

## 猕猴桃实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选

张慧琴, 谢鸣\*, 肖金平, 周利秋, 宋根华

(浙江省农业科学院 园艺研究所 浙江 杭州 310021)

**摘要:** 为筛选在猕猴桃中稳定表达的内参基因, 以确保其基因表达分析结果的可靠性。应用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *ACTB*, *TUB*, *18S rRNA* 和 *GAPDH* 四个常用植物内参基因在华特猕猴桃不同组织及果实不同发育时期的 mRNA 表达情况。经 GeNorm 软件分析发现 4 种内参基因的表达稳定性各异, *TUB* 和 *ACTB* 在 6 种不同组织中表达均稳定, *TUB* 和 *ACTB* 组合适合作为华特猕猴桃不同组织基因表达的内参基因; *18S rRNA* 在果实不同发育时期的表达最稳定, *18S rRNA* 和 *TUB* 组合最适合作为分析华特猕猴桃果实不同发育时期基因表达的内参基因。

**关键词:** 猕猴桃; 内参基因; qRT-PCR

中图分类号: S 633.4

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2015)04-0567-07

### Screening of reference genes for real-time quantitative PCR in kiwifruit

ZHANG Hui-qin, XIE Ming\*, XIAO Jin-ping, ZHOU Li-qiu, SONG Gen-hua

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** The present study aimed at selecting the stable reference genes to ensure the reliability and accuracy of gene expression analysis in kiwifruit for qRT-PCR. The expressions of four frequently-used reference genes (*ACTB*, *TUB*, *18S rRNA*, *GAPDH*) were analyzed in different tissues and fruits at different developmental stages, respectively. According to the analysis by GeNorm, the stabilities of the four candidate reference genes were different, *TUB* and *ACTB* were both stably expressed in six different tissues, which were recommended for genes expression normalization in different kiwifruit tissues. *18S rRNA* was the most stable gene in different developmental stages of White kiwifruit, *18S rRNA* and *TUB* were most suitable for normalization of mRNA expression levels in White kiwifruit.

**Key words:** kiwifruit; reference genes; qRT-PCR

实时荧光定量 PCR 因其灵敏度高、特异性强、重复性好及高通量等特点, 为进一步阐明复杂代谢途径、生物学过程及植物与病原菌互作机制等提供了强大的保证<sup>[1-2]</sup>, 已成为分子生物学领域中分析基因表达的重要工具<sup>[3-6]</sup>。然而, 利

用 qRT-PCR 分析基因表达过程中, RNA 的浓度和质量、反转录效率的差异以及扩增效率等都会对目的基因表达分析的准确性产生影响<sup>[7]</sup>。以内参基因的表达量对目标基因的表达量进行归一化和标准化, 可以减小检测样本之间的差异<sup>[8-9]</sup>。

收稿日期: 2014-07-31

基金项目: 浙江省果品农业新品种选育重大科技专项(2012C12904-9)

作者简介: 张慧琴(1975—), 女, 浙江兰溪人, 副研究员, 在读博士研究生, 主要从事浆果育种及栽培。E-mail: zhqzaas@163.com

\* 通讯作者, 谢鸣, E-mail: xieming1957@aliyun.com

内参基因需在所有样品中均能表达,表达量能保持相对稳定,且不受试验条件的影响<sup>[10]</sup>。然而,相关研究表明,相同植物的不同品种、不同组织器官以及相同组织器官在不同发育阶段,同一基因的表达均会出现差异,即使是涉及初级代谢和细胞骨架组成的看家基因的表达水平也可能出现变化,任何一种看家基因的所谓恒定表达都只在一定类型的细胞或实验条件下,小范围的局部恒定<sup>[11]</sup>。若选用不合适的内参基因对其他基因的表达水平进行归一化,将会对试验结果产生误判,且可能导致不同实验室的操作结果无法平行比对<sup>[12]</sup>。因此,根据试验处理及不同材料的特点,优化和选择用于 qRT-PCR 的内参基因就显得尤为重要。

猕猴桃富含维生素 C、膳食纤维和多种矿物营养,并具有诸多的保健功效,是近年来发展较为迅速的果树树种之一。随着分子生物学研究的不断深入和发展,基因表达分析已经广泛应用于猕猴桃基因代谢调控机理的研究中,因此筛选稳定的内参基因在基因表达分析中起着关键的作用。植物基因表达水平研究中 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GAPDH*)、肌动蛋白基因(*Actin*)、 $\alpha$  微管和  $\beta$  微管蛋白基因(*Tubulin*)、18S 核糖体 RNA(18S *rRNA*) 和转录延伸因子基因(*elongation factor 1- $\alpha$  EF1- $\alpha$* ) 等看家基因常用作内参基因<sup>[13-14]</sup>,它们常被用在猕猴桃 qRT-PCR 表达分析中。国内外还未见猕猴桃有关内参基因筛选的报道,本试验利用 qRT-PCR 技术分析 *ACTB*、*TUB*、18S *rRNA* 和 *GAPDH* 四个常用植物内参基因,选择最适于‘华特’猕猴桃基因表达水平研究的内参基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为七年生的华特(*Actinidia eriantha* cv. White)猕猴桃,种植于泰顺县碑排社区恩岱洋猕猴桃基地。栽植株行距为 4 m × 5 m,棚架栽培,“一杆两蔓”式整形,雌、雄株配比为 8:1,雄株品种为毛雄,在此基础上实行人工辅助授粉。沙质壤土,肥力中等,配备滴灌系统,夏、冬季各进行一次正常修剪,每年的晚秋施一次基肥,谢

花座果后 20 d 内施一次 N、P、K 复合肥,各采样植株的管理措施均一致。选择生长较为一致的华特猕猴桃,于 2012 年 5 月 12 日花开放率达到 50% 时挂标签。根、茎、叶、花于 2012 年 5 月 12 日随机从所选植株上取,重复 5 次。分别在开花后 28、42、56、98、133 和 165 d 采集果实。取样后,立即浸没于液氮当中,带回实验室进行去除果实果毛,分离内果肉、外果肉、中柱各组织并切成小块,然后装入自封袋中保存于 -80℃ 冰箱备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链合成

猕猴桃各样品总 RNA 的提取按照 TIANDZ 柱式植物 RNAout 试剂盒的说明书进行。提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其完整和纯度后直接用于 cDNA 第一链合成或置于 -80℃ 备用。使用反转录酶 M-MLV (RNase H<sup>-</sup>) 将 RNA 反转录成 cDNA。反转录产物可用于 PCR 扩增或保存于 -80℃ 备用。

#### 1.2.2 PCR 引物设计和合成

采用 Primer Express 软件设计 4 个内参基因的引物,各个内参基因的信息以及引物序列见表 1。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,对以上 4 个基因序列进行常规 PCR 扩增。采用 E. Z. N. A. TM 凝胶回收试剂盒(D2500-1)回收目的片段,与 pMD18-TVector 载体(TaKaRa)连接过夜,然后将连接液加入含感受态细胞 DH5 $\alpha$  的离心管中,涂布氨苄青霉素抗性的固体 LB 平板,37℃ 培养过夜,蓝白斑筛选,挑取白色菌落进行 PCR 验证,然后将筛选得到的菌体转入 LB 液体培养基(含 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  氨苄青霉素),37℃ 摇床培养过夜。提取质粒 pMD18T-LS,选择 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证,选阳性样本送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

#### 1.2.3 内参基因的荧光定量 PCR 分析

qRT-PCR 所用仪器为安捷伦 Agilent Stratagene Mx3005P。qRT-PCR 采用 SYBR premix EX TaqTM reagent 试剂盒(TaKaRa),按说明书进行操作。qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 SYBR premix EX Taq 混合液 10  $\mu\text{L}$ ,引物各 1  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:94℃ 预变性 1 min 后,95℃ 变性 10 s,58℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 10 s,共 40 次循环。每次循环第 3 步进行荧光采集,

最后退火至 65℃,每隔 30 s 上升 0.5℃,至 95℃ 变性 1 min。检测其荧光值,绘制溶解曲线。然后在相应各基因的扩增条件下进行各样品的扩增。引物扩增效率验证及标准曲线的绘制参考周兰等<sup>[15]</sup>的方法进行。目前认为只有扩增效率在一定的范围内(90%~105%)时,才符合进行下一步评价的要求。每个 cDNA 标样和待测样品均设置 3 次重复。

#### 1.2.4 数据处理与分析

根据公式  $Q = E^{\Delta Ct}$ ,利用 Excel 2007 根据每

个扩增样品的  $Ct$  值计算各基因的相对表达量  $Q$ 。其中  $E$  为基因扩增效率, $\Delta Ct = Ct_{\min} - Ct_{\text{样品}}$  ( $Ct_{\min}$  为所有样品中最低的  $Ct$  值, $Ct_{\text{样品}}$  为每个样品的  $Ct$  值)<sup>[16-17]</sup>。根据 4 个常用内参基因在各样品中计算得到的相对表达量,利用 GeNorm 软件(<http://medgen.ugentbe/~jvdesomp/genorm>)对各个内参基因的表达稳定度平均值( $M$ )进行统计学分析,结合候选内参基因标准化因子的配对差异分析( $Vn/n+1$ )来判定所需内参基因的最适数目,从而筛选出最适内参基因。

表 1 qRT-PCR 检测中所用内参基因引物序列、大小、标准曲线斜率和扩增效率

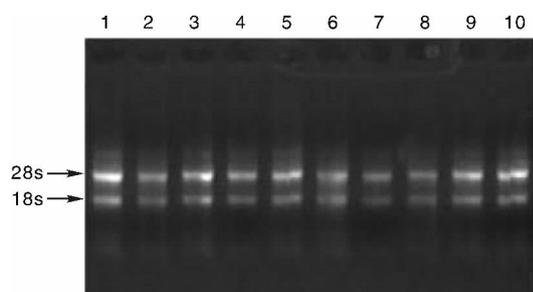
Table 1 Descriptions of reference genes, primer sequences, amplification size and efficiency

基因	基因简称	引物序列(5'→3')	扩增大小/bp	标准曲线斜率 $R^2$	扩增效率/%
Actin isoform B	ACTB	GTGCTCAGTGGTTCCTCAA GACGCTGTATTTCCTCTCAG	126	0.981	98.3
Protein Tubulin beta 4 chain	TUB	TGAGCACTAAAGAGGTGGATGA TGGGATGTCACACACACTGG	110	0.986	99.1
Ribosomal RNA 18S	18S rRNA	AACGAGACCTCAGCCTGCT CCCAGAACATCTAAGGGCA	133	0.992	98.7
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	ACACTCCATCACTGCGACA CACCTTGCCAACAGCCTTA	128	0.989	97.6

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取

琼脂糖凝胶电泳图和核酸定量检测显示,猕猴桃根、茎、叶、花果样品 RNA 电泳图谱条带清晰(图 1) 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 亮度的 2 倍,  $D$  值均为 1.8~2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,可见, RNA 样品无明显降解,完整性较好,可以用于后续试验。



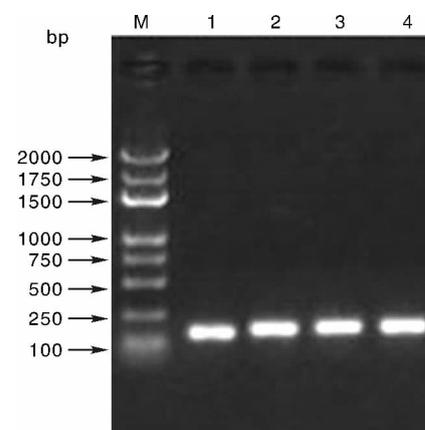
1,根; 2,茎; 3,叶; 4,花; 5,果肉(28 d); 6,果肉(42 d); 7,果肉(56 d); 8,果肉(98 d); 9,果肉(133 d); 10,果肉(165 d)。

图 1 猕猴桃样品 RNA 电泳

Fig. 1 Electrophoresis legend of total RNA of kiwifruit

### 2.2 内参基因的 PCR 分析

反转录产物经常规 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳证实,每个样品均能扩增出目的片段,经测序结果与目标序列一致,如图 2 所示为华特果实(花后 133 d) 4 个内参基因 PCR 产物的琼脂糖凝



M, DNA marker DL2000; 1, TUB; 2, ACTB; 3, GAPDH; 4, 18S rRNA

图 2 华特果实 4 个内参基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳扩增结果

Fig. 2 Agarose electrophoresis analysis of the PCR products of four reference genes in White kiwifruit

胶电泳扩增结果。

### 2.3 内参基因的荧光定量 PCR 分析

以华特猕猴桃果实不同发育时期果实外果肉及根、茎、叶组织 cDNA 第一链为模板,进行 qRT-PCR 分析。表 1 中列出的 4 个候选内参基因标准曲线斜率均大于 0.98,可见有较好的线性关系,且扩增效率表现良好,定量结果准确,所用引物可扩增特异性 DNA 序列。如图 3 所示华特 4 个内参基因在不同样品中溶解曲线均呈单一信

号峰,表明所用引物均能特异地扩增相应内参基因,不存在引物二聚体,并且重复之间差异小( $C_t$  值差异小于 1)。可见,本试验中 qRT-PCR 结果是准确可信的,最终取 3 次重复的平均  $C_t$  值,用于后续数据分析。从图 4 和 5 可以看出 4 个内参基因在华特猕猴桃不同组织中的表达水平均有一定的变化,其中 18S rRNA 的表达丰度相对较高,各个内参基因在叶片中的表达丰度均高于在其他组织中的表达丰度;4 个内参基因在华特

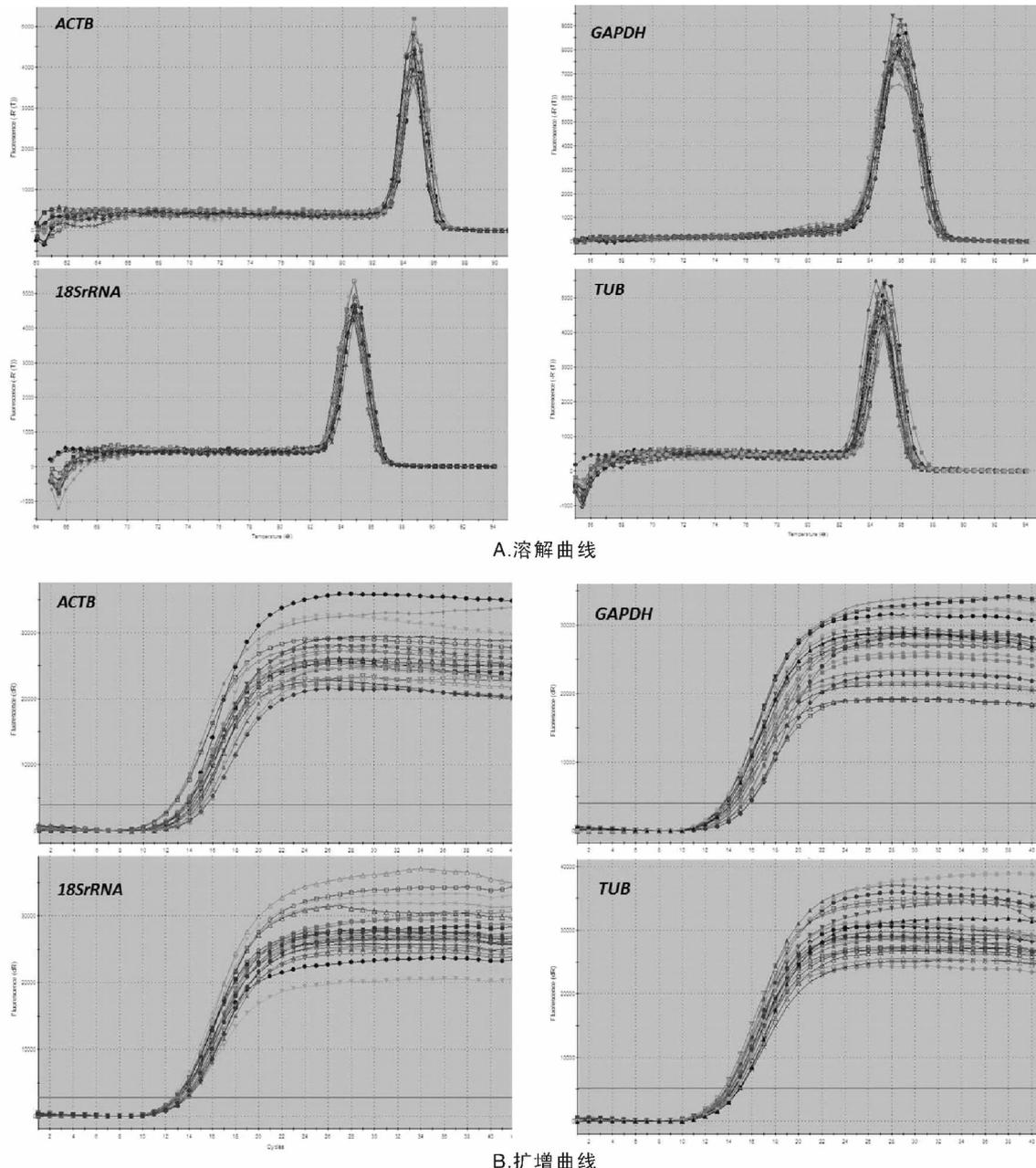


图 3 华特猕猴桃果实不同发育期外果肉及不同组织根、茎、叶中 4 个内参基因 qRT-PCR 扩增

Fig. 3 qRT-PCR amplification of four reference genes in different fruit development stages and different tissues of White kiwifruit

猕猴桃果实不同发育期中的表达水平也有变化,其中 *18S rRNA* 的表达丰度略高于其他 3 个内参基因, *ACTB* 和 *TUB* 表达量相当。

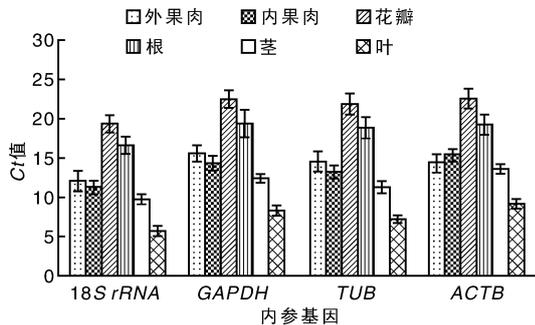


图4 四个内参基因在华特猕猴桃6种不同组织材料中的表达丰度

Fig. 4 qRT-PCR Ct values for four reference genes in 6 tissues of White kiwifruit

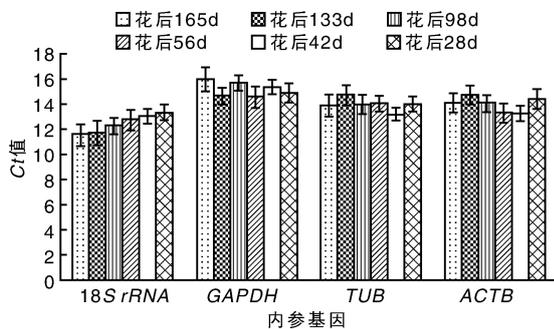


图5 四个内参基因在华特猕猴桃果实不同发育时期的表达丰度

Fig. 5 qRT-PCR Ct values for four reference genes in fruit different developmental stages of White kiwifruit

## 2.4 内参基因的表达稳定性分析

通过 GeNorm 软件分析内参基因在华特猕猴桃不同样品中的表达稳定性 ( $M$ ), 发现 6 个不同组织基因表达稳定度由高到低的排序为  $TUB > ACTB > 18S rRNA > GAPDH$  (图 6); 而在华特猕猴桃果实不同发育期基因表达稳定度由高到低依次为  $18S rRNA > TUB > ACTB > GAPDH$  (图 7)。

GeNorm 软件以  $Vn/n+1 = 0.15$  为默认的取舍值, 即  $Vn/n+1 > 0.15$  说明以  $n$  个基因作为组合还不是很稳定, 有必要引入第  $n+1$  个基因;  $Vn/n+1 < 0.15$ , 则说明以  $n$  个基因作为组合已经很稳定, 不需要引入第  $n+1$  个基因。图 8-A 和 8-B 显示,  $V3/4 > V2/3$ , 没必要 3 个基因组合,

故以最稳定的 2 个内参基因 *TUB* 和 *ACTB* 组合适合作“华特”猕猴桃不同组织中的基因表达分析及 *18S rRNA* 与 *TUB* 组合最适合作华特猕猴桃果实不同发育期的内参基因。

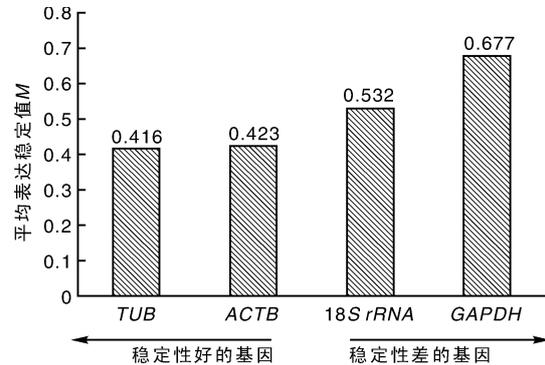


图6 GeNorm 软件分析获得的各内参基因在华特猕猴桃不同组织中的表达稳定值 ( $M$ )

Fig. 6 Expression stability values ( $M$ ) of reference genes in different tissues of White kiwifruit calculated by GeNorm

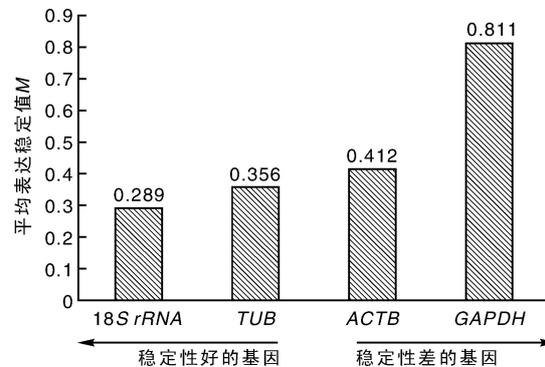


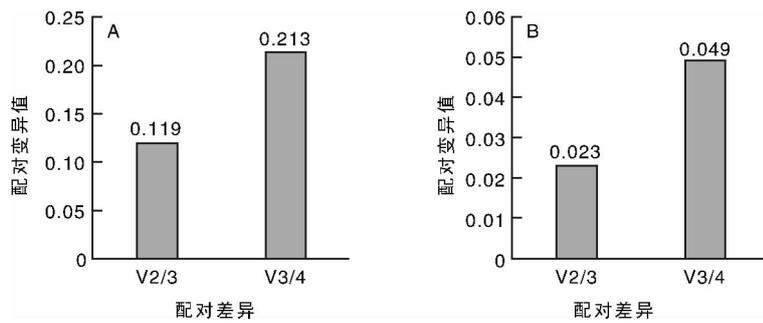
图7 GeNorm 软件分析获得的各内参基因在华特猕猴桃果实不同发育时期中的表达稳定值 ( $M$ )

Fig. 7 Expression stability values ( $M$ ) of reference genes in fruit different developmental stages of White kiwifruit calculated by GeNorm

## 3 讨论

qRT-PCR 技术现已成为分子生物学研究的重要工具, 要想获取确实可信的基因表达结果, 除了合理的试验设计、引物设计以及严格准确的试验操作之外, 还需选择稳定的内参基因。

在不同试验条件下, 内参基因稳定性表现不尽一致。目前, 在苹果<sup>[15]</sup>、柑橘<sup>[18]</sup>、龙眼<sup>[19]</sup>、桃<sup>[20]</sup>和葡萄<sup>[14]</sup>等果树中均有关于内参基因稳定



A. 不同组织分析; B. 果实不同发育时期分析

图 8 配对差异分析 ( $V_n/n+1$ ) 不同器官和不同发育时期最佳组合的内参基因数

Fig. 8 Pairwise variation analysis ( $V_n/n+1$ ) to determine the optimal number of reference genes for normalization

筛选和评价的报道,不同树种、不同组织、不同胁迫条件及不同发育期,所选用相对稳定表达的内参基因均有不同。肖翠等<sup>[18]</sup>对柑橘内参基因稳定性评价结果表明,在不同柑橘器官之间比较宜用 *UBQ10* 和 *rp II*,干旱胁迫下宜用 *GAPDH*, *18S rRNA*,低温胁迫下宜用 *UBQ10*, *Actin* 和 *18S rRNA*,溃疡病菌侵染胁迫下宜用 *Actin*, *UBQ10* 和 *GAPDH*,感染衰退病毒时宜用 *18S rRNA* 和 *rp II*。周兰等<sup>[15]</sup>发现 5 个传统内参基因 *18S rRNA*, *GAPDH*, *UBQ*, *TUB*, *ACTB* 在苹果不同基因型、不同组织、果实不同发育时期表达稳定性各异, *UBQ* 在果实不同基因型和不同发育时期的基因表达分析中最稳定, *ACTB* 和 *UBQ* 在 6 种不同组织中表达均稳定。本文通过 GeNorm 软件分析 4 个内参基因 *18S rRNA*, *GAPDH*, *TUB*, *ACTB* 在华特猕猴桃不同样品中的表达稳定性 ( $M$ ),发现 6 个不同组织基因表达稳定度由高到低的排序为  $TUB > ACTB > 18S rRNA > GAPDH$ ;而在华特猕猴桃果实不同发育期基因表达稳定度由高到低依次为  $18S rRNA > TUB > ACTB > GAPDH$ 。并结合候选内参基因标准化因子的配对差异分析,可见 *TUB* 和 *ACTB* 组合适合作华特猕猴桃不同组织表达的内参基因, *18S rRNA* 和 *TUB* 组合最适合作华特猕猴桃果实不同发育期的内参基因。

Xu 等<sup>[21]</sup>发现 *18S rRNA* 和 *EF1- $\alpha$*  在杨树 qRT-PCR 的 9 个候选内参基因中表达最稳定。Yan 等<sup>[22]</sup>在对柑橘 qRT-PCR 的 7 个内参基因的筛选中发现 *18S rRNA*, *ACTB* 和 *rp II* 表达最为稳定, Kim 等<sup>[23]</sup>发现 *18S rRNA* 在水稻不同发育时期以及不同品种和紫外伤害下的 2 组白化苗中,与其他 3 个内参基因 (*TUB*, *ACTB*, *GAPDH*) 比较,

表达均最为稳定。同样,赵晓等<sup>[24]</sup>分析了 4 个内参基因 (*18S rRNA*, *TUB*, *ACTB*, *GAPDH*) 在葡萄果实发育后期 qRT-PCR 表达中,发现 *18S rRNA* 表达水平最高且最稳定。本文对 4 个传统内参基因在‘华特’猕猴桃不同 cDNA 材料中的表达结果显示, *18S rRNA* 的表达丰度不管在不同组织还是不同发育时期均相对较高,通过 GeNorm 软件分析 *18S rRNA* 在华特猕猴桃果实不同发育时期中表达最稳定,与以上研究结果较为一致。但 *18S rRNA* 在华特猕猴桃不同组织中表达稳定性不如 *TUB* 和 *ACTB*,这与周兰等<sup>[15]</sup>研究结果一致, *18S rRNA* 在苹果各个组织中虽然表达丰度高,但其稳定性较差,不适合不同组织中表达内参基因。

参考文献:

- [1] Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, et al. Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11: 805 - 816.
- [2] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6: 279 - 284.
- [3] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Research*, 1996, 6: 986 - 994.
- [4] Haller F, Kulle B, Schwager S, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 335: 1 - 9.
- [5] Ransbotyn V, Reusch TBH. Housekeeping gene selection for quantitative real-time PCR assays in the seagrass *Zostera marina* subjected to heat stress [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2006, 4: 367 - 373.

- [6] Yoo WG, Kim TI, Li S, et al. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR [J]. *Parasitology Research*, 2009, 104: 321 – 328.
- [7] Pfaffl MW. Relative quantification [C] // Dorak M T, ed. Real-time PCR [M]. New York: International University Line, 2006: 63 – 82.
- [8] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation [J]. *Nature Genetics*, 2002, 32: 496 – 501.
- [9] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1: 1559 – 1582.
- [10] 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): research 0034.
- [11] Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 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 Research*, 2004, 64: 5245 – 5250.
- [12] Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20: 1736 – 1737.
- [13] Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, 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: 646 – 651.
- [14] Reid KE, Olsson N, Schlosser J. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6(27): 1 – 11.
- [15] 周兰, 张利义, 张彩霞, 等. 苹果实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. *果树学报*, 2012, 29(6): 965 – 970.
- [16] 李钱峰, 蒋美艳, 于恒秀. 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: 61 – 66.
- [17] 吴文凯, 刘成前, 周志刚. 用于莱茵衣藻荧光定量 PCR 分析的内参基因选择 [J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45: 667 – 672.
- [18] 肖翠, 严佳文, 龙桂友, 等. 柑橘内参基因的稳定性评价 [J]. *果树学报*, 2012, 29(6): 978 – 984.
- [19] Lin YL, Lai ZX. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree [J]. *Plant Science*, 2010, 178(4): 359 – 365.
- [20] Tong ZG, Gao ZH, Wang F. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 71.
- [21] Xu M, Zhang B, Su X, et al. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus* [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 408: 337 – 339.
- [22] Yan JW, Yuan FR, Long GY, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 39(2): 1831 – 1838.
- [23] Kim BR, Nam HY, Kim SU. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1869 – 1872.
- [24] 赵晓, 马会勤, 陈尚武, 等. 葡萄果实发育后期半定量 RT-PCR 内参基因的优选 [J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(3): 7 – 14.

(责任编辑 张 韵)