

# 用于荔枝 qPCR 分析的内参基因克隆及稳定性分析

魏永赞<sup>1,2</sup>, 赖彪<sup>1</sup>, 胡福初<sup>1,3</sup>, 李晓静<sup>1</sup>, 胡桂兵<sup>1</sup>, 王惠聪<sup>1</sup>

(1 华南农业大学园艺学院, 南方果树生理研究室, 广东广州 510642; 2 中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所, 广东湛江 524091; 3 海南省农业科学院 果树研究所, 海南海口 571100)

**摘要:** 利用基因克隆和测序, 从‘妃子笑’荔枝果皮中获得了  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 3 个 qPCR 分析常用的内参基因全长序列, 其长度分别为 1 273、1 368 和 1 712 bp; 3 个基因与其他物种高度同源, 氨基酸序列相似性均超过了 98%。在此基础上, 结合已报道的 UBQ、eEF 和 25S rRNA 3 个常用的内参基因, 对  $\beta$ -Actin、GAPDH、18S rRNA、UBQ、eEF 和 25S rRNA 6 个常用内参基因在荔枝果实发育不同阶段和外源生长调节剂处理后表达稳定性进行了分析, 同时比较了 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种不同算法的差异。结果表明: 以上 6 个基因中  $\beta$ -Actin 基因在 3 种不同算法下均保持了较好的表达稳定性。

**关键词:** 荔枝; qPCR; 内参基因; 克隆; 稳定性分析

中图分类号: S667.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)03-0301-06

## Cloning and Stability Analysis of Reference Genes for Expression Studies by Quantitative Real-Time PCR in Litchi

WEI Yong-zan<sup>1,2</sup>, LAI Biao<sup>1</sup>, HU Fu-chu<sup>1,3</sup>, LI Xiao-jing<sup>1</sup>, HU Gui-bing<sup>1</sup>,  
WANG Hui-cong<sup>1</sup>

(1 Physiological Laboratory for South China Fruits, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 The South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, 524091, China; 3 Institute of Tropical Fruit Trees, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

**Abstract:** The full-length sequences of  $\beta$ -Actin, GAPDH and 18S rRNA which are frequently used as reference genes in qPCR analysis were obtained from the pericarp of litchi (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao) by gene cloning and sequencing. Their sequence lengths were 1 273, 1 368 and 1 712 bp, respectively. Sequence analysis showed that the cloned sequences had very high similarity with other species. Furthermore, the stability of six genes, including  $\beta$ -Actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 18S rRNA, ubiquitin (UBQ), elongation factor (eEF) and 25S rRNA, was determined in litchi pericarp under different developmental stages and regulator treatments in this study. Three different analytic calculation methods including geNorm, NormFinder and BestKeeper were compared. Among the six genes tested,  $\beta$ -Actin appeared to be the most stable single gene under three different calculation methods.

**Key words:** *Litchi chinensis*; qPCR; reference genes; cloning; stability analysis

收稿日期: 2011-11-08

作者简介: 魏永赞(1983—), 男, 研究实习员, 硕士; 通信作者: 王惠聪(1972—), 女, 教授, 博士, E-mail: wanghc1972@263.net; 胡桂兵(1969—), 男, 教授, 博士, E-mail: guibing@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30971985); 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A1705); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-33)

荧光实时定量 PCR (qPCR) 是近年来发展的一种准确而高效的基因表达检测方法. 该方法采用与双链 DNA 非特异结合的荧光染料(如 SYBR Green 等) 或设计特异荧光探针(如 Taqman) 结合实时荧光检测设备, 分析 PCR 每一个循环结束时的荧光值来量化基因表达<sup>[1]</sup>. 为了获得真实可靠的试验数据, 试验通常采用内参基因进行数据校正和均一化, 以消除不同样品在 RNA 产量、质量以及反转录效率上可能存在的差别<sup>[2]</sup>.

理想的内参基因应在各种试验条件下, 各种类型的组织和细胞中均恒定表达, 而且其表达量是近似的, 无显著性差异. 然而, 不同类型的组织, 不同的发育阶段和不同处理条件下内参基因转录水平均可能发生变化, 因此, 选择合适的内参基因以减少检测样本间的差异, 决定了利用荧光定量 PCR 分析基因表达水平结果的可靠性<sup>[3]</sup>. 此外, 对于 qPCR 内参基因的选择过程发展出不同的算法, 如 geNorm<sup>[3]</sup>、NormFinder<sup>[4]</sup> 和 BestKeeper<sup>[5]</sup>, 从若干个候选内参基因中筛选出表达最为稳定的一个或一组基因作为内参系统. 在高等植物 RT-qPCR 研究中用得最多的内参基因是持家基因( Housekeeping genes), 主要包括  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -Actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、18S rRNA、25S rRNA、聚泛素 (UBQ) 和转录延伸因子 (eEF) 等基因<sup>[6-8]</sup>.

本研究以 ‘妃子笑’ 荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao 果皮为主要材料, 克隆了  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 3 个持家基因, 研究它们与其他植物的相似性; 然后结合已报道的 UBQ、eEF 和 25S-rRNA 3 个常用的持家基因, 用 qRT-PCR 方法检测上述 6 个候选内参基因在不同发育阶段和不同生长调节剂处理下的表达量, 分别用 geNorm、NormFinder 和

BestKeeper 3 种不同的算法进行数据分析, 筛选出最为稳定的内参基因和合适的内参基因选择计算方法, 旨在为 qRT-PCR 在荔枝基因表达研究上的广泛应用提供参照序列和依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

研究选取 ‘妃子笑’ 荔枝品种作为试验材料, 每个处理选取 3 棵树, 在果实采收前 1 个月(转色前), 分别用  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 和  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  CPPU 溶液喷施调控果实着色进度, 以清水处理为对照, 在处理时和处理后 7、14、21 d 采样. 此外, 在果实成熟时采 ‘桂味’ 和 ‘糯米糍’ 果实. 采样时将果皮和果肉分开, 装入锡纸袋, 用液氮速冻后, 带回实验室于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用.

### 1.2 荔枝果皮总 RNA 提取和 cDNA 合成

荔枝果皮总 RNA 的提取采用 Tiandz 基因公司 RNA<sub>out</sub>(北京). 用 DNase I (TaKaRa 公司) 消化 DNA, 排除干扰, 用核酸蛋白仪和  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量. 每个样品取  $2 \mu\text{g}$  总 RNA, 利用 MLV-Reverse Transcriptase kit (Invitrogen 公司) 合成 cDNA 第一链(具体方法参照说明书), 用于基因克隆和定量分析.

### 1.3 内参基因克隆

根据已报道的真核生物  $\beta$ -Actin<sup>[9]</sup>、GAPDH<sup>[10]</sup> 和 18 S rRNA<sup>[11]</sup> 基因的结构特点及其进化上的保守区域合成引物克隆 3 个基因全长(表 1), 分别送北京华大基因有限公司和上海英骏生物技术有限公司测序. 测序后, 用 DNAMAN 软件和登录 NCBI 网站进行生物信息学分析.

表 1 用于克隆内参基因全长的引物

Tab. 1 The primers sequences used in cloning the full-length of reference genes

基因名称	引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
$\beta$ -Actin	LcActin	ATGCCCGATGCTGAGGACATTC	TCAGAAGCACTTCTGTGGACAATG
GAPDH	LcGAPDH	TCTCACTCTCTCAGGAATCATGG	CAAGACCGTTGACTGAACCAT
18S rRNA	Lc18S rRNA	TCGGACGGTTTTGTGGTGA	CCTTCCTTGGATGTG GTAGCC

### 1.4 用于 qRT-PCR 的引物设计

参照 qRT-PCR 引物设计的一般原则, 根据在荔枝上克隆的  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 基因序列, 以及已报道的 UBQ、eEF 和 25S rRNA<sup>[12]</sup> 等内参基因的 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计了上述 6 种内参基因的 qPCR 引物(表 2), 委托上海生物工程有限公司合成.

### 1.5 Real-Time PCR 分析

Real-Time PCR 反应用 ABI 7500 Real-Time PCR System 完成. 反应体系按照 Real-Time PCR Master Mix( TOYOBO, Japan) 说明书, 反应体积为  $20 \mu\text{L}$ ; 反应条件如下:  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s;  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s;  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s;  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s;  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  35 s; 40 个循环; 之后进行  $55 \sim 95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  熔解曲线分析. 每个样品设 3 个重复. 反应结束后通过熔解曲线鉴定产物的特异性.

表 2 用于定量分析候选内参基因的引物序列

Tab. 2 The primer sequences of selected reference genes used in RT-qPCR analysis

基因名称	引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
$\beta$ -Actin	QLcActin	AGTTTGCTGATGTGGGAGAC	TGGCTGAACCCGAGATGAT
GAPDH	QLcGAPDH	GACAGCAGGTCAAGTATCT	GAAGCAGCCAAGCGACTT
UBQ	QLcUBQ	AAAGCTCCGACACCATTGAC	ATCCTCAAGCTGCTTTCCAG
eEF	QLceEF	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA
18S rRNA	QLc18S	ATTACCCAATCCTGACACGG	AACCCAAAAGTCCAACACTACGAG
25S rRNA	QLc25S	ATAACCGCATCAGGTCTCCAAG	CCTCAGAGCCAATCCTTTTCC

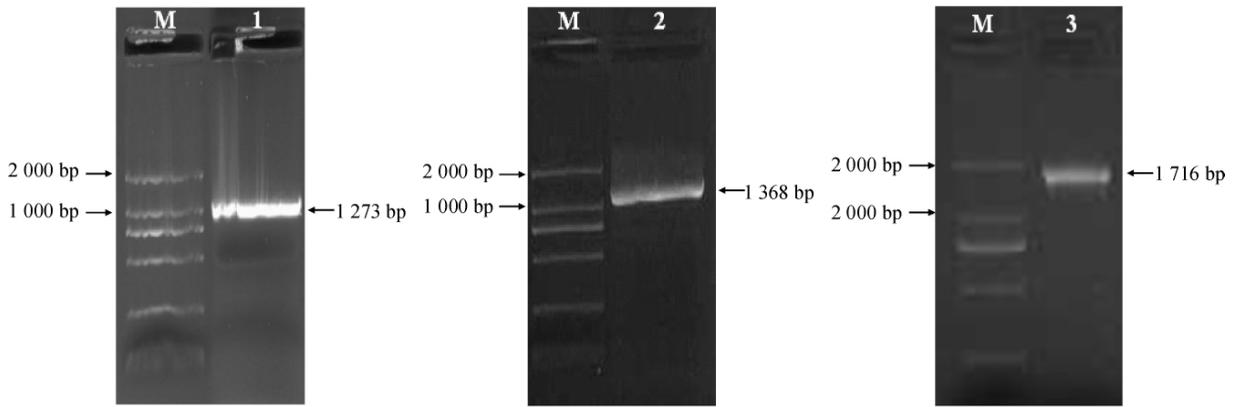
1.6 数据处理和分析

采用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种算法结合 Microsoft Office Excel 对以上 6 个内参基因在不同处理条件下荔枝果皮中的表达稳定性进行分析, 筛选出最优的内参基因或组合, 比较 3 种计算方法。

2 结果与分析

2.1 内参基因全长的克隆

以果皮 cDNA 模板, 对  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S-rRNA 3 个持家基因的全长序列进行扩增(图 1)。阳



M: DNA marker DL2000; 1:  $\beta$ -Actin 基因; 2: GAPDH 基因; 3: 18S rRNA 基因

图 1 荔枝  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 基因全长序列的克隆

Fig. 1 Cloning of  $\beta$ -Actin, GAPDH and 18S rRNA genes from litchi

性克隆测序结果显示  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 基因的核酸序列长度分别为 1 273、1 368 和 1 716 bp, 分别命名为 LcActin、LcGAPDH 和 Lc18S rRNA 基因, 在 GeneBank 中登录号依次为 HQ615689、JF759907 和 JF759906。

2.2 内参基因序列相似性分析

用 DNAMAN 软件分析发现, LcActin 基因最大的开放式阅读框(ORF)为 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸; LcGAPDH 基因最大的 ORF 为 1 008 bp, 编码 336

个氨基酸。将 3 个基因分别在 NCBI 上比对, 发现荔枝果实中的 LcActin 基因高度保守, 与欧洲山杨 *Populus trichocarpa* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的相似性分别达到 99% 和 98%; LcGAPDH 基因与龙眼 *Dioscorea longan* 的相似性达到 98%, 而与拟南芥的相似性却只有 74%; Lc18S rRNA 基因的保守性也很强, 与拟南芥、七叶树 *Aesculus pavia* 等相似性都超过了 96% (表 3)。另外, 试验还对‘妃子笑’、‘糯米糍’和‘桂味’3 个荔枝品种的 LcActin、LcGAPDH 和

表 3 内参基因序列相似性分析

Tab. 3 Similarities based on nucleotide sequences for reference genes isolated from litchi

基因名称	拟南芥		除拟南芥外其他植物	
	相似性最高基因	相似性/%	相似性最高基因	相似性/%
LcActin	AAA80356.1/Actin-2	98	ABO43670.1/Actin/欧洲山杨	99
LcGAPDH	AF348583.1/Atlg79530	74	FJ694011.1/GAPDH-L1/龙眼	98
Lc18S rRNA	AY056114.1/At2g16590	96	AF206838.1/18S rRNA/七叶树	99

Lc18S rRNA 基因的相似性进行分析,发现其相似性均为 100%,也就是说这 3 个持家基因在品种间是高度保守的。

### 2.3 内参基因的稳定性分析

2.3.1 用 geNorm 计算内参基因的稳定性 and 最适数目判断 使用 geNorm 软件对候选内参基因稳定性计算后,LcActin、LcUBQ、LcGAPDH、LceEF、Lc18S-rRNA 和 Lc 25S rRNA 基因表达稳定度的平均值  $M$  依次为 0.200、0.200、0.295、0.578、1.134 和 1.645,表达稳定度由高到低排序依次为 LcActin = LcUBQ > LcGAPDH > LceEF > Lc18SrRNA > Lc25SrRNA 基因(图 2)。geNorm 软件以 0.15 为默认取舍值,即当  $V_{n/(n+1)} < 0.15$  时,说明没必要使用数量  $\geq n+1$  的看家基因作为内参 本试验  $V_{2/3} = 0.095$ ,故没有必要考虑  $V_{3/4}$ 、 $V_{4/5}$  和  $V_{5/6}$  的配对差异,因此测定内参基因的最适数目为 2 个(图 3),表达相对最稳定组合是 LcActin 和 LcUBQ 基因。

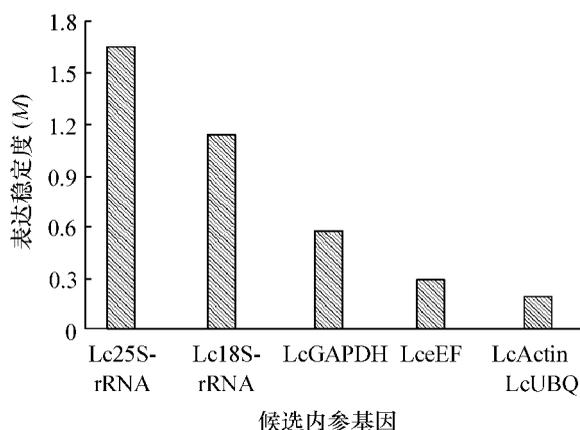


图2 荔枝果皮中 6 个内参基因表达稳定度的分析

Fig. 2 Average expression stability values of six reference genes in the pericarp of litchi

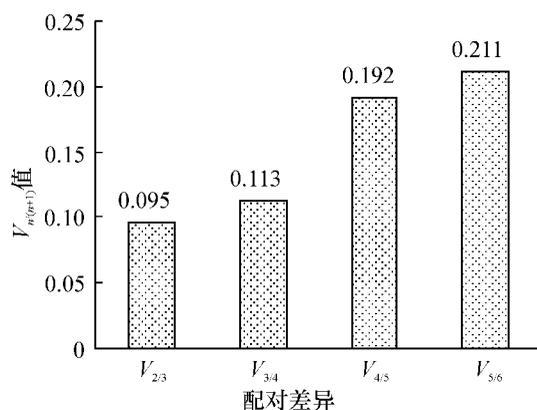


图3 荔枝果皮中 6 个内参基因最适数目判断

Fig. 3 Determination of the proper number of six reference genes for normalization in the pericarp of litchi

2.3.2 用 NormFinder 计算内参基因的稳定性 NormFinder 是 Andersen 等<sup>[4]</sup> 2004 年研发的另一种用于选择合适内参基因的程序,其原理是程序运行生成基因表达稳定值,稳定值越低则表明基因表达越稳定.经过 NormFinder 计算 本试验稳定值由低到高顺序是 LcActin、LcUBQ、LceEF、LcGAPDH、Lc18S-rRNA 和 Lc25S rRNA 基因(表 4). 选择出最合适的基因 LcActin.

表 4 用 NormFinder 软件计算出的内参基因稳定值  
Tab. 4 The expression stability values of selected reference genes calculated by the NormFinder software

基因	稳定值
LcActin <sup>1)</sup>	0.024
LcGAPDH	0.055
LcUBQ	0.038
LceEF	0.044
Lc18S rRNA	0.092
Lc25S rRNA	0.124

1) LcActin 基因为最适合基因。

2.3.3 用 BestKeeper 计算内参基因的稳定性 BestKeeper 程序在每个基因之间产生配对的相关系数和 BestKeeper 指数(每个候选基因 Ct 值的几何平均数) 根据其值的大小进行比较. 本试验中 LcActin、LceEF、Lc25S rRNA 和 Lc18S rRNA 基因与其他基因相关系数均大于 0.93,而 LcGAPDH 基因和 LcUBQ 基因的相关系数则小于或等于 0.86; 在相关系数较高的 4 个基因中,Lc25S rRNA 基因和 Lc18S rRNA 基因标准偏差和协方差值较高,说明它们在不同样品中的表达稳定性较低,而 LcActin 基因的标准差和协方差最低,LceEF 基因的也较低,说明最适内参基因是 LcActin 基因,其次是 LceEF 基因(表 5)。

表 5 用 BestKeeper 软件计算出的内参基因稳定性参数  
Tab. 5 The stability of selected reference genes calculated by BestKeeper software

内参基因	相关系数( $r$ )	标准差	协方差/%
LcActin	0.938	0.29	1.39
LcGAPDH	0.843	0.98	4.37
LcUBQ	0.860	0.44	2.06
LceEF	0.960	0.77	2.33
Lc18S rRNA	0.966	0.88	7.57
Lc25S rRNA	0.977	1.13	8.86

## 3 讨论与结论

目前,实时定量荧光 PCR 已成为不同样品间基因表达水平定量的权威性方法.然而大量的技术缺

陷可能会影响到 qRT-PCR 数据的质量,为了获得一致的、高质量的 qPCR 试验数据,定量 PCR 试验数据发表必需符合 2009 年正式出版的实验信息最低限度标准(MIQE)<sup>[13]</sup>. 此外,基于 Lefever 等<sup>[14]</sup> 2009 年建立了 qPCR 试验数据标注语言的 RDML 协议,使 qPCR 试验数据标注得到了统一. MIQE 指南和 RDML 协议提供了发表被认可的 qRT-PCR 试验结果所需考虑的所有参数,其中内参基因的选择和稳定性验证都被放到了十分重要的位置.

本试验从荔枝果皮中成功克隆了  $\beta$ -Actin、GAPDH 和 18S rRNA 3 个常用作内参基因的持家基因,其全长分别为 1 273、1 368 和 1 712 bp. 其中 LcActin 和 Lc18S rRNA 基因与拟南芥的相似性均超过了 96%; LcGAPDH 基因与拟南芥的相似性相对较低,只有 74%. 另外试验还对不同品种荔枝的这 3 个基因进行测序,结果发现不同品种荔枝的 LcActin、LcGAPDH 和 Lc18S rRNA 3 个基因的相似性均达到了 100%,品种间高度保守. 这些基因有效填补了 NCBI 中荔枝内参基因序列的空缺,为研究荔枝的基因表达提供了参照序列和参考依据.

在 RT-qPCR 试验中,内参基因被用来作为数据标准化的对照,以校正作为模板的 cDNA 所存在的数量差异<sup>[15]</sup>. 迄今,尚无一种内参基因适用于所有样本的校正和标准化,盲目地使用一种或几种内参基因,一方面难以发现基因表达的微小差异,另一方面可能导致错误的结论<sup>[3]</sup>. 本研究对  $\beta$ -Actin、GAPDH、UBQ、eEF、18S rRNA 和 25S rRNA 6 个常用内参基因在不同发育阶段和不同外源调节剂处理下样品的相对表达量进行分析,并分别采用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种算法对各基因的稳定性进行计算,得出较为稳定的一个或一对基因. geNorm 计算结果中, LcActin 和 LcUBQ 基因是最为稳定的组合,最适内参基因数是 2 个; NormFinder 计算则发现这 6 个基因中最为稳定的是 LcActin; 而 BestKeeper 分析结果表明 LcActin 和 LceEF 是最为稳定的 2 个内参基因. 虽然 3 种不同算法下,样品各内参基因表达的稳定性有一定的差异,但是 LcActin 始终是最为稳定的内参基因.

geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 是目前内参基因筛选常用的工具. geNorm 是通过基因配对的形式,筛选出最不稳定的基因,然后将剩下基因重新排序重新配对进行筛选,最终选出适当数目的合适内参基因,并对标准化因子进行配对差异分析来判定所需看家基因的最适数目<sup>[3]</sup>. 利用该程序可以对任

何组织或细胞的任意数量看家基因进行筛选,选出 2 个以上而不是传统地使用单一看家基因作为内参,将有助于校正系统偏差以得到更可靠的结果. NormFinder 的运行原理与 geNorm 程序类似,产生基因表达稳定值,然后根据稳定值的大小排序,最终将表达稳定值最小的基因作为最稳定的基因<sup>[1]</sup>. 其缺点是只能选择一个合适的内参基因作标准. BestKeeper 程序在每个基因之间产生配对的相关系数和 BestKeeper 指数,根据其值的大小进行比较<sup>[5]</sup>. 其优点是不但可以分析内参基因的稳定性,而且可以比较目标基因的表达水平. 与 geNorm 程序相比, BestKeeper 程序只能计算一次配对相关系数,当排除某个基因后该程序不能重新计算<sup>[16]</sup>.

因此,试验选择哪个内参基因,使用哪一种筛选工具,都要根据其试验材料、试验目的和试验设计的具体要求去做出选择. 只有这样才能从一系列不同功能的候选看家基因中选择出试验所需最适的内参基因用于目标基因的标准化,达到准确定量的目的.

#### 参考文献:

- [1] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386-401.
- [2] 张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(5): 546-550.
- [3] 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): 1-11.
- [4] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTTOFT 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(15): 5245-5250.
- [5] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(6): 509-515.
- [6] KIM B R, NAM H Y, KIM S U. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(21): 1869-1872.
- [7] DHEDA K, HUGGETT J F, BUSTIN S A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in re-

- al-time PCR [J]. *Biotechniques* 2004, 37(1):112-119.
- [8] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 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* 2009, 11(6):30-36.
- [9] 徐锦涛, 章镇, 彭日荷, 等. 八棱海棠肌动蛋白基因 (MrACT) 的克隆及分析 [J]. *果树学报* 2008, 25(3):289-292.
- [10] 卢秉国, 何伟毅, 申艳红, 等. 龙眼子叶胚 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的 cDNA 克隆及序列分析 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版* 2009, 38(5):506-511.
- [11] 毕燕会, 邹丹燕, 周志刚. 海带配子体 18S rRNA 基因的克隆、序列分析及其作为内参基因的应用 [J]. *华北农学报* 2009, 24(1):49-54.
- [12] 李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀, 等. 水稻胚乳 RNA 定量 RT-PCR 分析中参照基因选择 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版* 2008, 29(2):61-66.
- [13] BUSTIN S A, BENES V M, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem* 2009, 55(4):611-622.
- [14] LEFEVER S, HELLEMANS J, PATTYN F, et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data [J]. *Nucl Acids Res* 2009, 37(7):2065-2069.
- [15] GUTIERREZ L, MAURIAT M, GUÉNIN S, et al. The lack of a systemic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. *Plant Biotechnol J* 2008, 6(6):609-618.
- [16] WOOD S H, CLEMENTS D N, McEWAN N A, et al. Reference genes for canine skin when using quantitative real-time PCR [J]. *Vet Immunol Immunopathol* 2008, 126(3/4):392-395.

【责任编辑 柴 焰】

## 欢迎订阅 2013 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等,设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源,并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源。

国内外公开发行,季刊,A4幅面。定价 10.00 元,全年 40.00 元。自办发行,参加全国非邮发报刊联合征订发行,非邮发代号:6573。

订阅办法:订货款邮汇至:300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱,全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部