

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.02.018

# 扩展青霉菌实时定量 PCR 内参基因挖掘与应用

张真真<sup>1</sup>, 蒋礼玲<sup>2</sup>, 李婉忻<sup>1</sup>, 王谨凡<sup>1</sup>, 贾举庆<sup>3</sup>, 黄胜雄<sup>1</sup>

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016; 3. 山西农业大学 农学院, 山西 晋中 030801)

**摘要:**实时定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术因其高效且便捷的特点在基因表达检测中被广泛应用。实时定量 PCR 结果数据处理策略之一是使用内参基因进行基因表达数据的标准化。文章基于扩展青霉菌孢子不同生长阶段的 RNA-seq 数据,挖掘和注释了 694 个稳定表达的候选内参基因;随机挑选出 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase* 在内的 14 个基因,以 4、25 °C 条件下 PDB 培养基生长 6、12、24、36 h 的扩展青霉菌为材料,进行实时定量 PCR 实验。实时定量 PCR 数据基于 geNorm 和 NormFinder 2 种软件的综合分析,表明 *Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1* 适合作为内参基因。以 *Isy1* 和 *Spt5* 分别作为内参基因,检测 *Gh30* 基因在 4、25 °C 条件下扩展青霉菌生长发育过程中的基因表达,显示出一致的基因表达水平,进一步验证了挖掘得到的内参基因的可靠性。该研究为扩展青霉菌的分子生物学研究提供了优良的内参基因,同时提供了一种高效的内参基因的挖掘和鉴定方法。

**关键词:**内参基因;扩展青霉菌;RNA-seq 数据;实时定量聚合酶链式反应(PCR);稳定性

中图分类号:Q786

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2023)02-0261-07

## Exploitation and application of internal reference genes for qRT-PCR in *Penicillium expansum*

ZHANG Zhenzhen<sup>1</sup>, JIANG Liling<sup>2</sup>, LI Wanxin<sup>1</sup>, WANG Jinfan<sup>1</sup>, JIA Juqing<sup>3</sup>, HUANG Shengxiong<sup>1</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; 3. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

**Abstract:** Based on efficient and convenient characterization, the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) technology is widely applied in gene expression analyses. Currently, one important strategy of result data processing is expression data normalization based on internal reference genes. In this study, 694 stably expressed genes were identified in the RNA-seq data from the spores of *Penicillium expansum* in different growth stages. Through qRT-PCR experiments, the gene expression levels of 14 randomly selected genes, including *Knr4*, *Isy1*, *Spt5*, *Nucb*, *Hp1*, *Hp2*, *Whth*, *Hp3*, *Gph3*, *Pwi*, *Taf4*, *Hp4*, *Asy* and *GTPase*, were determined in *P. expansum* after 6, 12, 24, and 36 hours cultivation in PDB medium at 4 °C and 25 °C, respectively. Analyzed through geNorm and NormFinder, *Isy1*, *Spt5*, *Nucb* and *Hp1* were proved to be suitable as internal reference genes. Using *Isy1* and *Spt5* as internal reference genes, the expression profiles of *Gh30* gene were verified in *P. expansum* of different growth stages at 4 °C and 25 °C, respectively, showing consistent expression profiles. The results could provide well internal reference genes for molecular studies on

收稿日期:2021-03-22;修回日期:2021-04-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31461143008);农业农村部农业资源环境保护资助项目(125A0605)和徐州医科大学开放基金资助项目(XYKF202104)

作者简介:张真真(1993—),女,河南周口人,合肥工业大学硕士生;

黄胜雄(1983—),男,四川眉山人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:hsx926@hfut.edu.cn.

*P. expansum*, and an efficient method for the exploitation and verification of internal reference genes.

**Key words:** internal reference gene; *Penicillium expansum*; RNA-seq data; quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR); stability

## 0 引言

内参基因可以定义为在特定条件下预期表达水平不受影响的基因,其在不同的实验处理条件下或不同组织、器官中可稳定地表达<sup>[1-2]</sup>。实时定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是最常用的检测基因表达水平和验证 RNA-seq 结果数据的技术方法<sup>[3]</sup>。结合目标基因与内参基因的实时定量 PCR 数据进行适当的标准化,可以得到精确且可以相互比较的目标基因的表达值。标准化依赖于所选择的内参基因,不稳定表达的内参基因将显著影响目标基因表达定量的准确性和可靠性。

18S 核糖体 rRNA(18S rRNA)、肌动蛋白基因(ACT)、延伸因子基因(EF-1 $\alpha$ )、微管蛋白基因(TUB)、聚泛素基因(UBQ)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH)等<sup>[4-6]</sup>管家基因(HKGs)参与基本的细胞过程,被认为具有稳定的表达水平,经常被广泛作为内参基因使用。越来越多的研究表明,部分管家基因在不同生长、发育阶段或不同处理条件下的组织材料中的表达水平存在较大的波动<sup>[7-9]</sup>。

因此,对于特定的实验材料,开发和鉴定特异的内参基因很有必要。目前在生物学研究中,基于 geNorm<sup>[10]</sup>、NormFinder<sup>[11]</sup>、BestKeeper<sup>[6]</sup> 在内的生物软件对实时定量 PCR 数据的统计分析,已经成功筛选得到适用于不同特异的实验材料所需的内参基因。微生物研究中,内参基因的研究多集中于对传统内参基因稳定性的评估,新的内参基因的开发研究较少<sup>[12-13]</sup>。有研究者认为可以根据基因的功能类别,发现新的内参基因,选择适合特定微生物物种的特定内参基因<sup>[14]</sup>。文献<sup>[15]</sup>基于基因功能注释,利用实时定量 PCR,通过 geNorm、NormFinder、RefFinder 软件评价,筛选出适用于柑橘黄龙病细菌感染不同寄主及感染不同时期的新内参基因 *ftsZ* 和 *gyrA*。文献<sup>[16]</sup>基于转录组测序,采用 geNorm 和 NormFinder 软件筛选及定量验证发现了优于传统内参基因的 *glyS* 和 *degV* 基因更适合作为嗜热链球菌的新内参基因。

扩展青霉菌(*Penicillium expansum*)属于青

霉菌属<sup>[17]</sup>,侵染苹果、猕猴桃、柑橘等水果果实,造成大规模的经济损失。目前,扩展青霉菌的研究主要集中在基因组学、毒力基因的挖掘、棒曲霉素代谢等方面。40S ribosomal protein S24 (PEX2.023930)基因常常被作为实时定量 PCR 的内参基因,但其在扩展青霉菌不同生长阶段存在稳定的基因表达水平尚未得到验证。目前,扩展青霉菌缺乏系统的筛选和评估内参基因的研究,随着扩展青霉菌中分子生物学研究的深入开展,开发和验证新的内参基因具有重要的意义和应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物材料

扩展青霉菌由以色列农业部农业研究组 Samir Droby 教授提供,由本课题组保存。

### 1.2 基于 RNA-seq 的候选内参基因挖掘和注释

用灭菌枪头刮取 PDA 平板上培养 7 d 的扩展青霉菌的孢子,悬浮于含 0.02% Tween-20 的蒸馏水中,调制为  $10^8$  个/mL 孢子液。取该孢子液 2 mL 加入到 30 mL PDB 液体培养基中,分别置于 4、25 °C 条件下 180 r/min 振荡培养,在生长 8、12 h 时分别离心收集菌体,液氮中冷冻 1 h 以上,将菌体样品送派森诺公司进行转录组测序。

基于 RNA-seq 的基因表达值,候选内参基因的筛选标准如下:转录组数据中基因表达值的平均值  $\geq 15$  FPKM,且变异系数  $\leq 0.15$ 。满足以上条件的基因被筛选鉴定为候选内参基因。利用 Blast2GO 软件进行候选内参基因在基因本体(gene ontology, GO)数据库中的注释。

### 1.3 候选内参基因实时定量 PCR 引物设计

从 RNA-seq 数据鉴定的候选内参基因中随机挑选 14 个基因(*Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase*)进行后续研究。利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)引物设计软件 Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi))进行实时定量 PCR 实验的引物设计。所有设计的引物退火温度为 58~62 °C。实时定

量 PCR 扩增的条带大小限制在 80 ~ 200 bp 之间。

#### 1.4 总 RNA 提取和 cDNA 反转录合成

在 4、25 °C 条件下 180 r/min, PDB 液体培养基中生长 6、12、24、36 h 的扩展青霉菌,离心弃上清, -80 °C 超低温冰柜保存备用。

利用 RNA 提取试剂 TransZol UP(TransGen, China) 进行扩展青霉菌总 RNA 的提取。cDNA 反转录合成的 20  $\mu$ L 反应体系的主要成分如下: 2  $\mu$ g 的总 RNA, 2  $\mu$ L 的 5 $\times$ gDNA Buffer, 2  $\mu$ L 的 10 $\times$  King RT Buffer, 1  $\mu$ L 的 FastKing RT Enzyme Mix (TIANGEN, China), 2  $\mu$ L 的 FQ-RT Primer Mix, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补足到 20  $\mu$ L。反应条件如下: 42 °C, 15 min; 95 °C, 3 min。

#### 1.5 实时定量 PCR 扩增体系与反应条件

利用 LightCycler 96 PCR System (Roche, Swiss) 进行基因的实时定量 PCR。20  $\mu$ L 的反应体系如下: 0.5  $\mu$ L 的 cDNA, 10  $\mu$ L 的 2 $\times$ Super-Real Color PreMix (TIANGEN, China), 0.5  $\mu$ L 的 Dilution Buffer, 引物各 0.6  $\mu$ L, 7.8  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O。

反应条件如下: 95 °C, 15 min; 95 °C, 10 s, 60 °C, 30 s, 重复 40 个循环; 然后从 60 °C 升温到 95 °C 进行熔解曲线分析。每个样品重复 3 次实时定量 PCR 实验。

#### 1.6 候选内参基因的稳定性分析

本文利用 LightCycler 96 PCR System 自带

软件导出实时定量 PCR 的结果数据(C<sub>q</sub> 值)。将 C<sub>q</sub> 值作为输入数据, 分别在 geNorm<sup>[11]</sup>、Norm-Finder<sup>[12]</sup> 软件中进行候选内参基因的表达稳定性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选内参基因的挖掘和注释分析

RNA-seq 数据包括 4、25 °C 条件下, 分别在 PDB 液体培养基生长 8、12 h 的扩展青霉菌孢子的基因表达值。首先, 设置基因在 4 个样品中的基因表达值的平均值  $\geq$  15 FPKM, 过滤掉低表达不可信的基因; 其次, 设置 4 个样品之间基因表达值的变异系数  $\leq$  0.15, 筛选稳定表达的基因, 过滤掉不同样品之间基因表达水平差异大的基因; 最后, 满足以上条件的共有 694 个基因被鉴定为候选内参基因, 约占全基因组编码基因的 6% (694/11 060)。

利用 Blast2GO 软件, 在 GO 数据库进行了 694 个候选内参基因的 GO 注释, 提取了“Molecular Function”模块中的功能注释。“Molecular Function”模块中基因富集最多的 9 个 GO 条目见表 1 所列。从表 1 可以看出, 最多有 15 个基因富集在 2 级 GO 条目“Binding”; 在 3 级 GO“Heterocyclic compound binding”和“Organic cyclic compound binding”条目中, 均存在于 9 个基因定位中。从富集结果看, 这些稳定表达的基因主要涉及催化和结合两大功能。

表 1 “Molecular Function”模块中的 9 个富集 GO 条目

GO 级	GO 编号	GO 注释	基因数目
2	GO:0005488	Binding	15
2	GO:0003824	Catalytic activity	5
3	GO:1901363	Heterocyclic compound binding	9
3	GO:0097159	Organic cyclic compound binding	9
3	GO:0043167	Ion binding	8
4	GO:0003676	Nucleic acid binding	6
4	GO:0043169	Cation binding	5
5	GO:0003677	DNA binding	4
5	GO:0046872	Metal ion binding	5

### 2.2 候选内参基因的挑选和片段克隆

从 694 个候选内参基因中随机挑选 14 个基因, 包括 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase*, 进行后续的实时定量 PCR 实验。14 个基因在 RNA-seq 数据中的表达值见表 2 所列。在 4 个 RNA-seq 样

品之间, *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase* 基因的表达水平均值为 (28.49  $\pm$  0.35) ~ (1 711.72  $\pm$  197.61) FPKM; 表达水平的变异系数介于 0.01 ~ 0.12。最稳定表达的基因是 *Hp1* (PEX2-018900), 变异系数为 0.01。

表 2 RNA-seq 数据中 14 个候选内参基因的表达水平

基因	基因编号	基因表达值				基因表达值 平均值	变异系数
		25 °C 8 h	25 °C 12 h	4 °C 8 h	4 °C 12 h		
<i>Knr4</i>	PEX2-102720	61.38	58.67	69.50	59.49	62.26±4.96	0.08
<i>Isy1</i>	PEX2-072240	117.70	123.28	138.83	130.20	127.50±9.12	0.07
<i>Spt5</i>	PEX2-062890	55.53	56.24	49.93	51.19	53.22±3.13	0.06
<i>Nucb</i>	PEX2-110680	50.81	43.87	53.56	47.70	48.99±4.17	0.09
<i>Hp1</i>	PEX2-018900	28.58	28.55	28.82	27.99	28.49±0.35	0.01
<i>Hp2</i>	PEX2-025670	11.41	10.08	12.84	10.60	11.23±1.20	0.11
<i>Whth</i>	PEX2-045070	117.83	121.46	96.17	105.89	110.34±11.55	0.10
<i>Hp3</i>	PEX2-041850	46.85	54.64	50.93	44.26	49.17±4.56	0.09
<i>Gph3</i>	PEX2-099300	89.82	97.09	89.90	82.39	89.80±6.00	0.07
<i>Pwi</i>	PEX2-020760	70.33	73.52	83.15	79.36	76.59±5.75	0.08
<i>Taf4</i>	PEX2-043060	49.88	50.71	58.41	56.18	53.80±4.16	0.08
<i>Hp4</i>	PEX2-064170	49.95	44.73	56.66	44.33	48.92±5.76	0.12
<i>Asy</i>	PEX2-060800	85.20	101.68	79.80	93.85	90.13±9.63	0.11
<i>GTPase</i>	PEX2-053800	1 971.02	1 640.67	1 734.11	1 501.09	1 711.72±197.61	0.12

基于基因序列进行了上述 14 个基因的实时定量 PCR 引物设计,引物退火温度为 58~62 °C,扩增长度为 80~200 bp,具体引物序列见表 3 所列。首先进行了基因片段的常规 PCR 扩增实验,扩增结果如图 1 所示,图 1 中,L1~L14 泳道分别表示 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、

*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase* 基因的扩增结果。

由图 1 可知,本文得到了特异的 DNA 扩增条带,大小和设计完全一致。表明设计引物适用于目的基因特异片段的扩增,可以用于后续的实时定量 PCR 实验。

表 3 候选内参基因的定量 PCR 引物

基因	引物序列(5'-3')	基因	引物序列(5'-3')
<i>Knr4</i>	F1:CTCGTCTACAATGTGGCAATCAG	<i>Hp3</i>	F8:CGGTCCCTTTGACGAGAATG
	R1:CGGGATGTGCGTAGGCTTT		R8:ATCAAGAGGGTCTTCGTTTATGTG
<i>Isy1</i>	F2:CAAAGCCTGAGCGACTACCA	<i>Gph3</i>	F9:CATACGCCCCAATGTCCT
	R2:CGCCCTTCATCGTCGTAAA		R9:GCGAATACTCTGCCAGCAGTTC
<i>Spt5</i>	F3:CGATGCCGTGGCTACTGAT	<i>Pwi</i>	F10:CAAATCCCTCCAAATCCAAC
	R3:CTGATACGGTCAGGACATTTGTT		R10:ATTAGCCTGACCGCTTAGACAC
<i>Nucb</i>	F4:TCACCGAGGAACAAGTCAAAGA	<i>Taf4</i>	F11:GCAAGGCGAGCACAGTATCAC
	R4:GAGGCCAATCAACACGGATC		R11:CGAAGGAATCCGAACACCAA
<i>Hp1</i>	F5:GGTAGCTTGACTAGCGGGTTC	<i>Hp4</i>	F12:GCCACCCTTACCAGCAGTA
	R5:ATCCAACGTGCGTTTGTGCC		R12:CGGGTGCTTGAAGTGACAGG
<i>Hp2</i>	F6:TACAGTGCCATTCTACCAACC	<i>Asy</i>	F13:ACCGGCGAAAATTCTGCAC
	R6:CATTGAACCAGTCCAGCGATT		R13:GTTCTTCCCCTACCGTCCC
<i>Whth</i>	F7:CAAGAAGCGTGTTAAGGAGGC	<i>GTPase</i>	F14:GTGTCTGCGAGAACATCCCC
	R7:TGGTTTCCAATGCCCGTAG		R14:GAGGTTCTTCTGCGGTGGA

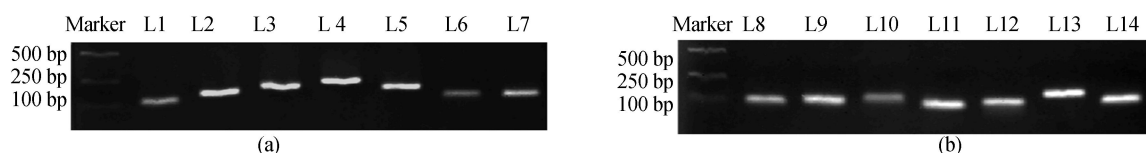


图 1 候选内参基因的常规 PCR 扩增结果

### 2.3 候选内参基因的稳定性分析

以在 PDB 液体培养基中 4、25 °C 条件下生长 6、12、24、36 h 后的扩展青霉菌为实验材料,对 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GTPase* 基因进行

实时定量 PCR 实验。

14 个候选基因的熔解曲线均只存在一个重叠峰,没有杂峰产生,其中 *Isy1* 的熔解曲线峰图如图 2 所示。结果证明实时定量 PCR 扩增条带单一,实验成功进行。

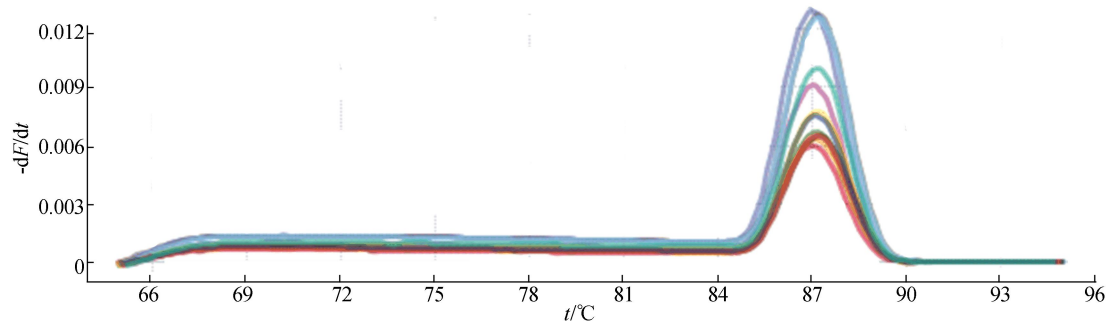
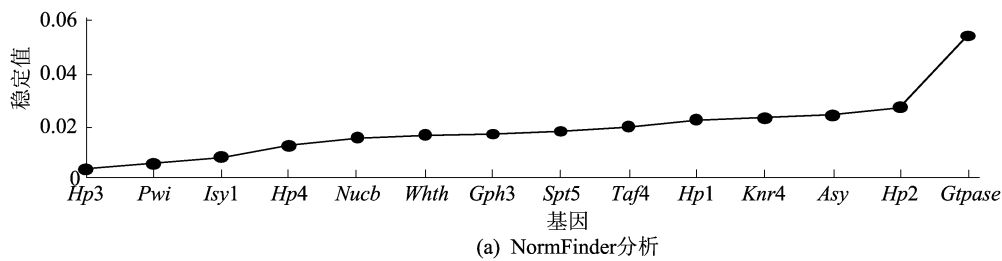


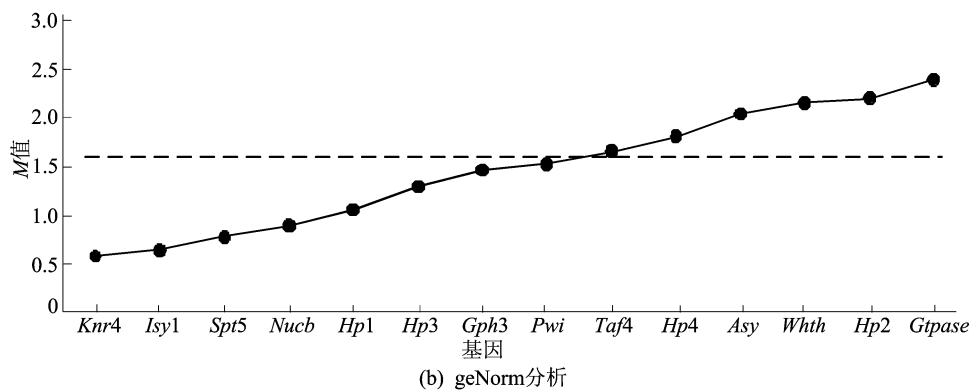
图 2 *Isy1* 基因的熔解曲线

将 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp2*、*Whth*、*Hp3*、*Gph3*、*Pwi*、*Taf4*、*Hp4*、*Asy*、*GT-Pase* 基因在 25 °C 条件下不同生长阶段的扩展青霉菌材料的实时定量 PCR 结果 C<sub>q</sub> 值作为输入数

据,在 geNorm 和 NormFinder 软件中分别进行稳定性分析,结果如图 3 所示,由图 3 可知,数值越低稳定性越高,geNorm 分析结果默认高于 1.5 阈值的基因不适合作为内参基因。



(a) NormFinder分析



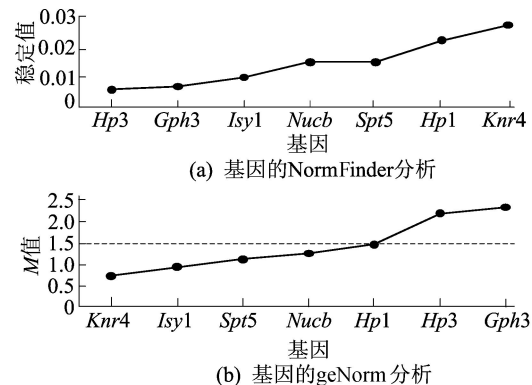
(b) geNorm分析

图 3 14 个候选内参基因在 NormFinder 和 geNorm 中的稳定性分析结果

去掉高于 1.5 阈值的后 7 个基因,将其余的 *Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*、*Hp3*、*Gph3* 基因在 4 °C 条件下不同生长阶段的扩展青霉菌材料的实时定量 PCR 数据进行分析。在 geNorm 和 NormFinder 软件中稳定性分析排序结果如图 4 所示。

以内的扩展青霉菌的基因定量研究。

由图 4a 可知,除去 *Knr4* 的分析值较高,其余 4 个基因(*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1*)的分析值都低于 0.02,具有较高的稳定性,适合作为内参基因。由图 4b 可知,*Knr4*、*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1* 的分析结果低于 geNorm 的 1.5 的阈值条件。综合分析表明,*Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1* 可以作为合适的内参基因,用于在 4、25 °C 条件下,生长 36 h



(a) 基因的 NormFinder 分析

(b) 基因的 geNorm 分析

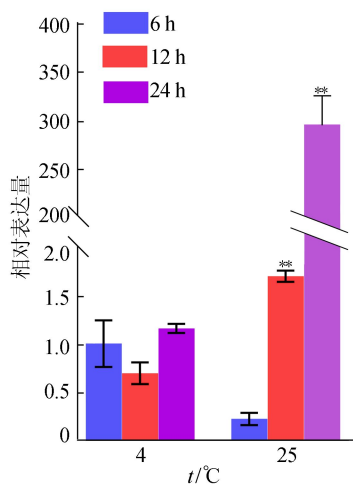
图 4 7 个候选内参基因的稳定性分析结果

## 2.4 内参基因的应用

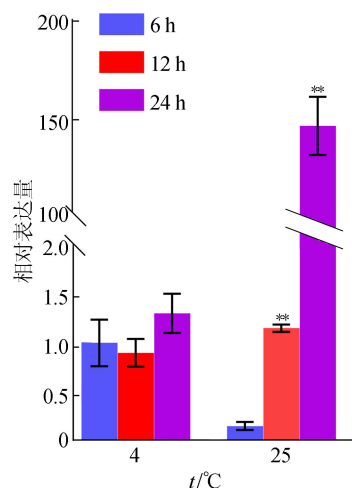
将 *Isy1* 和 *Spt5* 基因作为内参基因,分别在 PDB 液体培养基中,4、25 °C 条件下生长 6、12、24 h 的扩展青霉菌为实验材料,进行了 glycoside hydrolase 编码基因 *Gh30* (PEX2-044530) 的实时定量 PCR 实验。*Gh30* 基因的定量引物对如下。

上游引物:5'-CAGTCACCTCCTTCAACACGC-3';  
下游引物:5'-CGCATTGTTCCATTATCGTC-3'。

以 *Isy1* 和 *Spt5* 作为内参基因进行 *Gh30* 的表达水平定量结果如图 5 所示。图 5 中,\*\*表示  $P < 0.01$  显著性差异。



(a) *Isy1* 基因的定量结果



(b) *Spt5* 基因的定量结果

图 5 *Isy1* 和 *Spt5* 基因定量的 *Gh30* 基因表达水平

由图 5 可知,在相同系列的试验材料中,*Gh30* 基因显示出一致的表达趋势。表明上述 2 个基因可以作为内参基因,用于不同温度条件下早期发育阶段(24 h 以内)的扩展青霉菌基因表达的定量研究。

## 3 讨 论

大量研究表明,18S 核糖体、内参基因 *ACT*、延伸因子 *EF-1 $\alpha$*  基因等传统内参基因不存在绝对的恒定表达,在不同生长发育阶段或不同实验条件处理下的实验材料中,基因表达存在较大的波动<sup>[7-9]</sup>。

本研究利用转录组数据和实时定量 PCR,鉴定得到 *Isy1*、*Spt5*、*Nucb*、*Hp1* 基因适合作为不同温度条件下的内参基因,且对 *Isy1* 和 *Spt5* 基因进行了验证。

目前,得益于测序技术的进步和测序成本的大幅降低,包括 NCBI 在内的公共数据库中有大量的转录组数据,这对于内参基因的开发提供了大量的基因表达数据以供参考。此外,多种算法联用分析内参基因的稳定性逐渐成为主流,本研究采用 geNorm 和 NormFinder 软件进行基因表达稳定性分析。目前,基因稳定性分析有多种分析软件可供选择,包括 geNorm<sup>[10]</sup>、NormFinder<sup>[11]</sup>、BestKeeper<sup>[6]</sup>。结合 2 种以上的分析软件,基于不同算法综合进行基因表达稳定性分析,可以取得良好的分析结果。

## [参 考 文 献]

- [1] JOSEPH J T, POOLAKKALODY N J, SHAH J M. Plant reference genes for development and stress response studies [J]. *Journal of Biosciences*, 2018, 43(1):173-187.
- [2] LOVDAL T, LILLO C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 387(2):238-242.
- [3] TAKAMORI L M, PEREIRA A V, SOUZA G M, et al. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Urochloa brizantha* under abiotic stresses [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-11.
- [4] BARTLOMIEJ K, MARCIN R. Reference genes in real-time PCR [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2013, 54(4):391-406.
- [5] KUDO T, SASAKI Y, TERASHIMA S, et al. Identification of reference genes for quantitative expression analysis using large-scale RNA-seq data of *Arabidopsis thaliana* and model crop plants [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2016, 91:111-125.
- [6] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using a pair-wise correlations [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26:509-515.

- [7] BARBER R D, HARMER D W, COLEMAN R A, et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues[J]. Physiological Genomics, 2005, 21(3): 389-395.
- [8] BOROWSKI J M, GALLI V, MESSIAS R D, et al. Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses[J]. Planta, 2014, 239(6): 1187-1200.
- [9] TIAN C, JIANG Q, WANG F, et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117569.
- [10] VANDESOMPELE J, DE P 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): 341-342.
- [11] 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.
- [12] 盘林秀, 王娜, 王爱军, 等. 稻粒黑粉病菌实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 640-647.
- [13] ZAMPIERI D, NORA, L C, BASSO V, et al. Validation of reference genes in *Penicillium echinulatum* to enable gene expression study using real-time quantitative RT-PCR[J]. Current Genetics, 2014, 60(3): 231-236.
- [14] ROCHA D J P, SANTOS C S, PACHECO L G C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis[J]. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2015, 108(3): 685-693.
- [15] 郑永钦, 郑正, 陈燕玲, 等. 柑橘黄龙病菌内参基因的筛选与评估[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2985-2995.
- [16] 范艺, 周宋馨, 夏永军, 等. 基于转录组测序筛选嗜热链球菌荧光定量 PCR 新内参基因[C]//第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 南京: 中国食品科学技术学会, 2020: 52-53.
- [17] SINGH V, SINGH B, KAUL V K. Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in Western Himalaya and North Indian Plains [J]. Economic Botany, 2003, 57(4): 535-544.

(责任编辑 闫杏丽)

**(下转第 179 页)**

- [4] 叶潘. 盲信号处理中的关键技术研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2018.
- [5] COMON P. Independent component analysis, a new concept[J]. Signal Processing, 1994, 36(3): 287-314.
- [6] BINGHAM E, HYVARRINEN A. A fast fixed-point algorithm for independent component analysis of complex valued signals[J]. International Journal of Neural Systems, 2000, 10(1): 1-8.
- [7] HE J, CHEN W, SONG Y. Single channel blind source separation under deep recurrent neural network[J]. Wireless Personal Communications, 2020, 115: 1277-1289.
- [8] 赵知劲, 黄艳波. 基于经验模态分解的单通道盲源分离算法[J]. 计算机应用研究, 2017, 34(10): 3010-3012.
- [9] 苗晟, 王威廉, 姚绍文. Hilbert-Huang 变换发展历程及其应用[J]. 电子测量与仪器学报, 2014, 28(8): 812-818.
- [10] YUAN L, ZHOU Z H, YUAN Y C, et al. An improved FastICA method for fetal ECG extraction[J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2018, 2018: 7061456-1-7061456-7.
- [11] KEZIOU A, FENNIRI H, GHAZDALI A, et al. New blind source separation method of independent dependent sources[J]. Signal Processing, 2014, 104(6): 319-324.
- [12] 刘小乐, 袁海平, 郑鑫, 等. 基于 HHT 的爆破振动信号时频能量分析[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2019, 42(6): 779-784.
- [13] 叶红仙, 杨世锡, 杨将新. 基于 EMD-SVD-BIC 的机械振动源数估计方法[J]. 振动测试与诊断, 2010, 30(3): 330-334, 343.
- [14] 郭丽霞. 脉冲涡流检测中的信号采集及处理方法[D]. 成都: 电子科技大学, 2016.
- [15] 任旭虎, 张圣坤, 张振铁. 磁性材料缺陷的脉冲涡流检测系统设计[J]. 无损检测, 2020, 42(10): 72-75.
- [16] 黄大伟, 戴吾蛟, 刘斌, 等. 单通道独立分量分析算法的比较分析[J]. 大地测量与地球动力学, 2014, 34(1): 135-138.
- [17] 赵知劲, 黄艳波. 基于小波包分解的单通道盲源分离算法[J]. 通信技术, 2017, 50(3): 425-429.

(责任编辑 李 凯)