

唐思源,刘欣,姚友礼. 水稻内参基因的研究进展[J]. 江苏农业科学,2025,53(2):7-13.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.02.002

水稻内参基因的研究进展

唐思源,刘欣,姚友礼

(扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室培育点/农业部长江中下游作物生理生态与栽培重点开放实验室/
粮食作物现代产业技术协同创新中心,江苏扬州 225009)

摘要:实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术可为目的基因表达水平提供较为准确可靠的检测结果,但量化目的基因表达水平时需要使用内参基因来计算,因此,内参基因的选择合理与否会影响目的基因试验结果的准确性。理想的内参基因应该在所研究生物体内的大多数细胞中具有一致的较高丰度的转录表达,且表达水平不受外界因素的影响。实际上这些内参基因可能受物种、品种、发育阶段、器官以及处理条件等因素的影响而表达水平发生显著改变,从而影响定量计算结果。随着转录组测序技术的大量应用和数据积累,候选内参基因的选择也不再局限于传统的经验内参基因,利用公共数据库进行候选内参基因的筛选逐渐成为一种可能,因此,开展水稻内参基因筛选的相关研究具有重要的实践应用价值。本文综述总结了内参基因的来源和后续的筛选与验证方法,以及近几年来水稻内参基因由传统的管家基因向高通量测序数据中筛选出的适应水稻不同处理和组织的合适内参基因的转变,并对未来水稻内参基因的研究方向进行了展望,旨在为提高水稻基因表达研究的准确性提供有价值的参考。

关键词:内参基因;RT-qPCR;水稻;基因表达

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)02-0007-07

水稻是我国最主要的粮食作物之一,同时也是用于遗传和分子功能研究的模式单子叶植物。随着水稻基因组被完整测序和分子生物学的发展,水稻的重要功能基因不断地被鉴定、克隆和解析。对目的基因的表达模式进行分析是了解目的基因特点、功能和挖掘利用其潜能的最基础研究内容之一,因此基因表达分析是分子研究中的重要基础手

段。由于基因表达在根本上是受转录水平调控的,因此研究往往需要量化目的基因的转录水平,即其 mRNA 的表达水平^[1-2]。检测目的基因表达水平的常用技术包括 Northern 印迹、原位杂交、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、微阵列和转录组测序。其中,RT-qPCR 由于其特异性强、灵敏度高、重复性好和分析便捷与准确等优势,更频繁地用于量化目的基因的 mRNA 水平。在对 RT-qPCR 产物的定量分析过程中,其定量通常通过循环数与选择的稳定表达的内参基因的相对值来计算。因此,除非选择了真正稳定表达的内参基因作为参考,否则特定样本中目的基因的表达水平往往被高估或低估。例如测量目的基因 *PIF3H* 在芍药花的不同发育时期(花蕾期、初开期、盛花期、衰败期)的表达模式

收稿日期:2023-12-21

基金项目:江苏现代农业重点研发计划(编号:BE2022335);扬州现代农业项目(编号:YZ2022043)。

作者简介:唐思源(2001—),男,江苏盐城人,硕士研究生,研究方向为水稻生长发育的分子机理。E-mail:1295612145@qq.com。

通信作者:姚友礼,教授,主要从事水稻生长发育对环境响应的分子机理研究。E-mail:yaoyl@yzu.edu.cn。

[78] Molnar A, Melnyk C W, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells[J]. *Science*, 2010, 328(5980): 872-875.

[79] Liu M J, Wu S H, Wu J F, et al. Translational landscape of photomorphogenic *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(10): 3699-3710.

[80] Wang H, Zhou P, Zhu W Y, et al. *De novo* comparative transcriptome analysis of genes differentially expressed in the scion of homografted and heterografted tomato seedlings[J]. *Scientific*

Reports, 2019, 9(1): 20240.

[81] 江毅. 南瓜砧木对嫁接南瓜自交后代性状遗传变异的影响[D]. 新乡:河南科技学院, 2019: 22-27.

[82] Wang Z Y, Patterson K J, Gould K S, et al. Rootstock effects on budburst and flowering in kiwifruit[J]. *Scientia Horticulturae*, 1994, 57(3): 187-199.

[83] Honda C, Kusaba S, Nishijima T, et al. Transformation of kiwifruit using the *ipt* gene alters tree architecture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 107(1): 45-53.

时,利用常用的内参基因 *PP2A* 进行标准化时发现 *PIF3H* 的表达模式与利用其他常用内参基因标准化时存在显著差异^[3]。因此在基因表达测定中选择不恰当的内参基因可能会得到不可靠的表达水平变化趋势的结论^[4]。在不同的试验条件下或者不同的组织中,通常使用的内参基因本身的表达水平可能也在变化中,因此每个试验场景下应单独选择具有稳定表达水平的内参基因^[5]。因此,内参基因的正确选择,对于产生可靠和准确的 RT-qPCR 结果乃至形成基本结论都至关重要。

本文综述了植物研究中候选内参基因的选择,候选内参基因稳定性的评价和验证方法以及水稻内参基因的研究进展,旨在为水稻分子机理及育种应用等相关领域研究提供内参基因选择时的参考。

1 内参基因的选择

1.1 理想候选内参基因筛选的标准

内参基因,曾一度也被称为管家基因,后因发现其并非仅仅是起“管家”作用,故而“内参基因”一名更为广泛地为大家使用。理想的内参基因应该具备以下标准:(1)非假基因,以避免因基因组 DNA 的污染而被扩增^[6];(2)转录水平为高度或中度表达,避免低表达水平的基因,有利于以此基因表达水平作为基础的定量;(3)转录水平上稳定表达于不同类型的细胞和组织中,而且其表达量相近,至少无显著性差别;(4)其转录表达水平与细胞周期或活跃时期无关;(5)其稳定的表达水平与目的基因相对差异较小^[7];(6)受生长环境或内外界胁迫因子影响后的变化较小^[8]。

1.2 候选内参基因的来源

在植物中,RT-qPCR 候选内参基因的表达通常要求其在不同组织的细胞之间和不同的试验条件下保持稳定。其中常用内参基因主要来源于以往普遍使用的经“证实”的内参基因,这些内参基因主要包括 *ACTIN*(肌动蛋白基因)、*CYP*(亲环素基因)、*EF1 α* (真核细胞延伸因子基因)、*EIF*(真核细胞引发因子基因)、*GAPDH*(3-磷酸甘油醛脱氢酶基因)、*H3*(组蛋白基因)、*NADHD*(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶基因)、*PGK*(磷酸甘油酸激酶基因)、*rRNA*(核糖体 RNA 基因)、*SAMSC*(S-腺苷甲硫氨酸合酶基因)、*TEFG*(翻译延伸因子基因)、*TUB*(微管蛋白基因)、*UBC*(泛素结合酶基因)以及 *UBQ*(泛素基因)等^[9]。随着研究工作的深入和培育材料场

景的多样化,研究者发现,即使同一植物材料,在不同生长周期、不同组织、不同环境条件下,这些基因稳定性差异很大,需要分别筛选。如 de Andrade 等以耐旱性不同的 2 个甘蔗品种为材料,进行了 3 个独立的试验,分析了内参基因在田间干旱胁迫下叶片、温室干旱胁迫下叶片和在温室水培环境中茎根缺水情况下的表达情况,结果表明,在田间干旱胁迫下叶片中表达最稳定的基因是 *UBQ1*;在温室内处于干旱胁迫条件下的叶片中及在 PEG-8000 诱导的水分亏缺胁迫下的茎根样品中,*GAPDH* 基因的表达最稳定^[10]。

然而,随着高通量测序等技术的发展,微阵列和转录组测序等数据越来越容易获得,候选内参基因的来源不再局限于传统的内参基因。越来越多的研究人员开始广泛利用微阵列和转录组数据库来筛选候选内参基因,因此涌现了许多新的更稳定的内参基因。例如,利用转录组数据从葡萄中筛选出了 7 个新的候选内参基因(*CYSP*、*EF-Hand*、*EIF5A2*、*GDT1*、*Gluc*、*NDUFS8* 和 *YLS8*),它们在 2 种组织类型(叶和果)、3 个发育阶段(叶的 3 个发育阶段和果发育的 3 个阶段)以及葡萄藤叶病毒感染后的植株中分别稳定表达,且在各个验证算法中,这些新开发的内参基因几乎都要比传统的 *ACTIN* 和 *NAD5* 更稳定^[11]。在小麦上,为了寻找小麦短期干旱胁迫下的幼苗中最稳定内参基因,Dudziak 等选择了 5 个用于小麦表达试验的常用内参基因,又利用 Genevestigator 的微阵列数据库筛选了 5 个新的候选内参基因。随后对候选内参基因的稳定性进行 RT-qPCR 分析,试验结果表明,新候选内参基因 *CJ705892* 被发现是短期干旱胁迫下小麦中最稳定的内参基因,而同样在 Genevestigator 微阵列数据库中筛选的新候选内参基因 *CA728440* 在大多数稳定性分析中都是最差的,因此利用数据库对候选内参基因进行筛选后的验证是必不可少的^[12]。

2 内参基因稳定性的评价方法

随着人们对内参基因研究的逐步重视,许多在线工具被开发出来,用于量化比较内参基因表达的变化和稳定性,以期帮助研究者筛选出最合适的内参基因。目前常用的 5 个软件分别是 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 Δ CT 和 RefFinder。

geNorm 程序可以用于筛选任何试验的任意多个数目的候选内参基因,并最终挑选出 2 个或 2 个

以上的内参基因组合用来计算目的基因的表达量,使相对定量的结果更为精确。每个候选内参基因的稳定性(M)是基于所有测试基因之间的平均成对变异(V)而产生的,判定标准为 M 值越小,该内参基因的稳定性越好。同时,geNorm 可以根据 V_n/V_{n+1} 值来确定所需最适内参基因的数目。通常 V 值设定为 0.15,如果 V_n/V_{n+1} 值 < 0.15 ,则最合适的内参基因的数量是 n 个^[13]。

NormFinder 程序通过方差分析来评估稳定值,可以比较候选内参基因间的表达差异,还可以比较组间变异,稳定性值最小的候选内参基因的表达最稳定,即最适宜于作为内参基因来应用^[14]。

BestKeeper 程序通过计算标准差和变异系数来确定候选内参基因的表达稳定性。变异系数值越小的内参基因,其稳定性越高,选用最合适^[15]。

ΔCT 程序通过比较样本中候选内参基因组成的“基因对”的相对表达来识别稳定的内参基因,如果同一个样本中 2 个基因之间的 ΔCT 值不变,则认为这 2 个基因的表达稳定。因此 ΔCT 软件的选择原则为某一内参基因所有“基因对”的 ΔCT 平均标准偏差最小,则为最稳定的内参基因,应该被选用^[16]。

Reffinder 是在 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 ΔCT 分析的基础上,根据稳定性结果来计算几何平均数从而获取基因稳定性的综合指数排名,指数越小,则该基因表达越稳定,相对而言,综合考虑了几种计算方法的优缺点^[17]。

3 候选内参基因的后续 RT-qPCR 的验证

在利用上述 5 种软件对候选内参基因进行筛选并排名后,为了验证所得的候选内参基因的稳定性,往往要对这些候选内参基因的稳定性进行 RT-qPCR 试验验证。研究者们通常依据 geNorm 中 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时 n 的值来判断最终选择几个候选内参基因最合适,并且在后续的验证中,研究者在软件中选取稳定性排名最靠前的 n 个候选内参基因,再选取 1~2 个在软件中排名倒数(稳定性最差)的候选内参基因作为对照。利用经过归一化处理的排名靠前的候选内参基因和排名倒数的候选内参基因来验证目的基因表达结果的可靠性。

例如,为了验证燕麦中选出的最佳内参基因的可靠性,研究者选择出样品组在程序中综合排名最靠前的 EP 和 $EF1A$,并进行归一化处理,又选择样品组中综合排名最低的内参基因 $GAPDH1$;在检测

了 $AsPKP1$ 和 $AsAGPL2$ 在发育中的种子和胚乳中的表达水平后,发现经 $EP + EF1A$ 、 EP 和 $EF1A$ 标准化的 $AsPKP1$ 和 $AsAGPL2$ 的表达模式基本相似,与 $GAPDH1$ 的表达模式明显不同,以此证明了 EP 、 $EF1A$ 确实是这批候选内参基因中最稳定的内参基因^[18]。

再如,在对海南红豆杉叶片对不同胁迫处理(脱落酸、乙烯、甘露醇、茉莉酸甲酯、氯化钠和水杨酸)下以及由叶片制备的悬浮细胞的候选内参基因进行验证时,选择 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 Reffinder 这 4 个程序中排名最靠前的 $18S$ 和 UBQ ,和排名最靠后的 TUB ,又挑选了在乙烯胁迫下悬浮细胞中稳定性排名最靠前的 $18S$ 和 TUA ,和在乙烯胁迫下悬浮细胞稳定性排名最靠后的 NAC ,将样品中目的基因 $ChNCS$ 表达水平标准化以验证所选择的内参基因。实际比较 RT-qPCR 的计算结果发现,在叶中 $18S$ 和 UBQ 及归一化处理的变化模式差异较小,与 TUB 变化模式不同;在悬浮细胞中 $18S$ 和 TUA 及归一化处理的变化模式也一致, NAC 变化模式差异很大。验证结果和程序分析结果吻合,验证了候选内参基因的稳定性^[19]。

4 水稻内参基因的研究进展

4.1 常用内参基因作为水稻内参基因

从传统的内参基因家族中筛选相应的内参基因在水稻研究中应用十分广泛,如 Jain 等对 10 个常用的内参基因($18S$ rRNA-1、 $25S$ rRNA、 $ACT11$ 、 $eEF-1\alpha-1$ 、 $eIF-4\alpha$ 、 $GAPDH$ 、 UBC 、 $UBQ5$ 、 $UBQ10$ 和 $\beta-TUB$) 在 IR64 中进行评估筛选。他们将样品分成发育系列,包括 3 种光照条件下 7 日龄幼苗、7 日龄幼苗的根、成熟的叶片、穗轴、幼花花序、授粉前后的花和成熟的种子,以及处理系列,包括盐胁迫、冷胁迫、热胁迫、干旱胁迫、9 种激素胁迫和 2 个对照(均采用 7 日龄幼苗进行处理)。在将 2 个系列的所有组织一起分析时, $UBQ5$ 和 $eEF-1\alpha-1$ 的表达最稳定,而 $UBQ10$ 的稳定性最差。然而在不同发育时期、不同器官中,所有内参基因稳定性结果都非常相似,其中 $UBQ5$ 和 $eEF-1\alpha-1$ 最稳定;在不同胁迫处理中, $18S$ rRNA-1 和 $25S$ rRNA 最稳定^[20]。

在另一研究中,对 10 个不同的常用内参基因($ACT11$ 、 $cyclophilin$ 、 $Eef-1$ 、 $eIF-4-a$ 、 $GAPDH$ 、 $TIP41-like$ 、 $UBC-E2$ 、 $UBQ5$ 、 $UBQ10$ 和 $\beta-TUB$) 在 2 个不同盐敏感水稻品种的叶片中进行稳定性评估,结果显示 $UBQ10$ 是水稻在盐胁迫条件下用于

RT-qPCR 定量的最佳内参基因^[21]。

在籼稻 2 个品种的 5 叶苗期和生殖生长时期(开花前)对土壤供水匮乏的响应中, Auler 等检测了 9 个常用内参基因(*ACT11*、*cyclophilin*、*eIF-4 α* 、*GAPDH*、*TIP41-Like*、*UBC-E2*、*UBQ5*、*UBQ10* 和 β -*tubulin*), 其 RT-qPCR 的结果表明, 在营养生长和生殖生长时期, *UBC-E2* 和 *UBQ5* 是在缺水条件下水稻叶片最合适的内参基因; 而 *UBQ10Z* 在营养生长阶段被认为是最不稳定的内参基因之一, 但在生殖生长阶段却是最稳定的基因之一^[22]。

对处于重金属(Zn、Cu、Cd 和 Pb)胁迫下水稻叶片的内参基因(*Actin*、*EF-1 α* 、*eIF-4 α* 、*GAPDH*、*UBC*、*UBQ5*、*UBQ10* 和 β -*TUB*)的表达稳定性分析结果显示, *UBQ10* 和 *UBC* 是最合适的内参基因^[23]。

而在 3 个品种 KHO、RKB 和 IR-64 缺氧不同时长条件下(24、48、96 h)胚芽中表达稳定性检测结果表明, 所测试的常用内参基因有 18S rRNA、25S rRNA、*ACT11*、*eEF1 α -2*、*eIF4 α* 、*GAPDH-2*、*UBC*、*UBQ5*、*UBQ10* 和 β -*TUB*, 其中 *GAPDH-2* 和 *eEF1 α -2* 适宜于在水稻低氧萌发研究中作为最稳定的内参基因应用^[24]。

在对生物胁迫的响应中, Fang 等通过对 14 个不同构成的常用内参基因(18S rRNA、*Actin*、*Actin1-1*、*EF-1 α* 、*eIF-4 α* 、*EXP*、*GAPDH-1*、*OsAOC*、*TIP41-like*、*UBC*、*UBQ5*、*UBQ10*、 α -*TUB* 和 β -*TUB*) 在感染水稻条纹叶枯病的水稻和感染水稻黑条矮缩病的水稻中进行定量分析的结果表明, *UBQ10+GAPDH-1* 是水稻条纹叶枯病感染的水稻中最稳定表达的内参基因; *Actin1-1+UBC* 是在感染水稻黑条矮缩病情况下最稳定的内参基因^[25]。而 Hu 等对南方黑条矮缩病毒侵染后的水稻叶片进行内参基因验证时发现, 8 个常用内参基因(18S-2、25S、*ACTIN*、*EF1 α* 、*GAPDH*、*UBQ5*、*UBQ10* 和 β -*TUB*) 中, 仅 18S-2 是南方水稻黑条矮缩病毒侵染后水稻叶片的最合适内参基因^[26]。另外, Hashemipetroudi 等则发现, 感染不同病原菌的水稻中, 7 个常用内参基因(18S rRNA、*ACT1-2*、*CYP28*、*eIF4 α* 、*GAPDH*、*RPS27* 和 *UBC5*) 里, *ACT1-2* 是水稻单独感染立枯丝核菌后叶片中最佳内参基因, 而 *GAPDH*、*UBC5*、*eIF4 α* 分别是立枯丝核菌感染加硅酸钾处理下、立枯丝核菌感染加嗜皂苷假单胞菌和立枯丝核菌感染加假单胞菌蛋白等复合感染或有应对措施下植株材料的最佳内参基因。 *ACT1-2* 和

RPS27 对于硅酸钾和嗜皂苷假单胞菌的组合最稳定, 而 *RPS27* 对于硅酸钾和假单胞菌蛋白的组合最稳定。这些发现表明, 在不同病原菌侵染和应对后, 所谓的“最稳定的”内参基因其稳定性发生变化, 需要采用内参基因的组合来进行表达研究^[27]。

4.2 高通量测序数据应用于水稻候选内参基因的选择

随着高通量测序技术的发展, 微阵列数据和转录组数据大量积累, 为研究者在选择内参基因时提供了更多的可能性。如 Narsai 等用了 Affymetrix 平台上可获得的水稻的 136 个转录组数据和 373 个来自微阵列的数据进行综合分析, 这些数据来自包括组织发育(胚、胚乳、干种子、发芽种子、胚芽鞘、叶、顶端分生组织、根、柱头、子房和花序)、非生物胁迫(冷、热、干旱、盐、营养和物理)、生物胁迫(真菌、寄生虫、病毒和细菌)和激素处理的试验, 筛选出 12 个水稻新的候选内参基因^[28]。

Fabiane 等在 2 个铁敏感性不同的水稻品种中测试了先前研究中经常使用的 3 个传统内参基因(*OsGAPDH*、*OsNABP* 和 *OsEF-1a*) 以及从 Genevestigator 数据库中选择 9 个新型候选内参基因, 找到了在铁处理环境下的芽(*P2*、*OsGAPDH* 和 *OsNABP*)、根(*OsEF-1a*、*P8* 和 *OsGAPDH*) 和根+芽(*OsNABP*、*OsGAPDH* 和 *P8*) 的有效内参基因^[29]。而 Soni 等从暴露于重金属胁迫的公开转录组数据中筛选出 *OsOBP* 和 *OsCK1a.3*, 认为它们是类似条件下最可靠的内参基因^[30]。Ji 等利用开放的微阵列和转录组数据库筛选出 12 个基因作为候选内参基因, 并以 5 个传统内参基因为对比, 利用 RT-qPCR 对这些基因进行进一步分析和验证, 发现 4 个基因(*UPF3*、*eIF4A-3*、*GAPDH* 和 *PPP6*) 在生殖组织中稳定表达, 可作为水稻花药发育研究的内参基因^[31]。Zhao 等从 IC4R 转录组数据库筛选出 11 个新的水稻候选内参基因(*ARFB1B*、*DUF602*、*FhaB*、*Hypro*、*PP57*、*TFIIA-L1*、*TIF-SUII*、*UFC1*、*YIP1*、*ZF-RFP* 和 *ZF-U1*), 并将其与 5 个传统内参基因(*ACT1*、*GAPDH*、*UBF*、*UBQ5* 和 β -*TUB4*) 作比较, 发现新的内参基因 *UFC1*、*FhaB* 和传统使用的 *UBQ5* 是水稻各器官(根、茎、叶、穗)中最稳定的内参基因^[32]。

为了获得特定组织类型或生长条件中稳定的内参基因, Liu 等利用 RNA-Seq 数据库筛选出 12 个候选内参基因(*OsACT1*、*OsF-Box1*、*OsPP2C1*、*OsPP2C2*、*OsUBQ1*、*OsUBQ2*、*OsGDCP*、*OsHeFP*、

OsMED7、*OsOS-9*、*OsReTP* 和 *OsZOS3-23*), 其中前 6 个属于常用内参基因家族但未被广泛应用, 后 6 个是新发现的候选内参基因并对其进行验证, 发现了 7 日龄水稻叶 (*OsMED7*、*OsACT1* 和 *OsOS-9*)、茎 (*OsACT1*、*OsZOS3-23* 和 *OsGDCP*) 和根 (*OsMED7*、*OsOS-9* 和 *OsGDCP*) 的稳定内参基因^[33]。

除了利用公共数据库中转录组数据, 也有研究人员对自己特定处理材料的转录组测序结果, 筛选了更适合自己试验要求的内参基因。例如, 为了获得在高温下水稻胚乳发育过程中的合适内参基因, Xu 等对不同处理的水稻胚乳进行了转录组测序, 通

过 RT-qPCR 从中筛选出 6 个候选内参基因 (*ARP*、*eIF-5a*、*EXP1*、*Fb15*、*SAP18* 和 *SKP-1b*)。将它们和 11 个常用内参基因 (17S rRNA、18S rRNA、25S rRNA、*Actin*、*eEF-1a*、*eIF-4a*、*GAPDH*、*UBC*、*UBQ5*、*UBQ10* 和 β -*TUB*) 一起进行稳定性分析后, 发现 *Fb15* 和 *eIF-4a* 是水稻胚乳中 2 个最稳定的基因, 而高温处理对 *Fb15* 和 *UBQ5* 的表达影响最小, *Fb15*、*UBQ5* 和 17S rRNA 在高温下胚乳中的表达量最稳定^[34]。

目前在水稻各组织中筛选得到的最佳内参基因名单列于表 1。

表 1 水稻中筛选出的最佳的内参基因

组织	试验条件	合适内参基因	参考文献	
根	7 d 龄水稻根	<i>UBQ5</i>	[20]	
		<i>eEF-1α-1</i>	[20]	
		<i>OsMED7</i>	[33]	
		<i>OsOS-9</i>	[33]	
		<i>OsGDCP</i>	[33]	
		<i>OsEF-1a</i>	[29]	
	铁胁迫	<i>P8</i>	[29]	
		<i>OsGAPDH</i>	[29]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
茎	生殖生长时期的根	<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>OsACT1</i>	[33]	
		<i>OsZOS3-23</i>	[33]	
	7 d 龄的茎	<i>OsGDCP</i>	[33]	
		<i>UBQ10</i>	[21]	
		<i>UBC-E2</i>	[22]	
		<i>UBQ5</i>	[22]	
		<i>UBQ10</i>	[23]	
		<i>UBC</i>	[23]	
叶	盐胁迫	<i>18S rRNA-2</i>	[26]	
		<i>ACT1-2</i>	[27]	
		<i>UBQ10</i>	[25]	
		<i>GAPDH-1</i>	[25]	
		<i>Actin1-1</i>	[25]	
		<i>UBC</i>	[25]	
	干旱胁迫	<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>OsMED7</i>	[33]	
		<i>OsACT1</i>	[33]	
		<i>OsOS-9</i>	[33]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
重金属胁迫	感染南方水稻黑矮病的水稻	<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>OsMED7</i>	[33]	
		<i>OsACT1</i>	[33]	
	感染立枯丝核菌的水稻	<i>OsOS-9</i>	[33]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
感染水稻条纹叶枯病水稻	感染水稻黑条矮缩病水稻	<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
	7 日龄的叶	<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
穗	生殖生长时期的穗	<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
		<i>UFCl</i>	[32]	
		<i>FhaB</i>	[32]	
	幼苗	长日照和短日照 7 d 龄的水稻苗	<i>UBQ5</i>	[20]
			<i>eEF-1α-1</i>	[20]
			<i>18S rRNA-1</i>	[20]
		盐胁迫	<i>25S rRNA</i>	[20]
			<i>18S rRNA-1</i>	[20]
			<i>25S rRNA</i>	[20]
冷胁迫	<i>18S rRNA-1</i>	[20]		
	<i>25S rRNA</i>	[20]		
	<i>25S rRNA</i>	[20]		

表 1(续)

组织	试验条件	合适内参基因	参考文献
幼苗	热胁迫	18S rRNA - 1	[20]
		25S rRNA	[20]
	干旱胁迫	18S rRNA - 1	[20]
		25S rRNA	[20]
	激素胁迫	18S rRNA - 1	[20]
		25S rRNA	[20]
	铁胁迫	<i>P2</i>	[29]
		<i>OsGAPDH</i>	[29]
		<i>OsNABP</i>	[29]
	胚芽	低氧胁迫	<i>GAPDH - 2</i>
花药	减数分裂、四分体、单核、双细胞和三细胞阶段的花药	<i>eEF1α - 2</i>	[24]
		<i>UPF3</i>	[31]
		<i>eIF4A - 3</i>	[31]
		<i>GAPDH</i>	[31]
		<i>PPP6</i>	[31]
胚乳	高温胁迫	<i>Fb15</i>	[30]
		<i>UBQ5</i>	[30]
		17S rRNA	[30]

5 总结与展望

尽管 RT - qPCR 是一种快速、可靠和灵敏的技术,可以量化我们感兴趣的基因的转录水平,但它的结果在相当程度上取决于选择合适的内参基因来标准化计算,以此来最大程度地降低由样品制备和扩增反应所带来的误差。在理想情况下,内参基因应该在任何待检组织中或者试验情况下稳定表达,转录水平变化微小。然而,大多数试验结果显示,常采用的内参基因在不同组织、不同生长阶段和试验条件下都会发生较为显著的响应变化^[35]。尽管可能并不存在理想的在任何条件下都稳定表达的内参基因,由于 RT - qPCR 定量技术的应用局限,必须选择相对较为稳定的内参基因。

在水稻中,传统的内参基因和其他常用的内参基因都有了较多的研究,但这些研究经常表现出与生长条件、水稻品种和水稻器官有关的局限性。为了获得相对准确的 RT - qPCR 结果,需要对不同的样本和数据产生的具体条件进行分类,以筛选鉴定出最适宜的候选内参基因。随着测序技术的飞速发展,积累下来越来越多的转录组数据可以为我们提供更为可靠的筛选机遇,对精准筛选出试验特定条件下的最佳内参基因非常有帮助。针对不同试验条件,可以从公共数据库中对具有相似条件的数据进行下载,并根据一定标准严格或宽松地去筛选候选内参基因,同时对这些候选内参基因进行 RT - qPCR 验证。然后再通过 geNorm、NormFinder、

BestKeeper、 Δ CT 和 RefFinder 等软件做稳定性分析,根据排名筛出合适的内参基因数量,对其进行归一化。这样,在评价目的基因表达水平时能够有一个更为客观真实的结果。

随着生物信息学研究的不断深入,相信在不久的将来会出现一个综合的适用于水稻等各个物种的筛选内参基因的网站,它能够按物种、亚种、栽培品种、组织类型、发育阶段、生长条件和生物或非生物胁迫处理等提供更全面的特定最佳内参基因搜索。以上提到的筛选候选内参基因的所有工作将被大幅度地简化,在做相关表达水平分析时可以节约大量时间,更专注地做更有意义的功能分析。

参考文献:

- [1] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real - time RT - PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4): 279 - 284.
- [2] Bustin S A, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real - time RT - PCR: a perspective [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 34(3): 597 - 601.
- [3] 李 健. 芍药实时定量 PCR 内参基因的筛选和验证 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(7): 2544 - 2549.
- [4] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT - PCR [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7): 1736 - 1737.
- [5] 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.
- [6] 陈凤花, 王 琳, 胡丽华. 实时荧光定量 RT - PCR 内参基因的选择 [J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(5): 393 - 395.
- [7] Dheda K, Huggett J F, Bustin S A, et al. Validation of housekeeping

- genes for normalizing RNA expression in real - time PCR [J]. *BioTechniques*,2004,37(1):112 - 114,116, 118 - 119.
- [8] Thellin O,Zorzi W,Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards; use and limits [J]. *Journal of Biotechnology*,1999,75(2/3):291 - 295.
- [9] 李丹丹,胡博,王庆,等. 药用植物内参基因研究进展 [J]. *分子植物育种*,2017,15(3):903 - 910.
- [10] de Andrade L M, dos Santos Brito M, Peixoto R F Jr, et al. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit [J]. *Plant Methods*,2017,13:28.
- [11] Song Y S, Hanner R H, Meng B Z. Genome - wide screening of novel RT - qPCR reference genes for study of GLRaV - 3 infection in wine grapes and refinement of an RNA isolation protocol for grape berries [J]. *Plant Methods*,2021,17(1):110.
- [12] Dudziak K, Sozoniuk M, Szczerba H, et al. Identification of stable reference genes for qPCR studies in common wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under short - term drought stress [J]. *Plant Methods*,2020,16:58.
- [13] 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):RESEARCH0034.
- [14] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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 Research*,2004,64(15):5245 - 5250.
- [15] 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]. *Biotechnology Letters*,2004,26(6):509 - 515.
- [16] Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real - time PCR [J]. *BMC Molecular Biology*,2006,7:33.
- [17] Xie F L, Xiao P, Chen D L, et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. *Plant Molecular Biology*,2012,80:75 - 84.
- [18] Yang Z, Wang K, Aziz U, et al. Evaluation of duplicated reference genes for quantitative real - time PCR analysis in genome unknown hexaploid oat (*Avena sativa* L.) [J]. *Plant Methods*,2020,16:138.
- [19] Sun H P, Jiang X F, Sun M L, et al. Evaluation of reference genes for normalizing RT - qPCR in leaves and suspension cells of *Cephalotaxus hainanensis* under various stimuli [J]. *Plant Methods*,2019,15:31.
- [20] 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.
- [21] Moraes G P, Benitez L C, do Amaral M N, et al. Evaluation of reference genes for RT - qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress [J]. *Genetics and Molecular Research*,2015,14(1):2384 - 2398.
- [22] Auler P A, Benitez L C, do Amaral M N, et al. Evaluation of stability and validation of reference genes for RT - qPCR expression studies in rice plants under water deficit [J]. *Journal of Applied Genetics*,2017,58(2):163 - 177.
- [23] Almas D E, Kamrodi A R. Validation of appropriate reference genes for real - time quantitative PCR gene expression analysis in rice plants exposed to metal stresses [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*,2018,65(6):890 - 897.
- [24] Kumar D, Das P K, Sarmah B K. Reference gene validation for normalization of RT - qPCR assay associated with germination and survival of rice under hypoxic condition [J]. *Journal of Applied Genetics*,2018,59(4):419 - 430.
- [25] Fang P, Lu R F, Sun F, et al. Assessment of reference gene stability in rice stripe virus and rice black streaked dwarf virus infection rice by quantitative Real - time PCR [J]. *Virology Journal*,2015,12:175.
- [26] Hu K, Qiu L, Ding W B, et al. Evaluation of reference genes and expression of key genes involved in the isoprenoid metabolic pathway of rice leaves after infection by the Southern rice black - streaked dwarf virus [J]. *Molecular Biology Reports*,2019,46(4):3945 - 3953.
- [27] Hashemipetroudi S H, Ghorbani H, Rostami M, et al. Selection of reference genes for RT - qPCR analysis of rice with *Rhizoctonia solani* infection and biocontrol PGR/KSi application [J]. *Molecular Biology Reports*,2023,50(5):4225 - 4237.
- [28] Narsai R, Ivanova A, Ng S, et al. Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets [J]. *BMC Plant Biology*,2010,10:56.
- [29] Santos F I C D, Marini N, Santos R S D, et al. Selection and testing of reference genes for accurate RT - qPCR in rice seedlings under iron toxicity [J]. *PLoS One*,2018,13(3):e0193418.
- [30] Soni P, Shivhare R, Kaur A, et al. Reference gene identification for gene expression analysis in rice under different metal stress [J]. *Journal of Biotechnology*,2021,332:83 - 93.
- [31] Ji Y X, Tu P, Wang K, et al. Defining reference genes for quantitative real - time PCR analysis of anther development in rice [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*,2014,46(4):305 - 312.
- [32] Zhao Z, Zhang Z X, Ding Z, et al. Public - transcriptome - database - assisted selection and validation of reliable reference genes for qRT - PCR in rice [J]. *Science China (Life Sciences)*,2020,63(1):92 - 101.
- [33] Liu X, Gao Y B, Zhao X Y, et al. Validation of novel reference genes in different rice plant tissues through mining RNA - seq datasets [J]. *Plants*,2023,12(23):3946.
- [34] Xu H, Bao J D, Dai J S, et al. Genome - wide identification of new reference genes for qRT - PCR normalization under high temperature stress in rice endosperm [J]. *PLoS One*,2015,10(11):e0142015.
- [35] Bustin S A. Quantification of mRNA using real - time reverse transcription PCR (RT - PCR): trends and problems [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*,2002,29(1):23 - 39.