, Liu YJ, Tong YR, Gao W (2015). Molecular cloning and characterisation of farnesyl pyrophosphate synthase from *Tripterygium wilfordii*. *PLoS One*, 10 (5): e0125415
- Zhou LY, Mo G, Wang S, Tang JF, Yue H, Huang LQ, Shao AJ, Guo LP (2014). Stability analysis of reference gene based on real-time PCR in *Artemisia annua* under cadmium treatment. *Chin J Chin Mater Med*, 39 (5): 777–784 (in Chinese with English abstract) [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]

Selection of reference genes of *Atractylodes lancea* and its application in biosynthesis of active ingredients

SANG Xiao-Hua, GU Wei*, CHAO Jian-Guo, LIU Qing-Zhi, JIANG Ling, HAN Yun, ZHOU Yue-Zhang
College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: In this study, *18S rRNA*, β -*Actin*, *EF-1 α* , *GAPDH*, *UBQ1* and *UBQ2* were selected as candidate reference genes from the transcriptome databases of *Atractylodes lancea*, and the expression of six candidate reference genes in different tissues of *A. lancea* were analyzed under normal stage and drought stress, respectively, then the expression stability of the candidate reference genes was analyzed by using five methods of Delta CT, geNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder. The results showed that the expression of *UBQ2* and *EF-1 α* were stable under different physiological condition, while *EF-1 α* displayed the most stable under drought stress. On this basis, *UBQ2* were chosen as the reference gene to evaluate the expression characteristics of *HMGR* and *FPPS*, which were the key enzyme of the biosynthesis progress of active ingredients, during the early stage of anthesis. According to the results, they all had a highest expression in flowers and a lowest expression in stems and leaves.

Key words: *Atractylodes lancea*; real-time quantitative PCR; reference genes; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMGR); Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS)

Received 2017-02-22 Accepted 2017-08-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81573520), Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization (Grant No. ZDXM-3-24), Second Phase Construction of Jiangsu Traditional Chinese Medicine Superiority Discipline (Grant No. ysxk-2014), “Six Talent Peaks” High-Level Talent Project (Grant No. 2012-YY-009), and “333 High-Level Talents Training Project” in Jiangsu Province.

*Corresponding author (E-mail: guwei9926@126.com).