



## 研究报告

### Research Report

## 三叶木通果实成熟过程内参基因筛选

杨航<sup>1</sup> 刘红昌<sup>2</sup> 石小兵<sup>1</sup> 葛菲<sup>1</sup> 赵致<sup>2\*</sup> 罗辉<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 贵州大学生命科学学院, 贵阳, 550025

<sup>2</sup> 贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵阳, 550025

<sup>3</sup> 贵州省林业厅推广总站, 贵阳, 550001

✉ 通讯作者: [zzhao@gzu.edu.cn](mailto:zzhao@gzu.edu.cn); ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2016 年, 第 5 卷, 第 5 篇

收稿日期: 2016 年 05 月 04 日

接受日期: 2016 年 05 月 15 日

发表日期: 2016 年 05 月 25 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2016, Vol.35, No.5)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

杨航等, 2016, 三叶木通果实成熟过程内参基因筛选, 基因组学与应用生物学, 35 (5): 1206-1212 (doi: [10.13417/j.gab.035.001206](https://doi.org/10.13417/j.gab.035.001206))

引用格式(英文):

Yang et al., 2016, Selection of Reference Genes during Berry Development in *Akebia trifoliata*(Thunb.) Koidz, Genomics and Applied Biology, 35(5): 1206-1212 (doi: [10.13417/j.gab.035.001206](https://doi.org/10.13417/j.gab.035.001206))

**摘要** 为了筛选三叶木通果实成熟过程中最稳定的内参基因, 本试验从三叶木通果实转录组数据中搜索出 22 条候选内参基因, 用 geNorm、Normfinder 三个软件进行分析, 分析结果显示 RG19 (histone h3)与 RG5 (EF- $\alpha$ )配合使用作为内参基因最稳定。本试验首次提供了在三叶木通果实成熟过程中比较理想的两条内参基因, 通过两条内参基因的配合使用, 可作为三叶木通果实成熟过程荧光定量试验的稳定参考。

**关键词** 三叶木通, 果实, 内参基因

## Selection of Reference Genes during Berry Development in *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz

Yang Hang<sup>1</sup> Liu Hongchang<sup>2</sup> Shi Xiaobing<sup>1</sup> Ge Fei<sup>1</sup> Zhao Zhi<sup>2\*</sup> Luo Hui<sup>3</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences Guizhou University, Guiyang, 550025

<sup>2</sup> College of Agriculture Guizhou University, Guiyang, 550025

<sup>3</sup> Forestry Department of Guizhou Province Popularized Terminal, Guiyang, 550001

✉ Corresponding author, [zzhao@gzu.edu.cn](mailto:zzhao@gzu.edu.cn); ✉ Authors

**Abstract** InTo figure out the most suitable genes in fruit ripening process, 22 candidate reference genes from transcriptome of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz were selected for stability analysis using geNorm, Normfinder and Bestkeeper. According to results, using histone h3 with a combination of EF- $\alpha$  as reference genes can accurately indicate relative expression of other genes. In this work, suitable reference gene combination of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz was during fruit ripening was first investigated and provide the accuracy for its qPCR.

**Keywords** *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz, Fruits, Reference genes

三叶木通(*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz)为木通科木通属木质藤本植物, 原产于中国和日本, 在我国主要分布于贵州、湖南、湖北、陕西和江西等地区(马玉华和王荔, 2011)。中药预知子为其干燥近成熟果实(国家药典委员会, 2015)。近年来, 针对三叶木通的研究主要集中在对其化学成分、生态学、药理作用、扦插栽培以及指纹图谱等方面(吴永朋等, 2013)。文献报道,  $\alpha$ -常春藤皂苷是其主要指标性成分和活性成分(侯雄军等, 2012), 其中的有效成分对癌细胞

理想的内参基因应该是在不同处理、不同组织, 甚至不同物种之间的表达量相同, 但实际实验中这样的内参基因是不存在的(袁伟等, 2012)。任何一种内参基因的稳定表达都是相对的, 在一定类型的细胞或实验因素作用下稳定表达的某内参基因在其他类型的细胞中或实验因素作用下可能是变化的(阙友雄等, 2009)。因此筛选特定物种在特定处理中稳定表达的内参基因是进行荧光定量试验的前提。

## 1 结果与分析

### 1.1 RNA 检测

用 1% 琼脂糖凝胶电泳对所获得 RNA 进行完整性验证, 18S 与 28S 电泳条带亮而 5S 条带暗, 说明 RNA 未降解, 完整性良好(图 1)。并利用 Thermo Scientific 酶标仪对 RNA 进行浓度检测(表 1)。

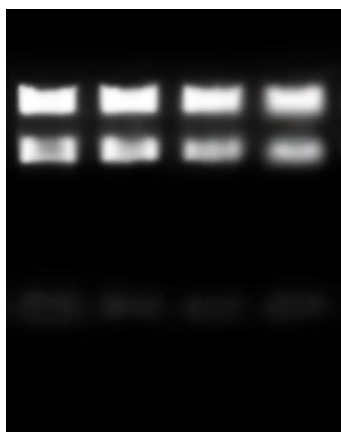


图 1 RNA 电泳分析

Figure 1 Agarose gel analysis of RNA samples

表 1 RNA 样品的提取浓度

Table 1 Concentration of RNA samples

样品编号 Sample No.	RNA 浓度( $\mu\text{g/mL}$ ) Concentration of RNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	OD 值( $A_{260}/A_{280}$ ) OD value ( $A_{260}/A_{280}$ )
Sample 1	386.0	2.36
Sample 2	441.0	2.37
Sample 3	288.0	2.33
Sample 4	349.0	2.31
Sample 5	182.5	2.28
Sample 6	160.0	2.23

### 1.2 初步评价

geNorm 评价结果显示, 在 22 条候选内参基因中逐一删除 M 值最大的基因, 最终剩余的 10 条候选内参基因分别为: RG3、RG5、RG7、RG9、RG12、RG14、RG15、RG17、RG19 和 RG21 (表 2)。Normfinder 评价结果显示, 在 22 条候选内参基因中最稳定的前 10 条基因分别是 RG15、RG21、RG7、RG12、RG19、RG4、RG17、RG3、RG5 和 RG9 (表 3)。其中 9 条候选内参基因(RG3, RG5, RG7, RG9, RG12, RG15, RG17, RG19, RG21)在两种软件的评价结果中均显示较稳定。

表2 geNorm 初次评价及排名

Table 2 First evaluation and ranking of geNorm

内参基因 Reference genes	M 值 M value	排名 Ranking
RG3 (EF- $\alpha$ )	0.260	5
RG5 (EF- $\alpha$ )	0.252	4
RG7 (Cytochrome b)	0.260	6
RG9 (Cytochrome b)	0.273	8
RG12 (PP2A)	0.221	2
RG14 (EF)	0.272	7
RG15 (18S)	0.276	9
RG17 (UBQ)	0.303	10
RG19 (histone h3)	0.219	1
RG21 (GBP)	0.235	3

### 1.3 二次评价

对初次评价筛选出的 9 条候选内参基因利用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软进行二次评价(表 4)。geNorm 软件评价显示在 9 条候选内参基因中 RG19 表达最稳定, RG17 表达最不稳定。按照 M 值由小到大排序为: RG19<RG12<RG21<RG5<RG7<RG3<RG15<RG9<RG17。Normfinder 软件评价显示 9 条候选内参基



因中 RG19 表达最稳定, RG17 表达最不稳定。Stabilityvalue 由小到大排序为: RG19<RG12<RG21<RG7<RG5<RG3<RG15<RG9<RG17。

表 3 Normfinder 初次评价

Table 3 First evaluation of Normfinder

内参基因 Reference genes	稳定值 Stability value	排名 Ranking	内参基因 Reference genes	稳定值 Stability value	排名 Ranking
RG1 (F-BOX)	0.218	14	RG12 (PP2A)	0.128	4
RG2 (RPL)	0.180	11	RG13 (actin)	0.301	20
RG3 (EF- $\alpha$ )	0.152	8	RG14 (EF)	0.209	13
RG4 (TUA)	0.141	6	RG15 (18S)	0.078	1
RG5 (EF- $\alpha$ )	0.163	9	RG16 (CYP)	0.227	15
RG6 (GAPDH)	0.239	18	RG17 (UBQ)	0.151	7
RG7 (Cytochrome b)	0.109	3	RG18 (F-BOX)	0.649	22
RG8 (F-BOX)	0.233	16	RG19 (histone h3)	0.132	5
RG9 (Cytochrome b)	0.177	10	RG20 (TUB)	0.181	12
RG10 (ELF)	0.237	17	RG21 (GBP)	0.101	2
RG11 (APR)	0.354	21	RG22 (SAND)	0.245	19

表 4 候选内参基因二次评价

Table 4 Second evaluation of candidate reference genes

内参基因 Reference genes	geNorm		Normfinder		BestKeeper		综合排名 Ranking
	M 值	排名	稳定值	排名	SD 值	排名	
	M value	Ranking	Stability value	Ranking	SD value	Ranking	
RG3 (EF- $\alpha$ )	0.266 791	6	0.139	6	0.218 724	4	5
RG5 (EF- $\alpha$ )	0.250 018	4	0.129	5	0.207 946	2	3
RG7 (Cytochrome b)	0.254 247	5	0.123	4	0.306 241	7	5
RG9 (Cytochrome b)	0.273 599	8	0.150	8	0.211 604	3	7
RG12 (PP2A)	0.222 764	2	0.090	2	0.235 696	5	2
RG15 (18S)	0.268 874	7	0.141	7	0.360 82	8	8
RG17 (UBQ)	0.296 366	9	0.176	9	0.399 173	9	9
RG19 (histone h3)	0.219 53	1	0.081	1	0.202 491	1	1
RG21 (GBP)	0.229 482	3	0.105	3	0.299 358	6	4

BestKeeper 软件评价也显示 9 条候选内参基因中 RG19 表达最稳定, RG17 表达最不稳定。根据 SD 值由小到大排序为: RG19<RG5<RG9<RG3<RG12<RG21<RG7<RG15<RG17。综合三个软件的分析结果, 显示 RG19 (histone h3)为 9 个候选内参基因中最稳定的内参基因, RG17(UBQ)为九个候选内参基因中最不稳定的内参基因。RG12 (PP2A)、RG5 (EF- $\alpha$ )和 RG21 (GBP)也比较稳定。此外, 根据 geNorm 软件推荐, 以 RG5 (EF- $\alpha$ )与 RG19 (histone h3)配合作为内参基因使用最稳定(图 2), 且配对变异系数  $Vn/n+1=0.060<0.15$ , 则两个内参基因配合使用已足够稳定, 不需要再加入第三个内参基因(图 3) (符伟等, 2012)。因此建议使用 RG5(EF- $\alpha$ )与 RG19 (histone h3)为内参基因。

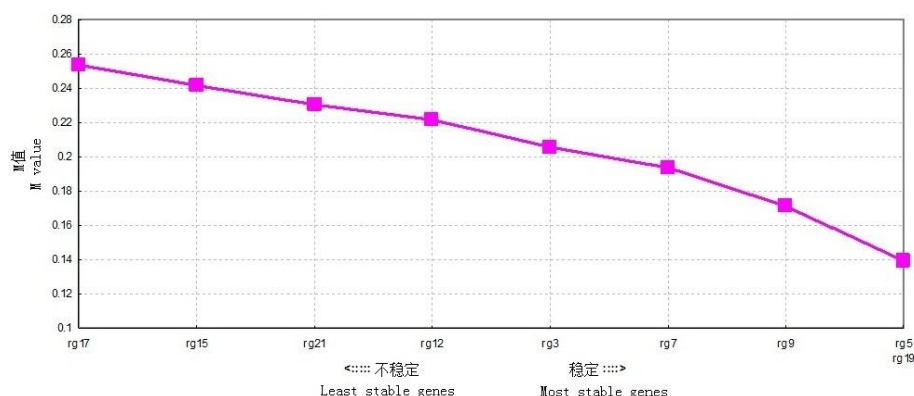




图 2 geNorm 分析候选内参基因稳定性

Figure 2 Stability and ranking of candidate reference genes by geNorm



图 3 geNorm 分析候选内参基因配对变异系数

Figure 3 Pairwise variations analyses of candidate reference genes by geNorm

#### 1.4 内参基因标准曲线及溶解曲线

软件分析显示 RG5 (EF- $\alpha$ )与 RG19 (histone h3)配合使用作为内参基因最稳定。故对两条内参基因进行标准曲线验证, 由仪器自带软件构建标准曲线(表 5)。由荧光定量仪器自带软件生成 RG5 (EF- $\alpha$ )与 RG19 (histone h3)两条内参基因的溶解曲线, 并计算出  $T_m$  值分别为 79.6 $^{\circ}\text{C}$  (图 4)和 83.2 $^{\circ}\text{C}$  (图 5), 二者均表现出明显的单峰, 说明两条基因特异性较好。

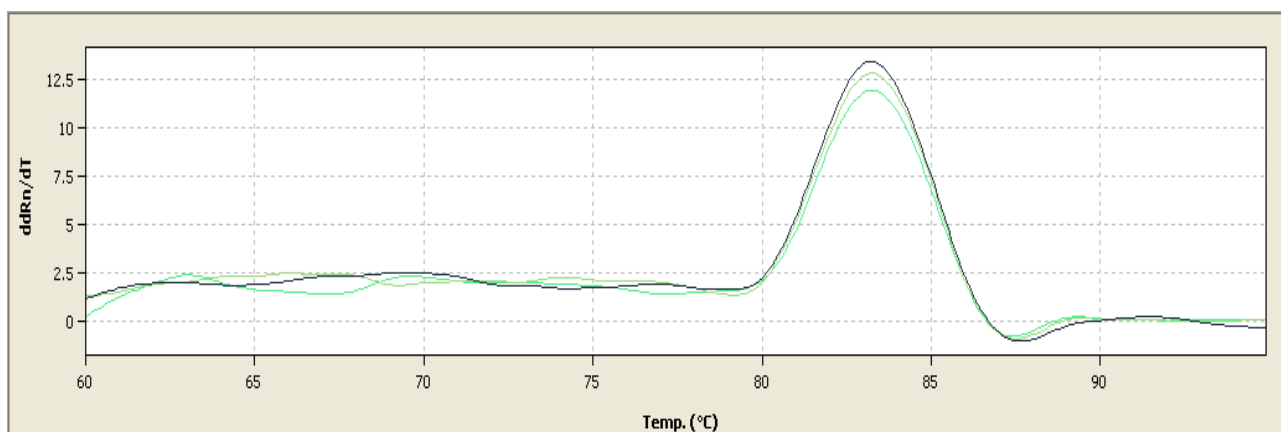


图 4 内参基因 RG5 (EF- $\alpha$ )溶解曲线

Figure 4 Melting curve of the reference gene RG5 (EF- $\alpha$ )

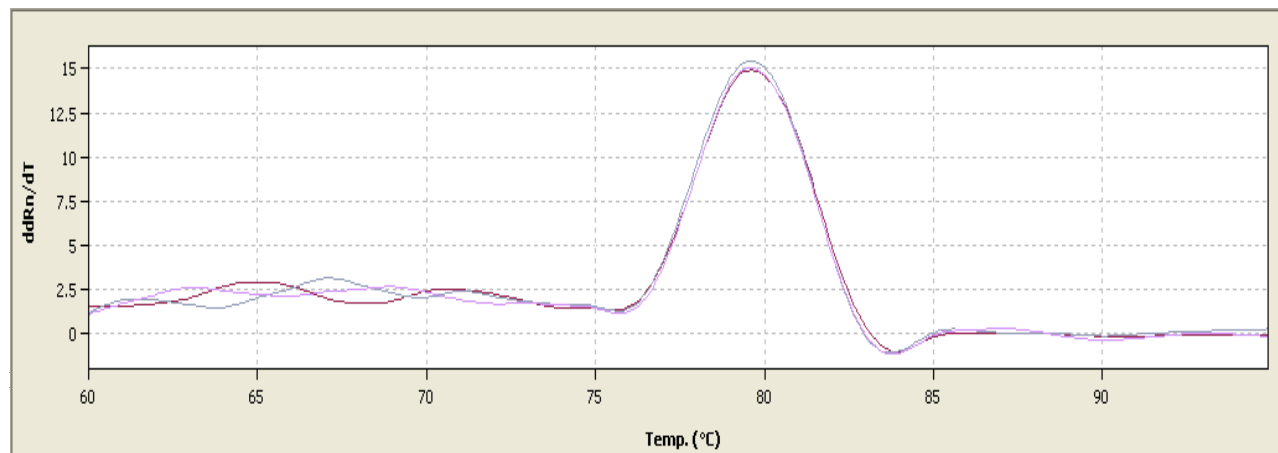


图 5 内参基因 RG19 (histone h3)溶解曲线

Figure 5 Melting curve of the reference gene RG19 (histone h3)



表 5 实时荧光定量 PCR 中 2 条内参基因标准曲线参数

Table 5 The parameters derived from RT-PCR standard curve of two reference genes

内参基因	斜率	相关系数 $R^2$	扩增效率 E	稀释倍数
Reference genes	Slope	Correlation coefficient	Efficiency E	Dilution multiple
RG5 (EF- $\alpha$ )	-3.63	0.996 98	0.89	5
RG19 (histone h3)	-3.31	0.995 63	1	5

## 2 讨论

使用本试验以野生三叶木通 6 个不同发育时期的果实作为样品, 基于果实转录组数据获得候选内参基因的序列进行引物设计及实时荧光定量 PCR 试验, 用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软件对各候选内参基因稳定性进行分析。结果显示 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软件评价结果基本一致, 均认为本试验中的 RG19 (histone h3) 为各候选内参基因中最稳定的内参基因。geNorm 软件默认为 M 值小于 1.5 的基因是稳定表达的基因, M 值越小表明基因表达越稳定。本试验中 9 条候选内参基因 M 值均小于 0.3, 其中 RG19(histone h3) 基因的 M 值仅为 0.22。在 Bestkeeper 软件评价中, SD 值小于 1 的内参基因被认为是稳定表达的基因, SD 越小表明该基因越稳定(肖翠等, 2012)。本试验中的 9 条候选内参基因 SD 值均小于 0.4, 其中 RG19 (histone h3) 基因的 SD 值仅为 0.20。由上述软件评价可知, 本试验中的 9 条候选内参基因的稳定性均已达到作为内参基因的标准, 其中筛选出的最优选择则更能满足荧光定量试验中对内参基因稳定性的要求。

geNorm 软件通过候选内参基因标准化因子(normalization factor)的配对差异(pairwise variation)分析( $V_n/n+1$ )来判定所需内参基因的最适数目。默认值为  $V_n/n+1=0.15$ 。若  $V_n/n+1<0.15$  说明以 n 个基因作为内参基因组合已经足够稳定, 不需要引入第 n+1 条基因(符伟等, 2012)。本试验中 n=2 时的  $V_n/n+1=0.060$ , 明显小于默认值 0.15, 因此可以认为取 2 条基因作为内参基因的稳定性已经非常可信, 不需要引入第 3 条内参基因。

综上所述, 本试验获得了三叶木通果实成熟过程中表达稳定的内参基因, 并进行了标准曲线和溶解曲线验证。最终证实, 以 RG19 (histone h3)与 RG5(EF- $\alpha$ )两条基因配合, 可作为三叶木通果实成熟过程中的内参基因使用。本试验结果可为三叶木通果实成熟过程中的基因表达分析提供参考。

## 3 材料与方法

### 3.1 内参基因标准曲线及溶解曲线

试验材料为野生三叶木通果实, 取自贵州省贵阳市花溪区花溪乡麦乃寨, 经贵州大学生命科学学院赵财副教授鉴定为木通科木通属三叶木通(*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz)。采样时间为自 2014 年 4 月起每隔一个月采样一次, 共采集 6 个时期的果实样品。果实采下后立即用液氮速冻, 后转存于  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱中保存。

### 3.2 RNA 提取及浓度检测

无果实样品在冷冻的研钵中磨细, 按照 Plant RNAKit (200) R6827-02 (OMEGA 公司)试剂盒说明提取 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳对所获得 RNA 进行完整性验证, 利用 Thermo Scientific 酶标仪对 RNA 进行浓度检测。用 DEPC 水将所有 RNA 稀释至相同浓度用于下游实验(Remans et al., 2008)。

### 3.3 cDNA 合成

无按照反转录试剂盒 PrimerScript<sup>TM</sup> RT ReagentKit Perfect Real time (TaKaRa 公司)说明进行反转录。获得的 cDNA 置于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

### 3.4 候选内参基因筛选及引物设计

根据文献, 共筛出 18s RNA、actin、CYP、Cyt b、EF- $\alpha$ 、elf、F-BOX、GAPDH、Histone h3、PP2A、rpl、SAND、EF、UBQ、APR、GBP、TUA 与 TUB 共 17 种类型的内参基因(Reid et al., 2006; Remans et al., 2008; 阙友雄等, 2009; 杨爱馥等, 2010; 袁伟等, 2012; 岳秀利等, 2013; 裴徐梨等, 2014; 张玉芳等, 2014)。从三叶木通果实转录组数据中搜索出以上 17 类内参基因共 207 条, 对转录组中的表达量数据进行分析, 筛选出结果较稳定的基因 22 条作为候选内参基因。用在线引物设计软件(<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>)对 22 条候选内参基因进行引物设计, 引物序列(表 6)送至英俊生物公司进行合成。

### 3.5 实时荧光定量 PCR



以 cDNA 为模板, 对 22 条候选内参基因进行荧光定量 PCR。试验体系为 20 L: 10 μL 荧光染料 SYBR Premix Ex Taq II (Takara 公司, SYBR® PremixEx Taq™ II Tli RNaseH Plus), 10 mol/L 的上下游引物各 1 μL, cDNA 模版 1 μL, 7 μL 超纯水。反应在 qTOWER 2.2 实时荧光定量 PCR 仪中(analytikjena 公司)进行。试验条件采用两步法: 95°C 预变性 3 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火与延伸 30 s, 进行 35 个循环, 60~95°C 每 0.6°C 进行 1 次荧光监测测定熔解曲线。每个样品设三个重复。

表 6 候选内参基因引物序列

Table 6 Candidate reference genes and their primer sequences

基因编号 Gene number	基因名称 Gene name	基因类型 Annotation	引物序列 Primer sequences	扩增长度(bp) Product size (bp)
RG1	comp109001_c0;orf2	F-BOX	GATTGAGACGGCTGTACCTATG CGGGACCAGATCTACTCCTAAT	112
RG2	comp86959_c0	RPL	CTCTTCGCCTTCACTGGTTAG CCCTTCTTCTAATCTGCTTCC	113
RG3	comp113525_c0	EF-α	GTGATCGAGAGGTTTGAGAAGG TGATACCACGTTACGTTTCAG	103
RG4	comp117161_c0	TUA	GAAGGCACAGGAGGATAGAAAG CTTGATAGGTGATCTGTGTGG	139
RG5	comp113525_c2	EF-α	GTCTCCCTCTTCAGGATGTTTAC GACAACCATAACCAGGCTTGA	95
RG6	comp107045_c1	GAPDH	CAAGGAGGAATCTGAGGGAAAC AGACCTGCTGTCACCTAGAA	91
RG7	comp110009_c0	Cytochrome b	TGGAAAGTTAAGGCCAGAAGAG GAGCTGTCCTCCAACAGTATC	86
RG8	comp117003_c0	F-BOX	TGAGGTTGAAGCAGAGGTTATC GTCTGTGCGTAGACGTAGAATAC	106
RG9	comp32821_c0	Cytochrome b	CCACAACACCCAGCTATTCA CCCTCAGTATCTTGCCCTAATG	109
RG10	comp118676_c0;orf2	ELF	AGGGTTCCTGCCTTTCATTC GGAGTGGGTCTTCCCTATCTA	80
RG11	comp108727_c0	APR	GGTGGATGGAGAATCCCTTAAC AATGGACACCAGGAAGCATAG	90
RG12	comp114322_c1	PP2A	GCGTTACATGGTCGCAAATC CAGCCTCATTGTCTCGAAGTAG	113
RG13	comp104478_c0	actin	AAGCCAGAGGTCGAATTAAGA GATGCTTATGCGAAGGGAATTG	120
RG14	comp114774_c0	EF	GGAAGCTACTCTACTTGCCTAC CCTCTGTGACAGGGTATCTTTG	109
RG15	comp112808_c0	18S	CTCGATCTGCTCAACCCTTAT GGTATCATCTCCATTGCCCTT	101
RG16	comp109264_c0;orf2	CYP	TTAGTGAACGCAACTCCGAATA CTGGGCTCATGTGTATCTCTTT	93
RG17	comp106488_c1	UBQ	TTGAGGATGGCAGAACGTTAG TTCCTGTCCAACACTTCAC	97
RG18	comp99435_c0	F-BOX	CTGGATGCCTTGGTTTGTATG CCAGCACTAGACTTCCTTCTAC	103
RG19	comp114747_c0	histone h3	CAAGCTCAGGCTGGAATTGA CGCATCTTCATCGTCCTCATA	108
RG20	comp106678_c0	TUB	TCTTGCGAAGTCCGTCTAATG ACGTACAACCCTCAACTTCTTC	124
RG21	comp117432_c0	GBP	CCGCTCAATCGAAGACAAGA CATCCTCATAACGCCTCAGATAC	92
RG22	comp113899_c0	SAND	CCGAGAATTAGATGGTCTTCC	104



CTTCAAGTTGCTCTCCACTTCTA

### 3.6 数据分析

由 qTOWER 2.2 实时荧光定量 PCR 仪自带的软件计算三个重复的 Ct 平均值为该基因在该样品中的 Ct 值。用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软件对各候选内参基因稳定性进行分析。geNorm 软件根据相对定量数据 q 值计算出每个候选内参基因的稳定性值(M value), 然后计算某一内参基因与其他内参基因的配对变异系数(Vn/n+1)从而判定所需内参基因的最适数目。Normfinder 软件同样根据相对定量数据 q 值进行分析, 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(周良云等, 2014)。BestKeeper 软件直接对 Ct 值进行分析, 主要以标准变异系数(SD)和变异相关系数(CV)来判断内参基因的稳定性(侯维海等, 2011)。由于 BestKeeper 软件一次最多只能同时对 10 条内参基因进行评价。因此本试验先用 geNorm 和 Normfinder 两软件对 22 条候选内参基因进行初步评价, 筛选出两软件均认为最为稳定的前 10 条候选内参基因, 再使用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三软进行二次评价。

### 3.7 内参基因标准曲线

评价出最稳定的内参基因进行标准曲线的验证。采用上述荧光定量 PCR 体系及条件, 将样品 cDNA 按 5 倍梯度稀释(共 5 个稀释浓度), 每个浓度设 3 个重复, 仪器自带软件构建标准曲线。

使用本试验以野生三叶木通 6 个不同发育时期的果实作为样品, 基于果实转录组数据获得候选内参基因的序列进行引物设计及实时荧光定量 PCR 试验, 用 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软件对各候选内参基因稳定性进行分析。结果显示 geNorm、Normfinder 和 BestKeeper 三个软件评价结果基本一致, 均认为本试验中的 RG19 (histone h3)为各候选内参基因中最稳定的内参基因。geNorm 软件默认为 M 值小于 1.5 的基因是稳定表达的基因, M 值越小表明基因表达越稳定。

### 作者贡献

杨航是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 并完成数据分析及论文初稿写作; 刘红昌和罗辉参与实验设计、实验结果分析; 葛菲和石小兵参与试验材料收集与管理; 赵致是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

诚挚本研究由贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目《木通仿生栽培研究与应用示范》(黔科合 SY 字[2014] 3034-1 号)、贵州省林业厅青年人才基金项目(黔林科合 J 字[2014] 08 号)和贵州省药用植物繁育与种植人才基地(黔人领发(2013) 15 号)共同资助。

### 参考文献

- Bala Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015, PRC codex, ChinaMedical Science Press, Beijing, China, pp.297 (国家药典委员会, 2015, 中华人民共和国药典, 中国医药科技出版社, 中国, 北京, pp.297)
- Fu W., Xie W., Zhang Z., Wu Q.J., Wang S.L., and Zhang Y.J., 2012, Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutellaxyllostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin, *Kunchong Xuebao* (Acta Entomologica Sinica), 55(12):1406-1412 (符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军, 2012, Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选, 昆虫学报, 55(12): 1406-1412)
- Hou W.H., Sun P., Chen Q.J., and Li X.E., 2011, Selection of the reference genes for gene expression studies in *Rehmanniaglutinosa* by real-time quantitative PCR, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 27(17):76-82 (侯维海, 孙鹏, 陈全家, 李先恩, 2011, 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选, 中国农学通报, 27(17): 76-82) Hou X.J., Liu Y.T., Zhang W.G., Li Z.F., Yang S.L., and Feng Y.L., 2012, Extraction process of saponins PD in *Fructus akebiae*, *Zhongyao Xinyao yu Linchuang Yaoli* (Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology), 23(2): 204-207 (侯雄军, 刘岩庭, 张武岗, 李志峰, 杨世林, 冯育林, 2012, 预知子中  $\alpha$ - 常春藤皂苷提取工艺研究, 中药新药与临床药理, 23(2): 204-207)
- Ma Y.H., and Wang L., 2011, Research advances in characteristics of *Akebia trifoliata*, *Jiangxi Nongye Xuebao* (Acta Agriculturae Jiangxi), 23(5): 71-73 (马玉华, 王荔, 2011, 三叶木通特性研究进展, 江西农业学报, 23(5): 71-73)
- Pei X.L., Jing Z.G., Tang Z. Chen Z.W., Wang Z., Luo T.K., and Zhang X.L., 2014, Cloning and expression analysis of a pollen coat protein gene from Broccoli, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 33(5): 1046-1052 (裴徐梨, 荆赞革, 唐征, 陈忠文, 王镇, 罗天宽, 张小玲, 2014, 青花菜花粉外壁蛋白基因的克隆与表达特征分析, 基因组学与应用生物学, 33 (5):1046-1052)
- Que Y.X., Xu L.P., Xu J.S., Zhang J.S., Zhang M.Q., and Chen R.K., 2009, Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in sugarcane, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 30(3): 274-278 (阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 张积森, 张木清, 陈如凯, 2009, 甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择, 热带作物学报, 30(3): 274-278)
- Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., and Lund S.T., 2006, An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development, *BMC Plant Biology*, 6(27): 1211
- Remans T., Smeets K., Opendakker K., Mathijsen D., Van gronsveld J., and Cuypers A., 2008, Normalisation of real-time RT-PCR gene expression Measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations, *Planta*, 227: 1343-1349



- Ren H.Y., Fang Z.Q., and Liang C., Research of akebia fruit seeds and akebia fruit inhibiting liver cancer cells malignant proliferation, *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan* (Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine), 32(6): 1310-1312(任红艳, 方肇勤, 梁超, 2014, 预知子籽及预知子抑制肝癌细胞恶性增殖的研究, *中华中医药学刊*, 32 (6): 1310-1312)
- Wu Y.P., Yuan Y.L., and Xiao Y.P., 2013, The research advancement review of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz, *ShanxiLinye Keji* (Shaanxi Forest Science and Technoloe), (1): 31-34 (吴永朋, 原雅玲, 肖娅萍, 2013, 三叶木通的研究进展, *陕西林业科技*, (1): 31-34)
- Xiao C., Yan J.W., Long G.Y., Dai S.M., Li D.Z., and Deng Z.N., 2012, Stability evaluation of reference genes in citrus, *Guoshu Xuebao* (Journal of Fruit Science), 29(6): 978-984(肖翠, 严佳文, 龙桂友, 戴素明, 李大志, 邓子牛, 2012, 柑橘内参基因的稳定性评价, *果树学报*, 29(6): 978-984)
- Yang A.F., Zhou Z.C., Dong Y., Jiang B., Wang X.Y., Chen Z., Guan X.Y., Wang B., and Sun D.P., 2010, Stability comparison of cytb and 茁-actin genes expression in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), *Zhongguo Nongye Keji Daobao* (Journal of Agricultural Science and Technology), 12 (1):79-84 (杨爱馥, 周遵春, 董颖, 姜北, 汪笑宇, 陈仲, 关晓燕, 王摆, 孙大鹏, 2010, 仿刺参 cyt b 和 茁-actin 基因表达稳定性比较, *中国农业科技导报*, 12(1): 79-84)
- Yuan W., Wan H.J., and Yang Y.J., 2012, Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants, *Zhiwu Xuebao* (Chinese Bulletin of Botany), 47(4): 427-436 (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)
- Yue X.L., Gao X.J., Wang J.J., Lv J.J., and Shen H.M., 2013, Selection of reference genes and study of the expression levels of detoxifying enzymes of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 46(21): 4542-4549 (岳秀利, 高新菊, 王进军, 吕娟娟, 沈慧敏, 2013, 二斑叶螨内参基因的筛选及解毒酶基因的表达水平, *中国农业科学*, 46(21): 4542-4549)
- Zhang Y.F., Zhao L.J., and Zeng Y.L., 2014, Selection and application of reference genes for gene expression studies, *Zhiwu Shengli Xuebao* (Plant Physiology Journal), 50(8): 1119-1125 (张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲, 2014, 基因表达研究中内参基因的选择与应用, *植物生理学报*, 50 (8):1119-1125)
- Zhou L.Y., Mo G., Wang S., Tang J.F., Yue H., Huang L.Q., Shao A.J., and Guo L.P., 2014, Stability analysis of reference gene based on real-time PCR in *Artemisia annua* under cadmium treatment, *Zhongguo Zhongyao Zazhi* (China Journal Chinese Materia Medica), 39(5): 777-784 (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)