

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.07.004

铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆与分析*

吕楠 安红强 裴薇 王万军[△]

(西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:研究尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)在铁皮石斛不同组织中的表达情况,探讨其与石斛多糖累积的关系。**方法:**根据铁皮石斛原球茎转录组数据中的 DoUGPase1 序列设计引物,并利用 RACE 技术克隆该基因;用生物信息学软件预测其蛋白结构,并进行系统发育分析;利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术研究该基因在铁皮石斛不同年份,不同组织中的表达。**结果:**通过 RACE 技术得到 1 个 3054 bp 基因,命名为 DoUGPase1,其 ORF 长 1530 bp,编码 510 个氨基酸残基,与油棕(*Elaeis guineensis*)和波斯枣(*Phoenix dactylifera*)有一定的同源性,且 DoUGPase1 在 3 年生的植株中相对表达量整体较高($P<0.05$)。**结论:**我们预测在铁皮石斛的生长发育过程中 DoUGPase1 基因与多糖累积的活跃程度成正比例。

关键词:铁皮石斛多糖;尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶;qRT-PCR;蛋白结构

中图分类号:Q75;Q78;S567.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)07-1215-05

Cloning and Expression Analysis of UGPase Gene in *Dendrobium Officinale* Kimura et Migo*

LV Nan, AN Hong-qiang, PEI Wei, WANG Wan-jun[△]

(Southwest jiaotong university, college of life science and engineering, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To observe the expression of UGPase in *Dendrobium*, and investigate its relationship with *Dendrobium* polysaccharide accumulation. **Methods:** The primers were designed according to the transcriptomic UGPase1 unigene sequence of *proto-corm* in *D. officinale*, then DoUGPase1 transcription factors were cloned by RACE techniques. Through bioinformatics analysis and phylogenesis analysis, the protein structure was predicted, and its affinity was obtained. The relative expression of *D. officinale* in different years and different tissues was analyzed through Roche Light circle 96 real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) experiment. **Results:** By RACE technique, a new 1530 bp long gene named DoUGPase1 was obtained. Its ORF (Open reading frame) was 1530 bp encoding 510 amino acids. The DoUGPase1 had the relatives with *Elaeis guineensis* and *Phoenix dactylifera*. The DoUGPase1 expression in 3 years plant was the biggest ($P<0.05$). **Conclusions:** The expression level of DoUGPase1 gene might be a positive proportion with active degree of *dendrobium* polysaccharide accumulation in the growth and development of *dendrobium officinale*.

Key words: *Dendrobium* polysaccharides; DoUGPase1; qRT-PCR; Protein structure

Chinese Library Classification (CLC): Q75; Q78; S567.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)07-1215-05

前言

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-Glucose Pyrophosphorylase, UGPase)在植物、动物、微生物中都有广泛分布,是植物糖代谢的主要酶类之一,它催化反应尿苷三磷酸(Uridine triphosphate, UTP)+葡萄糖-1-P $\leftrightarrow$ UDP-葡萄糖+焦磷酸(Pyrophosphoric acid, PPI),而尿苷二磷酸葡萄糖(Uridine diphosphate glucose, UDPG)是高等植物中主要活化糖的形式,是糖合成通路中的重要一员,也是葡萄糖基供体,参与多糖类物质的合成代谢^[1,2]。UGPase还与细胞液中的AGPas相偶联,形成ADPG,参与造粉体淀粉的合成^[3,4]。目前的研究显示,已经获得的酶基因片段长度大都介于1.4~1.6 kb之间,利用NCBI Blast同源性分析比较可知,在与马铃薯、沙梨、大麦的植物之间进行

同源性分析发现,其亲缘性大约在70%以上,而与其他物种之间的基因同源性相差较大,甚至无同源性^[5]。植物的各个组织中,由于生物功能的不同,UGPase催化的反应方向也不同。在植物的叶片中,UGPase主要功能是参与蔗糖的合成,将已经催化生成的UDPG提供给SPS(蔗糖磷酸合成酶)或SS(蔗糖合成酶),进一步合成蔗糖;而在植物的其它的非光合作用组织中,例如芽尖或者茎干中,蔗糖的降解过程同样也有UGPase的参与,将UGPD转化为Glc-1-P^[6]。在植物的储藏组织中,例如:种子胚乳及块茎,UGPase能够与细胞液中AGPase相偶联形成ADPG,参与造粉体中淀粉的合成过程^[6,7]。其他研究发现,黄芪的多糖积累量和UGPase活性之间有正比例的关系^[7]。铁皮石斛多糖代谢是一个复杂的过程,UGPase又处于糖代谢途径中交叉点的核心位置,因此在糖代谢中起着至关重要的作用,所

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31371232)

作者简介:吕楠(1990-),硕士研究生,主要从事植物发育生物学研究, E-mail: 1241423091@qq.com

[△] 通讯作者:王万军(1962-),教授,主要从事植物发育生物学研究, E-mail: wanjunwang@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期:2016-06-12 接受日期:2016-06-28)

以,对铁皮石斛 UGPase 进行研究对了解铁皮石斛糖代谢及糖积累机制具有重要意义^[8]。本研究选择 UGPase1 基因作为研究对象,通过荧光实时定量 PCR 分析其表达特性,发现该基因在不同组织中的表达量差异,这将对铁皮石斛生长发育分子机理研究提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛取自四川省成都市双流镇高饭店村万安石斛产业开发有限公司。分别选取大小相当,生长状况相当石斛,年龄分别为 1 年,3 年,6 年。从公司取回后按照上中下切割,以根部为下部(3 个节),芽端为上部(3 个节),再从中间选取 3 节。每个材料均有 3 个生物学重复,以保证具有普遍性。

铁皮石斛试管苗均来自实验室的组培苗,在 1/2MS 培养基中培养,16 小时光照,8 小时黑暗。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的制备 将铁皮石斛根、茎、叶组织和不同年份的茎干在液氮中研磨成粉末,用 RNAPrep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN)分别提取铁皮石斛不同组织的 RNA,提取过程中用 DNAase1 处理去除 DNA 污染,用琼脂糖凝胶电泳及 OD260/280 进行总 RNA 质量检测;用 M-MLV Reverse Transcriptase it(TAKARA)将符合质量要求的总 RNA 逆转录成 cDNA,并将 cDNA 保存于 -20℃ 冰箱留用。

1.2.2 DoUGPase1 基因的克隆 根据铁皮石斛原茎转录组数据中的序列,利用 primer Primer 5.0 设计 PCR 的引物,引物见表(1),由于 DoUGPase1 的序列较长所以将序列分为三段克隆,最后将三段拼接成为一段完成的序列。以 cDNA 为模板,使用 EasyTaq DNA 聚合酶(TAKARA)分别进行 PCR 扩增。扩增体系为 25 μL;EasyTaq 酶 0.25 μL;EasyTaq Buffer 2.5 μL;cDNA 1 μL;上、下游引物各 1 μL;dNTP Mixture 4 μL;dd H₂O 16.25 μL。扩增条件为 94℃ 3 min;35 个循环(94℃ 30 s;58℃ 30 s;72℃ 1 min);72℃ 5 min;4℃ 保存。经 DNA 连接酶连接到 pGEM-T 载体上,16℃ 10 h;4℃ 保存。转化到 DH5α 大肠杆菌后增殖,涂板后 37℃ 培养 12 h,在平板上进行蓝白斑挑选,培养后经过 PCR 扩增,电泳检测看到单一明亮的条带,将单克隆抗体的菌液送由生工(中国上海)进行测序。

表 1 在 PCR 反应中所用到的引物序列

Table 1 The primer used in degenerate and RACE PCR reactions

Primer	Sequence 5'-3'
1	CCTCAGTCCCTATCGTTCTC
2	GGACGGGATTTGTTTCGCT
3	CTCCGTACCTCAGTCCCT
4	CTGTCCATCTTCACTCTGCTTC
5	CATCTTGGGATTCAGCACAG
6	AAGGAGACGGGTACTTCATC

1.2.3 DoUGPase1 基因的生物信息分析 使用在线软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>,找出 DoUGPase1 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),并获得其编码蛋白质序

列;使用在线软件 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,将结果与 NCBI 中已登录的类似物种进行对比分析;使用软件 MEGA 4.0 将结果相似性达 70 % 以上的物种 DoUGPase1 构建进化树;亚细胞定位采用 WOLF PSORT。使用在线软件 <http://web.expasy.org/protparam/>,分析其编码蛋白质序列的一级结构。运用 SOPMA 软件 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa.sopma.html 预测铁皮石斛 DoUGPase1 蛋白的二级结构。使用 SWISS-MODEL 软件 <http://swiss-model.expasy.org/workspace/> 对其三级结构进行分析。

1.2.4 不同组织中 DoUGPase1 基因的表达 根据克隆得到的 DoUGPase1 核苷酸序列,利用 primer 5.0 软件设计定量引物 5'-TTTGAACAGCCGATGGTG -3' 和 5'-CTCAGCCTCAAACCTACTCC-3',引物选在靠近 3' 端的 CDS 区域中。两个引物形成一个长度为 247 bp 的 PCR 产物。内参基因选用 Tcp1γ^[9,10]和 Cwc22^[11-15]这一对基因,选用从万安公司取回的铁皮石斛,分别将 1 年,3 年,6 年的茎干分成上中下三个部分,随后进行荧光定量 PCR 分析。

1.2.5 统计学方法 运用 2-ΔΔC_Q^[15-18]的方法进行 DoUGPase1 基因的相对表达量方差分析。P<0.05 为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 DoUGPase1 的克隆及序列分析

利用 3 对引物的克隆,在菌液 PCR 时,发现菌液 PCR 的电泳条带大小与两轮 PCR 产物电泳条带大小基本一致,所以可认为转化大肠杆菌成功,随后将大肠杆菌送去生工生物公司,进行测序。一共克隆出 4 个片段,其中包括完整的 3' 端,5' 端和 CDS 序列,随后利用克隆序列重复的区域,将四段序列拼接起来得到一个全长为 3054 bp 的序列。在其全长序列当中,包含一个长度为 1530 bp 的开放阅读框(如图 1)所示,编码了 510 个氨基酸,Protparam 分析结果预测,DoUGPase1 编码的蛋白质序列分子量为 51.7 kDa;理论 pI 为 5.94;氨基酸组成方面亮氨酸含量(Leu)为最高,达 12.4 %,其次为甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)和谷氨酸(Glu)分别占 9.4 %、7.9 %和 7.3 %;不稳定性系数(Instability index, II)为 44.01,表明其稳定性较差;疏水性平均值(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为 -0.097,表明其为亲水性蛋白。

2.2 DoUGPase1 基因生物信息学的分析

2.2.1 进化树的建立 利用 MEGA 4.0 软件对 DoUGPase1 基因氨基酸序列与其他物种之间对比分子,包括葡萄、香蕉亚种、麻疯树等。从(图 2)中可以看出 DoUGPase1 蛋白与其他物种的 UGPase 没有较高的同源性。仅仅与油棕(Elaeis guineensis)和波斯枣(Phoenix dacty lifera)有一定的同源性,与其他物种中的 UGPase 序列关系不是很密切。

2.2.2 蛋白质二级结构及三级预测 利用 SOPMA 软件预测石斛 DoUGPase1 蛋白质二维结构占 38.76 %的 α 螺旋,无规卷曲 30.19 %,延伸链占 22.48 %。如(图 3A),其中蓝色代表 α 螺旋,红色代表旋转,绿色代表 β 延伸,紫色表示环绕。利用 Swiss-model 软件可以预测 DoUGPase1 蛋白质三维结构(如图 3B)。

```

1 M I E K W N L D G V R I E V E D E D V G G G G M S E P L E K L L K T L
1 ATGATTGAGAAGTGAATTTGGATGGGTTAGAATTGAGGTGAGGATGAAGATGTTGGGGCGGTGGAATGAGCGAGCCATTGGAGAAGCTGCTGAAGACITTA
36 N D V E E F Y D C V G G I I G Y Q V V V L E L L S P L K S K G K S N W
106 AATGATGTTGAAGAGTTTATGACTGTGTTGGAGGAATCATCGGATATCAGGTAGTGGTATTAGAGCTCCTTTACCTCTGAAATCAAAGGAAATCTAATTTGG
71 F S H M N L S L C E L Q E F H V P S G A N L L E D A E Y A S Q A A F W
211 TTTTCTCACATGAACTGCTCTTTGTGAATCAAGAAATTCATGTTCCCTCTGAGGCAATCTCTTGGAGGATGCTGAATATGCTTCAAGAGCAGCTTTCTGG
106 G L E G L P E L G E I Y P L G G A G D R L G L V D P V T G E C L P A A
316 GGATTAGAGGCTTGCCAGAGCTAGGTGAAATTTATCCTCTTGGTGGTGGGATCGGCTTGGTCTAGTTGACCTGTCAGTGGTGAATGTCTGCTGCTGCA
141 M L P Y C G S T L L E G L L R D L Q A R E F L H F K V F G K Q C I T P
421 ATGCTTCCATACCTGGAAGCAGCTTTATAGAAGGCTTGTAAGGATCTTCAGGCAAGAGAGTTCTTCACTTCAAGGTTTTTGGCAAGCAGTGATAACTCCT
176 V A M M T S S V K N N H D H I L A L C K K H G W F G R G Q Q K F R L F
526 GTTGTATGATGACAAGTTCAGTAAAGAACCAACATGATATTTTGGCTCTTTGTAAGAAACATGGATGGTTTGGCAGGGGCCAGCAGAAATTCGCTTTTTT
211 E Q P M V P V V A T E D G Q W L I N E P L S L V C K P G G H G A I W K
631 GAACAGCGATGGTCCAGTTGTTGCTACTGAAAGTGAATGGTGTGATTAATGAACCACTCTCCCTAGTCTGCAAAACAGGTGGTCAAGTGCAATATGAAAA
246 L A Y D K G I F Q W F Y S H G R K G A T V R Q V S N V V A A T D V T L
736 CTTCATATGATAAGGCATATTTCAATGGTTTACAGTCATGGAAGAAAGTGCAACTGTTGCAAGTCAGTAATGTTGTTGCTGCAACTGATGTGACACTT
281 L A L A G V G L R L E K K L G F A S C Q R N F G A T E G I N V L V E K
841 TTGGCGCTGGCAGGAGTAGGTTTGAAGGCTTGAAGAAATTAGGATTGCTTCGTCGTAAGAACTTTGGAGCTACGGAAGGTATTAATGTGCTTTGAGAAAG
316 Q S E D G Q W T Y G L T C I E Y T E F E K Y D I K V V P I S L S S L Q
946 CAGAGTGAAGATGGACAGTGGACATATGGCCTGACATGTTGATTAATATACCGAGTTTGAAGATGACATTAAGGTTGTCCTAATTTCACTTAGCAGTTTGCAG
351 A E F P A N T N V L Y V D L R A A E S I G A S K S R S S L P G L V L N
1051 GCAGAAITTCAGCAATACAAACGTTCTCTATGTTGATTAAAGGCTGACAGAGCATTTGAGCTAGCAAAAGCAGGAGCTCCTTACCAGGATTGTTACTGAAC
1261 ACATATGCTTCTAGGTGCAACGAAGGCATTGAGAGTTTATGGAATACCTTTATTTATATAATGAAGGAGACGGGTTACTTCACTAGCTAAAAGGAAAAAGAAA
456 M V D K S L H Q T P D G S F L D V I R N A S D L L S Q C N I K F L R L
1366 ATGGTAGACAAGTCATACATCAGACTCCAGATGGTTCTTTCTAGATGTCATACGGAATGCTTCTGATTGCTTTCACAATGCAATATATAAATTCCTGAGATTG
491 L T T A D I S I L G R L S S F S I L R
1471 CTGACACAGCAGATATCTCCATTCTGGGCGGCTTTCATCATTCTTCATCCTGCGT

```

图1 DoUGPase1 基因的 CDS 序列以及所编码的氨基酸序列

Fig. 1 The CDS sequence of DoUGPase1 gene and the encoded amino acid sequence

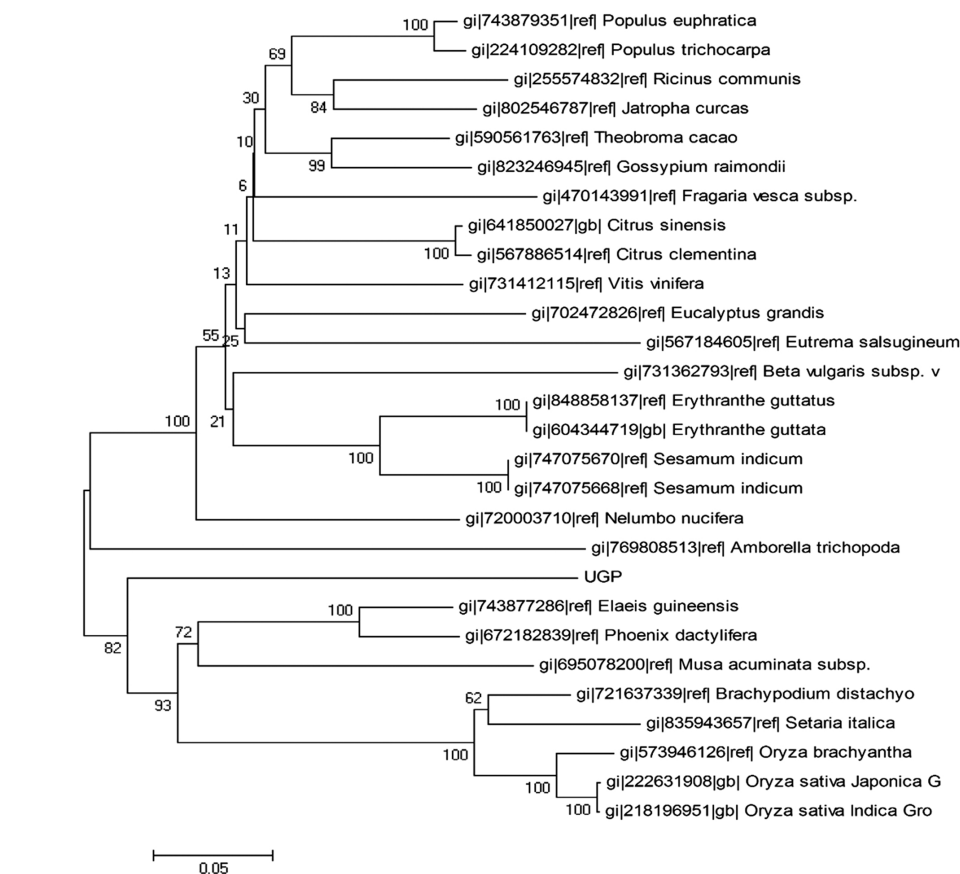


图2 不同植物的 DoUGPase1 进化树分析

Fig.2 DoUGPase1 phylogenetic tree analysis of different plants

2.2.3 DoUGPase1 基因的亚细胞定位预测 利用 wolf psort 软件对 DoUGPase1 基因的亚细胞定位预测, 预测蛋白详细情为 nucl: 4.5, chlo: 4, cytsk_nucl: 3, vacu: 2, cyto: 1, plas: 1。

2.3 不同年份, 不同组织铁皮石斛中的 DoUGPase1 基因地相对表达量的测定

2.3.1 根茎叶之间 DoUGPase1 基因表达量的差异 在数据处

理计算中, 将叶片的表达量作为参考量, 所以叶片中 DoUGPase1 基因的相对表达量为 1, 茎干中的基因表达量是叶片中的 126 倍, 根部是叶片中的 168 倍。

2.3.2 不同年份, 不同组织 DoUGPase1 基因表达量的差异 取回来的铁皮石斛材料一共有 3 个年份的材料, 分别为 1 年生, 3 年生和 6 年生(图 5), 又将材料分为上中下 3 个部分(图

6)。在数据处理计算时,将 1 年生的铁皮石斛上部作为参考量,所以其表达量为 1,其他样品的相对表达量均与其对比而得

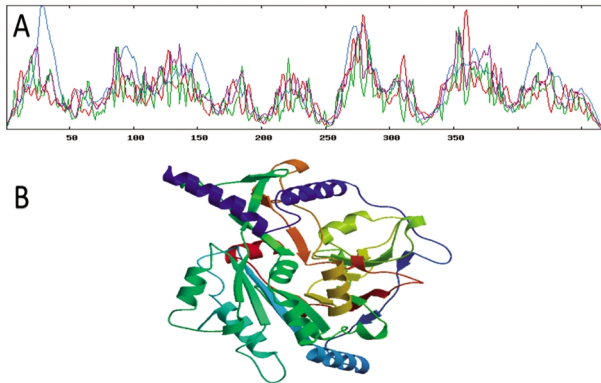


图 3 预测 DoUGPase1 蛋白质结构

Fig. 3 Prediction of the DoUGPase1 protein structure

Note: A is the second structure of protein, B is the third structure of protein.

到。图 7 是各个样品在内参基因 *Tcp1γ* 和 *Cwc22* 对比下的相对表达量。

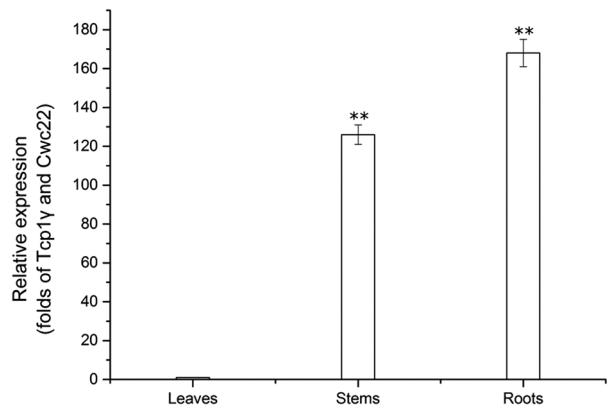


图 4 试管苗之间不同部位 DoUGPase1 基因表达量

Fig.4 The expression of DoUGPase1 in different parts of test tube seedling

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with group leaves.



图 5 不同年份的铁皮石斛

Fig. 5 *Dendrobium candidum* of different years

在图 7 中,所有的数据都已 1 年的上部为基准量 1。可以清楚地观察到在植物的上部,3 年的材料中 DoUGPase1 基因表达量最为突出,是所有样品中最高的,为参照样的 7.01 倍,在中部是 1 年的材料中 DoUGPase1 基因表达量最高,为参照样的 5.09 倍,在植物下部中 1 年,3 年的表达量一致为参照样的 2.75。从整体角度看来,3 年生植物的 DoUGPase1 基因较高,而 6 年生植物中的 DoUGPase1 基因表达量整体水平较低。

3 讨论

到目前为止,DoUGPase1 的酶动力学特征已经研究的较为彻底,但是在基因方面还需要将进一步的研究。虽然众多研

究已经克隆出了大量的 UGPase,但主要还是以动物为主,植物中的数量很少,仅有马铃薯,甘蔗,黄芪,水稻等,且在 BLAST 比对时发现,已知植物中的 UGPase 核苷酸序列,相似度都不大,亲缘关系较远,对实验室的研究需要来说没有太多的利用价值。铁皮石斛是一种以多糖为重要成分的名贵中药,通过实验我们希望了解,DoUGPase1 基因的表达量与铁皮石斛内多糖的形成,累积和铁皮石斛生长发育的关系。

本次实验通过 RACE 方法,通过已有转录组数据设计引物,克隆得到完整的 DoUGPase1 的核苷酸序列。发现铁皮石斛 DoUGPase1 基因,全长为 3054 bp,得到一个完整开放阅读框,编码了 510 个氨基酸,编码的蛋白质序列分子量约为 51.7

kDa;再通过同源性比对,选择有一定同源的基因,进行进化树分析。发现克隆出的 DoUGPase1 基因仅与油棕(*Elaeis guineensis*)和波斯枣(*Phoenix dactylifera*)中的基因有一定的相似度,且亲缘关系不是很密切。



图6 铁皮石斛的组织区分(上、中、下)

Fig.6 *Dendrobium candidum* tissue from the (Top, Middle and Basal)

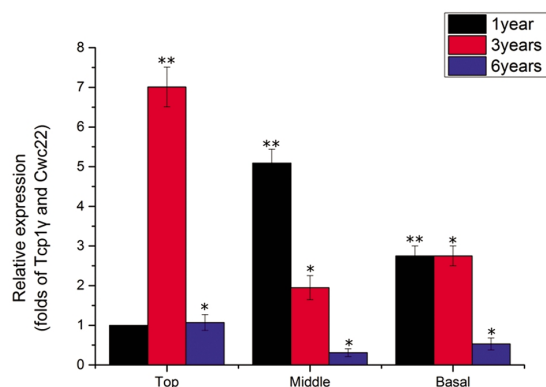


图7 不同年份,不同组织中 DoUGPase1 基因的相对表达量

Fig. 7 The relative expression of DoUGPase1 gene in different tissues and in different years

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with group 1-year.

通过定量 PCR 分析发现,DoUGPase1 基因在石斛不同组织中的表达量也存在着较大的差异,在对铁皮石斛的根、茎、叶,进行实验后,可以发现根和茎中的表达量较为接近,且远远高于叶中的含量。根和茎中的表达量是因为铁皮石斛根可以被认为是一种延伸茎,所以根和茎中的表达量基本一致。叶片中含量低的原因有可能是因为在幼嫩的叶片细胞中含有大量的水分,稀释了基因的浓度。在不同年份与不同组织的比较中,我们可以发现 1 年,3 年的整体表达情况好于 6 年。说明了在 1 年,3 年植物中的糖分累积情况和生长情况都处于一个相对活跃的状态,而 6 年的植物材料,通过图片和文献资料可以了解到,其组织开始出现木质化和糖分累积基本停止,所以 DoUGPase1 基因在其任何部分的表达量都不高。

本次实验成功克隆出了 DoUGPase1 的全长序列,以不同年份的铁皮石斛为对象,主要研究和探索了 DoUGPase1 基因

在不同组织之间的相对表达量。分析了铁皮石斛 DoUGPase1 的生物信息学内容,通过利用定量 PCR 得到了在不同时期,不同组织中 DoUGPase1 基因的相对表达量,为之后能够明确 DoUGPase1 基因在各个时期和组织中对于多糖成分合成与累积的影响,也为之后将 DoUGPase1 基因转入铁皮石斛中奠定了基础研究。

参考文献(References)

- [1] Feingold D S, Baeber G A. In methods in plant biochemistry[M]. New York Academic Press, 1990, 2: 39
- [2] Eimert K, Villand P, Kilian A, et al. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues[J]. Gene, 1996, 170: 227-232
- [3] Konishi Y, Tanizawa K, Muroya S, et al. Molecular cloning nucleotide sequencing, and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase[J]. Biochem, 1993, 114(1): 61-68
- [4] Wu X J, Du min, Weng Y Q, et al. Astragalus UGPase cDNA cloning, analysis and in *Escherichia coli* expression [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 06: 689-693
- [5] Winter H, Huber s C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes [J]. crit Rev Biochem Mol Biol, 2000, 35(4): 253-289
- [6] Kleczkowski IA. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants [J]. Phytochemistry, 1994, 37(6): 1507-1515
- [7] Tabe H, Niiyama T, Sasahara. Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 216-221
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [9] Tang W, Shi Y, Feng G, et al. Family-based association studies of the TCP1 gene and schizophrenia in the Chinese Han population[J]. Journal of Neural Transmission, 2006, 113(10): 1537-1543
- [10] Rosa Y B C J, Aizza L C B, et al. PmTCP1 encodes a putative TCP transcription factor and is differentially expressed during in vitro organogenesis in *Passiflora*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2013, 50(1): 36-44
- [11] Lin Y L. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree [J]. Plant Science, 2010, 178 (4): 359-365
- [12] Qi J, Yu S, Zhang F, et al. Reference Gene Selection r Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of mRNA Transcript Levels in Chinese Cabbage(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2010, 28(4): 597-604
- [13] Jing S, Liu M, Shi J, et al. Reference gene selection for qPCR in *Amorpha mongolica* under abiotic stresses and expression analysis of seven ROS-scavenging enzyme genes [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(7): 1245-1254
- [14] Zhang Li, Cao Y L, Wang H Y, et al. Data analysis and standardization research on the detection of genetically modified (qRT-PCR) gene by real-time fluorescence quantitative [J]. PCR Journal of agricultural biotechnology, 2015, 01: 126-134

(下转第 1232 页)

- cer Res, 2008, 68(12): 4494-4499
- [6] Doi T, Lukosiūtė A, Ruttenstock E, et al. Expression of Iroquois genes is up-regulated during early lung development in the nitrofen-induced pulmonary hypoplasia[J]. J Pediatr Surg, 2011, 46(1): 62-66
- [7] Guo X, Liu W, Pan Y, et al. Homeobox gene IRX1 is a tumor suppressor gene in gastric carcinoma[J]. Oncogene, 2010, 29(27): 3908-3920
- [8] Jiang J, Liu W, Guo X, et al. IRX1 influences peritoneal spreading and metastasis via inhibiting BDKRB2-dependent neovascularization on gastric cancer[J]. Oncogene, 2011, 30(44): 4498-4508
- [9] Wang T, Xu Y, Hou P. Identifying novel biomarkers of gastric cancer through integration analysis of single nucleotide polymorphisms and gene expression profile[J]. Int J Biol Markers, 2015, 30(3): e321-326
- [10] Lu J, Song G, Tang Q, et al. IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF- κ B signaling[J]. J Clin Invest, 2015, 25(5): 1839-1856
- [11] 杨惠洁, 余爽, 王静, 等. IRX1 基因在肝癌中的表达及其临床意义[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(10): 1354-1357
Yang Hui-jie, Yu Shuang, Wang Jing, et al. Expression and clinical significance of Iroquois homeobox gene IRX1 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Chin J Biologicals, 2012, 25(10): 1354-1357
- [12] 张磊, 涂艳阳, 张鹏幸, 等. 转录因子 SOX9 基因对脑胶质瘤干细胞干性维持的相关性研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(18): 3430-3434, 3465
Zhang Lei, Tu Yan-yang, Zhang Peng-xing, et al. Knock-down SOX9 Gene Regulated the Stemness Maintenance of Glioma Stem Cell in Vitro [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15 (18): 3430-3434, 3465
- [13] Tang Y, Zhou H, Chen A, et al. The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (13): 9106-9109
- [14] Galan Moya EM, Le Guelte A, Gavard J. PAKing up to the endothelium[J]. Cell Signal, 2009, 21(12): 1727-1737
- [15] Kumar R, Vadlamudi RK. Emerging functions of p21- activated kinases in human cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(2): 133-144
- [16] Liu F, Li X, Wang C, et al. Downregulation of p21-activated kinase-1 inhibits the growth of gastric cancer cells involving cyclin B1[J]. Int J Cancer, 2009, 125(11): 2511-2519
- [17] 韩肖燕, 向阳. 趋化因子 CXCL14 与肿瘤[J]. 癌症进展, 2008, 6(3): 255-258, 249
Han Xiao-yan, Xiang Yang. Progress in the chemokine CXCL14 and cancer[J]. Oncology progress, 2008, 6(3): 255-258, 249
- [18] 朱妮. 核转录因子 NF- κ B 及其抑制剂的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(7): 869-872
Zhu Ni. Progress in research on NF- κ B and its inhibitor [J]. Chinese Journal of biologicals, 2011, 24(7): 869-872
- [19] Kühn A, Löscher D, Marschalek R. The IRX1/HOXA connection: insights into a novel t(4;11)-specific cancer mechanism[J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 35341-35352
- [20] Zhang B, Wu T, Wang Z, et al. p38MAPK activation mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in glioma cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4): 3101-3107
- [21] Cahill KE, Morshed RA, Yamini B. Nuclear factor- κ B in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy [J]. Neuro Oncol, 2016, 18(3): 329-339
- [22] Suwala AK, Hanaford A, Kahlert UD, et al. Clipping the Wings of Glioblastoma: Modulation of WNT as a Novel Therapeutic Strategy [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2016, 75(5): 388-396
- [23] 刘楠, 涂艳阳, 张永生. MicroRNAs 在胶质瘤中生物学功能及基因治疗潜力研究进展[J]. 转化医学电子杂志, 2015, 2(2): 5-13
Liu Nan, Tu Yan-yang, Zhang Yong-sheng. A systematic review of microRNAs and the therapeutic potential in glioma [J]. E-J Transl Med, 2015, 2(2): 5-13
- (上接第 1219 页)
- [15] Yi J M, Qu Zhang, et al. The data analysis method of real time fluorescent quantitative [J]. PCR biological technology communication, 2015, 01: 140-145
- [16] Ji Dong, Xin S J. Development and data analysis of real time fluorescent quantitative[J]. PCR biotechnology newsletter, 2009, 04: 598-600
- [17] Liu Z X, Xu Yang, et al. Influence of different primers and data analysis methods on quantitative PCR results[J]. Journal of Nanjing Medical University (NATURAL SCIENCE EDITION), 2009, 08: 1112-1117