

网络出版时间:2015-12-02 14:25 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.01.010
网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.020.html

大豆 Pre-miRNAs 作为内参基因在盐碱胁迫下的表达稳定性分析

周永刚^{1a,1b}, 王 骥², 刘伟灿^{1a,1b}, 邓 宇^{1a,1b}, 李晰亮^{1a,1b}, 靳 京^{1a,1b},
邓文波^{1a,1b}, 赵利旦^{1a,1b}, 王兴超^{1a,1b}, 王 南^{1a,1b}, 王法微^{1a,1b},
李晓薇^{1a,1b}, 董园园^{1a,1b}, 李海燕^{1a,1b}

(1 吉林农业大学 a 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, b 生命科学学院, 吉林 长春 130118;

2 东北师范大学 附属中学, 吉林 长春 130118)

【摘要】 【目的】对比大豆 Pre-miRNAs 候选内参基因和传统内参基因的表达稳定性, 筛选出适合盐、碱胁迫条件下 RT-qPCR 分析的最稳定内参基因。【方法】选用了 6 个保守的 Pre-miRNAs 基因和 4 个常规的内参基因作为候选内参基因, 通过 RT-qPCR 的方法, 利用 GeNorm 和 NormFinder 软件, 评价了 10 个候选内参基因在大豆盐、碱胁迫条件下的稳定性。【结果】大豆盐胁迫下, 叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR166 和 Pre-miR172, 表达最稳定的单一基因是 *FboX*; 根中表达最稳定的基因组合是 *Act11* 和 *EF1A*, 表达最稳定的单一基因是 *Act11*。大豆碱胁迫下, 叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR393 和 Pre-miR172, 表达最稳定的单一基因是 Pre-miR393; 根中表达最稳定的基因组合是 *Act11* 和 *60S*, 表达最稳定的单一基因是 Pre-miR172。【结论】大豆 Pre-miRNAs 可以与传统内参基因一样作为内参定量目的基因。

【关键词】 大豆; 盐胁迫; 碱胁迫; 荧光定量 PCR; Pre-miRNAs(前体 miRNAs); 内参基因

【中图分类号】 Q-03; S-3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)01-0061-07

Stability of Pre-miRNAs in soybean as reference genes for quantitative polymerase chain reaction under salt and alkali stresses

ZHOU Yong-gang^{1a,1b}, WANG Qi², LIU Wei-can^{1a,1b}, DENG Yu^{1a,1b}, LI Xi-liang^{1a,1b},
JIN Jing^{1a,1b}, DENG Wen-bo^{1a,1b}, ZHAO Li-dan^{1a,1b}, WANG Xing-chao^{1a,1b},
WANG Nan^{1a,1b}, WANG Fa-wei^{1a,1b}, LI Xiao-wei^{1a,1b},
DONG Yuan-yuan^{1a,1b}, LI Hai-yan^{1a,1b}

(1 a Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development,

b College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 High School Attached to Northeast Normal University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 This study selected the appropriate reference genes for RT-qPCR by comparing the stability of candidate precursor miRNAs and traditional housekeeping genes in different tissues of soybean under different stress treatments. 【Method】 Six conservative Pre-miRNAs genes and four regular

【收稿日期】 2014-05-20

【基金项目】 国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08010-002); 国家自然科学基金项目(31271746, 31201144); 吉林省发改委项目(JF2012C002-04)

【作者简介】 周永刚(1989-), 男, 吉林图们人, 在读硕士, 主要从事植物抗逆分子生物学与基因工程研究。

E-mail: 31789632@qq.com

【通信作者】 李海燕(1971-), 女, 吉林长春人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物抗逆分子生物学与基因工程研究。

E-mail: hyl99@163.com

housekeeping genes in soybean were selected as candidate reference genes to evaluate their expression stability under salt and alkali stresses during RT-qPCR process using GeNorm and NormFinder. 【Result】 In leaves, the most stable combination of genes under salt stress was Pre-miR166 and Pre-miR172 whereas the best single gene under this stress was *FboX*. While, in roots, the most stable combination of genes under salt stress was *Act11* and *EF1A* whereas the best single gene was *Act11*. Under alkali stress conditions, the most stable combination of genes in leaves was Pre-miR393 and Pre-miR172 whereas the best single gene was Pre-miR393. The most stable combination of genes in roots was *Act11* and 60S whereas the best single gene was Pre-miR172. 【Conclusion】 Precursor miRNAs reference genes can be used as reference genes together with traditional housekeeping genes.

Key words: soybean; salt stress; alkali stress; RT-qPCR; Pre-miRNAs; reference gene

荧光定量 PCR 是一种快捷、准确、强大的定量分析技术,但其结果的可靠性取决于内参基因是否稳定^[1-2]。传统内参基因的选择通常选用构成细胞器骨架基本组分或参与生物体内基本代谢过程稳定表达的基因^[3-5]。但是,近年来的研究发现,在不同类型的细胞和组织中、发育的不同阶段以及各种试验条件等情况下,这些稳定表达基因的表达水平通常变异较大。由此发现,传统的内参基因并不能完全满足定量分析对内参基因的要求^[6]。因此,新种类内参基因的挖掘仍具有重要意义。

MicroRNA 在生物体内存在多种形式,如 Pri-miRNA、Pre-miRNA、成熟 miRNA。目前已有报道表明,成熟 miRNA 作为内参基因比传统内参基因具有更高的稳定性,它不仅可用于定量其他的成熟 miRNA,也可用于定量编码蛋白基因^[6]。而目前有关成熟 miRNA 基因的前身 Pre-miRNA 相比传统内参基因稳定性的评价尚未见报道。本研究选用 6 个保守的大豆 Pre-miRNAs 基因与 4 个传统内参基因,利用 GeNorm^[7] 和 NormFinder^[8] 软件,分析了盐、碱胁迫条件下大豆根和叶 2 种组织中的表达稳定性,并筛选出最适合 RT-qPCR 的内参基因,为进一步研究大豆盐、碱 2 种不同胁迫条件下的基因表达差异,以及应用 Pre-miRNAs 作为新的内参基因资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理方法

本试验使用大豆(Williams 82)品种作为基础研究材料。用改良的 Hoagland 培养液培养大豆,待大豆第 2 对复叶萌发时进行如下胁迫处理:(1)盐胁迫处理:110 mmol/L NaCl;(2)碱胁迫处理:110 mmol/L NaHCO₃。各处理胁迫 0,3,6,9 h 后,分别取根和叶片组织,在液氮中速冻后保存在 -80 °C 冰

箱,备用。

1.2 RNA 的提取

采用 RNAiso plus (Takara; Code No. 9108/9109)试剂对检测样本 Total RNA 进行提取,使用 Nanodrop2000 对 RNA 浓度和质量进行检测,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.3 反转录 cDNA

样品反转录采用 Takara 公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser-Perfect Real Time 试剂盒 (Takara; Code No. RR047A),具体操作依据试剂盒说明。将得到的 cDNA 在 -20 °C 保存。

1.4 候选看家基因的选择和引物设计

根据文献[9-12]中报道的与大豆相关的传统内参基因和本实验室已有的内参评价数据,选择了 4 个在大豆中最稳定的传统内参基因(*EF1A*、*FboX*、*Act11* 和 60S);并尝试选取了 6 个大豆 Pre-miRNA 基因 (Pre-miR156、Pre-miR166、Pre-miR167、Pre-miR171、Pre-miR172 和 Pre-miR393)作为候选内参基因。传统内参基因的引物设计可参常规荧光定量引物的设计原则。Pre-miRNAs 基因的引物设计与常规定量引物不同的是考虑了 Pre-miRNAs 家族各成员的同源性,设计的引物具有家族成员通用性。所有引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。

1.5 荧光定量 PCR

本研究采用 Takara 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) 试剂盒,其定量部分操作均在 Mx3000PTM Real time PCR 仪上进行,其操作系统为 Stratagene(Mx3000P)。每个样品设置 2 个重复和 NTC 对照。经优化后反应体系为:SYBR Premix Ex TaqTM (2×) 10 μL, PCR 正向引物 (10 μmol/L) 0.8 μL, PCR 反向引物 (10 μmol/L) 0.8

μL , Rox Reference Dye II (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , RT 62 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环。熔解曲线 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。
反应液 2.0 μL , DEPC 水 6 μL 。两步法 PCR 扩增
标准程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,

表 1 10 个候选基因引物序列及相关数据

Table 1 Primer sequences and characteristics of the 10 reference gene candidates

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	扩增产物 长度/bp Amplification length	基因功能 Function	数据库基因序列号 Accession No.
<i>Acl1</i>	GCGGGAAATTGTAAGGGATGT	TCGCCAATAGTGATGACCTG	141	细胞骨架结构蛋白 Cytoskeletal structural	(NCBI)NM_001252731.2
<i>EF1A</i>	GCCAGATTGGAATGGATACGC	AGCTCCTTACCAGATCGCCTGT	109	翻译延伸蛋白 Transcription elongation factor	(NCBI)XM_003553245.1
60S	GTCCTGAAGGCCATTCTAAG	ACTGATGCCTGCTCCAAC	131	核糖体蛋白 Ribosomal protein	(NCBI)XM_003551021.1
<i>FboX</i>	GAATCGGTGGGAGATTTAGCG	CCAAAGAGTGTCATCGGAAGC	120	FboX 蛋白质家族 FboX protein family	(NCBI)NM_001254106.2
Pre-miR156	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	GACAGGAAGAAAAGAGAGCAC	77~100	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase
Pre-miR166	GAGGTTGAGAGGAATGTTGTCT	TGGGTGTGGGAATGAAG	80~145	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase
Pre-miR167	GAAGTTCGCAAAGGAAAAGTG	GTCCCAAATAGGAAGGAGTG	119~121	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase
Pre-miR171	CTTGAGATATTGGTGC GGTTCA	CATGTGATATTGGCACGGCTC	76~102	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase
Pre-miR172	AGTCGTTATTTGCGGATGTAGC	GTGAAGTCGTTTATGGCTGATG	154~157	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase
Pre-miR393	GGAGGAGGCATCCAAAGGG	GGAGAAATCCAAAGGGATAGCAT	101~167	前体 miRNA miRNA precursor	miRBase

注:由于 Pre-miRNA 基因家族成员间的同源性较高,设计的引物具有基因家族通用性,因此同一对引物在不同家族成员中的扩增产物长度具有差异。

Note: Since the Pre-miRNA gene homology between family members is high, universal primers were designed with gene family. Therefore there are differences in the same primers for different members of the family.

1.6 数据分析

引物的扩增效率(E)和相关系数(R^2)计算公式为 $E = 10^{(-1/\text{斜率})} - 1$, 可由 Mx3000p 系统对样本稀释曲线各稀释点的测定结果自动计算得出。候选内参基因的表达稳定性分析采用 GeNorm^[7] 和 NormFinder^[8] 软件。GeNorm 软件可以显示逐步去除最不稳定候选内参基因后的各内参基因的平均表达稳定值 M , M 值越小, 说明基因表达越稳定; 同时, GeNorm 软件可给出内参基因的配对变异数 $V_{n/(n+1)}$ 柱形图, 该图显示了准确量化时需要选择的内参基因数目。 $V_{n/(n+1)}$ 的选择阈值为 0.15, 当 $V_{n/(n+1)} > 0.15$ 时, 表明需选择 n 个以上的基因组合作为量化标准; 当 $V_{n/(n+1)} \leq 0.15$ 时, 表明只需选择 n 个内参基因作为量化标准。 NormFinder 的运行原理与 GeNorm 程序类似, 也是通过计算基因表达稳定值 M , 然后根据稳定值 M 的大小排序, M 值越大稳定性越差; 反之, 具有最小稳定值 M 的基因为最稳定的基因。

2 结果与分析

2.1 盐碱胁迫后大豆叶和根总 RNA 质量检测

本研究利用 RNAiso plus 方法对胁迫后的大豆叶和根的总 RNA 进行了提取, 并用 Nanodrop2000 对其浓度和质量进行检测, 保证提取的 RNA $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.8~2.2, 最后对提取的 RNA 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 条带清晰, 质量完整, 无明显降解(图 1)。说明提取的 RNA 可以用于后续的反转录及实时荧光定量 PCR, 将其稀释至 800 ng/ μL , 放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

2.2 各候选内参基因引物 PCR 扩增效率及特异性

为了荧光定量分析的准确性, 本研究对 RT-qPCR 反应条件进行了优化, 确保了各候选内参基因引物的扩增效率在 95%~110%, 稀释曲线相关系数 $R^2 > 0.99$ (表 2), 符合 RT-qPCR 对引物扩增效率的基本要求。为了保证 10 个候选内参基因的引物特异性, 本研究对扩增产物进行了 1.0% 琼脂

糖凝胶电泳,结果显示扩增产物与目的片段大小一致,没有出现引物二聚体(图 2);同时 10 个候选内参基因的溶解曲线,也都只出现单一峰(图 3),且不

加模板的阴性对照检测不到荧光信号,说明各候选内参基因引物的特异性好。因此,各内参基因引物的扩增特性均符合 RT-qPCR 的要求。

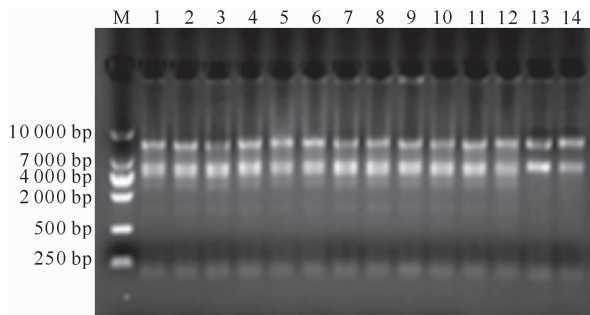


图 1 大豆总 RNA 样品的电泳检测结果
M. 10 000 bp DNA Marker;1~12. 随机抽取的大豆叶片样本;13~14. 随机抽取的大豆根样本

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for total RNA in soybean

M. 10 000 bp DNA Marker;1~12. Randomly selected samples of soybean leaves;13~14. Randomly selected samples of soybean roots

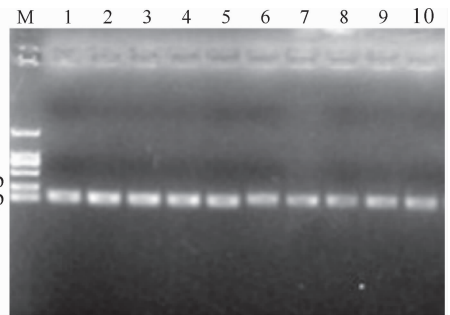


图 2 候选内参基因引物的荧光定量扩增产物电泳结果
M. 10 000 bp DNA Marker;1~10. 候选内参基因引物

Fig. 2 Electrophoresis of fluorescence quantitative PCR products of candidate primers

M. 10 000 bp DNA Marker;1~10. Candidates of primers

表 2 候选内参基因引物的扩增特性

Table 2 Primer amplification characteristics for each candidate reference gene

基因 Gene	扩增效率/% PCR efficiency	稀释曲线 相关系数 R^2	基因 Gene	扩增效率/% PCR efficiency	稀释曲线 相关系数 R^2
<i>Act11</i>	98.1	0.997	Pre-miR166	108.3	0.996
<i>EF1A</i>	95.3	1.000	Pre-miR167	99.9	0.996
60S	100.0	0.998	Pre-miR171	106.5	0.987
<i>FboX</i>	100.7	0.999	Pre-miR172	96.3	0.999
Pre-miR156	97.8	0.990	Pre-miR393	99.9	0.995

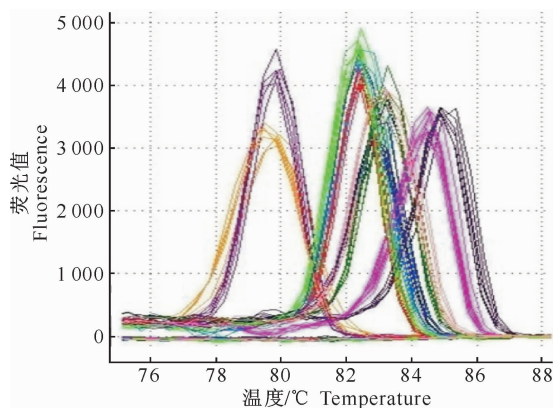


图 3 候选内参基因引物特异性扩增的溶解曲线

Fig. 3 Dissolution profiles for specific amplification of 10 candidate internal reference primers

2.3 大豆碱胁迫下候选内参基因的表达稳定性

为了发掘大豆碱胁迫下稳定表达的内参基因,本研究利用 GeNorm 和 NormFinder 软件,分别对大豆不同组织碱胁迫条件下 10 个候选内参基因的表达稳定性进行了评价。GeNorm 分析结果(图 4)显示,在碱胁迫下,各候选内参基因在大豆根、叶片

中的表达稳定性有所差异。其中在叶片中候选内参基因表达稳定性(根据稳定值 M 大小排序, M 值越小越稳定)由高到低依次为 Pre-miR393/Pre-miR172(0.142) $>$ *FboX*(0.154) $>$ *Act11*(0.180) $>$ Pre-miR166(0.223) $>$ 60S(0.268) $>$ *EF1A*(0.301) $>$ Pre-miR156(0.336) $>$ Pre-miR171(0.373) $>$ Pre-miR167(0.405);在根中候选内参基因表达稳定性由高到低依次为 *Act11*/60S(0.125) $>$ *EF1A*(0.234) $>$ *FboX*(0.286) $>$ Pre-miR167(0.346) $>$ Pre-miR172(0.383) $>$ Pre-miR171(0.431) $>$ Pre-miR156(0.485) $>$ Pre-miR166(0.528) $>$ Pre-miR393(0.577)。

GeNorm 柱形图分析结果(图 5)显示,所有的 $V_n/(n+1)$ 值都小于程序所推荐值 0.15,说明无需加入第 3 个基因进行校正,最合适的内参基因数目是 2 个。叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR393 和 Pre-miR172,根中表达最稳定的基因组合是 *Act11* 和 60S。同时, NormFinder 分析结果(表 3)显示,碱胁迫的叶片中 Pre-miR393 表达最稳定,而 Pre-

miR167、EF1A 和 Pre-miR156 表达稳定性差;碱胁迫的根中 Pre-miR172 表达最稳定,而 Pre-miR393、Pre-miR166 和 Pre-miR156 表达稳定性差。

综上所述,通过对比 GeNorm 和 NormFinder 分析结果,发现 2 种软件得到的结果基本一致,不同

的是 GeNorm 软件分析可得到内参基因的最优组合,而 NormFinder 软件只能选择单个最稳定的内参基因。尽管 2 种软件部分基因排序稍有不同,但这种差异经证实是由这 2 种软件计算方法不同引起的^[13-18]。

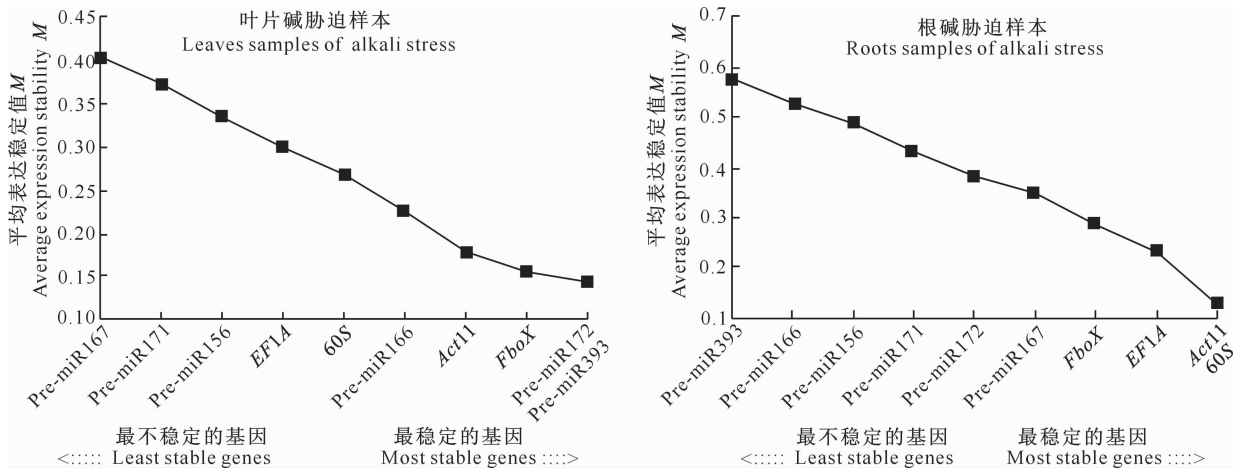


图 4 GeNorm 软件分析碱胁迫中内参基因的表达稳定值排序

Fig. 4 Ranking of candidate reference genes based on their expression stability under alkali stress calculated by GeNorm

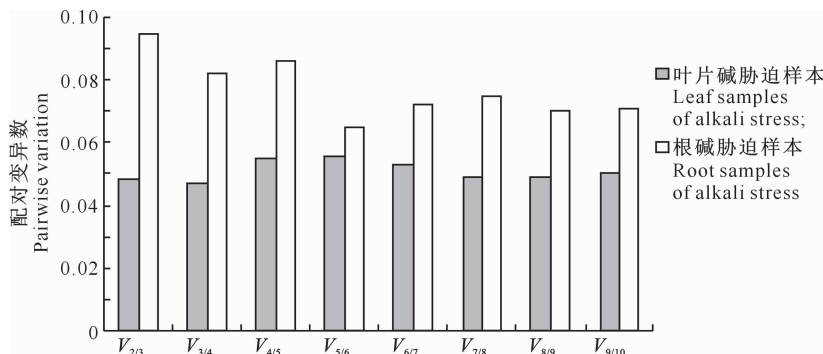


图 5 GeNorm 软件分析确定碱胁迫中用作标准化的最适内参基因数目

Fig. 5 Determination of the optimum number of reference genes for normalization under alkali stress calculated by GeNorm

表 3 NormFinder 软件分析碱胁迫下大豆叶片和根中内参基因的表达稳定值排序

Table 3 Ranking of candidate reference genes based on their expression stability under alkali stress calculated by NormFinder

稳定性排序 Order	叶 Leaves		根 Roots		稳定性排序 Order	叶 Leaves		根 Roots	
	基因 Gene	稳定值 Stability	基因 Gene	稳定值 Stability		基因 Gene	稳定值 Stability	基因 Gene	稳定值 Stability
1	Pre-miR393	0.045	Pre-miR172	0.095	6	Pre-miR166	0.199	60S	0.277
2	Act11	0.108	FboX	0.166	7	EF1A	0.258	Pre-miR167	0.327
3	Pre-miR172	0.109	EF1A	0.213	8	Pre-miR156	0.277	Pre-miR156	0.341
4	FboX	0.129	Act11	0.241	9	Pre-miR171	0.319	Pre-miR166	0.477
5	60S	0.182	Pre-miR171	0.268	10	Pre-miR167	0.340	Pre-miR393	0.484

2.4 大豆盐胁迫下候选内参基因的表达稳定性

为了发掘大豆盐胁迫下稳定表达的内参基因,本研究利用 GeNorm 和 NormFinder 软件分别对大豆不同组织盐胁迫条件下,10 个候选内参基因的表达稳定性进行了评价。GeNorm 分析结果(图 6)显示,在盐胁迫下叶中候选内参基因表达稳定性从高

到低依次是 Pre-miR166/Pre-miR172 (0.076) > FboX(0.097) > Pre-miR171(0.146) > Pre-miR167 (0.171) > Pre-miR393(0.213) > Act11(0.248) > 60S(0.275) > EF1A(0.301) > Pre-miR156 (0.346);根中候选内参基因稳定性从高到低依次是 Act11/EF1A(0.038) > 60S(0.093) > FboX

(0.122) > Pre-miR172 (0.145) > Pre-miR156 (0.166) > Pre-miR393 (0.187) > Pre-miR166 (0.240) > Pre-miR171 (0.301) > Pre-miR167 (0.414)。同时, GeNorm 柱形图分析结果(图 7)显示, 所有的 $V_{n/(n+1)}$ 值都小于程序所推荐值 0.15, 说明无需加入第 3 个基因进行校正, 最合适的内参基因数目是 2 个。叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR166 和 Pre-miR172, 根中表达最稳定的基因组

合是 *Act11* 和 *EF1A*。NormFinder 分析结果(表 4)显示, 盐胁迫的叶片中候选内参基因 *FboX* 表达最稳定, 而 Pre-miR156、Pre-miR167 和 *EF1A* 表达稳定性差; 盐胁迫的根中 *Act11* 表达最稳定, 而 Pre-miR166、Pre-miR171 和 Pre-miR156 表达稳定性差。综上所述, 通过对比 GeNorm 和 NormFinder 分析结果, 发现 2 种软件得到的结果基本一致。

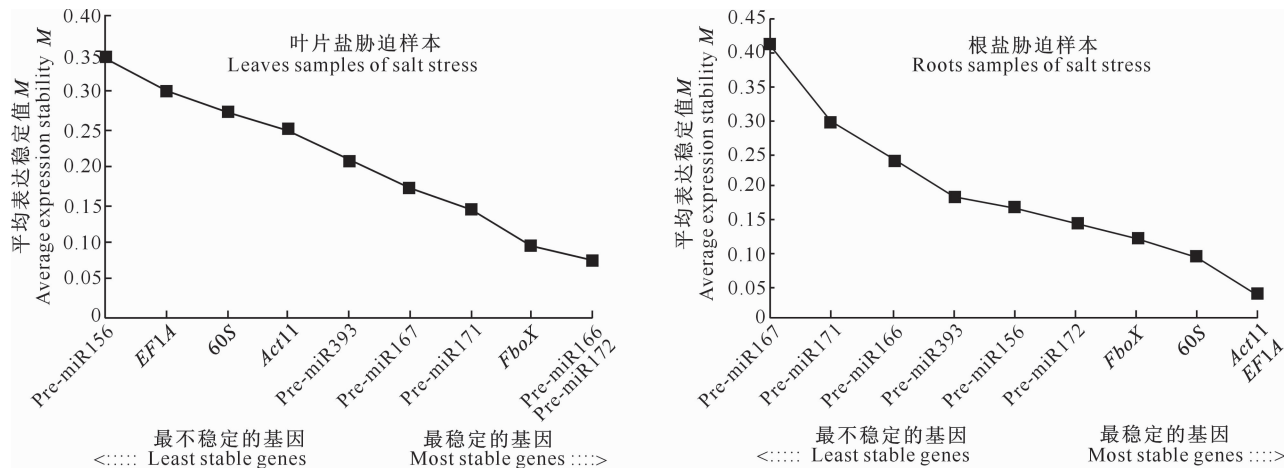


图 6 GeNorm 软件分析盐胁迫中内参基因的表达稳定值排序

Fig. 6 Ranking of candidate reference genes based on their expression stability under salt stress calculated by GeNorm

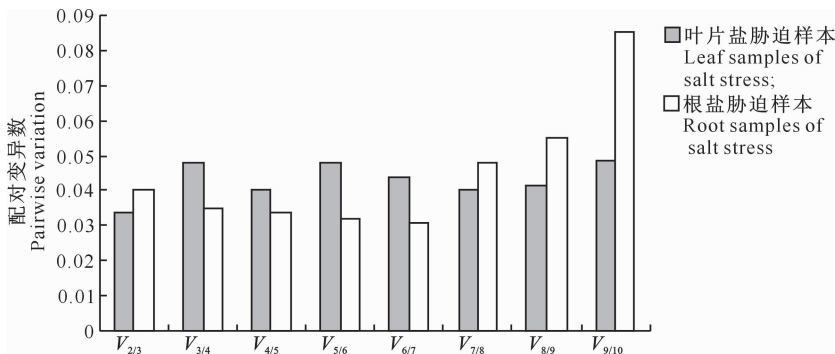


图 7 GeNorm 软件分析确定盐胁迫中用作标准化的最适内参基因数目

Fig. 7 Determination of the optimum number of reference genes for normalization under salt stress calculated by GeNorm

表 4 NormFinder 软件分析盐胁迫下大豆叶片和根中内参基因的表达稳定值排序

Table 4 Ranking of candidate reference genes based on their expression stability calculated by NormFinder

稳定性排序 Order	叶 Leaves		根 Roots		稳定性排序 Order	叶 Leaves		根 Roots	
	基因 Gene	稳定值 Stability	基因 Gene	稳定值 Stability		基因 Gene	稳定值 Stability	基因 Gene	稳定值 Stability
1	<i>FboX</i>	0.036	<i>Act11</i>	0.013	6	60S	0.190	Pre-miR156	0.122
2	Pre-miR166	0.074	<i>EF1A</i>	0.013	7	Pre-miR171	0.191	Pre-miR393	0.155
3	Pre-miR172	0.081	60S	0.036	8	<i>EF1A</i>	0.229	Pre-miR166	0.296
4	<i>Act11</i>	0.129	<i>FboX</i>	0.036	9	Pre-miR167	0.239	Pre-miR171	0.394
5	Pre-miR393	0.154	Pre-miR172	0.058	10	Pre-miR156	0.332	Pre-miR167	0.587

3 结论与讨论

荧光定量 PCR 是一个功能强大的定量分析技术, 为了确保试验结果的准确性和可靠性, RT-

qPCR 需要选用合适的内参基因作为基因表达分析时衡量目的基因表达量的参照标准, 以消除不同样品间可能存在的差异, 通常选用的内参基因是表达较为稳定的看家基因^[18]。但是, 近年来大量的研究

结果表明,并没有绝对稳定表达的基因,任何一种内参基因的稳定只是在一定试验条件下的相对稳定^[6,19]。因此,如何选择一个合适的内参基因就显得尤为重要。

本研究选用了 6 个保守的大豆 Pre-miRNAs 基因和 4 个传统内参基因作为候选内参基因,利用 GeNorm 和 NormFinder 软件,分析了 10 个候选内参基因在大豆盐、碱胁迫下根和叶 2 种组织中的表达稳定性,结果显示,大豆盐胁迫下,叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR166 和 Pre-miR172,表达最稳定的单一基因是 *FboX*,根中表达最稳定的基因组合是 *Act11* 和 *EF1A*,表达最稳定的单一基因是 *Act11*;大豆碱胁迫下,叶中表达最稳定的基因组合是 Pre-miR393 和 Pre-miR172,表达最稳定的单一基因是 Pre-miR393,根中表达最稳定的基因组合是 *Act11* 和 60S,表达最稳定的单一基因是 Pre-miR172。值得注意的是,Pre-miRNAs 在大豆盐、碱胁迫的叶中表达稳定性优于传统内参基因,分析原因可能有以下几个方面:其一,Pre-miRNAs 作为小分子 RNA 受 RNA 降解影响更小;其二,Pre-miRNAs 比传统的内参基因表达丰度较低,更适用于定量分析表达丰度较低的目标基因^[12,19];其三,Pre-miRNAs 基因为小分子 RNA,其反转录必须使用随机引物,而传统看家基因反转录常使用 oligodT,这可能会使二者的反转录效率不同而影响基因表达水平的可比性。

综上所述,Pre-miRNAs 基因作为新的内参基因资源为研究者提供了新的参考。另外,Pre-miRNAs 作为内参基因可使用与编码蛋白基因定量分析相同的普通定量试剂体系,不增加技术困难和成本。因此,进一步开发和研究 Pre-miRNAs 内参基因具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1736-1737.
- [2] Le D T, Aldrich D L, Valliyodan B, et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46487.
- [3] Stolf-Moreira R, Lemos E G M, Carareto-Alves L, et al. Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29: 19-34.
- [4] Tran L S, Quach T N, Guttikonda S K, et al. Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean [J]. *Mol Genet Genomics*, 2009, 281: 647-664.
- [5] Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress [J]. *DNA Res*, 2011, 18: 17-29.
- [6] Franceli R K, Francismar C M, Alexandre L N, et al. The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 406(2): 185-192.
- [7] Jo V, Katleen D P, Filip P, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): research0034. 1-research0034. 11.
- [8] Andersen C L, Jensen J L. 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 Res*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [9] Libault M, Thibivilliers S, Bilgin D D. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization [J]. *Plant Genome*, 2008, 7: 44-54.
- [10] Hu R, Fan C, Li H, et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2009(10): 93.
- [11] Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *J Exp Bot*, 2005(56): 2907-2914.
- [12] 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: 112-119.
- [13] Jian B, Liu B, Yu R B, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2008(9): 59.
- [14] Viviande J M, Roberta R C, Antônio A B V, et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack [J]. *BMC Research Notes*, 2013, 6: 196.
- [15] Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, et al. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation [J]. *Trends Plant Sci*, 2007(12): 301-309.
- [16] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs [J]. *Cell*, 2009(136): 669-687.
- [17] Voinnet O. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: A touch of robustness and versatility [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008(11): 464-470.
- [18] Ma S, Niu H, Liu C, et al. Expression stabilities of candidate reference genes for RT-qPCR under different stress conditions in soybean [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75271.
- [19] de Oliveira L A, Breton M C, Bastolla F M, et al. Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(2): 405-422.