

地熊蜂内参基因的筛选和稳定性研究*

夏中炎** 刘福罡 杨帆 张志浩

杨俊豪 杨慧鹏*** 李继莲***

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 国家资源昆虫重点实验室, 北京 100093)

摘要 【目的】内参基因的选择在昆虫基因表达研究中尤为重要。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术对 5 个候选内参基因在地熊蜂 *Bombus terrestris* 三型蜂的 4 种组织中的表达进行稳定性评价, 筛选出地熊蜂相关基因表达定量研究的最佳内参基因。【方法】本研究针对 GenBank 数据库中地熊蜂 *Actin5C*、*PLA2* (磷脂酶 A2)、*S18*、*S28*、*EF-1 α* (延伸因子) 共 5 个候选内参基因的核酸序列设计并筛选出特异性引物; 标记刚羽化出房的熊蜂工蜂、蜂王和雄蜂, 放回原蜂群饲养, 分别取 1、3、5、7 和 10 日龄蜂的头、卵巢、腹神经索和储精囊 4 个组织, 提取总 RNA; 反转录 PCR 克隆候选内参基因片段; 以 TA 克隆将候选内参基因片段克隆进 T 载体; 含有内参基因片段的 T 载体经测序验证后, 作为模板, 通过实时荧光定量 PCR, 优化候选内参基因的扩增条件并绘制候选内参基因荧光定量扩增的标准曲线, 在此基础上测定候选内参基因在地熊蜂三型蜂 4 个组织中的表达量, 并以 NormFinder、BestKeeper、GeNorm、 Δ CT 以及 RefFinder 5 种软件评价候选内参基因在三型蜂 4 种组织中的稳定性。【结果】不同软件对候选内参基因的稳定性排序具有一定差异, 以 RefFinder 综合分析结果显示, 蜂王和雄蜂头部、工蜂和雄蜂腹神经索、工蜂卵巢中最稳定的内参基因为 *PLA2*, 蜂王卵巢和工蜂头部最稳定的内参基因是 *Actin5C*; 蜂王腹神经索中 *EF-1 α* 最稳定; 雄蜂储精囊中最稳定的内参为 *S18*。【结论】熊蜂内参基因的稳定性因熊蜂级型及组织而异。因此, 在进行熊蜂相关基因表达研究时需要根据样本特性选择更稳定的内参基因, 以确保结果的可靠性。

关键词 地熊蜂; 内参基因; 基因筛选; 实时荧光定量 PCR; 稳定性分析

Screening and stability analysis of internal reference genes in *Bombus terrestris*

XIA Zhong-Yan** LIU Fu-Gang YANG Fan ZHANG Zhi-Hao

YANG Jun-Hao YANG Hui-Peng*** LI Ji-Lian***

(State Key Laboratory of Resource Insects Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China)

Abstract [Aim] Selecting appropriate internal reference genes is crucial for the analysis of gene expression in insects. Using real-time PCR, this study assessed the expression stability of five candidate reference genes across four tissue types in bumble bees, aiming to identify the most suitable reference gene for quantitative gene expression analysis. [Methods] Specific primers were designed for the five candidate internal reference genes of *Bombus terrestris*, including *Actin5C*, *PLA2* (phospholipase A2), *S18* (ribosomal protein S18), *S28* (ribosomal protein S28), and *EF-1* (elongation factor 1 alpha). Newly emerged workers, queens, and drones were labeled and reared in their original colonies. Total RNA was extracted from samples of the head, ovary, ventral nerve cord, and seminal vesicle taken at 1, 3, 5, 7, and 10 days of age. The fragments of candidate reference genes were cloned into a pMD19-T vector before being verified via sequencing. The amplification processes were then optimized and the standard curves established. The levels of candidate internal reference genes in queen, worker, and drone tissue samples were quantified using real-time PCR. The expression stability of the internal candidate

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (32350008); 中国农业科学院创新工程 (CAAS-ASTIP-2016-IAR)

**第一作者 First author, E-mail: xzy202992@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: yanghuipeng@caas.cn; bumblebeeljl@hotmail.com

收稿日期 Received: 2024-02-05; 接受日期 Accepted: 2024-03-02

internal reference genes was analyzed using NormFinder, BestKeeper, GeNorm, CT, and RefFinder. **[Results]** The expression stability of the candidate reference genes depended on the method of analysis used. However, results from a comprehensive analysis using RefFinder showed that PLA2 had the most stable expression level in the head of queens and drones, ventral nerve cord of workers and drones, and ovaries of workers. *Actin5C* was most stably expressed in the ovaries of queens and workers, whereas *EF-1* had the most stable expression level in the ventral nerve cord of queens. Finally, *S18* was the stably expressed gene in the seminal vesicle of drones. **[Conclusion]** These findings indicate that the quantitative stability of internal reference genes varies among castes and tissues of bumble bees. Therefore, it is crucial to select the most stable internal reference genes based on the sample tissue type to ensure the reliability of the results.

Key words *Bombus terrestris*; internal-reference gene; gene selection; quantitative real-time PCR; stability analysis

实时荧光定量 PCR 是一种用于实时监测 PCR 反应的技术 (Harshitha and Arunraj, 2021), 具有良好的重复性、高度特异性、高度灵敏性以及操作简单、成本较低、应用范围广等优点 (Bustin *et al.*, 2005)。实时荧光定量 PCR 根据其分析方法不同又被分为绝对定量和相对定量 (梁子英和刘芳, 2020)。绝对定量被广泛应用于微生物学、食品技术和生物技术等领域, 作为诊断、食品质量控制和安全的辅助手段, 而相对定量则被用于基因组学和功能转录组学领域, 在生物实验中进行基因表达分析, 特别是在病毒病原体的检测、定量和分型中 (Chhalliyil *et al.*, 2020)。相对定量需要用内参基因来消除因模板浓度不同所带来的误差, 进而对靶基因的初始量进行校正; 而绝对定量也可以通过引入内参基因, 对靶基因进行归一化处理, 从而减小误差 (张敏等, 2024)。地熊蜂 *Bombus terrestris* 属于膜翅目 Hymenoptera 蜜蜂科 Apidae 熊蜂属 *Bombus* (Schmid-Hempel *et al.*, 2007), 是许多野生植物和农作物的重要传粉昆虫, 特别是在设施栽培中, 熊蜂授粉的经济效益以及生态效益更加显著 (黄家兴等, 2007)。目前, 地熊蜂基因组测序已经完成, 地熊蜂功能基因组研究尤其是重要性状相关基因表达研究已经成为热点 (Marshall *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2021; Renard *et al.*, 2023), 然而针对其内参基因选择的研究尚不充分。本研究拟评价候选内参基因在地熊蜂三型蜂的 4 种组织中表达量的稳定性, 筛选出熊蜂基因表达定量研究的最佳内参基因。

在不同组织、不同时期都能稳定表达的基因通常被认为是最理想的内参基因 (Bustin, 2002)。

目前昆虫中常用的内参基因有肌动蛋白基因 (*Actin*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*)、18S/28S 核糖体蛋白基因 (18S/28S rRNA)、微管蛋白基因 (*Tubulin*) 等 (Shakeel *et al.*, 2018)。已有研究报道, 试验条件均相同的条件下 (取样工蜂处于相同的生长发育阶段、相同的组织器官和试验试剂), 西方蜜蜂 *Apis mellifera* 工蜂的内参基因在非洲蜜蜂亚种 *A. mellifera scutellata* 的工蜂中的表达不稳定 (Buttstedt *et al.*, 2023)。Sankar 等 (2022) 研究发现, 不同种的熊蜂蜂王以及在蜂王大脑、脂肪体、卵巢等不同的组织中, 内参基因的表达稳定性也不一样。Qin 等 (2021) 通过测定 8 个常用内参基因在熊蜂卵、幼虫和蛹 3 个发育阶段的表达情况, 并对其稳定性进行评估, 得出 *RPL13* 和 *RP49* 是熊蜂不同发育阶段最稳定的内参基因。使用不同病毒侵染健康蜜蜂幼虫, 结果表明, *ache2*、*rps18*、 β -*actin*、*tbp* 和 *tif* 可用于以色列急性麻痹病毒 (IAPV) 感染下西方蜜蜂的表达水平正常化, 而 *actin* 和 *tif* 的组合适用于慢性麻痹病毒 (CBPV) 感染的实验, *rpl14*、*tif*、*rpsa*、*ubc* 和 *ache2* 适用于中华蜜蜂 *A. cerana* 的中蜂囊状幼虫病毒 (CSBV) 感染状态下目标基因表达水平检测 (Deng *et al.*, 2020); 使用不同农药处理意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica* 工蜂, 研究发现 *RAD1a* 是啉虫脒、氟吡呋喃酮和联苯菊酯处理中最稳定的内参基因, *RPS18* 在吡虫啉暴露条件下被列为最稳定的基因, 而 *RPS5* 在对照组中被认为是最稳定的基因 (Kim *et al.*, 2022)。此外, 在绿盲蝽 *Aolygus lucorum* (Luo *et al.*, 2020)、黑水虻 *Hermetia illucens* (Gao *et al.*, 2019)、双委夜蛾 *Athetis dissimilis*

(Tang *et al.*, 2022) 等昆虫中的内参基因表达稳定性也有报道。内参基因表达量的稳定性被定义为被分析样本的连续稳定性水平的最小变化 (Shakeel *et al.*, 2018)。目前常用的分析基因表达稳定性的工具主要有 GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)、BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004)、NormFinder (Andersen *et al.*, 2004)、 Δ CT (Silver *et al.*, 2006) 和 RefFinder (Xie *et al.*, 2012, 2023)。

目前, 随着地熊蜂带来的经济效益和生态效益逐渐扩大, 关于地熊蜂的相关功能基因组研究日益增多, 内参基因选择不当将导致研究结果可靠性降低。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术, 分析不同日龄的地熊蜂蜂王、工蜂和雄性蜂的头、卵巢 (蜂王和工蜂)、储精囊 (雄性蜂) 和腹神经索组织中 *Actin5C*、*PLA2* (磷脂酶 A2)、*S18/S28* (18S/28S 核糖体 RNA)、*EF-1 α* (延伸因子) 5 个候选内参基因的稳定性, 筛选出熊蜂基因表达定量研究的最佳内参基因。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究使用的熊蜂由中国农业科学院蜜蜂研究所传粉昆虫繁殖与授粉应用团队提供, 蜂群参照徐龙龙等 (2014) 的方法饲养于温度 (26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 ($60\%\pm 5\%$) 的黑暗环境中, 饲喂 50% 糖水和花粉。

从蜂群中挑选当天刚出房蜂用背标标记并放回原群, 分别于 1、3、5、7 和 10 日龄取出作为供试昆虫 (出房当天记为 1 日龄)。在显微镜下解剖头、腹神经索、卵巢 (蜂王和工蜂) 和储精囊 (雄性蜂), 解剖后的组织放入 1.5 mL 离心管 (RNase-free), 每 6 头蜂的组织混合 1 个样品, 每个样品 3 个生物学重复, 共 135 个样品, 存放于 -80°C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 Trizol 裂解法提取样品总 RNA。从 -80°C 冰箱中取出保存的样品, 加入研磨磁珠和 200 μL Trizol, 在组织研磨仪中以 60 Hz 的频

率研磨 1 min, 室温静置 2 min; 加入 200 μL 氯仿, 充分摇匀, 室温静置 2 min, 4°C 12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液, 加入 500 μL 异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min, 4°C 1 200 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇, 涡旋振荡, 4°C , 9 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。沉淀晾干后加适量无酶水溶解, -80°C 保存备用。使用 NanoDrop2000 测量 RNA 浓度和纯度。

按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (6210A, TaKaRa) 逆转录试剂盒说明书合成第一链 cDNA, 该试剂盒中的反转录酶可以很好地抑制总 RNA 中高级结构和反转录酶的非特异性结合, 合成的 cDNA 合成效率和速度高, 同时还能合成本低、纯度高和完整性好的 cDNA, 此试剂盒还能有效控制反转录反应液配制时产生的非特异性延伸, 保存于 -20°C 备用, 用于后续内参基因片段克隆, 制作质粒模板。

按照定量 PCR 专用反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047A, Takara) 试剂盒说明书以 1 μg 总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 用于反转录模板的总 RNA 中常常有基因组 DNA 残留, 需要进行 DNase I 处理, 而此处理需要进行复杂的纯化操作, 会造成 RNA 降解和损失, 该试剂盒可以有效去除基因组 DNA 残留, 而且处理之后的样品不需要纯化操作, 可以直接进行反转录反应, 避免了 RNA 降解和损失, 保存于 -20°C 备用, 用于后续内参基因定量。

1.3 候选内参基因筛选及引物设计

从 GenBank 数据库中调取地熊蜂肌动蛋白 *Actin5C*、延伸因子 *EF-1 α* 、磷脂酶 *PLA2*、核糖体 RNA (*S28*、*S18*) 5 个内参基因的核酸序列, 用 NCBI 网站上在线引物设计程序 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计候选基因的特异性引物, 并由擎科生物有限公司 (北京) 合成。合成后引物首先利用常规 PCR 及 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增产物的特异性, 从而筛选确定最佳的地熊蜂候选内参基因引物 (表 1)。

表 1 地熊蜂候选内参基因引物序列
Table 1 Sequence of the primers for candidate reference genes in bumble bee

基因 Gene	GenBank 序列号 GenBank ID	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 (bp) Product length (bp)
<i>Actin5C</i>	XM_003396942.4	F-ACAGCCGAACGTGAAATTGTT R-GGTTGCCATTTCTGTTCGA	81
<i>EF-1α</i>	XM_012314816.3	F-GAGAAGTGCGCCGCTAGT R-AACGCGAATTAAGCGGATGC	94
<i>S18</i>	XM_003400778.3	F-AGCGTGCTGGAGAATGTTCA R-TCGTTCCAAGTCCTCACGAAG	179
<i>S28</i>	NW_025963548.1	F-AGCGCGGATATCTTGGACTG R-TCAAGACGGGTCCTGAGAGT	83
<i>PLA2</i>	XM_003400908.4	F-TTGCATGCGCATGACATTT R-ATCGCAGCCGATTGATACCC	114

1.4 基因标准品构建及标准曲线绘制

以第一链 cDNA 为模板,按照 25 μ L PCR 扩增体系:上游引物 1 μ L (10 μ mol/L)、下游引物 1 μ L (10 μ mol/L)、PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$) 12.5 μ L、双蒸水 7.5 μ L、cDNA 1 μ L; PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C、5 min (预变性); 94 $^{\circ}$ C、30 s (变性), 60 $^{\circ}$ C、30 s (退火), 72 $^{\circ}$ C、2 min (延伸), 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C、10 min。按照 TIANgel Purification Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP219-03) 说明书回收 PCR 产物,回收产物使用 pMDTM19-T Vector Cloning Kit (6013, Takara) 进行 TA 克隆,产物导入 Trans-T1 感受态细胞 (CD501-03, 北京全式金生物技术有限公司),进行蓝白斑筛选。挑选阳性克隆,摇菌,使用 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒 (DP103-02) 提取质粒,送至北京擎科生物测序。

以测序正确的质粒为模板,初始浓度为 1×10^9 copies/ μ L,按照 1:10 梯度稀释为 7 个浓度后进行 qRT-PCR 反应构建标准曲线。

1.5 内参基因表达分析

使用 FQD-96A 荧光定量聚合酶链反应检测系统 (杭州博日科技有限公司) 检测候选内参基因的表达量。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L: TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$) 10 μ L、上游引物 0.8 μ L (10 μ mol/L)、下游引物

0.8 μ L (10 μ mol/L)、双蒸水 7.4 μ L、cDNA 1 μ L (相当于 10 ng RNA 的逆转录产物),每个样品 3 个重复。反应条件:95 $^{\circ}$ C、30 s (预变性); 95 $^{\circ}$ C、15 s (变性), 60 $^{\circ}$ C、30 s (退火并延伸), 40 个循环;熔解曲线从 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C,每 0.3 $^{\circ}$ C 读取荧光 15 s。

1.6 候选内参基因稳定性分析

利用 Excel 2019 软件对 qPCR 原始 Ct 值进行统计处理,计算平均 Ct 值。使用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper、 Δ CT 法和 RefFinder 在线工具分别分析地熊蜂不同级型、不同日龄和不同组织中的候选内参稳定性。GeNorm 通过计算候选内参基因的稳定性 (M) 来判断内参基因的表达是否稳定, M 值越小表示内参越稳定。NormFinder 通过计算组内和组间变异,将结果合并成候选内参基因的稳定性 (M), M 值越高表明基因表达越不稳定。BestKeeper 计算候选基因的变异系数 (CV)、标准偏差 (SD) 和相关系数 (r),对基因进行稳定性排序,相关系数越大,标准偏差和变异系数越小,基因稳定性越好; $SD > 1$ 时,基因表达不稳定。 Δ CT 法通过计算标准偏差来确定基因的稳定性,标准偏差越小,基因表达越稳定。RefFinder 是一种网络在线工具,它将以上 4 种工具计算的基因稳定性结果进行综合评估,通过计算 GeNorm、NormFinder、BestKeeper、 Δ CT 4 种软件对于每个基因稳定性

权重的几何平均值,得到内参基因稳定性的最终排名,几何平均值越小,内参基因的稳定性越高。候选内参基因的表达水平和稳定性排序结果使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 候选内参引物特异性与扩增效率

常规 PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,引物扩增片段长度与预期长度一致,目的条带单一,无非特异性扩增和引物二聚体(图 1),质粒测序结果经比对与目标片段一致,无碱基突变;qPCR 结果显示,每个候选内参基因的熔解曲线呈单一熔解峰(图 2)。以 CT 值为纵坐标,

横坐标为相对拷贝数的对数(10 为底),制作标准曲线,所有引物的扩增效率在 90%-110%,线性关系良好 $R^2>0.995$ (表 2)。以上结果证明引物特异性好,扩增效率高,可以用于后续试验。

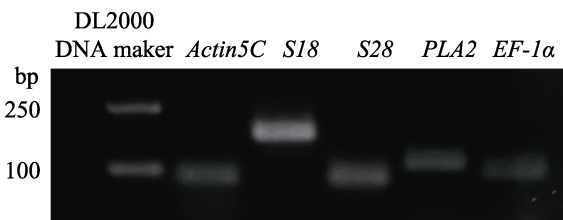


图 1 候选内参基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of candidate reference genes

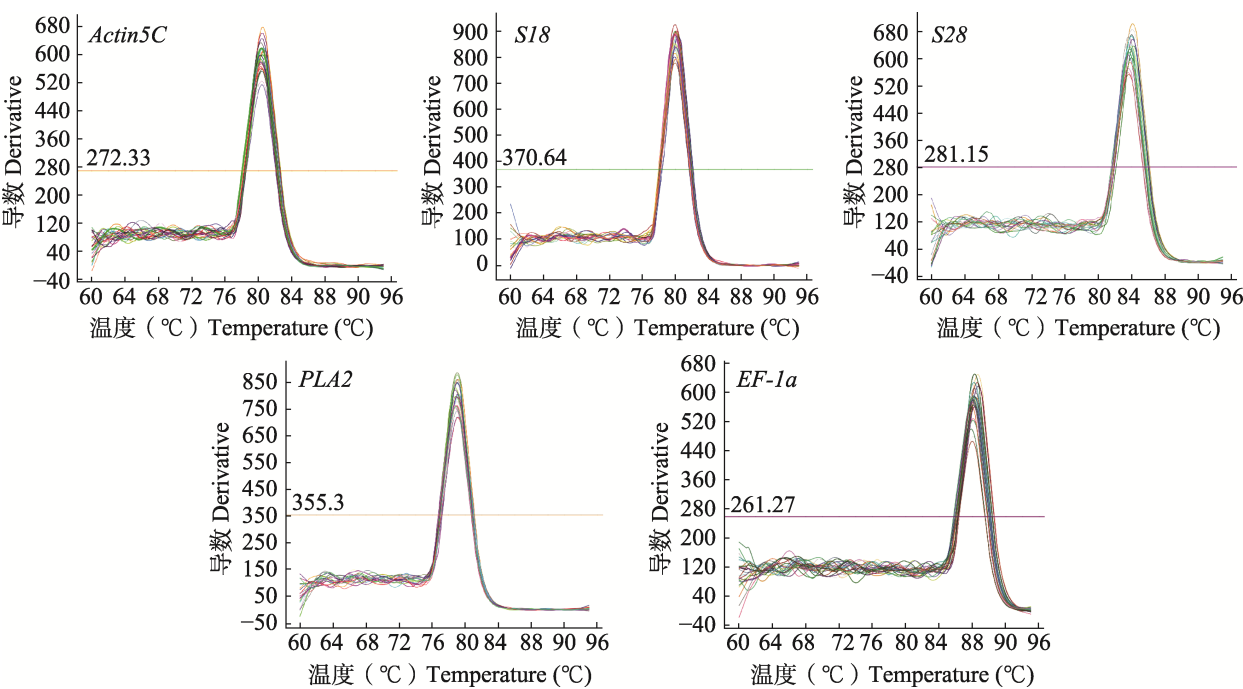


图 2 候选内参基因 qPCR 熔解曲线
Fig. 2 Melting curve of qRT-PCR of candidate reference genes

表 2 地熊蜂 5 个候选内参基因的荧光定量标准曲线

Table 2 qPCR standard curves of five candidate reference genes in bumble bees			
基因 Gene	扩增效率 (%) Amplification efficiency (%)	曲线斜率 Slope of amplification curve	线性相关系数 Linear correlation coefficient
<i>Actin5C</i>	98.59	- 3.356 1	0.998 7
<i>S18</i>	102.07	- 3.273 2	0.998 4
<i>S28</i>	104.68	- 3.214 6	0.999 1
<i>EF-1α</i>	95.34	- 3.438 7	0.999 6
<i>PLA2</i>	98.08	- 3.368 6	0.998 6

2.2 候选内参基因表达水平分析

qPCR 结果的 CT 值越高, 基因表达量越低。5 个候选内参基因的表达量在熊蜂的不同级型 (图 3: A-C) 和不同组织 (图 4: A-D) 中的表达量呈现出相似性, 均为 $S28 > S18 > Actin5C > EF-1\alpha$, CT 值介于 9.71-28.23; $S28$ 的表达量在储精囊中最高, CT 平均值为 11.22; $EF-1\alpha$ 的表

达量在储精囊中最低, CT 平均值为 25.83; 从基因表达水平的变化来看, $S18$ 基因表达水平变化在储精囊中最小, CT 值介于 20.41-21.41; $EF-1\alpha$ 在蜂王中的表达水平变化最大, CT 值为 22.45-27.98 (图 3, 图 4)。

2.3 候选内参基因表达稳定性分析

分别使用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper、

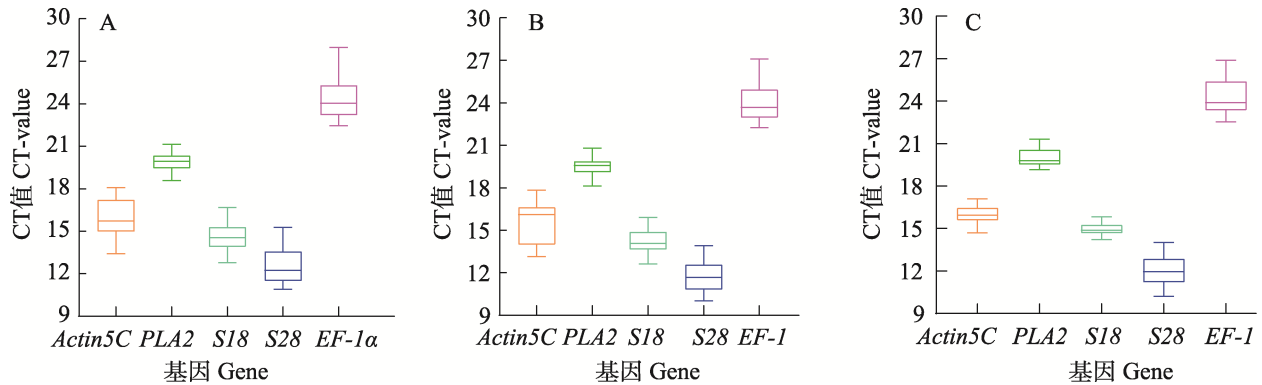


图 3 不同级型熊蜂中候选内参基因表达情况

Fig. 3 Candidate reference gene expression in different caste of bumble bees

A. 蜂王; B. 工蜂; C. 雄蜂。A. Queen; B. Worker; C. Drone.

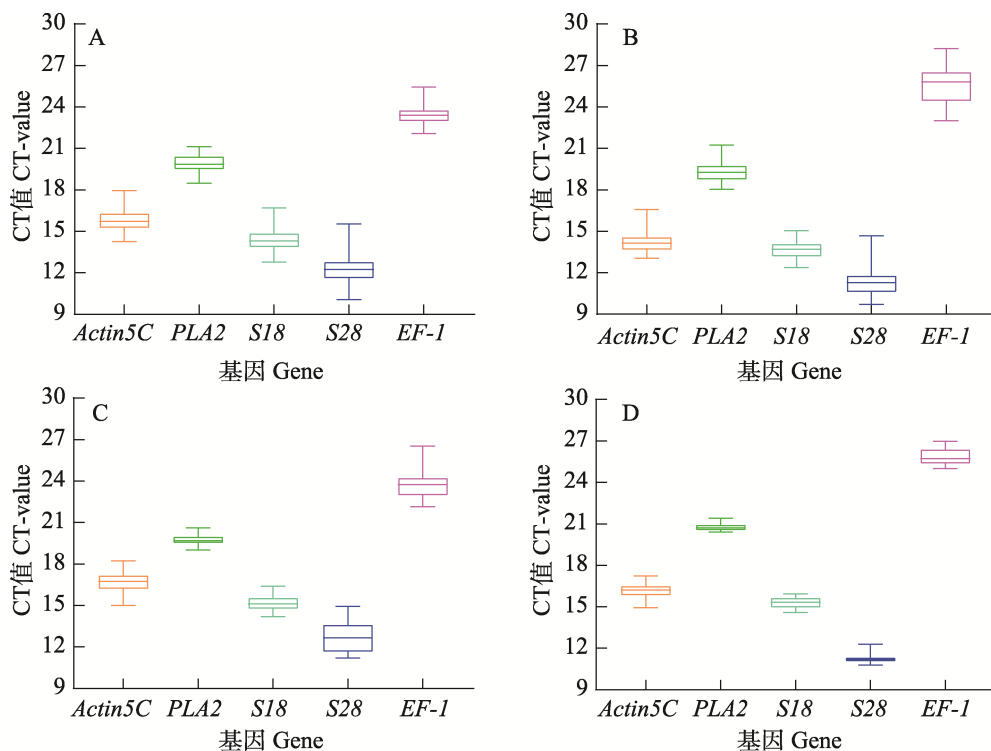


图 4 不同组织中候选内参基因表达情况

Fig. 4 The amount of candidate reference genes in different tissues

A. 腹神经索; B. 卵巢; C. 头; D. 储精囊。A. Ventral nerve cord; B. Ovary; C. Head; D. Seminal vesicle.

ΔCT 法和 RefFinder 对 5 个候选内参基因在不同级型以及不同组织中的稳定性进行分析。

GeNorm 认为蜂王中最稳定的内参基因为 *Actin5C* 和 *S28*, 而工蜂和雄蜂中最稳定的内参基因为 *PLA2* 和 *S18*; NormFinder 计算得出蜂王和工蜂中 *S18* 最稳定, 雄蜂中则是 *PLA2* 最稳定; BestKeeper 认为 *PLA2* 是蜂王和工蜂中最稳定的内参基因, 但是 *PLA2* 在雄蜂中最不稳定, 雄蜂

中最稳定的内参基因为 *S18*; ΔCT 分析结果显示在蜂王、工蜂和雄蜂中最稳定的内参基因分别是 *S28*、*S18* 和 *PLA2*。RefFinder 综合分析结果显示, 候选内参基因的稳定性排序在不同级型中有一定差异, 蜂王中稳定性排序为 *S28*>*S18*>*Actin5C*>*PLA2*>*EF-1α* (表 3); 工蜂中为 *S18*>*PLA2*>*S28*>*EF-1α*>*Actin5C* (表 4); 雄蜂中则为 *PLA2*>*S18*>*Actin5C*>*S28*>*EF-1α* (表 5)。

表 3 不同软件对蜂王中内参基因的稳定性排序
Table 3 Stability ranking of candidate reference genes using different software in queen

排名 Rank	GeNorm	NormFinder	BestKeeper	ΔCT	RefFinder
1	<i>Actin5C</i> / <i>S28</i> (0.252)	<i>S18</i> (0.095)	<i>PLA2</i> (0.513)	<i>S28</i> (0.376)	<i>S28</i> (1.57)
2	<i>Actin5C</i> / <i>S28</i> (0.252)	<i>S28</i> (0.126)	<i>S18</i> (0.778)	<i>S18</i> (0.405)	<i>S18</i> (1.86)
3	<i>S18</i> (0.306)	<i>Actin5C</i> (0.217)	<i>S28</i> (0.971)	<i>Actin5C</i> (0.429)	<i>Actin5C</i> (2.45)
4	<i>PLA2</i> (0.387)	<i>EF-1α</i> (0.537)	<i>Actin5C</i> (1.092)	<i>EF-1α</i> (0.584)	<i>PLA2</i> (3.34)
5	<i>EF-1α</i> (0.485)	<i>PLA2</i> (0.603)	<i>EF-1α</i> (1.217)	<i>PLA2</i> (0.633)	<i>EF-1α</i> (4.23)

表 4 不同软件对工蜂中内参基因的稳定性排序
Table 4 Stability ranking of candidate reference genes using different software in worker

排名 Rank	GeNorm	NormFinder	BestKeeper	ΔCT	RefFinder
1	<i>PLA2</i> / <i>S18</i> (0.299)	<i>S18</i> (0.077)	<i>PLA2</i> (0.493)	<i>S18</i> (0.457)	<i>S18</i> (1.19)
2	<i>PLA2</i> / <i>S18</i> (0.299)	<i>S28</i> (0.255)	<i>S18</i> (0.728)	<i>S28</i> (0.513)	<i>PLA2</i> (1.73)
3	<i>S28</i> (0.38)	<i>PLA2</i> (0.46)	<i>S28</i> (0.811)	<i>PLA2</i> (0.586)	<i>S28</i> (2.45)
4	<i>EF-1α</i> (0.497)	<i>EF-1α</i> (0.507)	<i>EF-1α</i> (1.086)	<i>EF-1α</i> (0.638)	<i>EF-1α</i> (4.00)
5	<i>Actin5C</i> (0.579)	<i>Actin5C</i> (0.602)	<i>Actin5C</i> (1.208)	<i>Actin5C</i> (0.703)	<i>Actin5C</i> (5.00)

表 5 不同软件对雄蜂中内参基因的稳定性排序
Table 5 Stability ranking of candidate reference genes using different software in drone

排名 Rank	GeNorm	NormFinder	BestKeeper	ΔCT	RefFinder
1	<i>PLA2</i> / <i>S18</i> (0.249)	<i>PLA2</i> (0.145)	<i>S18</i> (0.295)	<i>PLA2</i> (0.435)	<i>PLA2</i> (1.32)
2	<i>PLA2</i> / <i>S18</i> (0.249)	<i>Actin5C</i> (0.175)	<i>Actin5C</i> (0.515)	<i>Actin5C</i> (0.447)	<i>S18</i> (1.86)
3	<i>Actin5C</i> (0.274)	<i>S28</i> (0.435)	<i>PLA2</i> (0.525)	<i>S18</i> (0.549)	<i>Actin5C</i> (2.21)
4	<i>S28</i> (0.443)	<i>S18</i> (0.47)	<i>S28</i> (0.875)	<i>S28</i> (0.583)	<i>S28</i> (3.72)
5	<i>EF-1α</i> (0.54)	<i>EF-1α</i> (0.61)	<i>EF-1α</i> (1.096)	<i>EF-1α</i> (0.684)	<i>EF-1α</i> (5)

在熊蜂的不同组织中, 候选内参基因的稳定性也各不相同。综合来看, GeNorm 分析结果显示, 头、卵巢和储精囊中最稳定的内参基因为 *PLA2* 和 *S18*, 而在腹神经索中最稳定的内参基因为 *PLA2* 和 *Actin5C* (图 5: A); NormFinder

分析结果则显示在头和卵巢中最稳定的内参是 *Actin5C*, 最不稳定的内参基因是 *EF-1α* (图 5: B); BestKeeper 和 ΔCT 结果均显示卵巢中最不稳定的内参基因为 *EF-1α* (图 5: C, D)。RefFinder 综合评估结果显示头部候选内参基因稳定性排

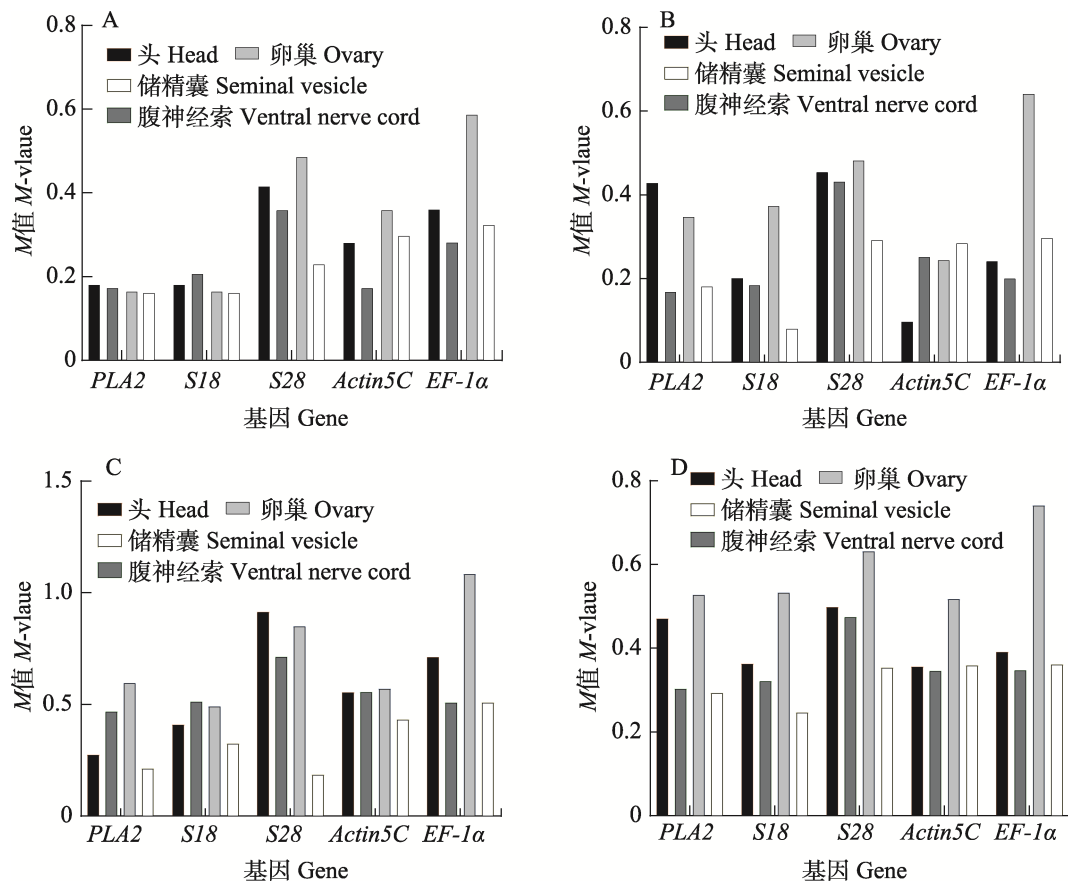


图5 不同软件对候选内参基因在不同组织中的稳定性排序

Fig. 5 Stability ranking of candidate reference genes using different software in different tissues

A. GeNorm; B. NormFinder; C. BestKeeper; D. ΔCT.

序为: $S18 > Actin5C > PLA2 > EF-1\alpha > S28$; 卵巢内参稳定性排序为: $Actin5C > S18 > PLA2 > S28 > EF-1\alpha$; 腹神经索内参稳定性排序为: $PLA2 > S18 > Actin5C > EF-1\alpha > S28$; 雄蜂储精囊内参基因稳定性排序为: $S18 > PLA2 > S28 > Actin5C > EF-1\alpha$ (图 6:A-D)。

为进一步了解在同一组织器官中内参基因的稳定性是否会随着蜂的级型变化而发生改变, 用 RefFinder 分析了三型蜂的头和腹神经索, 以及蜂王和工蜂的卵巢中候选内参基因的稳定性。结果发现, 在蜂王和雄蜂的头部最稳定的内参基因是 $PLA2$, 工蜂中稳定性最差的内参基因是 $S18$, 最稳定的内参基因是 $Actin5C$, 而 $Actin5C$ 在蜂王的头部最不稳定 (图 7); 在蜂王腹神经索中, 最稳定的内参基因是 $EF-1\alpha$, 其次为 $Actin5C$, 而工蜂和雄蜂的腹神经索中最稳定的内参基因为 $PLA2$ 和 $S18$ (图 8); 蜂王卵巢中候选内参稳定性从高到低排序为 $PLA2 > Actin5C >$

$S18 > S28 > EF-1\alpha$, 而在工蜂卵巢中 $Actin5C$ 的稳定性优于 $PLA2$ (图 9)。此外, 使用 RefFinder 对不同日龄熊蜂的内参基稳定性进行排序, 结果表明, 各日龄最稳定的内参基因均是 $PLA2$, 最不稳定的内参基因是 $EF-1\alpha$, 其余 3 个内参基因的稳定性排序会随日龄发生变化 (表 6)。

3 结论与讨论

内参基因的选择在基因表达分析研究中起到至关重要的作用, 根据不同的试验条件选用合适的内参基因, 能得到更加准确的目标基因的表达情况 (Kozera and Rapacz, 2013)。目前常用的内参基因主要是一些被认为细胞维持生命活动所必需的, 而且在不同发育时期以及组织器官中均可稳定表达, 例如 $Actin$ 、 $Tubulin$ 以及核糖体 RNA 等 (Joshi *et al.*, 2022)。越来越多的研究表明, 内参基因的表达稳定性会随着试验条件

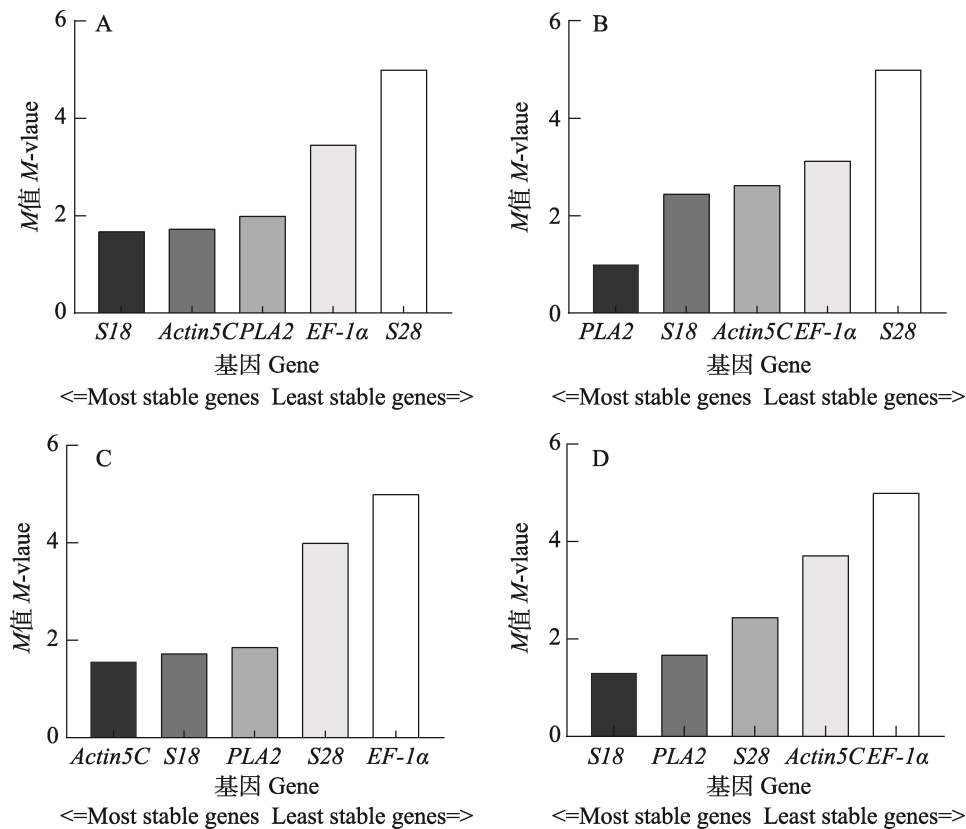


图 6 RefFinder 对候选内参基因在不同组织中的综合排序

Fig. 6 Stability ranking of candidate reference genes using RefFinder in different tissues

A. 头; B. 腹神经索; C. 卵巢; D. 储精囊。A. Head; B. Ventral nerve cord; C. Ovary; D. Seminal vesicle.

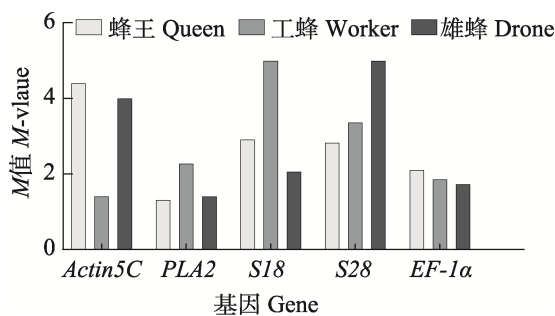


图 7 RefFinder 对蜂王、工蜂和雄性蜂头部组织中候选内参稳定性排序

Fig. 7 Stability ranking of reference genes evaluated by RefFinder in the head of different castes of bumble bee

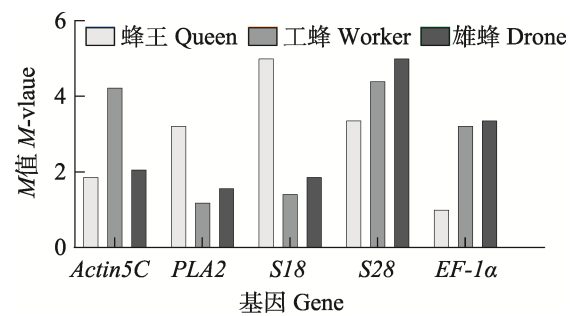


图 8 RefFinder 对蜂王、工蜂和雄蜂腹神经索中候选内参基因排序

Fig. 8 Stability ranking of reference gene evaluated by RefFinder in ventral nerve cord of different castes of bumble bee

的变化产生波动, 进一步对试验结果造成一定影响 (Gao *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2022)。因此, 在基因表达量测定试验中, 使用稳定可靠的内参基因会大大减少各种不确定因素而引起的误差, 为试验结果的可重复性和准确性提供保障 (刘凡奇等, 2019)。Sankar 等 (2022) 的研究结果表

明核糖体蛋白 (*S18*、*S28*)、延伸因子 (*EF-1α*)、磷脂酶 A2 (*PLA2*) 是熊蜂蜂王成虫体内稳定性较高的内参基因, 因此本研究将以上 4 个内参基因以及肌动蛋白基因 (*Actin5C*) 作为候选内参基因, 拟筛选出熊蜂三型蜂成虫阶段以及不同组织中 5 个候选内参基因, 为新出房时期地熊蜂相

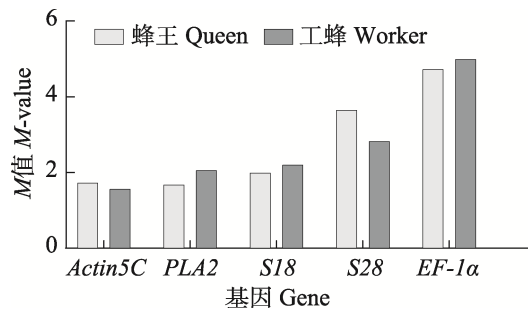


图9 RefFinder 对蜂王和工蜂卵巢中候选内参基因稳定性排序

Fig. 9 Stability ranking of reference gene evaluated by RefFinder in ovary of queen and worker

关基因表达研究奠定基础。

本研究发现,在5个候选内参基因中延长因子基因(*EF-1α*)在卵巢中的稳定性均优于18S核糖体RNA基因(*S18*),这与Sankar等(2022)的研究结果相反,可能是因为试验材料所用的蜂来源不同而造成的差异。Buttstedt等(2023)已经证实,来自非洲和欧洲两地的处于相同生长发育阶段的蜜蜂工蜂内参基因的

表达存在差异;蜂王中最稳定的内参基因为*S28*,工蜂中*S18*最稳定,而雄蜂中最稳定的为*PLA2*,这一结果表明熊蜂不同级型中内参基因表达稳定性具有一定差异,进一步证明了内参基因表达分析和稳定性评价的必要性。事实上,影响内参基因表达稳定性的因素还有很多。Jeon等(2020)已经证明蜜蜂的内参基因稳定性会随着四季交替而发生改变,*RPS5*是春季最稳定的基因,*RPS18*在夏季最稳定,*RPN2*在秋冬季节最稳定。蜜蜂在不同病毒感染状态下(Deng *et al.*, 2020)以及暴露于不同农药下(Kim *et al.*, 2022)内参基因稳定性也存在差异。在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的研究中发现在不同环境压力(温度)或经过铬离子处理后,对其内参基因的表达有显著影响(Plachetka-Božek and Augustyniak, 2017)。熊蜂作为农业授粉昆虫,长期暴露在农药环境中,同时也面临着温度等环境生存压力,其内参基因的稳定性有待进一步研究。

表6 RefFinder 对不同日龄熊蜂中候选内参基因稳定性排序

Table 6 Stability ranking of candidate reference genes evaluated by RefFinder in different age of bumble bee

排名 Rank	1日龄 1-day-old	3日龄 3-day-old	5日龄 5-day-old	7日龄 7-day-old	10日龄 10-day-old
1	<i>PLA2</i> (1.00)	<i>PLA2</i> (1.32)	<i>PLA2</i> (1.32)	<i>PLA2</i> (1.00)	<i>PLA2</i> (1.00)
2	<i>S18</i> (1.68)	<i>S18</i> (2.06)	<i>Actin5C</i> (1.86)	<i>S18</i> (1.68)	<i>S18</i> (1.68)
3	<i>Actin5C</i> (3.00)	<i>S28</i> (2.63)	<i>S18</i> (2.06)	<i>S28</i> (3.46)	<i>Actin5C</i> (3.00)
4	<i>S28</i> (4.00)	<i>Actin5C</i> (2.99)	<i>S28</i> (4.00)	<i>Actin5C</i> (3.46)	<i>S28</i> (4.23)
5	<i>EF-1α</i> (5.00)	<i>EF-1α</i> (4.73)	<i>EF-1α</i> (5.00)	<i>EF-1α</i> (5.00)	<i>EF-1α</i> (4.73)

本研究利用 GeNorm、BestKeeper、 ΔCT 法、NormFinder 和 RefFinder 5 种软件,对熊蜂三型蜂的不同日龄4个组织中的5个候选内参基因的表达稳定性进行分析。结果显示,蜂王和雄蜂头部、工蜂和雄蜂腹神经索、工蜂卵巢中最稳定的内参基因为 *PLA2*,蜂王卵巢和工蜂头部最稳定的内参基因是 *Actin5C*;蜂王腹神经索中 *EF-1α* 最稳定;雄蜂储精囊中最稳定的内参为 *S18*。本研究结果表明熊蜂内参基因的稳定性因熊蜂级型及组织而异。因此在进行熊蜂相关基因表达研究时需要根据样本特性选择更稳定的内参基因,以确保结果的可靠性。

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.
- Bustin SA, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1): 23–39.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW, 2005. Quantitative real-time RT-PCR: A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3): 597–601.
- Buttstedt A, Pirk CWW, Yusuf AA, 2023. Differences in the suitability of published honey bee (*Apis mellifera*) reference genes between the African subspecies *Apis mellifera scutellata*

- and European derived *Apis mellifera*. *Molecular Ecology*, Doi: 10.1111/mec.17139.
- Chhalliyil P, Ilves H, Kazakov SA, Howard SJ, Johnston BH, Fagan J, 2020. A real-time quantitative PCR method specific for detection and quantification of the first commercialized genome-edited plant. *Foods*, 9(9): 1245.
- Deng YC, Zhao HX, Yang S, Zhang L, Zhang LN, Hou CS, 2020. Screening and validation of reference genes for RT-qPCR under different honey bee viral infections and dsRNA treatment. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1715.
- Gao ZH, Deng WH, Zhu F, 2019. Reference gene selection for quantitative gene expression analysis in black soldier fly (*Hermetia illucens*). *PLoS ONE*, 14(8): e0221420.
- Harshitha R, Arunraj DR, 2021. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5): 800–812.
- Huang JX, An JD, Wu J, Guo ZB, 2007. Advantage of bumblebee as pollinator for solanum in greenhouse. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23(3): 5–9. [黄家兴, 安建东, 吴杰, 国占宝, 2007. 熊蜂为温室茄属作物授粉的优越性. 中国农学通报, 23(3): 5–9.]
- Jeon JH, Moon K, Kim Y, Kim YH, 2020. Reference gene selection for qRT-PCR analysis of season- and tissue-specific gene expression profiles in the honey bee *Apis mellifera*. *Scientific Reports*, 10(1): 13935.
- Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE, 2022. What are housekeeping genes? *PLoS Computational Biology*, 18(7): e1010295.
- Kim Y, Kim H, Cha J, Lee SH, Kim YH, 2022. Validation of quantitative real-time PCR reference genes and spatial expression profiles of detoxication-related genes under pesticide induction in honey bee, *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 17(11): e0277455.
- Kozera B, Rapacz M, 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4): 391–406.
- Liang ZY, Liu F, 2020. Research progress on real-time quantitative technology and its application. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(6): 1–3. [梁子英, 刘芳, 2020. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展. 现代农业科技, 2020(6): 1–3.]
- Liu FQ, Wan GJ, Zeng LY, Li CX, Pan WD, Chen FJ, 2019. Selection of stable internal reference genes for transcript expression analyses in *Laodelphax striatellus* under near-zero magnetic field. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(19): 3346–3356. [刘凡奇, 万贵钧, 曾路影, 李春绪, 潘卫东, 陈法军, 2019. 近零磁场下灰飞虱转录表达分析稳定性内参基因筛选. 中国农业科学, 52(19): 3346–3356.]
- Luo J, Wang AL, Cheng YX, Rong HL, Guo LB, Peng Y, Xu L, 2020. Selection and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 113(1): 451–460.
- Marshall H, Lonsdale ZN, Mallon EB, 2019. Methylation and gene expression differences between reproductive and sterile bumblebee workers. *Evolution Letters*, 3(5): 485–499.
- 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.
- Plachetka-Božek A, Augustyniak M, 2017. Evaluation of candidate reference genes for quantitative gene expression analysis in *Spodoptera exigua* after long-time exposure to cadmium. *Scientific Reports*, 7(1): 8338.
- Qin HR, Dong K, Huang JX, He SY, Wu J, 2021. Identification of reference genes for gene expression analysis at different developmental stages of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 52(4): 825–836.
- Renard T, Martinet B, De Souza Araujo N, Aron S, 2023. DNA methylation extends lifespan in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(2012): 20232093.
- Sankar K, Yoon HJ, Lee YB, Lee KY, 2022. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR analysis in tissues from bumble bees (*Bombus terrestris*) of different lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22): 14371.
- Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Brunner PC, Seeman OD, Allen GR, 2007. Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity (Edinb)*, 99(4): 414–422.
- Shakeel M, Rodriguez A, Tahir UB, Jin F, 2018. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: An overview in insects. *Biotechnology Letters*, 40(2): 227–236.
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL, 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:33.
- Tang J, Liang G, Dong S, Shan S, Zhao M, Guo X, 2022. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Aethis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae) under different conditions. *Frontiers in Physiology*, 13: 842195.
- Tian Y, Liu J, He F, Huang J, Wu J, He S, 2021. IRP30 promotes worker egg-laying in bumblebee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Gene*, 776: 145446.
- 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.
- Xie FL, Wang JT, Zhang BH, 2023. RefFinder: A web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & Integrative Genomics*, 23(2): 125.
- Xie FL, Xiao P, Chen DL, Xu L, Zhang BH, 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(2012): 75–84.
- Xu LL, Wu J, Guo J, Li JL, 2014. Dynamic variation of symbionts in bumblebees during hosts growth and development. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(10): 2030–2037. [徐龙龙, 吴杰, 郭军, 李继莲, 2014. 共生菌群在熊蜂生长发育过程中的动态变化. 中国农业科学, 47(10): 2030–2037.]
- Zhang M, Li ZP, Zhao XR, Zhang XH, Zheng HX, 2024. Selection and validation of candidate reference genes for gene expression analysis in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) by qRT-PCR. *Journal of Environmental Entomology*, 46(1): 174–183. [张敏, 李子鹏, 赵欣然, 张仙红, 郑海霞, 2024. 绿豆象实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. 环境昆虫学报, 46(1): 174–183.]