意大利蝗 *Calliptamus italicus* 卵巢基因表达 RT-qPCR 定量内参基因的筛选*

许亚丽[1**] 董 彬[1] 丁国婵[2] 桑 迪[1] 季 荣[1] 王 晗[1***]

（1. 新疆师范大学生命科学学院，中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心，新疆特殊物种保护与调控生物学实验室，乌鲁木齐 830054；2. 新疆玛纳斯县蝗虫鼠害预测预报防治站，玛纳斯 832200）

摘 要 **【目的】** 意大利蝗 *Calliptamus italicus* 是新疆草原重要害虫，研究其繁殖相关基因的生物学功能，对于害虫防控靶标筛选具有重要意义。为研究意大利蝗雌虫卵巢发育过程中功能基因的表达动态及调控功能，首先要选择适合的内参基因，以确保 RT-qPCR 定量结果的准确性。**【方法】** 选择 *β-actin*、*EF1-a*、*β-tubulin*、*α-tubulin*、*GAPDH*、*SDHA*、*GST*、*RPL32* 和 *TBP* 为候选内参基因，采用 RT-qPCR 技术检测其在意大利蝗卵巢发育过程中的表达水平，通过 GeNorm、 NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 评估其表达稳定性。以 *Hex2*、*VgR*、*Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 为目标基因，验证候选基因在不同发育阶段卵巢组织中的表达稳定性。**【结果】** GeNorm、NormFinder 和 BestKeepe 分析结果表明，*β-tubulin*、*RPL32*、*GAPDH*、*EF1-α* 基因均表现出良好的稳定性。通过 GeNorm 判断配对变异值确定的内参基因最佳数目，结合 RefFinder 软件综合分析，表明意大利蝗卵巢发育过程中最优内参组合为 *RPL32* 和 *EF1-α*。**【结论】** 本研究获得意大利蝗卵巢发育过程中表达最稳定的内参基因组合，可用于后续的基因表达定量研究。

关键词 意大利蝗；内参基因；表达稳定性；卵巢发育；实时荧光定量 PCR

Selection of reference genes for RT-qPCR of ovarian gene expression in *Calliptamus italicus* (Orthopera: Acrididae)

XU Ya-Li[1**] DONG Bin[1] DING Guo-Chan[2] SANG Di[1] JI Rong[1] WANG Han[1***]

(1. International Research Center for the Collaborative Containment of Cross-Border Pests in Central Asia, Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; 2. Manasi Station of Forecast and Control on Locusts and Rodents, Manasi 832200, China)

Abstract **[Objectives]** To identify stable reference genes for RT-qPCR investigation of the expression and regulatory functions of genes related to ovarian development of *Calliptamus italicus* (L.), an important pest in Xinjiang's grasslands. **[Methods]** Nine genes including *β-actin*, *EF1-a*, *β-tubulin*, *α-tubulin*, *GAPDH*, *SDHA*, *GST*, *RPL32* and *TBP,* were selected as candidate reference genes. The expression levels of these genes were detected with quantitative real-time PCR and their stability of expression evaluated with GeNorm, NormFinder, BestKeeper, and RefFinder. Their stability in different tissues and developmental stages was verified using *Hex2*, *VgR*, *Sox9a* and *Cyp6bg10* as the target gene. **[Results]** *β-tubulin*, *RPL32*, *GAPDH* and *EF1-α* were the most stable genes. Based on comprehensive analysis using GeNorm and RefFinder, the best combination of reference genes for the oocytes of different developmental stages was *RPL32* and *EF1-α*. **[Conclusion]** The most stable genes identified in this study could be suitable reference genes for analyzing gene expression in *C. italicus*.

Key words *Calliptamus italicus*; reference gene; expression stability; ovarian development; RT-qPCR

---

*资助项目 Supported projects：新疆维吾尔自治区自然科学基金项目（2021D01A124）；新疆维吾尔自治区创新环境（人才、基地）建设专项（2022D04002）

**第一作者 First author，E-mail：1721003156@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wanghanguoxi@sina.com

收稿日期 Received：2021-11-18；接受日期 Accepted：2022-05-23

实时荧光定量 PCR（Quantitative Real-time PCR，RT-qPCR）能够准确检测目的基因的表达，具有灵敏度高、特异性强和重复性好等优点，已成为基因表达定量研究最常用的方法之一（Zhao *et al.*，2019）。在 RT-qPCR 过程中，为了对样品之间的差异进行校准，确保定量的准确性，需要使用合适的内参基因（Zhao *et al.*，2019；杨超霞等，2021）。

持家基因（House-keeping genes）表达产物通常是维持细胞基本结构和功能的主要成分，具有高度保守性，在不同实验条件下均能稳定表达，因此常作为内参基因（Zhao *et al.*，2019；段云等，2021；魏笑佳等，2021）。在昆虫基因功能研究中，常用的内参基因有：β-肌动蛋白（*β-actin*）、延长因子 1-α（*EF1-α*）、核糖体蛋白 L10（*RPL10*）、琥珀酸脱氢酶复合体 A 亚基（*SDHA*）、α-微管蛋白（*α-tubulin*）、TATA 框结合蛋白基因（*TBP*）、甘油醛-3-磷酸酯（*GAPDH*）、核糖体蛋白 S18（*RPS18*）、18S 核糖体 RNA（*18S rRNA*）和 28S 核糖体 RNA（*28S rRNA*）等（Bai *et al.*，2020；Li *et al.*，2020）。然而，研究表明，没有基因能够在复杂的实验条件下始终维持恒定表达（Zhang *et al.*，2018；Luo *et al.*，2019）。由于内参基因的表达波动，导致在检测目的基因表达水平时产生一定误差，甚至得出错误结论（Liang *et al.*，2014）。因此，有必要在不同实验条件下对内参基因进行检测和筛选，以确保其表达水平的稳定性，从而获得准确的试验结论。

意大利蝗 *Calliptamus italicus* 是新疆主要优势蝗虫，每年给新疆农牧业经济带来严重损失。近年来，从分子生物学水平研究害虫生长繁殖相关基因的生物学功能，为害虫繁殖机制研究及防控靶标筛选提供理论和数据基础，已成为害虫防控领域研究热点，具有非常重要的意义（Liu *et al.*，2019）。其中，卵巢的发育成熟决定雌虫的繁殖力，对种群繁衍至关重要。为研究卵巢不同发育阶段中功能基因的表达动态及调控功能，首先要选择适合的内参基因，以确保表达定量结果的准确性。本研究选择 *β-actin*、*EF1-a*、*β-tubulin*、*α-tubulin*、*GAPDH*、*SDHA*、*GST*、*RPL32* 和 *TBP* 9 个候选内参基因，利用 GeNorm（Vandesompele *et al.*，2002）、NormFinder（Andersen *et al.*，2004）及 BestKeeper（Pfaffl *et al.*，2004）等统计软件及在线软件 RefFinder（http://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/），评价其在意大利蝗雌虫不同发育阶段卵巢组织中的表达稳定性；根据前期获得的意大利蝗转录组数据库，筛选表达丰度较高的储存蛋白（*Hex2*）和卵黄原蛋白受体（*VgR*）、表达丰度较低的 *Sry* 相关基因（*Sox9a*）和细胞色素 P450 单加氧酶（*Cyp6bg10*）为目的基因，对筛选的内参基因进行验证。研究结果可为意大利蝗内参基因的筛选提供数据资料，为后续功能基因的表达分析及卵巢发育机制的深入研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　蝗虫的采集和饲养

于新疆昌吉回族自治州玛纳斯县（43°54′N，86°21′E，海拔 1 310 m）采集意大利蝗蝗蝻，饲养于 1 m×1 m×1 m 养虫笼中，以新鲜冷蒿和苜蓿饲喂至成虫。待成虫羽化后，采集 1-25 日龄雌虫卵巢组织，置于 RNA-free 的冻存管中，立即加入 RNAstore Reagent（天根生化科技有限公司），- 80 ℃保存备用。

1.2　总 RNA 的提取及 cDNA 的第一链合成

Trizol 法（Invitrogen）提取卵巢组织总 RNA，NanoDrop2000（Thermo Fisher，USA）检测总 RNA 纯度及浓度，1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。PrimeScript^{TM} RT Reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa，Japan）去除可能的 gDNA 污染，合成 cDNA 第一链，20 μL 反应体系中 RNA 定量至 1 mg，- 20 ℃保存备用。

1.3　引物设计及标准曲线建立

选取 *β-actin*、*EF1-a*、*β-tubulin*、*α-tubulin*、*GAPDH*、*SDHA*、*GST*、*RPL32* 和 *TBP* 9 个候选内参基因，根据前期已获得的基因全长序列信息（NCBI 登录号分别为：MN970013、MN970014、MN970015、MN970016、MN970017、MN970018、

MN970019、MN970020 和 MT328398，数据未发表），利用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量引物（表 1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。对 1.2 中提取的卵巢 cDNA 样品进行梯度稀释，RT-qPCR 检测 9 个候选内参基因的 C_q 值，绘制标准曲线，计算扩增效率（E）及相关系数（R^2），计算方程为 E（100%）=（$10^{(-1/slope)}$ - 1）×100。每个梯度设置 3 次重复。

表 1 RT-qPCR 引物
Table 1 The primers used for RT-qPCR

基因 Genes	引物序列（5′-3′） Primer sequences (5′-3′)	产物大小（bp） Product size (bp)	扩增效率（%） Amplification efficiency (%)	R^2
β-actin	F：ACACCGTCCCCATCTATGAAGG R：TCAGCGGTAGTCGTGAAGCTG	109	106	1.00
EF1-α	F：GCCACTCGGTGTGAACAAAATGG R：CTTATTCCCTCAGCCTTTCCTTCC	237	98	0.99
β-tubulin	F：CGCCAATTAGCCGTGAACATGGT R：TCGAGCATCTGCTCATCCACTTC	245	99	0.98
α-tubulin	F：GTCCACGCCATGGAAAGTACATGGC R：CTCCATTCCTTCTCCNACRTACC	327	92	0.99
GAPDH	F：GTGGAGTCAACTGGAGTBTTCAC R：AATATCCTCGACCRTCACGCC	320	92	0.99
SDHA	F：CCCTTCGTACTGGTGGAATGG R：GCCAAGTCCTCGTGCAGTTCAT	172	100	0.99
GST	F：GCGGCTCAGATTGATATGGC R：CCTGCTGCAAGATAACCTCC	187	98	0.99
RPL32	F：TAAGGGCCAGTACCTGATGCC R：CCAACGTGCGGTTCTGCATC	150	102	1.00
TBP	F：CGGTGCCACACCTGAAATAGAC R：GCCAGCTTACCAGAAGACCAC	185	106	0.97

1.4 候选内参基因表达稳定性分析

以雌虫羽化后 1-25 d 的卵巢组织 cDNA 为模板，在 LightCycler® 96 定量 RCR 仪（Roche，USA）上，采用 TB Green Premix Ex Taq Ⅱ（TaKaRa，Japan）进行荧光定量 PCR，检测候选内参基因相对表达量。反应体系为 15 μL：7.5 μL 2×SYBR mix，上下游引物各 0.6 μL，cDNA 1.5 μL，dd H_2O 4.8 μL。反应程序：95 ℃，2 min；95 ℃，30 s，54-62 ℃，30 s，72 ℃，15 s，40 个循环；60-95 ℃，6 s，收集荧光信号绘制产物溶解曲线，判断引物特异性。每个日龄检测 3 个样品，每个样品测定 3 次，灭菌双蒸水为阴性对照。反应结束后采集 C_q 值，GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 等方法评价表达稳定性，最后利用在线软件 RefFinder（http://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/）进行综合排名。

1.5 内参基因稳定性的验证

以雌虫羽化后 1-25 d 的卵巢组织 cDNA 为模板，分别以 *RPL32*/*EF1-α*、*β-tubulin*、*α-tubulin* 和 *GST* 为内参基因，检测目的基因 *Hex2*、*VgR*、*Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 相对表达量。*Hex2* 上游引物：TCACTGTCGCTGTGCTGC，下游引物：GTCGTATGCCTTCTGGATG（Zhang *et al.*，2016）；*VgR* 上游引物：TCACTGTCGCTGTGCTGC，下游引物：GTCGTATGCCTTCTGGATG（Xiang *et al.*，2019）；*Sox9a* 上游引物：TAGTATCCGCAGCTGCACAACG，下游引物：CTTATGTCATCGCGGCTGGTAC；*Cyp6bg10* 上游引物：

TTAGACCCGGAACGCTTTACGG，下游引物：TGGCGCTGAAGACGAACTTAG。RT-qPCR 反应体系及反应程序同 1.4。每个日龄检测 3 个样品，每个样品测定 3 次，灭菌双蒸水为阴性对照。反应结束后采集 C_q 值，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *Hex2* 相对表达量，Origin2018 统计软件进行多因素方差分析（ANOVA），结合最小显著差数法（LSD），分析不同内参基因条件下 *Hex2*、*VgR*、*Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 相对表达量的差异显著性（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1　候选基因引物特异性分析

根据候选基因全长设计 RT-qPCR 特异性引物，扩增后得到明显的单一条带，产物大小与预期大小一致，无非特异性扩增产物（图 1），且各基因溶解曲线均为单峰，无非特异性扩增（图 2），表明引物特异性良好。各候选内参基因扩增效率范围在 98%-102%之间，线性相关系数 R^2 范围在 0.97-1.00，具有较好的线性关系，可以进行 RT-qPCR 定量实验（表 1）。

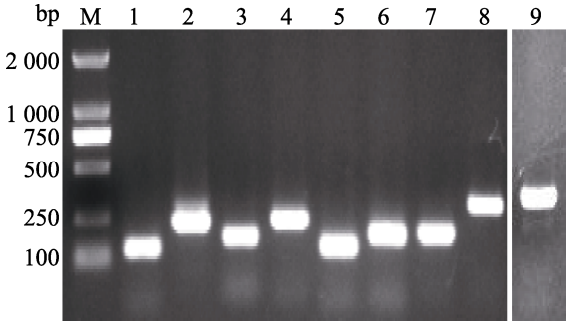

图 1　候选内参基因 RT-PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1　Electrophoresis results of RT-PCR products of candidate reference genes

M：分子量 Maker D2000；1-9：分别为内参基因 *β-actin*、*EF1-a*、*SDHA*、*β-tubulin*、*RPL32*、*GST*、*TBP*、*GAPDH* 和 *α-tubulin*。

M: D2000 DNA marker; 1-9: *β-actin, EF1-a, SDHA, β-tubulin, RPL32, GST, TBP, GAPDH* and *α-tubulin*.

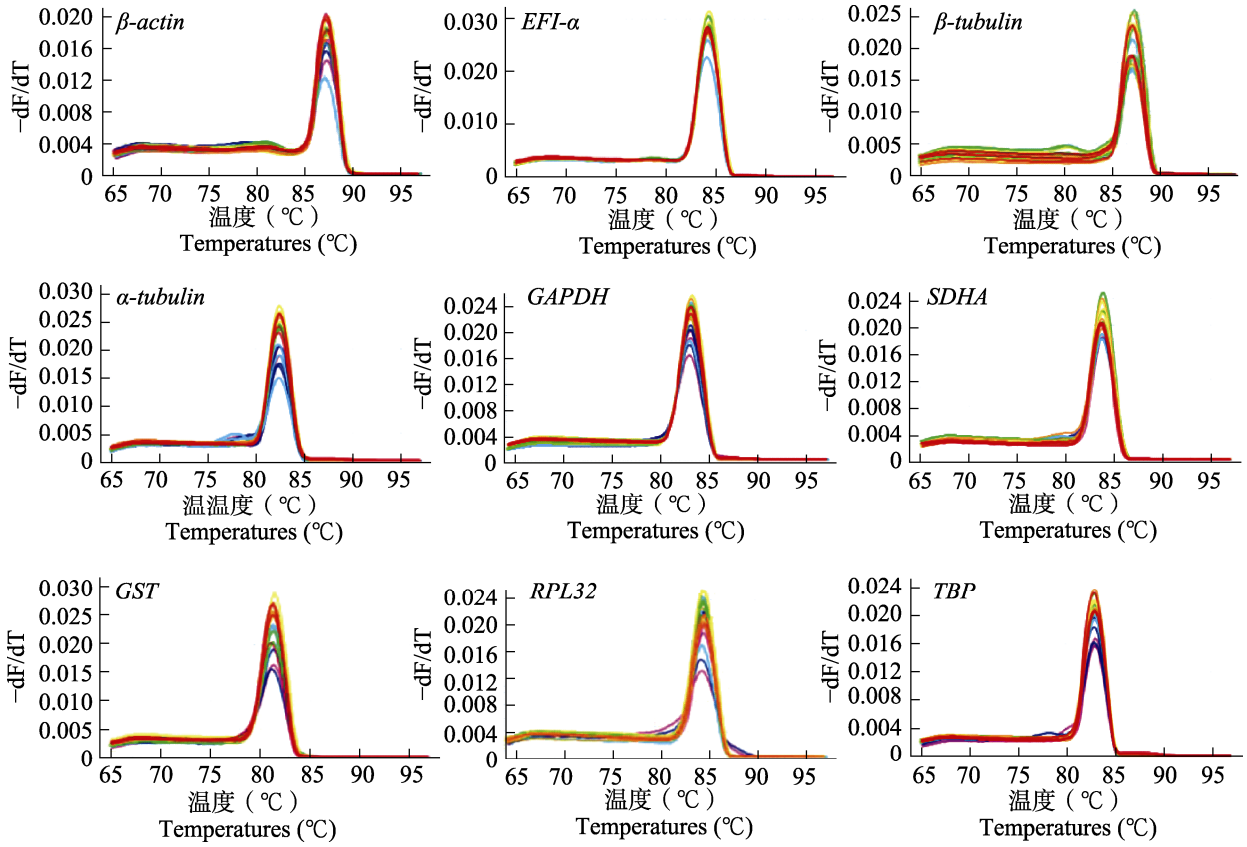

图 2　候选内参基因的溶解曲线

Fig. 2　Melting curves of candidate reference genes

2.2 候选基因表达分析

内参基因的表达丰度和 C_q 值变异大小是筛选的重要指标。9 个候选内参基因在意大利蝗雌虫卵巢发育过程中的 C_q 值在 17.31-26.35 之间（图 3），其中表达丰度较高的内参基因为 *GAPDH*、*RPL32*、*EF1-α*、*GST*、*β-actin* 和 *β-tubulin*，表达丰度较低的为 *TBP*、*SDHA* 和 *α-tubulin*。*GST*、*SDHA* 和 *α-tubulin* 基因在不同发育阶段组织间表达差异最大，而 *β-tubulin* 和 *RPL32* 的表达差异最小。

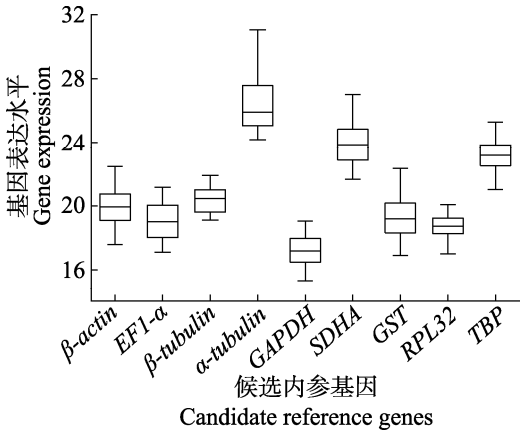

图 3 卵巢不同发育阶段下候选内参基因的表达水平

Fig. 3 Expression profiles of candidate reference genes at different developmental stages of ovary

候选内参基因表达水平以 C_q 值表示。箱型上下线分别代表上下四分位数，中垂线的上下限分别表示最大值和最小值，中线表示中位数。

The expression levels of candidate reference genes are shown as C_q values. The upper and lower edges of the boxes represents the 75th and 25th percentiles, respectively. Whiskers represent the minimum and maximum C_q values, the line in the box represents the median.

2.3 稳定性分析

2.3.1 GeNorm 和 NormFinder 分析 使用 GeNorm 计算各候选内参基因的表达稳定性（*M*），*M* 值越低其表达稳定性越高。在意大利蝗雌虫卵巢发育过程中，*RPL32* 和 *β-tubulin* 基因的 *M* 值最低，为 0.753，是表达最稳定的基因，而 *GST* 基因的 *M* 值最高，为 1.639，是表达最不稳定的基因（图 4：A）。各候选内参基因表达稳定性由高到低依次为 *RPL32*=*β-tubulin* > *EF1-α* > *GAPDH* > *TBP* > *β-actin* > *SDHA* > *α-tubulin* > *GST*。使用 NormFinder 计算各候选内参基因的稳定性值（*SV*），*SV* 值越低其表达稳定性越高。在意大利蝗雌虫卵巢发育过程中，*EF1-α* 基因的 *SV* 值最低，为 0.560，是表达最稳定的基因。而 *GST* 基因的 *SV* 值最高，为 1.694，是表达最不稳定的基因（图 4：B）。各候选内参基因表达稳定性从高到低依次为 *EF1-α* > *RPL32* > *GAPDH* > *β-tubulin* > *TBP* > *β-actin* > *α-tubulin* > *SDHA* > *GST*。

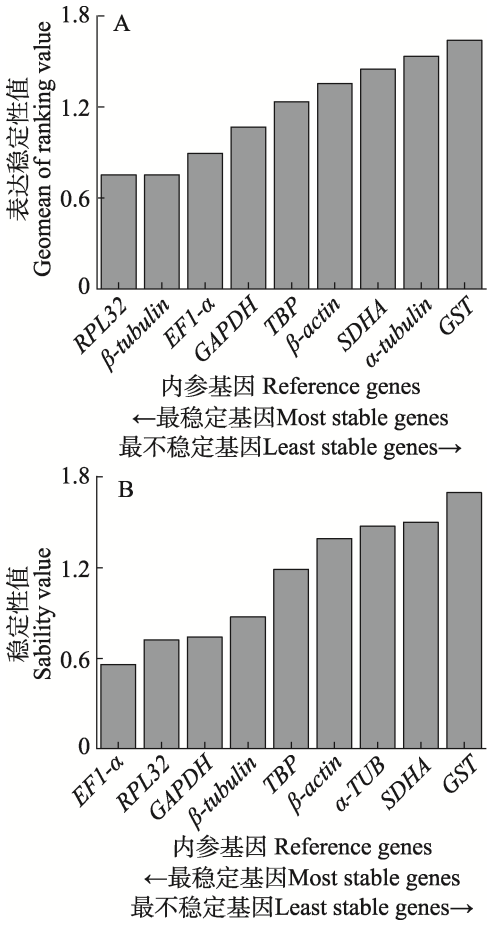

图 4 候选内参基因表达稳定性的 GeNorm（A）和 NormFinder（B）分析

Fig. 4 Expression stability of candidate reference genes analyzed by GeNorm (A) and NormFinder (B)

值越小表示表达式越稳定。

A lower value indicates more stable expression.

2.3.2 BestKeeper 分析 使用 BestKeeper 计算各候选内参基因的标准差（*SD*）、变异系数（*CV*）和相关系数（*r*），*SD* 值和 *CV* 值越低、*r* 值越大，

其表达稳定性越高(表 2)。*α-tubulin*、*GST*、*SDHA*、*TBP* 和 *β-actin* 的 SD 值均大于 1，表明其稳定性较差，不适合作为意大利蝗不同发育阶段卵巢组织的内参基因。其他 4 个候选内参基因 SD 值由小到大依次为：*β-tubulin* < *RPL32* < *GAPDH* < *EF1-α*。*CV* 值由小到大依次为：*β-tubulin* < *RPL32* < *EF1-α* < *GAPDH*。*r* 值由大到小依次为：*EF1-α* < *GAPDH* < *RPL32* < *β-tubulin*。*β-tubulin*、*RPL32*、*GAPDH* 和 *EF1-α* 的 $P < 0.05$，表明这 4 个基因均可以作为协同基因与其他基因一起组合应用。

2.3.3　RefFinder 综合分析　GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种方法分析稳定性的结果基本一致，即 *β-tubulin*、*RPL32*、*GAPDH* 和 *EF1-α* 基因均表现出良好的稳定性，但具体排名略有差异，因此利用 RefFinder 进行综合分析，得到的内参基因稳定性排名为 *RPL32* < *EF1-α* < *β-tubulin* < *GAPDH*（表 3）。

表 2　候选内参基因表达稳定性的 BestKeeper 分析

Table 2　Stability analysis of the candidate reference genes by BestKeeper

基因 Genes	*N*	几何平均数 Geometric mean [C_q]	算数平均数 Arithmetic mean [C_q]	最小值 Min [C_q]	最大值 Max [C_q]	标准差 *SD* [±C_q]	变异系数 *CV* [%C_q]	*r*	*P*
β-actin	24	19.83	19.87	16.41	22.46	1.02	5.11	0.403	0.051
EF1-α	24	19.08	19.12	17.10	21.15	0.99	5.16	0.852	0.001
β-tubulin	24	20.32	20.33	19.12	21.91	0.66	3.25	0.430	0.036
α-tubulin	24	26.29	26.35	24.17	31.05	1.41	5.34	0.668	0.001
GAPDH	24	17.27	17.31	15.32	20.60	0.94	5.41	0.788	0.001
SDHA	24	23.99	24.04	21.66	28.86	1.19	4.94	0.492	0.015
GST	24	19.45	19.54	16.90	25.47	1.33	6.83	0.644	0.001
RPL32	24	18.74	18.76	17.00	20.81	0.67	3.55	0.618	0.001
TBP	24	23.15	23.19	20.40	26.15	1.03	4.43	0.596	0.002

表 3　RefFinde 综合分析候选内参基因表达稳定性

Table 3　Expression stability ranks of the candidate reference genes evaluated by RefFinder

方法 Methods	表达稳定性排名 Expression stability ranks								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Genorm	*RPL32* *β-tubulin*		*EF1-α*	*GAPDH*	*TBP*	*β-actin*	*SDHA*	*α-tubulin*	*GST*
Normfinder	*EF1-α*	*RPL32*	*GAPDH*	*β-tubulin*	*TBP*	*β-actin*	*α-tubulin*	*SDHA*	*GST*
BestKeeper	*β-tubulin*	*RPL32*	*GAPDH*	*EF1-α*	*β-actin*	*TBP*	*SDHA*	*GST*	*α-tubulin*
RefFinder	*RPL32*	*EF1-α*	*β-tubulin*	*GAPDH*	*TBP*	*β-actin*	*SDHA*	*α-tubulin*	*GST*

通过 GeNorm 计算配对变异值确定内参基因的最佳数目，以 V=0.15 为默认取舍值，即当 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ 时说明最佳的内参基因数目为 n 个，当 $V_{n/(n+1)} > 0.15$ 则说明需要引入第 n+1 个内参基因。结果显示，$V_{2/3}$ 的配对变异值小于 0.15，说明内参基因的最佳数目为 2 个（图 5）。因此，最终确定，在意大利蝗不同发育阶段卵巢组织中，*RPL32* 和 *EF1-α* 为最佳内参基因组合。

2.4　内参基因稳定性的验证

以不同内参基因检测 *Hex2*、*VgR*、*Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 相对表达量，各组数据之间存在显著差异（$P<0.05$）（图 6）。以稳定性最佳的 *RPL32*/*EF1-α* 双基因为内参时，*Hex2* 在 1-7 d 的

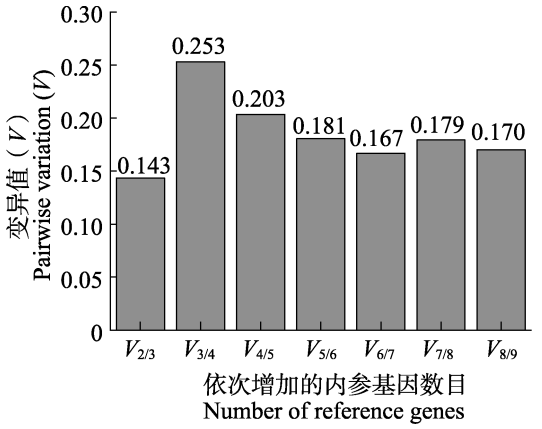

图 5 GeNorm 软件分析最优内参基因组合

Fig. 5 The optimal combination of reference genes by GeNorm

表达量逐渐上升，9-15 d 的表达量逐渐下降，17-23 d 表达再次升高，其中第 23 天表达量最高，为 17.961；*VgR* 在 1-7 d 表达量逐渐上升，在第 7 天达到峰值，为 5.89；9-13 d 的表达量逐渐下降，15-23 d 的表达量维持在较低水平。以稳定性较好的 *β-tubulin* 为内参时，*Hex2* 和 *VgR* 表达趋势与以 *RPL32*/*EF1-α* 为内参时基本一致，但峰值均出现在第 9 天，其中 *Hex2* 峰值为 19.999，*VgR* 峰值为 5.41。以稳定性较差的 *α-tubulin* 和 *GST* 为内参时，*Hex2* 表达峰值分别出现在第 23 天（71.465）和第 19 天（34.945），*VgR* 表达峰值分别出现在第 5 天（8.04）和第 7 天（8.97），且在某些日龄表达量异常。分别以稳定性最佳的 *RPL32*/*EF1-α* 双基因、稳定性较好的 *β-tubulin* 和稳定性较差的 *α-tubulin* 及 *GST* 为内参，检测 *Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 相对表达量，结果显示表达峰值及动态有显著差异。结果表明，

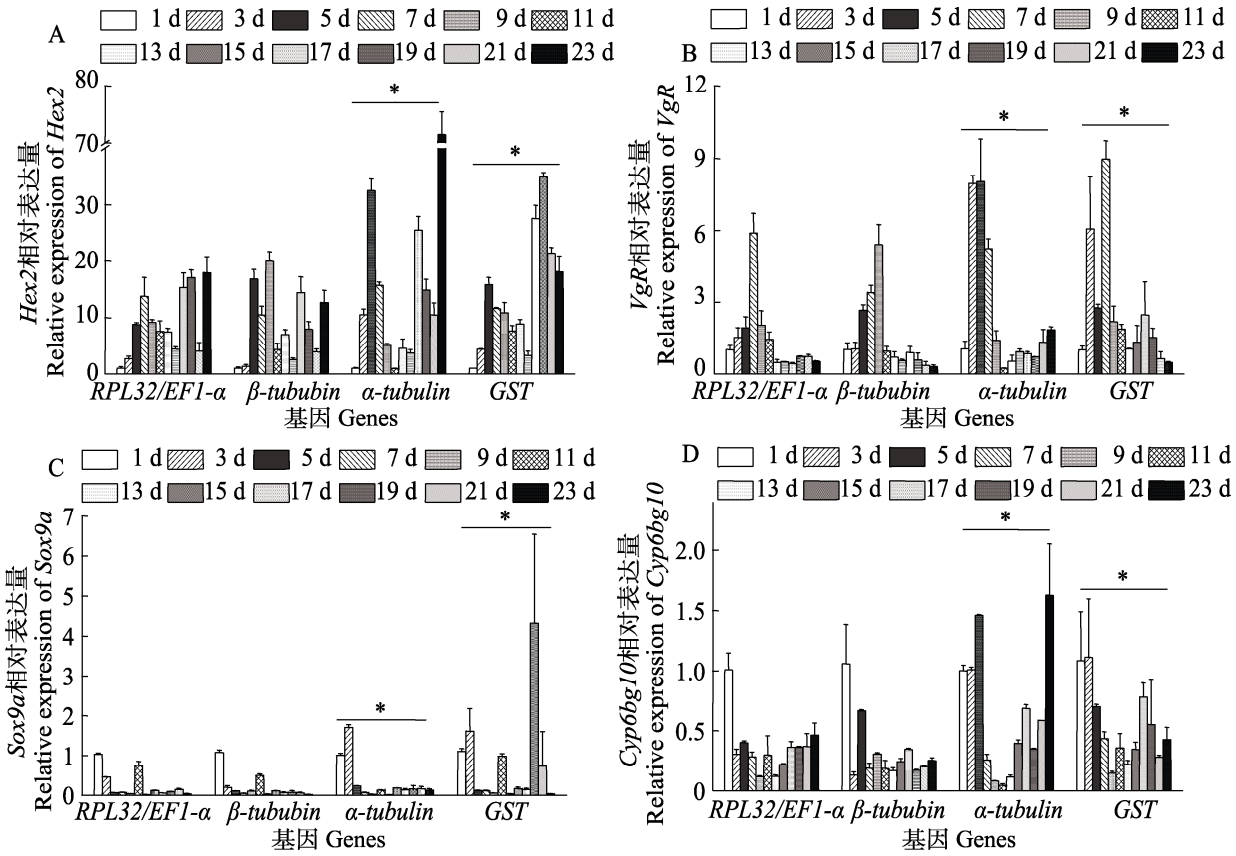

图 6 以不同内参基因检测意大利蝗卵巢不同发育阶段 *Hex2*（A）、*VgR*（B）、*Sox9a*（C）和 *Cyp6bg10*（D）相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *Hex2* (A), *VgR* (B), *Sox9a* (C) and *Cyp6bg10* (D) normalized by different reference genes at different ovarian developmental stages of *Calliptamus italicus*

柱上标有*表示差异显著（$P<0.05$，LDS 检验）。

Histograms with * indicate significant differences at the 0.05 level by LDS test.

选择不同的内参基因进行荧光定量分析，基因表达结果有明显不同。

3　讨论与结论

意大利蝗为非模式生物，生殖相关基因信息有限。通过高通量测序，获得了意大利蝗性腺转录组数据，为进一步研究生殖相关基因的生物学功能奠定基础（Xiang *et al.*，2019）。基因表达水平的测定是分析其生物学功能的前提。目前，RT-qPCR 是测定靶基因表达水平最方便、最有效的方法之一，为了确保基因表达分析的准确性，需要筛选稳定性较高的内参基因（Wang *et al.*，2020）。本研究选择了 9 个常用的参考基因作为候选基因，并评价它们在不同发育阶段卵巢组织中的稳定性。BestKeeper、NormFinder 和 GeNorm 软件分析结果均显示，*β-tubulin*、*RPL32*、*GAPDH* 和 *EF1-α* 基因具有良好的表达稳定性，但由于每个软件算法不同，稳定性排名存在差异。GeNorm 分析结果显示 *RPL32* 和 *β-tubulin* 稳定性较高，而 NormFinder 分析结果显示 *EF1-α* 稳定性较高。因此，本研究使用 RefFinder 对候选基因的整体稳定性进行排序。RefFinder 根据每个软件的排名，为每个内参基因分配一个适当的权重，并计算出它们的权重的几何平均值，以获得最终的总体排名（Xie *et al.*，2012）。同时，GeNorm 分析显示，在意大利蝗不同发育阶段卵巢组织中，内参基因的最佳数目为 2 个。因此，最终确定，*RPL32* 和 *EF1-α* 为最佳内参基因组合。

核糖体蛋白（Ribosomal protein，RP）参与蛋白质的翻译和合成，其编码基因在多种昆虫中能够稳定表达，常用于昆虫 RT-qPCR 的内参基因（Swapna *et al.*，2014）。RPL32 是核糖体蛋白编码基因之一。研究表明，RPL32 在柑橘大实蝇 *Bactrocera*（*Tetradacus*）*minax*（Lü *et al.*，2014）和绿盲蝽 *Apolygus lucorum*（Luo *et al.*，2019）不同发育时期表达稳定，在不同组织、不同抗性牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 中表达稳定性最高（贾冰等，2019），在不同温度处理下棉花粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 雌成虫组织中表达最稳定（陈芳和陆永跃，2014），在白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 晚期胚胎组织中表达稳定（Dzaki *et al.*，2017）。延伸因子（Elongation factors，EF）是一种多聚体核糖体蛋白质因子，在蛋白质翻译过程中促进多肽链的延伸（周冰等，2014）。真核细胞延伸因子有 3 种，分别为 EF1-α，EF1-β 和 EF2。*EF1-α* 在细胞内普遍存在并且可以稳定表达，可用于多种昆虫的内参基因（周冰等，2014）。研究表明，*EF1-α* 在中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*（Luo *et al.*，2018）、帝麦蝽 *Dichelops melacanthus*（Pinheiro *et al.*，2020）及黄翅绢野螟 *Diaphania caesalis*（Wang *et al.*，2020）不同发育阶段组织中表达稳定。本研究结果表明，*RPL32* 和 *EF1α* 是不同发育阶段卵巢组织的最适内参基因。

β-actin 是真核生物中最丰富的蛋白质之一，是细胞质中微丝的主要成分，其氨基酸序列和结构高度保守，被认为是理想的内参基因（Singh *et al.*，2019；Wang *et al.*，2020；何伟杰等，2021）。但也有研究显示，*β-actin* 在某些昆虫表达不稳定，不适合做为内参基因（Pinheiro and Siegfried，2020）。*β-actin* 在桃蛀螟 *Conogethes punctiferails* 不同发育时期和成虫不同组织中表达不稳定（杨苓等，2017），在大象灰甲 *Sympiezomias velatus* 成虫中表达差异很大（李晓等，2018），不适合作为内参基因。在本研究中，*β-actin* 的稳定性较差，不同分析方法中排名靠后，且在不同发育阶段组织间表达差异最大。这可能是由于在卵子发生过程中细胞的体积不断增大，细胞骨架不断重组，导致 β-actin 的表达不稳定（Telang *et al.*，2013）。

储存蛋白在昆虫繁殖过程中发挥重要作用。中华剑角蝗 *AcHex-2* 在卵子发生过程中呈现表达增高的趋势，*AcHex-2* 在 12 日龄卵巢组织中表达量是 5 日龄的 7 倍左右（董丽君等，2015），表明 *Hex2* 参与昆虫生殖系统的发育成熟。卵黄原蛋白受体是卵黄原蛋白的专一受体，介导卵黄原蛋白在卵母细胞中的沉积，对卵母细胞发育及卵巢成熟起着至关重要的作用。前期研究结果表明，意大利蝗卵巢发育过程中 *VgR* 的表达呈先升高后下降的趋势，与卵巢发育密切相关（Xiang *et al.*，2019）。本研究选取与卵黄发生相关的

Hex2 和 *VgR* 以及在卵巢组织中表达丰度较低的 *Sox9a* 和 *Cyp6bg10* 为目标基因，采用 RT-qPCR 方法检测其在卵巢不同发育阶段的表达水平，验证内参基因的稳定性。结果表明，分别以 *RPL32*/*EF1-α*、*β-tubulin*、*α-tubulin* 和 *GST* 为内参基因检测 4 个目标基因的相对表达量，各组数据之间存在显著差异，可见内参基因的稳定性影响 RT-qPCR 结果的准确性，甚至可能导致错误的分析结论。

本研究采用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 对意大利蝗不同发育阶段卵巢组织候选内参基因进行了稳定性评价，结果表明 *RPL32* 和 *EF1-α* 为最佳内参基因组合。研究结果为进一步开展意大利蝗卵巢发育相关功能基因的表达水平及生物学功能研究提供参考。

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.

Bai Y, Lv YN, Zeng M, Jia PY, Lu HN, Zhu YB, Li S, Cui YY, Luan YX, 2020. Selection of reference genes for normalization of gene expression in *Thermobia domestica* (Insecta: Zygentoma: Lepismatidae). *Genes*, 12(1): 21.

Chen F, Lu Y, 2014. Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress. *Acta Entomologica Sinica*, 57(10): 1146–1154. [陈芳, 陆永跃, 2014. 热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选. 昆虫学报, 57 (10): 1146–1154.]

Dong LJ, Zhang XH, Li YL, Lu SS, Yin H, 2015. Cloning and expression analysis of a hexamerin gene from *Acrida cinerea* (Acridoidea: Acrididae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(4): 78–84. [董丽君, 张晓红, 李艳丽, 陆珊珊, 印红, 2015. 中华剑角蝗储存蛋白基因的克隆及表达分析. 中国农业科技导报, 17(4): 78–84.]

Duan Y, Gong ZJ, Wu RH, Wu XB, Miao J, Li T, Jiang YL, Wu YQ, 2021. Identification of reference genes in the heads of *Mythimna separata* with real-time quantitative PCR under different light sources. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(2): 318–325. [段云, 巩中军, 吴仁海, 吴潇博, 苗进, 李彤, 蒋月丽, 武予清, 2021. 应用昆虫学报, 58(2): 318–325.]

Dzaki N, Ramli KN, Azlan A, Ishak IH, Azzam G, 2017. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 7(1): 43618.

He WJ, He LL, Shen FY, Zheng QL, Huang P, 2021. Cloning and analysis of the reference gene actin from *Wedellia trilobata*. *Genomies and Applied Biology*, 40(1): 308–314. [何伟杰, 何莉莉, 沈芳圆, 郑乾璐, 黄萍, 2021. 南美蟛蜞菊内参基因 *actin* 的克隆及其分析. 基因组学与应用生物学, 40(1): 308–314.]

Jia B, Ma Y, Pang B, Shan Y, Bao Q, Han H, Tan Y, 2019. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomologica Sinica*, 62(12): 1379–1391. [贾冰, 马亿, 庞保平, 单艳敏, 鲍青龙, 韩海斌, 谭瑶, 2019. 牧草盲蝽实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 62(12): 1379–1391.]

Liang P, Guo YJ, Zhou XG, Gao XW, 2014. Expression profiling in *Bemisia tabaci* under insecticide treatment: Indicating the necessity for custom reference gene selection. *PLoS ONE*, 9(1): e87514.

Li X, Gong P, Wang B, Wang C, Li M, Zhang Y, Li X, Gao H, Ju J, Zhu X, 2020. Selection and validation of experimental condition-specific reference genes for qRT-PCR in *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae). *Scientific Reports*, 10(1): 21951.

Li X, Li JW, Cheng B, Li W, Sun WX, Gao HY, Ju Q, Jiang XJ, Du L, Qu CJ, Qu MJ, 2018. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 61(11): 1284–1294. [李晓, 李建文, 成波, 李伟, 孙文秀, 高华援, 鞠倩, 姜晓静, 杜龙, 曲春娟, 曲明静, 2018. 大灰象甲实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 61(11): 1284–1294.]

Liu W, Guo S, Sun D, Zhu L, Zhu F, Lei CL, Sheng L, Phelps B, Wang XP, 2019. Molecular characterization and juvenile hormone-regulated transcription of the vitellogenin receptor in the cabbage beetle *Colaphellus bowringi*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 229: 69–75.

Lü ZC, Wang LH, Dai RL, Zhang GF, Guo JY, Wan FH, 2014. Evaluation of endogenous reference genes of *Bactrocera (Tetradacus) minax* by gene expression profiling under various experimental conditions. *The Florida Entomologist*, 97(2): 597–604.

Luo J, Wang A, Cheng YX, Rong HL, Guo LB, Peng Y, Xu LT, 2019. Selection and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of*

Economic Entomology, 113(1): 451–460.

Luo J, Ma C, Li Z, Zhu BQ, Zhang J, Lei CL, Jin SX, Hull JJ, Chen LZ, 2018. Assessment of suitable reference genes for qRT-PCR analysis in *Adelphocoris suturalis*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(12): 2745–2757.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6): 509–515.

Pinheiro DH, Siegfried BD, 2020. Selection of reference genes for normalization of RT-qPCR data in gene expression studies in *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). *Scientific Reports*, 10(1): 5070.

Pinheiro DH, Moreira RO, Leite NA, Redoan AC, Xavier ADS, Barros BA, Carneiro NP, 2020. Suitable reference genes for RT-qPCR analysis in *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Molecular Biology Reports*, 47(7): 4989–5000.

Singh S, Pandher S, Gupta M, Kaur G, Rathore P, 2019. Reference gene selection in *Phenacoccus solenopsis Tinsley* (Hemiptera: Pseudococcidae) and their normalization impact on gene expression in RNAi studies. *Journal of Economic Entomology*, 112(1): 371–381.

Swapna PR, Praveen M, Omprakash M, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*). *Insect Science*, 19(1): 41–46.

Telang A, Rechel JA, Brandt JR, Donnell DM, 2013. Analysis of ovary-specific genes in relation to egg maturation and female nutritional condition in the *mosquitoes Georgecraigius atropalpus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, 59(3): 283–294.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, Paepe AD, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.*, 3(7): Research0034.1-0034.11.

Wang Z, Meng QQ, Zhu X, Sun S, Liu A, Gao SF, Gou YF, 2020. Identification and evaluation of reference genes for normalization of gene expression in developmental stages, sexes, and tissues of *Diaphania caesalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 20(1): 6.

Wei XJ, He L, ADILA·Aji, Ji R, Hu HX, 2021. Identification of stable reference genes for real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in *Locusta migratoria* infected by *Paranosema locustae*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(1): 108–116. [魏笑佳, 何岚, 阿地拉·阿吉, 季荣, 扈鸿霞, 2021. 微孢子感染东亚飞蝗实时定量 PCR 内参基因的筛选. 应用昆虫学报, 58(1): 108–116.]

Xiang M, Sang D, Dong B, Hu HX, Ji R, Wang H, 2019. Molecular features and expression patterns of vitellogenin receptor in *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Physiology*, 19(6): 15.

Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B, 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1): 75–84.

Yang L, Hu XJ, Xu ZF, He L, Xiao W, 2017. Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferails* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(11): 1266–1277. [杨苓, 胡晓静, 徐志峰, 何林, 肖伟, 2017. 桃蛀螟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 60(11): 1266–1277.]

Yang CX, Yan Y, Zhang FM, Zhu X, Zhang YH, Li XR, 2021. Selection of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR of miRNAs in *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomologica Sinica*, 64(4): 439–448. [杨超霞, 闫艺, 张方梅, 朱勋, 张云慧, 李祥瑞, 2021. 麦长管蚜 miRNA 实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 64(4): 439–448.]

Zhang BZ, Liu JJ, Chen XL, Yuan GH, 2018. Selection and evaluation of reference genes for gene expression using quantitative real-time PCR in *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomological Research*, 48(5): 390– 399.

Zhang XH, Li YL, Zhang KJ, Hou J, Yin H, 2016. Cloning and expression analysis of the hexamerin subunit type 2 (*Hex2*) gene from the grasshopper *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Catantopidae). *Acta Entomologica Sinica*, 59(2): 156–163.

Zhao ZJ, Wang LM, Yue DM, Ye B, Li PP, Zhang B, Fan Q, 2019. Evaluation of reference genes for normalization of RT-qPCR gene expression data for *Trichoplusia ni* cells during *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) multicapsid nucleopolyhedrovirus (AnpeNPV) infection. *Journal of Insect Science*, 19(1): 4.

Zhou B, Cao C, Liu CX, 2007. Advances in research on translation elongation factor 1 alpha. *Letters in Biotechnology*, 18(2): 281–284. [周冰, 曹诚, 刘传暄, 2007. 翻译延伸因子 1 A 的研究进展. 生物技术通讯, 18 (2): 281–284.]