

开花期水稻颖花实时定量 RT-PCR 分析中内参基因的选择

何永明¹, 曾晓春^{1, 2*}

(1. 江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/农业部双季稻生理生态与栽培重点开放实验室, 江西 南昌 330045; 2. 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 实时定量 RT-PCR (qRT-PCR) 技术现已发展成为基因表达分析的首选方法, 然而为了得到精确和可靠的 qRT-PCR 分析结果, 需要应用稳定表达的内参基因对样品进行校正。以籼稻‘武运粳 7 号’和籼稻‘明恢 63’的颖花为试验材料, 应用 geNorm 算法对 6 个常用的内参基因 (*ACT1*、*eEF1-α*、*β-TUB*、*UBQ5*、*GAPDH* 和 *UBC*) 在颖花开放过程中的表达稳定性进行分析。结果发现: *eEF1-α* 和 *β-TUB* 在‘武运粳 7 号’颖花样品中的表达最为稳定, *UBC* 和 *GAPDH* 在‘明恢 63’颖花样品中的表达最为稳定, 而 *ACT1* 在 2 个品种的颖花样品中表达均最不稳定。此外, 同时选取 2 个最稳定表达的内参基因作为内参照可获得更精确的校准。分析不同内参基因对 JA 生物合成关键基因 *OsAOC* 表达定量的影响。*OsAOC* 表达的相对定量会随所选内参基因的不同而发生变异, 进一步强调选择合适的内参基因进行校准是获得可靠 qRT-PCR 结果的重要前提。

关键词: 水稻颖花; 基因表达; 实时定量 RT-PCR; 内参基因

中图分类号: S511; Q344+.13 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1086-07

Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization in Rice Florets during Anthesis

HE Yong-ming¹, ZENG Xiao-chun^{1, 2*}

(1. Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education / Key Laboratory of Physiology, Ecology, and Cultivation of Double, Cropping Rice, Ministry of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Life Science and Environmental Resources, Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) has become the most common method for gene expression analysis. In order to get accurate and reliable qRT-PCR results, stably expressed reference genes are required for normalization of tested samples. The expression stabilities of 6 commonly used reference genes (*ACT1*, *eEF1-α*, *β-TUB*, *UBQ5*, *GAPDH* and *UBC*) were carefully assessed by geNorm algorithm in florets during anthesis in japonica rice ‘Wuyunjing 7’ and indica rice ‘Minghui 63’. The results showed that the expression of *eEF1-α* and *β-TUB* was the most stable in the floret samples of ‘Wuyunjing 7’. *UBC* and *GAPDH* exhibited the most stable expression in ‘Minghui 63’. In contrast, *ACT1* was found to be the least stable expression among the tested samples from both rice varieties. Moreover, a combination of two most stable genes was found to be better as internal control for normalization of

收稿日期: 2012-06-30 修回日期: 2012-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960180)和江西省科技支撑计划项目(20111BBF60009)

作者简介: 何永明(1981—)男, 讲师, 博士生, 主要从事植物生长物质研究, E-mail: hymcom@126.com; * 通讯作者: 曾晓春, 教授, 博士, E-mail: xchzeng2002@yahoo.com.cn。

the data. The effect of normalization with different internal controls on quantification of *OsAOC*, a key gene in JA biosynthesis, was also examined. The relative quantification of expression of *OsAOC* varied according to the internal controls used, thus highlighting that choice of stable reference genes for normalization was a critical precondition for reliable qRT-PCR data.

Key words: rice florets; gene expression; quantitative real-time RT-PCR; reference genes

实时定量 RT-PCR (quantitative real-time reverse transcription-PCR, qRT-PCR) 技术自 10 多年前诞生以来,因其具有灵敏、特异、精确以及使用简便等优点,现已发展成为分子生物学研究中的重要工具^[1]。应用 qRT-PCR 进行基因表达分析时,为了消除起始总 RNA 量、反转录效率以及转录活性等差异对检测信号强度的影响,需要引入稳定表达的内参基因(reference gene)对样本 mRNA 部分进行精确校正^[2]。内参基因选择是否合适对 qRT-PCR 结果的可靠性和精确度起到了非常关键的作用,据 Gutierrez 等^[3]报导与经验的内参基因相比,使用未经验证的内参基因进行校正将对目标基因表达水平的定量出现 100 倍的偏差。由于试验材料和条件的千差万别,理想化的内参基因是不存在的,实际中用于校正的内参基因应当在评价目标基因表达的试验条件下稳定表达。目前 qRT-PCR 常用的内参基因是参与细胞基本生命过程的管家基因(housekeeping gene),如甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAPDH)、肌动蛋白(actin)、泛素(ubiquitin)、微管蛋白(tubulin)和 18S rRNA 等^[4]。大量研究表明这些常用的管家基因只是在特定的细胞组织和试验条件下稳定表达,而在其它试验体系中的表达变异很大^[3,5-6],因此对于某特定试验体系,需要进行合适内参基因的筛选。为了帮助科研工作者从一系列管家基因中筛选出适合某一试验体系的内参基因,目前已发展出了一些实用的统计算法,如 geNorm^[2]、Bestkeeper^[1],可以对特定试验体系下候选内参基因的表达稳定性进行评价。随着对 qRT-PCR 定量结果可靠性和精确性要求的不断提高,这些统计算法的应用越来越普遍,尤其在医学和动物研究领域。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,也是进行分子遗传学研究的重要模式单子叶植物。此前仅有研究报道了水稻不同发育时期不同组织和器官、各种处理条件下的幼苗以及发育种子 qRT-PCR 分析中内参基因的选择^[4,8-9],但目前有关水稻颖花开放过程中内参基因的选择未见报道。水稻颖花开放在短时间内发生着显著的生理和形态变化,对随后的受精结实有直接影响。研究颖花开放的调控机制在生产上有助于解决水稻杂交制种中经常出现的父母本花时不遇的问题以及开花期高温引起的颖花不育^[10-11]。目前对水稻颖花开放生理机制的研究已较系统^[11-12],然而对其分子机理的研究甚少,筛选出水稻颖花开放过程中稳定表达的内参基因将有助于应用 qRT-PCR 技术研究水稻颖花开放的基因调控网络,为此本研究对 6 个常用的内参基因在水稻颖花开放过程中的表达稳定性进行分析,同时还研究了不同内参基因对茉莉酸(JA)生物合成关键基因 *OsAOC* 表达定量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种粳稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) ‘武运粳 7 号’(‘Wuyunjing7’,简称‘WYJ7’)和籼稻(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) ‘明恢 63’(‘Minghui63’,简称‘MH63’),分别种植于大田中,按常规方法管理。在水稻抽穗开花期间,取样前 1 d 下午对上部颖花已开放过的稻穗挂牌标记,由于稻穗的开花顺序是从上部枝梗依次向下进行,第 2 天开放的颖花大部分着生在稻穗中部。在稻穗开花前 3 h (09:00)和正开花时(12:00),分别剪取稻穗取样当天已开放的上部颖花、取样当天会开放的中部颖花、取样当天不开放的下部颖花。每份样品取自 5 个稻穗颖花的混合样。样品采集后立即用液氮速冻,随后保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 采用 Trizol 试剂(北京全式金)法提取样品总 RNA,具体操作按公司说明书,每份颖花样品单独提取 2 份 RNA。总 RNA 的浓度和纯度用 NanoDrop 2000 微量分光光度计(Thermo Scientific)测定,完整性以甲醛变性凝胶电泳检测。

1.2.2 第一链 cDNA 的合成 每份 RNA 样品取 4 μg 用于 cDNA 的合成。总 RNA 中少量基因组 DNA

污染的去: 4 μg 总 RNA、1 U DNase I (Amplification Grade ,Invitrogen) 、1 μL buffer(10 ×)、补 DEPC - 水至 10 μL, 室温下反应 18 min, 反应结束后加 1 μL 25 mmol EDTA 65 °C 10 min 灭活 DNase I。使用 M - MLV 逆转录酶(Invitrogen) 进行第一链 cDNA 的合成, 反转录操作如下: 上述经 DNase I 消化的总 RNA 混合液、1 μL oligo(dT) 18 (500 μg/mL) 、1 μL 10 mmol dNTP 混合物 65 °C 5 min, 立即置于冰上, 然后加入 5 μL cDNA synthesis buffer (5 ×)、1 μL M - MLV、2 μL 0. 1 DTT、1 μL RNase inhibitor (In- vitrogen) 补 DEPC - 水至 25 μL 37 °C 反应 50 min 75 °C 加热 15 min 终止反应。最后将合成的 cDNA 稀释至 400 μL, 即终浓度相当于 10 ng/μL 总 RNA。

1. 2. 3 qRT-PCR 分析 qRT-PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) 试剂盒(TAKARA) , 反应体系为: 2 μL cDNA 5 μL SYBR Premix Ex TaqII (2 ×) 0. 2 μL ROX Reference Dye II (50 ×) 0. 2 μL 正、反向引物(10 μmol/L) , 反应体积 10 μL。扩增反应在 ABI PRISM 7500 Real - Time PCR 系统上进行, 反应条件设置为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 6 s 和 60 °C 延伸 37 s 42 个循环。反应结束后做溶解曲线, 并取反应产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。各颖花样品独立提取的 2 份 RNA 均进行了分析, 每份 RNA 样品 3 次技术重复; 2 份 RNA 样品重复间的 qRT-PCR 分析结果趋势一致, 取同一批次的 1 次重复进行数据分析。

1. 2. 4 目标基因及其引物 本研究的候选内参基因是 6 个常用的水稻管家基因 *ACT1*、*eEF1-α*、*β - TUB*、*UBQ5*、*GAPDH* 及 *UBC*, 其中 *ACT1* 用于 qRT-PCR 分析的引物序列参考 Ma 等^[13], 其余 5 个基因的引物序列参考 Jian 等^[8]。同时, 还分析了颖花开放过程中茉莉酸(JA) 生物合成基因 *OsAOC* 的表达变化, *OsAOC* 引物序列参考 Kong 等^[14]。所有目标基因及引物序列的具体信息见表 1。

表 1 目标基因及用于 qRT-PCR 分析的引物序列

Tab. 1 Target genes and their sequences used for qRT-PCR analysis

基因代号 Gene symbol	基因名称 Gene name	登录号 Accession no.	正向引物 5' - 3' Forward primer	反向引物 5' - 3' Reverse primer	扩增子 / bp Amplicon
<i>ACT1</i>	肌动蛋白 1 Actin 1	AK100267	TGGCATCTCTCAGCA- CATTCC	TGCACAATGGAT- GGGTCAGA	76
<i>eEF1-α</i>	真核延伸因子 1 - alpha Eukaryotic elongation factor 1 - alpha	AK061464	TTTCACTCTTGGTGT- GAAGCAGAT	GACTTCCT- TCACGATTTGATCG- TAA	103
<i>β - TUB</i>	Beta - 微管蛋白 Beta - tubulin	AK072502	GCTGACCACAC- CTAGCTTTGG	AGGGAACCTTAG- GCAGCATGT	82
<i>UBQ5</i>	泛素 5 Ubiquitin 5	AK061988	ACCACTTCGACCGC- CACTACT	ACGCCTAAGCCTGCT- GGTT	69
<i>GAPDH</i>	甘油醛 - 3 - 磷酸 - 脱氢 酶 Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase	AK064960	AAGCCAGCATCCTAT- GATCAGATT	CGTAACCCAGAATAC- CCTTGAGTTT	79
<i>UBC</i>	泛素缀合酶 E2 Ubiquitin - conjugating enzyme E2	AK059694	CCGTTTGTAGAGC- CATAATTGCA	AGGTTGCCTGAGTCA- CAGTTAAGTG	76
<i>OsAOC</i>	丙二烯氧化物环化酶 Allene oxide cyclase	AK071443	GAGGCTTCTTGCTAG- TAGGTGGA	CGTAGTGGCCGCTCGT- TGTACT	79

1. 2. 5 基因表达稳定性分析 应用 geNorm 算法(版本 genorm^{plus}, [http://www. biogazelle. com/genorm- plus](http://www.biogazelle.com/genorm-plus)) 对 6 个候选内参基因的表达稳定性进行分析。

2 结果与分析

2. 1 qRT-PCR 数据可靠性分析

提取的样品总 RNA 经 NanoDrop 2000 微量分光光度计测定, 显示各样品 A260/A280 均在 1. 9 ~ 2. 1 ,

说明纯度理想; 经甲醛变形凝胶电泳检测显示无明显降解。6 个内参基因 qRT-PCR 反应完成后的溶解曲线均呈现单一峰, 扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测也只显示一条预期大小的条带(图 1), 说明这 6 对引物均能特异扩增相应的内参基因, 没有引物二聚体的形成, 同时反转录合成的 cDNA 也没有受到基因组 DNA 污染。每内参基因各样品 3 次重复间的扩增曲线重复性都很好, 循环阈值 (threshold cycle C_t) 误差很小, 标准差为 0.006 ~ 0.174, 平均为 0.050 ± 0.039 , 取 3 次重复的平均 C_t 值用于后续 geNorm 分析。6 个内参基因各样品间的平均 C_t 值如图 2 所示。从图 2 可知, UBC 和 $\beta-TUB$ 的表达水平比其它 4 个内参基因更低 (C_t 值更高)。

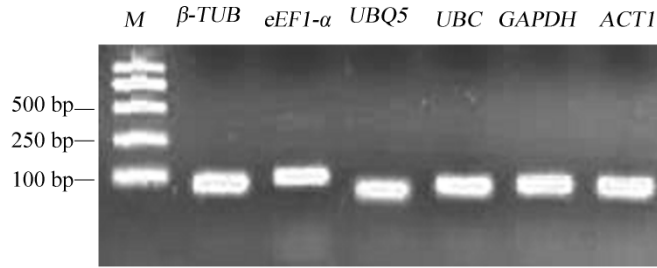
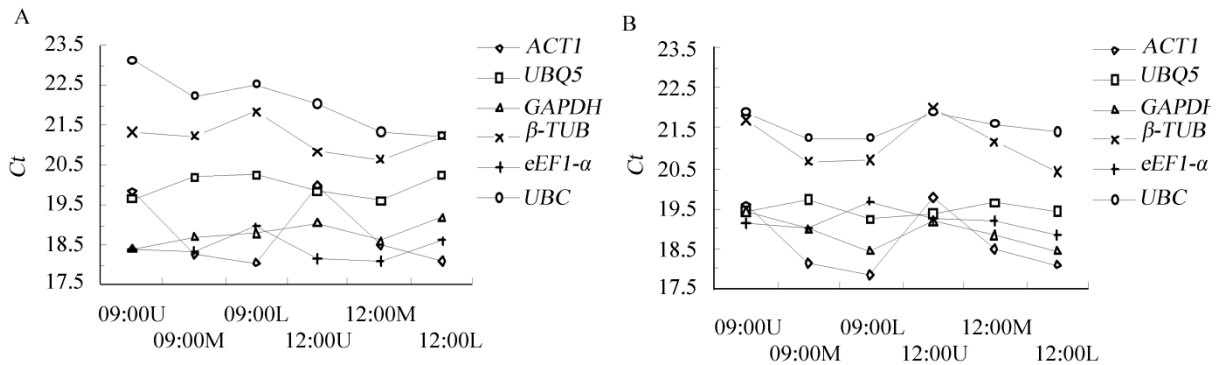


图 1 内参基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶 20 g/L 电泳检测
Fig. 1 Agarose gel 20 g/L electrophoresis of amplified products for tested reference genes



09:00: 颖花开放前 3 h, 12:00: 颖花开放时 “U”、“M”、“L”: 分别表示取样当天稻穗上部已开放的颖花、中部将开放的颖花、下部不开放的颖花。 C_t 值为 3 次重复的平均值。

09:00: 3 h before floret opening; 12:00: At floret opening “U”, “M”, “L” represent florets at upper part of panicle which had opened before the day, florets at middle part of panicle which have opened on the day and florets at lower part of panicle which wouldnt open on the day, respectively. Each C_t value is the mean of three replicates.

图 2 6 个内参基因在粳稻 ‘WYJ7’ (A) 和籼稻 ‘MH63’ (B) 不同颖花样品中的 C_t 值

Fig. 2 The C_t value of six reference genes tested in different floret samples of japonica rice ‘WYJ7’ (A) and indica rice ‘MH63’ (B)

2.2 内参基因表达稳定性分析

为筛选出最适内参基因, 本研究应用 geNorm 软件对各内参基因的表达稳定性进行分析。geNorm 是目前在特定实验体系下从候选基因中选取稳定表达内参基因的最常用统计软件, 最新版本是 $genorm^{plus}$, 整合在 $qbase^{plus}$ 中, 向 $genorm^{plus}$ 中直接输入 qRT-PCR 分析所得的 C_t 值就可以计算出候选内参基因的表达稳定性。geNorm 以 M 值表示特定试验条件下候选内参基因的平均表达稳定性, M 值越小表示表达稳定性越高。若在一系列相对均一的样品中某内参基因的 M 值 < 0.5 , 认为该内参基因的表达稳定, 适合该试验样品的校正^[15]。从图 3 可知 6 个内参基因在粳稻 ‘WYJ7’ 颖花样品中的表达稳定性从高到低依次是 $eEF1-\alpha$ 、 $\beta-TUB$ 、 $GAPDH$ 、 $UBQ5$ 、 UBC 、 $ACT1$ 。除 $ACT1$ 和 UBC 的 M 值较高外, 其余 4 个基因的 M 值都在 0.31 以下, 适合用作粳稻颖花样品的校正。在籼稻 ‘MH63’ 颖花样品中的表达稳定性从高到低依次是 UBC 、 $GAPDH$ 、 $UBQ5$ 、 $eEF1-\alpha$ 、 $\beta-TUB$ 和 $ACT1$ 。除 $ACT1$ 和 $\beta-TUB$ 的 M 值较高外, 其余 4 个基因的 M 值都在 0.4 以下, 适合用作籼稻颖花样品的校正。

2.3 精确校正的最适内参基因数目

通常选择 1 个高稳定表达的内参基因用于 qRT-PCR 数据校正是足够的, 但有些试验需分析表达量变化微弱的目标基因、或者对结果的精确度要求很高, 这时需要 2 个或以上稳定表达的内参基因进行精

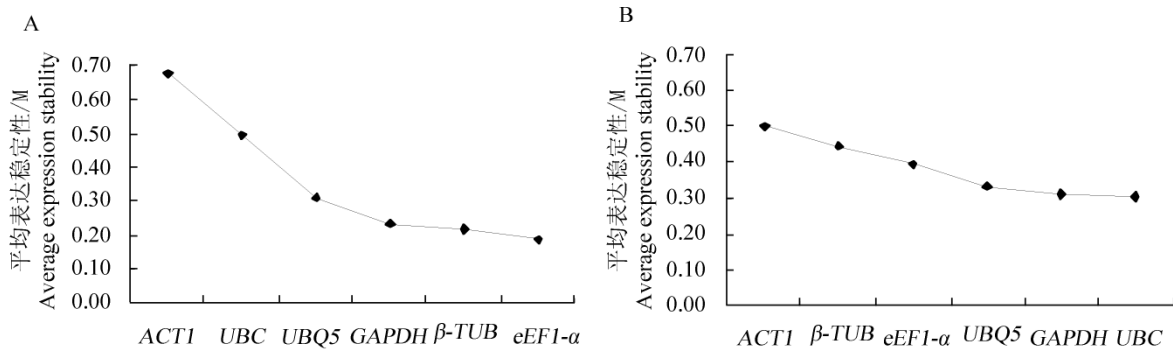


图 3 geNorm 分析获得的各内参基因在粳稻 ‘WYJ7’ (A) 和籼稻 ‘MH63’ (B) 颖花样品中的平均表达稳定性(M)

Fig.3 Average expression stability (M) of reference genes by geNorm analysis among floret samples of japonica rice ‘WYJ7’ (A) and indica rice ‘MH63’ (B)

确校正才能符合试验要求。为筛选出精确校正的最适内参基因数目,本研究利用 geNorm 计算个内参基因间的配对变异度(V)。geNorm 得出的配对变异度 V 值的截止值是 0.15,当 V 值 < 0.15,则表示不需要增加更多的内参基因进行校正^[2]。从图 4 可知,在粳稻 ‘WYJ7’ 和籼稻 ‘MH63’ 颖花样品中,基于 2 个或 3 个最稳定表达内参基因作校正因子间的比值(V_{2/3}) 均小于 0.15,表明用于精确校正的最适内参基因数目是 2 个。因此, ‘WYJ7’ 颖花样品的最适校正因子是取内参基因 eEF1- α 和 β -TUB 的几何平均值, ‘MH63’ 颖花样品的最适校正因子是取内参基因 UBC 和 GAPDH 的几何平均值。

2.4 不同内参基因对 qRT-PCR 定量目标基因表达水平的影响

为进一步验证不同内参基因对 qRT-PCR 分析基因表达的影响,本研究根据上述 geNorm 计算的结果,分别选取不同的内参基因对粳稻 ‘WYJ7’ 颖花样品中茉莉酸(JA) 生物合成关键基因 OsAOC 表达水平进行校正。从图 5 可知,由于用于校正的内参基因的不同,OsAOC 表达水平的相对定量结果会出现较大差异。选择稳定表达的 GAPDH 或者 2 个最稳定表达的(eEF1- α + β -TUB) 进行校正,OsAOC 表达水平

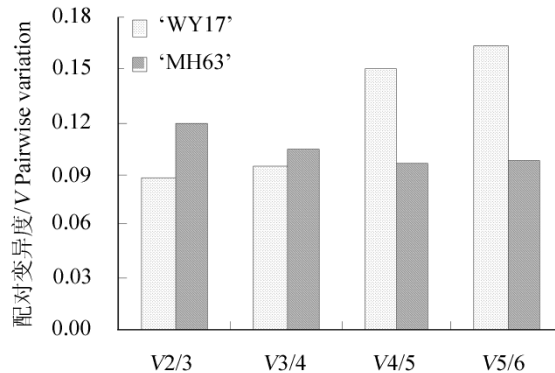


图 4 通过 geNorm 确定的用于精确校正的最适内参基因数目

Fig.4 Determination of the optimal number of reference genes for accurate normalization by geNorm analysis

的相对定量结果比较一致;而以表达不稳定的内参基因 ACT1 进行校正时,会导致稻穗未开放颖花(09: 00M/ 09: 00L/12: 00L) 和正开放颖花(12: 00M) 目标基因 OsAOC 表达水平的相对定量被严重低估。

3 讨论

影响 qRT-PCR 精确性的因素伴随整个试验过程,样本 RNA 的完整性、基因组 DNA 的污染、cDNA 反转录合成效率、引物设计、PCR 操作、内参基因的选择以及数据处理等均会对结果产生误差^[1]。为保证 qRT-PCR 结果的精确性和可靠性,非常关键的策略是使用该试验条件下稳定表达的内参基因进行校正。通常所用的内参基因虽然是参与细胞基本生命活动过程的管家基因,但它们的表达并不是恒定不变,会随组织和处理的不同而发生变化,若随意选用内参基因进行校正将导致 qRT-PCR 结果出现偏差^[3]。因此,用于特定试验体系校正的内参基因在使用前需要对其表达稳定性进行验证,对于这一点大多研究者都很清楚,但在实际应用中又经常被忽视,尤其在植物分子生物学研究领域。

关于水稻基因表达 qRT-PCR 分析中内参基因的选择,目前有一些研究进行了较详细的探讨。Li 等^[4]报道水稻种子发育过程中 ACT1 和 eEF4 - α 的表达最稳定,18S 和 28S RNA 表达最不稳定。Jian 等^[8]报道在水稻不同组织和器官间表达最稳定的是 eEF1- α 和 UBQ - 5,而 β -TUB 的表达最不稳定;在

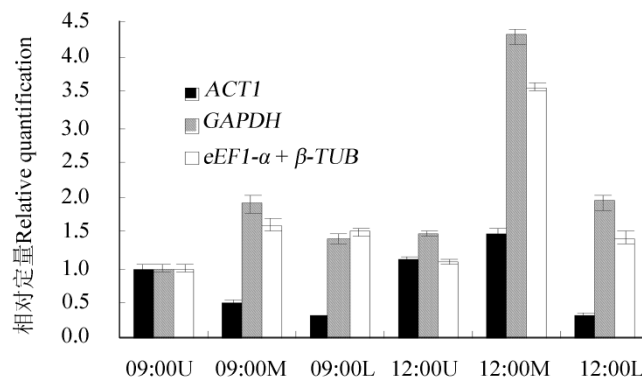
不同处理的水稻幼苗间表达最稳定的是 18S 和 28S RNA,而 *UBQ-10* 的表达最不稳定。本研究对 6 个常用的内参基因在水稻颖花开放过程中的表达稳定性进行 *geNorm* 分析后发现,在粳稻 ‘WYJ7’ 颖花开放过程中 *ACT1* 表达最不稳定, *eEF1- α* 表达最稳定,在籼稻 ‘MH63’ 颖花开放过程中 *ACT1* 表达最不稳定, *UBC* 表达最稳定(图 3)。结果说明 *ACT1* 不适合用于水稻颖花组织基因表达检测的校正,尽管有很多研究以 *ACTIN* 作内参基因^[13-14,17]。此外若需对水稻颖花样品进行更精确的校正,在粳稻中可以同时选择 *eEF1- α* 和 β -*TUB* 作内参基因,在籼稻中可以同时选择 *UBC* 和 *GAPDH* 作内参基因(图 4)。

JA 具有强烈诱导水稻^[18]、小麦^[19]、高粱^[11]等禾本科植物颖花开放的效应,分析颖花开放过程中 JA 途径相关基因的表达变化能进一步阐明 JA 与颖花开放的关系。*OsAOC* 是水稻 JA 生物合成的关键基因,其表达水平与体内 JA 水平相一致^[20]。从图 5 可知,以表达稳定的内参基因进行校正,水稻颖花开放时(12:00) *OsAOC* 的表达水平会比开放前 3 h (09:00) 大幅提高,说明颖花开放时 JA 的生物合成会增加,这与甘立军等^[21]测得小麦和黑麦草颖花开放时 JA 含量会大幅上升是相符合的;而以表达不稳定的内参基因 *ACT1* 进行校正时,稻穗未开放颖花和正开放颖花 *OsAOC* 表达水平会被严重低估,将导致试验结论出现较大偏差。图 5 结果进一步强调选择合适的内参基因进行校正是获得精确和可靠 qRT-PCR 分析结果的重要前提。

总结起来,本研究所验证的 6 个内参基因中 *eEF1- α* 和 *UBC* 分别是粳稻和籼稻颖花开花过程中表达最稳定的内参基因,而 *ACT1* 是两者中表达最不稳定的内参基因,研究结果为水稻颖花开放过程中基因表达谱 qRT-PCR 分析时合适内参基因的选择提供了参考。

参考文献:

- [1] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7): 1736-1737.
- [2] 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 Biology*, 2002, 3(7): reaseach0034. 1-0034. 11.
- [3] Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(6): 609-618.
- [4] Li Q, Sun S S M, Yuan D, et al. Validation of candidate reference genes for the accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data in rice during seed development [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(1): 49-57.
- [5] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al. Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 5-17.
- [6] Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(421): 2907-2914.
- [7] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes



颖花样品来自粳稻 ‘WYJ7’。分别以 *ACT1*、*GAPDH* 或 (*eEF1- α + β -TUB*) 作内参基因进行校正, *OsAOC* 表达相对定量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16]。

The floret samples were from japonica rice ‘WYJ7’. *ACT1*, *GAPDH* or (*eEF1- α + β -TUB*) was used as reference gene for expression normalization. The method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ^[16] was applied to calculate relative quantification of *OsAOC* expression.

图 5 以不同内参基因作校正对水稻颖花开放过程中 *OsAOC* 表达定量的影响

Fig. 5 Impact of different reference genes used for normalization on the quantification of *OsAOC* expression florets during anthesis

- and sample integrity: BestKeeper - Excel - based tool using pair - wise correlations [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (6): 509 - 515.
- [8] Jain M, Nijhawan A, Tyagi A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real - time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical research Communications*, 2006, 345(2): 646 - 651.
- [9] Kim B R, Nam H Y, Kim S U, et al. Normalization of reverse transcription quantitative - PCR with housekeeping genes in rice [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(21): 1869 - 1872.
- [10] Jagadish S V K, Craufurd P Q, Wheeler T R. High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(7): 1627 - 1635.
- [11] 曾晓春, 周燮, 吴晓玉. 水稻颖花开放机理研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2004, 37(2): 188 - 195.
- [12] 王忠, 顾蕴洁, 高煜珠. 水稻开颖机理的探讨 II. CO₂ 对水稻开颖的效应 [J]. *作物学报*, 1989, 15(1): 59 - 66.
- [13] Ma Q, Hedden P, Zhang Q. Heterosis in rice seedlings: Its relationship to gibberellin content and expression of gibberellin metabolism and signaling genes [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 1905 - 1920.
- [14] Kong Z, Li M, Yang W, et al. A novel nuclear - localized CCCH - type zinc finger protein, *OsDOS*, is involved in delaying leaf senescence in rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1376 - 1388.
- [15] Hellemans J, Mortier G, De Paep A, et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real - time quantitative PCR data [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(2): R19.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2 - $\Delta\Delta$ CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [17] 曹珍珍, 张其芳, 韦克苏, 等. 水稻籽粒氮代谢几个关键酶对花后高温胁迫的响应及其与贮藏蛋白积累关系 [J]. *作物学报*, 2012, 38(1): 99 - 106.
- [18] 曾晓春, 周燮. 茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导水稻颖花开放 [J]. *植物学报*, 1999, 41(5): 560 - 562.
- [19] 刘世家, 夏凯, 曾晓春, 等. 茉莉酸甲酯对小麦颖花开放的诱导效应及其受水杨酸的抑制 [J]. *作物学报*, 2001, 27(1): 123 - 126.
- [20] Yara A, Yaeno T, Hasegawa M, et al. Resistance to *Magnaporthe grisea* in transgenic rice with suppressed expression of genes encoding allene oxide cyclase and phytodieneic acid reductase [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 376(2): 460 - 465.
- [21] 甘立军, 夏凯, 王才林, 等. 抗茉莉酸甲酯单抗制备及小麦和黑麦草颖花中茉莉酸含量的测定 [J]. *实验生物学报*, 2004, 37(5): 359 - 366.