



内参基因在昆虫实时荧光定量 PCR 中的研究进展*

史彩华^{1,2**} 张友军^{2***}

(1. 长江大学, 荆州 434025; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘 要 作为一种高效的定量 PCR 技术, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 因其灵敏度高、特异性强、定量准确等优点, 已被广泛运用于昆虫基因表达和转录分析。然而, 为了控制样本 RNA 在质量和逆转录效率上存在差异, 必须筛选表达稳定的“看家基因”作为内参基因, 对目的基因表达量进行校正和标准化。许多学者研究表明, 昆虫种类和实验条件的不同, 导致选择的内参基因也不尽相同。因此, 本文综述了前人有关昆虫内参基因的研究及其稳定性评价, 为其它昆虫内参基因的研究提供理论参考依据。

关键词 昆虫, 内参基因, qRT-PCR

Advances in reference gene for real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) of insects research

SHI Cai-Hua^{1,2**} ZHANG You-Jun^{2***}

(1. Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Department of Plant Protection, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) is one of the most commonly used technologies for genes expression analysis, with its high sensitivity, specificity, veracity, etc. In order to avoid differences of RNA quality and efficiency of reverse transcription, it is necessary to use housekeeping gene as the reference for data normalization. Some researches indicate that different reference genes should be selected regarding different experimental conditions and different insect species. Here, we summarized the advances in reference genes for qRT-PCR of insects research. This review provides a comprehensive understanding of selecting appropriate reference genes for qRT-PCR in insect molecular biological studies.

Key words insects, reference gene, real-time quantitative reverse transcription PCR

实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术具有快速高效、易重复、准确定量、高灵敏度和高通量等优点, 对基因表达的检测实现了从定性到定量的飞跃 (Li *et al.*, 2013), 尤其适用于无法用 Northern-blot 等手段进行精确检测的样本 (Nolan *et al.*, 2006)。qRT-PCR 分为绝对定量和相对定量两种。由于基因之间存在表达量的差异, 因此, 科学家们通常

使用相对定量的手段检测目的基因的表达量, 其优点是成本低、方便操作 (Li *et al.*, 2015)。然而, 相对定量需要选择稳定表达的内参基因校正样本在起始细胞数目、RNA 质量及逆转录水平上的差异 (Suzuki *et al.*, 2000), 否则会影响目的基因的真实表达水平。理想的内参基因应该在不同实验条件下均能稳定表达 (Su *et al.*, 2013)。然而, 随着 qRT-PCR 和基因芯片的广泛应用,

* 资助项目 Supported projects: 公益性行业 (农业) 科研专项 (2013203027)

**第一作者 First author, E-mail: shicaihua1980@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyoujun@caas.cn

收稿日期 Received: 2015-08-28, 接受日期 Accepted: 2016-03-22

内参基因的研究报道日益增多 (Omondi *et al.*, 2015), 结果表明并无任何基因在复杂的实验条件下均能恒定表达 (Yuan *et al.*, 2014)。如果盲目选择内参基因, 可能难以发现某些目的基因的微小表达差异, 甚至得出相反结论 (Huggett *et al.*, 2005)。因此, 内参基因选择是否合适, 直接关系到 qRT-PCR 结果的正确与否 (Liang *et al.*, 2014)。本文的目的是综述前人有关昆虫内参基因的研究及其稳定性评价, 为其它昆虫内参基因的研究提供理论参考依据。

1 常用内参基因的选择

理想的内参基因通常选择表达量或拷贝数几乎恒定的“看家基因”(Yeap *et al.*, 2014)。不同类型的细胞、组织和实验处理, 内参基因的

表达水平存在较大差异, 因此, 检测特定实验条件下目的基因的表达需要筛选不同的内参基因 (Teng *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2014)。理想的内参基因不存在假基因 (Cao *et al.*, 2012), 在昆不同类型细胞和组织中高度或中度表达, 不受生理周期和任何内外因素的影响, 与目的基因具有相似的表达量 (Ferdous *et al.*, 2015), 且 Ct 值在 15~30 之间 (Wan *et al.*, 2010; Lilly *et al.*, 2011)。然而, 在所有实验条件下均能恒定表达的理想内参基因并不存在。因此, 筛选合适的内参基因是判断目的基因真实表达的重要前提, 而且同时选用 2 个或多个内参基因有利于调整系统偏差, 得到准确的基因表达结果, 尤其针对表达量差异细微的基因 (Khanlou *et al.*, 2012)。

目前, 常用的昆虫内参基因有: 18S 核糖体

表 1 昆虫研究中常用内参基因的选择
Table 1 Commonly used reference genes for insects

基因简称 Gene symbol	中文全称 Full Chinese gene name	英文全称 Full English gene name
18S rRNA	18S 核糖体 RNA	18S ribosomal RNA
28S rRNA	28S 核糖体 RNA	28S ribosomal RNA
GAPDH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
β -actin	β -肌动蛋白	Beta actin
EF1-a	α -延伸因子	Elongation factor 1 alpha
SDHA	琥珀酸脱氢酶 A 亚基	Succinate dehydrogenase A
rspL40	核糖体蛋白 L40	Ribosomal protein L40
BTF3	通用转录因子 3	Basic transcription factor
rsp27	核糖体蛋白 S27	Ribosomal protein S27
RPL18	核糖体蛋白 L18	Ribosomal protein L18
RPS18	18S 核糖体蛋白	Ribosomal protein S18
α -Tub	α -微管蛋白	Alpha tubulin
β -Tub	β -微管蛋白	Beta tubulin
RpL32	核糖体蛋白 L32	Ribosomal protein 49/L32
RPL13	核糖体蛋白 L13	Ribosomal protein L13
UBC	泛素	Ubiquitin conjugating enzyme
RPS15	15S 核糖体蛋白	Ribosomal protein S15
RPS11	11S 核糖体蛋白	Ribosomal protein S11
TBP	TATA 盒结合蛋白	TATA-Box binding protein
GST	谷胱甘肽-S-转移酶	Glutathione-S- transferase
RPS3	3S 核糖体蛋白	Ribosomal protein S3
G6PDH	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	Glucose-6-phosphate dehydrogenase

RNA (18S ribosomal RNA, 18S rRNA)、28S 核糖体 RNA (28S ribosomal RNA, 28S rRNA)、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、 β -肌动蛋白基因 (Beta actin, β -actin)、延伸因子 1 (Elongation factor-1 alpha, EF1- α) 和琥珀酸脱氢酶复合体 A 亚基 (Succinate dehydrogenase complex subunit A, SDHA) 等 (Sekalska *et al.*, 2006) (表 1), 这些基因在细胞中参与正常的生命代谢。

2 不同物种和实验条件下内参基因的研究

2.1 不同虫态或发育历期

同一基因在不同种类昆虫中的功能不尽相同, 表达水平也存在较大差异, “看家基因”也不例外。 β -actin 在蓖麻蚕的 4 个虫态期表达稳定 (Chen and Lu, 2014); TBP 在大豆蚜的不同发育历期表达稳定 (Bansal *et al.*, 2012); α -TUB 在棉粉蚧 2 龄若虫和 3 龄若虫期表达稳定 (陈芳, 2014); RPII 可作为柑橘全爪螨不同发育历期的内参基因 (杨丽红等, 2011); RPL18 适合作为温带臭虫不同发育历期的内参基因 (Mamidala *et al.*, 2011)。由于表达量绝对恒定的基因并不存在, 所谓稳定的内参基因仅具有相对性。因此, 选用 2 个或多个内参基因有利于校准目的基因的表达。RPS18 和 α -TUB 组合是朱砂叶螨 4 个不同发育历期的最佳参考基因 (Sun *et al.*, 2010) β -TUB 和 β -actin 可作为金纹细蛾各虫态的内参基因 (郭长宁, 2014); GAPDH 和 UCCR 在斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius) 不同发育历期表达稳定 (Lu *et al.*, 2013)。组合几个“看家基因”作为内参基因最为合适, 需要通过 geNorm 软件评估 $V_n/n+1$ 值 (小于 0.15), 若 n 值等于 3, 则选择 3 个“看家基因”组合较为合适。宋旺 (2015) 等研究表明, RPS、GAPDH 和 α -TUB 在花绒寄甲中表达稳定; PPI、RPII 和 DIMT 在不同发育阶段的棉蚜体内表达稳定 (徐素平, 2014); RP49、EF1 α 和 ACT 适合作为 5 龄沙漠飞蝗幼虫的内参基因 (Van Hiel *et al.*, 2009); ACTIN、GAPDH 和 RP49 适合作为丽蝇

不同发育历期的内参基因 (Cardoso *et al.*, 2014)。内参基因的组合并非都是选择 2 个或 3 个, 若 n 值大于 3, 则需要选择多于 3 个“看家基因”进行组合。Toutges 等 (2010) 研究表明, rps6、rpL13、rps3 和 rps18 组合适合作为赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst) 不同发育时期的内参基因; 18S rRNA、28S rRNA、GST1、 β -TUB 和 RPLPO 适合作为丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen) 不同发育历期的内参基因 (Bagnall and Kotze, 2010); RPS15、RPS11、 α -TUB 和 EF1- α 组合适合作为褐飞虱不同发育历期的内参基因 (Yuan *et al.*, 2014)。虽然内参基因的组合提高了目的基因表达分析的准确性, 但是内参基因组合太多, 会严重增加实验负担。因此, 选择合适的“看家基因”作为候选内参基因至关重要。物种和实验条件均相同, 选择的候选“看家基因”不同, 可能得出的稳定内参基因组合也不同。Lü 等 (2014) 研究表明, RPL32 在柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 不同发育历期表达稳定, 而王刘豪 (2013) 研究表明 α -TUB、RPL32 和 EF1- α 为最佳组合, 另外也有研究表明 UBQ、GAPDH 和 GST 作为柑橘大实蝇各虫态期的内参基因 (王佳等, 2014)。同理, Zhang 等 (2015) 研究表明, 28S rRNA 和 RPS15 适合作为棉铃虫不同发育历期的内参基因, 而 Shakeel 等 (2015) 研究表示 RPL28 和 RPS15 为最佳组合。

综上所述, 昆虫种类不同, 各发育历期内参基因的稳定性组合也不尽相同。

2.2 不同组织

昆虫种类不同, 研究各组织目的基因表达所选择的最佳内参基因组合不尽相同。 β -actin 在粘虫 (李柯等, 2010)、蓖麻蚕 (陈立华等, 2014) 和金纹细蛾成虫 (郭长宁, 2014) 组织中表达稳定; EF-1 α 在白蜡窄吉丁虫组织中表达稳定 (Rajarapu *et al.*, 2012); RPL18 在温带臭虫不同组织中表达稳定 (Mamidala *et al.*, 2011)。由于内参基因的稳定性具有相对性, 目前学术界公认选用 2 个及以上的内参基因进行目的基因标准化。吴家红等 (2011) 研究表明 RSPL40 和 BTF3 适合作为白纹伊蚊不同组织研究的内参基因; 而

ACTB 和 α -TUB 适合作为东方实蝇组织研究的内参基因 (Shen *et al.*, 2010); PPI 和 DIMT 组合是棉蚜不同组织的最优内参基因 (徐素平, 2014); 18S rRNA 和 EF-1 α 适合作为长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* (Stål) 不同组织器官研究的内参基因 (Majerowicz *et al.*, 2011)。同 2.1 所述, 通过 geNorm 软件得出 $V_n/n+1$ 值 (小于 0.15), 评估研究不同组织目的基因表达量应该选择内参基因的个数。Yuan 等 (2014) 研究表明 RPS11、TUB 和 RPS15 组合适合作为褐飞虱组织研究的内参基因; RPL10、AK 和 EF-1 α 适合作为斜纹夜蛾不同组织研究的内参基因 (Lu *et al.*, 2013); 18S rRNA, GAPDH 和 α -TUB 适合作为长红锥蝽唾液腺和体腔内研究的内参基因 (Paim *et al.*, 2012)。

同种昆虫组织不同, 所选择的内参基因也不尽相同。ACT3、GAPDH 和 α -TUB 适合作为家蚕中肠研究的内参基因, α -TUB、UBC 和 TBP 适合作为家蚕脂肪体研究的内参基因, 而 UBC、 α -TUB 和 ACT3 适合作为家蚕马氏管研究的内参基因 (彭然, 2012)。吴玉等 (2013) 研究表明, α -TUB 和 28S rRNA 在家蚕中部丝腺中表达稳定, GAPDH 和 28S rRNA 在后部丝腺中表达稳定, α -TUB 和 UBC 在脂肪体中表达稳定。因此, 也暗示了同种昆虫不同虫态组织的基因研究所选择的内参基因也不能盲目借鉴或套用。Zhang 等 (2015) 研究证实了以上推测, RPS15 和 RPL13 适合作为棉铃虫幼虫组织的内参基因, EF-1 α 和 RPL27 适合作为棉铃虫成虫组织的内参基因。

同种昆虫不同性别, 所选择的内参基因也不尽相同。申光茂等 (2010) 研究表明, α -TUB 和 ACT5 在桔小实蝇雌虫组织中表达稳定, α -TUB 和 ACT3 在雄虫组织中表达稳定; Wang 等 (2014) 研究表明, UBE3 和 RPL22 在茼蒿雌虫中表达稳定, 而 UBE3、TAF5 和 RPL22 在雄虫中表达稳定; 王佳等 (2014) 研究表明 TUB、GAPDH 和 GST 适合作为柑橘大实蝇成虫组织研究的内参基因。

综上所述, 昆虫种类不同, 各组织研究所选用的内参基因不同; 昆虫种类相同, 研究的组织不同所选用的内参基因也不同。因此, 说明内参

基因的选择不能盲目套用, 需要在特定的实验条件下筛选。

2.3 不同温度

检测温度胁迫后目的基因的表达量, 所选择的内参基因也因昆虫种类的不同而不同。随着季节和温度的变化, β -actin 在光滑鳖甲 (孟闪闪等, 2014)、谢氏宽漠王 (唐婷等, 2008) 和黑腹果蝇 (Ponton *et al.*, 2011) 中表达稳定, 而在小胸鳖甲 (孟闪闪等, 2014) 中表达波动较大。同 2.2 所述, 学术界认可选用 2 个及以上的内参基因进行目的基因标准化。通过不同的温度胁迫处理后, Yuan 等 (2014) 认为 RPS15、TUB 和 EF-1 α 在褐飞虱体内表达稳定; α -TUB 和 RPII 在柑橘全爪螨体内表达稳定 (杨丽红, 2011); GAPDH 和 EF-1 α 在斜纹夜蛾体内表达稳定 (Lu *et al.*, 2013)。也同 2.1 所述, 由于不同学者选择“看家基因”的种类不同, 致使同种昆虫同一实验条件下, 筛选出的最佳内参基因组合不尽相同。Zhang 等 (2015) 研究表明, 温度胁迫处理后 RPS15 和 RPL27 在棉铃虫体内表达稳定, 而 Shakeel 等 (2015) 却认为 RPL28 和 RPS15 组合最适合作为温度胁迫棉铃虫研究的内参基因。

2.4 不同菌或病毒胁迫

微生物是影响昆虫体内基因表达非常重要的因素, 不同微生物胁迫后, 昆虫体内基因表达量不尽相同。因此, 目的基因研究时需要针对不同微生物胁迫进行最佳内参基因筛选。Scharlaken 等 (2008) 研究表明, 细菌胁迫后 ACT、RPS18 和 GAPDH 在意大利蜂中表达稳定; 真菌感染后 RPS3, RPS18 和 RPL13 在赤拟谷盗体内表达稳定 (Lord *et al.*, 2010); 病毒感染后 UBI、18S rRNA 和 ACT 在飞虱体内表达稳定 (Maroniche *et al.*, 2011), 而 PPAI、RPL23 和 UBI 适合作为欧洲熊蜂感染 IAPV 病毒研究的内参基因 (Niu *et al.*, 2014), GAPDH、RPL27 和 TUB 组合适合作为棉铃虫感染核型多角体病毒研究的内参基因 (Zhang *et al.*, 2015)。因此, 以上所述再次证实了内参基因的选择不能盲目套用, 需要在特定的实验条件下筛选。

2.5 不同地理种群

地理种群对昆虫的分化影响较大, 同种昆虫在不同地理种群下体内基因表达各异。因此, 进行不同地理种群昆虫目的基因研究时, 需要进行内参基因筛选。Yuan 等 (2014) 表明 TUB、RPS11 和 EF-1 α 适合作为褐飞虱不同地理种群研究的内参基因; RPL10 和 EF-1 α 在不同地理种群的斜纹夜蛾中表达稳定 (Lu *et al.*, 2013)。因此, 暗示不同昆虫在不同地理种群基因研究中, 内参基因的选择也不能盲目借鉴, 需要根据特定的实验条件进行筛选。

2.6 不同药剂处理

目前, 随着农药的大量使用, 昆虫对药剂的抗性表现突出, 抗性产生的机理离不开基因的研究。同时, 抗性也因昆虫种类不同, 基因表达量也不尽相同。甲氰菊酯胁迫二斑叶螨后 α -TUB 表达稳定 (高新菊和沈慧敏, 2011), 而胁迫朱砂叶螨后 RPS18 和 5.8S rRNA 表达稳定 (Sun *et al.*, 2010)。药剂不同, 在昆虫体内作用的靶标也不同, 基因的表达也自然不同。经不同药剂处理后, EF-1 α 和 GAPDH 在柑橘全爪螨品系中表达稳定 (Niu *et al.*, 2012); RPS11、EF-1 α 和 TUB 在褐飞虱中表达稳定 (Yuan *et al.*, 2014); β -actin 和 β -TUB 在金纹细蛾中表达稳定 (郭长宁, 2014); RPS15 和 RPL32 在棉铃虫中表达稳定 (Zhang *et al.*, 2015)。综上研究暗示, 药剂处理可能导致昆虫体内部分“看家基因”发生较大的表达波动, 因此, 研究药剂处理后昆虫目的基因的表达差异, 需要根据药剂和昆虫种类的不同筛选合适的内参基因。

2.7 其它胁迫条件下内参基因选择

关于昆虫内参基因的筛选研究, 除了研究不同虫态、组织、温度、微生物、地理种群和农药处理外, 还有食物、光周期和机械损伤等多种处理, 它们对昆虫体内“看家基因”的表达稳定性并非一致。不同食物饲养后, 褐飞虱体内 RPS15、TUB、RPS11 和 EF-1 α 表达稳定 (Yuan *et al.*, 2014); 黑腹果蝇体 *Drosophila melanogaster* 内

RPL32 和 α -TUB 表达稳定 (Ponton *et al.*, 2011); 水生蚤类体内 Xbp1, Tbp, CAPON 和 Stx16 表达稳定 (Spanier *et al.*, 2010)。另外, 同种昆虫不同胁迫处理后体内“看家基因”的表达稳定性不尽相同, 如棉铃虫, 不同光同期处理对 HSP90 和 TUBB 表达差异较小; 机械损伤对 TUBB 和 GAPDH 表达差异较小; 饥饿对 RPL28 和 RPS15 表达差异较小。

综合上述所有的研究表明: 绝对稳定的“看家基因”并不存在; 物种和实验条件不同, 用于标准化的内参基因有可能不同, 需要在特定条件下重新筛选; 内参基因的稳定性表达具有相对性, 哪些基因可以作为标准化基因, 与筛选内参基因研究中候选“看家基因”的种类有关。另外, 在特定的实验条件下, 哪些“看家基因”表达相对稳定, 哪些“看家基因”组合最理想, 需要有专门的分析软件进行评估。

3 内参基因稳定性评估

特定实验条件下内参基因筛选时, 需要首先对候选“看家基因”进行引物设计, 控制基因片段大小在 80~200 bp 之间。然后, 通过 qRT-PCR 进行引物扩增效率分析, 筛选出扩增效率在 90%~105%, 熔解曲线为单峰, T_m 值 (扩增产物解链温度) 大于 75°C 的引物开展下一步实验 (Tellinghuisen and Spiess, 2014)。目前, 评价内参基因稳定性的方法主要包括 GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)、NormFinder (Jensen and Ørntoft, 2004)、BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) 和 ΔCt 法。Xie 等 (2011) 将这 4 种方法整合成一个网络分析工具——RefFinder, 可以综合评价合适的内参基因。

GeNorm 软件 (下载地址: <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/index.php>) 专门用于分析内参基因的稳定性, 将某一“看家基因”与其它“看家基因”表达水平进行两两比值, 转换为对数后将其平均标准差作为基因表达稳定性的平均值 M , 其中 M 值越小, 稳定性越高 (崔淼等, 2014)。该软件可以筛选不同实验条件下最适内

参基因的数量, 选择出 2 个以上最优组合的内参基因, 有利于减少系统偏差(张艳君等, 2007)。同时, geNorm 软件可以通过 V 值确定所需内参基因的最适数目, 如果 $V_{n/n+1}$ 小于 0.15, 则需要引入 n 个内参基因进行最优组合(Rivera Vega *et al.*, 2012)。

NormFinder 软件(下载地址: <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>)建立在固定的统计学框架上, 通过测定每个基因的稳定性来筛选出合适的内参基因(Ferreira and Cronjé, 2012), 若稳定值越小, 则表示稳定性越好, 最终选择稳定值最小的基因作为内参基因。该程序的不足之处是只能选择 1 个合适的内参基因作为标准(Gao *et al.*, 2012)。

BestKeeper 软件(下载地址: <http://www.gene-quantification.de/best-keeper.html>)可以同时比较 100 个样品中 10 个内参基因和 10 个目标基因的表达水平(Kumar *et al.*, 2011)。原理是比较每个基因之间 Ct 值产生配对的相关系数(r)、变异系数(CV)和标准偏差(SD), 再根据标准偏差和变异系数的大小排序, 其中标准偏差和变异系数越小, 稳定性越好(Zhang *et al.*, 2012)。

以上软件均是通过不同的统计学分析方法筛选合适的内参基因, 但由于它们之间的算法不同, 可能导致分析出的最佳内参基因不尽相同(Wang *et al.*, 2012)。因此, 可以通过 RefFinder 软件进行综合分析, 得出一个综合排名指数, 若指数越小, 说明该内参基因越稳定(Huang *et al.*, 2014)。

4 结语

不同生物样本存在 RNA 产量、质量和反转录效益上较大的差异。因此, 进行基因相对定量研究时, 需要选择合适的“看家基因”作为内参基因进行校正(Borges *et al.*, 2014)。然而, 同种昆虫体内绝对恒定表达的“看家基因”并不存在, 异种昆虫同一组织或相同实验条件下始终恒定表达的“看家基因”也不存在。为了让目标基因获得真实可靠的实验数据, 需要在特定的实验条件下进行内参基因筛选, 不能盲目选择内参基

因。由于不同物种在不同条件下的最佳内参基因往往存在较大差异(Han *et al.*, 2015), 倘若选择不当, 可能导致目标基因产生十几倍、几十倍、上百倍的差异(Iskandar *et al.*, 2004), 甚至相反的结论。比如: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)目标基因表达研究时, 通常采用 ACT 作为内参基因(Li *et al.*, 2011), 然而 Su 等(2013)研究发现, 许多条件下 ACT 在烟粉虱中表达极不稳定。当然, 也存在同种昆虫同种实验条件, 不同学者得出的最佳内参基因不尽相同, 原因是学者们进行内参基因筛选时, 所选用的“看家基因”不同。

目前, 随着基因组测序、基因芯片和 EST 数据库的推动, 内参基因的筛选有了新的途径(Chang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012), 常用“看家基因”可能因表达稳定性差被新的基因逐渐替代, 有助于准确无误地揭示昆虫基因表达的内在规律。然而, 近年来昆虫基因芯片数据和 EST 数据库筛选新内参基因的研究较少, 许多学者仍沿用常用的“看家基因”作为内参。因此, 挖掘新内参基因还需寻找更加精确有效的方法。

参考文献(References)

- Bagnall NH, Kotze AC, 2010. Evaluation of reference genes for real-time PCR quantification of gene expression in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Med. Vet. Entomol.*, 24(2): 176–181.
- Bansal R, Mamidala P, Mian MR, Mittapalli O, Michel AP, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in aphid glycines (Hemiptera:Aphididae). *J. Econ. Entomol.*, 105(4): 1432–1438.
- Borges AF, Fonseca C, Ferreira RB, Lourenco AM, Monteiro S, 2014. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stress in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE*, 9(10): e111399.
- Cao SN, Zhang XW, Ye NH, Fan X, Mou S, Xu D, Wang W, 2012. Evaluation of putative internal reference genes for gene expression normalization in *Nannochloropsis* sp. by quantitative real-time RT-PCR. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 424(1): 118–123.
- Cardoso GA, Matioli CC, de Azeredo-Espin AML, Torres TT, 2014. Selection and validation of reference genes for functional studies in the Calliphoridae family. *J. Insect Sci.*, 14(1): 2.
- Chang CW, Cheng WC, Chen CR, Shu WY, Tsai ML, Huang CL,

- Hsu IC, 2011. Identification of human housekeeping genes and tissue-selective genes by microarray meta-analysis. *PLoS ONE*, 6(7): e22859.
- Chen LH, Zhang YH, He QL, Qian HY, Sun PJ, Li G, Xu AY, 2014. Selection of reference genes for transcription expression analysis in *Phiosamia cynthia ricini*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 37(6): 78–84. [陈立华, 张月华, 何庆玲, 钱荷英, 孙平江, 李刚, 徐安英, 2014. 蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选. 河北农业大学学报, 37(6): 78–84.]
- Chen F, Lu YY, 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.]
- Cui M, Liu XJ, Li T, Guo YP, Ma EB, Zhang JZ, 2014. Selection of reference genes on different days during the development of the fifth-instar nymph of *Locusta migratoria* with quantitative real-time PCR. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(3): 733–740. [崔淼, 刘晓健, 李涛, 郭亚平, 马恩波, 张建珍, 2014. 五龄飞蝗不同发育时间实时定量 PCR 内参基因的筛选. 应用昆虫学报, 51(3): 733–740.]
- Ferdous AS, Islam MT, Alam SS, Khan H, 2015. Identification of stable reference genes for quantitative PCR in jute under different experimental conditions: An essential assessment for gene expression analysis. *Aust. J. Crop Sci.*, 9(7): 646.
- Ferreira E, Cronjé MJ, 2012. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR in apoptosis-induced MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Biotechnol.*, 50(2): 121–128.
- Gao ZH, Wei JH, Yang Y, Zhang Z, Zhao WT, 2012. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis*. *Plant Cell Rep.*, 31(9): 1759–1768.
- Gao XJ, Shen HM, 2011. Resistance selection with fenpropathrin and the change of detoxification enzyme activities in *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 64–69. [高新菊, 沈慧敏, 2011. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性选育及解毒酶活力变化. 昆虫学报, 54(1): 64–69.]
- Guo CN, 2014. Cloning and stability analysis of reference gene from *Phyllonorycter Ringoniella*. Master dissertation. Shanxi :Northwest A & F University. [郭长宁, 2014. 金纹细蛾内参基因克隆分析及稳定性评价. 硕士学位论文. 陕西: 西北农林科技大学.]
- Han GY, Li XM, Zhang T, Zhu X, Li J, 2015. Cloning and tissue-specific expression of a chitin deacetylase gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) and its response to *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Sci.*, 15(1): 95.
- Huang LK, Yan HD, Jiang XM, Zhang Y, Zhang X, Ji Y, Yan Y, 2014. Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in orchardgrass subjected to various abiotic stresses. *Gene*, 553(2): 158–165.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations. *Genes Immun.*, 6(4): 279–284.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM, 2004. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22(4): 325–337.
- Jensen J, Ørntoft T, 2004. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64(15): 5245–5250.
- Khanlou KM, Erik Van Bockstaele E, 2012. A critique of widely used normalization software tools and an alternative method to identify reliable reference genes in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Planta*, 236(5): 1381–1393.
- Kumar V, Sharma R, Trivedi PC, Vyas GK, Khandelwal V, 2011. Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. *Aust. J. Crop Sci.*, 5(11): 1455.
- Li R, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Yang NN, Yang X, Zhou XG, 2013. Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae). *PLoS ONE*, 8(1): e53006.
- Li ZY, Zhu YB, Wang N, Bai H, Dong L, Quan J, 2015. Selection of optimal qRT-PCR reference genes for gene expression studies in foxtail millet. *Indian J. Genet. Pl. Br.*, 75(2): 225–231.
- Li K, Yin H, Xi GS, Lian ZM, 2010. Molecular cloning, sequence analysis and expression detection of β -actin gene in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1089–1094. [李柯, 阴环, 奚耕思, 廉振民, 2010. 粘虫 β -actin 基因 cDNA 的克隆, 序列分析及表达量检测. 昆虫知识, 47(6): 1089–1094.]
- Li JM, Su YL, Gao XL, He J, Liu SS, Wang XW, 2011. Molecular characterization and oxidative stress response of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(3): 118–133.
- 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): e87541.
- Lilly ST, Drummond RSM, Pearson MN, MacDiarmid RM, 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe. Interac.*, 24(3): 294–304.

- Liu Y, Wang N, Zhang Z, Li F, 2012. Application of transcriptome in insect resistance research. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 317–323.[刘莹, 王娜, 张赞, 李飞, 2012. 五种鳞翅目害虫中抗药性相关基因的转录组学分析. 应用昆虫学报, 49(2): 317–323.]
- 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. *J. Microbiol. Methods*, 80(2): 219–221.
- Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, Li J, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera:Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.
- 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. *Fla. Entomol.*, 97(2): 597–604.
- Majerowicz D, Alves-Bezerra M, Logullo R, Fonseca-de-Souza AL, Meyer-Fernandes JR, Braz GRC, 2011. Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). *Insect Mol. Biol.*, 20(6): 713–722.
- Mamidala P, Rajarapu SP, Jones SC, Mittapalli O, 2011. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Cimex lectularius*. *J. Med. Entomol.*, 48(4): 947–951.
- Maroniche GA, Sagadin M, Mongelli VC, Truol GA, del Vas M, 2011. Reference gene selection for gene expression studies using RT-qPCR in virus-infected planthoppers. *Virol. J.*, 8(1): 1.
- Meng SS, Ma WJ, Liu XN, Ma J, 2014. Expression stability of β -actin gene in the desert insects *Microdera punctipennis* and *Anatolica polita*. *Tianjin Agricultural Sciences*, 20(2): 1–6.[孟闪闪, 马文静, 刘小宁, 马纪, 2014. β -actin 基因在荒漠昆虫光滑鳖甲和小胸鳖甲中表达的稳定性研究. 天津农业科学, 20(2): 1–6.]
- Niu JZ, Cappelle K, de Miranda JR, Smagghe G, Meeus I, 2014. Analysis of reference gene stability after Israeli acute paralysis virus infection in bumblebees *Bombus terrestris*. *J. Invertebr. Pathol.*, 115: 76–79.
- Niu JZ, Dou W, Ding TB, Yang LH, Shen GM, Wang JJ, 2012. Evaluation of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during development and abiotic stress in *Panonychus citri* (McGregor) (Acari:Tetranychidae). *Mol. Biol. Rep.*, 39(5): 5841–5849.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA, 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*, 1(3): 1559–1582.
- Omondi BA, Latorre-Estivalis JM, Oliveira IHR, Ignell R, Lorenzo MG, 2015. Evaluation of reference genes for insect olfaction studies. *Parasit Vectors*, 8: 243.
- Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araujo RN, 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BMC Res. Notes*, 5(1): 128.
- Peng R, 2012. Analysis of reference gene expression for real time PCR based on relative quantitative and dual spike-in strategy in the silkworm *Bombyx mori*. Master dissertation. Suzhou: Soochow University. 19–33.[彭然, 2012. 家蚕常用内参基因的稳定性分析及两种实时荧光定量 PCR 方法比较. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学. 19–33.]
- 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. *Biotechnol. Lett.*, 26(6): 509–515.
- 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*. *J. Insect Physiol.*, 57(6): 840–850.
- Rajarapu SP, Mamidala P, Mittapalli O, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*). *Insect Sci.*, 19(1): 41–46.
- Rivera-Vega L, Mamidala P, Koch JL, Mason ME, Mittapalli O, 2012. Evaluation of reference genes for expression studies in ash (*Fraxinus* spp.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 30(1): 242–245.
- Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ, 2008. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *J. Insect Sci.*, 8(1): 33.
- Sekalska B, Ciechanowiec A, Dolegowska B, Narusewicz M, 2006. Optimized RT-PCR method for assaying expression of monocyte chemotactic protein type 1(MCP-1) in rabbit aorta. *Biochem. Genet.*, 44(3/4): 129–139.
- Shakeel M, Zhu X, Kang TH, Wan H, Li J, 2015. Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Asia-Pac. Entomol.*, 18(2): 123–130.
- Shen GM, Jiang HB, Wang XN, Wang JJ, 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera:

- Tephritidae). *BMC Mol. Biol.*, 11(1): 76.
- Song W, Wang XJ, Guo RJ, Zhang W, Zhang ZQ, Li ML, 2015. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Dastarcus helophoroides*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 24(2): 156–161.[宋旺, 王小纪, 郭瑞坚, 张伟, 张正青, 李孟楼, 2015. 花绒寄甲荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. *西北农业学报*, 24(2): 156–161.]
- Spanier KI, Leese F, Mayer C, Colbourne JK, Gilbert D, Pfrender ME, Tollrian R, 2010. Predator-induced defences in *Daphnia pulex*: Selection and evaluation of internal reference genes for gene expression studies with real-time PCR. *BMC Mol. Biol.*, 11(1): 1.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR, 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29(2): 332–337.
- Su YL, He WB, Wang J, Li JM, Liu SS, Wang XW, 2013. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in the Mediterranean species of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex. *J. Econ. Entomol.*, 106(3): 1446–1455.
- Sun W, Jin Y, He L, Lu WC, Li M, 2010. Suitable reference gene selection for different strains and developmental stages of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*, using quantitative real-time PCR. *J. Insect Sci.*, 10(1): 208.
- Tang T, Liu FS, Ren GD, 2008. Cloning, characterization and expression detection of the β -actin cDNA from *Mantichorula semenowi* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(11): 1210–1215.[唐婷, 柳峰松, 任国栋, 2008. 谢氏宽漠王 β -actin 基因 cDNA 克隆、序列分析及表达量检测. *昆虫学报*, 51(11): 1210–1215.]
- Tellinghuisen J, Spiess AN, 2014. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. *Anal. Biochem.*, 449: 76–82.
- Teng XL, Zhang Z, He GL, Yang L, Li F, 2012. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects. *J. Insect Sci.*, 12(1): 60.
- Toutges MJ, Hartzer K, Lord J, Oppert B, 2010. Evaluation of reference genes for quantitative polymerase chain reaction across life cycle stages and tissue types of *Tribolium castaneum*. *J. Agr. Food Chem.*, 58(16): 8948–8951.
- 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 Biol.*, 3(7): 1–12.
- Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Simonet G, 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Mol. Biol.*, 10(1): 56.
- Wan HJ, Zhao ZG, Qian CT, Sui Y, Malik AA, Chen J, 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.*, 399(2): 257–261.
- Wang J, Zhao J, Liu YH, 2014. Evaluation of endogenous reference genes in *Bactrocera mina* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(12): 1375–1380.[王佳, 赵静, 刘映红, 2014. 柑橘大实蝇内参基因的评估. *昆虫学报*, 57(12): 1375–1380.]
- Wang Y, Wang ZK, Huang Y, Liao YF, Yin YP, 2014. Identification of suitable reference genes for gene expression studies by qRT-PCR in the blister beetle *Mylabris cichorii*. *J. Insect Sci.*, 14(1): 94.
- Wang Q, Ishikawa T, Michiue T, Zhu BL, Guan DW, Maeda H, 2012. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. *Int. J. Legal. Med.*, 126(6): 943–952.
- Wang LH, 2013. The transcriptome sequencing and diapause related gene-cloning research of *Bactrocera Minax*. Master dissertation. Luoyang: Henan Institute of Science and Technology.[王刘豪, 2013. 柑橘大实蝇转录组测序和滞育相关基因克隆研究. 硕士学位论文. 洛阳: 河南科技学院.]
- Wu JH, Cheng JZ, Sun Y, Chen L, 2011. Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in *Aedes albopictus*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 27(5): 432–435.[吴家红, 程金芝, 孙宇, 陈璐, 2011. 白纹伊蚊基因表达定量 PCR 内参基因的选择. *中国人兽共患病学报*, 27(5): 432–435.]
- Wu Y, Zhai YF, Huang MX, Zhao GD, Li B, Wei ZG, Shen, WD, 2013. The expression stability analysis of commonly used reference genes and research on the expression regulation of silk protein related genes in *Bombyx mori*. *Chinese Journal of Cell Biology*, 35(4): 423–431.[吴玉, 翟渊粉, 黄明霞, 赵国栋, 李兵, 卫正国, 沈卫德, 2013. 家蚕常用内参基因稳定性分析及丝蛋白相关基因表达调控研究. *中国细胞生物学学报*, 35(4): 423–431.]
- Xie F, Sun G, Stiller JW, Zhang B, 2011. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS ONE*, 6(11): e26980.
- Xu SP, 2014. Cloning and expression analysis of odorant binding proteins in *Aphis Gossypii* Glover. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University.[徐素平, 2014. 棉蚜气味结合蛋白基因克隆和表达分析. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]

- Yang LH, 2011. Study on mechanisms of *Panonychus citri* (McGregor) in response to thermal stress. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. 99–106. [杨丽红, 2011. 柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 对热胁迫的响应机制研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Yeap WC, Loo JM, Wong YC, Kulaveerasingam H, 2014. Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR gene expression normalization in reproductive, vegetative tissues and during fruit development in oil palm. *PCTOC*, 116(1): 55–66.
- Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Li J, 2014. 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*, 9(1): e86503.
- Zhang SD, An SH, Li Z, Wu F, Yang Q, Liu Y, Liu X, 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402.
- 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. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 34(5): 546–550. [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 L, Cao YL, Liu X, Wu G, Wu Y, Lu C, 2012. In-depth analysis of the endogenous reference genes used in the quantitative PCR detection systems for rice. *Eur. Food Res. Technol.*, 234(6): 981–993.