

## 蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选

陈立华<sup>1,2</sup>, 张月华<sup>1,2</sup>, 何庆玲<sup>1</sup>, 钱荷英<sup>2</sup>,  
孙平江<sup>2</sup>, 李 刚<sup>2</sup>, 徐安英<sup>1,2</sup>

(1. 江苏科技大学, 江苏 镇江 212003; 2. 中国农业科学院 蚕业研究所, 江苏 镇江 212018)

**摘要:** 为了筛选能够稳定表达, 适合蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因, 根据鳞翅目昆虫基因分析中常用的内参基因肌动蛋白( $\beta$ -non-muscle,  $\beta$ -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、18S rRNA、16S rRNA 的序列设计特异性引物, 分别对蓖麻蚕 4 个组织及 9 个不同发育时期的个体材料进行实时荧光定量 PCR, 制作标准曲线, 采用相对定量的方法处理  $C_t$  值, 结合 NormFinder 和 geNorm 软件分析以上 4 个候选内参基因在蓖麻蚕不同组织和不同发育时期转录表达的稳定性。结果表明:  $\beta$ -actin 在蓖麻蚕血液、脂肪体、中肠、丝腺各组织, 以及幼虫、蛹、成虫、卵各发育时期的表达最为稳定, 适合作为蓖麻蚕基因转录水平研究的内参基因。

**关键词:** 蓖麻蚕; 转录; 内参基因; 实时荧光定量

中图分类号: S885.2

文献标志码: A

## Selection of reference genes for transcription expression analysis in *Philosamia cynthia ricini*

CHEN Li-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Yue-hua<sup>1,2</sup>, HE Qing-ling<sup>1</sup>, QIAN He-ying<sup>2</sup>,  
SUN Ping-jiang<sup>2</sup>, LI Gang<sup>2</sup>, XU An-ying<sup>1,2</sup>

(1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212003, China;

2. The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

**Abstract:** In order to screen the stable expression reference genes in eri-silkworm(*Philosamia cynthia ricini*), based on the sequence of  $\beta$ -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 18S rRNA and 16S rRNA that are commonly used as reference genes, specific primers were designed. Real-time quantitative PCR was carried out in four organizations and nine different developmental stages. Using quantitative approach handle  $C_t$  to make relative standard curve combine with geNorm and NormFinder software to analyze the transcriptional expression stability of four genes in different tissues and developmental stages. The results showed that the transcription of  $\beta$ -actin in blood, fat body, midgut, silk gland and larvae, pupae, adult, egg of eri-silkworm was more stable, and can be taken as a suitable reference gene for quantitative analysis.

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22).

作者简介: 陈立华(1986-), 女, 在读硕士生, E-mail: woaily-ing@163.com.

通讯作者: 张月华, 副研究员, 硕士生导师, 研究领域为家蚕遗传育种与分子生物学. E-mail: cyszyh@163.com

**Keywords:** *Philosamia cynthia ricini*; transcription; reference genes; real-time quantitative PCR; geNorm; NormFinder

内参基因是一类不受时间、空间限制在生物体不同组织、细胞中表达相对恒定的基因。内参基因的作用是校正试验过程中由于人为和系统因素引起的实验偏差,以保证定量结果的准确、可靠。常见的内参基因有  $\beta$ actin、GAPDH、18S rRNA、16S rRNA、28S rRNA 等<sup>[1-4]</sup>。近年来,实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)<sup>[5]</sup> 技术不断成熟,因其高效、快速和灵敏等优点以及可以检测高通量的 RNA 等优越性能,进一步促进 qPCR 的应用,使其成为在转录水平检测基因的一种有效方法,并进一步促进了内参基因的相关研究。

蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini*) 属典型的鳞翅目昆虫,与家蚕、柞蚕一起并称为我国的 3 大绢丝昆虫;对蓖麻蚕基因表达的研究是解析蓖麻蚕遗传进化、发育变态以及抗病抗逆等重要生命活动的基础。吴玉等<sup>[6]</sup> 按照 MIQE 规则检测了家蚕 7 种常用内参基因 ( $\beta$ actin、GAPDH、28S rRNA、RPL3、 $\alpha$ -Tubulin、UBC 和 TBP) 在不同发育时期以及不同组织在蜕皮激素诱导下的转录表达变化,并利用检测内参基因常用的 NormFinder 和 geNorm 软件进行稳定性分析,得到不同试验条件下、不同组织中相对稳定表达的内参基因。Pen 等<sup>[7]</sup> 则应用实时荧光定量 PCR 技术检测了以上 7 种家蚕常用内参基因的转录表达变化,结合 NormFinder 和 geNorm 软件的分析得出家蚕的内参基因的表达并不是恒定的,在研究不同组织以及不同刺激条件下应选用不同的内参基因,因此内参基因的选择往往决定试验的成败。目前尚未见蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选的相关报告。本研究选择  $\beta$ actin、GAPDH、18S rRNA 和 16S rRNA 4 个鳞翅目昆虫基因表达分析常用内参基因,选取幼虫、蛹、成虫、卵各发育时期和 5 龄第 3 天血液、脂肪体、中肠、丝腺等组织,采用 qPCR 对 4 个蓖麻蚕的候选内参基因的表达变化进行检测,用 geNorm 和 NormFinder 程序分析试验数据,选择在蓖麻蚕不同组织和发育时期稳定表达的内参基因,为今后研究蓖麻蚕目的功能基因表达相对定量检测结果的准确性提供保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验蚕品种 供试蓖麻蚕品种‘海蓝(B7)’,由中国农业科学院蚕业研究所提供。蚕卵在 25℃、RH 80% 的条件下催青,幼虫在 25℃ 条件下用新鲜蓖麻叶饲养。蓖麻蚕的 9 个不同时期的个体材料分别为:蚁蚕、1~5 龄第 2 天的幼虫、化蛹第 2 天蚕蛹、羽化第 2 天成虫、产卵第 2 天蚕卵;5 个不同组织分别为:5 龄第 3 天幼虫血液、脂肪体、中肠、丝腺,样品分装于 1.5 mL 的 EP 管中,−80℃ 保存备用。

1.1.2 试验试剂 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH plus)、PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、pMD<sup>®</sup> 19-T Simple Vector、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 和 MiniBEST Plasmid Purification Kit 等购自 TaKaRa 公司;TRIzol 试剂等购自 Promega 公司。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞由本课题组制备。

### 1.2 试验方法

1.2.1 数据来源 蓖麻蚕基因 GAPDH (基因登录号:KC774025)、18S rRNA (基因登录号:AF535029.1) 和 16S rRNA (基因登录号:AY601280.1) 下载自 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); $\beta$ actin 基因片段由本实验室自己克隆。

1.2.2 蓖麻蚕总 RNA 提取及  $\beta$ actin 基因片段的克隆 根据鳞翅目昆虫中的柞蚕 (*Antheraea pernyi*) (登录号:GU176616.1) 和家蚕 (*Bombyx mori*) (登录号:U49644.1) 的  $\beta$ actin 基因,通过引物设计软件 primer5.0 设计简并引物  $\beta$ -actin-1F (5'-TTT-GGCGAGTGCAGTACCGAGGAC-3') 和  $\beta$ -actin-1R (5'-TTGCCGACCGTATGCAGAAGGAA-3')。采用 TRIzol 试剂提取蓖麻蚕 5 龄第 3 天幼虫头部总 RNA,经电泳检测提取的总 RNA 质量,cDNA 第 1 条链的合成根据 PrimeScript<sup>™</sup> RT 试剂盒说明书进行。反应体系:5×PrimeScript<sup>™</sup> Buffer 2  $\mu$ L, PrimeScript<sup>™</sup> RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ L, Oligo dT Primer (5×10<sup>-5</sup> mol/L) 0.5  $\mu$ L, Random 6 mers (1

$\times 10^{-4}$  mol/L) 0.5  $\mu$ L, RNA 模板 ( $1 \times 10^3$  ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 总体积 10  $\mu$ L。反应程序: 37  $^{\circ}$ C 15 min; 85  $^{\circ}$ C 5 s。以 cDNA 第 1 条链为模板进行 PCR, 反应体系: TaKaLa LA Taq 0.3  $\mu$ L, 10  $\times$  LA Taq Buffer II ( $Mg^{2+}$  Plus) 2.5  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 4  $\mu$ L, 模板 500 ng, 引物 0.1~0.5  $\mu$ mol/L, 灭菌水调到 25  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延长 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 选择与预期的 DNA 片段长度接近的区域割胶回收, 连接于 p<sup>MD</sup><sup>®</sup> 19-T Simple Vector 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 菌液 PCR 检测后送到上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

### 1.2.3 荧光定量 PCR 检测 4 个基因表达的稳定性

(1) 总 RNA 提取及 cDNA 合成。收集的蓖麻蚕不同组织和各发育时期蚕体的样品, 按照“1.2”所述方法提取总 RNA, 合成 cDNA。使用分光光度计检测提取的总 RNA 的浓度和 OD260/OD280 比值, 用 DEPC 水进行第 1 步标准化调平, 使各样品 RNA 浓度相等。逆转录测定 cDNA 的浓度和 OD260/OD280 比值, 并用 DEPC 水进行第 2 步标准化调平, 使各样品 cDNA 的浓度接近相等, -20  $^{\circ}$ C 保存。

(2) 引物设计。根据已克隆的  $\beta$ -actin 基因片段、GAPDH、18S rRNA 和 16S rRNA 设计引物 (如表 1)。

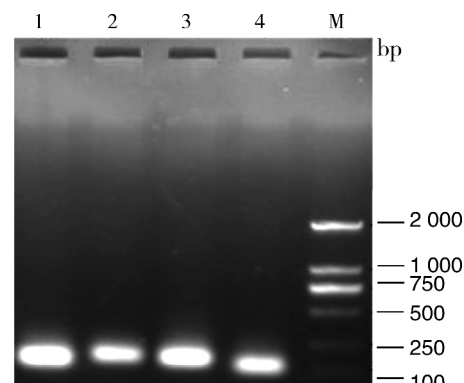
表 1 蓖麻蚕各候选基因的引物序列

Table 1 The primers of candidate reference genes of *Philosamia cynthia ricini*

基因名 Gene name	引物序列 Primer Sequence(5'-3')	扩增子 /bp Amplicon size	溶解 温度/ $^{\circ}$ C T <sub>m</sub>
$\beta$ -actin	GGGCCGACTCGTCATATT ATCACAGCCCTCGCTCCAT	153	59.7
GAPDH	CACTACTGCCACCCAGAAGACT CCAGTGGAAGCAGGAATAATGT	96	66.0
18S rRNA	GACACCGACAGGATTGACAGATTGA GCAGGCTAGAGTCTCGTTCTTAC	125	62.0
16S rRNA	AAACTCTATAGGGTCTTCTCGTCTT TGGTGACTTGTATGAAGGATTGGA	120	64.2

为了排除引物二聚体及非特异性扩增产物对 qRT-PCR 结果造成的影响, 对 PCR 产物进行电泳

检测, 显示单一条带, 如图 1, 说明 PCR 产物中无引物二聚体且引物具有特异性。



1: 16S rRNA; 2:  $\beta$ -actin; 3: 18S rRNA; 4: GAPDH。

图 1 候选内参基因的扩增图

Fig. 1 PCR products of candidate reference genes

(3) 实时定量 PCR 检测。采用 SYBR Green I 染料法, 在荧光定量 PCR 仪上进行试验。以候选内参基因引物进行 PCR 扩增, 割胶回收, 纯化 DNA 片段, 测得  $C_1$  ( $\beta$ -actin) 为 31.8 ng/ $\mu$ L、 $C_2$  (GAPDH) 为 29.0 ng/ $\mu$ L、 $C_3$  (18S rRNA) 为 34.5 ng/ $\mu$ L、 $C_4$  (16S rRNA) 32.4 ng/ $\mu$ L。将胶回收产物进行多次 4 倍稀释, 结合荧光定量, 选择合适的稀释倍数制作标准曲线, 其中  $\beta$ -actin 的扩增产物选择了  $4^{10} \sim 4^{14}$  5 个稀释度, GAPDH 基因的扩增产物选择了  $4^7 \sim 4^{11}$  5 个稀释度, 18S rRNA 的扩增选择了  $4^6 \sim 4^{10}$  5 个稀释度, 16S rRNA 的扩增选择了  $4^9 \sim 4^{13}$  5 个稀释度。反应体系为: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L, 50  $\times$  Rox Reference Dye 0.4  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L。反应程序: Stage1: 50  $^{\circ}$ C 2 min, Reps1; Stage2: 95  $^{\circ}$ C 30 s, Reps 1; Stage3: 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, Reps46; Stage4: 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, Reps1。以  $C_t$  值为纵坐标 (Y), 以稀释后每个样品浓度的对数为横坐标 (X), 并把最低浓度的对数设定为 1, 获得标准曲线。

1.2.4 数据分析 通过 PCR 产物制作标准曲线,  $C_t$  值和起始拷贝数存在线性关系, 计算得到各样品的表达量, 确定基因表达稳定性。

采用 geNorm<sup>[8]</sup> 和 NormFinder<sup>[9]</sup> 程序对蓖麻蚕的候选内参基因表达的稳定性和所需要的内参基因数量进行分析。设定不同样本中某一候选内参基

因  $Ct$  值最小者的相对表达量为 1,其他样本该基因的相对表达量则为  $2^{-\Delta Ct}$ ( $\Delta Ct =$  各样本  $Ct$  值 - 最小  $Ct$  值),通过计算内参基因表达稳定度的平均值( $M$ ), $M$  值越小表达越稳定。对内参基因的表达稳定度进行排序,并通过内参基因标准化因子配对差异值( $V_{n/n+1}$ ),评估该实验条件下适合作为蓖麻蚕基因转录分析的内参基因以及内参基因数量。

2 结果与分析

2.1 蓖麻蚕  $\beta$ -actin 的克隆与鉴定

以 1.2 所述进行 PCR 扩增,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,出现大小约 400 bp 的目的条带,如图 2。经 DNA 序列测定,扩增获得  $\beta$ -actin 的 cDNA 序列长度为 402 bp,与 GenBank 中柞蚕的同源序列和家蚕的同源序列的相似度都达到 99%。

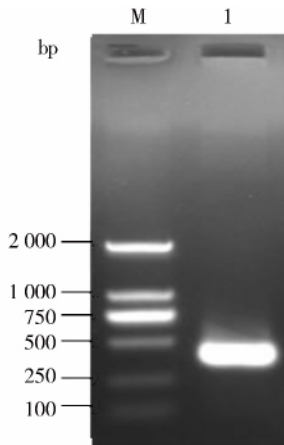


图 2 蓖麻的蚕  $\beta$ -actin 基因的 RT-PCR 扩增产物  
Fig. 2 Amplification of *Philosamia cynthia ricini*  $\beta$ -actin gene by RT-PCR

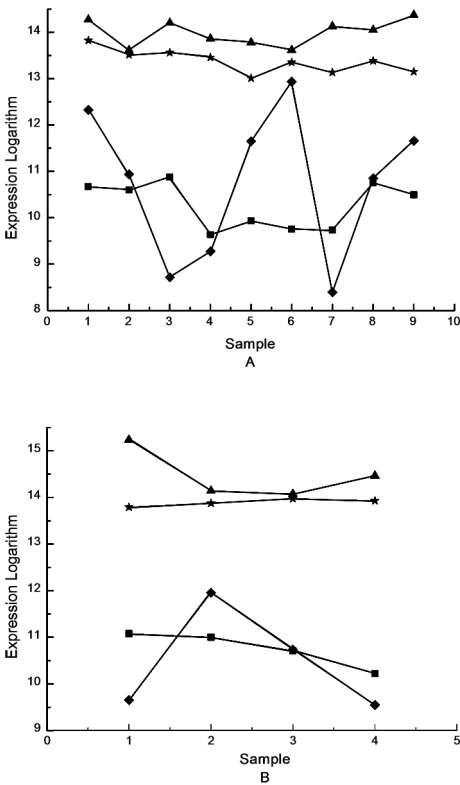
2.2 基因的稳定性分析

2.2.1 标准曲线的建立 根据  $Ct$  值得到标准曲线方程,见表 2,各基因的标准曲线的  $R^2$  都达到 0.993 以上,具有很好的相关性。

表 2 候选内参基因的标准曲线方程  
Table 2 Standard curve equation of the candidate reference genes

基因 Gene	标准曲线方程 The equation of standard curves	回归系数 Regression coefficient
$\beta$ -actin	$Y = -3.1132X + 23.350$	0.993 3
GAPDH	$Y = -2.9839X + 23.853$	0.997 4
18S rRNA	$Y = -3.1289X + 21.544$	0.997 8
16S rRNA	$Y = -3.0154X + 22.698$	0.996 9

2.2.2 基因表达的稳定性分析 各候选内参基因在蓖麻蚕不同发育时期和组织的转录水平如图 3。



▲ GAPDH, ★  $\beta$ -actin, ■ 18S rRNA, ◆ 16S rRNA  
(A) 1:卵,2:蚁蚕,3~7:1~5 龄幼虫,8:蛹,9:蛾。  
(B) 1:血液,2:脂肪体,3:中肠,4:丝腺。

图 3 实时荧光定量 PCR 检测蓖麻蚕各候选基因在不同发育时期(A)与不同组织(B)中的表达变化

Fig. 3 The expression of eri-silkworm candidate genes at different developmental stages and in different tissues with the real-time quantitative PCR

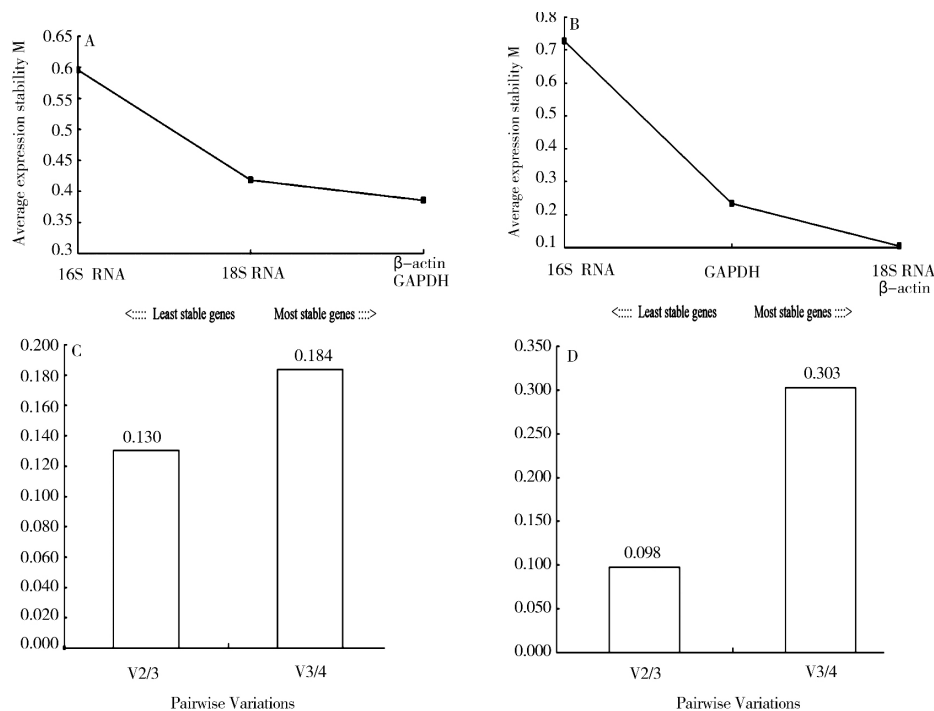
在不同的发育时期时, $\beta$ -actin 和 GAPDH 的表达差距较小,表达量接近在一条水平线上,即在不同发育时期表达量很稳定;而 18S rRNA 在卵期、蚁蚕、1 龄幼虫、蛹期、蛾期的表达量明显高于 2~5 龄幼虫,16S rRNA 在蚁蚕、4 龄幼虫的表达量远远高出其他时期,即这 2 个基因在蓖麻蚕不同发育阶段的表达量不稳定。综上所述,以上 4 个基因在蓖麻蚕不同发育时期的表达稳定性顺序为: $\beta$ -actin > GAPDH > 18S rRNA > 16S rRNA;在不同组织中  $\beta$ -actin 的表达量几乎没有变化,18S rRNA 在血液、脂肪体、中肠、丝腺中的表达量逐渐下降,GAPDH 在血液中的表达明显高于其他组织,16S rRNA 在脂肪体中的表达量最高,即以上 4 个基因在不同组织中的表达稳定性顺序为: $\beta$ -actin > 18S rRNA > GAPDH > 16S rRNA。

### 2.3 geNorm 分析候选内参基因的表达稳定性

运用 geNorm 软件检测蓖麻蚕中的候选内参基因在不同发育时期和组织中的表达变化,通过计算出各基因的表达稳定性  $M$ ,  $M$  值越小稳定性越高,结果见图 4(A、B)。由图 4 可见,在蓖麻蚕不同发育时期,  $\beta$ -actin(0.385 4)和  $GAPDH$ (0.3854)的  $M$  值相等,且小于 18S  $rRNA$ (0.4185)和 16S  $rRNA$ (0.595 6)的  $M$  值;由图 4(B)可见,在蓖麻蚕不同组织中,  $\beta$ -actin(0.105 1)和 18S  $rRNA$ (0.105 1)的  $M$  值相等,且小于  $GAPDH$ (0.233 2)和 16S  $rRNA$ (0.726 4)的  $M$  值,而且各基因的  $M$

值都小于 1.5。

为了提高结果的准确性,在检测基因的表达分析中,一般会选择多于 1 个内参基因对目的基因进行校正。本试验通过标准化因子配对差异分析  $V_{n/n+1}$ ,确定内参基因的适合数目,结果见图 4(C、D)。如图 4(C、D)所示,在不同发育时期  $V_{2/3} < 0.15$ ,说明可以选择  $\beta$ -actin 和  $GAPDH$  两个基因进行校正;在不同组织中  $V_{2/3} < 0.15$ ,说明可以使用  $\beta$ -actin 和 18S  $rRNA$  两个基因做内参;  $V_{3/4} > 0.15$ ,无需加入 3 个内参基因。



A:不同时期中的  $M$  值;B:不同组织中的  $M$  值;C:不同时期中的最适内参数目;D:不同组织中的最适内参数目。

图 4 geNorm 软件分析各候选内参基因的表达  $M$  值及最适内参基因数目

Fig. 4 Expression stability values of the reference genes and the optimum number of reference genes by geNorm

### 2.4 NormFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

为了提高试验的准确度,本试验还采用了 NormFinder 软件分析各基因的表达稳定性,稳定值越小稳定性越高,结果见表 3、表 4。由表 3 可知各候选内参基因在不同发育时期表达最为稳定的基因是  $\beta$ -actin,稳定值为 0.040,系统误差值是 0.033,  $GAPDH$  的稳定性次之,18S  $rRNA$ 、16S  $rRNA$  表达稳定性较差,这与 geNorm 软件的分析结果相似;由表 4 可知  $\beta$ -actin 在不同组织中的表达稳定性最高,  $GAPDH$  的稳定性次之,18S  $rRNA$ 、16S  $rRNA$  表达稳定性较差,与不同发育时期各候选内参基因的表达稳定性接近,这和 geNorm 软件分析候选内

参基因在不同组织中的表达稳定性接近,只有  $GAPDH$  和 18S  $rRNA$  的稳定性顺序有所变化,说明在蓖麻蚕的研究中  $\beta$ -actin 都可以用作内参基因。

表 3 NormFinder 软件分析在不同发育时期各候选内参基因的表达稳定性

Table 3 Calculated expression stability values of the reference genes in different developmental stages by NormFinder

基因 Gene name	稳定值 Stability value	标准差 Standard deviation
$\beta$ -actin	0.040	0.033
$GAPDH$	0.045	0.036
18S $rRNA$	0.129	0.033
16S $rRNA$	0.150	0.085

表 4 NormFinder 软件分析在不同组织中各候选内参基因的  
表达稳定性

Table 4 Calculated expression stability values of the  
reference genes in different organs

基因 Gene name	稳定值 Stability value	标准差 Standard deviation
$\beta$ -actin	0.063	0.050
GAPDH	0.065	0.049
18S rRNA	0.092	0.047
16S rRNA	0.120	0.069

### 3 讨论与结论

内参基因通常在某些组织或细胞中的表达是稳定的,但在其他类型的组织或细胞中则是变化的,因此任何一种内参基因的稳定表达都只是在特定类型的细胞或者组织中有相对稳定的表达<sup>[10]</sup>。在进行基因的相对定量研究中,由于不同的样本存在 RNA 的产量、质量和反转录效益上的差异,因此需要选择合适的内参基因进行校正<sup>[11-13]</sup>。

彭然等<sup>[7]</sup>用实时荧光定量 PCR 的方法,通过 geNorm 和 NormFinder 程序分析家蚕基因表达稳定性,得出 ACT3、GAPDH、 $\alpha$ -Tubulin 在中肠组织中可做内参基因,而  $\alpha$ -Tubulin、UBC、TBP 则在脂肪体中表达稳定,可做内参基因,在马氏管中则选 UBC、 $\alpha$ -Tubulin、ACT3 做内参基因。袁淼<sup>[14]</sup>在对褐飞虱内参基因的筛选中得出, RPS15、RPS11、TUB、EF、18S、AK、ACT、MACT 在不同发育时期表达稳定,适合做内参, PS11、TUB、RPS15、18S、ACT、MACT、EF、AK 在组织研究中可以作为内参使用。由此可见,即使是同一物种在相同的发育时期不同组织也必须选择相应的内参基因,而不是直接选择常用的内参基因。蓖麻蚕作为家蚕的近缘野生物种,目前尚未见蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选的相关报道。

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术分析蓖麻蚕  $\beta$ -actin、GAPDH、18S rRNA 和 16S rRNA 基因在不同组织和不同发育时期的表达变化。结果显示,在蓖麻蚕的不同组织和不同发育时期  $\beta$ -actin 基因的表达都很稳定,可以用作蓖麻蚕基因转录分析的内参基因;而其他 3 个候选内参基因的表达稳定性相对较差,在不同发育时期和不同组织中表达不够稳定,在不同的试验中可视具体情况确定内参基因的数量以及选何种内参基因。其中 GAPDH 在

蓖麻蚕不同发育时期的相同组织中表达量相对稳定,在进行相同组织的不同基因研究时也可以作为内参基因;在研究不同组织的基因表达量时, 18S rRNA 则呈现出与  $\beta$ -actin 相同的稳定趋势,因此在进行蓖麻蚕不同组织的相关基因研究时可以作为内参基因。由此可见,在进行蓖麻蚕基因研究时要根据不同的研究组织或发育时期选择合适的内参基因,这与家蚕的研究结果一致。

本试验采用了 geNorm 和 NormFinder 2 个软件对试验结果进行分析,在鉴定蓖麻蚕目的基因于不同组织中的表达变化选择内参基因时,2 个软件的分析结果产生了一些差别,即在选择 2 个内参基因时 GeNorm 认为 18S rRNA 优于 GAPDH,而 NormFinder 的分析结果则认为 GAPDH 优于 18S rRNA。这可能是由于这 2 个软件原理和侧重点不同造成,GeNorm 软件可以对任何组织的任意数量的内参基因进行筛选,选出合适数量的内参基因校对系统偏差,对细微表达差异的基因研究具有更重要的意义;而 NormFinder 程序只适用于检测单一表达稳定的基因,2 种软件分析结果会出现一些不同,很多研究者更偏好 geNorm 分析的结果。因此对蓖麻蚕不同组织的基因进行研究时,如果涉及低丰度基因的微小变化研究,在选择内参基因时可以倾向 geNorm 程序分析的结果。

本试验采用荧光定量 PCR 技术筛选内参基因的方法具有快速、高通量的特点,建立的 qPCR 检测目的基因转录水平的标准方程,线性范围广,为筛选更多的蓖麻蚕内参基因提供了借鉴。

### 参考文献:

- [1] Pugnale P, Latorre P, Rossi C, et al. Real-time multiplex PCR assay to quantify hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Virol Methods, 2006, 133(2): 195-204
- [2] Regis S, Grossi S, Lualdls, et al. Diagnosis of pelizaeus merzbacher disease: detection of proteolipid protein gene copy number by real-time PCR[J]. Neurogenetics, 2005, 6(2): 73-78
- [3] Nguyen van N, Taglineger K, Helps C R, et al. Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using quantitative real-time RT-PCR[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 113(3/4): 404-414

- [4] Tsui N B, Ngeek, Loym. Molecular analysis of circulating RNA in plasma[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 336: 123-134
- [5] Kenneth J, Thomas D L. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ct method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [6] 吴玉, 翟渊粉, 黄明霞, 等. 家蚕常用内参基因稳定性分析及丝蛋白相关基因表达调控研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(4): 423-431
- [7] 彭然. 家蚕常用内参基因的稳定性分析及两种实时荧光定量 PCR 方法比较[D]. 苏州: 苏州大学, 2012: 19-33
- [8] Vandesompele J, Preter D K, Pattyn F, 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): 0034
- [9] Andersen C L, Jensen J L, Orntoft 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 Res*, 2004, 64(15): 5245-5250
- [10] Hayati M I, Robert S, Rosanne 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: 325-337
- [11] 张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(5): 546-550.
- [12] Massimo Bionaz, Juan J L. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle[J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29: 312-319.
- [13] Ponton F, Chapuis M P, Pernice M, et al. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*[J]. *J Insect Physiol*, 2011, 57: 840-850.
- [14] 袁森. 褐飞虱内参基因的筛选及精氨酸酶基因的分子特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 50-54

(编辑: 梁 虹)

(上接第 77 页)

- [5] 刘耀武, 付桂月, 刘洪春, 等. 抗虫棉棉田害虫动态变化研究[J]. *江西棉花*, 2000, 22(1): 19-22.
- [6] LU Yan-hui, WU Kong-ming, JIANG Yu-ying, et al. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China[J]. *Science*, 2010, 328(28): 1151-1154.
- [7] WU K, LI W, FENG H, et al. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China[J]. *Crop Protection*, 2002, 21: 997-1002.
- [8] 黄本荣. 几种药剂对烟蚜毒力的温度效应[J]. *华东昆虫学报*, 2008, 17(3): 184-187.
- [9] 李前龙, 唐旭东, 徐莉, 等. 不同温度下 5 种拟除虫菊酯类农药对家蚕的毒性变化[J]. *蚕业科学*, 2013, 39(1): 70-75.
- [10] 朱金文, 魏方林, 李少南, 等. 毒死蜱对家蚕的急性毒性研究[J]. *蚕业科学*, 2006, 32(2): 272-275.
- [11] 陈伟国, 戴建忠. 大田常用农药对家蚕的熏蒸毒性测试[J]. *蚕业科学*, 2007, 33(3): 418-421.
- [12] 马云华. 几类杀虫剂对麦长管蚜和绿盲蝽的温度系数及温度对主要代谢酶的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [13] MA Y H, GAO I L, DANG Z H, et al. Effect of temperature on the toxicity of several insecticides to *Apolygus lucorum* (Heteroptera: Miridae)[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2012, 37(2): 135-139
- [14] 陆宴辉, 吴孔明. 棉花盲椿象及其防治[M]. 北京: 金盾出版社, 2008.
- [15] 王开运, 仪美芹, 姜兴印, 等. 吡虫啉对 6 种蚜虫的毒力和温度效应[J]. *农药*, 1999, 38(7): 13-14.
- [16] 姜兴印, 王开运, 仪美芹. 防治苹果黄蚜有效药剂的研究[J]. *农药*, 2000, 39(4): 26-27.
- [17] 马云华, 高占林, 李耀发, 等. 四种类型杀虫剂对麦长管蚜的温度效应及其与主要解毒酶的关系[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(6): 1661-1668.

(编辑: 李 川)