

喀西茄内参基因实时荧光定量 PCR 表达稳定性评价

周晓慧, 刘 军, 庄 勇*

(江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 南京 210014)

摘 要: 为了筛选在喀西茄 (*Solanum aculeatissimum*) 中表达稳定的内参基因, 选取 7 个常用内参基因 *GAPDH*、*ACTIN*、*18sRNA*、*UBQ*、*TUA*、*EF1* 和 *CYP*, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 结合 GeNorm、NormFinder 和 RefFinder 软件对其在喀西茄不同组织、不同植物生长调节剂处理、非生物和生物胁迫下的表达稳定性进行评价。结果表明, *TUA* 和 *18sRNA* 在喀西茄不同组织中的表达稳定性最好, *18sRNA* 和 *ACTIN* 在不同植物生长调节剂处理条件下表达水平最稳定, *EF1* 和 *GAPDH* 在干旱和盐条件下表达稳定性最好, *TUA* 和 *EF1* 在所有喀西茄测试样品组中 (包括不同组织、不同植物生长调节剂处理、非生物及生物胁迫) 的表达稳定性最高, 而 *CYP* 和 *ACTIN* 在喀西茄不同试验条件下的表达稳定性较差。

关键词: 喀西茄; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

中图分类号: S 641.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 08-1731-08

Selection of Appropriate Reference Genes in *Solanum aculeatissimum* for Quantitative Gene Expression Studies Under Different Experimental Conditions

ZHOU Xiao-hui, LIU Jun, and ZHUANG Yong*

(Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The present study aimed to select stable and optimal reference genes for gene expression analysis in *Solanum aculeatissimum*. A total of seven traditional reference genes including *GAPDH*, *ACTIN*, *18sRNA*, *UBQ*, *TUA*, *EF1* and *CYP* were screened and compared by the real-time quantitative PCR. The mRNA levels of these candidate genes were evaluated under different experimental conditions, including different tissues, different hormone treatments, abiotic and biotic stress using three common statistical softwares, GeNorm, NormFinder and RefFinder. The data showed that *TUA* and *18sRNA* were the most stable genes in different tissues. *18sRNA* and *ACTIN* showed high stability in different hormone treatments sample pool. *EF1* and *GAPDH* were the most stably expressed reference genes under salt and drought stress while *TUA* and *EF1* exhibited the most stable expression across all of the tested *S. aculeatissimum* samples. *CYP* and *ACTIN* exhibited the least stable expression under most of the

收稿日期: 2014-04-14; 修回日期: 2014-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101542); 江苏省自然科学基金项目 (BK20131335); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (11) 4045]

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jaaszy@163.com)

experimental conditions which are not recommended.

Key words: *Solanum aculeatissimum*; real-time quantitative PCR; reference gene

实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 是在传统 PCR 技术基础上发展而来的一种新的核酸定量技术, 具有灵敏度高、重复性好、特异性强和高通量等特点, 已被广泛地应用于基因的表达和转录组分析等研究中 (Gachon et al., 2004; Huggett et al., 2005; Wan et al., 2010)。然而, 在进行 qRT-PCR 过程中, 其准确性及可靠性往往受到很多因素的影响, 包括 RNA 的质量、反转录效率和内参基因的选择等。在基因表达分析中, 选择合适的内参基因是精确分析 qRT-PCR 结果的重要前提 (Bustin & Nolan, 2004; Pfaffl et al., 2004; Gutierrez et al., 2008; Goulao et al., 2012)。

通常情况下, 理想化的内参基因应在各种类型的组织、细胞和各种试验条件下都能稳定表达 (Schmittgen & Zakrajsek, 2000; Lland et al., 2006)。但越来越多的研究报道表明, 传统的管家基因被用作为内参基因, 而这些基因在不同试验条件下的稳定性却表现不一 (Hu et al., 2009; Gao et al., 2012)。因此, 筛选和评价在不同试验条件下稳定表达的内参基因对获得可靠的试验结果十分重要 (Goulao et al., 2012; Zhu et al., 2012)。

喀西茄 (*Solanum aculeatissimum*) 是茄子的近缘野生种, 具有许多栽培茄资源内缺乏的重要性状, 如抗根结线虫病、抗黄萎病等, 是栽培茄重要的抗性育种资源 (Collonnier et al., 2001; 庄勇和王述彬, 2009)。随着对其抗病基因挖掘研究的不断深入, 基因表达分析对揭示喀西茄抗病基因的调控机理具有重要作用。因此, 筛选稳定的内参基因在喀西茄基因表达研究中起着关键作用。目前, 在茄科作物上常用的内参基因有 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*)、18S 核糖体 RNA (*18sRNA*)、肌动蛋白基因 (*ACTIN*)、多聚泛素酶基因 (*UBQ*)、转录延伸因子基因 (*EF1*)、亲环蛋白基因 (*CYP*) 和 α 微管蛋白基因 (*TUA*) 等 (Exposito-Rodriguez et al., 2008; Wan et al., 2011; Wang et al., 2012; Gantasala et al., 2013; Lopez-Pardo et al., 2013)。本研究选取以上 7 个常用内参基因, 利用 qRT-PCR 技术对其在不同试验条件下 (包括不同组织、不同植物生长调节剂处理、非生物及生物胁迫) 的表达稳定性进行评价, 以期筛选出不同试验背景下喀西茄稳定表达的内参基因, 为后续的基因表达研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

用于试验的喀西茄是引自荷兰种质资源中心 (Center for Genetic Resources, The Netherlands)。2013 年 3 月, 将种子经消毒、催芽, 种植于江苏省农业科学院温室内。待幼苗 4 片真叶时, 每 5 株为 1 个重复, 设 3 个重复, 分别取每个重复植株的叶片、茎部及根部样品, 经液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

非生物胁迫处理: 包括干旱胁迫和盐胁迫两种, 参考 Wan 等 (2010) 的方法, 将处于第 4 片真叶期的幼苗分别移栽到 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液 (盐胁迫) 和 $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘露醇溶液 (干旱胁迫) 中, 以移栽至蒸馏水中的为对照, 处理 5 h 后取嫩叶样品, 每个处理设 3 个重复, 经液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱保存。

生物胁迫处理: 以茄子黄萎病病原菌接种模拟生物胁迫, 所用的黄萎病病原菌由本课题组分离。接种参考 Robb 等 (2007) 和 Dervis 等 (2009) 的方法: 于 4 片真叶期采用灌根法接种, 孢子悬浮液浓度 1×10^7 个孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 以不接种的为对照, 喀西茄及感病对照 ‘苏州牛角’ 均设 3 次重复。

接种 24 h 后取嫩叶样品, 经液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

植物生长调节剂处理: 参考 Wan 等(2010)的方法, 于幼苗 4 片真叶期分别将茉莉酸甲酯(MeJA, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、脱落酸(ABA, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和水杨酸(SA, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种溶液喷洒于叶片, 以喷施蒸馏水的为对照, 每个处理设 3 个重复, 处理 5 h 后取嫩叶样品, 经液氮速冻置于 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

样品总 RNA 提取均使用 RNeasy Plant Mini kit 试剂盒(Qiagen), 具体操作依照产品说明书进行。1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 使用 Nanodrop 核酸分析仪测定总 RNA 的浓度和纯度。cDNA 第 1 链的合成使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa), 具体操作按照产品说明书进行。

1.3 内参基因的选择和引物设计

根据前人在马铃薯、番茄、辣椒和茄子内参基因研究的基础上(Exposito-Rodriguez et al., 2008; Wan et al., 2011; Wang et al., 2012; Gantasala et al., 2013; Lopez-Pardo et al., 2013), 选择了 7 个常用的内参基因 *GAPDH*、*18sRNA*、*ACTIN*、*UBQ*、*EF1*、*CYP* 和 *TUA*。通过 Primer 3 软件设计引物, 扩增产物长度在 100 ~ 160 bp 之间。所有引物序列由上海英骏公司合成。

1.4 荧光定量 PCR 对目的基因的检测

使用 CFX96 型荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad), 以提取的不同组织和不同处理条件下的样品 cDNA 第 1 链为模板进行定量分析。PCR 反应体系为: 10 μL SYBR Green Master (Rox) (Roche), 5 μL 稀释 cDNA, 0.5 μL (10 pmol) 正反向引物, 其余用 ddH_2O 补足至 20 μL 。PCR 扩增条件为: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 40 个循环。每个样品设 3 个重复, 并设阴性对照。

1.5 数据分析

荧光定量 PCR 分析后, 仪器自动得出各样品的 Ct 值, 使用 GeNorm 和 Normfinder 软件进行各内参基因稳定性的分析, 同时利用 RefFinder 软件对各内参基因的稳定性进行综合评价(<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)。GeNorm 软件根据计算出的每个候选基因表达稳定度 M (average expression stability values) 进行排序, M 值越高, 表达越不稳定, 反之, 则越稳定; 同时, 通过对候选内参基因标准化因子的配对差异分析 ($V_{n/n+1}$) 可判定所需内参基因的最适数量 (Vandesompele et al., 2002)。NormFinder 软件是结合组内方差与组间方差计算各候选内参基因的稳定性, 稳定性越小, 内参基因表达就越稳定; 反之, 则越不稳定 (Andersen et al., 2004)。RefFinder 是整合 GeNorm、NormFinder、Bestkeeper 以及 Delta CT 法, 对每个候选内参基因单独用 4 种分析方法评价时的排名求几何平均值, 得到综合排名指数, 该指数越小, 说明内参基因表达越稳定; 反之, 则越不稳定 (Zhu et al., 2012)。

2 结果与分析

2.1 喀西茄内参基因的 PCR 分析

选取 *GAPDH*、*18sRNA*、*ACTIN*、*UBQ*、*EF1*、*CYP* 和 *TUA* 等 7 个作为内参基因。根据每个内参基因的核苷酸序列设计 qRT-PCR 引物, 目的片段大小在 110 ~ 160 bp 之间(表 1)。运用常规 RT-PCR

检测这些引物的特异性, 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增产物为单一条带, 无非特异性扩增, 无引物二聚体, 且扩增片段与目的片段大小相一致, 可用于进一步的试验 (图 1)。

表 1 喀西茄 7 个候选内参基因的引物信息
Table 1 Seven candidate reference genes, primers, and amplicon characteristics

内参基因 Gene	基因全称 Gene description	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	产物长度/bp Amplicon length	退火温度/℃ T_m
<i>CYP</i>	Cyclophilin	ATCCTGTCCATGGCTAATGC	ATGCCCTCAACAACCTTGTC	119	60
<i>ACTIN</i>	Actin	ACCACAGCTGAGCGAGAAAT	GACCATCGGGAAGCTCATAG	133	60
<i>EF1</i>	Elongation factor 1- α	ACCAGCATCACCAATCTTCA	ACTGCCATACTTCCCACATT	116	60
<i>18sRNA</i>	18S ribosomal RNA	TAGTTGGACTTTGGGATGGC	AGAGCGTAGGCTTGCTTTGA	119	58
<i>UBQ</i>	Ubiquitin	GTGTGGGCTCACCTACGTTT	GTGTGGGCTCACCTACGTTT	154	60
<i>TUA</i>	Alpha-tubulin	GATGTCAATGCTGCTGTCGC	CCAGGCACTACTGTTGGAGG	116	60
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CCGCTCCTAGCAAAGATGCC	ACCCTCCACAATGCCAAACC	115	58

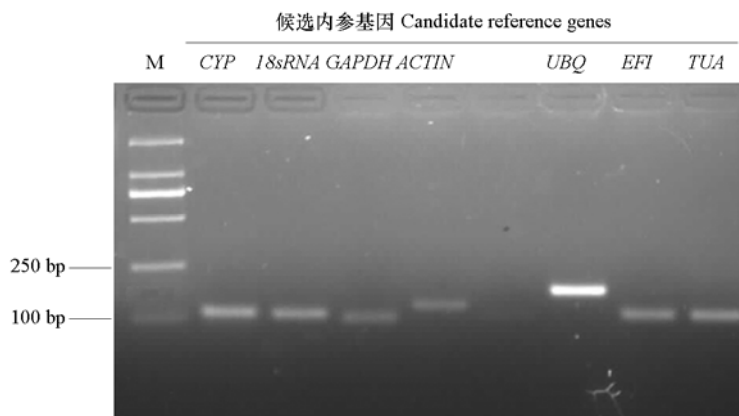


图 1 喀西茄 7 个候选内参基因的 PCR 扩增产物
琼脂糖凝胶电泳检测。

Fig. 1 Specificity of seven candidate reference genes for qRT-PCR amplification
Amplified fragments shown by agarose gel electrophoresis.

2.2 内参基因的荧光定量 PCR 分析

基于荧光染料 SYBR 的 RT-PCR 检测, 这 7 个内参基因在茄子样品中的溶解曲线显示只有明显的单一信号峰, 每 3 个重复样品间扩增曲线的重复性高, 表明引物的特异性较好。对这 7 个内参基因的 Ct 值分析发现, 每个内参基因在不同试验条件下的喀西茄样品中的表达水平都有一定的变化。在所有喀西茄样品中, 各基因的 Ct 值从 19.80 到 32.52 不等。用 Ct 值来反映每个内参基因的表达丰度, Ct 值越高, 表达丰度越低; Ct 值越低, 表达丰度越高。总体而言, 内参基因 *CYP*、*EF1*、*18sRNA* 和 *GAPDH* 在不同处理样品中的表达丰度较内参基因 *ACTIN*、*TUA* 和 *UBQ* 的高。如表 2 所示, 内参基因 *CYP*、*EF1*、*18sRNA* 和 *GAPDH* 在不同组织、不同植物生长调节剂处理以及干旱和盐胁迫处理样品中的 Ct 值在 19.80 ~ 25.42 之间, 而内参基因 *ACTIN*、*TUA* 和 *UBQ* 在这 3 组处理中的 Ct 值在 25.90 ~ 32.52 之间, 其中尤以内参基因 *ACTIN* 的表达丰度最低。此外, 这些内参基因在这 3 组处理样品中的表达变化并没有一定的规律性。

表 2 候选内参基因在喀西茄不同组织和不同处理植株叶片中的 Ct 平均值
Table 2 Expression average Ct values for all the seven candidate reference genes of different treatments

组织或处理 Different tissue or treatment	<i>CYP</i>	<i>ACTIN</i>	<i>EF1</i>	<i>TUA</i>	<i>UBQ</i>	<i>18sRNA</i>	<i>GAPDH</i>
根 Root	23.57	31.21	19.80	27.31	28.52	21.58	24.88
茎 Stem	22.63	28.44	20.03	26.38	27.84	20.87	22.82
叶 Leaf	21.73	32.52	21.92	28.10	28.63	22.65	24.17
干旱 Drought	23.87	28.84	20.98	27.06	28.88	22.08	23.17
盐 Salt	22.74	29.60	19.90	25.90	28.08	20.97	22.75
茉莉酸甲酯 MeJA	22.26	30.07	22.50	28.24	28.90	22.13	25.42
脱落酸 ABA	24.37	29.63	21.01	26.63	29.03	21.60	23.13
水杨酸 SA	23.60	29.86	21.62	27.37	28.77	21.45	23.64

2.3 内参基因的表达稳定性评价

2.3.1 GeNorm 软件分析

GeNorm 程序是通过比较每个候选内参基因的表达稳定度 M 值进行排序，M 值越大，表明稳定度越低；反之，则越高。GeNorm 软件默认的取舍值为 $M = 1.5$ 。从表 3 可以看出，这 7 个内参基因在不同的样品池中，其最稳定的内参基因是有差异的。在干旱和盐胁迫条件下，表达最稳定的内参基因是 *EF1* 和 *18sRNA*；在不同植物生长调节剂处理条件下，*18sRNA* 和 *ACTIN* 的稳定性表现最好；而在不同组织中，*TUA* 和 *18sRNA* 的表达稳定性最好。在所有的喀西茄样品池中，*TUA* 和 *EF1* 是表达最稳定的内参基因。此外，在大多数条件下，内参基因 *CYP* 和 *ACTIN* 的表达稳定性较差。

GeNorm 软件还可以通过分析内参基因的配对差异值 $V_{n/n+1}$ 来确定在某个试验条件下所需内参基因的最佳数量。通常将 0.15 作为选择最佳内参基因数的临界值。当成对的内参基因 $V_{n/n+1} < 0.15$ 时，则无需再引入第 $(n + 1)$ 个内参基因。由图 2 可以看出，在干旱和盐胁迫条件以及在不同组织的样品中 $V_{2/3}$ 的值均低于临界值 0.15，表明进行基因表达分析的最适内参基因数为两个，分别为 *EF1* 和 *18sRNA*、*TUA* 和 *18sRNA*（表 3），无需引入第 3 个基因进行校正；在不同植物生长调节剂处理条件下， $V_{3/4}$ 值低于临界值 0.15，表明在此条件下最适内参基因为 *18sRNA*、*ACTIN* 和 *EF1*（表 3），无需引入第 4 个基因进行校正；对于所有的喀西茄样品而言， $V_{4/5}$ 的值低于临界值 0.15，说明至少包括 *TUA*、*EF1*、*UBQ* 和 *18sRNA* 等 4 个基因（表 3），无需引入第 5 个基因进行校正。

表 3 GeNorm 软件分析 7 个候选内参基因在喀西茄不同试验条件下的表达稳定性（M 值）
Table 3 GeNorm ranking of the seven candidate reference genes with respect to their expression stability (M value) under different experimental conditions

处理 Treatment	排序 Rank	基因 Gene	M	处理 Treatment	排序 Rank	基因 Gene	M
所有测试样品 Total	1	<i>TUA</i>	0.845	不同植物生长调 节剂 Different hormone	1	<i>18sRNA</i>	0.659
	2	<i>EF1</i>	0.874		2	<i>ACTIN</i>	0.660
	3	<i>UBQ</i>	0.931		3	<i>EF1</i>	0.706
	4	<i>18sRNA</i>	1.115		4	<i>TUA</i>	0.742
	5	<i>GAPDH</i>	1.254		5	<i>UBQ</i>	0.768
	6	<i>ACTIN</i>	1.277		6	<i>GAPDH</i>	1.057
	7	<i>CYP</i>	1.427		7	<i>CYP</i>	1.610
干旱/盐胁迫 Salt and drought	1	<i>EF1</i>	0.345	不同组织 Different tissue	1	<i>TUA</i>	0.766
	2	<i>18sRNA</i>	0.347		2	<i>18sRNA</i>	0.773
	3	<i>CYP</i>	0.356		3	<i>GAPDH</i>	0.810
	4	<i>TUA</i>	0.375		4	<i>EF1</i>	0.815
	5	<i>UBQ</i>	0.378		5	<i>UBQ</i>	1.006
	6	<i>GAPDH</i>	0.510		6	<i>CYP</i>	2.003
	7	<i>ACTIN</i>	1.210		7	<i>ACTIN</i>	2.099

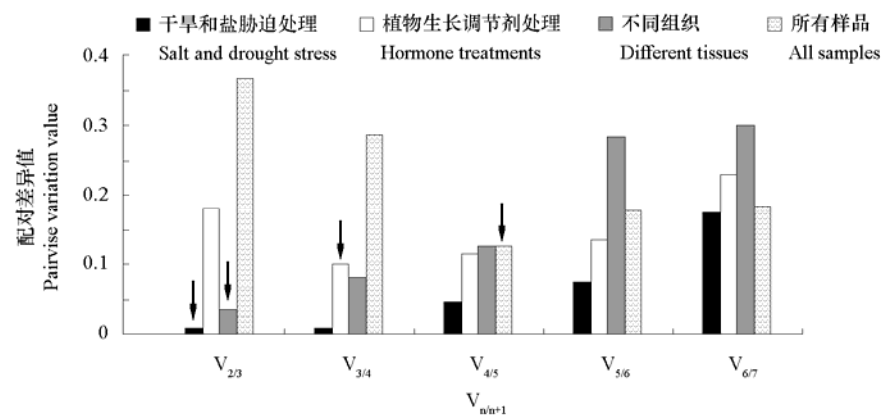


图 2 喀西茄 7 个候选内参基因的成对比较分析

Fig. 2 Pairwise variation analysis of the seven candidate reference genes

2.3.2 NormFinder 软件分析

NormFinder 软件是通过计算候选内参基因的稳定性对其进行评价的。如表 4 所示，在干旱和盐胁迫条件下，表达最稳定的内参基因是 *GAPDH* 和 *UBQ*；不同植物生长调节剂处理条件下，内参基因 *18sRNA* 和 *ACTIN* 的稳定性表现最好；而在不同组织中，内参基因 *TUA* 和 *18sRNA* 的表达稳定性最好；在所有的样品池中，*TUA* 和 *EF1* 是表达最稳定的内参基因。此外，和 GeNorm 软件的分析结果类似，在大多数条件下，内参基因 *CYP* 和 *ACTIN* 的表达水平最不稳定。由表 3 和表 4 可以看出，NormFinder 的分析结果与 GeNorm 软件基本相一致，除干旱和盐条件下，其他不同试验条件下的最稳定和最不稳定的两个内参基因都是一样的。

表 4 NormFinder 软件分析 7 个候选内参基因在喀西茄不同试验条件下的表达稳定性 (M 值)
Table 4 NormFinder analysis of the seven candidate reference genes with respect to their expression stability (M value) under different experimental conditions

处理 Treatment	排序 Rank	基因 Gene	M	处理 Treatment	排序 Rank	基因 Gene	M
所有测试样品 Total	1	<i>TUA</i>	0.146	不同植物生长调 节剂 Different hormone	1	<i>18sRNA</i>	0.086
	2	<i>EF1</i>	0.236		2	<i>ACTIN</i>	0.086
	3	<i>UBQ</i>	0.262		3	<i>UBQ</i>	0.182
	4	<i>18sRNA</i>	0.581		4	<i>EF1</i>	0.291
	5	<i>GAPDH</i>	0.705		5	<i>TUA</i>	0.353
	6	<i>ACTIN</i>	0.728		6	<i>GAPDH</i>	0.694
	7	<i>CYP</i>	0.873		7	<i>CYP</i>	1.105
干旱/盐胁迫 Salt and drought	1	<i>GAPDH</i>	0.052	不同组织 Different tissue	1	<i>TUA</i>	0.014
	2	<i>UBQ</i>	0.069		2	<i>18sRNA</i>	0.014
	3	<i>EF1</i>	0.156		3	<i>EF1</i>	0.029
	4	<i>18sRNA</i>	0.173		4	<i>GAPDH</i>	0.091
	5	<i>CYP</i>	0.192		5	<i>UBQ</i>	0.277
	6	<i>TUA</i>	0.214		6	<i>CYP</i>	1.370
	7	<i>ACTIN</i>	0.837		7	<i>ACTIN</i>	1.439

2.3.3 RefFinder 软件分析

根据 RefFinder 分析的综合排名以及结合 GeNorm 的配对差异分析 $V_{n/n+1}$ 结果显示 (表 5)，在干旱和盐胁迫条件下，表达稳定性较好的两个内参基因分别为 *EF1* 和 *GAPDH*；不同组织的样品池中，内参基因 *TUA* 和 *18sRNA* 的表达稳定性较好；不同植物生长调节剂处理的样品池中，表达稳定

性最好的 3 个内参基因分别为 *18sRNA*、*EF1* 和 *ACTIN*；而在所有喀西茄测试样品中，内参基因 *TUA*、*EF1*、*UBQ* 以及 *18sRNA* 则为最稳定的内参基因组合。

表 5 候选内参基因在喀西茄不同试验条件下的表达稳定性

Table 5 Consensus of stability ranking of the candidate reference genes for different treatments

处理 Treatment	表达稳定基因组合 Stable genes	表达最不稳定基因 The least stable genes
干旱和盐 Salt and drought/ 不同组织 Different tissue	<i>EF1</i> , <i>GAPDH</i> <i>TUA</i> , <i>18sRNA</i>	<i>TUA</i> , <i>ACTIN</i> <i>CYP</i> , <i>ACTIN</i>
不同植物生长调节剂 Different hormone	<i>18sRNA</i> , <i>EF1</i> , <i>ACTIN</i>	<i>GAPDH</i> , <i>CYP</i>
所有测试样品 Total	<i>TUA</i> , <i>EF1</i> , <i>UBQ</i> , <i>18sRNA</i>	<i>ACTIN</i> , <i>CYP</i>

3 讨论

随着生物技术的发展，实时荧光定量 PCR 技术已被广泛地应用于基因表达分析的研究中，而选择合适的内参基因是荧光定量 PCR 获得可靠准确结果的首要前提 (Pfaffl et al., 2004)。理想的内参基因应在所有组织和细胞类型中都能表达，不受任何内、外源因素的影响，且表达水平与目标基因相似 (Bustin et al., 2005; Wan et al., 2010)。然而在实际中能满足这些条件的基因几乎是不存在的，通常传统的管家基因被用作内参基因，但在研究中发现这些基因的表达水平也是随着不同的试验条件而有所差异。本试验的结果也证明了这一点，同样的内参基因在不同的试验条件下的表达水平是不一致的，比如内参基因 *ACTIN* 在植物生长调节剂处理的喀西茄样品池中表达水平较稳定，而在不同组织的样品池中的表达则最不稳定。因此，在进行目的基因表达分析前，对内参基因在某一具体试验条件下进行表达稳定性的评价是十分有必要的。

目前在茄科很多作物中均有关于内参基因稳定性筛选的报道。在辣椒上，Wang 等 (2012) 对 10 个常用内参基因的分析发现，*EF1α*、*UEP* 和 *Actin1* 在不同试验条件下的表达稳定性最好。Lopez-Pardo 等 (2013) 对马铃薯在不同冷藏条件下 6 个常用内参基因的表达稳定性的筛选中发现，*EF1α* 和 *APRT* 的表达最稳定。结合本研究的结果可以看出，同样的内参基因在不同作物中的表达稳定性存在很大差异。Gantasala 等 (2013) 通过对茄子 6 个常用内参基因 (*18sRNA*、*APRT*、*GAPDH*、*CYP*、*ACTIN* 和 *RuBP*) 的检测发现，*18sRNA*、*CYP* 和 *APRT* 在茄子不同组织中的表达稳定性最好。在本研究中内参基因 *18sRNA* 在喀西茄不同组织样品池、干旱和盐条件以及不同植物生长调节剂处理样品池中的表达稳定性均较好，而 *CYP* 则在大多数条件下的稳定性表现并不理想。因此，在进行喀西茄优良基因的表达分析尤其是与茄子等其他作物进行比较研究时，选择合适的内参基因尤为重要。

References

- Andersen C L, Jensen J L, Orntoft T F. 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 Research*, 64: 5245 – 5250.
- Bustin S A, Benes V, Nolan T, Pfaffl M W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597 – 601.
- Bustin S A, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15: 155 – 166.
- Collonnier C, Fock I, Kashyap V, Rotino G L, Daunay M C, Lian Y, Mariska I K, Rajam M V, Servaes A, Ducreux G, Sihachakr D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 91 – 107.

- Dervis S, Yetisir H, Yildirim H, Tok F M, Kurt S, Karaca F. 2009. Genetic and pathogenic characterization of *Verticillium dahliae* isolates from eggplant in Turkey. *Phytoparasitica*, 37: 467 – 476.
- Exposito-Rodriguez M, Borges A A, Borges-Perez A, Perez J A. 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8: 31.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B. 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55 (402): 1445 – 1454.
- Gantasala N P, Papolu P K, Thakur P K, Kamaraju D, Sreevathsa R, Rao U. 2013. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies by real-time PCR in eggplant (*Solanum melongena* L.). *BMC Research Notes*, 6: 12.
- Gao Z H, Wei J H, Yang Y, Zhang Z, Zhao W T. 2012. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis*. *Plant Cell Report*, 31: 1759 – 1768.
- Goulao L F, Fortunato A S, Ramalho J C. 2012. Selection of reference genes for normalizing quantitative real-time PCR gene expression data with multiple variables in *Coffea* spp. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 741 – 759.
- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Wuytswinkel O. 2008. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, 20: 1734 – 1735.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu Y F. 2009. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 10: 93.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6: 279 – 284.
- Lland H, Hertzberg M, Marlton P. 2006. *Myeloid Leukemia: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press.
- Lopez-Pardo R, Galarreta J I R, E. Ritter. 2013. Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *Molecular Breeding*, 31: 39 – 45.
- Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26: 509 – 515.
- Robb J, Lee B, Nazar R N. 2007. Gene suppression in a tolerant tomato – vascular pathogen interaction. *Planta*, 226: 299 – 309.
- Schmittgen T D, Zakrajsek B A. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 46: 69 – 81.
- 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 Biology*, 3 (7): research 0034.1-0034.11.
- Wan H J, Y W, Ruan M Y, Ye Q J, Wang R Q, Li Z M, Zhou G Z, Yao Z P, Zhao J, Liu S J, Yang Y J. 2011. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416: 24 – 30.
- Wan H J, Zhao Z G, Qian C T, Sui Y H, Malik A A, Chen J F. 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 399: 257 – 261.
- Wang S B, Liu K W, Zhi L, Ge W, Liu J B, Pan B G, Wan H J, Chen J F. 2012. Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. *Molecular Breeding*, 30: 1393 – 1400.
- Zhu X Y, Li X P, Chen W X, Chen J Y, Lu W J, Chen L, Fu D W. 2012. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. *PLoS One*, 7 (8): e44405.
- Zhuang Yong, Wang Shu-bin. 2009. Isolation and analysis of resistance gene analogs from *Solanum khasianum*. *Molecular Plant Breeding*, 7 (6): 1223 – 1228. (in Chinese)
- 庄 勇, 王述彬. 2009. 喀西茄抗病基因同源序列的分离与分析. *分子植物育种*, 7 (6): 1223 – 1228.