

Expression Stability Analysis of Internal Reference Genes in Insect States of *Euzophera pyriella*

Guanghuang Ma¹, Ping Fu¹, Yan Sun¹, Shuyuan Kang¹, Minglu Yang^{1,2}

¹College of Plant Science, Tarim University, Alar Xinjiang

²Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Alar, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Alar Xinjiang

Email: ymlzkytd@163.com

Received: May 28th, 2019; accepted: June 12th, 2019; published: June 19th, 2019

Abstract

Euzophera pyriella is one of the important pests in forestry and fruit trees in Xinjiang. In order to study the expression of some genes in this pest, 5 candidate internal reference genes such as β -actin, 18s rRNA, UBQ, GAPDH and β -tub were selected as the research objects. The relative expression of candidate internal reference genes was analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The expression stability was evaluated by Delta Ct, GeNorm, BestKeeper, NormFinder and RefFinder software or methods. The results showed that 18s rRNA and UBQ genes had good stability in insect states of *Euzophera pyriella*, and only BestKeeper software analyzed UBQ gene stability slightly better than 18s rRNA, followed by TUB and β -Actin, GAPDH expression stability was the worst.

Keywords

Euzophera Pyriella, Internal Reference Genes, Real Time Fluorescence PCR

香梨优斑螟不同虫态内参基因稳定性分析

马光皇¹, 符平¹, 孙妍¹, 康淑媛¹, 杨明禄^{1,2}

¹塔里木大学, 新疆 阿拉尔

²农业农村部阿拉尔作物有害生物科学观测站, 新疆 阿拉尔

Email: ymlzkytd@163.com

收稿日期: 2019年5月28日; 录用日期: 2019年6月12日; 发布日期: 2019年6月19日

摘要

香梨优斑螟是新疆危害林果的重要害虫之一,为研究该害虫某些基因的表达情况,选取 β -actin、18s rRNA、UBQ、GAPDH和 β -tub等5种候选内参基因为研究对象,利用实时荧光定量PCR技术分析候选内参基因相对表达情况,以Delta Ct、GeNorm、BestKeeper、NormFinder和RefFinder软件或方法评价表达稳定性。结果发现:18s rRNA和UBQ基因在香梨优斑螟不同虫态中稳定性较好,只有BestKeeper软件分析UBQ基因稳定性略好于18s rRNA,其次是TUB和 β -Actin, GAPDH表达稳定性最差。

关键词

香梨优斑螟, 内参基因, 实时荧光PCR

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

香梨优斑螟(*Euzophera pyriella*)属鳞翅目螟蛾科,是新疆林果业上的重要害虫之一[1],主要分布在新疆塔城、博乐、伊宁、昌吉、哈密、叶鲁番、库尔勒和阿克苏等地,主要寄主有梨、苹果、无花果、枣、杏、巴旦杏、桃等[2]。部分产区被害率高达50%,危害严重的甚至会造成树体死亡,在阿克苏地区5年以上香梨园内香梨优斑螟危害株率达100%,常造成严重的经济损失[3][4]。虽然香梨优斑螟在新疆是受到关注的害虫,但其发现时间较晚[5],基因功能方面研究不够深入,在内参基因选择上还没有文献报道。

香梨优斑螟不同发育时期代谢差异很大,为了研究其目标基因的表达水平,选择 β -actin、18s rRNA、UBQ、GAPDH和 β -tub等5种管家基因[6],参考实验室转录组数据库对应基因序列设计引物,以实时荧光PCR方法检测其在不同虫态表达的相对稳定性。

2. 材料与方法

2.1. 试虫

香梨优斑螟2017年5~6月采自塔里木大学校园果园,幼虫、蛹直接采集于梨树树干受害处,成虫是蛹室内羽化后收集,样品放入-80℃超低温冰箱保存备用。

2.2. 试剂

总RNA提取Trizol试剂、cDNA第一链合成HiFiScript试剂盒、SGExcel UltraSYBR Mixture试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)、三氯甲烷、75%乙醇及无RNase水。

2.3. 研究方法

2.3.1. 香梨优斑螟总RNA提取

香梨优斑螟不同虫态(雌或雄)样品单头作一处理,每处理设置三次重复。将样品放入2 ml离心管中,再加入1 ml TRIzol及2颗皓珠,置于组织研磨机中,设置50 Hz、60 S进行研磨,室温放置5 min;将0.2 ml三氯甲烷加入离心管中,剧烈震荡15秒,室温放置2~3分钟;4℃、12,000 rpm离心15 min,将

水相(约 0.6 ml)转移到 RNase-free 离心管; 然后加入 0.6 ml 异丙醇, 颠倒混匀, 室温下放置 10 min; 4℃、12,000 rpm 离心 10 min, 丢弃上清液; 离心管中加入 75% 乙醇 1 ml, 洗涤沉淀; 4℃、12,000 rpm 离心 3 min, 小心吸取上清液; 室温放置 3 分钟, 晾干; 加入 50 μL RNase-free 水, 充分溶解 RNA, 将 RNA 保存在 -80℃ 超低温冰箱备用或直接用于 cDNA 合成。

2.3.2. 香梨优斑螟总 RNA 检测

吸取 1 μL RNA 溶液在微量核酸测量仪检测 RNA 浓度, 利用 1% 的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。

2.3.3. 第一链 cDNA 的合成

根据 cDNA 第一链合成 HiFiScript 试剂盒进行操作, 逆转录产物置于 -20℃ 冰箱保存。

2.3.4. 候选内参基因的选择及引物设计

利用 primer 6.0 设计根据相应基因序列片段候选内参基因引物, 基因序列来源于实验室香梨优斑螟转录组数据库, 内参基因引物由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1)。

Table 1. General information of primer sets designed based on the gene

表 1. 候选内参基因引物信息列表

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增长度/bp
18s rRNA	ACCAGTGATGGGATGAGTGC	ATGCGATCGGCAAAAGTTATC	107
β -tub	TTCTTGATGGCGGTCGAGTTG	AAGGAGGTTGACGAGCAGATGC	159
GAPDH	CTCCACTCACGGTCGCTTCAA	TGAGCCGATGCCTTGCTGTG	183
UBQ	AGGTCGAGCCCTCCGATACCAT	GACAGAGTGCGGCCATCTTCCA	124
β -actin	GCTATGTCGCCCTGGACTT	AGAAGGAAGGCTGGAAGAGG	150

2.3.5. 实时荧光 PCR 扩增

cDNA 稀释十倍后作为 PCR 反应模板, 采用 SGExcel UltraSYBR Mixture 试剂盒, 反应体系为 25 μL, 其中 cDNA 1 μL, Mixture 12.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, ddH₂O 至 25 μL。

反应条件为预变性 95℃ 10 min; 变性 95℃ 15 s, 60℃ 延伸和退火 30 s, 40 个循环。

2.4. 数据分析

利用 Excel 将不同虫态或性别样品获得 Ct 值根据软件需求格式整理, 采用 BestKeeper [7]、NormFinder [8]、GeNorm [9]、Delta Ct [10] 和 RefFinder [11] 方法分析候选内参基因的稳定性。

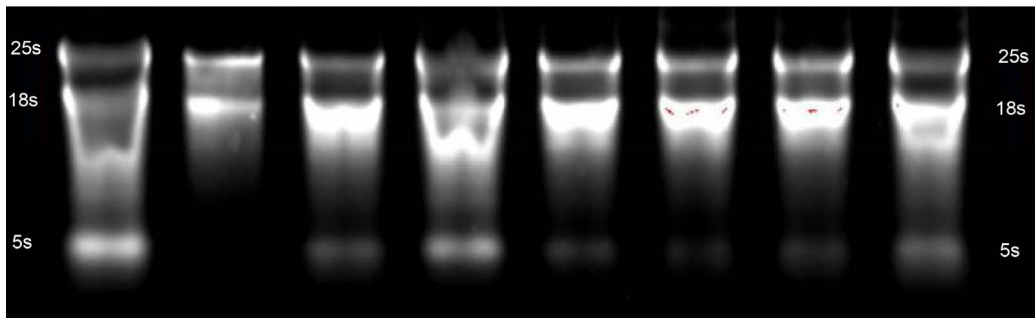
3. 结果与分析

3.1. 总 RNA 完整性分析

微量核酸测量仪测定总 RNA 浓度显示香梨优斑螟总 RNA 的 A260/A280 平均值为 1.98, 1.0% 琼脂糖非变性凝胶电泳呈现条带中 18S 条带最亮, 表明所提取 RNA 完整性较好(图 1)。

3.2. 内参基因表达分析

由 6 种内参基因在香梨优斑螟雌雄的低龄幼虫、大龄幼虫、蛹和成虫中的 Ct 值在 8.97~33.80 之间, 其中 16S rRNA 基因的表达丰度(Ct 值为 8.97~15.87)明显高于其他候选内参基因, GAPDH 基因的表达丰度(Ct 值为 16.6~33.8)波动最大。



注：从左至右分 1~2 为低龄雌幼虫，3~5 是雄成虫，6~8 为蛹。

Figure 1. Extraction of total RNA agarose electrophoresis from
图 1. 香梨优斑螟提取总 RNA 琼脂糖电泳图

根据 Delta Ct、BestKeeper、GeNorm、NormFinder 和 RefFinder 方法对 RT-qPCR 数据进行候选内参的稳定性综合评价。采用 Delta CT 法以标准差的大小对基因的表达稳定性进行排序，候选基因稳定性由高到低为 18s rRNA > UBQ > β -tub > β -actin > GAPDH，在香梨优斑螟不同发育阶段 18S 的表达稳定性是最高的，但各基因表达的 Delta CT 标准差变化不大(图 2(A))。以 geNorm 分析的候选内参基因在不同样品中的表达稳定性(M)在 2.22-4.06 之间，M 值均大于 1.5，不符合表达稳定性要求(图 2(C))。NormFinder 分析结果是 18s rRNA 内参基因表达最稳定，其次是 UBQ 内参基因(图 2(D))，而 BestKeeper 分析发现 UBQ 内参基因表达最稳定，其次是 18s rRNA 内参基因(图 2(B))。利用 RefFinder 综合分析排名为 18s rRNA > UBQ > β -tub > β -actin > GAPDH (图 2(E))。

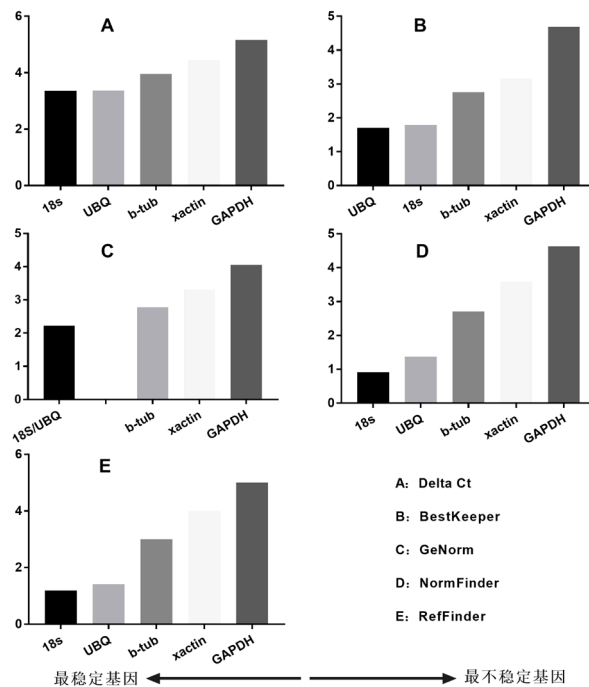


Figure 2. Expression stability analysis of internal reference genes of *Euzyophera pyriella* in insect states
图 2. 内参基因在香梨优斑螟不同虫态表达稳定性

4. 结论与讨论

所选择内参基因一般是受环境因素或不同处理之表达水平相对稳定的管家基因[12]，其表达量或在基

因组中的拷贝数接近恒定。由于内参基因在不同组织及试验条件下表达水平有差异,因此需要选择不同的管家基因作为内参[13],理想的内参基因 Ct 值常介于 15~30 之间[14]。蓖麻蚕幼虫、蛹、成虫、卵各发育时期的 β -actin 表达稳定[15],在香梨优斑螟的各虫态中 β -actin 基因稳定性较差,而与丝光绿蝇不同历期和纹细蛾成虫不同组织研究结果相似,认为 18S rRNA 基因可以作为内参基因[16] [17]。综合评价认为香梨优斑螟在不同发育历期和性别方面的基因稳定性为 18s rRNA > UBQ > β -tub > β -actin > GAPDH。

基金项目

国家大学生创新项目(项目编号: 201610757008)和国家自然科学基金(项目编号: 31560512)资助。

参考文献

- [1] 杨明禄,熊仁次. 香梨优斑螟大发生原因与综合防治[J]. 落叶果树, 2009, 41(4): 28-30.
- [2] 宋美杰,周娜丽,邢虎田,邢虎田,粟素芬,肖飞. 香梨优斑螟发生规律及防治研究[J]. 新疆农业科学, 1998(1): 22-24.
- [3] 梅闯,钟仕荣,马兰菊. 香梨优斑螟危害调查及其空间分布格局研究[J]. 新疆农业大学学报, 2010, 33(5): 405-408.
- [4] 侯世星,刘兵,温俊宝,庞华,孙世国. 香梨优斑螟在库尔勒香梨园中的空间分布[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2013, 37(6): 41-46.
- [5] 杨集昆. 库尔勒香梨优斑螟新种记述[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(6): 560-562.
- [6] 史彩华,胡静荣,李传仁,王文凯. 内参基因在昆虫 qRT-PCR 中的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 1-7.
- [7] Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. (2004) Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper—EXCEL-Based Tool Using Pair-Wise Correlations. *Biotechnology Letters*, **26**, 509-515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- [8] Andersen, C.L., Jensen, J.L. and Orntoft, T.F. (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**, 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- [9] Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D. and Speleman, F. (2002) Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biology*, **3**, research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- [10] Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S.L. (2006) Selection of Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Reticulocytes Using Real-Time PCR. *BMC Molecular Biology*, **7**, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- [11] Xie, F.L., Sun, G.L., Stiller, J.W. and Zhang, B. (2011) Genome-Wide Functional Analysis of the Cotton Transcriptome by Creating an Integrated EST Database. *PLoS ONE*, **6**, e26980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026980>
- [12] Wanchin, Y., Jiamayne, L., Yickching, W. and Kulaveerasingam, H. (2014) Evaluation of Suitable Reference Genes for qT-PCR Gene Expression Normalization in Reproductive, Vegetative Tissues and during Fruit Development in Oil Palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **116**, 55-66. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0382-3>
- [13] Teng, X., Zhang, Z., He, G., Yang, L. and Li, F. (2012) Validation of Reference Genes for Quantitative Expression Analysis by Real-Time rt-pcr in Four Lepidopteran Insects. *Journal of Insect Science*, **12**, 1-17. <https://doi.org/10.1673/031.012.6001>
- [14] Wan, H.J., Zhao, Z.G., Qian, C.T., Sui, Y., Malik, A.A. and Chen, J.F. (2010). Selection of Appropriate Reference Genes for Gene Expression Studies by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction in Cucumber. *Analytical Biochemistry*, **399**, 257-261. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.008>
- [15] 陈立华,张月华,何庆玲,钱荷英,孙平江,李刚. 蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选[J]. 河北农业大学学报, 2014(6): 78-84.
- [16] 郭长宁. 金纹细蛾内参基因克隆分析及稳定性评价[D]: [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 32-49.
- [17] Bagnall, N.H. and Kotze, A.C. (2010) Evaluation of Reference Genes for Real-Time PCR Quantification of Gene Expression in the Australian Sheep Blowfly, *Lucilia cuprina*. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 176-181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00866.x>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjas@hanspub.org