

姜 静, 王银磊, 赵丽萍, 等. 番茄 qRT-PCR 内参基因的筛选[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 389-396.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.024

番茄 qRT-PCR 内参基因的筛选

姜 静^{1,2}, 王银磊², 赵丽萍², 周 蓉², 李亚茹², 赵统敏², 余文贵^{1,2}

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 以高温、低温、盐胁迫、TYLCV 接种处理和对照的番茄幼苗为植物材料, 通过实时荧光定量 RT-PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 方法分析了常用的 8 个内参基因肌动蛋白基因 (*ACT*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*)、泛素基因 (*UBI*)、18S 核糖体 RNA 基因 (*18S*)、转录延伸因子基因 (*EF-1a*)、 β -微管蛋白基因 (*TUB*)、表达蛋白基因 (*EXP*) 和接合素蛋白复合物基因 (*CAC*) 在不同样本中的表达情况。利用 geNorm 和 NormFinder 软件分析筛选表达稳定性较高的内参基因。结果表明, 在不同胁迫处理条件下, *UBI* 和 *ACT* 的稳定性较高; 在同样的胁迫处理中, 8 个内参基因的表达稳定性不同。综合而言, 虽然 *UBI* 和 *ACT* 的稳定性同样较高, 但在 TYLCV 接种处理试验中 *ACT* 的稳定性相对较差, 而 *TUB* 和 *GAPDH* 表达较稳定, 故 *TUB* 和 *GAPDH* 可在 TYLCV 接种处理试验中作为番茄 qRT-PCR 的内参基因。

关键词: 番茄; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0389-08

Selection of tomato reference genes for qRT-PCR

JIANG Jing^{1,2}, WANG Yin-lei², ZHAO Li-ping², ZHOU Rong², LI Ya-ru², ZHAO Tong-min²,
YU Wen-gui^{1,2}

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, the tomato seedlings treated under high and low temperature, salt stress, TYLCV whiteflies vaccination and the relative controls were used as plant materials, and the expression levels of eight commonly used reference genes including actin (*ACT*), glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), ubiquitin (*UBI*), 18S ribosomal RNA (*18S*), transcription elongation factors (*EF-1a*), β -tubulin (*TUB*), expressed protein (*EXP*) and clathrin adaptor complexes (*CAC*) in different samples were analyzed through the qRT-PCR. The genes with stable expression levels were identified using geNorm and NormFinder softwares. The results showed that under different conditions of stress treatments, the stability of *UBI* and *ACT* were higher, while at the same stress treatment, the stability of expression of the eight reference genes were inconsistent. On the whole, the stability of *UBI* and *ACT* were equally high. In the TYLCV vaccination, the stability of *ACT* was relatively poor, so stably expressed *TUB* and *GAPDH* could be used as tomato reference genes for qRT-PCR.

收稿日期: 2016-05-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31401884); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140739); 江苏省自主创新基金项目 [CX(14)5012]; 江苏省农业科学院基本科研业务专项 [ZX(15)2003]

作者简介: 姜 静 (1989-), 女, 山东省烟台人, 硕士研究生, 主要从事番茄遗传育种研究。(Tel) 15895996723; (E-mail) 496399220@qq.com

通讯作者: 赵统敏, (E-mail) tmzhaomail@163.com; 余文贵, (E-mail) wenguiyu@mail.jaas.ac.cn

Key words: tomato; qRT-PCR; reference gene

基因的表达分析已广泛应用于生命科学的各个领域。基因表达分析对新基因的预测、基因功能的研究等具有重要作用。与传统常规 PCR 相比,实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 具有定量准确、灵敏度高、重复性好及高通量等特点,因而被广泛用于不同生物组织表达量的测定^[1-3]。利用 qRT-PCR 方法分析基因相对表达量时需要借助内参基因 (Reference gene) 作为参考标准进行校正。在基因表达研究中,最常用的内源性参照基因为持家基因 (Housekeeping genes)。持家基因为不受外部环境影响,在所有细胞中均要表达的一类基因,其产物是维持细胞基本生命活动所必需的^[4]。利用 qRT-PCR 方法分析基因表达时结果会受到多种因素的影响,例如 RNA 反转录合成效率、RNA 的质量、扩增效率以及分析方法等^[5]。为了避免这类误差的影响,在分析目标基因的表达量时需选择表达稳定性较高的内参基因作为校正标准^[6]。用内参基因做参照,其作用是校正上样量和上样过程中存在的试验误差,保证试验结果的准确性^[4]。然而,许多研究者发现,常用的内参基因在不同类型组织细胞、不同阶段器官发育和不同试验条件下,其表达量通常是不稳定的^[7-8]。在一种生物中表达稳定的内参基因在另一生物中表达可能并不稳定^[9-10]。使用表达不稳定的内参基因对靶基因表达量的分析可能有极大影响。盲目地使用内参基因,一方面可能使基因表达的微小差异难以发现,另一方面可能会出现错误甚至相反的结论^[11-12]。因此,针对不同的试验条件及样品类型选择合适的内参基因至关重要。

番茄品种繁多,作为传统的模式植物,对其各种功能基因在不同生长发育阶段或特定环境下差异表达的测定分析具有重要意义,而内参基因的高稳定性决定着表达量的真实性。番茄中常用的内参基因有肌动蛋白 (actin) 基因 (*ACT*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase) 基因 (*GAPDH*)、泛素 (ubiquitin) 基因 (*UBI*)、18S 核糖体 RNA (18S ribosomal RNA) 基因 (*18S*)、26S 核糖体 RNA (26S ribosomal RNA) 基因 (*26S*)、转录延伸因子 (transcription elongation factors) 基因 (*EF-1a*) 等^[13]。本试验选择 8 个候选内参基因,比较其在同

一试验条件下和不同试验条件下番茄植株中的表达情况,分析传统内参基因表达量的稳定性,以期为选择合适的内参基因进行靶向基因的表达分析提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验植株及其处理方法

选用抗番茄黄化卷叶病毒 (TYLCV) 的番茄材料 1227 和感病材料 MoneyMaker,将番茄种子播种在 50 孔的穴盘中温室培养,两个材料各 3 盘,同环境生长。待番茄幼苗长到三叶一心时,进行高温、低温、盐胁迫、TYLCV 接种处理,每个处理及对照各 40 株。高温处理:高温 (昼夜 40 °C) 处理在人工气候箱中进行,每天早晚浇 1 次水;低温处理:低温 (昼夜 5 °C) 处理也是在人工气候箱中进行,隔 1 天浇 1 次水;盐胁迫处理:在组培室中进行,隔 1 天浇 1 次盐水 (200 mmol/L NaCl) 约 1 L,植株生长温度控制在白天 23 °C,夜间 18 °C;TYLCV 接种处理:在小温室中以携带 TYLCV 病毒的烟粉虱刺吸番茄植株接种,植株和烟粉虱的生长温度为昼夜 27 °C。对照组植株的生长温度控制在白天 23 °C,夜间 18 °C,用不携带 TYLCV 病毒的烟粉虱接种,只浇清水。所有处理的光照时间为 6:00 到 22:00 (昼 16 h,夜 8 h)。7 d 后分别取样,每个处理的两个材料各随机选取 9 株,每 3 株混合取样,重复 3 次,分别用锡箔纸包好,做好标记,立即放于液氮中速冻,然后置于 -80 °C 超低温冰箱中贮藏备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 使用天根公司的 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用 1.00% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并用 EppendorfBioSpectrometer[®] 紫外/可见光分光光度计测定 $OD_{260/280}$ 值,检测总 RNA 的纯度和浓度。将 RNA 浓度调整一致后,按照 PrimeScript^{TM1st} Strand cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa 公司产品) 说明书要求,取 1 μg RNA 进行反转录反应。获得的 cDNA 产物稀释 5 倍后直接用于 qRT-PCR 或 -20 °C 贮藏备用。

1.2.2 内参基因选择和引物合成 8 个候选基因 *ACT*、*GAPDH*、*EF-1a*、*TUB*、*CAC*、*UBI*、*EXP* 和 *18S* 作

为 *qRT-PCR* 分析的参考基因。8 种内参基因的定量 *PCR* 引物序列见表 1。引物由金斯瑞生物科技有

表 1 番茄幼苗 *qRT-PCR* 检测中候选内参基因引物序列
Table 1 Primer sequences of tomato seedlings candidate reference gene by *qRT-PCR*

基因名称	缩写	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)	参考文献
肌动蛋白基因	<i>ACT</i>	CGGTGACCACTTTCCGATCT	62	[14]
		TCCTCACCGTCAGCCATTTT		
甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因	<i>GAPDH</i>	ACCACAAATTGCCTTGCTCCCTTG	110	[15]
		ATCAACGGCTCTTCTGAGTGGCTGT		
转录延伸因子基因	<i>EF-1a</i>	ATTGGAAATGGATATGCTCCA	100	[15]
		TCCTTACCTGAACGCCTGTCA		
β -微管蛋白基因	<i>TUB</i>	TTGGTTTTGCACCACTGACTTC	84	[14]
		AAGCTCTGGCACTGTCAAAGC		
接合素蛋白复合物基因	<i>CAC</i>	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	173	[16]
		ATTGGTGAAAAGTAACATCATCG		
泛素基因	<i>UBI</i>	TCGTAAGGAGTGCCTAATGCTGA	119	[15]
		CAATCGCCTCCAGCCTTGTGTGTA		
表达蛋白基因	<i>EXP</i>	GCTAAGAACGCTGGACCTAATG	183	[16]
		TGGGTGTGCCTTTTCTGAATG		
18S 核糖体 RNA 基因	<i>18S</i>	GGGCATTCTGATTTTCATAGTCAGA	98	[15]
		GTTCTTGATTAATGAAAACATCCT		

1.2.3 *qRT-PCR* 分析 以稀释 5 倍后的 cDNA 产物作为实时定量 *PCR* 的模板,配制 20 μ l 反应体系:SYBR[®] Premix *Ex Taq* (TliRNaseH Plus, 2 \times) 10.0 μ l, *PCR* 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ l, ROX Reference Dye II 0.4 μ l, 模板 cDNA 2.0 μ l, ddH₂O 6.8 μ l。 *PCR* 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共 40 个循环(根据不同条件进行适当改变)。扩增结束后直接进行熔解曲线分析检测扩增产物的特异性, 6595 $^{\circ}$ C 下连续测定样品的荧光强度获得熔解曲线, 反应仪器为 ABI QuantStudio 6 Real-Time *PCR* System, 由荧光定量 *PCR* 仪自动读取数据。

1.2.4 数据处理和分析 *qRT-PCR* 结束后, 从 ABI QuantStudio 6 Real-Time *PCR* System 荧光定量 *PCR* 仪中导出 *Ct* 值, 换算各基因的相对表达量为 $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{\text{最小}} - Ct_{\text{样品}}$)。用 geNorm 软件^[11] 分析换算的各基因相对表达量, 获得各处理条件下内参基因

的稳定值 (*M*), geNorm 软件的默认值为 1.5。对内参基因的表达稳定度进行排序 (*M* 越小, 表达越稳定), 并通过标准化因子配对差异分析 $V_{n/n+1}$ (阈值为 0.15) 判定内参基因的最适数量。此外, 还应用 NormFinder 软件^[9] 对 8 个候选内参基因的表达稳定性进行统计学分析, 从而筛选出最优的内参基因, 并与 geNorm 软件分析结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 内参基因引物的特异性分析

对提取的各样品总 RNA 用 1.00% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果表明, 各样品总 RNA 均显示出整齐的 rRNA 条带, 都含有 28S、18S 和 5S 3 条带, 28S 和 18S 条带亮度清晰, 5S 条带亮度较弱, RNA 的完整性比较好, 没有明显的降解现象。利用 EppendorfBioSpectrometer[®] 紫外/可见光分光光度计检测所有样品 RNA 的 $OD_{260/280}$ 值, 均在 1.9 至 2.1 之

间,表明提取的 RNA 纯度较好,可以满足后续试验的要求。

qRT-PCR 熔解曲线分析结果显示,8 个内参基因的熔解曲线都有很明显的单一峰,不存在引物二

聚体(图 1)。说明每个内参基因的引物均有很好的特异性,引物设计合理,qRT-PCR 反应专一性高,结果准确可靠,在后续试验中可以满足实时定量分析对引物的要求。

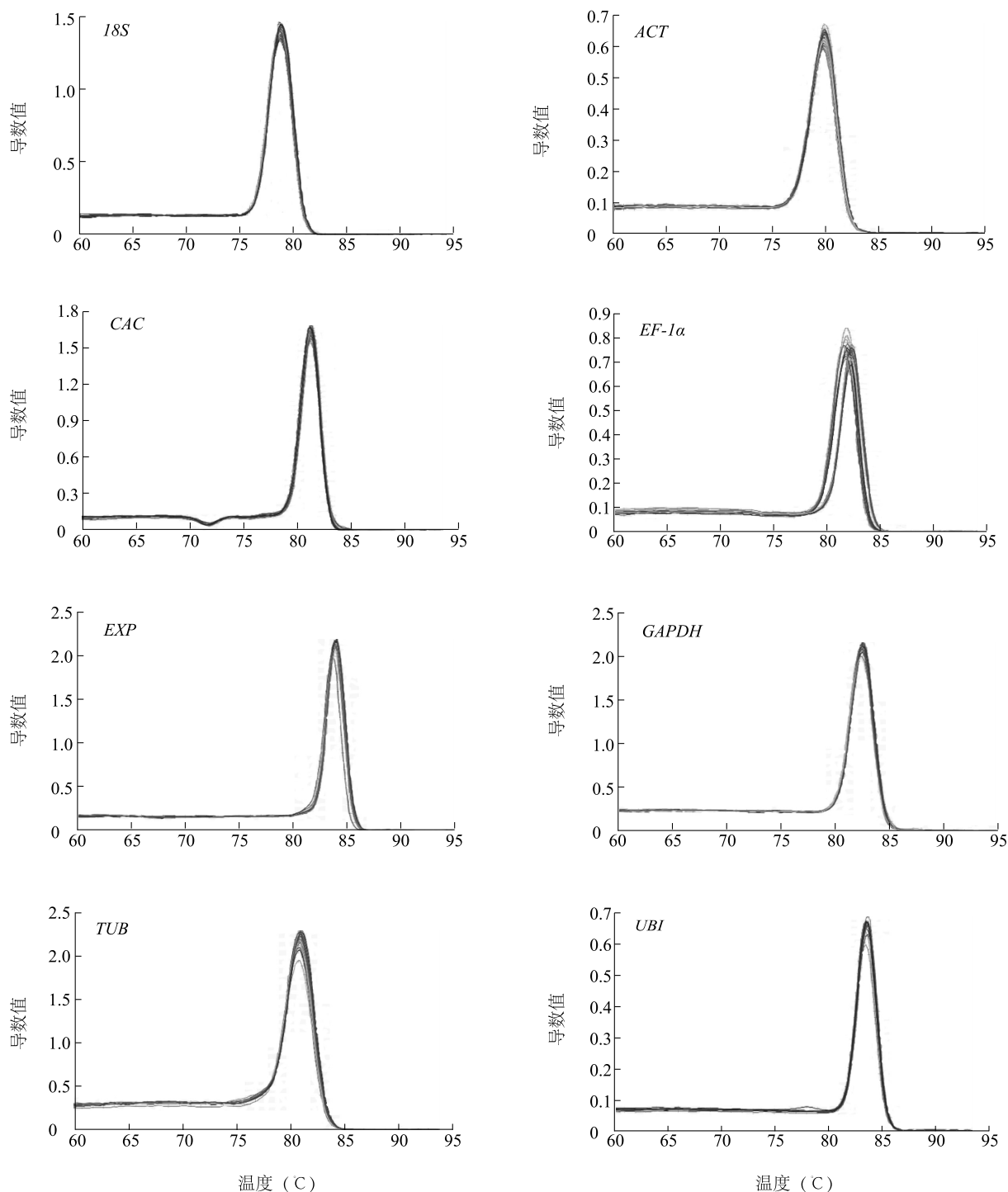


图 1 8 个内参基因的熔解曲线

Fig.1 Melting curves of eight reference genes

2.2 不同试验条件下内参基因的表达稳定性

利用 geNorm 和 NormFinder 软件对番茄内参基因在不同试验条件下的表达稳定性分别进行分析。用 geNorm 软件对候选的 8 个内参基因在各样品中的相对表达量进行统计分析,计算各内参基因的表达稳定值(M),对 8 个内参基因的表达稳定性进行排序。 M 值与基因的稳定性呈负相关,即 M 值越小,稳定性越高。在不同试验条件下 8 个候选内参基因的表达稳定性排序为 $ACT = CAC > UBI > GAPDH > TUB > 18S > EXP > EF-1\alpha$ 。其中 EXP 和 $EF-1\alpha$ 的 M 值大于 geNorm 软件的默认值 1.5,稳定性相对较差,可删除,重新计算剩余的 6 个候选基因。由图 2 可知, ACT 、 CAC 和 UBI 排在第 1、2 位,在 8 个候选基因中最稳定。

同样,通过 NormFinder 软件分析这 8 个候选内参基因的表达稳定性,稳定值越小基因的表达越稳定。其稳定性排序为 $UBI > ACT = GAPDH > CAC = TUB > EXP > 18S > EF-1\alpha$ 。其中最稳定的内参基因也是 UBI 和 ACT ,与 geNorm 软件分析的结果基本一致。所以 UBI 和 ACT 更适合作为 qRT-PCR 的内参基因用于不同试验条件下样品的校正。

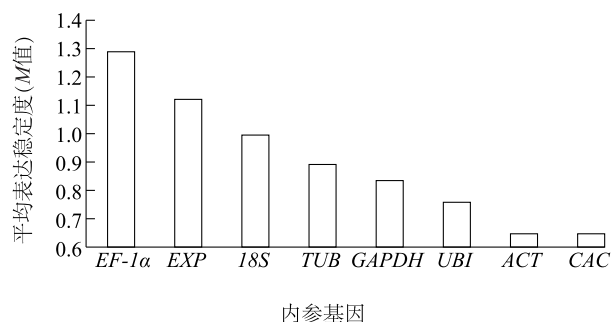


图2 geNorm 软件分析的各内参基因表达稳定值

Fig.2 Expression stability values of reference genes calculated by geNorm

2.3 同一试验条件下内参基因的表达稳定性

应用 geNorm 软件对候选的 8 个内参基因在不同试验条件下各样品中的相对表达量进行统计分析,通过计算基因表达稳定值(M),可筛选出最适合的内参基因。而在 qRT-PCR 分析基因表达时,使用 1 个内参基因校正往往达不到试验要求,造成的试验误差要比使用 2 个以上内参基

因高得多,geNorm 软件可以用于确定不同试验条件下最适内参基因的数量,并选择出最优组合,而不是简单地使用单一内参基因。通过 geNorm 软件分析内参基因的配对差异值($V_{n/n+1}$),软件默认为 0.15,当 $V_{n/n+1}$ 大于 0.15 时,需要引入第 $n+1$ 基因;当 $V_{n/n+1}$ 小于 0.15 时,则不需要引入新的内参基因。geNorm 软件分析结果表明,在低温条件下 8 个内参基因中最稳定的基因是 ACT 和 UBI (图 3),对 8 个内参基因的配对差异值($V_{n/n+1}$)进行分析,结果(表 2)显示低温处理时 $V_{2/3}$ 为 0.109 小于 0.15,所以可不必引入第 3 个内参基因进行校正,内参基因最理想数目为 2 个,即 ACT 和 UBI 。在高温条件下 8 个内参基因中最稳定的为 ACT 和 UBI , EXP 最不稳定(图 3),配对差异值($V_{2/3}$)为 0.196,大于 0.150。而 $V_{3/4}$ 为 0.124,小于 0.150。所以需要引入第 3 个内参基因进行校正,内参基因合适数目为 3 个,即 ACT 、 UBI 和 $18S$ 。在 TYLCV 烟粉虱接种处理条件下最稳定的基因为 TUB 和 $GAPDH$, $18S$ 稳定性较差(图 3),配对差异值($V_{2/3}$)为 0.106,小于 0.15,理想内参基因数为 2 个,即 TUB 和 $GAPDH$ 。盐胁迫处理条件下 8 个内参基因中表达最为稳定的为 ACT 和 CAC (图 3),对这 8 个内参基因的配对差异值($V_{n/n+1}$)进行分析,结果(表 2)显示,配对差异值($V_{2/3}$)为 0.158,大于 0.15,直至 $V_{7/8}$ 都大于 0.15,所以需重新选择内参基因。在对照中 ACT 和 UBI 最为稳定(图 3),配对差异值($V_{2/3}$)为 0.110 小于 0.15,可不必引入第 3 个内参基因进行校正,2 个理想内参基因为 ACT 和 UBI 。

同样, NormFinder 软件分析结果(表 3)显示,低温条件下 8 个候选内参基因中最稳定的内参基因为 UBI ,最不稳定的是 CAC ;在高温条件下最稳定的为 UBI ,最不稳定的是 EXP ;在 TYLCV 烟粉虱接种处理条件下最稳定的内参基因为 TUB ,最不稳定的基因是 $18S$,与 geNorm 软件的分析结果一致。在盐胁迫处理条件下 8 个候选内参基因的表达稳定性顺序为: $EF-1\alpha > UBI > CAC > TUB > ACT > 18S > GAPDH > EXP$,与 geNorm 软件的分析结果不尽一致,但总体相近。在对照中 8 个候选内参基因中最稳定的为 UBI ,与 geNorm 软件分析结果一致。

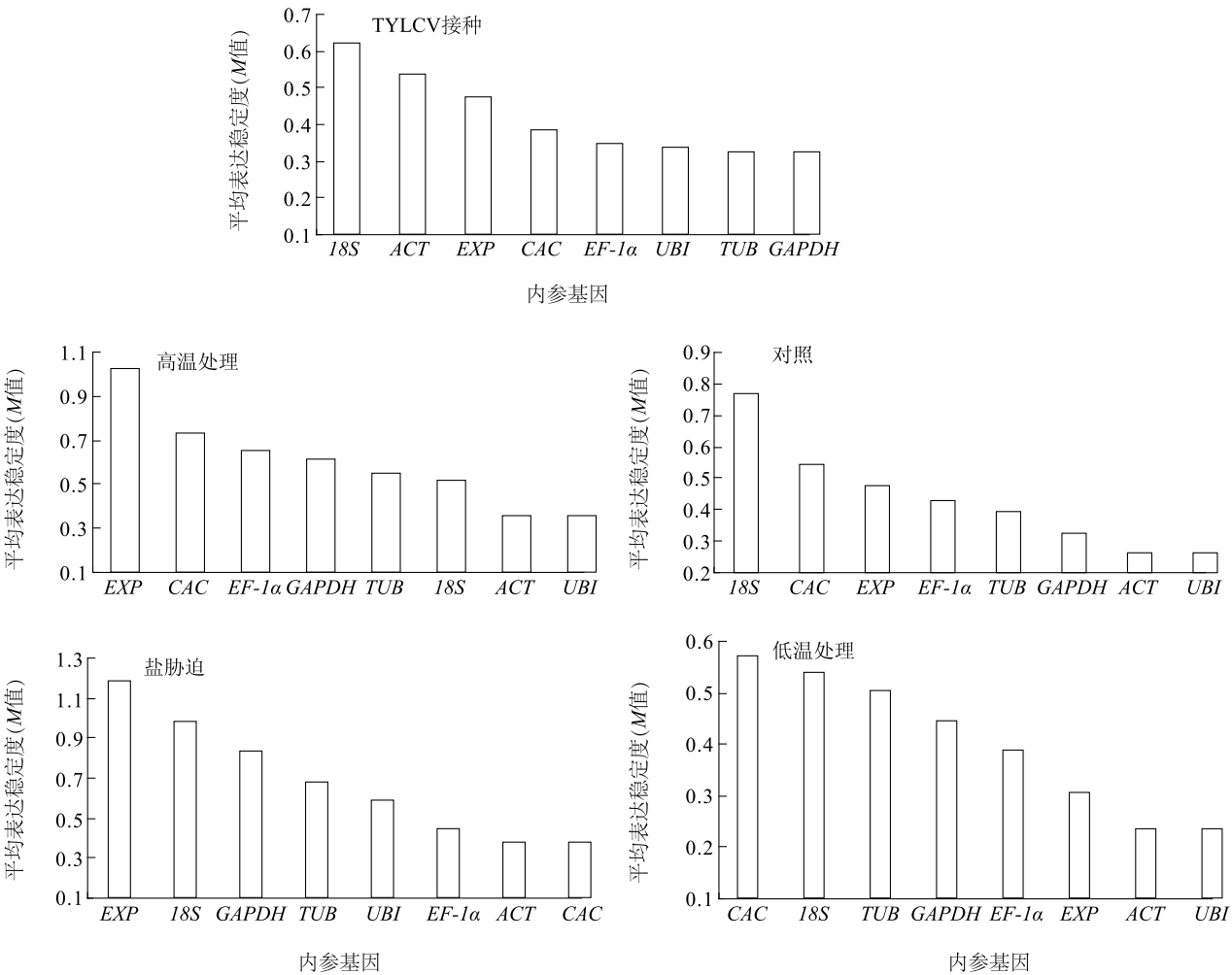


图3 geNorm 软件分析的各内参基因表达稳定值
Fig.3 Expression stability values of reference genes calculated by geNorm

表 2 geNorm 软件分析的不同处理中 8 个内参基因的配对差异值
Table 2 The pairwise variation of eight reference genes calculated by geNorm under different treatments

处理	配对差异值					
	$V_{2/3}$	$V_{3/4}$	$V_{4/5}$	$V_{5/6}$	$V_{6/7}$	$V_{7/8}$
低温	0.109	0.109	0.097	0.093	0.078	0.070
高温	0.196	0.124	0.126	0.099	0.123	0.238
TYLCV 接种	0.106	0.078	0.075	0.104	0.088	0.100
盐胁迫	0.158	0.172	0.155	0.173	0.177	0.207
对照	0.110	0.104	0.091	0.084	0.093	0.178

综合 geNorm 和 NormFinder 两种软件分析结果,虽然在不同的处理条件下,可能所有内参基因的稳定性都小于 1.5,理论上都可以作为内参使用,但是本研究为不同试验条件筛选出最为稳定的内参作

为校正内参基因。例如在含 TYLCV 病毒的烟粉虱接种处理条件下 8 个候选内参基因中稳定的内参基因为 *TUB*、*GAPDH*、*UBI*, 18S 最不稳定,而 *ACT* 稳定性也相对较差;对照(正常生长未受烟粉虱接种)条

件下 8 个候选内参基因中稳定的内参基因为 *UBI*、*ACT*、*GAPDH*、*TUB*, 最不稳定的也为 18S, 所以 *UBI* 和 *GAPDH* 更适合作为 qRT-PCR 的内参基因用于后续 *TYLCV* 基因表达试验条件下样品的校正。

表 3 NormFinder 软件分析的不同处理条件下内参基因的稳定性
Table 3 Stable values of reference genes analysed by NormFinder under different treatment conditions

基因	低温处理		高温处理		TYLCV 接种处理		盐胁迫处理		对照	
	稳定值	排序	稳定值	排序	稳定值	排序	稳定值	排序	稳定值	排序
<i>ACT</i>	0.196	2	0.319	4	0.397	6	0.541	5	0.096	2
<i>UBI</i>	0.135	1	0.125	1	0.269	4	0.141	2	0.093	1
<i>EF-1α</i>	0.280	3	0.290	3	0.200	3	0.085	1	0.280	5
<i>18S</i>	0.343	7	0.326	5	0.543	8	0.779	6	0.980	8
<i>EXP</i>	0.291	4	1.312	8	0.402	7	1.132	8	0.410	6
<i>TUB</i>	0.313	6	0.482	6	0.107	1	0.453	4	0.180	4
<i>CAC</i>	0.377	8	0.667	7	0.287	5	0.340	3	0.496	7
<i>GAPDH</i>	0.310	5	0.131	2	0.196	2	0.782	7	0.151	3

3 讨 论

在荧光定量 PCR 中合适、稳定的内参基因是识别目的基因准确表达模式的关键因素^[17]。理想的内参基因应在所有组织、细胞类型中均有表达,在细胞组成及基本功能的维持中起着重要作用,在不同环境和试验条件下能稳定表达,不受任何内外因素的影响^[18-19]。但任何一个内参基因的稳定性都是相对的,同一物种同一内参基因的稳定性,在不同生理条件下通常并不稳定,而在不同物种中同源内参基因也没有绝对的通用性,它们的稳定性也不完全相同^[4]。许多研究证实,理想的内参基因并不存在,不同的处理因素以及不同组织中内参基因表达的稳定性是不一致的^[20-22]。因此,在利用 qRT-PCR 进行目的基因表达的研究时,应根据不同的试验条件、试验样品筛选合适稳定的内参基因^[23]。

本研究用 geNorm 和 NormFinder 软件对候选内参基因进行评估,并通过试验对其做了进一步的筛选验证。用 geNorm 软件评估内参基因时通常考虑 2 个主要参数,即稳定值 (*M*) 和配对差异值 (*V_{n/n+1}*)。通过计算内参基因表达稳定性的 *M* 值,进而分析内参基因在不同样品中的表达稳定性,*M* 值越大稳定性越差,*M* 值越小稳定性越好。配对差异值 (*V_{n/n+1}*),可用于确定不同试验条件下最适内参基因的数量和最优组合,而不是使用单一的内参基因,这样有利于系统偏差的校正,从而获得更加可信

的表达分析结果。NormFinder 软件是通过测定每个基因的稳定性来估计基因表达稳定性,评价候选内参基因的整体和样本子群之间的变化^[24]。NormFinder 软件的运行原理与 geNorm 软件类似,也是通过计算内参基因的表达稳定值来评估稳定性,值越大稳定性越差,值越小稳定性越好。这 2 个软件都是基于候选基因实时定量 PCR 的 *Ct* 值而设计,尽管各自的计算原理和方法不同,但两者分析的结果基本相近,2 个软件的综合利用可提高筛选稳定内参基因的可靠性。本研究通过两个软件分析的结果表明,在不同试验处理条件下 *UBI* 和 *ACT* 在 8 个候选基因中最稳定,而在同一试验条件下 8 个候选基因的表达稳定性又是不同的。说明同一内参基因在不同试验条件下其稳定性是不一致的。

因此,在基因定量表达的分析研究中,需借助不同的内参基因稳定性评价软件来筛选在不同试验条件、不同组织器官和不同试验样品中能稳定表达的合适内参基因,对试验进行校正和标准化处理,以减少不必要的试验误差,从而获得目标基因特异性表达的真正差异。

参考文献:

[1] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR a perspective [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34(3): 597-601.

[2] NOLAN T, HANDS R E, BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. Nature Protocols, 2006, 1(3):

- 1559-1582.
- [3] GINZINGER D G. Gene quantification using Real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream[J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30(6): 503-512.
- [4] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(8): 1119-1125.
- [5] MAROUFI A, BOCKSTAELE E V, LOOSE M D. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11(1): 15.
- [6] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择[J]. *植物学报*, 2012, 47(4): 427-436.
- [7] MASCIAT T, SANTOVITO E, GALLITELLI D, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants [J]. *Mol-Plant Pathol*, 2010, 11(6): 805-816.
- [8] HRUZT T, WYSS M, DOCQUIERM M, et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 156.
- [9] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTOF 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 Res*, 2004, 64: 5245-5250.
- [10] HELLEMANS J, MORTIER G, DE PAEPE A, et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(2): 19.
- [11] 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 Biol*, 2002, 3(7): 34.
- [12] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations [J]. *Genes Immun*, 2005, 6: 279-284.
- [13] 王艳, 刘瑜. 番茄实时定量PCR内参基因选择的研究进展[J]. *北方园艺*, 2015(23): 198-201.
- [14] ALFENAS-ZERBINIP, MAIAIG, FAVARORD, et al. Genomewide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a Potyvirus [J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2009, 22(3): 352-361.
- [15] MASCIAT, SANTOVITO E, GALLITELLI D, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(6): 805-816.
- [16] EXPOSITO-RODRIGUEZ M, BORGES A, BORGES-PEREZA, et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process [J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(1): 131.
- [17] WAN H, ZHAO Z, QIAN C, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. *Anal Biochem*, 2010, 399(2): 257-261.
- [18] 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 Biol*, 2002, 3(7): 34.
- [19] TONG Z G, GAO Z H, WANG F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009, 10(1): 1-13.
- [20] MOHELNIKOVA-DUCHONOVA B, OLIVERIUS M, HONSOVA E, et al. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2012, 32: 203-210.
- [21] ALBERSHARDT T C, IRITANI B M, RUDELL A. Evaluation of reference genes for quantitative PCR analysis of mouse lymphocytes [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 384: 196-199.
- [22] LUO H L, LUO K C, LUO L P, et al. Evaluation of candidate reference genes for gene expression studies in *Cymbidium kanran* [J]. *Sci Hort*, 2014, 167: 43-48.
- [23] 代红军, 秦晨亮, 徐伟荣. 赤霞珠葡萄发育后期 RT-PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(3): 668-673.
- [24] FERREIRA E, CRONJÉ M J. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR in apoptosis-induced MCF-7 breast cancer cells [J]. *Mol Biotechnol*, 2012, 50: 121-128.

(责任编辑: 张震林)