

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

吴 玉^{1,2} 翟渊粉^{1,2} 黄明霞^{1,2} 赵国栋^{1,2} 李 兵^{1,2,3} 卫正国^{1,2,3} 沈卫德^{1,2,3*}

(¹苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123; ²现代丝绸国家工程实验室, 苏州 215123;

³苏州大学蚕桑研究所, 苏州 215123)

摘要 按照MIQE规则检测了家蚕7种常用内参基因(*Actin3*、*GAPDH*、*28SrRNA*、*RPL3*、*α-Tubulin*、*UBC*和*TBP*)正常条件下的不同发育时期及蜕皮激素诱导条件下在不同组织的转录表达水平, 并利用标准化分析软件geNorm和NormFinder进行稳定性分析, 找到了不同实验条件下在不同组织中相对稳定表达的基因。利用筛选出的内参基因检测了*Fib-H*和*SGF-I*基因在家蚕后部丝腺, *Ser-I*和*SGF-I*基因在中部丝腺, *Fib-H*和*SGF-I*基因在脂肪体组织中的转录水平变化, 通过比较组织间的转录水平, 分析蚕体组织以及*Fib-H*、*Ser-I*、*SGF-I*基因在蜕皮激素诱导后的表达调控特征。

关键词 实时荧光定量PCR; MIQE; 内参基因; 标准化; 家蚕

The Expression Stability Analysis of Commonly Used Reference Genes and Research on the Expression Regulation of Silk Protein Related Genes in *Bombyx mori*

Wu Yu^{1,2}, Zhai Yuanfen^{1,2}, Huang Mingxia^{1,2}, Zhao Guodong^{1,2}, Li Bing^{1,2,3}, Wei Zhengguo^{1,2,3}, Shen Weide^{1,2,3*}

(¹School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China; ²National Engineering Laboratory of Modern Silk, Suzhou 215123, China; ³Institute of Sericulture, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract In this study, the expression level of seven commonly used reference genes (*Actin3*, *GAPDH*, *28SrRNA*, *RPL3*, *α-Tubulin*, *UBC* and *TBP*) were detected at different development time points and in response to treatment with 20-Hydroxyecdysone (20E) according to MIQE. The expression stability was analyzed using geNorm and NormFinder program. Significant variations were found among normal tissues and between experimentally treated tissues. We found that the most stable reference genes were different among the different tissues and between the different treatments. The selection of reference genes is critical for expression studies and depends on the experimental system. For this purpose, seven candidate reference genes were investigated. Furthermore, we used the RT-PCR technique to measure the transcriptional level of *Fib-H*, *SGF-I* and *Ser-I* in the posterior silk gland, middle silk gland and fat body of *Bombyx mori*^{5th} instar larvae fed on mulberry leaves that were immersed in ecdysone solution. Through the comparison of the transcriptional level between the tissues, we analyzed the expression regulation characteristics of silkworm larvae tissues and the *Fib-H*, *SGF-I* and *Ser-I* gene in molting hormone metabolic process.

Key words Real-time quantitative PCR; MIQE; reference gene; normalization; Silkworm *Bombyx mori*

收稿日期: 2012-12-03 接受日期: 2012-12-26

现代农业产业技术体系专项(批准号: CARS-22)和江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(批准号: CXZZ11-0108)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0512-65880182, E-mail: shenwd@suda.edu.cn

Received: December 3, 2012 Accepted: December 26, 2012

This work was supported by the Foundation of Post Scientist in National Sericultural System (Grant No.CARS-22) and Graduate Student Innovation Project of Jiangsu Province (Grant No.CXZZ11-0108)

*Corresponding author. Tel: +86-512-65880182, E-mail: shenwd@suda.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-20 14:06 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130320.1406.001.html

基因表达分析在生命科学研究领域中变得日趋重要,实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)具有定量准确、灵敏度高、重复性好等特点,已被广泛应用于基因的表达分析研究^[1-2]。按照参照系的不同,RT-PCR可分为内参法和双跟踪荧光定量PCR,其中双跟踪荧光定量PCR采用双外源参照基因进行校正,避免了内参基因表达不稳定的问题,并在数据处理中消除了使用不同内参引物带来扩增效率的不同等问题,从而使实验结果更加准确,但由于实验操作上需要同时检测DNA和RNA而使工作量有一定增加。

采用内参法RT-PCR检测结果会受到实验设计、引物、模板质量、内参的选择及数据分析等多个因素的影响,规范实验设计及操作是得到可靠结论的前提和必要条件^[3-6]。为此,国际推出了一套指导方针MIQE(minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments),对RT-PCR的实验和发表文章所必需信息提出了最低限度的标准^[7]。MIQE对RT-PCR的过程做了详尽的阐述,以此来规范实验操作,可以提高研究者对实验结果的可信度,增强实验的透明度,促进实验室之间的一致性^[8-11]。

本工作按照MIQE的方法,对于内参基因如果没有合适的标准化处理,随意或是盲目地使用某个基因作为内参基因,目的基因的表达将会被误导,甚至得出相反的结论^[12-14]。在研究中一般使用标准化分析软件geNorm和NormFinder对给定内参基因的稳定性进行分析^[15-16]。在本文的研究中,我们以家蚕为研究对象,按照MIQE方法检测了家蚕7种常用内参基因:肌动蛋白(*Actin3*)、28S核糖体RNA(*28S rRNA*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)、核糖体蛋白L3(*RPL3*)、 α -微管蛋白(α -*Tubulin*, α -*Tua*)、TATA盒结合蛋白(*TBP*)、泛素结合蛋白(*UBC*)在正常条件下的不同发育时期及蜕皮激素诱导条件下在不同组织的转录表达水平,并利用标准化分析软件geNorm和NormFinder进行内参基因稳定性分析,筛选出在不同实验条件下不同组织中相对稳定表达的基因。利用筛选出的内参基因检测蜕皮激素诱导下丝素重链基因(*Fib-H*)、丝腺因子-1基因(*SGF-1*)在家蚕后部丝腺、丝胶基因-1(*Ser-1*)、*SGF-1*在中部丝腺、*Fib-H*、*SGF-1*基因在脂肪体组织中的表达变化,通过比较组织间的转录水平,分析蚕体组织以及*Fib-H*、*Ser-1*、*SGF-1*基因在蜕皮激素诱导后的作用与表达调控特征。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

1.1.1 材料 家蚕品种大造,本研究室保存。26 °C±1 °C、RH 60%~75%条件下桑叶育。正常组即正常桑叶饲养的家蚕幼虫。从5龄第1天开始取材,至5龄第7天为止,共7天,每10头为一小组。分别取每一天家蚕幼虫的中部丝腺、后部丝腺和脂肪体组织,用PBS冲洗后贮存在-70 °C备用。刺激组采用添食法处理,配制 2×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蜕皮激素溶液浸泡桑叶^[17],自然晾干,喂食5龄第2天的家蚕,2 h后换用正常桑叶。对照组则用等量的纯净水。每10头蚕为一小组,取添食蜕皮激素后0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h家蚕5龄幼虫的中部丝腺、后部丝腺和脂肪体组织;另设0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h不添食蜕皮激素处理的家蚕为对照组,同样取幼虫的中部丝腺,后部丝腺和脂肪体组织。用PBS冲洗后贮存在-70 °C备用。

1.1.2 主要试剂 蜕皮激素溶液(20-羟基蜕皮甾酮, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$)由江苏牧王药业有限公司提供;TRNzol Total RNA Reagent由天根生化科技(北京)有限公司提供;DNase I、M-MLV反转录酶、RNase Inhibitor、SYBR Premix Ex Taq™等由TaKaRa公司提供;引物、异丙醇(isopropanol)和DEPC H₂O由上海生工生物工程技术服务有限公司提供;三氯甲烷(trichloromethane)由南京化学试剂有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 家蚕组织总RNA的提取及cDNA第1链的合成 总RNA的提取:参照MIQE法则以保证准确的实时荧光定量结果^[7]。在冰上解剖各样本的组织器官,取约100 mg组织加1 mL TRNzol液在液氮中研磨成粉末,在室温下放置5 min;4 °C下12 000 r/min离心15 min;上清液按每毫升TRNzol液加入0.2 mL氯仿,剧烈振荡,室温放置2~3 min,4 °C下12 000 r/min离心15 min,使离心管内液体分成3层,上层为含RNA的水相,中间为DNA,下层为含蛋白质的有机相;取上清液,按每毫升TRNzol液加入0.5 mL异丙醇,颠倒混匀,室温放置10 min,4 °C下12 000 r/min离心15 min,弃上清液;按每毫升TRNzol液加入1 mL 75% DEPC乙醇,颠倒混匀,4 °C下5 000 r/min离心5 min,弃上清液;室温干燥,看到白色沉淀变成半透明后加入20 mL DEPC H₂O溶解,用DNase I处理,保存在-70 °C中。使用RNase-free DNase I(TaKaRa公司)处理RNA,降解DNA防止污染,并用离心柱纯化RNA。所有RNA样

品在紫外分光光度计(Nanodrop ND-1000)下测定其260/280 nm的吸收比率, 范围在1.8~2.0, 以确保待检测RNA浓度、纯度及完整性。

反转录过程参照PrimeScript反转录试剂盒(TaKaRa公司)说明, 制备足够量的cDNA满足所选基因模板需要, 产物用作定量PCR的模板。反应体系: 5×PrimeScript™ Buffer(for Real-time) 2 μL; PrimeScript™ RT Enzyme Mix×1, 0.5 μL; Oligo dT Primer(50 μmol/L) 0.5 μL; Random 6 mers(100 μmol/L) 0.5 μL; 模板RNA加入2 μL; 总体积10 μL。反转录后的cDNA在紫外分光光度计下测其 $D_{260/280}$ 值, 然后稀释10倍作为定量模板, 保存于-20 °C。

1.2.2 引物设计与合成 使用Primer5.0 软件设计引物, 实验所用的引物登录号及引物序列见表1。

1.2.3 RT-PCR RT-PCR反应采用荧光染料SYBR Green I在ABI Prism 7300上进行。PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq(2×) 10 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL, 下游引物(10 μmol/L) 0.4 μL, ROX Reference Dye(50×) 0.4 μL, 模板 2.0 μL, dH₂O 6.8 μL, 总体系 20 μL。两步法PCR扩增程序: 50 °C 2 min; 95 °C 预变性1 min; 95 °C 15 s, 60 °C 31 s, 45个循环。每个

样品重复测定3次。

1.2.4 标准曲线制作 将基因*Actin3*稀释成不同的浓度梯度, 利用RT-PCR测定*Actin3*的Ct值, 绘制得到标准曲线。各基因的标准曲线方程见表2。

1.2.5 数据计算及分析 RT-PCR的结果数据用仪器自带的Sequence detection software version 1.3.1软件处理, 内参基因标准化参照geNorm和NormFinder软件使用说明^[18-19]。

表2 基因标准曲线方程

Table 2 Standard curves equation for genes

基因 Gene	标准曲线方程 The equation of standard curves	斜率 Slope	回归系数 Regression coefficient
<i>Actin3</i>	$y = -3.259x + 34.805$	-3.26	0.998
<i>GAPDH</i>	$y = -3.182x + 33.010$	-3.18	0.995
<i>28SrRNA</i>	$y = -3.224x + 34.242$	-3.22	0.986
<i>α-Tua</i>	$y = -3.464x + 35.832$	-3.46	0.997
<i>RPL3</i>	$y = -3.391x + 32.693$	-3.39	0.986
<i>UBC</i>	$y = -3.317x + 35.545$	-3.31	0.986
<i>TBP</i>	$y = -3.552x + 36.006$	-3.55	0.997
<i>Fib-H</i>	$y = -3.087x + 36.828$	-3.09	0.999
<i>SGF-1</i>	$y = -2.917x + 35.071$	-2.92	0.997
<i>Ser-1</i>	$y = -3.329x + 37.100$	-2.90	0.997

表1 实时荧光定量PCR的检测基因和内参照基因的引物

Table 1 Primer pairs for real-time fluorescent quantitative PCR to detect transcriptions of target and internal reference genes

基因名称 Target gene	中文全称 Chinese name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	登录号 Accession number	扩增子 Amplicon size
<i>Actin3</i>	肌动蛋白	CGG CTA CTC GTT CAC TAC C CCG TCG GGA AGT TCG TAA G	U49854	147 bp
<i>28SrRNA</i>	28S核糖体RNA	CCC AGT GCT CTG AAT GTC AAC AGA TAG GGA CAG TGG GAA TCT C	AY038991	150 bp
<i>GAPDH</i>	3-磷酸甘油醛脱氢酶	TGT TGA GGG CTT GAT GAC ACC TTA CCC ACA GCT TTG	NM_001043921	150 bp
<i>RPL3</i>	核糖体蛋白L3	GAA GAT GAT CCG CTA CTG T TAT CCT TTG CCC TTG GTG	AY769270	231 bp
<i>α-Tua</i>	α-微管蛋白	CTC CCT CCT CCA TAC CCT ATC AAC TAC CAG CCA CCC	NM_001043419	186 bp
<i>TBP</i>	TATA盒结合蛋白	GGT TGT GCC TGG GAC TGT CAC TCA CCC GAA GTT TCC	NM_001043594	179 bp
<i>UBC</i>	泛素结合蛋白	GTG TCC GCA CTT TGT CTT ACC TTC CCT TCG CAT TCT	AF308163	115 bp
<i>Fib-H</i>	丝素重链基因	ACA AGG TGC AGG AAG TGC AGC AAT TCA CAC AAG GCA GT	NM_001113262.1	155 bp
<i>SGF-1</i>	丝腺因子-1基因	TAC CAG TCG CCG CTG TA AGA TTG TCG GGT TGT GC	NM_001043864.1	149 bp
<i>Ser1</i>	丝胶基因-1	CAC TTT GAT TGC GTT GG CTG CTC TAC GGA CTT GG	NM_001044041.1	160 bp

2 结果

2.1 正常条件下内参基因的稳定性

采用RT-PCR检测了七种内参基因在家蚕5龄第1天至第7天的表达水平, 然后使用内参基因稳定性分析软件geNorm和NormFinder对内参基因的稳定性进行评估。如图1A所示: 在不同组织中相对稳定的基因是不同的, 其中 α -Tubulin、GAPDH在中部丝腺; GAPDH、UBC在后部丝腺; α -Tubulin、UBC在脂肪体组织中表达相对较为稳定。

另外, 使用geNorm软件通过对内参基因标准化因子的配对差异分析来判断所需合适内参基因的数目, 如图2所示: 三种组织(即中部丝腺、后部丝腺、脂肪体)的 $V_{2/3}$ 都小于0.15, 说明在正常条件下的三个组织中, 实时荧光定量PCR选用2个内参照基因就可以了。

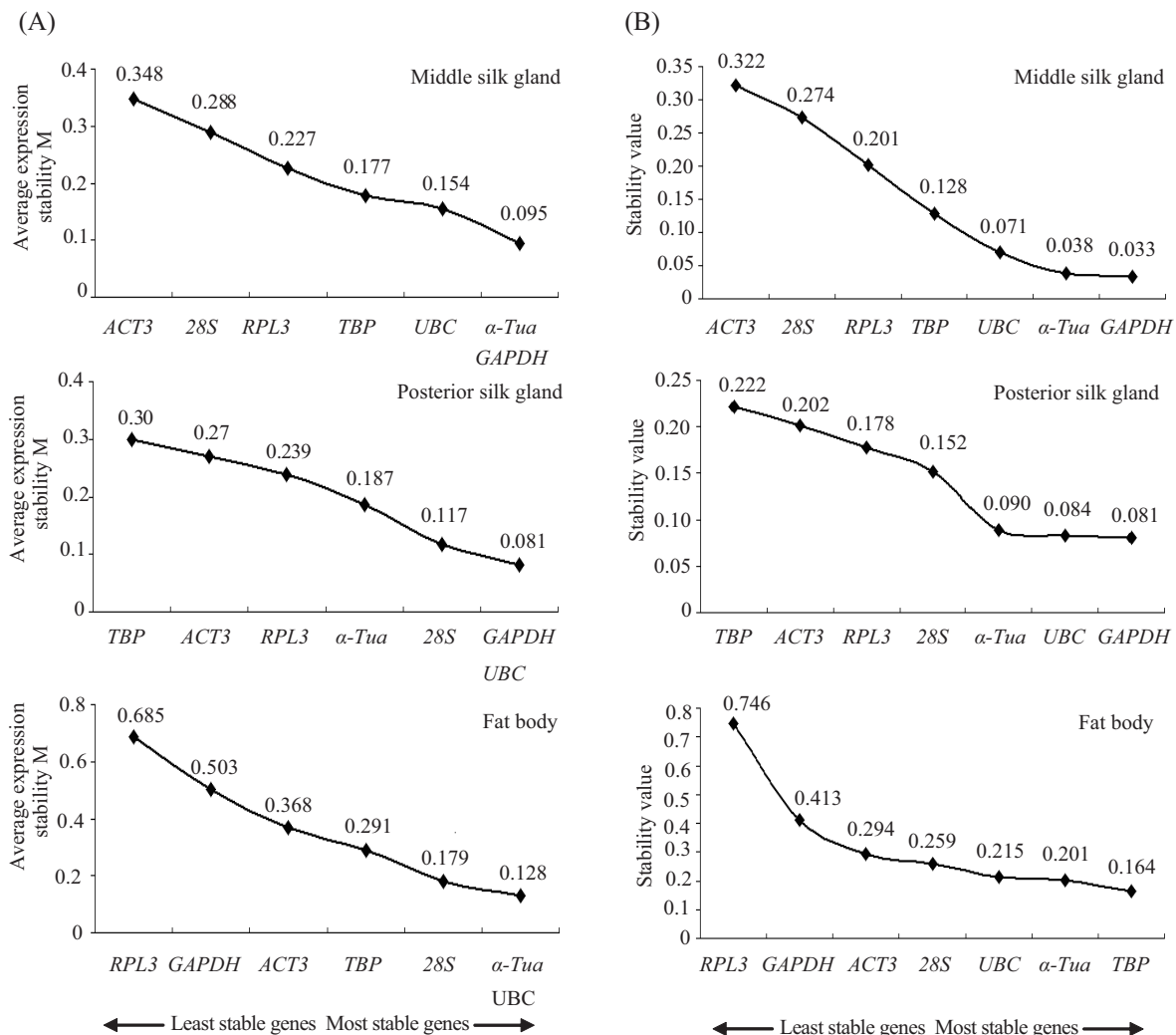
NormFinder程序计算得出 α -Tubulin、GAPDH在中部丝腺, UBC、GAPDH在后部丝腺, α -Tubulin、TBP在脂肪体组织中表达相对稳定(图1B)。

由NormFinder选择的相对稳定基因与geNorm程序分析结果具有共同性, 得出: α -Tubulin、GAPDH在中部丝腺, GAPDH、UBC在后部丝腺, α -Tubulin、UBC在脂肪体组织中表达相对稳定。

2.2 20E诱导刺激条件下内参基因的稳定性

昆虫的蜕皮激素属于类固醇激素, 昆虫中受MH调节的基因很多, 类固醇类激素对高等有机体的再生、变态发育和内环境稳定等多方面都有调节作用。

使用geNorm和NormFinder软件分别对候选的七种内参基因在20E诱导条件下5龄第2天0~72 h的表达水平进行评估。如图3A所示: α -Tubulin、28S

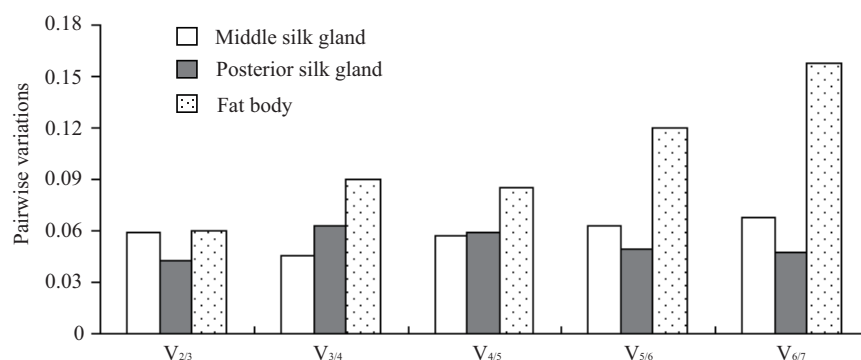


A: geNorm软件分析内参基因的稳定性; B: NormFinder软件分析内参基因的稳定性。

A: stability of candidate reference genes by geNorm analysis; B: stability of candidate reference genes by NormFinder analysis.

图1 geNorm和NormFinder软件分析正常组织(中部丝腺、后部丝腺和脂肪体)中内参基因的稳定性

Fig.1 Stability of candidate reference genes was determined in normal tissues using geNorm and NormFinder

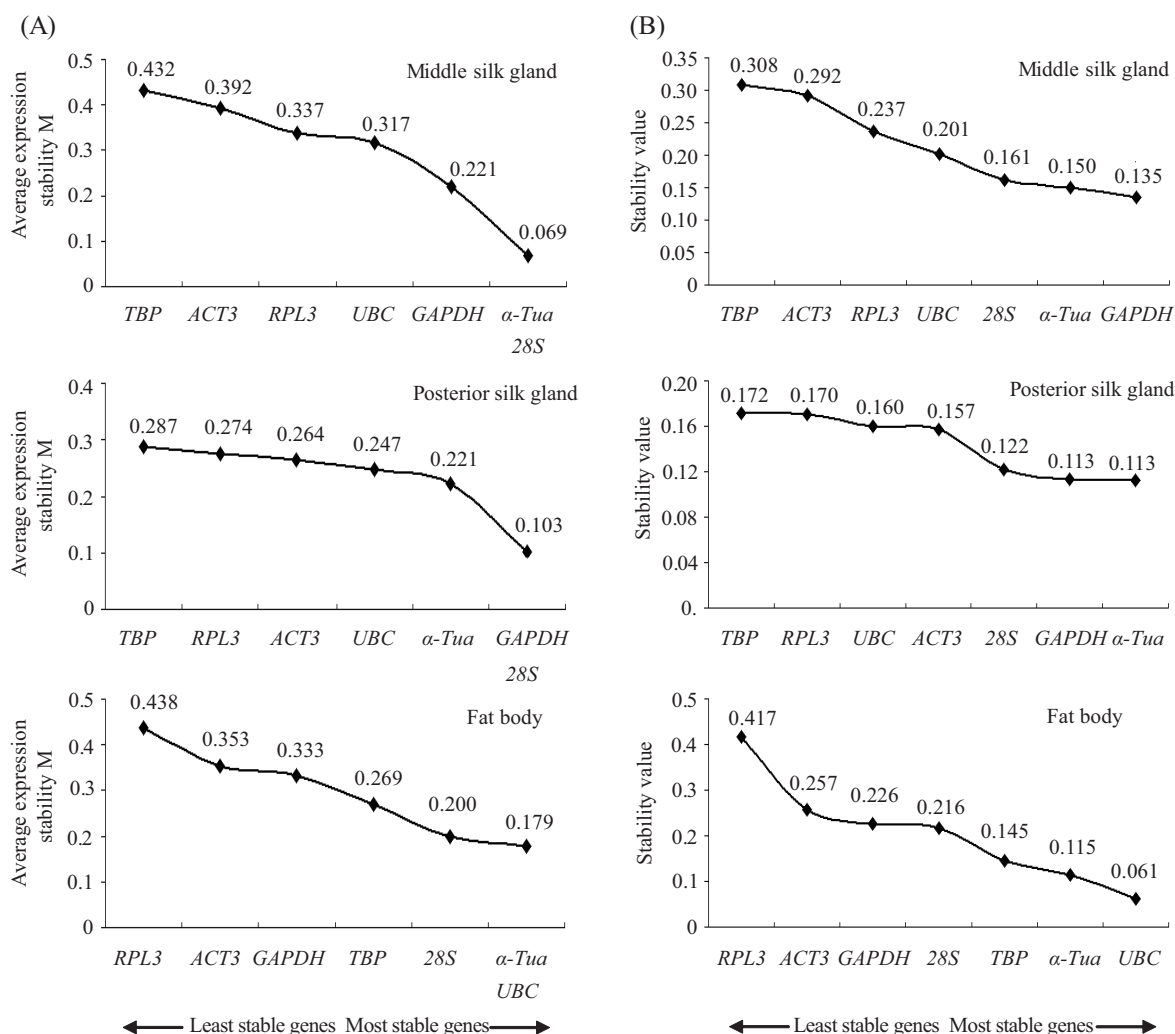


Pairwise variation ($V_{n(n+1)}$) 表示变异系数, 用来选择合适内参基因的数目。一般默认临界值为 0.15。正常条件的不同发育时期, 三种组织(中部丝腺、后部丝腺和脂肪体)中, 2 个内参基因已经基本满足实验条件。

Pairwise variation ($V_{n(n+1)}$) was used to determine the optimal number of reference genes for an accurate normalization. The cut-off value for such significance is 0.15. In 3 tissues (middle silk gland, posterior silk gland and fat body) under different development time points, two reference genes might be enough to normalize expression values of target genes.

图2 geNorm软件计算变异系数选择合适内参基因数目

Fig.2 Pairwise variation to determine the optimal number of reference genes by geNorm analysis

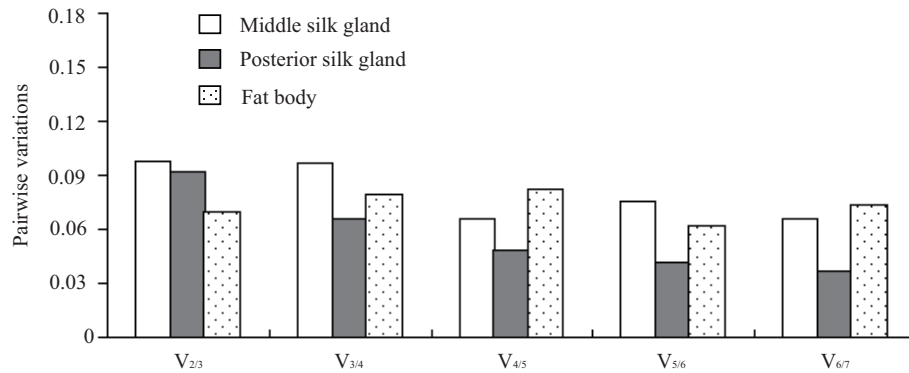


A: geNorm软件分析内参基因的稳定性; B: NormFinder软件分析内参基因的稳定性。

A: stability of candidate reference genes by geNorm analysis; B: stability of candidate reference genes by NormFinder analysis.

图3 geNorm和NormFinder软件分析处理组织(中部丝腺、后部丝腺和脂肪体)中内参基因的稳定性

Fig.3 Stability of candidate reference genes was determined in treated tissues using geNorm and NormFinder



Pairwise variation($V_{n/(n+1)}$)表示变异系数,用来选择合适内参基因的数目。一般默认临界值为0.15。蜕皮激素诱导刺激下,三种组织(中部丝腺、后部丝腺和脂肪体)中,2个内参基因已经基本满足实验条件。

Pairwise variation ($V_{n/(n+1)}$) was used to determine the optimal number of reference genes for an accurate normalization. The cut-off value for such significance is 0.15. In 3 tissues (middle silk gland, posterior silk gland and fat body) under 20E treatment, two reference genes might be enough to normalize expression values of target genes.

图4 geNorm软件计算变异系数选择合适内参基因数目

Fig.4 Pairwise variation to determine the optimal number of reference genes by geNorm analysis

*rRNA*在中部丝腺;*GAPDH*和*28SrRNA*后部丝腺;*α-Tubulin*和*UBC*在脂肪体中表达相对稳定。合适内参基因数目的分析结果见图4,在20E诱导刺激后,三种组织(中部丝腺、后部丝腺、脂肪体)的 $V_{2/3}$ 都小于0.15,说明在20E诱导刺激后,RT-PCR选用2个内参基因就可以了。

NormFinder软件分析计算得出:*α-Tubulin*、*GAPDH*在中部丝腺, *GAPDH*、*α-Tubulin*在后部丝腺, *α-Tubulin*、*UBC*在脂肪体三种组织中表达相对较为稳定(图3B)。

由NormFinder软件选择得到的相对稳定基因与geNorm程序分析结果共同性得出:内参基因*α-Tubulin*、*28SrRNA*在中部丝腺, *GAPDH*和*28SrRNA*在后部丝腺, *α-Tubulin*和*UBC*在脂肪体中的表达相对稳定。

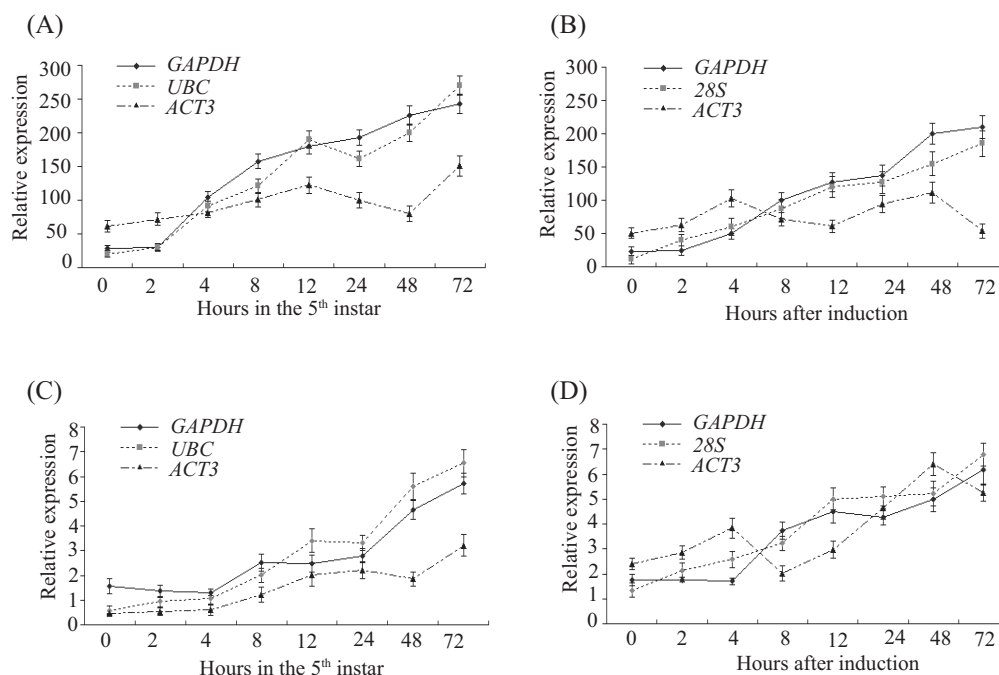
2.3 蜕皮激素诱导后*Fib-H*、*Ser-1*和*SGF-1*基因的组织转录水平分析

2.3.1 蜕皮激素诱导后家蚕5龄幼虫*Fib-H*和*SGF-1*基因在后部丝腺的转录水平 分别以筛选出的稳定表达基因和*Actin3*基因作为参照基因对检测结果进行归一化处理,如图5所示:采用筛选出的2个稳定表达基因作为内参,目的基因的表达趋势相似,曲线重合性较好,但使用家蚕常用的内参基因*Actin3*,会出现较大的差异,甚至会得出相反的结论。如图5A和5B所示,以*GAPDH*基因作为内参, *Fib-H*基因在蜕皮激素诱导后,转录水平表达量与对照相比上升缓

慢,4 h时只有对照的0.5倍左右,在诱导72 h后也只有对照的0.86倍。如图5C和5D所示,采用*GAPDH*基因作为内参, *SGF-1*基因在蜕皮激素诱导后转录水平均高于对照的表达,在诱导12 h后表达量是对照水平的1.8倍,在诱导刺激后72 h后表达量为对照的1.1倍。所以我们认为蜕皮激素对*Fib-H*基因的表达有一定的抑制作用,而对*SGF-1*基因具有促进作用。

2.3.2 蜕皮激素诱导后家蚕5龄幼虫*Ser-1*和*SGF-1*基因在中部丝腺的转录水平 分别以筛选出的稳定表达基因和*Actin3*作为参照基因对检测结果进行归一化处理,如图6所示:采用*α-Tubulin*基因作为内参,与对照相比, *Ser-1*基因在蜕皮激素诱导后转录水平只有对照水平的一半左右,诱导刺激12 h后转录水平只有对照水平的0.4倍。*SGF-1*基因在蜕皮激素诱导后转录水平均高于对照水平的表达,诱导刺激4 h后表达量是对照的2倍左右,诱导刺激72 h为对照水平的1.6倍。同样表明蜕皮激素对*Ser-1*基因的表达有一定的抑制作用,而对*SGF-1*基因具有促进作用。

2.3.3 蜕皮激素诱导后家蚕5龄幼虫*Fib-H*和*SGF-1*基因在脂肪体中的转录活性变化 分别以筛选出的稳定表达基因和*Actin3*作为参照基因对检测结果进行归一化处理,如图7所示: *Fib-H*和*SGF-1*基因正常情况下在脂肪体中的表达量远低于后部和中部丝腺的表达量,经蜕皮激素诱导后*Fib-H*基因在4 h后表达量开始出现明显降低, *SGF-1*在诱导刺激后表达量高于对照水平。

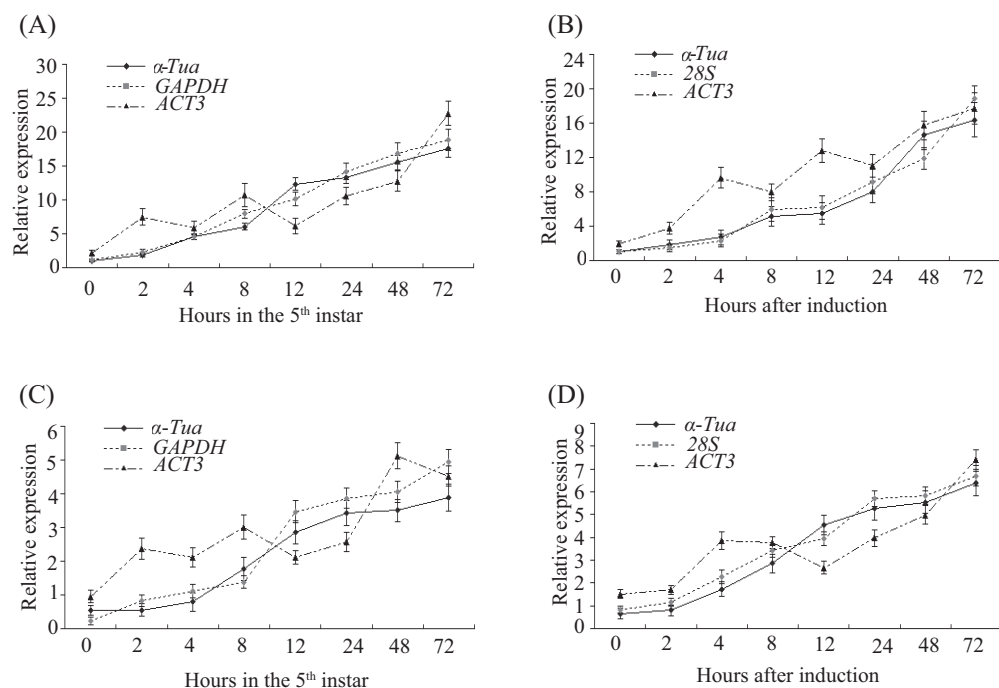


A、B分别为正常饲养和激素诱导后*Fib-H*基因mRNA在后部丝腺中的转录活性变化; C、D分别为正常饲养和激素诱导后*SGF-I*基因mRNA在后部丝腺中的转录活性变化。

A and B are mRNA transcriptional activity variations of *Fib-H* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in posterior silk gland; C and D are mRNA transcription activity variations of *SGF-I* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in posterior silk gland.

图5 *Fib-H*和*SGF-I*基因mRNA在后部丝腺转录活性变化

Fig.5 mRNA transcriptional activity variations of *Fib-H*, *SGF-I* in posterior silk gland

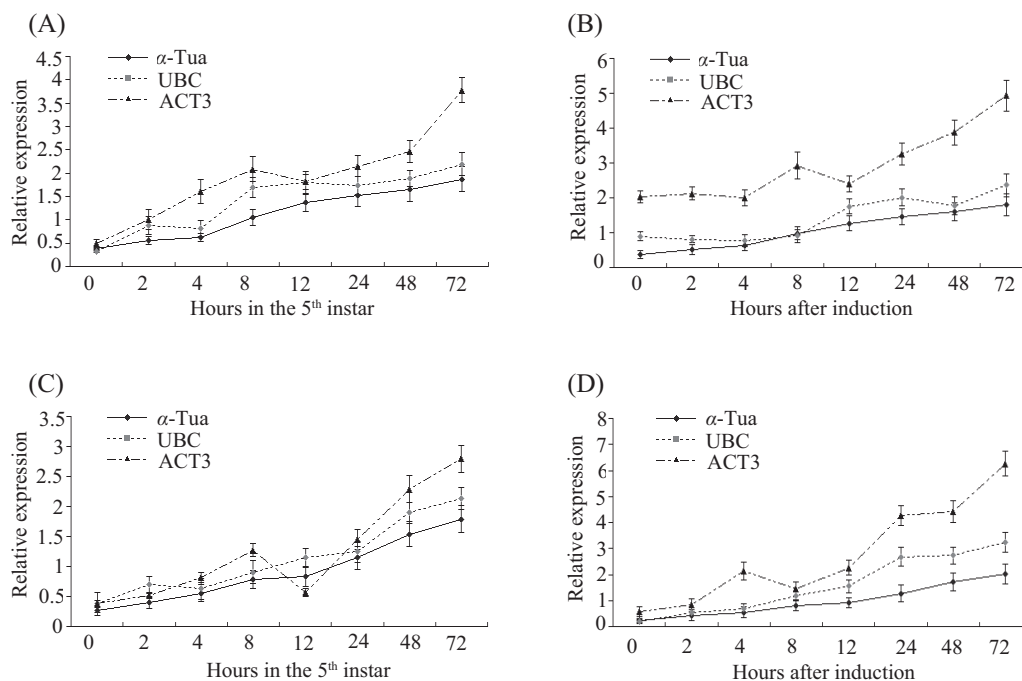


A、B分别为正常饲养和激素诱导后*Ser-I*基因mRNA在中部丝腺中的转录活性变化; C、D分别为正常饲养和激素诱导后*SGF-I*基因mRNA在中部丝腺中的转录活性变化。

A and B are mRNA transcriptional activity variations of *Ser-I* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in middle silk gland; C and D are mRNA transcription activity variations of *SGF-I* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in middle silk gland.

图6 *Ser-I*和*SGF-I*基因mRNA在中部丝腺转录活性变化

Fig.6 mRNA transcriptional activity variations of *Ser-I* and *SGF-I* in middle silk gland



A、B分别为正常饲养和激素诱导后*Fib-H*基因mRNA在脂肪体中的转录活性变化; C、D分别为正常饲养和激素诱导后*SGF-I*基因mRNA在脂肪体中的转录活性变化。

A and B are mRNA transcriptional activity variations of *Ser-I* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in fat body; C and D are mRNA transcription activity variations of *SGF-I* gene under normal rearing and by induction of molting hormone in fat body.

图7 *Fib-H*和*SGF-I*基因mRNA在脂肪体转录活性变化

Fig.7 mRNA transcriptional activity variations of *Fib-H*, *SGF-I* in fat body

3 讨论

在相对定量中一般采用各种不同的管家基因作为内源参照基因进行校正,用来去除不同样本在RNA的产量、质量以及反转录效率上可能存在的差别。理想的管家基因应在各种实验因素条件下,各种类型的组织或细胞中均恒定表达。然而,大量的研究表明,内参基因的表达并不稳定,任何一种看家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。如果没有合适的标准化处理,盲目地使用一种看家基因作为内参,可能导致错误甚至相反的结论。目前,研究中一般要参照MIQE规则应用geNorm和NormFinder软件进行标准化分析,筛选出合适的稳定内参基因,以确保目的基因检测结果的可靠性^[15-16]。

本实验对家蚕常用的内参基因在不同发育时期和不同刺激条件下的表达稳定性进行分析。发现在不同的组织中,不同的实验条件下,表达相对稳定的内参基因是不同的,内参基因需要根据具体的实验条件加以选择,选择不同的内参基因对目的基因进行校正,基因的表达会有很大的区别。利用软件

筛选出的相对稳定基因作为内参基因对目的基因进行校正,目的基因的表达趋势是相似的,如果选择表达不稳定的基因作为内参基因,目的基因的表达将会被误导。

激素诱导后*Fib-H*、*Ser-I*在后部丝腺、中部丝腺中的表达量都有不同程度的降低,区别在于开始出现明显降低的时间点不同,表明在家蚕5龄幼虫早期阶段外源添食蜕皮激素对于*Fib-H*和*Ser-I*的表达有一定的抑制作用。*SGF-I*基因在激素刺激后在后部丝腺、中部丝腺中的表达量分别在不同的时间点出现了升高,表明外源的蜕皮激素对于*SGF-I*基因的表达有正调控作用,推测蜕皮激素可以促进*SGF-I*基因的表达,进而调控丝蛋白的合成。丝素基因的表达有着众多的调控因子,对于表达调控的复杂网络还有待于进一步的研究。同时发现,丝素基因除主要在5龄幼虫的后部丝腺中表达外,在其他组织如中部丝腺和脂肪体中也有一定程度较弱的表达,基因表达的组织和时期特异性并不十分严格。

本文对常用内参基因在不同实验条件不同组织中的稳定性进行分析,发现在RT-PCR中内参基因

的选择是很重要的, 盲目地使用某个基因作为内参目的基因的表达将会被误导。这为探索家蚕功能基因组组织转录水平的定量分析法提供了一定的指导意义。

参考文献 (References)

- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19.
- Kheirleiseid EA, Chang KH, Newell J, Kerin MJ, Miller N. Identification of endogenous control genes for normalization of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 12-25.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010; 50(4): 227-30.
- Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48(8): 1178-85.
- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR(qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci(Lond)* 2005; 109(4): 365-79.
- Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-66.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
- Burns MJ, Valdivia H, Harris N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378(6): 1616-23.
- Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods-evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 2005; 5: 31.
- Ellison SL, English CA, Burns MJ, Keer JT. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol* 2006; 6: 33.
- Burns M, Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 1513-24.
- Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van RN, de Paepe A, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): RESEARCH0034.
- Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, *et al.* Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: Comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85(1): 154-9.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR(RT-PCR): Trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29(1): 23-39.
- Jiang HB, Liu YH, Tang PA, Zhou AW, Wang JJ. Validation of endogenous reference genes for insecticide-induced and developmental expression profiling of *Liposcelis bostrychophila* (Pso-coptera: Liposcelididae). *Mol Biol Rep* 2010; 37(2): 1019-29.
- Ponton F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2011; 57(6): 840-50.
- 路爱成, 卫正国, 李 兵, 沈卫德. 野桑蚕不同组织细胞色素 P450 CYP305B1V1 基因的诱导表达特征研究. 安徽农业科学(Lu Aicheng, Wei Zhengguo, Li Bing, Shen Weide. Induced expression of cytochrome P450 CYP305 B1V1 gene in different tissues of wild mulberry silkworm(*Bombyx mandarina*). *Agricultural Science & Technology* 2009; 37(12): 5400-2.
- Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, *et al.* geNorm manual, last update on July 8, 2008. Available: http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
- NormFinder Software. <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>