五龄飞蝗不同发育时间实时定量 PCR 内参基因的筛选*

崔 淼** 刘晓健 李 涛 郭亚平 马恩波 张建珍***

（山西大学应用生物学研究所 太原 030006）

摘 要 **【目的】** 筛选 5 龄飞蝗不同发育时间的最适内参基因，为相关研究提供基础数据。**【方法】** 本文选取 β-肌动蛋白（*β-actin*）、延长因子（*EF-1α*）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）、核糖体蛋白 49（*RP49*）、α-微管蛋白（*α-Tubulin*）和 18S 核糖体 RNA（*18S rRNA*）基因作为候选内参基因，运用实时定量 PCR（qPCR）方法研究各基因在 5 龄飞蝗不同发育时间的相对表达量，用 geNorm 与 Normfinder 软件分析这 6 个基因表达稳定性。**【结果】** geNorm 分析结果显示 6 个内参基因表达稳定度 M 值顺序为：*β-actin*（0.3720）> *RP49*（0.3750）> *α-Tubulin*（0.4030）> *18S rRNA*（0.4270）> *EF-1α*（0.4970）> *GAPDH*（0.6040）。M 值越小表示基因表达稳定度越高，同时 geNorm 软件以标准化因子配对差异值（Pairwise variations）0.15 默认为取舍值，由于 V2/3=0.098 < 0.15，所以最适内参基因数目为 2 个。运用 NormFinder 软件也得出相似的结果。**【结论】** *β-actin* 与 *RP49* 为 5 龄飞蝗不同发育时间的最适内参基因。

关键词 飞蝗，实时定量 PCR，内参基因，geNorm，NormFinder

Selection of reference genes on different days during the development of the fifth-instar nymph of *Locusta migratoria* with quantitative real-time PCR

CUI Miao** LIU Xiao-Jian LI Tao GUO Ya-Ping MA En-Bo ZHANG Jian-Zhen***

(Research Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract **[Objectives]** To identify the most appropriate reference genes on different days during the development of fifth-instar nymphs of *Locusta migratoria* to pave the way for relevant studies. **[Methods]** Six genes were selected as candidate reference genes, including the beta actin gene (*β-actin*), the Elongation factor 1α gene (*EF-1α*), the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*), the Ribosomal protein 49 gene (*RP49*), the Alpha tubulin gene (*α-Tubulin*) and the 18S ribosome RNA gene (*18S rRNA*). The relative expression of these genes on different days during the development of *L. migratoria* was detected with quantitative real-time PCR (qPCR). The expression stability of these genes was then investigated using geNorm and Normfinder software. **[Results]** Based on the results of geNorm analysis, the average expression stability (M) of the six genes was, in descending order; *β-actin* (0.3720) > *RP49* (0.3750) > *α-Tubulin* (0.4030) > *18S rRNA* (0.4270) > *EF-1α* (0.4970) > *GAPDH* (0.6040). The less the M value the more stable the gene expression. The software took 0.15 as a constant value for pairwise variations. The appropriate number of reference genes was 2 because

* 资助项目：国家自然科学基金资助项目（31272380, 31201710）；山西省高等学校留学回国人员科研资助项目（201163）

**E-mail: 359271757@qq.com

***通讯作者，E-mail: zjz@sxu.edu.cn

收稿日期：2013-10-30，接受日期：2013-11-14

V2/3=0.098 < 0.15. Similar results were obtained using NormFinder software. **[Conclusion]** *β-actin* and *RP49* are the most suitable reference genes during the development of fifth-instar nymph of *L. migratoria*.

Key words *Locusta magratoria*, quantitative real-time PCR, reference genes, geNorm, NormFinder

实时定量 PCR（Quantitative real-time PCR，qPCR） 技术由美国 Applied Biosystems 公司 1996 年发明，是一种在转录水平上对 mRNA 表达进行定量的方法。该技术凭借其定量准确、高重现性、高灵敏度和高通量等特点，已逐渐成为基因表达研究的主要手段（Vandesompele *et al.*，2002；Arya *et al.*，2005）。qPCR 数据的真实可信度是该技术的关键，其结果往往会受到不同变量的影响，与目标基因特异性表达的真实值存在差异（Marchal *et al.*，2013）。这些变量包括：起始材料的质量、RNA 质量（纯度、完整性、DNA 的污染）、反转录效率、扩增效率和内参基因的选择等（Bustin *et al.*，2009）。故进行 qPCR 时，需使用内源性参照基因（简称内参或管家基因）进行标准化，从而真实显示目的基因特异性表达水平。

理想的内参基因应在各种实验条件下，各种类型的组织和细胞中均恒定表达，而且其表达量应无显著性差异（符伟等，2012）。传统的管家基因常常作为内参基因，如 18S 核糖体 RNA 基因（*18S rRNA*）、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因（*GAPDH*）和 β-肌动蛋白基因（*β-actin*）等。然而大量研究显示，使用不同的内参基因校正目的基因表达水平，常常会得到不同的结果，主要原因是由于内参基因在不同实验条件下的表达水平并不完全一致（侯维海等，2011）。因此，选择合适的内参基因显得尤为重要。筛选合适的内参基因最常用的 2 个分析软件是 geNorm（Andersen *et al.*，2004）与 NormFinder（Radonić *et al.*，2004），两者均是通过分析候选内参基因表达的 $2^{-\Delta Ct}$ 值，得出各个基因的表达稳定度，从而确定最适内参基因。

目前关于内参基因的研究在哺乳动物分子生物学研究领域研究较多，如人类白细胞（Zhang *et al.*，2005）、肝癌细胞（张艳君等，2007）、小鼠胚胎干细胞（Veazey and Golding，2011）等，也有对稻曲病菌（顾志敏等，2012）的研究。在昆虫中也有一些对最适内参基因组合的研究报道，Ponton 等（2011）分析了果蝇 *Drosophila melanogaster* 7 个候选内参基因（*Actin*, *EF1a*, *Mnf*, *Rps20*, *Rpl32*, *Tubulin* 和 *18S*）在刺伤、温度变化以及食物比例变化后目标基因表达的变化，认为 *EF1a*、*Mnf*；*Mnf*、*EF1a*；*Actin*、*EF1a* 分别为最优的内参基因组合。Lord 等（2010）分析了真菌感染赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 后不同时间点 8 个候选内参基因的表达稳定性，发现各个时间点都有不同的最适内参基因组合，最终筛选到 *RPS3*、*RPS18* 和 *RPL13* 为所有实验条件下均可稳定表达的内参基因。

飞蝗 *Locusta migratoria* 是我国的重要农业害虫，同时也是昆虫学研究的经典模式动物，近些年已逐渐成为分子生物学的研究热点（Ma *et al.*，2006），飞蝗 5 龄期蜕皮激素水平较高，而保幼激素低度很低，是研究蜕皮激素调控基因表达模式的理想龄期（Baehr *et al.*，1979），同时这一龄期飞蝗若虫个体较大，便于进行各组织的解剖及表型观察。5 龄飞蝗 qPCR 内参基因的选择对于准确研究基因的表达调控具有重要意义。本文分析了常用的 6 个候选内参基因在 5 龄飞蝗不同发育日龄的相对表达量，利用 geNorm 与 NormFinder 软件分析基因的表达稳定度，筛

选出最优内参基因，为后续 5 龄飞蝗基因表达的研究提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

飞蝗虫卵取自山西晋源北邵飞蝗养殖基地，人工气候箱孵化，温度（30±2）℃，相对湿度 40%±10%，光周期 14L∶10D，将孵化的蝗蝻转移至纱笼中，新鲜小麦幼苗和麦麸饲喂。

试虫为蜕皮后 5 龄飞蝗若虫，每天取样，共 3 个生物学重复，每个重复 3 头整虫，共取 7 d。所有样品于液氮中速冻，保存于－80℃冰箱。

1.2　供试药品及主要仪器

RNAiso^{TM} Plus、RNase-free DNase、M-MLV Reverse Transcriptase（TaKaRa）；SYBR Premix Ex Taq（TOYOBO）；2×Taq PCR MasterMix（TIANGEN）PTC-200 PCR 仪（MJ research）；3K15 型离心机（Sigma）；凝胶成像系统（Bio-rad）；Applied Biosystem（Applied Biosystems）；紫外交联仪（UVC500，Amersham Biosciences）

1.3　内参基因的选择和引物设计

通过搜索飞蝗转录组，获得了 6 个不同功能的内参基因，即 β-肌动蛋白（*β-actin*）、延长因子（*EF-1α*）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）、核糖体蛋白 49（*RP49*）、α-微管蛋白（*α-Tubulin*）与 18S 核糖体 RNA（*18S rRNA*）。根据核苷酸序列运用 Primer Premier3.0 软件设计特异性表达引物，并在 NCBI 数据库中进行引物特异性比对。引物合成由上海英潍捷基公司合成。引物具体信息见表 1。

1.4　总 RNA 提取及 cDNA 合成

按照 RNAiso^{TM} Plus 说明书进行上述样品总 RNA 的提取，RNase-free DNase I 处理所提取的 RNA，1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量，在酶标仪上进行定量，1.5 μg 总 RNA 合成第一链 cDNA，按照 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行操作。

1.5　RT-PCR 验证引物特异性

（1）RT-PCR 反应体系：12.5 μL 2×Taq PCR MasterMix；1 μL 上游/下游引物（引物浓度 10 μmol/L）；8.5 μL ddH_2O；2 μL cDNA（20×）。

（2）RT-PCR 反应程序：95℃预变性 60 s，95℃解链 15 s，60℃退火并延伸 60 s，20 个循环，4℃保存。

选取 5 龄若虫第 1 天的样品为模板，6 个基因各做 1 个反应，于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6　实时荧光定量 PCR

（1）qPCR 反应体系：10 μL SYBR Premix Ex Taq；0.8 μL 上游/下游引物（引物浓度 10 μmol/L）；2 μL cDNA（20×）；6.4 μL ddH_2O。

表 1　飞蝗候选内参基因的引物

Table 1　The primers of candidate reference genes of *Locusta migratoria*

基因 Gene symbol	基因名称 Gene name	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	片段长度 Product size (bp)	引物效率 Primer efficiency
β-actin	β-肌动蛋白 Beta actin	F: CGAAGCACAGTCAAAGAGAGGTA R: GCTTCAGTCAAGAGAACAGGATG	156	98.2%
EF1α	延长因子 1α Elongation factor 1α	F: AACATCGTCGTCATTGGTCA R: GTTCAGCCTTCAGCTTGTCC	175	99.4%
GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: AGGCCAAGGTCAAGGAAGCT R: GAATGGCAGTCACCAATGAAGTC	120	92.2%
RP49	核糖体蛋白 49 Ribosomal protein 49	F: CGCTACAAGAAGCTTAAGAGGTCAT R: CCTACGGCGCACTCTGTTG	90	96.3%
α-Tubulin	α-微管蛋白 Alpha tubulin	F: TGGTGTCCAACTGGTTTCAA R: CGCTCTCTTGGCATACATCA	174	96.5%
18SrRNA	18S 核糖体 RNA 18S ribosome RNA	F: CTGAGAAACGGCTACCACATC R: ACCAGACTTGCCCTCCAAT	171	95.6%

（2） qPCR 反应程序：95℃预变性 10 s，95℃解链 5 s，60℃退火并延伸 30 s，40 个循环。60℃进行荧光检测。DNA 熔解分析 60~95℃，每步上升 1℃。

每个样品生物学重复 3 次，技术重复 2 次，分别以上述 6 对引物进行 PCR 反应。

1.7 数据处理与分析

采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算出荧光定量样品中各基因的相对表达量，输入 geNorm 程序计算基因表达稳定度平均值（M），分析候选内参基因的表达稳定性。利用程序 NormFinder 筛选出稳定的内参基因，二者结合确定最合适的内参基因。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果

总 RNA 凝胶电泳结果如图 1 所示，从图 1 中可见 3 条完整带型，分别为 28S、18S 和 5S。用酶标仪检测 OD_{260} 和 OD_{280}，$A_{260/280}$ 值均在 1.8~2.0 之间，表明所提取的总 RNA 质量良好，未发生降解，可以用于后续反转录及实时荧光定量 PCR 实验。

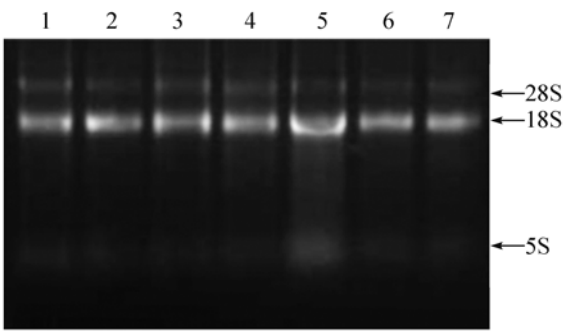


图 1 总 RNA 的抽提
Fig. 1 Extraction of total RNA

1~7 分别为 5 龄飞蝗第 1 至 7 天所提 RNA 的电泳图谱。
1- 7: The agarose gel electrophoresis of total RNA from the 5th instar nymphs on day 1 to 7.

2.2 内参基因的引物特异性验证

内参基因 RT-PCR 产物凝胶电泳结果如图 2 所示，所设计的内参基因引物均得到特异性扩增产物。每对引物均扩增出预期片段，且无引物二聚体。qPCR 观察所研究的 6 个内参基因的熔解

曲线，除主峰外没有其他杂峰，表明无引物二聚体和非特异性条带产生。

2.3　geNorm 程序分析

应用 geNorm 程序分析 6 个内参基因的表达稳定性，同时计算基因表达的稳定度 M 值，6 个候选内参基因表达稳定度 M 值顺序为：*β-actin*（0.3720）> *RP49*（0.3750）> *α-Tubulin*（0.4030）> *18S rRNA*（0.4270）> *EF-1α*（0.4970）> *GAPDH*（0.6040）。同时 geNorm 软件以标准化因子配对差异值（Pairwise variations）0.15 默认为取舍值，从图 3 可以看出，本文所有的标准化因子配对差异值（*Vn/n*+1）均小于 0.15。

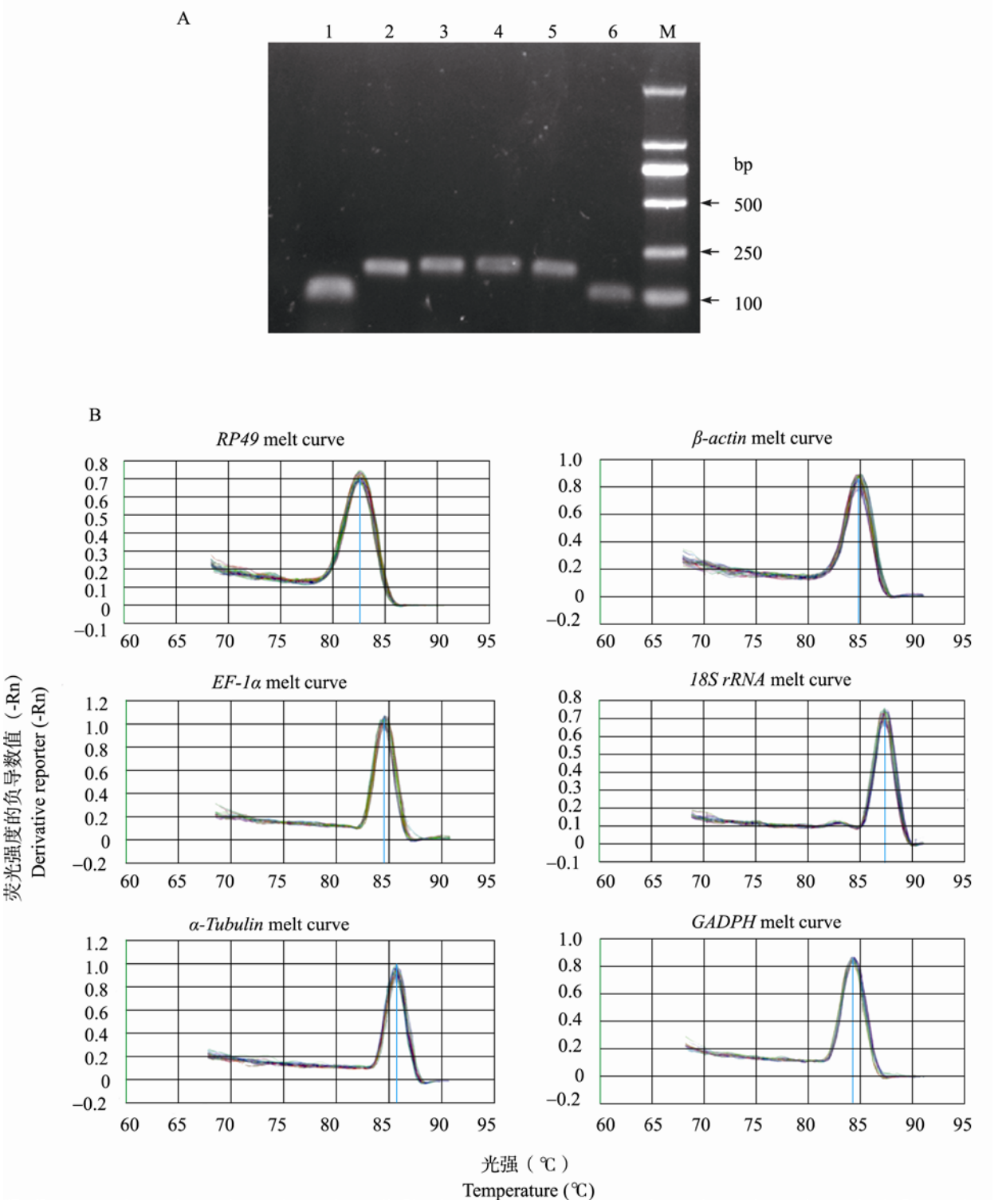
2.4　NormFinder 程序分析

Andersen 等（2004）研发的另一种用于选择合适内参基因的程序是 NormFinder，其原理是程序运行生成基因表达稳定值，该值越低则表明基因表达越稳定（表 2）。经过 NormFinder 运算，6 个基因中仍然是 *RP49* 与 *β-actin* 最为稳定。

3　讨　论

实时定量 PCR（qPCR）技术已普遍用于基因表达的分析，理想的内参基因应在各种实验条件下，各种类型的组织或细胞中均恒定表达，然而越来越多的研究表明，内参基因的表达并不稳定，任何一种内参基因的所谓恒定表达都只是在一定类型的细胞或实验因素作用下“有范围”的恒定。如果没有进行标准化处理，盲目地使用一个管家基因作为内参，可能导致错误的结论。所以在 qPCR 实验中采用不同的内参基因，将有效消除不同样本在 RNA 的质量、产量以及反转录效率方面的差异（Jian *et al*.，2008；Miranda *et al*.，2013）。

目前昆虫中关于内参基因的研究还较少，为了确定昆虫某些目的基因在特定实验条件下的表达，均需先确定最适内参基因组合。内参基因



* 资助项目：国家自然科学基金资助项目（31272380, 31201710）；山西省高等学校留学回国人员科研资助项目（201163）

**E-mail: 359271757@qq.com

***通讯作者，E-mail: zjz@sxu.edu.cn

收稿日期：2013-10-30，接受日期：2013-11-14

图 2　候选内参基因 **PCR** 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳及熔解曲线

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis and the melting curves of six reference genes of PCR products

图 A 所示为 6 个候选内参基因 RT-PCR 电泳图谱。1：*RP49*；2：*β-actin*；3：*EF-1α*；4：*18S rRNA*；5：*α-Tubulin*；6：*GAPDH*；M: DL2000 DNA marker。图 B 所示为 6 个候选内参基因的 qPCR 熔解曲线。

Fig. A shows agarose gel electrophoresis of reversed transcript PCR products of six candidate reference genes. Fig. B shows melting curves of six candidate reference genes by using qPCR.

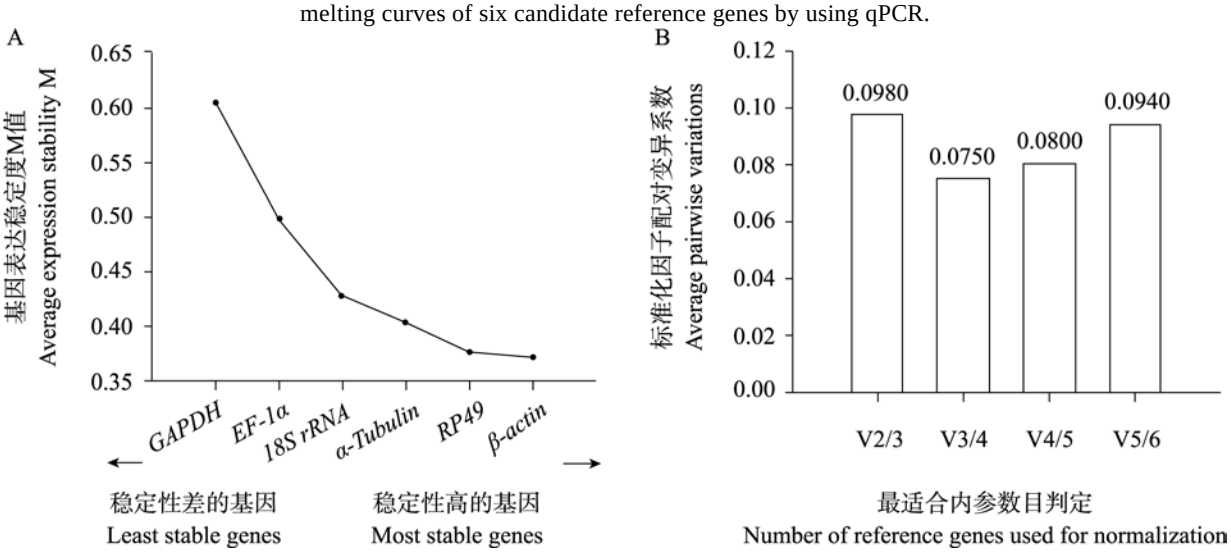


图 3　候选内参基因表达稳定度 **M** 值和配对差异

Fig. 3　The expression stability measure M and pairwise variance of candidate reference genes

图 A 所示为 geNorm 分析后生成的 6 个基因表达稳定度 M 值；图 B 所示为 geNorm 分析后最适合内参基因数目判定。

Fig. A shows the geNorm's analysis of average expression stability M of 6 candidate reference genes; Fig. B shows geNorm`s analysis of average pairwise variations.

表 2　**NormFinder** 软件分析各内参基因的表达稳定值

Table 2　Expression stability values of the reference genes calculated by NormFinder

基因 Gene symbol	稳定值 Stability value
GAPDH	0.3810
EF-1α	0.2840
18S rRNA	0.1920
α-Tubulin	0.1740
β-actin	0.1210
RP49	0.0870

表达的标准化处理常采用 geNorm 与 Normfinder 软件。Van Hiel 等（2009）分析了沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 7 个候选内参基因在 5 龄若虫及成虫脑部不同天数的表达，结果表明 *RP49*、*EF1a* 与 *ACT* 为研究沙漠蝗 5 龄若虫最适内参基因，*GAPDH*、*Ubi* 与 *EF1a* 为研究成虫沙漠蝗脑部最适内参基因。Chapuis 等（2011）发现 *Arm* 与 *EF1a* 为研究不同饲养条件下澳大利亚蝗 *Chortoicetes terminifera* 神经组织表达变化的最优内参基因。综上所述，对于研究不同的实验条件下基因的表达，需要首先确定该条件下的最适内参基因组合。

作者所在课题组 10 多年来以飞蝗为研究对象开展昆虫毒理学及表皮代谢等分子生物学研究工作，内参基因的合理选择对于验结果的准确性尤为重要。Liu 等（2013）首次运用 qPCR 筛

选得出 *EF1α* 与 *GAPDH* 为研究飞蝗不同组织部位的最适内参基因，*β-actin* 与 *EF1α* 为研究体壁发育的最适内参基因。本研究以 5 龄飞蝗整虫不同天数为模板，通过选取常用的 6 个管家基因 β-肌动蛋白（*β-actin*）、延长因子（*EF-1α*）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）、核糖体蛋白 49（*RP49*）、α-微管蛋白（*α-Tubulin*）与 18S 核糖体 RNA（*18S rRNA*）为候选内参基因，使用 geNorm 与 Normfinder 软件分析相对表达量，得到基因表达稳定度 M 值、标准化因子配对系数以及表达稳定值。geNorm 程序分析 6 个内参基因的 $2^{-\Delta Ct}$ 值，计算出基因表达的稳定度 M 值。M 值是某一个内参基因与其他所选内参基因表达水平的比值经对数交换，计算其平均标准差作为基因表达稳定度的平均值。经过 geNorm 程序分析，所选 6 个候选内参基因表达稳定度 M 值顺序为：*β-actin*（0.3720）> *RP49*（0.3750）> *α-Tubulin*（0.4030）> *18S rRNA*（0.4270）> *EF-1α*（0.4970）> *GAPDH*（0.6040）。M 值越小，表明基因表达稳定性越高。同时 geNorm 软件以标准化因子配对差异值（Pairwise variations）0.15 默认为取舍值，即当 $Vn/n+1 < 0.15$ 时，表明没有必要选择使用数量≥$n+1$ 的基因作为内参。从图 3 可以看出，本研究所有标准化因子配对差异值（$Vn/n+1$）均小于 0.15，即没有必要选择≥3 的基因作为内参。综上所述，经 geNorm 程序分析，本研究选择 *β-actin* 与 *RP49* 两个基因为最适内参基因。NormFinder 软件的运行原理与 geNorm 程序相似，运行结果是以稳定值的大小排序，表达稳定值最小的基因即为最稳定的基因。通过表 2 可见，稳定值最小的两个最适内参基因仍然为 *RP49* 与 *β-actin*。本研究结果将为研究目标基因在 5 龄飞蝗的表达提供最佳内参基因，同时也对其他昆虫内参基因的选择具有一定的参考价值。

参考文献 (References)

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF, 2004. 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 Research*, 64(15): 5245–5250.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR, 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2): 209–219.

Baehr JC, Porcheron P, Papillon M, Dray F, 1979. Haemolymph levels of juvenile hormone, ecdysteroids and protein during the last two larval instars of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 25: 415–421.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611–622.

Chapuis MP, Tohidi-Esfahani D, Dodgson T, Blondin L, Ponton F, Cullen D, Simpson SJ, Sword GA, 2011. Assessment and validation of a suite of reverse transcription-quantitative PCR reference genes for analyses of density-dependent behavioural plasticity in the Australian plague locust. *BMC Molecular Biology*, 12: 7.

Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C, Han T, 2008. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9: 59.

Liu X, Li F, Li D, Ma E, Zhang W, Zhu KY, Zhang J, 2013. Molecular and functional analysis of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *PLoS One*, 8(8): e71970.

Lord JC, Hartzer K, Toutges M, Oppert B, 2010. Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2): 219–221.

Ma Z, Yu J, Kang L, 2006. LocustDB: a relational database for the transcriptome and biology of the migratory locust (*Locusta migratoria*). *BMC Genomics*, 7: 11.

Marchal E, Hult EF, Huang J, Tobe SS, 2013. Sequencing and validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR during the gonadotrophic cycle of *Diploptera punctate*. *BMC*

Research Notes, 6: 237.

Miranda VJ, Coelho RR, Viana AA, de Oliveira Neto OB, Carneiro RM, Rocha TL, de Sa MF, Fragoso RR, 2013. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. *BMC Research Notes*, 6: 196.

Ponton F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ, 2011. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(6): 840–850.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A, 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4): 856–862.

Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Broeck JV, Simonet G, 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10: 56.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7): RESEARCH0034.

Veazey KJ, Golding MC, 2011. Selection of stable reference genes for quantitative RT-PCR comparisons of mouse embryonic and extra-embryonic stem cells. *PLoS One*, 6(11): e27592.

Zhang X, Ding L, Sandford AJ, 2005. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 6: 4.

符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军, 2012. 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, 55(12): 1406–1412. [FU W, XIE W, ZHANG Z, WU QJ, WANG SL, ZHANG YJ, 2012. 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 Entomologica Sinica*, 55(12): 1406–1412.]

顾志敏, 丁正中, 陈析丰, 郭龙彪, 曾大力, 钱前, 马伯军, 2012. 实时荧光定量 PCR 筛选稻曲病菌内参基因. 中国水稻科学, 26(5): 615–618. [GU ZM, DING ZZ, CHEN XF, GUO LB, ZENG DL, QIAN Q, MA ZJ, 2012. Reference gene selection of ustilaginoidea virens by Real-time PCR. *Chinese Journal of Rice Science*, 26(5): 615–618.]

侯维海, 孙鹏, 陈全家, 李先恩, 2011. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选. 中国农学通报, 27(17): 76–82. [HOU WH, SUN P, CHEN QJ, LI XE, 2011. Selection of the reference genes for gene expression studies in *Rehmannia glutinosa* by Real-time Quantitative PCR. *Chinese Agricultual Science Bulletin*, 27(17): 76–82.]

张艳君, 朱志峰, 陆融, 徐琼, 石琳熙, 简序, 刘俊燕, 姚智, 2007. 基因表达转录分析中内参基因的选择. 生物化学与生物物理进展, 34(5): 546–550. [ZHANG YJ, ZHU ZF, LU R, XU Q, SHI LX, JIAN X, LIU JY, YAO Z, 2007. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression. *Progess in Biochemistry and Biophysics*, 34(5): 546–550.]