

· 医药生物技术 ·

钩吻看家基因筛选及生物碱合成相关酶基因的表达分析

章瑶^{1#}, 穆德添^{1#}, 周宇¹, 陆英¹, 柳亦松², 左梦婷², 董壮¹, 刘兆颖², 唐其^{1,3*}

1 湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128

2 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128

3 湖南农业大学国家中药材生产(湖南)技术中心, 湖南 长沙 410128

章瑶, 穆德添, 周宇, 陆英, 柳亦松, 左梦婷, 董壮, 刘兆颖, 唐其. 钩吻看家基因筛选及生物碱合成相关酶基因的表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 286-303.

ZHANG Yao, MU Detian, ZHOU Yu, LU Ying, LIU Yisong, ZUO Mengting, DONG Zhuang, LIU Zhaoying, TANG Qi. Screening of housekeeping genes in *Gelsemium elegans* and expression patterns of genes involved in its alkaloid biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 286-303.

摘要: 钩吻是我国的一种传统中草药, 具有重要的药用价值, 萜类吲哚生物碱为其主要的活性组分。为了研究钩吻不同部位最适看家基因, 以钩吻 4 个不同部位根皮、茎段、叶片和花序为材料, 通过实时荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 以及 GeNorm、NormFinder、BestKeeper、 Δ CT 和 RefFinder 软件对 10 个候选看家基因(*18S*、*GAPDH*、*Actin*、*TUA*、*TUB*、*SAND*、*EF-1 α* 、*UBC*、*UBQ* 和 *cdc25*)进行表达稳定性评估。结果显示, *EF-1 α* 在钩吻的 4 个部位中均稳定表达, 为最适的看家基因。同时, 为了研究与生物碱合成相关基因的表达情况, 基于“基因组+全长转录组+代谢组”共表达模式筛选出钩吻生物碱合成通路上 18 个相关基因(*AS*、*AnPRT*、*PRAI*、*IGPS*、*TSA*、*TSB*、*TDC*、*GES*、*G8H*、*8-HGO*、*IS*、*7-DLS*、*7-DLGT*、*7-DLH*、*LAMT*、*SLS*、*STR* 和 *SGD*), 以看家基因 *EF-1 α* 为参照, 利用 qRT-PCR 技术对这 18 个候选基因表达情况进行分析, 结果发现这些基因的表达量与钩吻素己含量变化呈相关性, 推测其可能参与钩吻生物碱钩吻素己的合成。

关键词: 钩吻; 实时荧光定量 PCR; 看家基因; 萜类吲哚生物碱; 钩吻素己

资助项目: 湖南省科技计划项目(2022NK2004, 2017ZK3133); 湖南省教育厅项目(HNJG-2020-0327)

This work was supported by the Project of Hunan Provincial Science and Technology Department (2022NK2004, 2017ZK3133) and the Project of Hunan Provincial Education Department (HNJG-2020-0327).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: tangqi@huanu.edu.cn

Received: 2022-04-29; Accepted: 2022-07-06; Published online: 2022-07-08

Screening of housekeeping genes in *Gelsemium elegans* and expression patterns of genes involved in its alkaloid biosynthesis

ZHANG Yao^{1#}, MU Detian^{1#}, ZHOU Yu¹, LU Ying¹, LIU Yisong², ZUO Mengting², DONG Zhuang¹, LIU Zhaoying², TANG Qi^{1,3*}

1 College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

3 National Technology Center of TCM Production (Hunan), Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: *Gelsemium elegans* is a traditional Chinese herb of medicinal importance, with indole terpene alkaloids as its main active components. To study the expression of the most suitable housekeeping reference genes in *G. elegans*, the root bark, stem segments, leaves and inflorescences of four different parts of *G. elegans* were used as materials in this study. The expression stability of 10 candidate housekeeping reference genes (*18S*, *GAPDH*, *Actin*, *TUA*, *TUB*, *SAND*, *EF-1 α* , *UBC*, *UBQ*, and *cdc25*) was assessed through real-time fluorescence quantitative PCR, GeNorm, NormFinder, BestKeeper, Δ CT, and RefFinder. The results showed that *EF-1 α* was stably expressed in all four parts of *G. elegans* and was the most suitable housekeeping gene. Based on the coexpression pattern of genome, full-length transcriptome and metabolome, the key candidate targets of 18 related genes (*AS*, *AnPRT*, *PRAI*, *IGPS*, *TSA*, *TSB*, *TDC*, *GES*, *G8H*, *8-HGO*, *IS*, *7-DLS*, *7-DLGT*, *7-DLH*, *LAMT*, *SLS*, *STR*, and *SGD*) involved in the *Gelsemium* alkaloid biosynthesis were obtained. The expression of 18 related enzyme genes were analyzed by qRT-PCR using the housekeeping gene *EF-1 α* as a reference. The results showed that these genes' expression and gelsenicine content trends were correlated and were likely to be involved in the biosynthesis of the *Gelsemium* alkaloid, gelsenicine.

Keywords: *Gelsemium elegans*; qRT-PCR; housekeeping gene; terpenoid indole alkaloids; gelsenicine

钩吻(*Gelsemium elegans* Benth.)为马钱科(Loganiaceae)钩吻属(*Gelsemium*)的一种常绿木质藤本植物,在我国主要分布于湖南、广东、广西等南方地区^[1],是我国的一种传统药用植物。其始载于《神农本草经》,又称为断肠草、胡蔓藤和大茶药等,全株剧毒,主祛风攻毒、散结消肿之效,其活性成分为生物碱、环烯醚萜类和黄酮类等成分^[2-3],可外敷治疗皮炎、湿疹,在临床上能抑制多种癌细胞的生长增殖,

还具有免疫调节、抗肿瘤、镇痛镇静和抗焦虑等作用^[4-5]。钩吻作为一种剧毒植物,被猪、羊等畜类适量食用可以驱虫、增加食欲^[6],人若口服则极易引起中毒,但据研究表明,其治疗剂量与中毒剂量相近^[5],因此也受到国内外的广泛关注,具有重要的研究价值。目前,对钩吻的研究主要集中于化学成分的提取与鉴定^[7-8]、药理及毒理机制^[9-10]等方向,而对于钩吻生物碱的生物合成途径相关研究甚少,因此,

阐明钩吻生物碱生物合成分子机制的研究,解析合成途径中关键酶基因的调控机制,将为钩吻的开发与利用奠定基础。

实时荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)能通过荧光信号的累积实时监测到 DNA 扩增反应的产物总量并进行定量分析^[11-12],是研究和分析基因相对表达水平的重要技术之一,因其具有灵敏度高、可重复性强、特异性好且易于操作等特点,在内参基因筛选的研究中,具有重要作用^[13]。但由于该技术的结果准确性和稳定性还受引物特异性等诸多因素影响,需引入内参基因对 qRT-PCR 所得数据进行均一化处理^[14]。通常看家基因表达稳定,不易受环境影响,常被用作 qRT-PCR 分析的内参基因。植物中常见的看家基因有 18S 核糖 RNA (*18S*)、肌动蛋白基因(*Actin*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)、 α 微管蛋白基因(*TUA*)、延伸因子基因(*EF1- α*)、SAND 家族蛋白基因(*SAND*)和细胞分裂控制蛋白基因(*cdc25*)等。在诸多研究中发现,不同植物间看家基因的表达稳定性也不同。如 Wang 等^[15]研究发现 *PPA2* 是何首乌不同组织中最佳的看家基因; Teng 等^[16]研究发现 *CYP* 和 *GAPDH* 是大花红景天用于 qRT-PCR 的最适看家基因; Yang 等^[17]通过实验发现 *ACT7* 和 *PP2A* 是铁十字秋海棠斑叶在不同时期表达稳定性最优的看家基因。目前,仍没有对于钩吻内参基因的筛选研究。因此,筛选出钩吻 qRT-PCR 分析中最佳的内参基因对后续的基因表达及分析具有重要意义。

研究发现,从钩吻植株中分离出来的毒性成分为钩吻生物碱,属于萜类吲哚生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs)^[18],其中含量最高的成分是钩吻素子(koumine)^[19],毒性最强的为钩吻素己(gelsenicine)^[20]。钩吻碱作为钩吻的主要活性成分,应用前景非常广泛,阐明其

生物合成途径,了解途径上的相关酶基因,有利于通过合成生物学等手段,提高钩吻碱的产量,拓宽钩吻的应用市场。吲哚类生物碱的合成主要涉及环烯醚萜途径和色胺途径。来自甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(MEP pathway)的前体异戊烯二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)^[21-22],在香叶基焦磷酸合酶(geranyl diphosphate synthase, GPPS)、香叶醇合酶(geraniol synthase, GES)的催化下分别生成香叶基二磷酸酯(geranyl diphosphate)^[23]和香叶醇(geraniol)^[24],接着通过环烯醚萜途径(iridoid pathway)参与氧化、还原等反应,生成马钱子酸(loganic acid)^[25-26],再经由番木鳖酸甲基转移酶(loganic acid methyltransferase, LAMT)及裂环马钱子苷合成酶(secologanin synthase, SLS)的共同催化得到断马钱子苷(secologanin)^[27-28];分支酸(chorismate)在色胺途径(tryptamine pathway)中多种酶的催化下,能得到色胺(tryptamine)^[29]。至此,通过异胡豆苷合成酶(strictosidine synthase, STR)催化,断马钱子苷和色胺缩合形成胡豆苷(strictosidine)^[30]。最后,异胡豆苷通过异胡豆苷 β -D-葡萄糖苷酶(strictosidine- β -D-glucosidase, SGD)脱糖^[31],再经过细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP450)和 N-甲基转移酶(N-methyltransferase, NMT)催化,最终生成钩吻中剧毒成分——钩吻素己,其生物合成途径及涉及的相关基因见图 1。

基于本课题组前期已完成的基因组测序^[32],发现了大量钩吻 TIAs 生物合成途径上的相关酶基因,并基于基因组和转录组数据筛选出了钩吻 10 个候选看家基因,通过使用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper、Delta CT (Δ CT)和 RefFinder 分析候选看家基因在钩吻不同部位的表达稳定性。然后利用筛选出的最佳看家基因

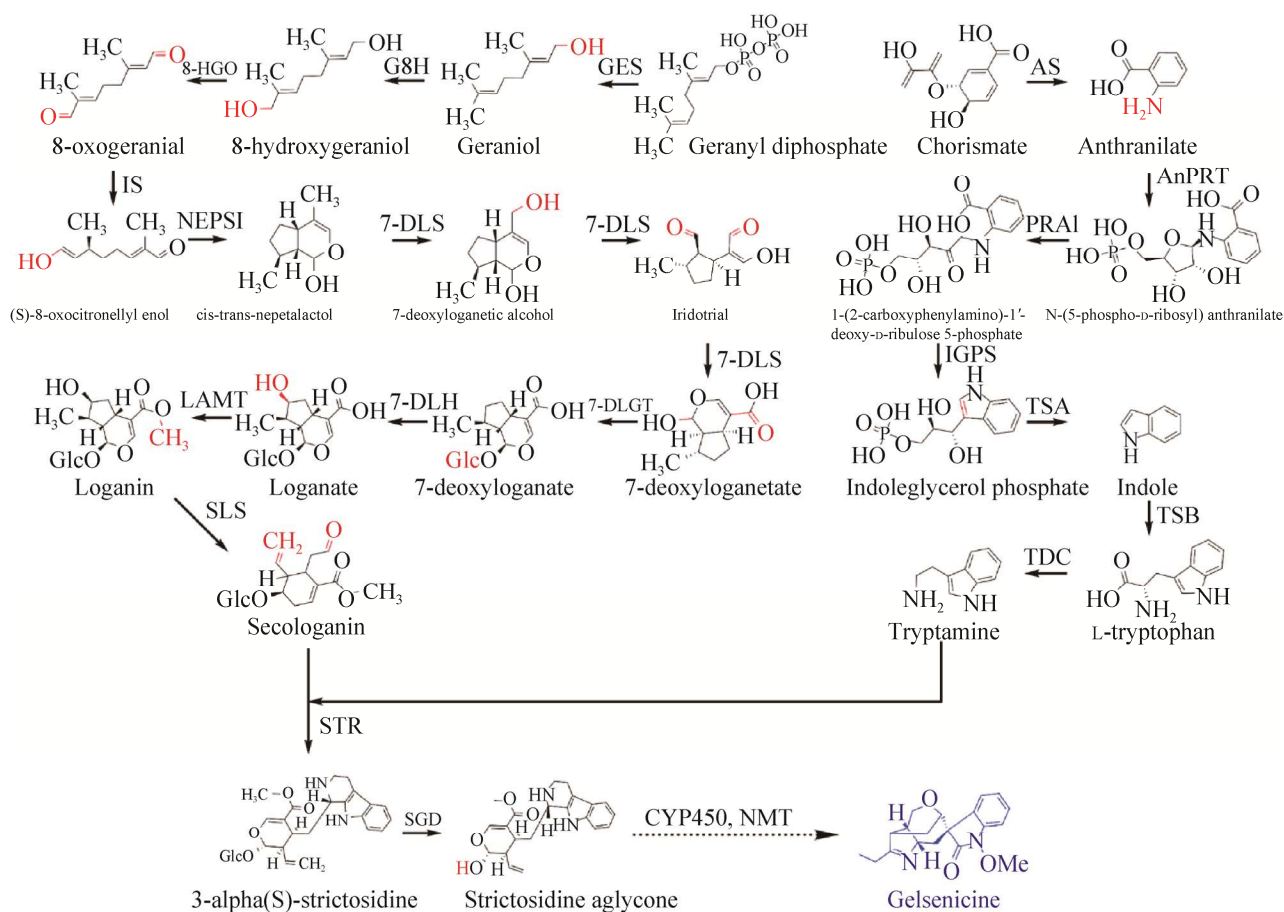


图 1 钩吻素己生物合成途径

Figure 1 The biosynthesis pathway of gelsenicine in *Gelsemium elegans*.

对参与钩吻素己生物合成上游途径相关酶基因的表达模式进行分析, 以进一步验证该看家基因的准确性, 并为后续研究钩吻生物碱合成关键酶基因的功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用钩吻 *G. elegans* 采自广西壮族自治区柳州市柳城县龙头镇新村, 剪取钩吻 4 个不同部位(根皮、茎段、叶片、花序)植物材料。剪取后, 经简单清理后迅速切片, 置于液氮中速冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱保存备用。

研究中所用仪器主要有 Agilent 6530 LC-MS

系统(Agilent Technologies, Palo Alto)、qTower³G 实时荧光定量 PCR 仪, Analytik Jena 公司。

1.2 方法

1.2.1 钩吻生物碱基于 LC-MS 技术的相对含量分析

将新鲜钩吻样品用液氮充分研磨后, 置于 LGJ-10C 冷冻干燥机(四环福瑞科仪科技发展有限公司)内干燥, 备用。称取钩吻粉末 1 g, 加入 80%乙醇(体积分数) 25 mL, 于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超声机中超声 30 min, 得滤液, 滤渣再加入 80%乙醇 25 mL, 再次超声 30 min, 合并 2 次滤液。待滤液散至无乙醇味后, 取 1 mL 滤液, 氮气吹干, 加入 200 μL 洗脱液(A)和 800 μL 洗脱液(B)

复溶, 过 0.22 μm 滤膜, 待分析。

使用 Agilent 1290 高效液相色谱串联时间飞行(6530)质谱仪(Agilent 公司, LC-QqTOF/MS)检测样品, 样品在 Waters C18 柱(3.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm)上分离。流动相为 0.1%甲酸-乙腈, 分析时间 50 min, 使用梯度洗脱程序: 0–2 min, 10%–10% (B); 2–7 min, 10%–15% (B); 7–30 min, 15%–45% (B); 30–40 min; 45%–90% (B); 40–43 min, 90%–90% (B); 43.01–50 min, 10%–10% (B)。流速为 0.3 mL/min, 柱温保持 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 5 μL 。采用自动二级模式进行样品分析, (+) ESI; 碎裂电压, 30 V; 毛细管电压, 3 500 V; 干气温度, 300 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气温度, 350 $^{\circ}\text{C}$; 使用干燥气体(N_2)作为雾化气体流量, 9 L/min; 鞘气流量, 11 L/min; 雾化器, 35 psi; 扫描范围: 50–1 000 m/z 。碰撞能量(CE)设置为 30 V。

通过测定, 得到不同部位的质谱响应峰高, 对不同部位中钩吻素己的相对含量进行成分分析。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

采用多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)对钩吻 4 个部位分别进行总 RNA 提取。利用超微量分光光度计(K5600, 北京凯奥科技有限公司)检测总 RNA 样品的浓度、 OD_{260}/OD_{280} 值及 OD_{260}/OD_{230} 值, 然后取 RNA 各 2.5 μL , 用 1%琼脂糖凝胶电泳仪检测, 通过观察 18S、28S 条带亮度判断总 RNA 的完整性。4 个部位均采用 200 ng RNA 进行 cDNA 第一链合成, 按照 PrimerScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒(TaKaRa, 大连)说明书的操作步骤进行, 置于 -20°C 保存备用。

1.2.3 看家基因的筛选与引物合成

基于课题组已有的钩吻转录组数据, 筛选

出 10 个候选的看家基因 18S、GAPDH、Actin、TUA、TUB、SAND、EF-1 α 、UBC、UBQ 和 cdc25, 另外, 基于“基因组+转录组+代谢组”共表达分析, 筛选出钩吻生物碱生物合成已知上游途径中的共 18 个相关基因, 分别通过 Primer Premier 5.0 软件进行 qRT-PCR 引物的设计(表 1 和表 2)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

将不同部位样品的 cDNA 模板原液等量混合, 依次稀释 4 倍, 设置 5 个浓度梯度, 分别为模板原液的 1、1/4、1/16、1/64 和 1/256, 由于 TUB、GAPDH 基因的表达量高, 该 2 个基因采用的浓度梯度, 分别为模板原液的 1、1/5、1/25、1/125 和 1/625。

qRT-PCR 实验采用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit (AG11701)试剂盒, 操作步骤按说明书进行, 并使用 qTower³G 实时荧光定量 PCR 仪(Aanalytikjena 公司)进行 qRT-PCR 反应, 反应体系为 20 μL : 2 \times SYBR Green Pro Taq HS 预混型 10 μL (Vazyme), cDNA 2 μL (共添加 50 ng), 上、下游引物(浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , RNase 无菌水 7.2 μL , 配制过程在冰上完成。扩增反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 每个样品进行 3 次重复检测, 反应结束后由软件生成熔解曲线, 根据熔解曲线判断引物的扩增特异性。

通过 qRT-PCR 反应, 获得每个看家基因在不同梯度下的 C_t 值, 生成标准曲线, 计算斜率 (k) 和线性相关系数 (R^2), 并利用公式 $E = (10^{-1/k} - 1) \times 100\%$ 计算看家基因的扩增效率。同时, 整理经过 qRT-PCR 反应所得数据, 收集 10 个候选看家基因的 C_t 值, 并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析定量结果。

表 1 钩吻生物碱上游合成途径中相关酶基因 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences for related genes in *Gelsemium* alkaloids upstream synthesis pathway

Gene name	Genes full name	Primer sequence (5'→3')
<i>GES</i>	Geraniol synthase	F: GGCTGCGTTTCAGGTTGCT R: CTTTAGGTGGGCTTGGGTG
<i>G8H/CYP76B6</i>	Geraniol 8-hydroxylase	F: AAGCCGAACAATCCCCACC R: TTTCCATCACGCCCCACA
<i>8-HGO/CYP76B10</i>	8-hydroxygeraniol dehydrogenase	F: CTGTCTTCCCCTGCTTGC R: CGTTCCATTGCCGTGTTGA
<i>IS</i>	(S)-8-oxocitronellyl enol synthase	F: CACGATTCGCCCTTCACC R: GCGTCCACAGCATCAGCA
<i>7-DLS/ CYP76A26</i>	7-deoxyloganetic acid synthase	F: TGAGACAATGGCTGAGGTG R: TCTGAATACCAGGCGAGTT
<i>7-DLGT/UGT85A24</i>	7-deoxyloganetic acid glucosyltransferase	F: GCCTTTGGTCATTCCTCTG R: GATTTGTGGCTCCTCCTTG
<i>7-DLH/CYP72A224</i>	7-deoxyloganate 7-hydroxylase	F: CGGTGCTTGTGAAGGTCGT R: CAATCCGCAGCAAATAGGT
<i>LAMT</i>	Loganate methyltransferase	F: CTGCTCCACAGGTCCCAATA R: GTGCCATCAACCCTCCGT
<i>SLS/CYP72A1</i>	Secologanin synthase	F: GCCTCACATTGACAAAACC R: TGTAGCAAATAGCGAAAAGC
<i>AS</i>	Anthranilate synthase	F: GGCGAATCCCCTTGTGTTGT R: TTGAGGCGTTCAGGTCC
<i>AnPRT</i>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	F: ACGGCAATCCTCCTTCCAA R: TTCGCCTGAGCATCCAACA
<i>PRAI</i>	Phosphoribosylanthranilate isomerase	F: GCCCTAAACTCCCCGTCA R: CCCGAAAGAAGCACAAGAAGA
<i>IGPS</i>	Indole-3-glycerol phosphate synthase	F: TGGTCCCTTGTAGTTTCGG R: AGGCAACCCAGTTCGTGAG
<i>TSA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	F: CAAGCGTGGTGTGAAAAG R: GCTCTGGGAGTTGTGGGTG
<i>TSB</i>	Tryptophan synthase beta chain	F: TGGCGTCCAACCTCCTCTA R: CGATACGGTTTCTGGTCAT
<i>TDC</i>	L-tryptophan decarboxylase	F: TGCGGGGAAATGCTTAGTG R: CATAGCGGGTGGAGGAGTC
<i>STR</i>	Strictosidine synthase	F: AAGGAAGAGGGCGTGGA R: GCAACAGGCAATGCAGAA
<i>SGD</i>	Strictosidine- β -D-glucosidase	F: TATGGTTATGCGTCGGGTGT R: AAGGCTCTGTGCCAGGGTT

1.2.5 看家基因表达稳定性评价

分别使用 GeNorm^[33]、Normfinder^[34]、BestKeeper^[35]和 Δ CT^[36]这 4 个程序以及 RefFinder 网站在线^[37]评估 10 个候选看家基因在钩吻不同部位的表达稳定性。BestKeeper 和 Δ CT 程序可直接采用 C_t 值进行计算分析,而

使用 GeNorm 和 Normfinder 程序均需将所得 C_t 值先转化为 Q 值^[38]再分析, Q 值为该基因在不同样品中的 C_t 值分别与在所有样品中最小的 C_t 值之差。最后采用 RefFinder 在线网站 (<http://blooge.cn/RefFinder/>)结合上述 4 个程序的分析结果进行综合评价,以筛选出最佳看家

基因。根据筛选出的最佳看家基因,对钩吻生物碱生物合成已知的上游途径相关基因在钩吻不同部位进行表达模式分析,每个样品进行3次技术重复,并利用 IBM SPSS Statistic 22 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 钩吻生物碱相对含量分析

根据峰高的响应值进行钩吻素己相对含量的分析,可以得出该成分在4个部位的相对趋势(图2)。结果显示,钩吻素己在钩吻根皮中含量较高,其次是花序和茎段,在叶片中含量最低。

2.2 钩吻总 RNA 提取及质量检测

凝胶电泳的成像结果显示(图3),提取的总 RNA 均呈现清晰明亮的 28S 和 18S 条带,表明该总 RNA 的提取完整性较好。进一步使用超微量分光光度计检测发现,4个样品(根皮、茎段、叶片、花序)的总 RNA 浓度分别为 32.6、94.4、105.8 和 188.9 ng/ μ L,所有样品的

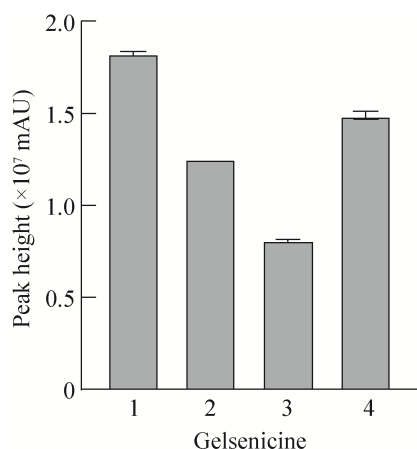


图2 钩吻不同部位中钩吻素己的相对含量 ($n=3$)

Figure 2 Relative content of gelsenicine in different parts of *Gelsemium elegans* ($n=3$). 1: Root bark; 2: Stem segments; 3: Leaves; 4: Inflorescences.

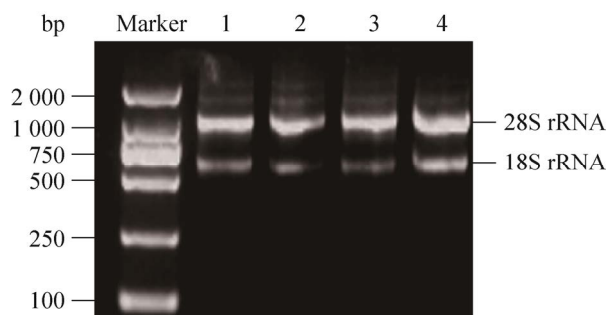


图3 钩吻不同部位总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of total RNA gene from different tissues of *Gelsemium elegans*. 1: Root bark; 2: Stem segments; 3: Leaves; 4: Inflorescences.

OD_{260}/OD_{280} 在 2.10–2.17 之间, OD_{260}/OD_{230} 在 1.60–1.85 范围内。上述结果表明,所有样品总 RNA 的完整性较好且纯度较高,可在后续实验中使用。

2.3 候选看家基因 qRT-PCR 引物特异性检验

以稀释为 5 个浓度梯度的 cDNA 为模板,采用 qRT-PCR 反应检验 10 个候选看家基因的引物特异性,根据下机数据分别获得各看家基因的标准曲线。结果显示(表 2),10 个看家基因的相关系数 R^2 均大于 0.99,引物的扩增效率均介于 0.86%–1.09% 之间,熔解曲线均为单一熔解峰(图 4),且曲线平滑,没有引物二聚体的存在。上述结果表明,cDNA 模板量与对应的 C_t 值呈现较好的线性关系,从低浓度至高浓度,对应 C_t 值均逐渐减小,符合表达规律;且各候选基因的引物特异性强,同一样品重复性好,可展开后续实验。

2.4 候选看家基因表达丰度分析

对 10 个候选看家基因以不同部位的 cDNA 为模板进行 qPCR 实验,得到的 C_t 值可直接反映各候选基因在各部位的表达丰度,且 C_t 值越小,

反映出的基因表达丰度越高。结果显示(图 5), 所有样品的 C_t 值均在 16.65–25.18 的区间内。其中, *EF1- α* 的平均 C_t 值最小, 所有 C_t 值处于 16.65–18.11 的范围内, 说明候选基因 *EF1- α* 在各部位的表达丰度最高; *SAND* 的平均 C_t 值最大, 所有 C_t 值介于 24.14–25.18 之间, 说明候选基因 *SAND* 在各部位的表达丰度最低。

2.5 候选看家基因稳定性分析

2.5.1 GeNorm 分析

GeNorm 程序在使用前, 先将所得下机数据 C_t 值转化为 Q 值, 得到相对表达量。该程序是通过候选看家基因的平均稳定指数 M 值的计算, 评价各候选基因的稳定性, M 值的默认稳定性界线为 $M=1.5$, 且越低于 1.5, 候选看家基因越稳定^[39], 反之则越不稳定, 由此可判断各候选基因在钩吻不同部位的表达稳定

性。GeNorm 软件分析结果显示(图 6), 在钩吻的 4 个部位中, 10 个候选看家基因的表达稳定性排序为 *Actin=UBC>UBQ>EF1- α >SAND>GAPDH>cdc25>TUA>18S>TUB*。所有候选基因的 M 值均小于 1.5, 说明所有候选基因在 4 个不同部位中均表达稳定, 其中 *Actin* 和 *UBC* 的稳定性最好, *TUB* 的稳定性最差。因此, 还需要通过 GeNorm 程序计算变异值 ($V_{n/n+1}$) 以便确定最佳的看家基因数目。当 $V_{n/n+1}<0.15$ 时, 最适看家基因数达 n 个, 反之则需要 $n+1$ 个。如图 7 所示, $V_{2/3}$ 的比值小于 0.15, 说明对于钩吻的不同部位, 看家基因数目最佳为 2 个。

2.5.2 NormFinder 分析

NormFinder 程序同 GeNorm 程序分析相似, 在使用前需将 C_t 值转化为 Q 值, 再通过

表 2 钩吻 10 个候选看家基因 qRT-PCR 的引物序列和扩增系数

Table 2 Primer sequence and amplification parameters for 10 candidate housekeeping genes of *Gelsemium elegans*

Gene name	Genes full name	Primer sequence	Slope (k)	Amplification parameters (%)	Correlation coefficient (R^2)
<i>18S</i>	18S ribosomal RNA	F: GATGGAGTCCCGAAGTTGC R: TCCAGATCGCATGGCATTAG	-3.13	1.09	0.993 01
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: AAGGGTGGTGCCAAGAAGG R: CAGTGGGAACACGGAAAGC	-3.41	0.96	0.993 99
<i>Actin</i>	Actin	F: GTTGCCAGAAAGTCCTATT R: TTCCTGTGGACGATTGATG	-3.72	0.86	0.996 31
<i>TUA</i>	α -tubulin	F: ATGAAGTTAGAACAGGGACA R: CAAGCAGGGAGTGAGTAGA	-3.35	0.99	0.997 83
<i>TUB</i>	β -tubulin	F: TGTCCGTAAAGAAGCCGAGAA R: CAGGGAACGAAGGCAACA	-3.56	0.91	0.999 24
<i>SAND</i>	SAND family protein	F: CATCCGACCCACCTACCGT R: ACTCTGCCAACTCCGCTCC	-3.17	1.07	0.995 90
<i>EF1-α</i>	Elongation factor 1 α	F: AAGCCACTCCGTCTCCACT R: TCGGCAAACCTGACAGCAATA	-3.59	0.90	0.996 35
<i>UBC</i>	Ubiquitin C	F: CAAAGGTGGTGAGGAGGAT R: ACAGAGCAGCGACTGAATG	-3.48	0.94	0.990 54
<i>UBQ</i>	Polyubiquitin	F: CCCTGACTGGGAAGACAAT R: AGACGGAGGACGAGGTGAA	-3.29	1.01	0.997 95
<i>cdc25</i>	Cell division cyclin 25 homolog C	F: CAGGGATGACGAAAGGAGT R: CGCAATGGAAAACAAGAGT	-3.47	0.94	0.990 78

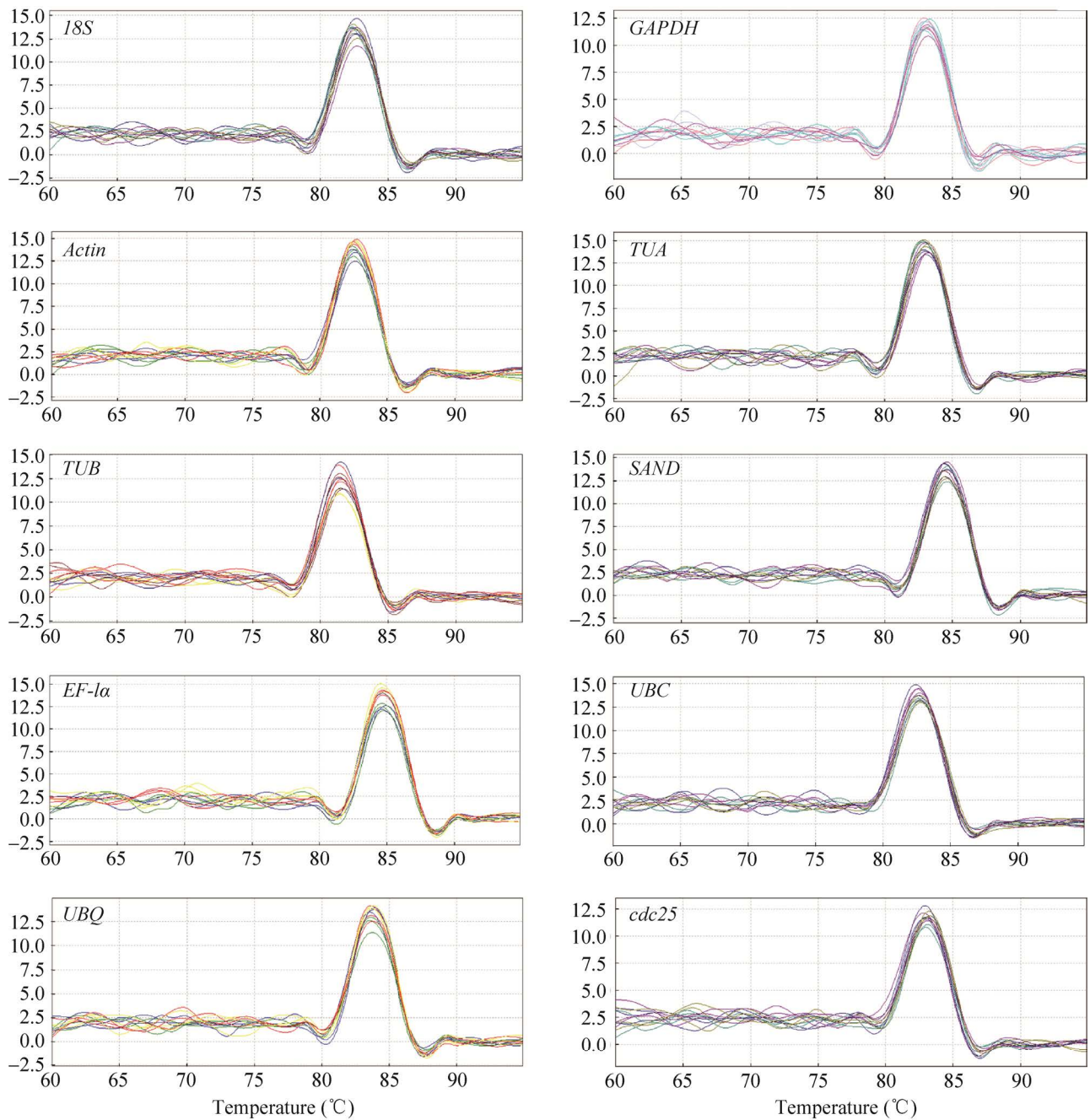


图 4 10 个候选看家基因的 qRT-PCR 引物的熔解曲线

Figure 4 Melting curves of qRT-PCR primers for 10 candidate housekeeping genes.

该程序计算得到 10 个候选看家基因的表达稳定值 M ，得到候选基因在不同部位的稳定性变化，且 M 值越小，基因表达稳定性越高。结果表明(图 8)，10 个候选看家基因的稳定

性依次是： $EF1-\alpha > Actin > UBQ > SAND > UBC > GAPDH > TUA > cdc25 > 18S > TUB$ 。其中， $EF1-\alpha$ 的 M 值最小，即稳定性最佳； TUB 的 M 值最大，即稳定性最差。

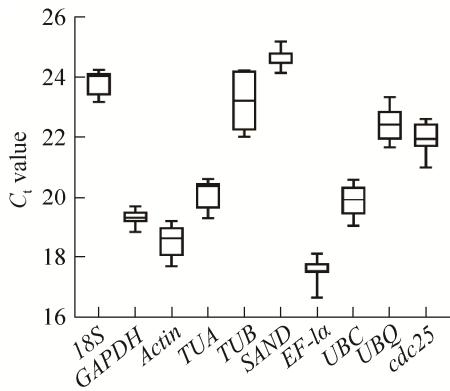


图5 10个看家基因的 C_t 值分布箱线图
Figure 5 C_t value distribution box-plot of 10 candidate housekeeping genes.

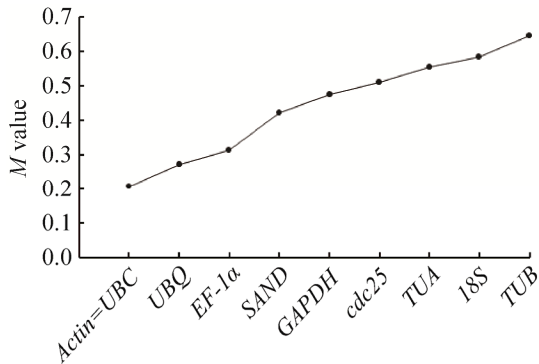


图6 10个候选看家基因的 GeNorm 稳定性分析
Figure 6 GeNorm stability analysis of 10 candidate housekeeping genes.

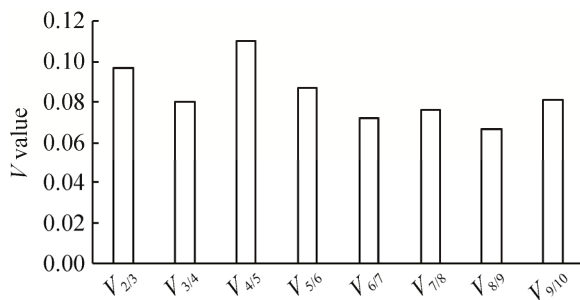


图7 GeNorm 看家基因标准化因子配对变异值分析($V_{n/n+1}$)
Figure 7 Standardization factor paired variation ($V_{n/n+1}$) of housekeeping genes according to GeNorm.

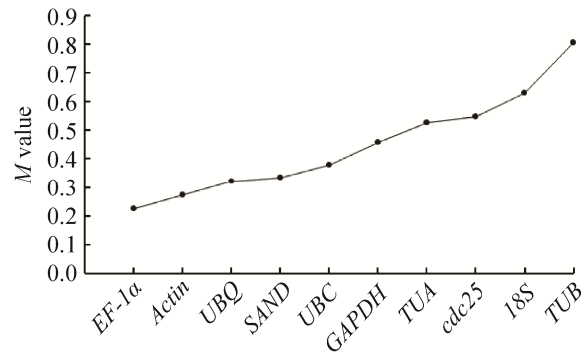


图8 10个候选看家基因的 NormFinder 稳定性分析

Figure 8 NormFinder stability analysis of 10 candidate housekeeping genes.

2.5.3 BestKeeper 分析

BestKeeper 程序可直接输入候选看家基因的 C_t 值分析计算,筛选出表达稳定性好的候选基因。通过输入各候选基因在不同部位的 CP (crossing point) (3次技术重复所得 C_t 值的几何平均数),计算得出各候选基因的标准偏差(SD)和变异系数(CV)^[40],以此分析候选看家基因的表达稳定性。该程序默认 $SD=1$ 为稳定性界线,SD 越小,表明基因的表达越稳定,若 $SD>1$,则该基因表达稳定性较差;CV 反映的是候选看家基因在不同部位中表达水平的变异程度,CV 越小,变异程度越小^[14]。结果显示(图 9),SD 值的大小排序为: $GAPDH<SAND<EF1-\alpha<18S<cdc25<Actin<TUA<UBC<UBQ<TUB$,说明 $GAPDH$ 的表达稳定性较好, TUB 的表达稳定性差;而 CV 值最小的是 $SAND$,其次依次是 $GAPDH$ 、 $18S$ 、 $EF1-\alpha$ 、 $cdc25$ 、 $Actin$ 、 TUA 、 UBC 、 UBQ ,而 TUB 的 CV 值最大,说明 $SAND$ 在不同部位的表达水平变异程度最小, TUB 的变异程度最大。综合 BestKeeper 程序计算的所有数据显示,在钩吻不同部位中表达最稳定的候选基因为 $GAPDH$,然后依次是 $SAND$ 和 $EF1-\alpha$ 。

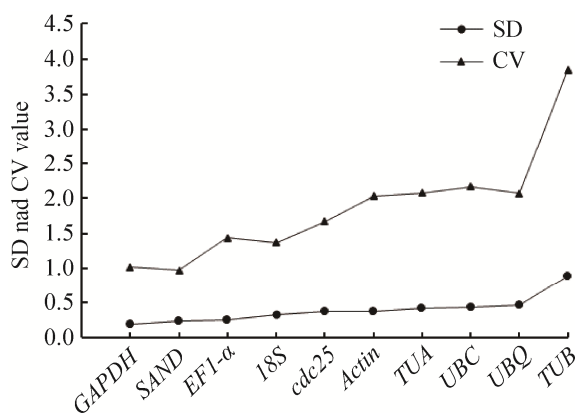


图9 BestKeeper分析10个候选看家基因表达的稳定性

Figure 9 Expression stability of 10 candidate housekeeping genes analyzed by BestKeeper.

2.5.4 Δ CT 分析

评估候选看家基因的表达稳定性，可以通过计算各候选基因 C_t 值的平均标准偏差来分析。平均标准偏差越小，基因在不同部位的表达越稳定。 Δ CT 分析结果显示(图 10)，在钩吻的 4 个部位中，10 个候选看家基因的稳定性依次为： $EF1-\alpha > Actin > UBQ > UBC = SAND > GAPDH > cdc25 = TUA > 18S > TUB$ 。表明 $EF1-\alpha$ 和 $Actin$ 的平均标准偏差最小，这 2 个基因在 4 个部位的表达最稳定，而 TUB 的表达稳定性最差。

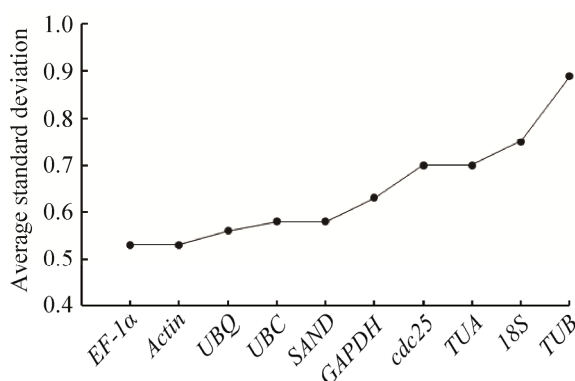


图10 10个候选看家基因的 Δ CT稳定性分析

Figure 10 Δ CT stability analysis of 10 candidate housekeeping genes.

2.5.5 RefFinder 综合稳定性分析

RefFinder 在线网站能够综合 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 及 Δ CT4 个程序的稳定性评价结果进行评估，是基于对这 4 个程序的稳定性结果采取适当的权重分配，并通过计算几何平均数，得到基因表达稳定性的综合排名和指数^[41]的一种方法。使用 RefFinder 网站，可以避免单个程序分析的片面性，对所有候选的看家基因进行全面地分析，且候选基因排名越靠前、指数越小，表达稳定性越好。RefFinder 综合分析结果显示，10 个候选看家基因的稳定性排序为 $EF1-\alpha (1.86) > Actin (2.21) > UBC (3.56) > SAND (3.76) > GAPDH (3.83) > UBQ (3.95) > cdc25 (6.65) > 18S (7.35) > TUA (7.48) > TUB (10.00)$ 。由此表明， $EF1-\alpha$ 的表达稳定性最佳， TUB 的表达稳定性最差。因此， $EF1-\alpha$ 的表达水平及稳定性最佳，可以作为 qRT-PCR 实验下对于钩吻不同部位的理想看家基因。

2.6 钩吻生物碱上游途径相关酶基因表达分析

通过“基因组+转录组+代谢组”共表达关联分析方法筛选出钩吻生物碱上游途径相关候选基因，该方法对于多基因或超基因家族候选序列的筛选具有很高的预见性，可以更加精准地对重点序列进行研究。以 $PRAI$ 基因为例(图 11)，从基因组中共鉴定了 9 条 $PRAI$ 候选基因序列，通过转录组、代谢组共表达分析，发现有 4 条序列与钩吻素己的含量聚为一类，分别为 contig5.924、contig29.88、contig22.428 以及 contig9.18，其中挑选了 contig5.924 作为重点候选序列进行了 qRT-PCR 分析。以此类推，采用该模式对途径中其他 17 类基因进行了筛选，这样能有效缩小基因功能验证的范围、提高了筛选效率，这类筛选方法在本课题组前期研究罗汉果 CYP450 和糖基转移酶超基因家族中获得了较好的验证^[42-44]。在钩

吻不同部位中,以 *EF1- α* 为看家基因,对钩吻素己生物合成上游途径中的相关酶基因进行了表达模式分析。结果依次为色胺途径上的邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase, *AS*, 图 12A)、邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶(anthranilate phosphoribosyltransferase, *AnPRT*, 图 12B)、磷酸核糖邻氨基苯甲酸转移酶(phosphoribosylanthranilate isomerase, *PRAI*, 图 12C)、吲哚-3-甘油磷酸合酶(indole-3-glycerol phosphate synthase, *IGPS*, 图 12D)、色氨酸合成酶 α 链(tryptophan synthase alpha chain, *TSA*, 图 12E)、色氨酸合成酶 β 链(tryptophan synthase beta chain *TSB*, 图 12F)、色氨酸脱羧酶(l-tryptophan decarboxylase, *TDC*, 图 12G); 环烯醚萜途径中的香叶醇合酶(geraniol synthase, *GES*, 图 12H)、

香叶醇 8-羟化酶(geraniol 8-hydroxylase, *G8H*, 图 12I)、8-羟香叶醇脱氢酶(8-hydroxygeraniol dehydrogenase, *8-HGO*, 图 12J)、环烯醚萜合酶[(S)-8-oxocitronellyl enol synthase, *IS*, 图 12K]、7-去氧番木鳖酸合成酶(7-deoxyloganetic acid synthase, *7-DLS*, 图 12L)、7-去氧番木鳖酸葡萄糖转移酶(7-deoxyloganetic acid glucosyltransferase, *7-DLGT*, 图 12M)、7-去氧番木鳖酸羟化酶(7-deoxyloganate 7-hydroxylase, *7-DLH*, 图 12N)、番木鳖酸甲基转移酶(loganate methyltransferase, *LAMT*, 图 12O)、裂环马钱子苷合成酶(secologanin synthase, *SLS*, 图 12P); 还有吲哚生物碱途径上的异胡豆苷合成酶(strictosidine synthase, *STR*, 图 12Q)及异胡豆苷 β -D-葡萄糖苷酶(strictosidine- β -D-glucosidase, *SGD*, 图 12R)。

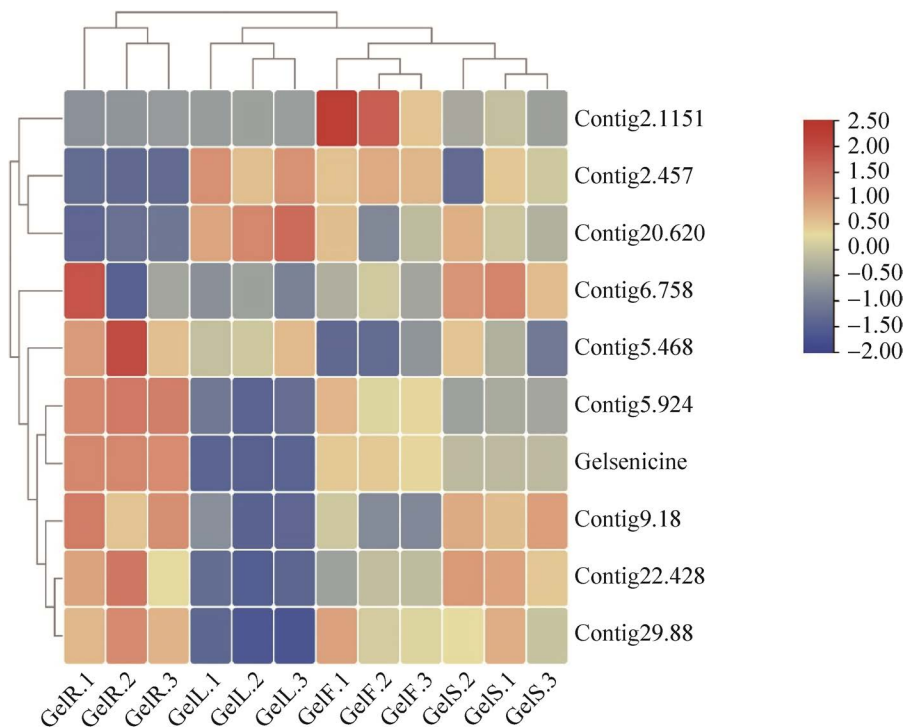


图 11 磷酸核糖邻氨基苯甲酸转移酶(*PRAI*)基因筛选热图

Figure 11 Screening of phosphoribosylanthranilate isomerase synthase (*PRAI*) gene heatmap. GelR: Root bark of *G. elegans*; GelS: Stem segments of *G. elegans*; GelL: Leaves of *G. elegans*; GelF: Inflorescences of *G. elegans*.

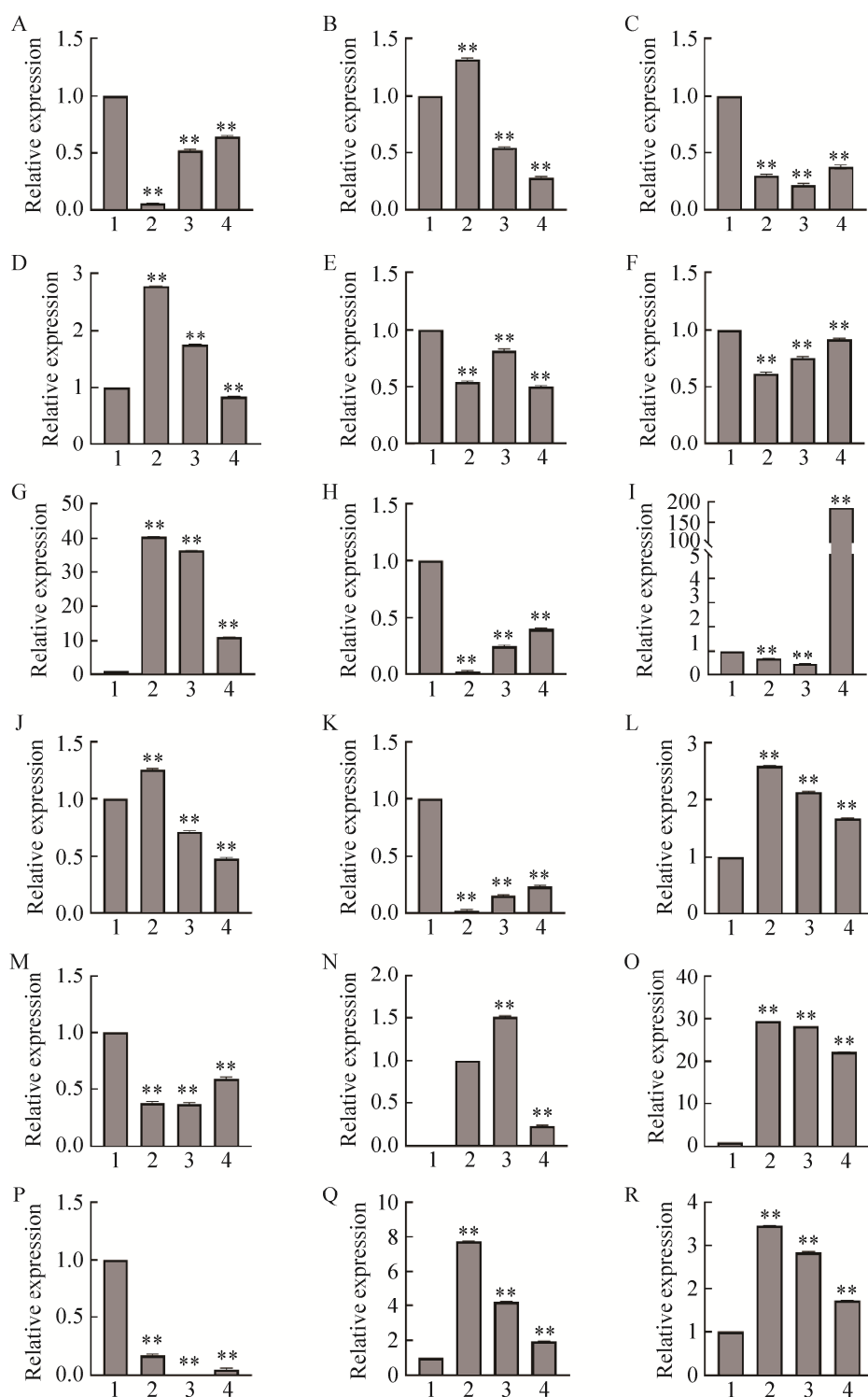


图 12 以 *EF-1α* 为看家基因时钩吻素己生物合成已知上游途径中相关基因表达模式分析

Figure 12 Analysis of the expression pattern of related genes in the known upstream pathway of gelsenicine biosynthesis using *EF-1α* as a housekeeping gene (**: $P < 0.01$). A: *AS*. B: *AnPRT*. C: *PRAI*. D: *IGPS*. E: *TSA*. F: *TSB*. G: *TDC*. H: *GES*. I: *G8H*. J: *8-HGO*. K: *IS*. L: *7-DLS*. M: *7-DLGT*. N: *7-DLH*. O: *LAMT*. P: *SLS*. Q: *STR*. R: *SGD*. 1: Root bark; 2: Stem segments; 3: Leaves; 4: Inflorescences.

实验结果表明, 这些基因大部分表达模式与全长转录组的表达模式一致, 说明了全长转录组测序结果比较准确。其中 *AS*、*PRAI*、*TSB*、*GES*、*IS*、*7-DLGT* 及 *SLS* 基因的表达模式与钩吻素己含量变化趋势基本一致, 在根皮和花序 2 个部位的表达量较高, 在茎段和叶片中的表达量较低, 尤其是 *AS*、*GES* 和 *IS* 在茎段的表达量极低; *IGPS*、*TDC*、*7-DLS*、*7-DLH*、*LAMT*、*STR* 及 *SGD* 基因的表达模式相类似, 均为在茎段和叶片中的表达量高, 在根皮和花序中的表达量低, 且 *7-DLH* 基因在钩吻根皮中不表达; *AnPRT* 和 *8-HGO* 基因表达模式一致, 均为茎段表达量最高, 根皮和叶片次之, 花序中表达量最低; *TSA* 基因主要在根皮中表达, 其次为叶片, 在茎段和花序中表达量相差较小; *G8H* 基因在花序中的表达量很高, 在其他 3 个部位中微量表达甚至不表达。在钩吻次生代谢物的累积过程中, 这些酶通过影响途径上各代谢产物的含量与合成, 进一步直接影响到终产物的积累。

3 讨论与结论

看家基因是一种在不同发育时期和不同环境下能够稳定表达的一种基因, 通常都与细胞的基础活动相关, 比如 *Actin* 基因与细胞结构相关, *cdc25* 基因与细胞周期的调控相关等^[45]。近年来, 国内外很多学者基于 qRT-PCR 技术对不同植物的看家基因进行了研究, 并发现在不同植物或同一植物不同组织部位、不同发育时期和其他非生物胁迫处理中, 其看家基因的种类和表达水平具有差异性^[39], 所以通常看家基因并不在所有植物中通用, 需要进一步研究确定不同处理情况下的最佳看家基因。qRT-PCR 技术作为表达模式分析的一种重要手段, 筛选合适的看家基因对 qRT-PCR 技术实验结果进行校正是非常有必要的, 能够提高结果的准确性

和可靠性。例如, *UBQ2* 和 *EF1- α* 基因不仅是茅苍术在正常条件下表达较稳定的基因, 同时 *EF1- α* 基因也是茅苍术在干旱胁迫下稳定性最佳的看家基因^[46]; *Actin1* 基因是瓜儿豆在干旱胁迫条件下稳定表达的看家基因^[47]; *18S*、*ACT* 和 *TUA* 基因均可作为岗梅基因研究的理想看家基因^[48]。

本研究共选取了为 10 个植物中较为普遍的候选看家基因 *18S*、*GAPDH*、*Actin*、*TUA*、*TUB*、*SAND*、*EF-1 α* 、*UBC*、*UBQ* 和 *cdc25*, 在 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 Δ CT 4 个程序不同的算法评价下, 结合 RefFinder 网站的综合分析, 评估候选看家基因分别在钩吻 4 个不同部位(根皮、茎段、叶片和花序)中的表达稳定性。根据结果显示, 5 个软件分析所得结果基本一致, 但仍存在差异性: 在钩吻的不同部位中, 经 GeNorm 分析得出, *Actin* 和 *UBC* 的稳定性最好; 经由 NormFinder 和 Δ CT 分析下, *EF-1 α* 是候选基因中表达水平最稳定的; 通过 BestKeeper 分析, 基因 *GAPDH* 的稳定性最佳, 变异程度较小, 其次其后的 *SAND* 变异程度最小; 而通过 RefFinder 网站综合其他 4 个程序的分析结果得到一个稳定性排名, 发现 *EF-1 α* 是在钩吻不同部位中最适的看家基因。综合 5 个程序的分析得出, 更适合作为钩吻在不同部位 qRT-PCR 实验中的看家基因是 *EF-1 α* 。

钩吻作为马钱子科的植物, 其主要的活性成分钩吻生物碱作为一种吲哚类生物碱, 在生物合成过程中与色胺途径和环烯醚萜途径两个已知途径相关。实验结果中, *AS*、*TSB*、*TSA*、*GES*、*G8H*、*IS*、*7-DLGT* 及 *SLS* 基因在钩吻 4 个部位的表达水平同钩吻素己在不同部位的相对含量趋势基本一致, 表明以上 8 个基因可能参与钩吻素己的生物合成。同时, 经研究发

现, 8-HGO、7-DLS、7-DLGT 以及 7-DLH 均在植物韧皮部表皮细胞内表达^[25], 这与实验结果中基因均在茎段有较高的表达量一致; 马钱子酸会从植物的韧皮部转移至叶面的表皮细胞^[49], 实验结果显示, 其中相关的 *SLS*、*LAMT*、*STR* 基因在茎段和叶片中有较高的表达量, 这可能与茎段细胞富含韧皮部、叶面表皮细胞存在于叶片相关联; 色胺途径中的酶均被定位于叶绿体中, 这与相关的酶基因在钩吻叶片中均有表达的实验结果一致, 包括 *AS*、*AnPRT*、*PRAI*、*TSA*、*TSB*、*IGPS* 和 *TDC* 基因, *AS* 基因在不同的植物中具有组织特异性^[50], 所以在根皮的表达量偏高可能和代谢终产物的大量积累有关; *TDC* 基因被证实在萝芙木^[51]和喜树的所有部位均有表达, 且在喜树中的茎段和叶片中表达明显, 在根部的表达极其微弱, 而这与实验中 *TDC* 的表达水平一致^[25]; *SGD* 基因被证实在萝芙木的根、茎段、叶中均有表达, 且茎段和叶片的表达量较高, 这与实验中 *SGD* 基因在茎段和叶片中的表达量较高一致; 而 *PRAI* 基因主要在根皮中表达, 依次是花序、茎段, 叶片中的表达量最低, 这与钩吻素已在根皮中的含量最高, 花序和茎段次之, 而叶片中含量最低的趋势一致, 这说明这条基因很可能是钩吻生物碱合成途径上的 *PRAI* 候选基因之一。

本研究筛选出 *EF-1a* 为钩吻在不同部位 qRT-PCR 分析时最佳的看家基因, 同时, 结合“基因组+全长转录组+代谢组”共表达关联分析的方式, 对钩吻生物碱已知的上游合成途径相关基因在 4 个部位的表达水平进行了研究, 为钩吻及马钱科植物其他功能基因表达模式分析及功能验证奠定了基础。

REFERENCES

[1] 刘虹虹, 梁燕妮, 陈超杰. 对广西地区钩吻生物碱成

分的含量检测分析研究[J]. 中国食品工业, 2021(S1): 116-118.

LIU HH, LIANG YN, CHEN CJ. Determination and analysis of alkaloids in *Gelsemium elegans* in Guangxi[J]. China Food Industry, 2021(S1): 116-118 (in Chinese).

[2] 赵雅婷, 武淑鹏, 胡春丽, 亢晶, 赵猛. 钩吻的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 200-210.

ZHAO YT, WU SP, HU CL, KANG J, ZHAO M. Reviews on chemical compositions and pharmacological effect of *Gelsemium elegans*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(3): 200-210 (in Chinese).

[3] 黄余贵. 对一起误用钩吻熬制凉茶造成中毒的调查研究[J]. 中国医学文摘(内科学), 2006(5): 476-477.

HUANG YG. Investigation on a case of poisoning caused by misuse of *Gelsemium hook* to boil herbal tea[J]. China Medical Abstracts (Internal Medicine), 2006(5): 476-477 (in Chinese).

[4] LI NP, LIU JS, LIU JW, TIAN HY, ZHOU HL, ZHENG YR, HUANG XJ, CAO JQ, YE WC, WANG L. Monoterpenoid indole alkaloids from the fruits of *Gelsemium elegans* and their anti-inflammatory activities[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 107: 104624.

[5] 孙铭学, 徐庆强, 孟文琪, 岑金凤, 毛冠超, 裴志鹏, 肖凯. 钩吻药理及毒理机制研究进展[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(4): 336-341.

SUN MX, XU QQ, MENG WQ, CEN JF, MAO GC, PEI ZP, XIAO K. Research progress on pharmacology and toxicological mechanism of *Gelsemium elegans*[J]. Journal of Toxicology, 2020, 34(4): 336-341 (in Chinese).

[6] Huang CY, Yang K, Cao JJ, Li YJ, Wang ZY, Yu H, Sun ZL, Zheng XF, Liu ZY. Gene expression profile analysis of ileum transcriptomes in pigs fed *Gelsemium elegans* plants[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 15756.

[7] 崔研, 孙铭学, 高焕焕, 杨玉彦, 路金才, 肖凯. 钩吻根脂溶性化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(4): 248-251, 324.

CUI Y, SUN MX, GAO HH, YANG YY, LU JC, XIAO K. Isolation and identification of the liposoluble constituents from the roots of *Gelsemium elegans* Benth[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2014, 31(4): 248-251, 324 (in Chinese).

[8] 刘艳纯, 孙志良, 刘兆颖. 钩吻中非生物碱化学成分的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(10): 55-64.

LIU YC, SUN ZL, LIU ZY. Research progress on

- non-alkaloids analysis for chemical constituents from *Gelsemium*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(10): 55-64 (in Chinese).
- [9] 王帅帅. 钩吻醇提取物抗腹泻的作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2019.
WANG SS. Study on anti-diarrhea effects of gelsegium elegans Benth extraction by ethanol[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [10] 卢靖珊. 钩吻素子盐酸盐抗糖尿病神经病理性痛的基底外侧杏仁核星形胶质细胞作用机制[D]. 福州: 福建医科大学博士学位论文, 2021.
LU JS. Effect of koumine hydrochloride on diabetic neuropathic pain and its mechanism of regulating basolateral amygdala astrocytes[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Medical University, 2021 (in Chinese).
- [11] 王鑫源, 董诚明, 杨林林, 高袁浩, 侯文川, 顾旭鹏, 侯庆峰. 地黄轮纹病实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. 中药材, 2022, 45(3): 530-535.
WANG XY, DONG CM, YANG LL, GAO YH, HOU WC, GU XP, HOU QF. Establishment and application of real-time fluorescent quantitative PCR assay for leaf ring rot of *Rehmannia glutinosa*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(3): 530-535 (in Chinese).
- [12] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611-622.
- [13] 华雅洁, 岳远征, 杨秀莲, 何卿. 海州常山叶片实时荧光定量 PCR 的内参基因选择[J]. 林业科学研究, 2022, 35(2): 194-202.
HUA YJ, YUE YZ, YANG XL, HE Q. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR in *Clerodendrum trichotomum* thunb. leaves[J]. Forest Research, 2022, 35(2): 194-202 (in Chinese).
- [14] 易小哲, 邬兰, 向丽, 王梦月, 陈士林, 师玉华, 刘霞. 艾 *Artemisia argyi* 实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 659-667.
YI XZ, WU L, XIANG L, WANG MY, CHEN SL, SHI YH, LIU X. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Artemisia argyi*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(3): 659-667 (in Chinese).
- [15] 王浩, 蔡启忠, 刘露, 杨全, 周良云. 何首乌实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(1): 80-85.
WANG H, CAI QZ, LIU L, YANG Q, ZHOU LY. Reference gene screening for Real-time quantitative PCR in *Polygonum multiflorum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(1): 80-85 (in Chinese).
- [16] 滕彦娇, 王宏鹏, 王菁, 宋文芹, 陈成彬, 张力鹏. 大花红景天内参基因筛选与 POD 基因表达分析[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1343-1349.
TENG YJ, WANG HP, WANG J, SONG WQ, CHEN CB, ZHANG LP. Study on the screen of reference genes in *Rhodiola crenulata* and the analysis of POD gene expression[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(6): 1343-1349 (in Chinese).
- [17] 杨婷, 薛珍珍, 李娜, 郎校安, 李凌飞, 钟春梅. 铁十字秋海棠斑叶发育过程内参基因筛选及验证[J]. 园艺学报, 2021, 48(11): 2251-2261.
YANG T, XUE ZZ, LI N, LANG XA, LI LF, ZHONG CM. Reference genes selection and validation in *Begonia masoniana* leaves of different developmental stages[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(11): 2251-2261 (in Chinese).
- [18] 胡骁飞, 魏凤仙. 钩吻碱在饲料养殖业中的应用前景[J]. 当代畜牧, 2003(7): 42-43.
HU XF, WEI FX. Application prospect of gelsemine in feed breeding industry[J]. Contemporary Animal Husbandry, 2003(7): 42-43 (in Chinese).
- [19] 杨梦然, 毛妍, 梁曾恩妮, 邬静, 袁志航. 钩吻素子抗炎作用研究进展[J]. 动物医学进展, 2022, 43(3): 103-106.
YANG MR, MAO Y, LIANG Z, WU J, YUAN ZH. Progress on anti-inflammatory effect of koumine[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2022, 43(3): 103-106 (in Chinese).
- [20] 唐模欢, 王千翎, 张华海, 刘兆颖. 钩吻素子和钩吻素己对轻度认知功能障碍模型小鼠的影响[J]. 动物医学进展, 2021, 42(6): 46-50.
TANG MH, WANG QX, ZHANG HH, LIU ZY. Effects of koumine and gelsenicine on mild cognitive impairment model mice[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(6): 46-50 (in Chinese).
- [21] WANG Q, QUAN S, XIAO H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2019, 6(1): 1-13.
- [22] 吴昕怡, 刘小莉. 环烯醚萜类成分生物合成途径及

- 关键酶基因研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(8): 44-48.
- WU XY, LIU XL. Progress of biosynthetic pathway and the key enzyme genes of iridoids[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2017, 26(8): 44-48 (in Chinese).
- [23] KAMRAN HM, HUSSAIN SB, SHANG JZ, XIANG L, CHEN LQ. Identification and molecular characterization of geranyl diphosphate synthase (GPPS) genes in wintersweet flower[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2020, 9(5): 666.
- [24] KUMAR SR, SHILPASHREE HB, NAGEGOWDA DA. Terpene moiety enhancement by overexpression of geranyl(geranyl) diphosphate synthase and geraniol synthase elevates monomeric and dimeric monoterpene indole alkaloids in transgenic *Catharanthus roseus*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 942.
- [25] 杨然, 方磊, 李佳, 张永清. 环烯醚萜苷类生物合成途径及相关酶的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2482-2488.
- YANG R, FANG L, LI J, ZHANG YQ. Research progress on biosynthetic pathways and related enzymes of iridoid glycosides[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(10): 2482-2488 (in Chinese).
- [26] GEU-FLORES F, SHERDEN NH, COURDAVAULT V, BURLAT V, GLENN WS, WU C, NIMS E, CUI YH, O'CONNOR SE. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis[J]. Nature, 2012, 492(7427): 138-142.
- [27] PETRONIKOULOU N, HOLLATZ AJ, SCHULER MA, NAIR SK. Loganic acid methyltransferase: insights into the specificity of methylation on an iridoid glycoside[J]. Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2018, 19(8): 784-788.
- [28] ASADA K, SALIM V, MASADA-ATSUMI S, EDMUNDS E, NAGATOSHI M, TERASAKA K, MIZUKAMI H, de LUCA V. A 7-deoxyloganic acid glucosyltransferase contributes a key step in secologanin biosynthesis in Madagascar periwinkle[J]. The Plant Cell, 2013, 25(10): 4123-4134.
- [29] QUITTENDEN LJ, DAVIES NW, SMITH JA, MOLESWORTH PP, TIVENDALE ND, ROSS JJ. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway[J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 1130-1138.
- [30] BERGER A, KOSTYAN MK, KLOSE SI, GASTEGGER M, LORBEER E, BRECKER L, SCHINNERL J. Loganic acid and secologanin derived tryptamine-iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae)[J]. Phytochemistry, 2015, 116: 162-169.
- [31] ARAFA AS, RAGAB AE, IBRAHIM AR S, ABDEL-MAGEED WS, NASR ME. Cloning and overexpression of strictosidine β -D-glucosidase gene short sequence from *Catharanthus roseus* in *Escherichia coli*[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2019, 9(4): 655-661.
- [32] LIU YS, TANG Q, CHENG P, ZHU MF, ZHANG H, LIU JZ, ZUO MT, HUANG CY, WU CQ, SUN ZL, LIU ZY. Whole-genome sequencing and analysis of the Chinese herbal plant *Gelsemium elegans*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2020, 10(2): 374-382.
- [33] ST-PIERRE J, GRÉGOIRE JC, VAILLANCOURT C. A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: the case of the placental sex[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 16923.
- [34] XU HL, LI J, WU RH, SU WC, WU XB, WANG LY, DONG LY. Identification of reference genes for studying herbicide resistance mechanisms in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*)[J]. Weed Science, 2017, 65(5): 557-566.
- [35] BAO ZZ, ZHANG KD, LIN HF, LI CJ, ZHAO XR, WU J, NIAN SH. Identification and selection of reference genes for quantitative transcript analysis in *Corydalis yanhusuo*[J]. Genes, 2020, 11(2): 130.
- [36] SILVER N, BEST S, JIANG J, THEIN SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR[J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 33.
- [37] BARROSO C, CARVALHO P, NUNES M, GONÇALVES JFM, RODRIGUES PNS, NEVES JV. The era of antimicrobial peptides: use of hepcidins to prevent or treat bacterial infections and iron disorders[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 754437.
- [38] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 李伟才, 魏永赞. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. 现代农业科技, 2017(5): 278-281.
- WU JY, HE B, DU YJ, LI WC, WEI YZ. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(5): 278-281 (in Chinese).
- [39] 覃慧娟, 范付华, 周紫晶. 激素处理下马尾松茎干组织 qPCR 内参基因的筛选[J]. 农业生物技术学报,

- 2022, 30(2): 393-401.
- QIN HJ, FAN FH, ZHOU ZJ. Screening of qPCR internal reference genes in stem tissue of *Pinus massoniana* under hormone treatment[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(2): 393-401 (in Chinese).
- [40] 杨培芳, 史红专, 郭巧生, 赵坤, 刘丽. 不同光强条件下紫花地丁 RT-qPCR 内参基因的筛选及验证[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5620-5626.
- YANG PF, SHI HZ, GUO QS, ZHAO K, LIU L. Screening and validation of RT-qPCR reference genes of *Viola yedoensis* under different light intensities[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(21): 5620-5626 (in Chinese).
- [41] 姚李祥, 潘春柳, 余丽莹, 乔柱, 唐美琼, 韦范. 草果种子休眠解除过程中 qRT-PCR 内参基因筛选[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(15): 3832-3837.
- YAO LX, PAN CL, YU LY, QIAO Z, TANG MQ, WEI F. Selection of qRT-PCR reference genes for *Amomum tsaoko* seeds during dormancy release[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(15): 3832-3837 (in Chinese).
- [42] TANG Q, MA XJ, MO CM, WILSON IW, SONG C, ZHAO H, YANG YF, FU W, QIU DY. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 343.
- [43] DAI LH, LIU C, ZHU YM, ZHANG JS, MEN Y, ZENG Y, SUN YX. Functional characterization of cucurbitadienol synthase and triterpene glycosyltransferase involved in biosynthesis of mogrosides from *Siraitia grosvenorii*[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(6): 1172-1182.
- [44] ZHANG JS, DAI LH, YANG JG, LIU C, MEN Y, ZENG Y, CAI Y, ZHU YM, SUN YX. Oxidation of cucurbitadienol catalyzed by CYP87D18 in the biosynthesis of mogrosides from *Siraitia grosvenorii*[J]. Plant and Cell Physiology, 2016, 57(5): 1000-1007.
- [45] MORIYA H, SHIMIZU-YOSHIDA Y, KITANO H. *In vivo* robustness analysis of cell division cycle genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS Genetics, 2006, 2(7): e111.
- [46] 桑晓华, 谷巍, 巢建国, 刘青芝, 蒋玲, 韩赞, 周乐章. 茅苍术内参基因筛选及其在活性成分生物合成研究中的应用[J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1680-1686.
- SANG XH, GU W, CHAO JG, LIU QZ, JIANG L, HAN Y, ZHOU YZ. Selection of reference genes of *Atractylodes lancea* and its application in biosynthesis of active ingredients[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(9): 1680-1686 (in Chinese).
- [47] PATEL SAMARTH R, FOGAT RANBIR S, SUSHIL K, SAKURE AMAR A, POONAM P, ARUNYANARK A, JOGLOY S, AKKASAENG C, VORASOOT N, KESMAIA T, NAGESWARA RAO RC, PATANOTHAI A, BAJJI M, KINET JM, LUTTS S, BARR HD, WEATHERLY PE, BARSALOBRES CAVALLARI CF, SEVERINO FE, MALUF MP, et al. Evaluation of housekeeping genes for gene expression study in cluster bean under drought stress[J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2021, 81(2): 307-318.
- [48] 郑夏生, 叶国兵, 纪晓宇, 温羚玲, 徐晖, 詹若挺, 陈蔚文. 岗梅实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 热带作物学报, 2015, 36(6): 1119-1124.
- ZHENG XS, YE GB, JI XY, WEN LL, XU H, ZHAN RT, CHEN WW. Selection of reference gene for real-time PCR study in *Ilex asprella*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(6): 1119-1124 (in Chinese).
- [49] BURLAT V, OUDIN A, COURTOIS M, RIDEAU M, ST-PIERRE B. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2004, 38(1): 131-141.
- [50] 钱旭, 于可济, 袁冠绅, 杨航宇, 潘秋红, 朱保庆. 植物中邻氨基苯甲酸合成酶的研究进展[J]. 热带生物学报, 2015, 6(4): 504-511.
- QIAN X, YU KJ, YUAN GS, YANG HY, PAN QH, ZHU BQ. Research progress in plant anthranilate synthase[J]. Journal of Tropical Biology, 2015, 6(4): 504-511 (in Chinese).
- [51] 许宏宣, 常凯, 马丽利, 郑月, 刘小强. 萝芙木异胡豆苷- β -D-葡萄糖苷酶(SGD)基因的克隆与分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(19): 10006-10010.
- XU HX, CHANG K, MA LL, ZHENG Y, LIU XQ. Cloning and characterization of the strictosidine- β -D-glucosidase (SGD) gene from *Rauvolfia verticillata*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(19): 10006-10010 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)