DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201609013
引文格式: 陈玉连, 张涛, 董登峰. 低磷胁迫大豆 RT-qPCR 内参基因的筛选及谷胱丙肽合成代谢酶的表达 [J]. 广西植物, 2017, 37(8): 1008-1018
CHEN YL, ZHANG T, DONG DF. Selection of reference genes for RT-qPCR and expression of genes involved in homoglutathione anabolism in soybean under stress of phosphorus deficiency [J]. Guihaia, 2017, 37(8):1008-1018

低磷胁迫大豆 RT-qPCR 内参基因的筛选及谷胱丙肽合成代谢酶的表达

陈玉连, 张 涛, 董登峰*

(广西大学 农学院, 南宁 530005)

摘 要: 谷胱丙肽在作物耐低磷中起重要作用,而选择稳定的内参基因是保证实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)结果准确的前提。该研究检测了低磷和正常条件下两个不同磷效率的大豆品种根叶中 15 个内参基因的表达,GeNorm、NormFinder、BestKeeper、ΔCt 对比和 RefFinder 分析表明 *PSC*、*TUB* 和 18*sRNA* 的稳定性最好;同时以这 3 个基因为内参,检测了不同磷胁迫时期谷胱丙肽合成代谢中两个关键基因谷氨酸半胱氨酸合成酶(γ-*ECS*)和谷胱丙肽合成酶(*hGSHS*)的表达水平。结果表明:低磷胁迫下,磷低效品种桂香 1 号(GX1)根叶中 γ-*ECS* 和 *hGSHS* 的相对表达量(Fold change, FC)都随着胁迫时间延长而减少;磷高效品种桂夏 2 号(GX2)根叶 γ-*ECS* 以及根中的 *hGSHS* 的相对表达量都随着胁迫时间延长而增加,而叶片中 *hGSHS* 的相对表达量随胁迫时间增加而降低。谷胱丙肽合成酶基因表达差异可能是品种磷效率差异的原因。该研究结果为大豆低磷抗性分子机理研究提供了理论依据。

关键词: 大豆, 内参基因, 实时荧光定量 PCR, 谷胱丙肽合成代谢, 低磷
中图分类号: Q945 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-3142(2017)08-1008-11

Selection of reference genes for RT-qPCR and expression of genes involved in homoglutathione anabolism in soybean under stress of phosphorus deficiency

CHEN Yu-Lian, ZHANG Tao, DONG Deng-Feng*

(*Agricultural College*, *Guangxi University*, Nanning 530005, China)

Abstract: Selection of stable reference gene(s) is the prerequisite for RT-qPCR analysis. Homoglutathion plays an important roles in utilization of phosphate in plants. In this study, the expression of fifteen candidate reference genes were determined in two soybean varieties differing in phosphorus efficiency under normal and stress of low phosphorus availability. Fifteen candidate reference genes were validated by GeNorm, NormFinder, BestKeeper and ΔCt comparision and

收稿日期: 2016-11-02 **修回日期**: 2016-12-21
基金项目: 国家自然科学基金 (31160054) [Supported by the Natural Science Foundation of China(31160054)]。
作者简介: 陈玉连(1992-),女,广西玉林人,硕士,主要研究方向为植物分子生物学,(E-mail)chenyulian1608@ hotmail.com。
*通信作者: 董登峰,博士,教授,主要研究方向为植物分子生物学,(E-mail)dongdfxy@ 163.com。

RefFinder analysis, and out of those, the three most stable genes, *PSC*, *TUB* and 18*sRNA*, were used to normalize the expression of two genes, *γ-glutamylcysteine synthetase* (*γ-ECS*) and *homoglutathione synthetase* (*hGSHS*), involved in homoglutathion anabolism. In the low P efficient soybean variety GX1, the expression fold changes (FC, as compared to normal) of *γ-ECS* and *hGSHS* in roots and leaves all decreased with the rise of stress duration; while in the high P efficient variety GX2, the FCs of *γ-ECS* in roots and leaves, as well as *hGSHS* in roots increased with the increase of stress duration; except that *hGSHS* in leaves decreased. The results suggest that the difference of gene expression might account to the phosphorus utilization efficiency.

Key words: soybean, reference gene, homoglutathione anabolism, RT-qPCR, phosphorus deficiency

实时荧光定量 PCR(real-time quantitativereverse transcription PCR,RT-qPCR)因具有定量准确、灵敏度高、重复性好、高通量等特点,已广泛应用于基因的表达分析(Valasek & Repa, 2005),但在 RT-qPCR 过程中易受到 RNA 提取、逆转录过程和 PCR 扩增效率等因素影响,导致目标基因真实表达值与实验值间存在差异。为获得真实可靠的实验结果,需引入稳定表达的内参基因对目的基因的表达量进行均一化处理,但目前未发现任何一个内参基因能够在所有实验环境下稳定表达,只有在特定的实验处理下,在一定的组织和细胞中,存在某些相对恒定表达的内参基因(Suzuki et al,2000)。如在甜樱桃的营养器官中,最适合的内参基因为 *CYP*2,而在生殖器官中,最适合的内参为 *SAND*-2(张芳明,2013);吝爱月(2012)对玉米的研究显示,*CYP* 是低温和铝毒胁迫下稳定性最强的内参基因;*EFl-α* 是高温和盐胁迫下最合适的内参基因;*TUB* 是干旱胁迫下最合适的内参基因等;还有针对茶树(Hu et al,2009)、菠萝蜜(汪永保等,2014)、芝麻(刘莉铭等,2012)等植物内参基因的筛选,发现其结果也不尽相同。由于内参基因的稳定性存在差异,研究者需根据自己的实验要求来筛选相对稳定的内参基因。

大豆(*Glycine max*, soybean)是我国主要的油料作物,是全人类最主要植物性蛋白质的来源之一,在医学、工业生产、畜牧养殖业方面也有很大价值。南方土壤中的磷易与铝形成沉淀,大豆不能有效吸收磷元素,缺磷成为了南方地区影响大豆产量主要问题之一。谷胱甘肽(glutathione,GSH)是一种抗氧化剂,通过 Asada-Halliwell 途径清除活性氧、保护植物体内生物大分子的巯基(-SH) 在生物体内能保护 DNA、蛋白质和其他生物分子抵抗氧化损伤,其在生物体抵抗各种胁迫(冷害、干旱、重金属、真菌等)的过程中起重要作用(Lxppartient et a1,1999)。大豆中谷胱丙肽(homoglutathione,hGSH)几乎具有 GSH 的全部功能(Hopkins,1929)。hGSH 的生物合成分两步完成,首先 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-glutamylcysteine synthetase, γ-ECS)催化 L-谷氨酸和 L-半胱氨酸下合成 γ-谷氨酸半胱氨酸(γ-glutamylcysteine, γ-EC);然后在谷胱丙肽合成酶(homoglutathione synthetase, GSHS)的催化下,丙氨酸被添加在 γ-谷氨酸半胱氨酸 C-末端生成 hGSH。γ-ECS 和 hGSHS 被认为是 GSH 生物合成过程中的关键酶,其含量水平的高低与植物对各种环境胁迫的忍耐程度有关。γ-ECS 和 hGSHS 是由 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 独立进化的,*γ-ECS* 可能起源于蓝细菌,hGSHS 出现后,真核细胞和大多细菌才分别独立的进化获得 *hGSHS*(Copley & Dhillon,2002)。拟南芥 *GSHS* 序列与其它真核生物的 cDNAs 具有很高的序列同源性,而 *γ-ECS* 序列却有很大差异(May,1994)。*γ-ECS* 和 *hGSHS* 的表达量高低与植物抗逆性有密切相关。

目前,尚未见有对大豆低磷胁迫下内参基因稳定性的相关报道。本研究旨在探讨大豆在低磷胁迫下相关 15 个内参基因表达稳定性,根据内参基因的筛选结果,用于研究低磷胁迫下谷胱丙肽合成代谢过程中的 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 的两个关键基因的表达水平,为大豆低磷抗性分子机理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1 材料和胁迫处理

以大豆磷低效品种桂香 1 号(简称 GX1)和磷高效品种桂夏 2 号(简称 GX2)为材料,大豆由广西农业科学研究院经济作物研究所提供。

挑选饱和度相当的种子,使用 30% 的 H_2O_2 消毒

表 1 15 个内参基因引物序列和扩增效率

Table 1 Primer sequences and PCR efficiency of fifteen reference genes

内参基因 Reference gene	登录号 GenBank	引物 Primer	扩增长度 Amplication length (bp)	扩增效率 PCR efficiency (%)
18*sRNA*	X02623	F:GCCCTTTGTACACACCGCCC	103	90.46
		R:TTCTCACAACGTCGCGGGCA		
ACT	AW350943	F:TCGTATGAGCAAGGAAATTGG	101	91.80
		R:TAGAGCCACCAATCCAGACAC		
ATP	CA801096	F:GCAAGCTCTATAGGCCAGGAT	119	98.01
		R:CTCCAATGTCAATGCCTTCAT		
CYP	BQ453702	F:TGTGTCAGGGTGGCGACTTCA	101	98.50
		R:TTCGCCATGGAGAGGATGCC		
EFl-α	DQ235094	F:AGTCCTGAAACTCGCTGCGCT	111	93.38
		R:GGGTTCTTGATCGACGGTGGCA		
EFl-β	BM270158	F:AGCAAGCATGGCAGTCACACT	95	91.36
		R:ACCCGGTGATGTAGCTGCGT		
G6PDH	HQ651809	F:CGGTGCTGCTAGAGGATGGGAA	150	109.23
		R:AGCAAGATCCCCAGAAGCGC		
PE	AI938444	F:TTCTGGAGTTGGAGGACACTG	100	93.14
		R:GGCATCTTAACAGCAGAAGCA		
PP2A	CA802098	F:TGCAGCACATACTTCCTCAGGT	107	91.18
		R:AGGGCCCATCACAGGAGCAA		
PSC	BG508491	F:GGCTGCATTAGAGATGCTGAA	93	90.80
		R:AGAGATCACATCTCAGCAACCA		
TIF	CD391856	F:TCCAACTCGGACCAATACAAG	90	93.46
		R:GTTAGTGCCCACAGCATAACC		
TUB	CD394504	F:CTCGTCATCGATCTCGTTCTC	106	103.11
		R:TGGATGAGATGGAGTTTACCG		
*UNK*1	BU548932	F:CTTCCACCATGTCTGGTAAAGA	100	101.33
		R:CTAGAAGGTGCAGTGCGTGTT		
*UNK*2	CD392706	F:ATTTTCCTCCTCAACGTTTGC	142	93.92
		R:GGAGTGAAGGAAGCTTGGTCT		
Letin	DQ235094	F:TGGGACAGCGAAACCGGCAA	140	108.03
		R:CCATCGTCGGATTGGGGCTGA		

浸泡 1 min,转入饱和的 $CaSO_4$ 中浸泡 30 min,放入湿润的沙子中培养,待第一片复叶长出后,移栽到 1/5 Hoagland 营养液中水培。培养期间实验组进行低磷(1/5Hoagland 营养液,其中 KH_2PO_4 终浓度为 0.2 μmol · L^{-1},pH = 4.5)和对照处理(1/5 Hoagland 营养液,pH = 4.5),2 d 换 1 次营养液,每小时通气 10 min,每天的 8:00 和 18:00 各调节 1 次 pH(李艳英等,2012),收集胁迫处理 2、4、8、12、16 d 的大豆根尖和叶片样品,液氮速冻后存于-80 ℃冰箱备用。

1.2 RNA 的提取和逆转录

总 RNA 的提取按照植物 RNA 提取试剂盒(北京康为世纪)操作说明进行,RNA 提取结果用凝胶电泳和 Nanodrop 2000 检测其浓度和纯度,当 28SrRNA 和 18SrRNA 条带清晰,A260/A280 的值在

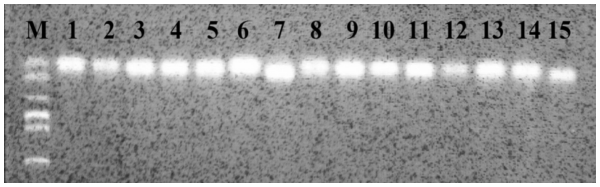

图 1　15 个内参基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1　Agarose electrophoresis analysis of the PCR products of fifteen reference genes in soybean　**M.** DL2000 Marker; **1.** 18*sRNA*; **2.** *ACT*; **3.** *ATP*; **4.** *CYP*; **5.** *EFl-α*; **6.** *EFl-β*; **7.** *G6PDH*; **8.** *PE*; **9.** *PP2A*; **10.** *PSC*; **11.** *TIF*; **12.** *TUB*; **13.** *UNK*1; **14.** *UNK*2; **15.** *Letin*.

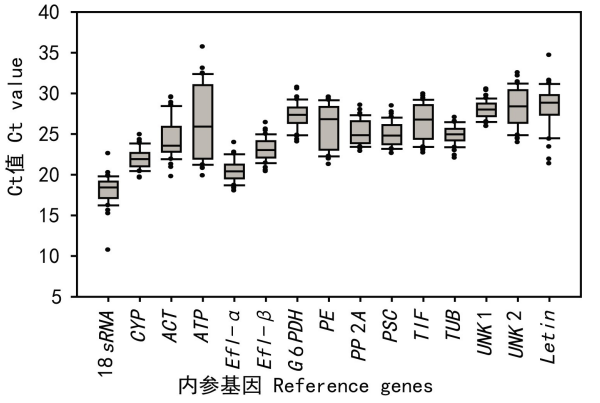

图 2　Ct 值分布图　箱体由上至下的横线分别表示 上限、上四分数、中位数、下四分数、下限；箱体外的黑点表示异常值。

Fig. 2　Distribution of Ct values　Each box from top to bottom mean maximun, upper quartile, median, lower quatile, minimum. The black spots mean outliers.

1.8~2.2 之间，A260/A230 在 2.0 以上，则用于后续实验；逆转录按参照反转录酶（Takara，大连）说明书合成 cDNA 第一链，并于−20 ℃保存备用。

1.3 内参基因和目的基因引物的设计和合成

于 NCBI 查找出 15 个内参基因 18*sRNA*、*ACT*、*ATP*、*CYP*、*EFl-α*、*EFl-β*、*G6PDH*、*PE*、*PP2A*、*PSC*、*TIF*、*TUB*、*UNK*1、*UNK*2、*Letin* 序列，用 Primer3.0 软件设计引物，引物合成交由上海生工公司完成，引物序列见表 1。

1.4 内参基因 RT-qPCR 体系

采用 Bio-RAD CFX96 定量 PCR 仪，2×SYBR Green mix（北京康为世纪）试剂进行内参基因 RT-qPCR。10 μL 体系，含 2×SYBR mix 5 μL；上、下游引物各 0.5 μL；cDNA 0.5 μL；ddH_2O 3.5 μL。RT-qPCR 扩增程序：95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s；65 ℃/60 ℃ 30 s；40 个循环；65~95 ℃生成熔解曲线，每升高 0.5 ℃保持 5 s，4 个生物学重复，当基因的溶解峰为单一峰，无杂峰，无二聚体，扩增曲线重复性良好，则进行后续实验。

1.5 内参基因引物扩增效率的计算

取样品 cDNA，以 10 倍稀释为 6 个梯度，浓度由 10^0 递减至 10^{-5}。cDNA 的稀释梯度作横坐标，检测到的 Ct 值作为纵坐标，绘制标准曲线。根据公式 $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)\times100\%$ 来计算扩增效率，待内参基因的 E 的值在 90%~110%，$R^2>0.99$ 时，即可往下实验，引物扩增效率如表 1。

1.6 内参基因稳定性数据分析

取各个样品进行 RT-qPCR，收集检测到的每个样品 Ct，用 excel 处理数据。以 Genorm（Vandesompele et al，2002）、NormFinder（Andersen et al，2004）、BestKeeper（Pfaffl et al，2004）和 ΔC 对比（Silver et al，2006）来分析内参基因的稳定性，最后用 RefFinder（Xie，2012）综合评价筛选出最稳定的内参基因。GeNorm 和 NormFider 程序需要将 Ct 值转化成 Q 值才能进行分数据分析，转化公式为 $Q=E^{\text{Ct sample}-\text{Ct min}}$（$E$ 为扩增效率，当扩增效率接近 100% 时，E 通常默认为 2。Ct sample 为该基因在样品中的 Ct 值，Ct min 为该基因在样品中的最小 Ct 值）。

1.7 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 合成及检测

实验扩增 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 的基因片段，引物设计（*hGSHS*，F：ACAACACCACCTTTCCCTT，R：ATCAGCAGCAGCCTCTTCA，Genbank：NM001250121.1；*γ-ECS*，F：CCTTGTCCGTCCAGTCCTTATT，R：TCAGTGGCAACTACAGCGTCTT，Genbank：XM006580527.2）、合成、扩增效率计算方法同内参基因。最后以 DL2000 Marker 为标记，1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物，选取与预期大小一致条带用琼脂糖胶回收试剂盒（Takara，大连）回收，回收产物连接到 pMD18-T 载体（Takara，大连），转化大肠杆菌（DH5α）感受态细胞，涂抹于含 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上，进行蓝白斑筛选，测序交由上海生工公司完成，测序结果无误后，进行荧光定量 PCR，定量数据采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法（Livak & Schmittgen，2001）计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 内参基因荧光定量 PCR 结果

以大豆不同材料来源的第 1 链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,经过琼脂糖凝胶电泳证实,在 80~250 bp 之间均存在较亮的特异条带, 与引物设计的预期片段大小一致,说明扩增反应具有较高的专一性,为内参基因的目标片段,如图 1 所示。

2.2 Ct 的可靠性分析

根据 RT-qPCR 得到的 Ct 值可比较基因表达的丰度。Ct 值越高,表明该基因表达的 mRNA 含量就越低,反之,则 mRNA 含量越高。结果如图 2 所示,15 个内参基因在 40 个样本中的平均 Ct 值在 15~35 之间,主要集中在 20~30 之间,每个基因在样品中存在不同范围的波动,从图 2 可以看出分布范围最大的基因是 *ACT*,Ct 值差值达到 15.84。*CYP* 的 Ct 值分布最集中,在所有样本中 18*s rRNA* 所有样本中的的 Ct 值最低,说明它们的 mRNA 量在样本含量最高。

2.3 候选内参基因的稳定性分析结果

2.3.1 使用 GeNorm 软件的分析方法 GeNorm (Vandesompele et al, 2002)软件通过表达稳定指数 M 来确定最稳定的内参基因,M 值越大,基因的稳定性越低,反之则越高,M=1.5 为上限,M<1.5 判断为相对稳定。GeNorm 软件计算结果如图 3 所示,候选内参基因 M 值的排序为 *PSC*=*PP2A*<*EFl-β*<*CYP*<*TUB*<*EFl-α*<*UNK2*<*G6PDH*<18*sRNA*<*Letin*<*UNK1*<*TIF*<*ACT*<*PE*<*ATP*。*PSC* 和 *PP2A* 被认定为稳定性最好的内参基因组合,稳定性最差的为 *ATP*,而在排在 18*sRNA* 之后的基因稳定值大于 1.5,判定这些内参的稳定性不好,不能用作内参基因。

Genorm 除了对内参基因的稳定性进行排序外,该程序还能对候选的内参基因标准化因子的配对差异 V(Vn/n+1)进行分析,从而确定最合适的内参基因数目。该程序默认的 V 值是 0.15,若 Vn/n+1>0.15,则有必要引入下一个内参基因,若 Vn+1/n+2<0.15,则在该实验条件下合适的内参基因数目是 n+1个。但若 V 值都大于 0.15,标准化因子无法得出最优的内参基因数目,可直接选取 3 个最稳定的内参基因用于矫正目的基因。根据本研究结果,V 值都大于 0.15, 所以以 3 个内参基因作为最合适的内参基因数目,详见图 4。

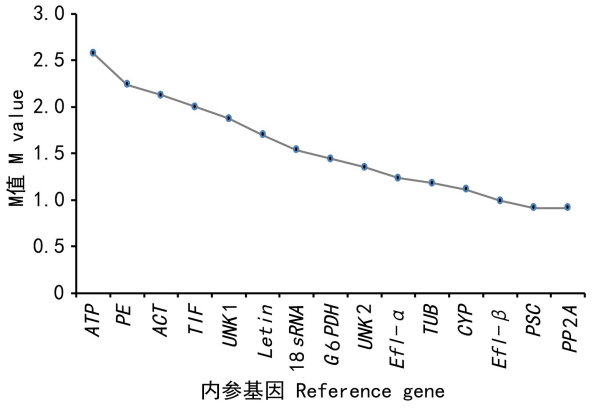

图 3 15 个候选内参基因稳定值(M)

Fig. 3 Expression stability values (M) of fifteen reference genes

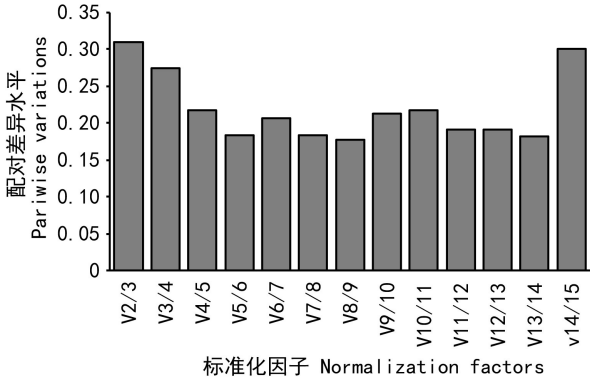

图 4 15 个候选内参基因的配对差异 V

Fig. 4 Pairwise variation values (V) of fifteen reference genes

2.3.2 使用 NormFinder 软件的分析方法 NormFinder (Andersen et al,2004)程序用 Excel 软件计算基因的稳定 S,S 值越低,则该基因越稳定,反之不稳定。如图 5 所示,15 个候选的内参基因在所有的样品中,S 的排序为 *PSC*<*ACT*<18*sRNA*<*EFl-α*<*G6PDH*<*TUB*<*EFl-β*<*TIF*<*PP2A*<*Letin*<*PE*<*UNK2*<*CYP*<*ATP*<*UNK1*,*PSC* 的稳定值为 0.045,是所有内参基因中最小的,是稳定性最好的内参基因,相反 *UNK1* 的稳定值最大。对比 GeNorm 和 NormFinder 计算结果,发现两个软件的分析具有一定的差异。

表 2　Bestkeeper 软件分析 15 个候选内参基因的稳定值

Table 2　Expression stability values of fifteen reference genes calculated by Bestkeeper

内参基因 Referencegene	样品数量 Sample amount	几何平均值 Geo mean	算术平均值 Ar mean	最小值 Min	最大值 Max	标准偏差 SD	变异系数 CV	排名 Order
*UNK*1	40	27.96	27.98	25.94	30.52	0.87	3.09	1
TUB	40	24.47	24.50	21.97	26.93	1.02	4.15	2
CYP	40	21.95	21.99	19.61	24.92	1.02	4.63	3
G6PDH	40	27.25	27.30	24.04	30.73	1.32	4.83	4
PSC	40	24.51	24.56	21.31	28.42	1.19	4.84	5
PP2A	40	24.77	24.82	22.11	28.49	1.28	5.14	6
EFl-β	40	22.64	22.69	19.56	25.88	1.18	5.21	7
EFl-α	40	20.05	20.10	16.71	23.42	1.05	5.23	8
Letin	40	27.90	28.02	21.48	34.19	1.88	6.72	9
18*sRNA*	40	17.61	17.71	10.29	22.06	1.19	6.72	10
*UNK*2	40	28.13	28.24	23.95	32.52	2.11	7.46	11
ACT	40	24.09	24.19	19.76	29.54	1.82	7.51	12
TIF	40	26.37	26.47	22.68	29.92	2.10	7.95	13
PE	40	25.69	25.83	21.27	29.53	2.61	10.10	14
ATP	40	26.11	26.51	19.86	35.70	4.43	16.71	15

表 3　△Ct 对比分析 15 个候选内参基因平均标准偏差排序

Table 3　Order of Mean SD in fifteen reference genes calculated by △Ct

内参基因 Reference gene	*ATP*	*UNK*2	18*sRNA*	*Letin*	*TIF*	*G6PDH*	*PE*	*PP2A*	*ACT*	*TUB*	*UNK*1	*EFl-α*	*PSC*	*EFl-β*	*CYP*
平均标准偏差 Mean SD	0.5	0.61	0.68	0.72	0.74	0.82	0.84	0.84	0.86	0.88	0.93	0.96	0.97	1.01	1.01
排序 Order	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

2.3.3 BestKeeper 软件分析法　BestKeeper(Pfaffl et al,2004)程序以每个基因的 4 次平均数为原始数据,对每个基因在样品中产生的标准偏差(SD)与变异系数(CV)来分析内参基因表达的稳定性,SD 越小,CV 越小,基因表达越稳定,以 SD = 1.0 为界限,若 SD 值大于 1.0,则认为基因在样品中的表达是不稳定的,再根据 CV 进行排名得出稳定的内参基因。在全部样品中,除了 *UNK*1 的 SD 值为 0.87 外,其余的 SD 值都大于 1, 因此除 *UNK*1 外, 其余的内参基因都判定为不稳定的;同时,*UNK*1 的 CV 值在有的基因中最小。因此,根据 BestKeeper 的结果显示,认为 *UNK*1 是最稳定的内参基因,详见表 2。

2.3.4 使用 ΔCt 值对比分析法　ΔCt 值分析法(Silver et al,2006)是对两个基因在所有的样本中进行两两比较,计算两个基因之间的 ΔCt,若 ΔCt 值在样本中波动很大,说明至少有一个基因在所有样品中是不稳定表达的,此时引入下个基因来进行两两比较,最终比较每两个基因的 ΔCt 的平均标准偏差(Mean StdDev),Mean StdDev 越小即表示该基因在相对其他基因变化越小,该基因则越稳定。如表 3 所示,15

表 4 RefFinder 软件分析结果

Table 4 Result calculate by refFinder

内参基因 Reference gene	Reffinder		Genorm		Normfinder		Bestkeeper		△Ct comparision	
	几何平均数 Geo mean	排序 Order	M 值 M value	排序 Order	S 值 S value	排序 Order	标准偏差 ± 变异系数 SD ± CV	排序 Order	平均标准偏差 Mean SD	排序 Order
PSC	2.839	1	0.914	1	0.045	1	4.84 ± 1.19	5	0.97	13
TUB	4.949	2	1.182	5	0.06	6	4.15 ± 1.02	2	0.88	10
18*sRNA*	5.335	3	1.535	9	0.051	3	6.72 ± 1.19	10	0.68	3
PP2A	5.422	4	0.914	2	0.072	9	5.14 ± 1.28	6	0.84	8
G6PDH	5.566	5	1.443	8	0.059	5	4.82 ± 1.32	4	0.82	6
*UNK*1	6.527	6	1.873	11	0.135	15	3.09 ± 0.87	1	0.93	11
*UNK*2	6.557	7	1.350	7	0.081	12	7.45 ± 2.11	11	0.61	2
EFl-β	6.735	8	0.991	3	0.068	7	5.20 ± 1.18	7	1.01	14
EFl-α	6.928	9	1.232	6	0.059	4	5.23 ± 1.05	8	0.96	12
CYP	6.955	10	1.112	4	0.098	13	4.63 ± 1.02	3	1.01	15
ACT	7.279	11	2.125	13	0.048	2	7.51 ± 1.82	12	0.86	9
ATP	7.492	12	2.575	15	0.133	14	16.71 ± 4.43	15	0.5	1
Letin	7.746	13	1.700	10	0.077	10	6.71 ± 1.88	9	0.72	4
TIF	8.888	14	1.998	12	0.071	8	7.95 ± 2.10	13	0.74	5
PE	11.084	15	2.238	14	0.079	11	10.10 ± 2.61	14	0.84	7

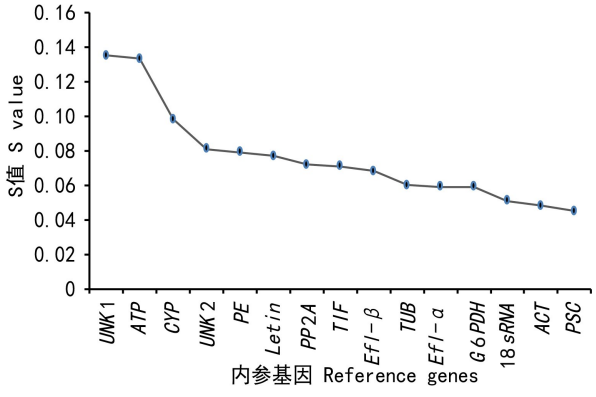

图 5 NormFinder 软件分析 15 个候选内参基因的稳定值（S）

Fig. 5 Expression stability values(S) of fifteen reference genes calculated by NormFinder

个候选内参基因在所有样品中 Mean StdDev 最小的是 *ATP*，则稳定性最好的内参基因为 *ATP*，稳定性差的是为 *CYP* 因其 Mean StdDev 最大。

2.3.5 使用 RefFinder 软件结果分析 如表 4 所示，每种软件分析得到的内参基因排序具有一定的相似性和差异性，此时则需要 RefFinder（Xie，2012）软件作出综合评价，RefFinder 软件根据候选内参基因在每种分析软件中的排序予以一定权重后，计算出其排序的几何平均值，内参基因的几何平均值越小，说明该内参基因稳定性越好。排名结果显示，排在前三位的是 *PSC*、*TUB* 和 18*sRNA*，则判断这三个基因是稳定性最好的内参基因，而稳定性最不好的是 *PE*。结合 GeNorm 软件分析，本研究选用 3 个内参作为最佳的内参基因数目，因此，在低磷胁迫下，最合适的内参基因为 *PSC*、*TUB*、18*sRNA*。

2.4 *hGSHS*、*γ-ECS* 基因序列比对结果

如图 6 所示，序列经 Blast 分析后表明，相似度均符合要求，各引物扩增出的片段均为目标基因，可用于后续实验。

```
Query  12   CTC-CGC-ACCGCCAATTCCTGA-CCCTAAGCTAGCGCCATGGCTGTCGTTTCGCGAAGT  68
            ||| ||| ||||||||||||||| ||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  204  CTCACGCAACCGCCAATTCCTGAACCCT-A---AGCGCCATGGCTGTCGTTTCGCGAAGT  259

Query  69   GCGACGACCTATACGCGCCACTACTTAATACGACACGAGTTTGATAGGAAAACGAAAACC  128
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  GCGACGACCTATACGCGCCACTACTTAATACGACACGAGTTTGATAGGAAAACGAAAACC  319

Query  129  TGCGTTGCCAATAATAGTTTGTGTTACTCTGCTAAGAAGGCTCCTCCACCGCAGAGGATT  188
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  TGCGTTGCCAATAATAGTTTGTGTTACTCTGCTAAGAAGGCTCCTCCACCGCAGAGGATT  379

Query  189  GTTGGTGGCCGTAGAGTGATTGTTGCTGCGAGCCCTCCCACCGAAGACGCTGTAGTTGCC  248
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  GTTGGTGGCCGTAGAGTGATTGTTGCTGCAAGCCCTCCCACCGAAGACGCTGTAGTTGCC  439

Query  249  ACTGA  253
            |||||
Sbjct  440  ACTGA  444
```

A

```
Query  3    CCTCATTC-CTCTCTTTCGCTAA-CCTCTC-AACTCATGTCTCAACCTTTGACCACCAAC  59
            ||||| || |||||||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  94   CCTCAATCACTCTCTTTCGCTAAACCTCTCAAACTCATGTCTCAACCTTTGACCACCAAC  153

Query  60   TCTGTTCTTGTTGAAGAGGCTGCTGCTGAT  89
            |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  154  TCTGTTCTTGTTGAAGAGGCTGCTGCTGAT  183
```

B

图 6　*γ-ECS* 和 *hGSHS* 基因比对结果　**A.** *γ-ECS* 比对结果；**B.** *hGSHS* 比对结果。

Fig. 6　Blast results of *γ-ECS* and *hGSHS*　**A.** Blast result of *γ-ECS*; **B.** Blast result of *hGSHS*.

2.5 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 荧光定量 PCR 结果

2.5.1 *γ-ECS* 荧光定量 PCR 分析　图 7 和图 8 显示，CK 为正常条件下 2 d 时根和叶部样品。在 GX1 的根部中，*γ-ECS* 的相对表达量随胁迫时间的增加，出现了先增加后减少的趋势，在叶部，在受到低磷胁迫 2 d，12 d 时，其表达量均在 CK 以下，呈减少趋势；GX2 中，无论是根部还是叶部，其相对表达量都现增加趋势，其中属叶部涨幅最大，在 12 d 时其增长了 CK 的 12.008 倍；另外，标准偏差的大小反应了不同内参基因矫正后目的基因相对表达量的离散程度，出现了在某些时期矫正结果差异较大的现象，说明不同的内参基因矫正是有一定差异的。

2.5.2 *hGSHS* 荧光定量 PCR 结果　CK 为正常条件下 2 d 时根和叶部样品。与 CK 相比，*hGSHS* 在 GX1 中相对表达量无论在根部还是叶部随胁迫时间增加均呈现减少趋势，在 12 d 时减少最甚，相对表达量在 0.1 左右。在 GX2 的根部，*hGSHS* 的相对表达量在 2 d 时比 CK 组少，但在 12 d 时其相对表达量达到 CK 的 4.490 倍；而其叶部，2 d 时其表达量增加了 CK 的 5.271 倍，达最大值，却在 12 d 的时候含量减少为 CK 的 1.561 倍，因此，在磷高效品种中，*hGSHS* 的相对表达量在根部呈现随时间增加先减少后增加的趋势，而在叶部相反，如图 9、图 10 所示。

3　讨论

3.1 内参基因筛选

随着 RT-qPCR 的广泛应用，内参基因的筛选越

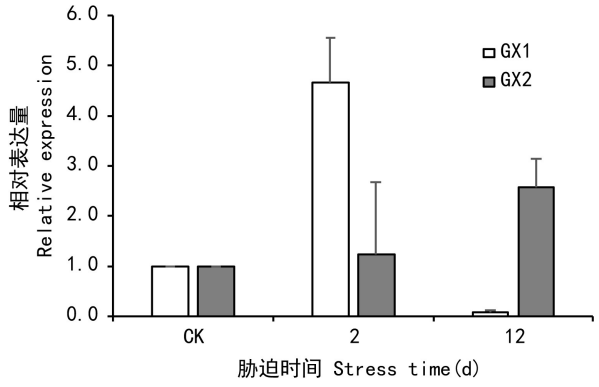

图 7 γ-*ECS* 基因在 GX1 和 GX2 根部相对表达量
Fig. 7 Relative expression of γ-*ECS* in roots of soybean in GX1 and GX2

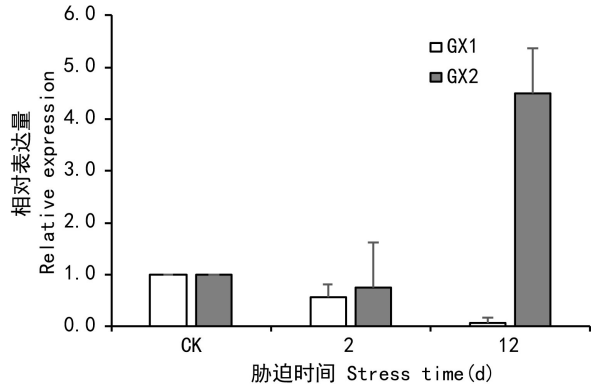

图 9 *hGSHS* 基因在 GX1 和 GX2 根部相对表达量
Fig. 9 Relative expression of *hGSHS* in roots of soybean in GX1 and GX2

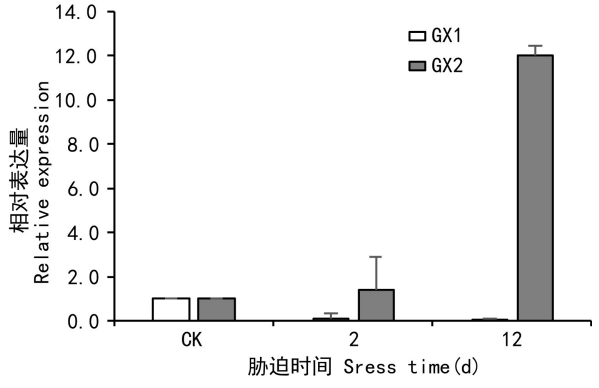

图 8 γ-*ECS* 基因在 GX1 和 GX2 叶部相对表达量
Fig. 8 Relative expression of γ-*ECS* in leaves of soybean in GX1 and GX2

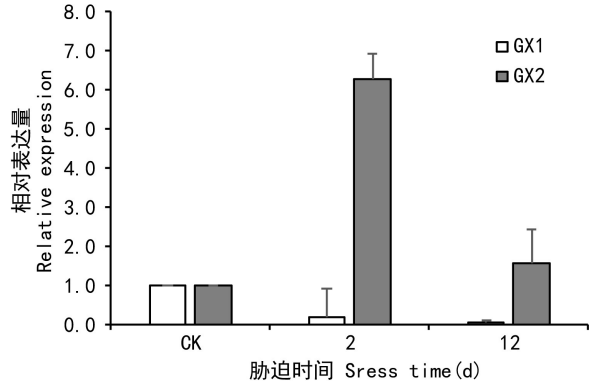

图 10 *hGSHS* 基因在 GX1 和 GX2 叶部相对表达量
Fig. 10 Relative expression of *hGSHS* in leaves of soybean in GX1 and GX2

来越受到人们的重视。理想的内参基因应满足以下条件:(1)在不同类型的细胞和组织中及不同生长发育阶段都稳定表达;(2)表达不受环境、生物或非生物胁迫等内源性和外源性因素的影响;(3)不存在假基因,以避免基因组 DNA 扩增;(4)其稳定表达量与目的基因表达量近似(Vandesompele et al, 2002),常用的有 *Actin*、18*s rRNA* 和 *G6PDH* 等管家基因。本研究评价了 15 个常见的管家基因,分析它们在不同的品种(GX1 和 GX2),不同部位(根和叶),不同时期(2、4、8、12、16 d),共 40 个样品中的稳定性,选用 4 种方法进行评价,发现使用不同的评价软件时,其结果也存在一定的差异和相似,如 *PSC* 在 GeNorm 和 NormFinder 软件中排名第 1,在 BestKeeper 软件排名第 5,而在 △Ct 分析法排到第 13 位;*PE* 在 GeNorm 和 BestKeeper 软件中排名第 14 位,在 NormFinder 软件排到 15 名,△Ct 分析法排在 11 位,之前有研究者在使用不同的软件分析,内参基因的稳定性排名基本一致,当然也存在排名不一致的情况(Andersen et al,2004),分析认为不同分析软件评价内参基因表达稳定性的运算方式不同,因此每个软件的计算结果可能会存在一定出入,此时,需要引入 RefFinder 将 4 种分析方法的计算结果进行综合评价,得出相对准确的结果,这也是被证明是可行的(Zsori et al,2013)。

RefFinder 结果显示，*PSC*、*TUB*、18*sRNA* 这 3 个基因是 15 个候选的内参基因中稳定性最好的基因。杨树根在不同时期中发育的 *Efl-a* 和 18*srRNA* 表达稳定(Xu et al,2011)；水稻在紫外线伤害下最稳定的内参基因是 18*srRNA*(Kim et al,2003)；菠萝蜜中 18*sRNA* 是最稳定的内参基因之一(汪永保等,2014)，这与本研究结果有一定相似性，认为 18*sRNA* 为核糖体 RNA，与蛋白质结合形成核糖体，其功能是作为 mRNA 的支架，参与蛋白质的合成，在细胞生长中起到不可或缺的作用，植物通过过量且稳定表达 18*sRNA* 来维持正常的细胞活动。因此，18*sRNA* 相对其他管家基因中表达丰度最大，且稳定性良好。*TUB* 是细胞内编码微管蛋白的基因(Yoshikawa et al,2003)，只有 *TUB* 在细胞内的稳定表达，才能保证细胞基础活动的顺利进行。苹果在不同时期、不同组织、不同基因型中和玉米在干旱环境下 *TUB* 的稳定性最佳(吝爱月,2012)；而本研究中，*TUB* 的稳定性亦排到第二。*PSC* 用于编码丝氨酸羧肽酶的基因之一，丝氨酸羧肽酶参与多肽和蛋白质的加工、修饰与降解等多个重要环节，是植物生长繁殖中的重要物质，*PSC* 是 15 个候选的内参基因中稳定性最良好的内参基因。大豆在受到不同的光周期下，稳定性最好的是 *ACT*11，*UKN*1 和 *UKN*2(Hu et al,2009)，大豆在盐胁迫下 *Efl-a* 和 *ACT*11 表达稳定；*TUB*4、*TUA*5 和 *Efl-a* 在干旱处理时稳定；*ACT*11 和 *UKN*2 在黑暗(衰老)处理时稳定；而 *Efl-β* 和 *UKN*2 在受大豆花叶病毒侵染时表达稳定(马淑华,2013)；这与本研究在缺磷胁迫的结果不同，进一步说明内参基因在不同实验环境下表达稳定性存在差异，研究者在实验前先筛选合适的内参基因，否则可能会导致定量结果不准确。

3.2 *γ-ECS* 和 *GSHS* 表达分析

磷调控植物体内线粒体的氧化磷酸化、电子传递链、叶绿体的能量传递、光合磷酸化过程，是植物体内不可缺少的元素之一。植物缺磷可使 ATP 的合成受到影响，电子传递与磷酸的解偶联，能量经还原氧气产生自由基从而被消耗掉(曹黎明和潘晓华,2000)。过多的自由基易对植物的生理活动造成影响，谷胱丙肽能有效清除植物体内自由基。大豆在低磷和铝毒胁迫下，大豆中的 hGSH 含量明显提高，且磷高效品种中 hGSH 上升的幅度要大于磷低效品种(李艳英等,2012)。Verena et al(2010)报道在烟草中过量表达 *γ-ECS*，叶片中 GSH 含量提高 20 至 30 倍；在转基因杨树中，*γ-ECS* 的过量表达增加了 GSH 含量(Arisi et al,1997)；在重金属胁迫下，油菜 *GSHS* 和 *γ-ECS* 基因表达增加；印度芥菜中分别过量表达 *GSHS*，增加了植物对 Cd 的耐性(Grill et al,1985)。可见，在许多逆境胁迫下，推测植物可能通过增加 *hGSHS*、*γ-ECS* 的表达量，从而增加谷胱甘肽的合成来抵抗逆境胁迫。本研究低磷处理下发现，谷胱甘肽的合成酶基因 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 在磷低效和磷高效两个大豆品种中均有表达，但其表达具有一定的差异性。随着胁迫时间的增加，磷低效品种 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 相对表达量随胁迫时间增加而逐渐减少，说明低磷胁迫影响了谷胱甘肽的合成代谢中 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 的表达；而在磷高效品种中，*γ-ECS* 在根叶部和 *hGSHS* 在根部的相对表达量都随胁迫事件延长而增加，分析推测 GX2 根部通过增加的 *hGSHS* 和 *γ-ECS* 的相对表达量，从而合成更多的 hGSH 来抗低磷胁迫，但因叶部 *hGSHS* 含量降低，推测根部比叶部具有更强的耐性。

4　结论

在 15 个内参基因中，18*sRNA*、*TUB*、*PSC* 稳定性最佳，这是基于 5 种分析软件的结果，用于研究低磷胁迫下荧光定量分析可得到相对可靠的结果，但是随着研究的深入，不排除能找到更合适的内参基因；低磷胁迫下，不同磷效率品种的大豆 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 的相对表达量在不同时期，不同部位具有一定的表达差异，磷高效品种在低磷胁迫下能有效诱导大豆 *γ-ECS* 和 *hGSHS* 的增量表达，而磷低效品种表达量减少。因此，认为谷胱丙肽合成酶基因表达差异可能是品种磷效率差异的原因。

参考文献：

ANDERRSEN CL, JENSEN JL, ORNTOFT TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applidto bladder and colon cancer data sets [J]. Canc Res, 64(15): 5245-5250.

ARISI ACM, NOCTOR G, FORYER CH, et al, 1997. Modifi-

cation of thiol contents in popar overexpressing enzymes involved in glutathion systhesis [J]. Planta, 203: 362-372.

CAO LM, PAN XH, 2000. Screening and identify of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes on the tolerance to low phosphorus Environment [J]. Acta Agron Sin, 31(2): 162-168. [曹黎明, 潘晓华, 2000. 水稻耐低磷基因型种质的筛选与鉴定 [J]. 江西农业大学学报, 2000, 31(2): 162-168.]

CHEN KM, GONG HJ, WANG SM, 2004. Glutathione metabol ism and environmental stresses in plant [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 24(6): 1119-1130. [陈坤明, 宫海军, 王锁民, 2004. 植物谷胱甘肽代谢与环境胁迫 [J]. 西北植物学报, 24(6): 1119-1130.]

COPLEY SD, DHILLON JK, 2002. Lateral gene transfer and parallel evolution in the history of glutathione biosynthesis genes [J]. Genome Biol, 3(5): 1-16.

GRILL E, WINNACKER EL, ZENK MH, 1985. Phytochelatins: the principal heavymetal complexing peptides of higher plants [J]. Science, 230(4726): 674-676.

HU R, FAN C, LI H, et al, 2009. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR [J]. BMC Mol Biol, 10: 93.

HU RB, FAN CM, FU YF, 2009. Reference gene selection in plant real-time quantitati ve reverse transcription PCR(qRT-PCR) [J]. J Agric Sci Technol, 11(6): 30-36. [胡瑞波, 范成明, 傅永福, 2009. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国农业科技导报, 11(6): 30-36.]

KIM BR, NAM HY, KIM SU, et al, 2003. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice [J]. Biotechnol Lett, 25:1869-1872.

LIN AY, 2012. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in maize treated with abiotic stresses and hormones [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. [吝月爱, 2012. 玉米在非生物胁迫和激素处理条件下实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [D]. 雅安: 四川农业大学.]

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 25(4): 402-408.

LIU LM, LIU HY, TIAN BM, 2012. Selection of reference genes from sesame infected by *Macrophomina phaseolina* [J]. Acta Agron Sin, 38(3):471-478 [刘莉铭, 刘红彦, 田保明, 2012. 茎点枯病菌诱导下芝麻内参基因的筛选 [J]. 作物学报, 38(3): 471-478.]

LI YY, DONG DF, WANG YY, et al, 2012. Effects of low phosphorus availability and aluminium toxicity on homoglutathione metabolism of soybean [J]. SW Chin J Agric Sci, 25 (6): 2026-2032. [李艳英, 董登峰, 王沿沿, 2012. 低磷和铝毒胁迫对大豆谷胱甘肽代谢的影响 [J]. 西南农业学报, 25(6): 2026-2032.]

LXPPARITENT AG, VIDMAR JJ, LEUSTEK T, et a1, 1999. Interorgan signaling in plants: regulation of ATP sulfurylage and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound [J]. Plant J, 18(1): 89-95.

MA SH, 2013. Reference gene screening and callose metabolism-related genes expression analysis by RT-qPCR during soybean resistance to soybean mosaic virus infection [D]. Baoding: Hebei Agricultural University. [马淑华, 2013. 大豆抗 SMV 侵染过程中 RT-qPCR 内参基因的筛选及胼胝质代谢相关基因的表达分析 [D]. 保定: 河北农业大学.]

MAY M J, LEAV ER C J, 1994. Arabidopsis thaliana γ-glutamylcysteine synthetase isstructurally unrelated to mammalian, yeast and *E. coil* homologs [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 91(21): 10059-10063.

NOTOR G, ARISI ACM, JOUANIN L, et al, 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants [J]. J Exp Bot, 49 (321): 623-647.

PFAFFL MW, TICHOPAD A, PROGOMET C, et al, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper excelbased tool using pairwise correlations [J]. Biotechnol Lett, 26: 509-515.

SILVER N, BEST S, JIANG J, et al, 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J]. BMC Mol Biol, 7: 33.

SUZUKI T, HIGGINS PJ, CRAWFORD DR, 2000. Control selection for RNA quantization [J]. Biotechniqes, 29(2): 332-337.

VALASEK MA, REPA JJ, 2005. The power of real-time PCR [J]. Advan Physiol Ed, 29(3): 151-159.

VANDESOMPLE J, PRETER KD, PATTYN F, et al, 2002. Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-qPCR by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biol, 3(7):1-12.

VERENA L, ANDREAS W, AN Z, et al, 2010. Exploiting plants for glutathione production: uncoupling GSH synthesis from cellular controls results in unprecedented GSH accumulation [J]. Plant Biotechnol, 8(7): 807-820.

WANG YB, YU Q, LI YZ, et al, 2014. Screening of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in Jackfruit [J]. Chin J Trop Crops, 35(7): 1374-1381. [汪永保,余庆,李映志, 等, 2014. 菠萝蜜实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. 热带作物学报, 35(7): 1374-1381.]

XIE, 2012. http://www. leonxie. com/referencegene. php.

XU M, ZHANG B, SU XH, et al, 2011. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in Populus [J]. Anal Biochem, 408(2):337-339.

YOSHIKAWA M,YANG G X,KAWAGUCHI K,et al, 2003. Expression analyses of betatubulin isotype genes in rice [J]. PCP, 44(11): 1202-1207.

ZHANG FM, 2013. Selection of refercence genes in sweet cherry [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. [张芳明, 2013. 甜樱桃内参基因的筛选 [D]. 郑州: 河南农业大学.]

ZSORI KS, MUSZBEK L, CSIKI Z, et al, 2013. Validation of reference genes for the determination of platelet transcript level in healthy individuals and in patients with the history of myocardial infarction [J]. Int J Mol Sci, 14(2): 3456-3466.