

二化螟实时荧光定量 PCR 内参基因筛选和表达稳定性评价

徐红星¹ 王国荣² 鲁艳辉^{1,*} 杨亚军¹ 郑许松¹ 田俊策¹ 吕仲贤^{1,*}

(¹浙江省农业科学院 农业部农产品信息溯源重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 杭州 310021; ²杭州市萧山区农业技术推广中心, 杭州 311202; *通讯联系人: luyanhui4321@126.com; luzxmh@163.com)

Screening Reference Genes and Evaluating of Their Expression Stability for qRT-PCR Normalization in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

XU Hongxing¹, WANG Guorong², LU Yanhui^{1,*}, YANG Yajun¹, ZHENG Xusong¹, TIAN Junce¹, LÜ Zhongxian^{1,*}

(¹Key Laboratory of Information Traceability for Agricultural Products, Ministry of Agriculture, P. R. of China/Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Xiaoshan Agricultural Technology Extension Center, Hangzhou 311202, China; *Corresponding author, E-mail: luyanhui4321@126.com; luzxmh@163.com)

Abstract: 【Objective】We aim to screen reference genes stably expressed in striped stem borers (SSB), *Chilo suppressalis*, under certain conditions, to lay a foundation for the study on the gene expression in SSB. 【Method】According to the results of SSB transcriptome data, 11 candidate genes from SSB were selected and their expression stability was detected under different treatment conditions (including development duration, tissues, feeding on different diets and rice varieties, dsRNA and mixed samples under temperature stress, insecticide treatment), by using real-time fluorescence quantitative PCR. The stability of the 11 candidate genes was evaluated by RefFinder, BestKeeper, GeNorm, NormFinder and ΔC_t . 【Result】*AK*, *RPL10* and *EF1* were highly stable in different development durations; *EF1*, *TUB* and *ACTB* were highly stable in different tissues. *TUB*, *RPL10* and *EF1* were relatively stable under temperature stress. *TF4* and *ACTA* were stable in insecticide treated samples. *TUB*, *TF4*, *EF1* and *RPL10* were stable in samples fed on different diets. *TUB* and *EF1* were stable reference genes in samples fed on different rice varieties. *TUB*, *AK*, *ACTB* and *EF1* were stable in the sample treated with dsRNA. *EF1*, *TUB* and *ACTB* were stable in mixed samples. 【Conclusion】It provide a reference for selection of suitable reference gene under different test conditions, and also provide more reliable and accurate data for research in gene expression in rice SSB.

Key words: *Chilo suppressalis*; reference gene; qRT-PCR; gene expression

摘要: 【目的】筛选特定试验条件下二化螟(*Chilo suppressalis*)稳定表达的内参基因, 为二化螟基因表达研究奠定基础。【方法】根据二化螟转录组测序结果挑选出11个候选基因, 利用实时荧光定量PCR测定其在二化螟不同发育历期、不同组织、温度处理、杀虫剂处理、取食不同饲料、取食不同水稻、dsRNA处理和混合样品的表达量, 利用RefFinder、BestKeeper、GeNorm和NormFinder等软件和 ΔC_t 值对11个候选基因的稳定性进行评估。【结果】5种分析方法表明, 在二化螟不同发育历期稳定性较高的内参基因是*AK*、*RPL10*和*EF1*, 不同组织中稳定性较高的内参基因是*EF1*、*TUB*和*ACTB*, 不同温度下较稳定的内参基因为*TUB*、*RPL10*和*EF1*, 杀虫剂处理样品中较稳定的是*TF4*和*ACTA*, 取食不同饲料较稳定的是*TUB*、*TF4*、*EF1*和*RPL10*, 取食不同品种水稻较稳定的是*TUB*和*EF1*, dsRNA处理样品中较稳定的是*TUB*、*AK*、*ACTB*和*EF1*, 混合样品中较稳定的是*EF1*、*TUB*和*ACTB*。【结论】为不同试验条件下选择合适的内参基因提供了参考, 也有利于在二化螟基因表达研究中获得更加可靠准确的数据。

关键词: 二化螟; 内参基因; 荧光定量PCR; 基因表达

中图分类号: Q755; S435.112^{+.1}

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)01-0075-10

实时荧光定量PCR(qRT-PCR)是目前检测生物样品中基因表达差异最灵敏、便捷的方法之一^[1]。

在利用qRT-PCR进行目的基因的表达水平研究时, 需要使用合适的内参基因对实验样品进行校正和

收稿日期: 2018-03-27; 修改稿收到日期: 2018-05-15。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31672050); 浙江省植物有害生物防控省部共建国家重点实验室培育基地自主设计项目(2010DS700124-ZZ1601)。

标准化,以减少转录效率、cDNA浓度差异等对结果的影响。这些内源性参照基因(简称内参或看家基因)应不受外部环境的影响,在各种组织或细胞中以及各种试验条件下都能稳定表达^[2]。常用的看家基因包括18S核糖体RNA基因(18S rRNA)、微管蛋白基因(tubulin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、核糖体蛋白基因(ribosomal protein)和 β -肌动蛋白基因(β -actin)。然而越来越多的研究表明,这些看家基因在用作内参基因时,因为选用的试验条件不同,稳定性不一^[3]。如Gutierrez等^[4]报道在用微管蛋白基因(tubulin6)校正发育动态表达时,与已经验证的内参基因相比,使用未验证的内参基因进行校正将对目标基因表达水平的定量出现100倍的偏差。盲目地使用一种看家基因作为内参,一方面可能导致基因表达的微小差异难以发现;另一方面可能出现错误甚至相反的结论^[5-6]。因此,筛选和评价在不同试验条件下稳定表达的内参基因对获得更准确的试验结果十分重要。

二化螟[*Chilo suppressalis*(Walker)],是我国水稻上的常发性害虫,食性较杂,除为害水稻外,还为害茭白、玉米等。随着对研究的不断深入,基因表达水平分析对于研究二化螟的寄主选择、适应性、抗药性、滞育和神经调节等相关基因的调控机理方面具有重要作用。因此,筛选稳定的内参基因在二化螟基因表达研究中起着关键作用。在之前的研究中已有对多种鳞翅目昆虫筛选稳定的内参基因的报道,如小菜蛾^[7]、斜纹夜蛾^[8]、棉铃虫^[9-11]、甜菜夜蛾^[12]、褐蝶^[13]、大螟^[14, 15]、大斑蝶^[16]、蝙蝠蛾^[17]、草原毛虫^[18]和桃蛀螟^[19]等。尽管之前有二化螟内参基因评价的相关研究^[20, 21],探讨了在不同组织、不同发育历期和不同温度处理下内参基因的稳定性,但本研究还对杀虫剂处理、不同喂食、取食不同品种水稻和dsRNA处理下内参基因的表达稳定性进行了评估,为不同试验条件下选择合适的二化螟内参基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和不同的处理

二化螟种群于 2014 年采自浙江省杭州市萧山区义桥镇(N 30°04', E 120°12')常规水稻田,置于人工气候室饲养并维持种群。温度为(25±1)°C,相对湿度为 75%,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。幼虫采用人工饲料饲养^[22],羽化后的成虫以 10%的蔗糖

水补充营养。

不同组织样本:选择个体大小一致、健康的 3 龄幼虫,饥饿 3 h,在预冷的生理盐水中解剖,获取头、中肠、脂肪体和表皮四部分组织。

不同发育时期样本:收集不同发育阶段的样本,包括第 5 天的卵、1~6 龄幼虫(蜕皮后第 1 天的幼虫)、早期蛹(第 1 天的蛹)、晚期蛹(第 7 天的蛹)、雌雄成虫(第 1 天羽化的成虫)。

温度处理:分别采用 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C处理二化螟 3 龄幼虫 3 h,收集样品,液氮速冻,置于-80°C超低温冰箱保存,以备提取 RNA 用,每个处理 3 个生物学重复,每个重复收集 5 头幼虫。

药剂处理:选取三种常用于防治二化螟的药剂氯虫苯甲酰胺、阿维菌素、甲氧虫酰胺(原药由中国农业大学高希武教授提供),采用稻苗浸渍法进行毒力测定^[23]。每种药剂用含 0.1% TritonX-100 的清水稀释 5 个浓度梯度,0.1% TritonX-100 的清水作为空白对照。将分蘖期的水稻茎秆基部放入各处理药液中浸渍 10 s,取出晾干后将稻茎齐根剪下,留下 5~6 cm 的茎秆。事先准备 6.5 cm 直径的培养皿若干,每皿内铺 4 层滤纸并加入无菌水保湿。将茎秆放入培养皿中,每个培养皿放置 15 根茎秆并用毛笔接入 10 头 3 龄幼虫,每组重复 3 次。然后用两层黑布覆盖。48 h 后观察幼虫死亡情况,计算 LC₂₅。然后以每种药剂的 LC₂₅ 分别处理二化螟 3 龄幼虫,48 h 后收集存活的试虫,每个重复收集 5 头,共收集 3 个重复,液氮冻存置于-80°C下供提取总 RNA 用。

不同寄主植物饲喂:利用人工饲料、水稻品种 TN1(台本地 1 号)的茎秆、茭白和香根草饲喂二化螟 3 龄幼虫 3 d 后,收集样品,提取总 RNA。

不同水稻品种饲喂:用不同水稻品种(TN1 和转 Cry2A 基因的明恢 63)茎秆饲喂二化螟 3 龄幼虫 3 d 后,收集样品,提取总 RNA。

dsRNA 处理:选取大小一致的 3 龄幼虫,利用以二化螟乙酰胆碱酯酶基因为靶标的 dsRNA(利用 TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit 按照说明书操作合成)进行显微注射(仪器: Nanoject II, Drummond Scientific Company; 注射部位:第三和第四节间膜^[24]),单头注射量为 1 μ L(1.0 μ g/ μ L)的 dsRNA,对照采用缓冲液(dsRNA 合成试剂盒中提供的溶解 dsRNA 的缓冲液)。每组注射 30 头,注射完 3 d 后,收集存活的试虫,每个重复收集 5 头,共收集 3 个重复,-80°C下保存供提取总 RNA 用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

所有样本总 RNA 提取采用 Trizol 试剂，具体步骤参照 Trizol 试剂说明书(Invitrogen)。取 1 μ L RNA 样品测定 OD_{260}/OD_{280} (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific)，比值在 1.8~2.2 之间的样品用于 cDNA 合成。

cDNA 合成：取 3.0 μ g 总 RNA，利用 Oligo dT 进行 cDNA 合成，操作步骤参照 Thermo Fisher 反转录试剂盒说明书。cDNA 置于-20℃下保存以供实时 PCR 用。

1.3 qRT-PCR 检测候选内参基因引物特异性和扩增效率

利用 Primer 3.0 设计二化螟备选基因(表 1)。实时荧光定量 PCR 反应按照 iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA)说明书进行，使用 ABI 7300 定量 PCR 仪。反应体系共 20 μ L，包含 1 μ L 的 cDNA，10 μ L iTaq Universal SYBR Green Supermix (2 \times)，正反向引物各 1 μ L，双蒸水 7 μ L；反应条件为 95℃下 30 s，95℃下 10 s，55℃下 30 s，共 40 个循环。融解曲线：55℃到 95℃，每 0.5℃收

集一次荧光信号。每个 cDNA 样本设置 2 个技术重复。cDNA 按 5 倍等比稀释成 5 个不同浓度，获得引物扩增效率。

1.5 基因表达稳定性分析

分别利用 RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>)、BestKeeper^[25]、GeNorm^[26]、NormFinder^[6]等分析软件和 ΔC_t 值^[27]，评估候选内参基因在不同条件下的表达稳定性。每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 引物的扩增效率及特异性评价

qRT-PCR 数据显示，每个候选内参基因的溶解曲线均为单一峰，表明所选的定量引物均具有很好的特异性。同时，基于内参基因不同浓度的 cDNA 获得的标准曲线具有良好的决定系数($R^2>0.987$)，PCR 扩增效率也在 97.6%~107.0% (表 1)。由此可见，候选内参基因的定量引物设计合理，可以用于相应

表 1 备选基因的功能、引物序列和产物特性

Table 1. Function, primer sequence and amplicon characteristics of the candidate reference genes used in this study.

基因名 (缩写) Gene name (Gene symbol)	引物序列 Sequence (5'-3')	基因功能 Putative function	PCR 扩增 效率 E/%	决定系数 Coefficient of determination
Beta 微管蛋白 Beta-tubulin(TUB)	F: CTCCGACTTACAGTTAGAGC R: AGTACTGAATCGACAAGCTC	细胞骨架结构蛋白 Cytoskeleton structural protein	104.2	0.994
延长因子-1 α Elongation factor-1 α (EF1)	F: CTGGGTATTGGACAAACTGA R: GAGGTTCTGTGATCATGTT	核糖体的组成结构 Structural constituent of ribosome	107.0	0.997
转录因子 4 Transcription factor 4(TF4)	F: ATTGCTGTGATAAAGAAGAAC R: AGAAGGTGGTGGACTCAAC	催化 GTP 结合到核糖体的受体 Catalyze GTP binding to the acceptor of ribosome	98.7	0.993
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	F: GGGTATTCTTGACTACAC R: CTGGATGTACTTGATGAG	糖酵解酶 Glycolytic enzyme	105.9	0.995
肌动蛋白 A1 Actin A1(ACTA)	F: GTCGCTTCCCAAATTACATC R: CTCCATATCGTTCCAGTCG	参与细胞的运动、结构和完整性 Involved in cell motility, structure and integrity	103.5	0.987
Beta 肌动蛋白 Beta-actin(ACTB)	F: GATCATGTTTGAGACCTT R: GATCTTCATGAGGTAGTC	参与细胞的运动、结构和完整性 Involved in cell motility, structure and integrity	97.6	0.992
精氨酸激酶 Argininase kinase(AK)	F: CTGAAGAAGTACCTTACC R: CAATCCAGCAGAGTTGAG	细胞能量代谢关键酶 Key enzyme F cellular energy metabolism	99.4	0.996
核糖体蛋白 S2 Ribosomal protein S2(RPS2)	F: CAACGATGAGGTCCTGAAGA R: CGATCTTGTTACCCAGTAG	核糖体的组成结构 Structural constituent of ribosome	102.1	0.990
核糖体蛋白 S3 Ribosomal protein S3(RPS3)	F: CGGAGATCATCATTATGG R: GAGTTTGATCTGAGAGAC	核糖体的组成结构 Structural constituent of ribosome	103.5	0.989
核糖体蛋白 S5 Ribosomal protein S5(RPS5)	F: TACTGCCATAATCAACTCCG R: TTAGATGAACCTTAGCAGC	核糖体的组成结构 Structural constituent of ribosome	105.4	0.992
核糖体蛋白 L10 Ribosomal protein L10(RPL10)	F: GACTTGGGTAAGAAGAAG R: GATGACATGGAATGGATG	核糖体的组成结构 Structural constituent of ribosome	101.4	0.989

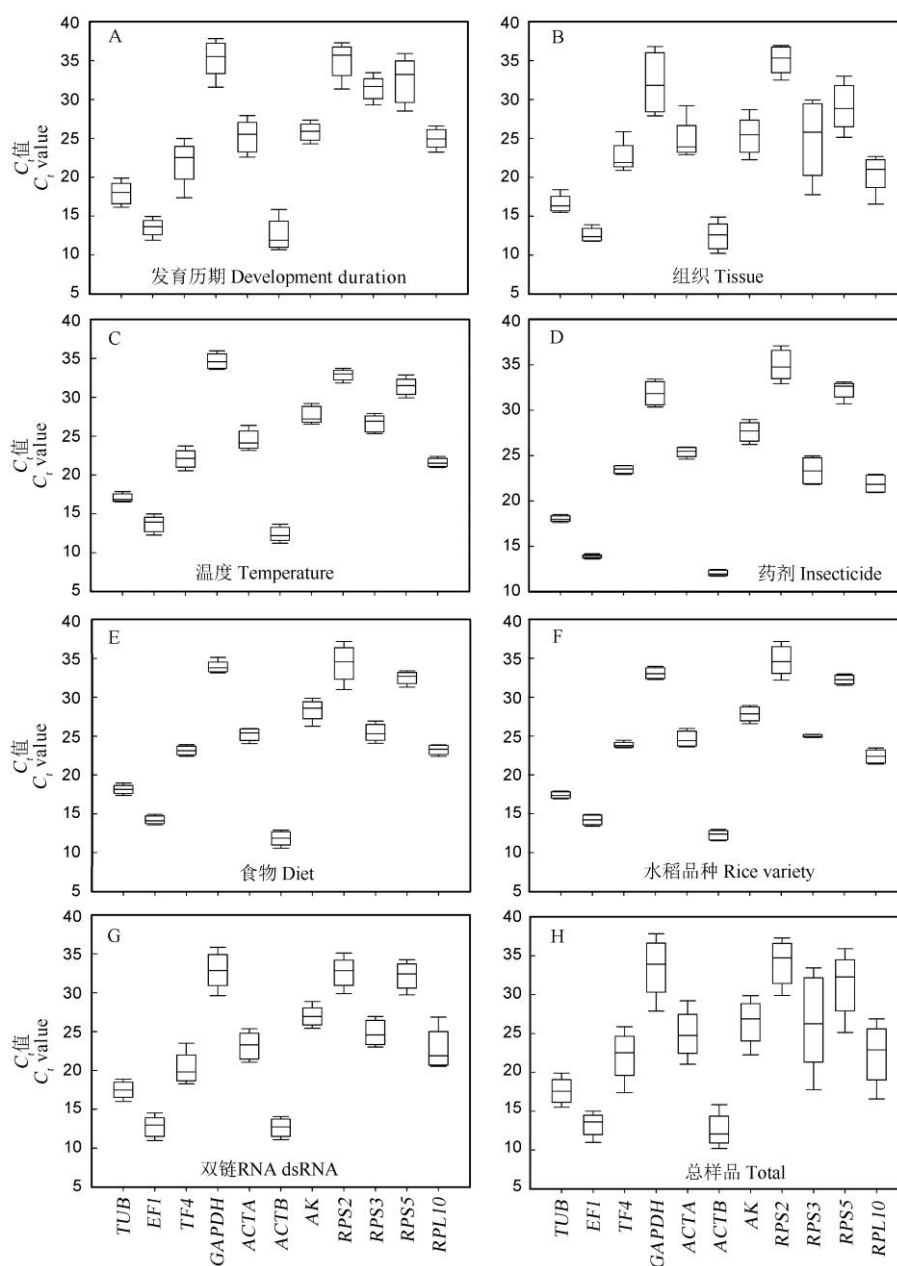


图 1 候选内参基因的表达水平(C_t 值)

Fig. 1. Expression levels of candidate reference genes (C_t values).

基因的定量检测。

2.2 候选内参基因的表达水平分析

检测了每个候选内参基因在不同条件下的 C_t 值, 如不同发育历期(图 1-A)、不同组织(图 1-B)、不同温度处理(图 1-C)、杀虫剂处理(图 1-D)、喂食不同饲料(图 1-E)、取食不同水稻(图 1-F)和 dsRNA 处理(图 1-G)。所有 11 个候选内参基因的 C_t 值中位数为 12.08(*ACTB*)~34.73(*RPS2*)(图 1-H)。其中 *ACTB* 的表达水平最高, C_t 值为 10.22~15.84, 其他依次为 *EF1* (11.0~14.99)、*TUB* (15.50~19.90)、*TF4* (17.36~25.86)、*RPL10* (16.57~26.87)、*ACTA* (21.06~29.19)、

RPS3 (17.76~33.45)、*AK* (22.26~29.87)、*RPS5* (25.14~35.91)、*GAPDH* (27.90~37.83)、*RPS2* (29.88~37.29)。*RPS3* 在不同样品间的表达差异最大, 而 *EF1* 在不同样品间的表达差异最小(图 1-H)。因此, 没有一种内参基因在所有的试验条件下都稳定表达。

2.3 候选内参基因在不同发育历期的表达稳定性分析

在不同发育历期样品中, 利用 RefFinder、GeNorm 和 NormFinder 分析均显示 *AK* 是稳定性最高的基因。BestKeeper 和比较 ΔC_t 值分析分别表明 *RPL10* 和 *EF1* 是最稳定的基因(图 2)。另外, 5 种分



图 2 候选内参基因在不同发育历期、不同组织、不同温度处理、不同杀虫剂处理下的表达稳定性分析
 Fig. 2. Comparison of the rankings in candidate reference genes expression stability in development durations of *C. suppressalis*, across different tissues of *C. suppressalis*, exposed to different temperatures or insecticides.

析方法均表明 *RPS5* 是最不稳定的内参基因(图 2)。
 根据 RefFinder 分析, 表达稳定性排名为 *AK*、*RPL10*、*RPS3*、*EF1*、*TUB*、*ACTA*、*ACTB*、*GAPDH*、*RPS2*、*TF4* 和 *RPS5*(图 2)。利用 GeNorm 软件判断配对变异值(V_n/V_{n+1})来确定内参基因的最佳数目, 即当 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时, 该条件下的内参基因最佳数目为 n 个。GeNorm 分析显示在不同发育历期中所

有配对变异值均高于 0.15(图 2), 说明通过 V_n/V_{n+1} 不能确定内参基因的最佳数目。此时, 我们应选表达稳定性最高的 3 个基因作为最适内参基因。综合分析, 在不同发育历期, 表达最稳定的 3 个内参基因为 *AK*、*RPL10* 和 *EF1*(表 2)。
 2.4 候选内参基因在不同组织的表达稳定性分析
 在不同组织, RefFinder、 ΔC_i 值和 NormFinder

表 2 不同实验条件下的理想内参基因

Table 2. Ideal reference genes across different experimental conditions according to software analysis.

发育历期 Development duration	不同组织 Tissue	温度处理 Temperature	杀虫剂处理 Insecticide	喂食处理 Diet	转基因处理 Transgenic rice	dsRNA	综合分析 Total
AK	EF1	TUB	TF4	TUB	TUB	TUB	EF1
RPL10	TUB	RPL10	ACTA	TF4	EF1	AK	TUB
EF1	ACTB	EF1		EF1		ACTB	ACTB
				RPL10		EF1	

分析表明 *EF1* 是最稳定的内参基因, 而 BestKeeper 和 GeNorm 分析显示 *TUB* 是稳定性最高的(图 2)。另外, 5 种分析方法均显示 *RPS3* 是最不稳定的内参基因(图 2)。根据 RefFinder 分析, 表达稳定性排名为 *EF1*、*TUB*、*ACTB*、*TF4*、*AK*、*RPS2*、*ACTA*、*RPL10*、*RPS5*、*GAPDH* 和 *RPS3*(图 2)。GeNorm 分析显示 V_n/V_{n+1} 均高于 0.15(图 2)。综合分析, 在不同组织样品中, 内参基因表达稳定性排名依次为 *EF1*、*TUB* 和 *ACTB*(表 2)。

2.5 候选内参基因在不同温度处理下的表达稳定性分析

在不同温度处理下, RefFinder、 ΔC_t 值、GeNorm 和 NormFinder 分析均表明 *TUB* 是最稳定的内参基因, *ACTA* 是最不稳定的, 而 BestKeeper 分析显示 *RPS2* 是稳定性最高的, *AK* 是最低的(图 2)。根据 RefFinder 分析, 稳定性排名为 *TUB*、*RPL10*、*RPS2*、*EF1*、*GAPDH*、*RPS5*、*ACTB*、*AK*、*TF4*、*RPS3* 和 *ACTA*(图 2)。GeNorm 分析显示 V_4/V_5 低于 0.15(图 4), 因此, 需要 4 个内参基因, 然而 *RPS2* 的平均 C_t 值大于 30, 不适合作为不同温度处理条件下的内参基因(图 1-C)。综合分析, 在不同温度处理样品中, 3 个表达稳定的内参基因分别为 *TUB*、*RPL10* 和 *EF1*(表 2)。

2.6 候选内参基因在杀虫剂处理下的表达稳定性

分别利用氯虫苯甲酰胺、阿维菌素、甲氧虫酰胺处理二化螟 3 龄幼虫, RefFinder、 ΔC_t 值、GeNorm 和 NormFinder 分析均表明 *TF4* 是最稳定的内参基因, *RPS2* 是最不稳定的, 而 BestKeeper 分析显示 *EF1* 的稳定性最高, *RPS3* 最低(图 2)。根据 RefFinder 分析, 稳定性排名为 *TF4*、*ACTA*、*TUB*、*EF1*、*ACTB*、*RPL10*、*AK*、*RPS5*、*GAPDH*、*RPS3* 和 *RPS2*(图 2)。GeNorm 分析, V_2/V_3 低于 0.15(图 4), 表明需要 2 个内参基因。因此, 在氯虫苯甲酰胺处理样品中, 2 个需要的内参基因为 *TF4* 和 *ACTA*(表 2)。

2.7 候选内参基因在不同喂食处理下的表达稳定性分析

在取食人工饲料、水稻茎秆和茭白条件下,

RefFinder 和 BestKeeper 分析显示 *TUB* 是最稳定的内参基因。 ΔC_t 值和 NormFinder 分析表明 *TF4* 是稳定性最高的内参基因, GeNorm 分析显示 *GAPDH* 是最稳定的(图 3)。另外, 5 种分析方法都显示 *RPS2* 是最不稳定的内参基因(图 3)。RefFinder 分析显示内参基因排名为 *TUB*、*TF4*、*GAPDH*、*EF1*、*RPL10*、*ACTA*、*RPS5*、*ACTB*、*RPS3*、*AK* 和 *RPS2*(图 3)。GeNorm 分析显示 V_4/V_5 低于 0.15(图 4), 表明需要 4 个内参基因, 它们分别是 *TUB*、*TF4*、*EF1* 和 *RPL10*(表 2)。

2.8 候选内参基因在取食不同水稻品种下的表达稳定性分析

在取食两种不同品种水稻条件下, RefFinder、 ΔC_t 值和 NormFinder 分析显示 *TUB* 是稳定性最高的内参基因。BestKeeper 分析表明 *RPS3* 是最稳定的内参基因, GeNorm 分析显示 *GAPDH* 是最稳定的(图 3)。5 种分析方法均显示 *RPS2* 是最不稳定的内参基因(图 3)。RefFinder 分析表明内参基因排名为 *TUB*、*RPS3*、*EF1*、*GAPDH*、*TF4*、*RPL10*、*RPS5*、*AK*、*ACTA*、*ACTB* 和 *RPS2*(图 3)。GeNorm 分析显示 V_2/V_3 低于 0.15(图 4), 表明需要 2 个内参基因, 它们是 *TUB* 和 *EF1*(表 2)。

2.9 候选内参基因在 dsRNA 处理下的表达稳定性

在注射 dsRNA 处理的条件下, RefFinder、 ΔC_t 值、GeNorm 和 NormFinder 分析均表明 *TUB* 是最稳定的内参基因。BestKeeper 分析显示 *AK* 是稳定性最高的(图 3)。根据 RefFinder 分析, 内参基因表达稳定性排名为 *TUB*、*AK*、*ACTB*、*EF1*、*RPS2*、*RPS3*、*GAPDH*、*ACTA*、*RPS5*、*TF4* 和 *RPL10*(图 3)。根据 GeNorm 分析, V_9/V_{10} 和 V_{10}/V_{11} 低于 0.15(图 4)。综合分析, 4 个最稳定的内参基因是 *TUB*、*AK*、*ACTB* 和 *EF1*(表 2)。

2.10 候选内参基因在所有供试样品中的表达稳定性分析

为选择可以通用的内参基因, 将所有供试样品的 qRT-PCR 的原始数据放在一起进行评估。根据 RefFinder、 ΔC_t 值和 BestKeeper 分析, 二化螟中最



图 3 候选内参基因在不同喂食处理、取食不同水稻品种、经 dsRNA 处理、在所有供试样品中的表达稳定性分析

Fig. 3. Comparison of the rankings in candidate reference gene expression stability of *C. suppressalis* fed on different diets, reared on different rice varieties, under dsRNA treatments or in all the tested samples of *C. suppressalis*.

稳定的内参基因是 *EF1*、*TUB* 和 *ACTB*；根据 GeNorm 和 NormFinder 分析，*TUB*、*EF1* 和 *ACTB* 是最稳定的。根据 RefFinder 综合分析，内参基因稳定性排名为 *EF1*、*TUB*、*ACTB*、*ACTA*、*AK*、*TF4*、*RPL10*、*RPS2*、*RPS5*、*GAPDH* 和 *RPS3*(图 3)。根据 GeNorm 分析， V_n/V_{n+1} 均高于 0.15(图 4)。因此，

在所有样品可以稳定使用的内参基因为 *EF1*、*TUB* 和 *ACTB*(表 2)。

3 讨论

qRT-PCR 是研究基因表达水平的重要技术，采

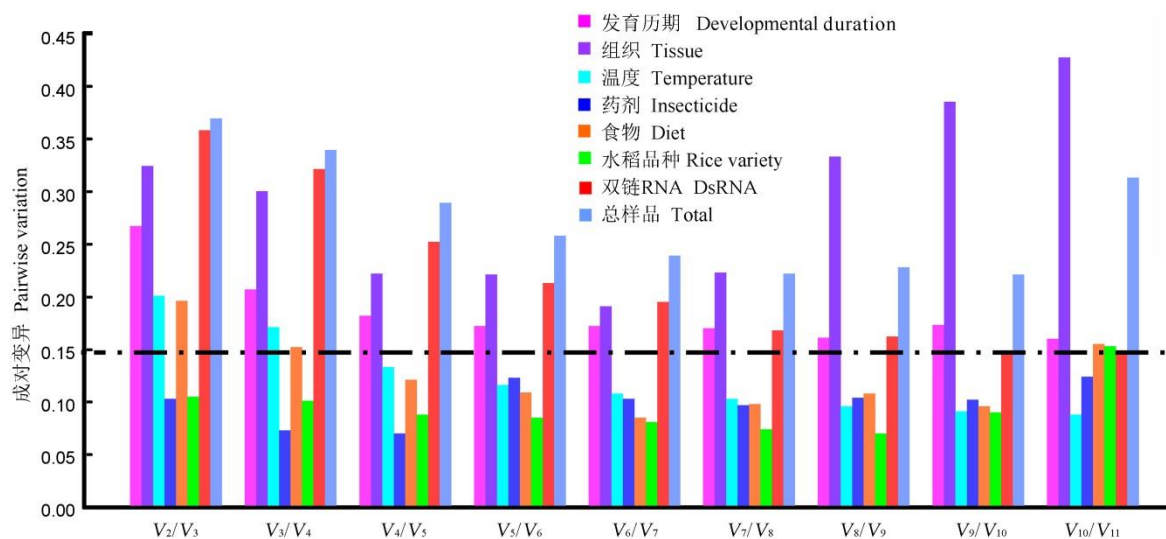


图 4 二化螟最优内参基因综合分析

Fig. 4. Determination of the optimal number of reference genes in *C. suppressalis*.

用相对定量的方法对基因的表达量进行检测,即以内参基因作为标准,校准目的基因的表达量,具有灵敏度高、准确性好的特点,目前已成为研究基因表达中检测 mRNA 水平的标准技术^[1,28]。为了保证基因表达分析的可靠性,内参基因应该在不同试验条件下稳定表达^[6]。因此,筛选合适的内参基因是研究基因表达的关键。之前关于二化螟内参基因筛选的研究,对不同发育时期、不同组织和不同温度处理的样品中内参基因的稳定性进行了评估^[20-21]。而本研究通过 RefFinder、BestKeeper、GeNorm、NormFinder 和 ΔC_t 值这 5 种分析方法,在不同发育时期、不同组织、不同温度、杀虫剂处理、取食不同饲料、取食不同水稻、dsRNA 处理和所有的供试样品中评估合适的内参基因用于 mRNA 水平的表达分析。

候选内参基因的稳定性分析,首先使用 BestKeeper、GeNorm、NormFinder 和 ΔC_t 值依据相关参数分析各基因的稳定性,并对稳定性高低进行排序,然后进一步使用在线程序 RefFinder 给出候选内参基因的综合排名。研究结果表明 *TUB* 在不同温度、取食不同饲料、取食不同品系水稻和 dsRNA 处理的二化螟样品中是最稳定的内参基因。*TUB* 在很多基因表达研究被作为内参基因^[29-31],它属于真核生物结构基因家族,参与形成微管和骨架的基础组分,调控细胞分裂、形状、运动和胞内活动等^[32]。在一些昆虫内参基因评价研究中,*TUB* 被认为是最稳定表达的内参基因,如在褐飞虱的不同地理种群^[33]、白背飞虱不同发育时期和温度处理^[34]、松墨天牛不同发育时期和不同组织^[31]、蝙蝠蛾的微生物感染^[17]

和烟粉虱温度处理样品中^[35]等。*EF1* 通过催化氨酰基转运 RNA 的依赖型 GTP 结合到核糖体的受体位点,在翻译过程中起着重要作用^[36]。*EF1* 在很多研究中,被认为是合适的内参基因,如斜纹夜蛾的温度处理样品^[8]、东亚飞蝗的不同发育历期^[37]、西花蓟马的不同历期和温度处理^[38]、大螟的不同组织和不同发育历期^[15]和瓢虫的不同发育时期和温度处理^[39]等。在本研究中,*EF1* 在二化螟不同组织和混合供试样品中,是最稳定的内参基因。在之前一些二化螟基因表达研究中^[40-43],*EF1* 通常被用作内参基因,表现非常稳定。

本研究通过 5 种方法评估了内参基因的稳定性, ΔC_t 值和 NormFinder 分析得到的结果在所有实验条件中都非常相似。因此,为了确定合适的内参基因数量,GeNorm 分析被用来计算配对变异值 (V_n/V_{n+1});当配对变异值小于 0.15,意味着不需要增加额外的内参基因来提高准确性^[6]。本研究中,配对变异值在不同发育时期、不同组织和混合样品中,都高于 0.15,意味着通过配对变异值不能确定内参基因的最佳数目,根据 GeNorm 使用手册,当配对变异值大于 0.15 时,可以根据配对变异值趋势选择 2~3 个最稳定的内参基因。因此,在这 3 种条件下需要选择 3 个表达稳定的内参基因最为合理,以获得更加准确可靠的结果。

本研究中,我们利用 5 种分析方法评估了 *TUB*、*AK*、*ACTB*、*EF1*、*RPS2*、*RPS3*、*GAPDH*、*ACTA*、*RPS5*、*TF4* 和 *RPL10* 这 11 种候选内参基因在 8 种不同试验条件下的稳定性。*TUB* 在温度处理、取食不同饲料、取食不同品系水稻和 dsRNA 处理的二

化螟样品中是最稳定的, 在不同组织和混合样品中是第二稳定的。*EF1* 在不同组织和混合样品中是最稳定的, 在取食不同品系水稻中是第二稳定的, 在不同发育时期、温度处理和取食不同饲料中被认为是第三稳定的。另外, *AK* 和 *TF4* 在不同发育时期和杀虫剂处理的样品中分别是最稳定的内参基因。这些结果表明没有一个内参基因适用于任何试验条件, 因此我们认为更多的内参基因需要在特定的试验条件下进行评估。本研究结果为不同试验条件下选择合适的内参基因提供了参考, 也有利于在二化螟基因表达研究中获得更加可靠准确的数据。

参考文献:

- [1] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25: 169-193.
- [2] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol*, 1999, 75: 291-295.
- [3] de Jonge H J, Fehrmann R S, de Bont E S, Hofstra R M, Gerbens F, Kamps W A, de Vries E G, van der Zee A G, te Meerman G J, ter Elst A. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*, 2007, 2: e898.
- [4] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, Van Wuytswinkel O. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell*, 2008, 20: 1734-1735.
- [5] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 2005, 6: 279-284.
- [6] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002, 3: Research0034.
- [7] 符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军. Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 2012, 55(12): 1406-1412.
Fu W, Xie W, Zhang Z, Wu Q J, Wang S L, Zhang Y J. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin. *Acta Entomol Sin*, 2012, 55(12): 1406-1412. (in Chinese with English abstract)
- [8] Lu Y H, Yuan M, Gao X W, Kang T H, Zhan S, Wan H, Li J H. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 2013, 8: e68059.
- [9] Chandra GS, Asokan R, Manamohan M, Kumar N K, Sita T. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in cotton bollworm, *Helicoverma armigera*. *Mol Biol*, 2014, 48: 927-938.
- [10] Shakeel M, Zhu X, Kang T, Wan H, Li J. Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Asia-Pac Entomol*, 2015, 18: 123-130.
- [11] Zhang S D, An S H, Li Z, Wu F M, Yang Q P, Liu Y C, Cao J J, Zhang H J, Zhang Q W, Liu X X. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 2015, 555: 393-402.
- [12] Zhu X, Yuan M, Shakeel M, Zhang Y J, Wang S L, Wang X, Zhan S, Kang T H, Li J H. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 2014, 9: e84730.
- [13] Arun A, Baumle V, Amelot G, Nieberding C M. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR expression analysis of candidate genes involved in olfactory communication in the butterfly *Bicyclus anynana*. *PLoS One*, 2015, 10: e0120401.
- [14] Lu Y H, Zheng X S, Liang Q, Xu H X, Yang Y J, Tian J C, He X C, Lu Z X. Evaluation and validation of reference genes for SYBR Green qRT-PCR normalization in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Asia-Pac Entomol*, 2015, 18: 669-675.
- [15] Sun M, Lu M X, Tang X T, Du Y Z. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, 2015, 10: e0115979.
- [16] Pan H P, Yang X W, Bidne K, Hellmich R L, Siegfried B D, Zhou X G. Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* (L.), a migrating bio-indicator. *PLoS One*, 2015, 10: e0129482.
- [17] Liu G Q, Qiu X H, Cao L, Zhang Y, Zhan Z B, Han R C. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR studies of physiological responses in the ghost moth, *Thitarodes armoricanus* (Lepidoptera, Hepialidae). *PLoS One*, 2016, 11: e0159060.
- [18] Zhang L, Zhang Q L, Wang X T, Yang X Z, Li X P, Yuan M L. Selection of reference genes for qRT-PCR and expression analysis of high-altitude-related genes in grassland caterpillars (Lepidoptera: Erebidae: Gynaephora) along an altitude gradient. *Ecol Evol*, 2017, 7: 9054-9065.
- [19] 杨苓, 胡晓静, 徐志峰, 何林, 肖伟. 桃蛀螟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 2017, 60(11): 1266-1277.
Yang L, Hu X J, Xu Z F, He L, Xiao W. Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomol Sin*, 2017, 60(11): 1266-1277. (in Chinese with English abstract)
- [20] Teng X L, Zhang Z, He G L, Yang L W, Li F. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects. *J Insect Sci*, 2011, 12: 60.
- [21] Xu J, Lu M X, Cui Y D, Du Y Z. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using

- qRT-PCR in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol*, 2017, 110: 683-691.
- [22] 胡阳, 郑永利, 曹国连, 傅强. 利用半人工饲料大规模简化饲养二化螟中国水稻科学, 2013, 27(5): 535-538. Hu Y, Zheng Y L, Cao G L, Fu Q. A technique for rearing *Chilo suppressalis* in the large scale with an oligidic diet in laboratory. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27(5): 535-538. (in Chinese with English abstract)
- [23] 吴敏, 张真真, 高聪芬. 水稻二化螟抗药性监测方法. 应用昆虫学报, 2013, 50(2): 548-552. Wu M, Zhang Z Z, Gao C F. Methods of insecticides resistance monitoring of the striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *Chin J Appl Entomol*, 2013, 50(2): 548-552. (in Chinese with English abstract)
- [24] Hui X M, Yang W, He G L, Yang Q P, Han Z, Li F. RNA interference of *ace1* and *ace2* in *Chilo suppressalis* reveals their different contributions to motor ability and larval growth. *Insect Mol Biol*, 2011, 4: 507-518.
- [25] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity. BestKeeper: Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 509-515.
- [26] 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. *Cancer Res*, 2004, 64: 5245-5250.
- [27] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1101-1108.
- [28] Radonic A, Thulke S, Mackay I M, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313: 856-862.
- [29] Huis R, Hawkins S, Neutelings G. Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 71.
- [30] Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, 2013, 54: 391-406.
- [31] 冯波, 郭前爽, 毛必鹏, 杜永均. 松墨天牛化学感受组织荧光定量 PCR 内参基因的鉴定与筛选. 昆虫学报, 2016, 59(4): 427-437. Feng B, Guo Q, Mao B P, Du Y J. Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-PCR. *Acta Entomol Sin*, 2016, 59(4): 427-437. (in Chinese with English abstract)
- [32] Nielsen M G, Gadagkar S R, Gutzwiller L. Tubulin evolution in insects: Gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 113.
- [33] Yuan M, Lu Y H, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin B R, Li J H. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS One*, 2014, 9: e86503.
- [34] An X K, Hou M L, Liu Y D. Reference gene selection and evaluation for gene expression studies using qRT-PCR in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *J Econ Entomol*, 2016, 109: 879-886.
- [35] Dai T M, Lu Z C, Liu W X, Wan F H. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis during biological invasions: The thermal adaptability of *Bemisia tabaci* MED. *PLoS One*, 2017, 12: e0173821.
- [36] Ponton F, Chapuis M P, Pernice M, Sword GA, Simpson S J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 2011, 57: 840-850.
- [37] Yang Q P, Li Z, Cao J J, Zhang S D, Zhang H J, Wu X Y, Zhang Q W, Liu X X. Selection and assessment of reference genes for quantitative PCR normalization in migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *PLoS One*, 2014, 9: e98164.
- [38] Zheng Y T, Li H B, Lu M X, Du Y Z. Evaluation and validation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *PLoS One*, 2014, 9: e111369.
- [39] Pan H P, Yang X W, Siegfried B D, Zhou X G. A comprehensive selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory lady beetle, *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae). *PLoS One*, 2015, 10: e0125868.
- [40] Qiu L, Wang P, Wu T, Li B, Wang X, Lei C, Lin Y, Zhao J, Ma W. Downregulation of *Chilo suppressalis* alkaline phosphatase genes associated with resistance to three transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines. *Insect Mol Biol*, 2018, 27: 83-89.
- [41] Xu G, Gu G X, Teng Z W, Wu S F, Huang J, Song Q S, Ye G Y, Fang Q. Identification and expression profiles of neuropeptides and their G protein-coupled receptors in the rice stem borer *Chilo suppressalis*. *Sci Rep*, 2016, 6: 28976.
- [42] Xu G, Wu S F, Teng Z W, Yao H W, Fang Q, Huang J, Ye G Y. Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Sci*, 2017, 24: 371-384.
- [43] Xu G, Wu S F, Wu Y S, Gu G X, Fang Q, Ye G Y. De novo assembly and characterization of central nervous system transcriptome reveals neurotransmitter signaling systems in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *BMC Genomics*, 2015, 16: 525.