

文章编号: 1000-0615(2017)07-1064-09

DOI: 10.11964/jfc.20160810518

高光胁迫下坛紫菜定量PCR内参基因的筛选

昌 晶, 陈陆丹, 徐 燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了筛选不同高光光强胁迫下坛紫菜中表达水平最为稳定的内参基因, 本研究采用qRT-PCR技术测定了植物中常用的6种内参基因*UBC*、*TUB*、*18S*、*EF2*、*ACT*和*GAPDH*在不同光照强度下培养的坛紫菜藻体中的绝对表达水平, 并采用比较Ct值法、GeNorm、Bestkeeper和NormFinder软件分析4种方法对6种候选内参基因的表达稳定性进行评估。结果显示, *UBC*的Ct值变化范围最小, *18S*的Ct值变化范围最大; geNorm软件分析结果显示最稳定的内参基因为*UBC*和*EF2*; Bestkeeper和NormFinder软件分析结果类似, *UBC*基因的稳定性M均为最低值(分别为0.044和0.80), 说明其表达水平最稳定。研究表明, *UBC*基因可以作为不同光照条件下坛紫菜基因表达qRT-PCR分析的最适内参基因。

关键词: 坛紫菜; 高光胁迫; 内参基因; qRT-PCR

中图分类号: Q 785; S 968.4

文献标志码: A

实时荧光定量PCR(real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR), 是指在PCR反应中加入荧光基团, 通过监测荧光信号的变化实现实时定量的技术, 因具有快速、定量准确、灵敏度高、重复性好等诸多优点, 使其成为分子生物学中基因表达定量研究的重要工具之一^[1]。采用qRT-PCR检测基因表达时, 不同样本在RNA质量、逆转录效率及加样过程中均可能存在一定的差异, 为了得到目的基因表达的正确情况, 通常会使用内参基因进行校正和标准化^[2]。因此, 内参基因的选择是否恰当, 会影响实验结果的准确性。越来越多的研究显示qRT-PCR分析中, 不同的实验材料和条件所需的内参基因也不尽相同^[3-4]。因此在进行qRT-PCR分析时, 结合实际实验材料和条件对候选内参基因进行表达稳定性评估是实验结果可靠性的保证。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国特有的暖温带性大型红藻, 也是浙江南部、福建和广东北部沿海广泛栽培的经济物种。与冷水性的条斑紫菜(*P. yezoensis*)相比, 坛紫菜具有更高的生

长适温、更快的生长速率和更高的产量, 具有重要的经济价值。坛紫菜叶状体生长在海陆交错的中高潮区的礁石上, 潮汐的变化导致坛紫菜的栖息环境发生剧烈变化, 使其需要经历高温、强光、紫外辐射、失水和高低盐等复杂的逆境考验, 从而形成独特的抗逆功能^[5]。对于紫菜内参基因的研究, 邵惠等^[6]分析了条斑紫菜在不同温度、光照和失水胁迫下以及不同发育世代中进行qRT-PCR分析的最适内参基因; 随后Wang等^[7]也对条斑紫菜在不同盐度、温度和光强下进行qRT-PCR分析的最适内参基因进行了筛选; Wu等^[8]研究了坛紫菜在不同发育世代中qRT-PCR分析的最适内参基因; Li等^[9]也对坛紫菜不同品系、发育时代、胁迫和盐度条件下qRT-PCR分析的最适内参基因进行了筛选, 但是截至目前尚没有关于坛紫菜在高光强胁迫下qRT-PCR分析最适内参基因的报道。因此, 本实验采用qRT-PCR对6个常用的内参基因18S核糖体RNA基因(18S), 延伸因子基因(*EF2*), 肌动蛋白基因(*ACT*), 细胞骨架微管蛋白基因(*TUB*), 甘油-3-磷

收稿日期: 2016-08-27 修回日期: 2017-01-12

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A411); 国家自然科学基金(41276177); 福建省自然科学基金(2014J05041, 2014J07006)

通信作者: 谢潮添, E-mail: Ctxie@jmu.edu.cn

酸脱氢酶基因(*GAPDH*)及泛素连接酶基因(*UBC*)在不同光照强度下培养的坛紫菜藻体中的表达水平进行绝对定量分析, 并利用比较Ct值法、geNorm、Bestkeeper和NormFinder软件对各候选内参基因在不同光照强度下的表达稳定性进行统计学分析, 以筛选出最适的内参基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验供试材料为人工选育的坛紫菜Z-61品系, 取自福建省坛紫菜种质资源库。Z-61品系由采自福建平潭的野生坛紫菜(母本)和经诱变选育的成熟时间晚、藻体细长的坛紫菜品系7-I(父本)杂交选育而得。该品系紫菜具有藻体薄、生长速率快、抗逆性强等优点。

正常培养条件: 温度(21±1) °C, 光照强度50~60 μmol/(m²·s), 昼夜光周期为12L:12D, 每3 d更换1次新鲜培养液。

高光胁迫处理: 取正常条件下培养的长度为(20±2) cm的健康藻体(NL), 置于200 μmol/(m²·s)光强下充气培养1 h(HL1), 随后转入500 μmol/(m²·s)光强下充气培养1 h(HL2), 继而再转入1000 μmol/(m²·s)光强下继续充气培养1 h(HL3)和3 h(HL4), 整个高光胁迫处理过程中温度维持(21±1) °C。在培养过程的每个节点(NL、HL1、HL2、HL3、HL4)分别取样, 每个胁迫处理均设置3个生物学重复。

1.2 内参基因及其引物序列

6个候选内参基因引物的设计参照Li等^[9]的方法, 序列如表1所示, 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 候选内参基因及其定量引物序列

Tab. 1 Candidate internal control genes and sequence of their primers

引物名称 primers name	基因描述 gene description	引物序列(5'-3') sequence	扩增长度/bp product size
<i>Ph18S</i>	18S ribosomal RNA	F: TGGAGGGCAAGTCTGGTGA R: CCGACAATTAGAAAGTGTATGATGG	229
<i>PhTUB</i>	beta-tubulin	F: TGCAGGGCTTCCAGGTGAC R: CCGCATCCGCATTCTCCAC	207
<i>PhACT</i>	actin	F: CGAGCATCCCTGCCTGTT R: CCGAATCCACCACAATCCC	170
<i>PhGAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GCCATCTGCATCGCCTATTG R: CCGTGCTGCCGACAAAC	156
<i>PhEF2</i>	elongation factor2	F: CTGTCCAAGAGTGCGAACAAG R: CTCGTCCATGCCATACTCGT	136
<i>PhUBC</i>	ubiquitin conjugating enzyme	F: TCACAACGAGGATTTACCACC R: GAGGAGCACCTTGAAACG	107

1.3 RNA提取及cDNA合成

收集“实验材料”中各处理节点的坛紫菜藻体0.1 g, 滤纸吸干后液氮研磨, 采用E.Z.N.A植物RNA提取试剂盒(OMEGA, 德国)提取各样品的总RNA。经凝胶电泳检查所提取总RNA的完整性, 并在Multiskan GO 3.2全波长酶标仪上分别测定OD260和OD280值, 根据测定结果计算RNA的浓度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。随后, 以提取的各样品RNA为模板, 采用TaKaRa公司提供PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒将其反转录成cDNA, 于-20 °C保存备用。

1.4 目的基因片段的普通PCR扩增

25 μL的普通PCR扩增体系中包含cDNA 1.0 μL,

PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.5 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.5 μL, 2×Taq PCR Master Mix (TIANGEN) 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR扩增反应条件: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性35 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min, 扩增完成后用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 标准曲线的绘制及基因扩增效率

采用DNA纯化回收试剂盒(TIANGEN)对PCR产物进行回收纯化, 并将回收片段与PMD[®]19-T VeCtor (TaKaRa)连接, 然后转化大肠杆菌DH5α感受态细胞(TIANGEN)。采用质粒小提试剂盒(TIANGEN, 离心柱型)提取质粒DNA, 并用Multiskan GO 3.2全波长酶标仪测定质粒DNA的浓

度, 该质粒DNA即作为绝对定量标准品。标准品的拷贝数计算公式:

$$\text{拷贝数} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{拷贝/mol}) \times \text{DNA 数量 (g)}}{\text{DNA 长度 (bp)} \times 660 (\text{g/mol} \cdot \text{bp})}$$

采用ABI7300型荧光定量PCR仪进行qRT-PCR扩增, 将扩增得到的Ct值与目的基因拷贝数的对数值建立标准曲线, 10倍梯度稀释的标准品、待测样品以及空白对照同时进行qRT-PCR反应, 且每组样品进行3次生物学重复。同时利用公式 $E(\%) = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ 计算基因的扩增效率。

1.6 候选内参基因表达水平的qRT-PCR分析

采用ABI7300型荧光定量PCR仪进行各内参基因表达水平测定, 20 μL 的qRT-PCR反应体系包括SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 \times) 10 μL , ROX Reference Dye (50 \times) 0.4 μL , cDNA 2 μL , PCR Forward Primer (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , PCR Reverse Primer (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , ddH₂O 6.8 μL , 每个实验组设置3个生物学重复和2个技术性重复。qRT-PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 40个循环; 循环结束后, 从55 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢升温至95 $^{\circ}\text{C}$, 绘制熔解曲线。

1.7 数据分析

根据qRT-PCR定量分析结果, 利用比较Ct值法、geNorm、Bestkeeper和NormFinder软件对各候选内参基因在不同程度高光胁迫下的表达稳定性进行统计学分析, 从而筛选出最优的内参基因。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因的普通PCR扩增、标准曲线绘制及引物的扩增效率

以不同光照强度下培养的坛紫菜叶状体的总RNA反转录成的cDNA为模板进行普通PCR扩增, 以1%的琼脂糖电泳检测。结果如图1所示, 各候选内参基因引物扩增的目标片段与预期大小一致, 且条带清晰、无杂带和引物二聚体, 表明各候选内参基因引物特异性较好, 可用于qRT-PCR分析。

将各基因片段切胶回收后转入质粒进行基因克隆, 提取质粒并测定浓度后作为标准品, 计算质粒的拷贝数。然后将质粒以10倍做梯度稀

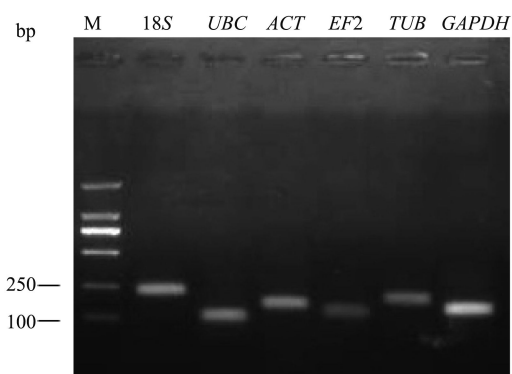


图1 各候选内参基因引物的的特异性

Fig. 1 Primers specific of each candidate internal control gene

M: Marker DL2000

释绘制标准曲线, 并根据标准曲线的斜率值和计算公式 $E(\%) = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ 计算获得各候选内参基因引物的扩增效率为95.5%~104.1%(图2)。

2.2 候选内参基因的qRT-PCR分析及绝对表达量

以各处理节点的cDNA为模板进行各候选内参基因的qRT-PCR分析, 并绘制各候选内参基因的熔解曲线, 结果表明6个候选内参基因的熔解曲线(图3)均为单峰, 且扩增曲线的重复性也非常好, 再次说明各引物的特异性较好, 不存在引物二聚体, qRT-PCR的扩增结果准确可靠。进而将各扩增结果的Ct值比对到标准曲线, 计算获得6个候选内参基因在各样本中的绝对表达量(表2)。

2.3 候选内参基因的表达稳定性分析

应用比较Ct值法、geNorm、Normfinder和Bestkeeper软件对候选内参基因在不同光照强度条件下的表达水平进行评估, 从而筛选出可用于不同高光光强胁迫下基因表达定量分析的坛紫菜最适内参基因。

Ct值可以反映出基因在不同样品中的表达水平, 因此各候选内参基因Ct值在不同光照强度条件下的变化范围可以作为评估基因表达稳定性的依据。从图4可以看出各候选内参基因在不同光照强度条件下表达水平的变化范围。图中黑色菱形标记表示基因表达的平均Ct值, 其中平均表达丰度最高的基因为TUB, 平均Ct值为22.48; 平均表达丰度最低的为EF2, 平均Ct值为19.47。在不同光照强度条件下UBC的Ct值变化范

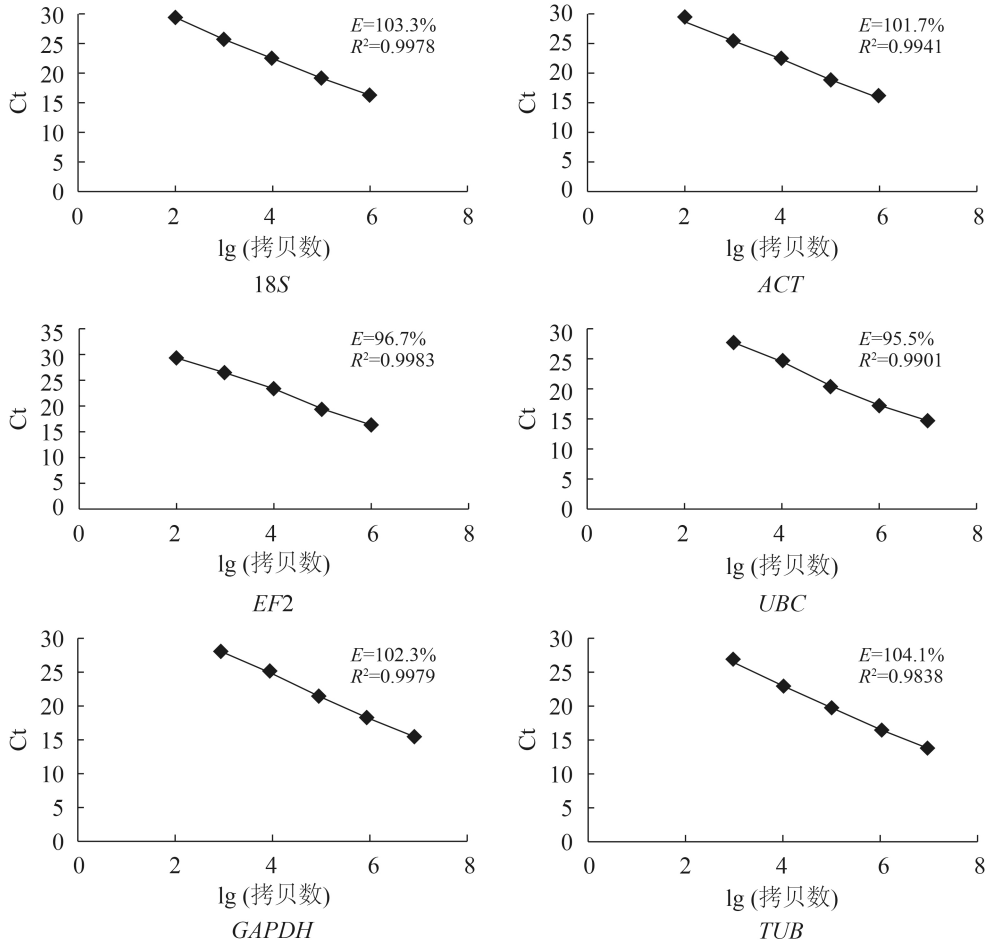


图 2 各候选内参基因的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of each candidate internal control gene

围最小, 18S的Ct值变化范围最大。说明在不同光照强度条件下UBC基因的表达最为稳定, 而18S基因的表达则受光照条件影响最大。

采用geNorm软件对不同光照强度条件下各候选内参基因的表达稳定性进行评估, 候选基因表达稳定值M为任意2个候选内参基因组合的表达水平比值的对数值, M值越小, 基因表达的稳定性的越高。geNorm程序会依次排除最不稳定的基因, 直到仅剩2个为止。由图5可知, 在不同光照强度条件下M值由大到小的内参基因依次为GAPDH>18S>ACT>TUB>UBC/EF2, M值最低的候选内参基因为UBC和EF2, 说明在不同光照强度条件下表达水平最稳定的内参基因为UBC和EF2。

采用Normfinder软件评估不同光照强度条件下6个候选内参基因的表达稳定性。Normfinder与geNorm对基因表达稳定性进行评估的原理相似, 只是计算方法不同, Normfinder是基于数学

模型计算基因表达的稳定性, 结果如表3所示。6个候选内参基因在不同光照强度条件下的表达稳定值依次为0.171、0.044、0.194、0.564、0.135、0.108, 由此可以看出不同光照强度条件下表达稳定性最好的候选内参基因是UBC, 稳定性最差的是GAPDH。

采用Bestkeeper软件对不同光照强度条件下各候选内参基因的表达稳定性进行分析, 结果如表3所示, 同样表明不同光照强度条件下基因表达最稳定的候选内参基因为UBC, 而18S基因的表达则受光照条件影响最大。

3 讨论

qRT-PCR是在传统PCR技术的基础上建立起来的一种高效、灵敏、准确的核酸定量技术, 已被认为是“基因检测和定量表达的黄金标准”^[10]。合适的内参基因对qRT-PCR分析结果的准确性起

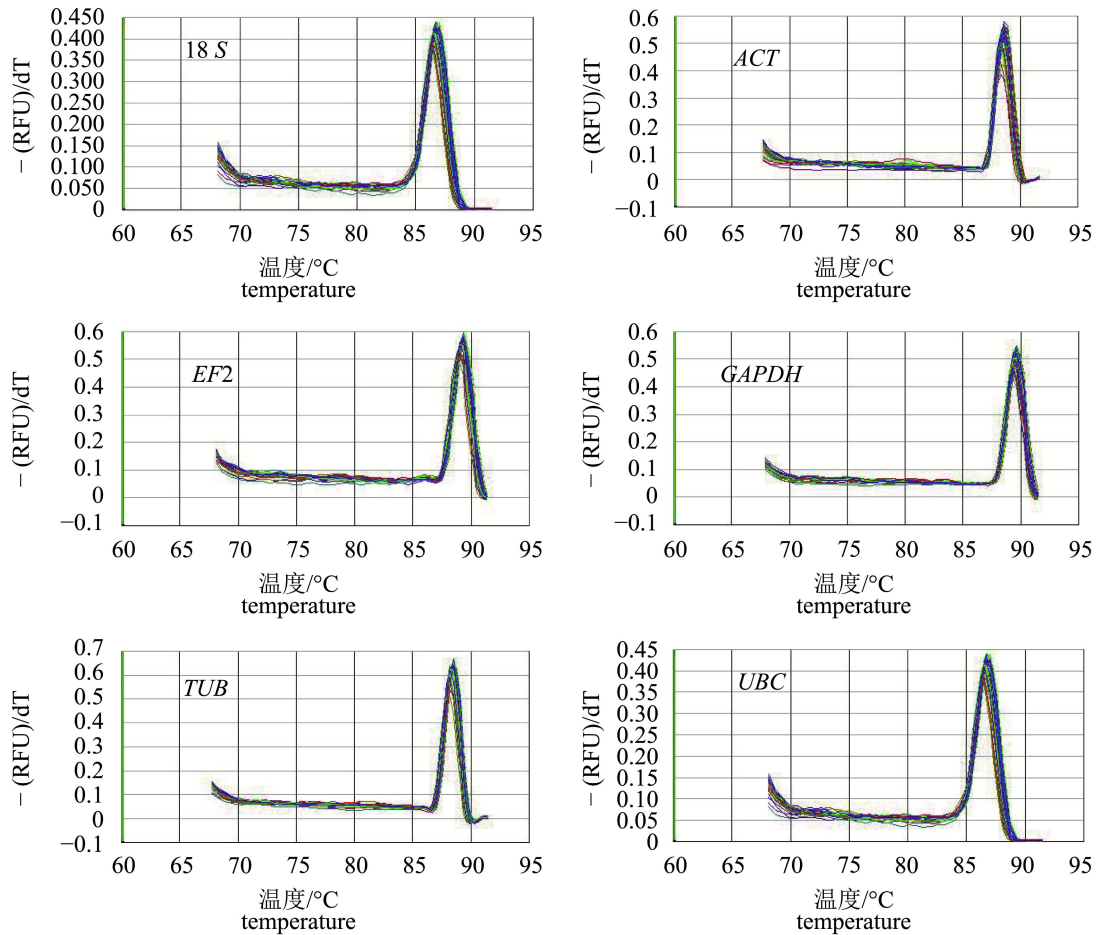


图3 各候选内参基因qRT-PCR扩增产物的溶解曲线

Fig. 3 Melting curves of qRT-PCR product of each candidate internal control gene

表2 各候选内参基因在各样品中的绝对表达量

Tab. 2 The absolute expression level of each housekeeping gene in each tested sample

样品 samples	18S		UBC		ACT		GAPDH		TUB		EF2	
	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number	Ct	拷贝数/ (拷贝/ μg) copy number
NL	20.79	3.1×10^4	20.70	1.1×10^5	19.67	6.3×10^4	18.16	1.0×10^6	21.31	3.4×10^4	18.39	1.9×10^5
HL1	22.80	7.6×10^3	21.82	5.2×10^4	20.99	2.2×10^4	21.12	1.3×10^5	25.88	1.3×10^3	21.14	3.0×10^4
HL2	28.01	1.9×10^2	21.99	4.6×10^4	24.94	1.6×10^3	20.48	2.0×10^5	23.88	5.5×10^3	20.55	4.5×10^4
HL3	19.90	5.9×10^4	20.01	1.7×10^5	18.47	1.5×10^5	21.84	7.7×10^4	20.32	7.0×10^4	18.76	1.5×10^5
HL4	19.69	6.9×10^4	20.02	1.7×10^5	18.57	1.4×10^5	22.37	5.3×10^4	20.97	4.3×10^4	18.52	1.8×10^5

到决定性的作用，理想的内参基因应具备以下特点：①在生物体的不同组织和细胞中均能稳定表达；②在各种环境条件下都能稳定表达，不受细胞周期调控及生物体任何内外源因素的影响；③表达水平应与目标基因类似；④表达丰度适宜^[11]。但是在实验中发现，没有一个内参

基因能在不同实验条件、不同物种、不同组织细胞及发育阶段稳定表达，因此在实际研究中应针对所研究的对象和条件筛选合适的内参基因。

本研究采用比较Ct值法、NormFinder、geNorm及Bestkeeper软件对植物中常用的6个内参基因(18S、GAPDH、ACT、UBC、TUB和EF2)在

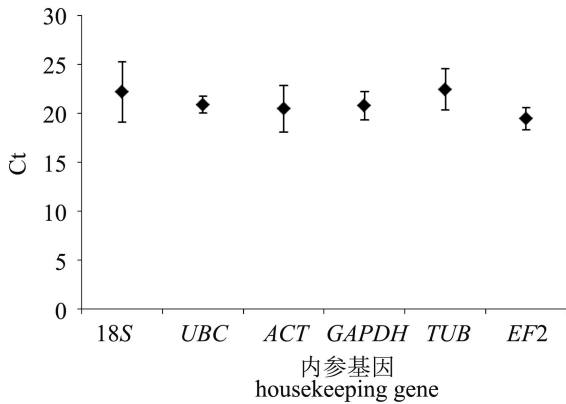


图 4 各候选内参基因在各样本中Ct值的变化范围

Fig. 4 The variation of Ct values of selected housekeeping genes in all test samples

不同光强下的表达稳定性进行了分析。比较Ct值法获得的各候选内参基因的表达稳定性大小为 $UBC > EF2 > GAPDH > TUB > ACT > 18S$; Norm-Finder软件分析结果表明各候选内参基因的表达稳定性大小为 $UBC > EF2 > TUB > 18S > ACT > GAPDH$; geNorm软件分析获得的各候选内参基因的表达稳定性大小为 $UBC/EF2 > TUB > ACT > 18S > GAPDH$; Bestkeeper软件分析获得的各候选内参基因的表达稳定性大小为 $UBC > EF2 > GAPDH > TUB > ACT > 18S$ 。尽管以上4种分析方法获得的各候选内参基因的表达稳定性不尽相同, 但所获得的表达水平最稳定的候选内参基因均为 UBC , 因此 UBC 可以作为坛紫菜在不同光照强度下基因表达水平

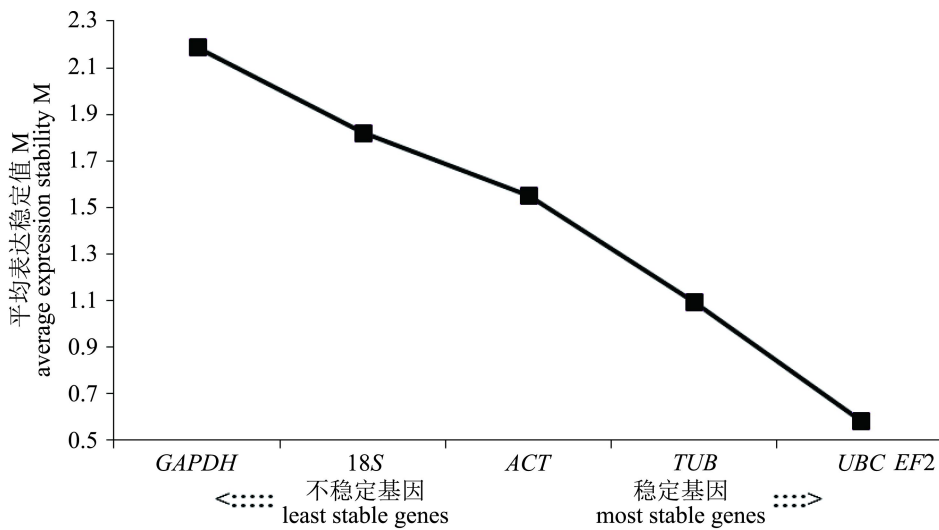


图 5 各候选内参基因表达稳定性的geNorm分析结果

Fig. 5 Gene expression stability of each housekeeping gene calculated by geNorm

表 3 各候选内参基因表达稳定性的Normfinder和Bestkeeper分析结果

Tab. 3 Gene expression stability of each housekeeping gene calculated by Normfinder and Bestkeeper

基因 gene	稳定值(Normfinder) stability value	稳定值(Bestkeeper) stability value
18S	0.171	2.53
UBC	0.044	0.80
ACT	0.194	1.95
GAPDH	0.564	1.18
TUB	0.135	1.93
EF2	0.108	1.10
最适内参基因 the best housekeeping gene	UBC	UBC

qRT-PCR分析的最适内参基因。

泛素蛋白普遍存在于真核生物细胞中, 并且参与细胞的许多生命活动过程。其中 UBC 属于泛素结合酶E2家族成员, 主要作用是与被泛素激活酶E1激活的泛素相结合, 再与泛素连接酶E3共同对底物进行泛素化修饰, 是底物泛素化中不可或缺的一部分^[12]。 UBC 基因在底物泛素化过程及蛋白泛素化修饰的精准性和特异性等方面发挥着重要作用^[13]。研究表明, 植物中泛素蛋白具有高度保守性和同源性, 其保守性对维持蛋白质的结构和功能起到重要作用^[14]。正是由于泛素蛋白的高度保守性和底物泛素化在细胞生命中的必要性, 使得其在不同细胞组织和不同

环境下均能保持稳定表达, 所以常被作为植物基因表达分析中的内参基因。Hong等^[15]分析二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)在不同逆境胁迫下9个内参基因的表达稳定性时发现*UBC*基因的表达稳定性最好; Czechowski等^[16]在筛选不同组织和处理条件下的拟南芥(*Arabidopsis*)内参基因时同样发现*UBC*基因的表达稳定性最高。另外在侧柏(*Platycladus orientalis*)和长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)不同发育阶段和不同实验条件下均发现*UBC*基因都能稳定表达^[17-18]。本研究结果确认*UBC*可以作为坛紫菜在不同光照强度下基因表达水平qRT-PCR分析的最适内参基因, 这与Li等^[9]在筛选坛紫菜不同品系、不同生活史和不同胁迫(高温、失水)条件下qRT-PCR分析的最适内参基因结果一致, 均为*UBC*基因。

*GAPDH*是参与磷酸戊糖途径和糖酵解途径的重要酶, 在细胞中发挥着多种功能, 因其基因拷贝数较低, 基因同源性不高, 被广泛作为各种植物基因表达的内参基因^[6]。作为常见的内参基因, *GAPDH*基因在甘蔗(*Saccharum officinarum*)^[19]、红花檵木(*Lorpetalum chinense*)^[20]以及茶树(*Camellia sinensis*)^[21]的不同组织器官中都能稳定表达。但是在本研究中, NormFinder和geNorm分析结果均认为*GAPDH*基因在不同光照强度处理下的坛紫菜藻体中表达最不稳定, 这与对长囊水云^[17]、毛果杨(*Populus trichocarpa*)^[22]、条斑紫菜^[6]的研究结果一致。现有的很多研究中都采用18S作为内参进行基因表达的定量分析, 如在葡萄(*Vitis vinifera*)^[23]、杨树^[24]、条斑紫菜^[25-26]等物种中检测基因表达时均曾采用过。但18S基因在本研究不同光照强度处理下的坛紫菜藻体中的表达稳定性却较差, 不适合作为坛紫菜在不同光照强度处理下基因表达水平检测的内参基因。在拟南芥^[27]、马铃薯^[28]、水稻(*Oryza sativa*)^[29]等的研究中发现*ACT*基因不是最佳的内参基因, 这与本研究对*ACT*基因的分析结果一致。尽管Wu等^[8]的研究中发现坛紫菜不同发育世代的最适内参基因是*TUB*, 但在不同光照强度下*TUB*基因的表达水平并不稳定, 因此也不适合作为本研究的最适内参基因。本研究中, 4种评估方法均认为*EF2*基因的表达稳定性仅次于*UBC*基因, 在进行不同光照强度处理下坛紫菜基因的表达水平定量分析时, 如果需要2个内参基因时, *EF2*基因也可以作为备选的内参基因。

本研究筛选出了坛紫菜在高光胁迫下进行基因表达水平研究的最适内参基因*UBC*, 为坛紫菜在不同光照强度下基因的表达分析奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张惟材, 朱力, 王玉飞. 生物实验室系列: 实时荧光定量PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013: 1-31.
Zhang W C, Zhu L, Wang Y F. Biology Lab Manual Series: Real-time Quantitative PCR[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013: 1-31 (in Chinese).
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Lee P D, Sladek R, Greenwood C M T, et al. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies[J]. Genome Research, 2002, 12(2): 292-297.
- [5] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 29-37.
- [6] 邵惠. 条斑紫菜(*Pyropia/Porphyr a yezoensis*)实时荧光定量PCR内参基因的筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Shao H. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *P. yezoensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [7] Wang W L, Wu X J, Wang C, et al. Exploring valid internal-control genes in *Porphyra yezoensis* (Bangiaceae) during stress response conditions[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(4): 783-791.
- [8] Wu X J, Niu J F, Huang A Y, et al. Selection of internal control gene for expression studies in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) at different life-history stages[J]. Journal of Phycology, 2012, 48(4): 1040-1044.
- [9] Li B, Chen C S, Xu Y, et al. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying the gene expression in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) by quantitative real-time PCR[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 33(9): 152-159.

- [10] 杨怡姝, 孙晓娜, 王小利, 等. 实时荧光定量PCR技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(7): 15-19.
Yang Y S, Sun X N, Wang X L, *et al.* Experimental teaching of real-time fluorescent Quantitative PCR[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2011, 30(7): 15-19(in Chinese).
- [11] 侯维海, 孙鹏, 陈全家, 等. 地黄实时定量PCR内参基因的筛选[J]. 中国农学通报, 2011, 27(17): 76-82.
Hou W H, Sun P, Chen Q J, *et al.* Selection of the reference genes for gene expression studies in *Rehmannia glutinosa* by real-time quantitative PCR[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(17): 76-82(in Chinese).
- [12] 兰秋艳, 高媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展[J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 14-30.
Lan Q Y, Gao Y, Li Y C, *et al.* Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(1): 14-30(in Chinese).
- [13] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination[J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70: 503-533.
- [14] 刘传娇, 王顺利, 薛璟祺, 等. 牡丹泛素延伸蛋白基因 *ubiquitin* 克隆及其作为内参基因的研究[J]. 园艺学报, 2015, 42(10): 1983-1992.
Liu C J, Wang S L, Xue J Q, *et al.* Molecular cloning of ubiquitin protein gene and study on this gene as reference gene in tree peony[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(10): 1983-1992(in Chinese).
- [15] Hong S Y, Seo P J, Yang M S, *et al.* Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 112.
- [16] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, *et al.* Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 5-17.
- [17] Le Bail A, Dittami S M, de Franco P O, *et al.* Normalisation genes for expression analyses in the brown alga model *Ectocarpus siliculosus*[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9: 75.
- [18] Chang E M, Shi S Q, Liu J F, *et al.* Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) using real-time PCR[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33278.
- [19] Iskandar H M, Simpson R S, Casu R E, *et al.* Comparison of reference genes for quantitative Real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(4): 325-337.
- [20] 张力, 于晓英, 符红艳, 等. 红花檵木实时荧光定量PCR分析内参基因的选择[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 11-17.
Zhang L, Yu X Y, Fu H Y, *et al.* Reference genes selection for Real-time fluorescence quantitative PCR in *Lorpetalum chinense* var. *rubrum*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(10): 11-17(in Chinese).
- [21] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量PCR分析中内参基因的选择[J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.
Sun M L, Wang Y S, Yang D Q, *et al.* Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(5): 579-587(in Chinese).
- [22] 苏晓娟, 樊保国, 袁丽钊, 等. 实时荧光定量PCR分析中毛果杨内参基因的筛选和验证[J]. 植物学报, 2013, 48(5): 507-518.
Su X J, Fan B G, Yuan L C, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(5): 507-518(in Chinese).
- [23] 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.
Zhao X, Ma H Q, Chen S W, *et al.* Internal reference gene selection for semi quantitative RT-PCR of genes in the second half of grape berry development[J]. Journal of China Agricultural University, 2010, 15(3): 7-14(in Chinese).
- [24] Xu M, Zhang B, Su X H, *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 408(2): 337-339.
- [25] 周向红, 阎斌伦, 王萍, 等. 条斑紫菜HSP90基因实时荧光定量PCR检测方法的构建[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2010, 19(2): 81-84.
Zhou X H, Yan B L, Wang P, *et al.* Establishment of

- real-time PCR for HSP90 gene of *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Sciences Edition), 2010, 19(2): 81-84(in Chinese).
- [26] 周向红, 易乐飞, 李信书, 等. 条斑紫菜谷胱甘肽S-转移酶基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(9): 1354-1361.
- Zhou X H, Yi L F, Li X S, *et al.* Molecular cloning and expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(9): 1354-1361(in Chinese).
- [27] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin 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.
- [28] Nicot N, Hausman J F, Hoffman 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.
- [29] Kim B R, Nam H Y, Kim S U, *et al.* Normalization of reverse transcription Quantitative-PCR with house-keeping genes in rice[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(21): 1869-1872.

Selection of the internal control gene for expression analyses of *Pyropia haitanensis* under high light stress by quantitative real-time PCR

CHANG Jing, CHEN Ludan, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian*

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Pyropia haitanensis* is a sessile marine macroalgae that inhabits the intertidal zone. High light was the main environmental stressor of *P. haitanensis* during low tides and the key factor affecting yield. To explore the molecular mechanisms of high light tolerance, gene expression analysis was the first step. Gene expression studies using quantitative real-time PCR should start by selecting an appropriate internal control gene; therefore, the absolute expression levels of six housekeeping genes [18S rRNA (18S), ubiquitin-conjugating enzyme (*UBC*), actin (*ACT*), β -tubulin (*TUB*), elongation factors 2 (*EF2*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)] were examined by the quantitative real-time PCR in samples corresponding to different high light stress treatments. Their expression stabilities were assessed by the comparative cycle threshold (Ct) method and by three different software packages: geNorm, Bestkeeper and NormFinder. The results showed that the Ct value of *UBC* had the least variation, while that of *18S* obviously changed under different light intensities treatments. The analysis of geNorm also exhibited that the most stable housekeeping genes were *UBC* and *EF2*. The analysis of both Bestkeeper and NormFinder exhibited that stability measure M of *UBC* was the lowest (0.044 and 0.80, respectively) among six candidate genes. Thus the most stable housekeeping gene is *UBC*. Based on the above results, it is proposed that the most appropriate internal control gene for expression analyses under high light stress of *P. haitanensis* is *UBC*.

Key words: *Pyropia haitanensis*; high light stress; housekeeping genes; qRT-PCR

Corresponding author: XIE Chaotian. E-mail: Ctxie@jmu.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program 863 (2012AA10A411); National Natural Science Foundation of China (41276177); Natural Science Foundation of Fujian, China (2014J05041, 2014J07006)