

DOI:10.16861/j.cnki.zggc.2024.0732

# 不同光质处理下糙皮侧耳 qRT-PCR 内参基因的优化

胡梦丹, 祝梦柯, 张鹏, 高玉千, 邱立友, 李亚楠

(河南农业大学生命科学学院·农业农村部农业微生物酶工程重点实验室 郑州 450046)

**摘要:** 为了筛选出适合分析糙皮侧耳在不同光质处理下基因特异性表达的内参基因,以糙皮侧耳菌丝为材料,在不同光质处理的菌丝转录组数据中筛选 12 个基因作为糙皮侧耳实时荧光定量 PCR 的候选内参基因,对其表达丰度和表达稳定性进行评价。设计的 12 个候选内参基因荧光定量引物具有良好的特异性,溶解曲线呈单一峰,各基因 CT 值在 18~26 之间。geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 表达稳定性分析显示,真核翻译起始因子编码基因(*eIF1*)、泛素结合酶编码基因(*UBC*)、40S 核糖体蛋白编码基因(*40SRP*)和肌动蛋白编码基因(*Actin1*)在 3 种分析中的表达稳定性均位于前列。这 4 个基因在不同光质处理下的表达丰度从高到低依次为 *UBC*、*eIF1*、*Actin1* 和 *40SRP*。*eIF1* 和 *UBC* 可以作为靶标基因高丰度表达水平下的最佳内参基因组合;*40SRP* 和 *Actin1* 可作为靶标基因中、低丰度表达水平下的最佳内参基因组合。

**关键词:** 糙皮侧耳;内参基因;光处理;qRT-PCR

中图分类号: S646.1<sup>41</sup>

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)06-035-09

## Optimization of reference genes for qRT-PCR of *Pleurotus ostreatus* under different lighting treatments

HU Mengdan, ZHU Mengke, ZHANG Peng, GAO Yuqian, QIU Liyou, LI Yanan

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University/Key Laboratory of Agricultural Microbial Enzyme Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhengzhou 450046, Henan, China)

**Abstract:** To identify suitable reference genes for analyzing the specific gene expression of *Pleurotus ostreatus* under different lighting treatments, the mycelium of *P. ostreatus* was used as the material, and 12 genes were screened from the transcriptome data of mycelium under different lighting treatments as candidate reference genes for qRT-PCR of *P. ostreatus*, and their expression abundance and expression stability were evaluated. The results indicated that the primers of 12 candidate reference genes had good specificity in qPCR, with single peaks in the melting curve, and the CT values of the genes were between 18 and 26, demonstrating good gene expression abundance. The expression stability analysis of geNorm, NormFinder and BestKeeper showed that the expression stability of eukaryotic translation initiation factor1 encoding gene(*eIF1*), ubiquitin-conjugating enzyme encoding gene(*UBC*), 40S ribosomal protein encoding gene(*40SRP*) and actin1 encoding gene(*Actin1*) were at the forefront in the three analyses. The expression abundance of these four genes under different lighting treatments from high to low was *UBC*, *eIF1*, *Actin1* and *40SRP*. *eIF1* and *UBC* can be used as the best reference gene combination at the high abundance expression level of target genes. *40SRP* and *Actin1* can be used as the best reference gene combination at medium and low abundance expression levels of target genes.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; Reference gene; Lighting treatment; qRT-PCR

食用菌在栽培过程中需要适宜的光照<sup>[1]</sup>,不同品种的食用菌对光照具有不同的要求和响应<sup>[2-6]</sup>。研究发现,在黑暗条件下,杏鲍菇原基可以形成,但难以进一步分化成具有正常结构的子实体;而在红光和蓝光条件下,原基能够正常分化,且在蓝光下分化的速度快,数量比红光下多<sup>[3]</sup>。在蓝光下,与光调控相关的脱氧核糖二嘧啶光解酶基因 *PHR* 表达量显著上调<sup>[3]</sup>。Kim 等<sup>[4]</sup>研究表明,蓝光对香菇菌盖

和菌柄的发育有显著影响,对其分析发现碳水化合物活性酶编码基因和部分转录因子编码基因的表达量出现明显上调,为进一步解析光照对其调控机制奠定了基础。糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*),又名平菇,是我国栽培量最大、栽培范围最广的食用菌之一<sup>[7]</sup>,因其具有高营养价值及药用特性而著名<sup>[8]</sup>。在糙皮侧耳的生长中,其对光照的需求主要体现在原基分化时期和子实体形成及发育时期<sup>[7]</sup>。目前通过

收稿日期:2024-11-19;修回日期:2025-01-21

基金项目:国家自然科学基金青年项目(32102455);河南省科技攻关计划项目(242102110311)

作者简介:胡梦丹,女,在读硕士研究生,主要从事食用菌分子生物学研究。E-mail: humengdan1998@163.com

通信作者:李亚楠,女,讲师,主要从事食用菌分子生物学研究。E-mail: liyanan@henau.edu.cn

试验发现,不同程度的光照对糙皮侧耳菌丝培养时期的生长发育也会产生不同的影响。分析不同光照条件下生长发育和调控中相关基因的表达差异,是解析其光调控机制的重要研究途径。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是研究基因表达差异的主要方法。该方法具有微量、高效、快速得到结果的特点<sup>[9]</sup>。qRT-PCR 计算基因表达量时通常采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法,该方法基于  $CT$  (cycle threshold) 值,即反应过程中荧光信号达到阈值以上的最小循环数,通过计算目标基因与其内参基因之间的  $CT$  值差异,进而转换为表达量的对数比值,从而实现对基因表达水平变化的相对定量。内参基因用于校正组内和组间由于样本处理、RNA 提取、逆转录及定量效率等可能存在的试验误差,对其进行归一化处理,确保试验结果的准确性<sup>[10]</sup>。因此,内参基因的选择在分析基因表达差异的过程中起着至关重要的作用,不合适的内参基因的使用会导致对基因表达水平和表达趋势的误判。通常,选择在不同组织和不同处理条件下表达量稳定且相对较高的管家基因作为内参基因<sup>[11-12]</sup>。管家基因中  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin)、 $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin)、甘油醛-3 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 编码基因作为常用的内参基因<sup>[13]</sup>。但是在特定处理条件下,一些常规管家基因的表达稳定性可能也会发生变化,导致其不再适合作为特定研究的内参基因。此时,需要通过分析对比通用管家基因的表达稳定性,以筛选出更合适的内参基因。

目前可用于分析基因表达水平稳定性的软件有 geNorm<sup>[14]</sup>、NormFinder<sup>[15]</sup>、BestKeeper<sup>[16]</sup> 等。GeNorm 软件可以筛选出两个及两个以上较为稳定的内参基因,通过程序运算,计算各个基因的  $M$  值, $M$  值越低,其作为内参基因的稳定性越高;反之越低<sup>[14]</sup>。NormFinder 可用来筛选 1 个基因作为最优内参基因,通过程序计算出  $S$  值, $S$  值越低,表明该基因作为内参基因的稳定性越高;反之越低<sup>[15]</sup>。BestKeeper 通过程序计算出每个基因相应的变异系数和标准偏差,变异系数和标准偏差低的基因适合作为内参基因<sup>[16]</sup>。通常情况下,可通过这 3 个软件的综合评价分析,筛选出最优内参基因。

真核翻译起始因子编码基因 *eIF* 在日本枞 (*Eurotyum japonicus*)<sup>[17]</sup>、秋葵 (*Abelmoschus esculentus* L.)<sup>[18]</sup>、魔芋 (*Amorphophallus Konjac*)<sup>[19]</sup> 等植物中被广泛用作内参基因,但在食用菌中使用此基因作为

内参基因的报道较少。Yang 等<sup>[20]</sup> 研究发现,丝状真菌中新型内参基因 *RNB*、*V-ATP* 和 *VAMP* 比传统内参基因 *ACTB*、 $\beta$ -*TUB* 和 *GAPDH* 更为稳定。王文沛等<sup>[21]</sup> 发现在草菇 (*Volvariella volvacea*) 常用菌株和继代退化菌株中最佳参考基因组合为 *SPRYp* 和  $\alpha$ -*TUB*,但 Tao 等<sup>[22]</sup> 发现,*SPRYp*、*Ras* 和 *Vps26* 在草菇中表现出高稳定性。*VSN*、*CYP*、*Ctsyn*、*UBC*、*40SRP* 和 *60SRP* 在生物胁迫下筛选内参基因中也有较多报道<sup>[23-24]</sup>,但在食用菌中使用频率较低。在糙皮侧耳中,*VSN* 和 *Rbp* 在不同氮源处理下比 *Actin1* 更适合作为内参基因,但在热胁迫条件下,*Actin1* 成为最佳选择<sup>[25]</sup>。不同光照条件下内参基因的筛选报道较少,在植物刺葡萄 (*Vitis davidii* Foëx.) 愈伤组织中,不同光条件下最适内参基因为 *60SRP* 和 *TUB*<sup>[26]</sup>,目前并未发现在食用菌中不同光质处理的内参基因的报道。笔者初步对这些基因在不同光照下糙皮侧耳转录组中的本底 FPKM 值进行分析,筛选出了 12 个候选内参基因,并进一步对其表达丰度和表达稳定性充分对比分析,以期能够为不同光质处理下 qRT-PCR 的规范和数据处理的保真性提供支撑,为研究糙皮侧耳的基因表达水平和光调控机制提供保障。

## 1 材料与方 法

试验于 2024 年 4—8 月在河南农业大学生命科学学院力行楼进行。

### 1.1 供试菌株及培养基

糙皮侧耳 X831 由河南农业大学食用菌课题组保存;麸皮固体培养基:麸皮 20 g、蛋白胨 2.0 g、酵母粉 2.0 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g、 $KH_2PO_4$  0.46 g、 $K_2HPO_4$  1.0 g、琼脂粉 20 g、加去离子水补足至 1000 mL,分装后使用灭菌锅于 121 °C 高压灭菌 30 min。

### 1.2 不同光质处理

将活化后的菌种接种于麸皮固体培养基中,25 °C 恒温黑暗培养。在培养 2 d 后,每天对菌丝分别进行红光、蓝光、白光 2 h 光照处理 (约 1000 lx,共处理 6 d),以黑暗培养的菌丝作为对照,培养 7 d 后收集菌丝并于液氮中速冻,置于 -80 °C 冰箱备用。

### 1.3 总 RNA 提取与反转录

使用 TRIeasy™ Total RNA Extraction Reagent (购自上海翌圣生物科技有限公司) 提取已保存菌丝的总 RNA,具体按照说明书操作。通过琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 RNA 的完整性和浓度。使用 4 × gDNA wiper Mix、5 × HiScript III

qRT SuperMix (购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行反转录获得 cDNA 片段,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

#### 1.4 候选内参基因的筛选、引物设计与基因克隆

通过查阅文献[17-26],使用 NCBI blast 比对分析,在糙皮侧耳中初步选择了 20 个内参基因,对其在不同光质下的转录组数据进行进一步筛选,以转录组数据中平均 FPKM 值 $>100$  以及  $\text{MFC}\leq 2$ (最大值与最小值的比值)<sup>[20]</sup>作为参考依据,初步筛选出进一步重点关注的候选内参基因。查找候选内参基因的编码序列,设计 qRT-PCR 引物,并对引物的特异性进行验证。引物由生工(上海)生物工程有限公司合成,扩增产物长度为 100~200 bp。

#### 1.5 荧光定量引物标准曲线和扩增效率分析

qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ 。使用定量 PCR 仪进行反应,运行过程中通过熔解曲线分析引物特异性。在荧光定量 PCR 引物的外侧设计引物并通过常规 PCR 扩增获取模板核酸片段的标准品,凝胶回收后测定其核酸浓度( $\rho$ )(100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 左右),将模板标准品按照梯度稀释( $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ ),并分别进一步进行荧光定量 PCR,记录各稀释浓度下对应的 CT 值,用于分析引物扩增的标准曲线和扩增效率。以标准品浓度为横坐标,以基因的 CT 值为纵坐标,计算分析各基因的斜率  $k$  和回归系数  $R^2$ ,通过  $E=10^{-1/k}-1$  计算出各内参引物的扩增效率<sup>[27]</sup>。

#### 1.6 不同候选内参基因的表达稳定性分析

以不同光质处理的糙皮侧耳的 cDNA 为模板,采用 1.5 中确认过的标准曲线和扩增效率正常的荧光定量引物进行 qRT-PCR,记录其 CT 值,用于后续对候选内参基因表达稳定性的筛选。将不同光质处理下各候选内参基因的 CT 值通过 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行分析,以反映基因表达的稳定性,具体参照 Vandesompele 等<sup>[14]</sup>、Andersen 等<sup>[15]</sup>和 Michael 等<sup>[16]</sup>的方法。最终,对不同软件中的稳定性排名进行综合评估<sup>[21]</sup>,以确定最合适的内参基因。

#### 1.7 数据分析

采用 Excel 2016 记录整理数据;采用 SPSS 对试验结果进行统计分析;采用 Prism 10 对试验分析结果绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选内参基因的筛选

通过查阅文献初步选择 20 个内参基因,基于

糙皮侧耳在不同光质处理下的转录组数据,对反映基因表达丰度的 FPKM 值进行汇总分析。在前期试验中,笔者发现当 FPKM 值低于 100 时,其 qPCR 结果显示的 CT 值大于 26,此时 CT 值相对过大,不再适合作为内参基因。结果分析显示(表 1),丝状真菌中的新型内参基因 *SPRYp*、*RNB*、*V-ATP*、*VAMP* 的平均 FPKM 值低于 100,其中 *RNB* 和 *VAMP* 在某些处理下几乎不表达,*V-ATP* 在不同光质处理下存在超过 2 倍的表达差异。此外,不同氮源下筛选到的糙皮侧耳最优内参基因为 *Rbp* 和 *VSN*,但在本研究中,*Rbp* 的平均 FPKM 值小于 100,不再适合作为常规表达量的内参基因。同时,*Ctsyn* 和 *Actin3* 的平均 FPKM 值也低于 100,而 *Cyp* 的平均 FPKM 值高于 5000,也不适合作为常规表达量的内参基因。当  $\text{MFC}\leq 2$  时,基因处于严格稳定状态, $\text{MFC}>2$  的基因不适合作为内参基因。最后通过筛选获得了 12 个候选内参基因,分别为 *Vps26*、*Ras*、*eIF1*、*eIF5A*、*Actin1*、*Actin2*、*GAPDH*、*TUB*、*UBC*、*VSN*、*60SRP*、*40SRP*。

表 1 候选内参基因表达稳定性和表达水平的初步筛选  
Table 1 Preliminary screening of expression stability and expression levels of candidate reference genes

基因名称 Gene name	平均表达量 Average FPKM	最大值与最小值比值 MFC
<i>SPRYp</i>	80.75	1.25
<i>Vps26</i>	111.12	1.74
<i>Ras</i>	545.52	1.11
<i>RNB</i>	0.20	0.00
<i>V-ATP</i>	94.37	2.16
<i>VAMP</i>	8.71	0.00
<i>eIF1</i>	3 037.10	1.72
<i>eIF5A</i>	2 311.02	1.27
<i>Rbp</i>	55.43	1.40
<i>Ctsyn</i>	75.10	1.84
<i>Actin1</i>	1 015.17	1.73
<i>Actin2</i>	263.80	1.85
<i>Actin3</i>	63.99	2.25
<i>GAPDH</i>	125.39	1.70
<i>TUB</i>	1 698.70	1.64
<i>UBC</i>	3 445.12	1.34
<i>VSN</i>	134.05	1.36
<i>Cyp</i>	8 226.20	2.29
<i>60SRP</i>	1 752.89	1.53
<i>40SRP</i>	1 606.01	1.37

### 2.2 RNA 质量和引物特异性检测

将提取后的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,均具有明亮的 18S 和 28S 条带,通过分光光度计检测其  $A_{260/280}$  在 1.8~2.1 之间, $A_{260/230}$  在 2.0~2.4 之间,说明提取的总 RNA 完整性较好。实时荧光定量 PCR 熔解曲线呈单一峰(图 1),说明引物特异性较好。

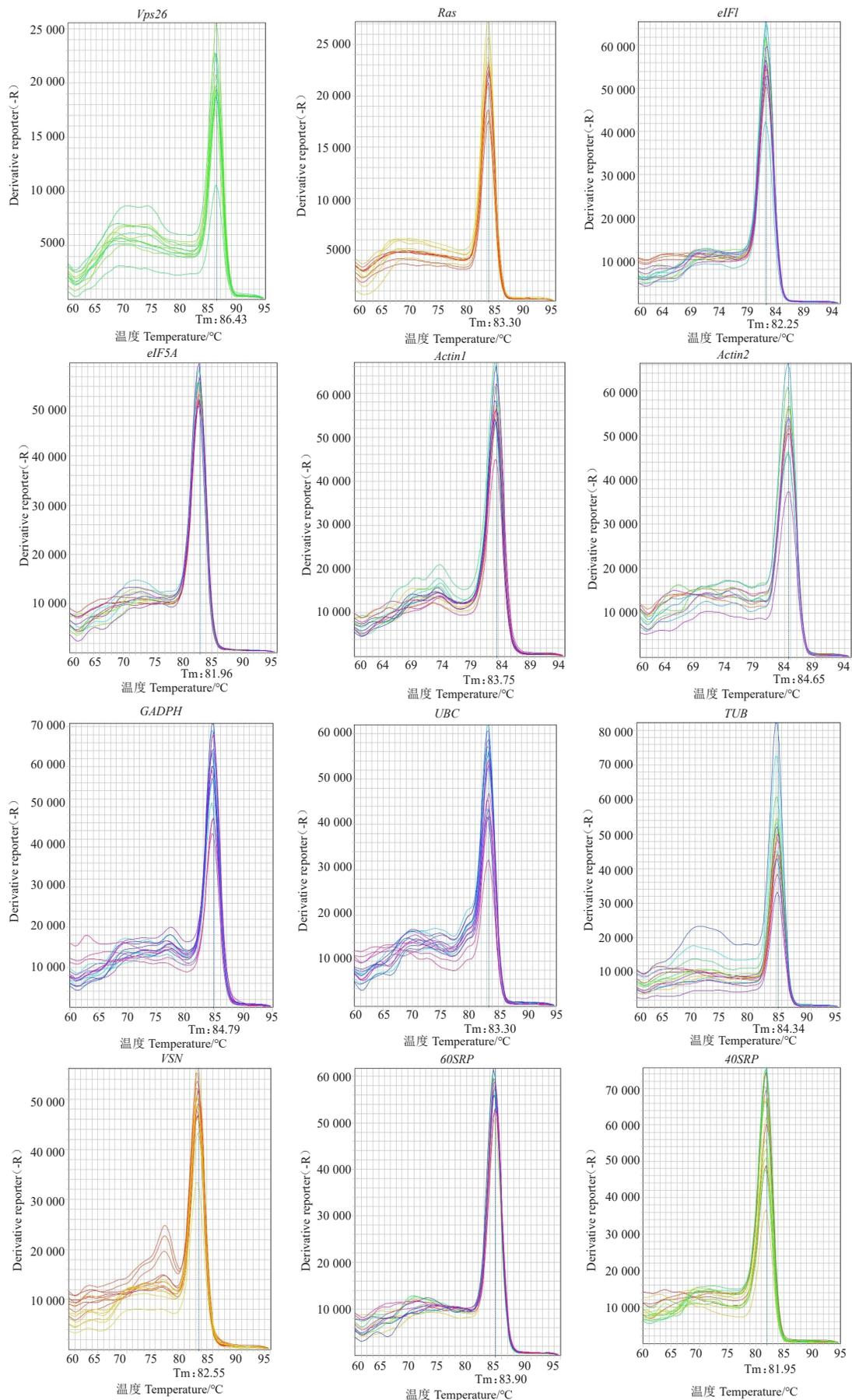


图1 不同候选内参基因荧光定量PCR扩增引物的熔解曲线

Fig. 1 Melting curves of different candidate reference genes for fluorescence quantitative PCR amplification primers

对 12 个基因绘制标准曲线,结果表明候选内参基因的扩增效率处于 91%~116%之间,回归系数处于 0.990 8~0.999 5 之间(表 2)。结果显示,引物扩增效率符合后续分析的要求。

表 2 不同候选内参基因荧光定量 PCR 扩增引物的标准曲线和扩增效率分析

Table 2 Analysis of standard curve and amplification efficiency of fluorescence quantitative PCR amplification primers for different candidate reference genes

基因 Gene	标准曲线 Standard curve	扩增效率 Amplification efficiency/%	回归系数 Regression coefficient
<i>Vps26</i>	$y=3.143 0x+6.154 0$	108	0.991 4
<i>Ras</i>	$y=3.224 6x+4.541 9$	104	0.992 3
<i>eIF1</i>	$y=3.019 2x+7.261 3$	114	0.997 8
<i>eIF5A</i>	$y=3.529 1x+7.158 4$	92	0.998 6
<i>Actin1</i>	$y=3.544 6x+7.394 5$	91	0.997 5
<i>Actin2</i>	$y=3.041 9x+7.430 1$	113	0.999 5
<i>GAPDH</i>	$y=3.181 2x+5.421 7$	97	0.993 1
<i>UBC</i>	$y=3.436 3x+5.164 7$	95	0.997 4
<i>TUB</i>	$y=3.234 8x+6.922 3$	103	0.994 3
<i>VSN</i>	$y=2.995 6x+5.258 2$	116	0.990 8
<i>60SRP</i>	$y=3.522 1x+4.138 7$	92	0.997 1
<i>40SRP</i>	$y=3.537 1x+4.449 5$	91	0.992 7

### 2.3 候选内参基因 CT 值分析

对不同光质处理下 12 个候选内参基因的 CT 值进行分析,发现 12 个内参基因的 CT 值均处于 18~26 之间,其中基因表达丰度较高的为 *UBC*、*eIF1*、*eIF5A*、*TUB*; 基因表达丰度为中等水平的是 *Actin1*、*40SRP*、*60SRP*; 基因表达丰度较低的是 *Actin2*、*Ras*、*GAPDH*、*Vps26* 和 *VSN*。同一基因在不同处理中的 CT 值波动幅度可反映其表达稳定性,波动值越小,基因稳定性越高。候选内参基因中稳定性较高的内参基因为 *Ras*、*40SRP*、*eIF1*、*GAPDH*; 稳定性中等的为 *Vps26*、*VSN*、*Actin1*、*UBC*、*60SRP*; 稳定性较差的为 *eIF5A*、*Actin2*、*TUB*(图 2)。对这些候选内参基因的表达稳定性进一步利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行定量分析。

### 2.4 候选内参基因表达稳定性分析

2.4.1 geNorm 分析 通过 geNorm 分析不同光质处理下候选内参基因的 CT 值,获得候选内参基因的 M 值。M 值越大,表明该基因作为内参基因的稳定性越低; M 值越小,稳定性越高; 当 M 值 > 1.5 时,不适宜作为内参基因。分析 12 个候选内参基因数

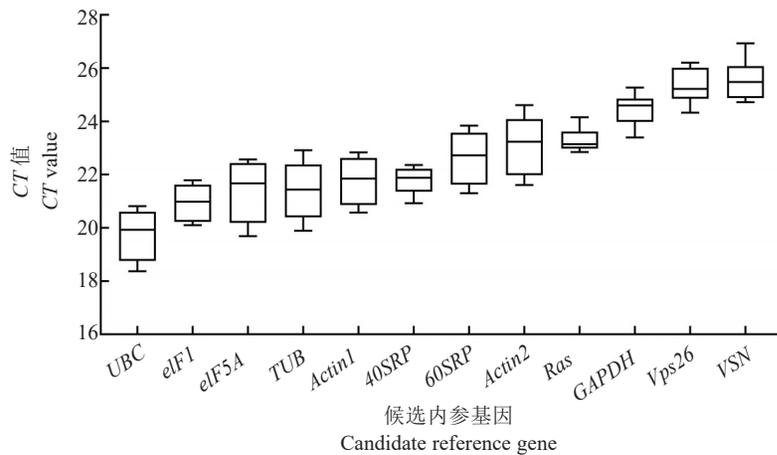


图 2 不同候选内参基因循环阈值(CT)

Fig. 2 Circulating threshold(CT) of different candidate reference genes

据,通过 M 值对其稳定性进行比较(图 3),发现 M 值均小于 1.5,其中 *UBC* 和 *60SRP* 的 M 值最小, *Actin1* 和 *eIF1* 次之,这些基因表达稳定性较高, *TUB* 和 *Actin2* 表达稳定性较差。

2.4.2 NormFinder 分析 通过 NormFinder 分析不同光质处理下候选内参基因的 CT 值,获得候选内参基因的 S 值。S 值越大,表明该基因作为内参基因的表达稳定性越低, S 值越小; 其作为内参基因的表达稳定性越高。分析结果得到候选内参基因的表达稳定性排名如图 4 所示, *eIF1* 的 S 值最低, 稳

定性最强, *UBC*、*Actin1* 和 *40SRP* 次之。此排名顺序与 geNorm 的结果有所差异。

2.4.3 BestKeeper 分析 通过 BestKeeper 分析不同光质处理下候选内参基因的 CT 值,获得候选内参基因的标准偏差(SD)和变异系数(CV)。CV 和 SD 越大,说明稳定性越弱,反之稳定性越强。当 SD > 1 时,基因的稳定性较差,不宜作为内参基因。如表 3 所示,试验中所选的 12 个基因 SD 均小于 1,其中 SD 相对小的为 *Ras*、*40SRP*、*Vps26* 和 *VSN*; CV 较低的基因为 *Ras*、*40SRP*、*Vps26*、*VSN*。对这 2

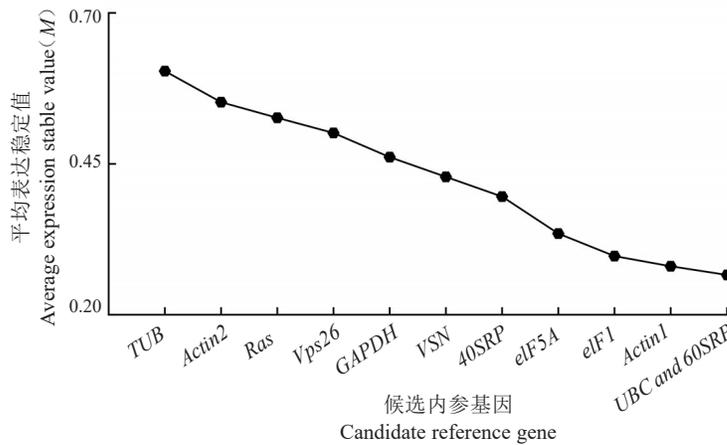


图3 不同候选内参基因在 geNorm 软件分析的 M 值

Fig. 3 The M value of different candidate reference genes was analyzed by geNorm software

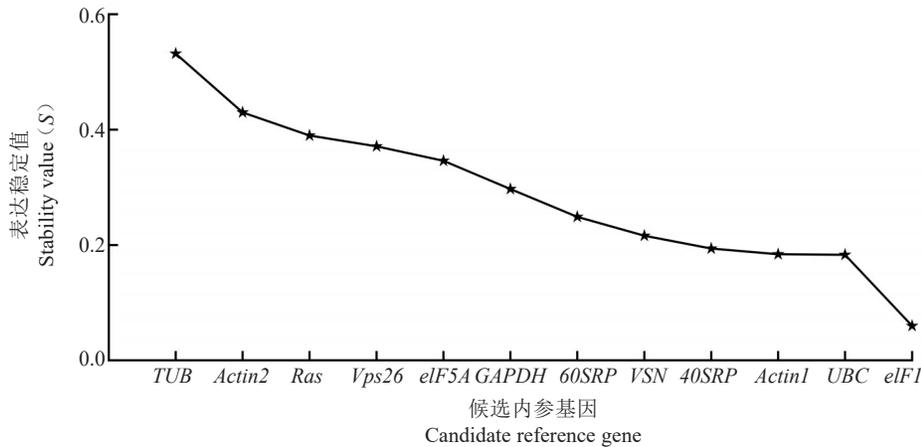


图4 不同候选内参基因在 NormFinder 软件的分析结果

Fig. 4 Analysis result of different candidate reference genes by NormFinder software

表3 BestKeeper 软件分析结果  
Table 3 Analysis result by BestKeeper

基因 Gene	标准偏差 SD	变异系数 CV	排名 Ranking
Ras	0.32(1)	1.37(1)	1
40SRP	0.43(2)	1.95(2)	2
Vps26	0.54(3)	2.12(3)	3
VSN	0.57(4)	2.25(4)	4
GAPDH	0.61(5)	2.76(5)	5
eIF1	0.63(6)	3.00(6)	6
Actin1	0.73(7)	3.35(7)	7
Actin2	0.78(8)	3.37(8)	8
60SRP	0.81(9)	3.59(9)	9
TUB	0.87(11)	4.08(10)	10
UBC	0.86(10)	4.36(11)	11
eIF5A	0.99(12)	4.60(12)	12

项参数进行排序,并通过几何平均数法得出 BestKeeper 分析中各基因的稳定性排名,结果显示,排名靠前的候选内参基因是 Ras、40SRP、Vps26、VSN、

GAPDH、eIF1 和 Actin1。

2.4.4 候选内参基因的综合分析 通过几何平均数法对 3 种软件的分析结果进行综合排序(图 5),发现 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 分析后的优势内参基因排名有所差异,geNorm 和 NormFinder 分析排名较为一致。结果表明,综合排名较靠前的基因为 eIF1、UBC、40SRP 和 Actin1,适合作为不同光质处理下的内参基因。TUB 和 Actin2 整体排名较靠后,不适合作为不同光质处理下的内参基因。

2.4.5 候选内参基因两两变异性分析 多项研究表明,仅使用一个内参基因进行靶基因表达量分析是不充分的,通常要 2 个及以上的内参基因对靶基因的表达量进行分析更为准确。通过 geNorm 对 12 个候选基因进行两两变异分析(图 6),以确定适合不同光质处理下参考基因的数量,当  $V_{n/n+1} < 0.15$  时,认为适合该条件下的参考基因数量为 n 个。在不同光质处理下  $V_{2/3} < 0.15$ ,意味着最适参考基因数量为 2 个。综合考

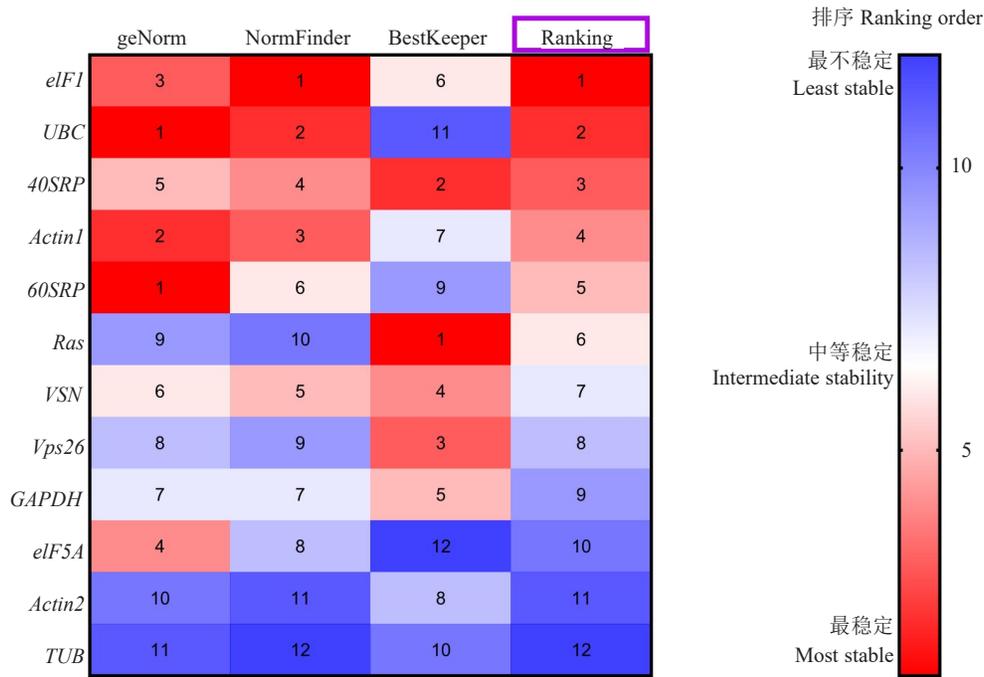


图5 不同候选内参基因的综合分析

Fig. 5 Comprehensive analysis ranking of different candidate reference genes

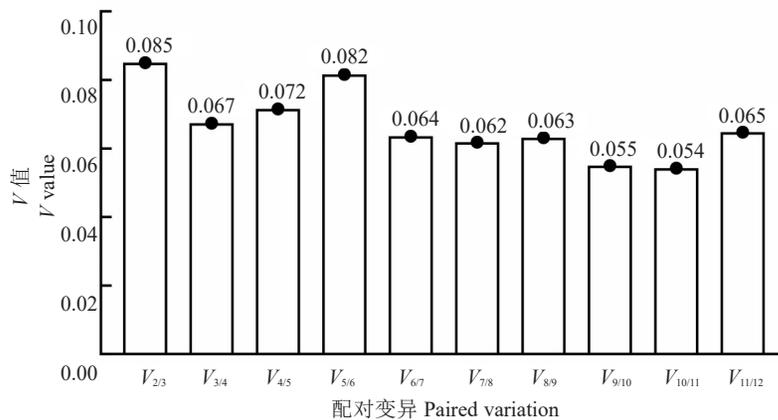


图6 不同候选内参基因两两变异性分析

Fig. 6 Pairwise variability analysis of different candidate reference genes

考虑上述对基因表达丰度和表达稳定性的分析结果,当靶标基因的表达量处于高水平时,*eIF1*和*UBC*可以作为最佳内参基因组合;对于中度和低表达水平的靶标基因,*40SRP*与*Actin1*可作为理想的内参基因组合。

### 3 讨论与结论

内参基因的选择对基因表达分析的准确性至关重要,对目标基因进行基因表达量分析之前,必须对内参基因的稳定性进行综合评估,以确保试验结果的可靠性和数据的准确性<sup>[23-24]</sup>。并非所有传统内参基因均适用于作为不同条件下的参照标准,这一现象可能归因于不同物种之间以及不同处理方

式下的生物学差异<sup>[1-3]</sup>。因此,精心挑选一个适宜的传统型内参基因对试验的准确性和可靠性至关重要。由于不同光质处理下内参基因的选择未见系统的报道,在本研究中,笔者对糙皮侧耳中内参基因的选择进行了深入分析,旨在评估不同光质处理下内参基因的稳定性。在丝状真菌中,传统的内参基因如 $\beta$ -*ACT*、 $\beta$ -*TUB*和*GAPDH*常被用于qRT-PCR试验中的标准化分析,但是Yang等<sup>[20]</sup>的研究中报道了3个新的内参基因*RNB*、*V-ATP*和*VAMP*在丝状真菌稳定性评估中表现出比传统内参基因更高的稳定性。笔者的研究表明,这些新型候选内参基因*RNB*、*V-ATP*和*VAMP*在不同光质

处理下的糙皮侧耳转录组中的表达量低且在不同处理组中相对不稳定,不再适合作为内参基因。

笔者通过基因荧光定量 PCR 获得 CT 值,并通过 geNorm、NormFinder、BestKeeper 软件对 12 个候选内参基因在不同光质处理下的表达稳定性进行了综合分析,发现在不同光质处理下,常规内参基因 *Actin2* 和 *TUB* 不再适合作为糙皮侧耳中的内参基因,这一发现与 *Trichoderma atroviride* 中 *Actin* 在光照条件下表达不稳定的研究结果一致<sup>[27]</sup>。在草菇中,*Actin* 不适合作为内参基因,而在热胁迫下糙皮侧耳中,*Actin* 可作为最佳内参基因<sup>[28]</sup>。此外,在橡胶灵芝菌<sup>[29]</sup>、天蓝苜蓿<sup>[30]</sup>中,*TUB* 不适合作为内参基因。而在茯苓<sup>[31]</sup>中, $\alpha$ -*TUB* 适合作为不同组织中的内参基因。这些结果显示,不同的生物学背景,不同的处理条件,常规内参基因的适用性也会发生改变。

本试验结果表明,不同光质处理下糙皮侧耳的 *eIF1*、*UBC*、*40SRP* 和 *Actin1* 基因表现出了较高的稳定性,适合作为最优内参基因的选择。其中,有关 *eIF1* 的这一结论与积雪草<sup>[32]</sup>、广藿香<sup>[33]</sup>、青钱柳<sup>[34]</sup>、魔芋<sup>[19]</sup>和黑麦草<sup>[35]</sup>等植物中 *eIF* 基因的高稳定性相一致,表明这些植物中 *eIF* 基因在不同条件下均能保持相对稳定的表达水平。然而,在斑地锦<sup>[36]</sup>、桑果<sup>[37]</sup>和樟叶越橘<sup>[38]</sup>中,*eIF* 基因则不适合作为内参基因,因为这些植物在特定条件下 *eIF* 基因的表达稳定性不足。在植物中,真核翻译起始因子 *eIF* 作为内参基因的应用较为广泛,但在食用菌中鲜有报道。同样,*40SRP* 和 *UBC* 在食用菌中的研究也较为有限。这些新型内参基因的鉴定为食用菌内参基因的选择提供了新的参考依据。

在选择内参基因时,除了考虑其表达稳定性外,还要考虑其表达量的平均值大小,要与目标基因相匹配。Yang 等<sup>[20]</sup>对内参基因选择时将其归为适用于不同表达水平靶标基因的内参基因。在本研究中,综合考虑基因表达丰度和表达稳定性,当靶标基因的表达量处于高水平时,*eIF1* 和 *UBC* 可以作为最佳内参基因组合;对于中度和低表达水平的靶标基因,*40SRP* 与 *Actin1* 的组合可作为理想的内参基因组合。这种划分可以使不同表达丰度的基因表达水平的计算更加科学。

综上所述,真核翻译起始因子编码基因(*eIF1*)、泛素结合酶编码基因(*UBC*)、40S 核糖体蛋白编码基因(*40SRP*)和肌动蛋白编码基因(*Actin1*)在 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种分析方法中的

表达稳定性均位于前列,其中 *eIF1* 和 *UBC* 可以作为靶标基因高丰度表达水平下的最佳内参基因组合,*40SRP* 和 *Actin1* 可作为靶标基因中、低丰度表达水平下的最佳内参基因组合。研究结果为不同光质处理下 qRT-PCR 的规范性和数据处理的保真性奠定了基础。

### 参考文献

- [1] FENG K, YANG Z Y, YAN Y J, et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization in different developmental stages of *Oenanthe javanica*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1287589.
- [2] IM J H, PARK C H, SHIN J H, et al. Effects of light on the fruiting body color and differentially expressed genes in *Flammulina velutipes*[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(6): 372.
- [3] YE D, DU F, HU Q X, et al. Transcriptome analysis reveals candidate genes involved in light-induced primordium differentiation in *Pleurotus eryngii*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 435.
- [4] KIM D Y, JANG M J, PARK Y J, et al. Transcriptome analysis identified candidate genes involved in fruit body development under blue light in *Lentinula edodes*[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(15): 6997.
- [5] LIU Y H, LUO Y, GUO W Z, et al. Study on the effects of different light supply modes on the development and extracellular enzyme activity of *Ganoderma lucidum*[J]. *Agriculture*, 2024, 14(6): 835.
- [6] YI Z L, HUANG W F, REN Y, et al. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 175: 139-143.
- [7] KALAČ P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(2): 209-218.
- [8] KHAN M A, TANIA M. Nutritional and medicinal importance of *Pleurotus Mushrooms*: An overview[J]. *Food Reviews International*, 2012, 28(3): 313-329.
- [9] SINGH C, ROY-CHOWDHURI S. Clinical applications of PCR[M]. New Jersey: Humana Press, 2016.
- [10] ZHANG J, HE X Y, ZHOU J, et al. Selection and verification of standardized reference genes of *Angelica dahurica* under various abiotic stresses by real-time quantitative PCR[J]. *Genes*, 2024, 15(1): 79.
- [11] ZHU L F, YANG C Q, YOU Y H, et al. Validation of reference genes for q RT-PCR analysis in peel and flesh of six apple cultivars (*Malus domestica*) at diverse stages of fruit development[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 244(3): 165-171.
- [12] LIU W, YU J, WANG Y F, et al. Selection of suitable internal controls for gene expression normalization in rats with spinal cord injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2022, 17(6): 1387-1392.
- [13] KREUZER K A, LASS U, LANDT O, et al. Highly sensitive

- and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of  $\beta$ -actin transcripts as quantitative reference[J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(2):297-300.
- [14] 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):research0034.1.
- [15] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTOF 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.
- [16] MICHAEL W P, ALE T, CHRISTIAN P, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best keeper-excel-based tool using pair-wise correlations[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6):509-515.
- [17] GUO W, YANG Y H, MA B, et al. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Euonymus japonicus* based on RNA sequencing[J]. *Genes*, 2024, 15(1):131.
- [18] ZHU Z P, YU J X, TANG X H, et al. Selection and validation of reference genes in different tissues of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under different abiotic stresses[J]. *Genes*, 2023, 14(3):603.
- [19] LIU Y L, ZHANG C C, HARIJATI N N, et al. Selection and evaluation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Amorphophallus Konjac* based on transcriptome data[J]. *Genes*, 2023, 14(8):1513.
- [20] YANG Y Y, XU X Y, JING Z H, et al. Genome-wide screening and stability verification of the robust internal control genes for RT-qPCR in filamentous fungi[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(9):952.
- [21] 王文沛, 谭强飞, 程志虹, 等. 草菇不同菌株 RT-qPCR 参考基因筛选[J]. *菌物学报*, 2022, 41(5):749-758.
- [22] TAO Y X, VAN PEER A F, HUANG Q H, et al. Identification of novel and robust internal control genes from *Volvariella volvacea* that are suitable for RT-qPCR in filamentous fungi[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:29236.
- [23] SALATIELLO F, GERDOL M, PALLAVICINI A, et al. Comparative analysis of novel and common reference genes in adult tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1):349.
- [24] VERBRUGGHE E, PASMANS F, MARTEL A. Reference gene screening of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* for quantitative real-time PCR studies[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:18534.
- [25] 胡延如, 邵玉强, 陈浩澜, 等. 糙皮侧耳热胁迫背景下 RT-qPCR 内参基因的筛选[J]. *菌物研究*, 2023, 21(增刊1):200-206.
- [26] 潘红, 赖呈纯, 张静, 等. 不同光质条件下刺葡萄红色愈伤组织的 RT-qPCR 内参基因筛选[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(6):1407-1413.
- [27] DONG X M, ZHANG W, ZHANG S B, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of development and tissue-dependent flower color formation in *Cymbidium lowianum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2):738.
- [28] 侯志浩, 赵梦然, 陈强, 等. 热胁迫下糙皮侧耳实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. *食用菌学报*, 2019, 26(3):11-18.
- [29] 赵欣阳, 罗佑红, 蔡海滨, 等. 橡胶灵芝菌内参基因筛选与分析[J]. *福建农业学报*, 2024, 39(5):615-622.
- [30] 张德辉, 孙亚丽, 赵亮, 等. 天蓝苜蓿锌胁迫下实时定量 PCR 内参基因筛选[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(3):833-838.
- [31] 赵小龙. 茯苓 qRT-PCR 内参基因筛选的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016.
- [32] 罗家佳, 零唯, 明如宏, 等. 积雪草实时荧光定量 PCR 内参基因筛选和验证[J/OL]. *分子植物育种*, 1-13(2023-07-26). <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230725.0954.002.html>.
- [33] 王本松, 陈柏霖, 巫锴丽, 等. 广藿香实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J/OL]. *分子植物育种*, 2023, 1-20(2023-07-19). <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230719.1241.004.html>.
- [34] 瞿印权, 陈小玲, 陈必芹, 等. 青钱柳实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(24):8133-8140.
- [35] 严海东, 蒋晓梅, 张新全, 等. 非生物胁迫下多年生黑麦草 qRT-PCR 分析中内参基因的选择[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(12):1494-1501.
- [36] 宋美玲, 黄胜和, 陈祖杰, 等. 斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛选[J]. *广西植物*, 2022, 42(2):340-348.
- [37] 可尔木拉·依地力斯, 晁楠, 刘宁远, 等. 桑果 qRT-PCR 候选内参基因的表达稳定性评估[J]. *蚕业科学*, 2021, 47(4):387-392.
- [38] 蒲芝雨, 杨玉菊, 张安勉, 等. 7 个候选内参基因在樟叶越橘不同组织中的表达及稳定性分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2023, 38(5):868-877.