

## 研究报告

## 布莱克韦尔虫草实时荧光定量逆转录 PCR 内参基因的筛选

李佳妮<sup>1</sup>, 张姝<sup>1,2</sup>, 张永杰<sup>\*1</sup>

1 山西大学 生命科学学院, 山西 太原 030006

2 农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081

李佳妮, 张姝, 张永杰. 布莱克韦尔虫草实时荧光定量逆转录 PCR 内参基因的筛选[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 219-229.

LI Jiani, ZHANG Shu, ZHANG Yongjie. Screening of reference genes for real-time quantitative reverse transcription PCR in *Cordyceps blackwelliae*[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 219-229.

**摘要:**【背景】实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 常用于分析基因表达, 但选择合适的内参基因, 对分析结果的稳定性非常重要。布莱克韦尔虫草是一种具有开发价值的虫草, 研究其功能基因表达具有重要意义。【目的】筛选获得布莱克韦尔虫草不同生长阶段(液体发酵菌丝体、小麦粒培养基菌丝体及子实体)最稳定的内参基因。【方法】选取 8 个候选内参基因(18S rRNA、*gapdh*、*β-tubulin*、*cyclophilin A*、*γ-actin*、*rpl10*、*tefla* 和 *ubiquitin*), 采用 RT-qPCR 技术进行扩增, 结合 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 $\Delta C_t$  等算法, 评估这些基因在布莱克韦尔虫草不同生长发育阶段的表达稳定性。【结果】相比其他基因, *γ-actin* 和 18S rRNA 在不同生长发育阶段的表达稳定性最好, 可作为布莱克韦尔虫草基因表达分析的内参基因。【结论】本研究筛选出了布莱克韦尔虫草 RT-qPCR 的内参基因, 为深入研究生长发育过程中的基因表达规律奠定了基础。

**关键词:** 布莱克韦尔虫草; 内参基因; RT-qPCR

资助项目: 农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金(KLMRCP2023-01); 山西省基础研究计划(202203021221036)

This work was supported by the Open Fund of Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (KLMRCP2023-01) and the Fundamental Research Program of Shanxi Province (202203021221036).

\*Corresponding author. E-mail: zhangyj2008@sxu.edu.cn

Received: 2024-04-26; Accepted: 2024-05-21; Published online: 2024-06-07

## Screening of reference genes for real-time quantitative reverse transcription PCR in *Cordyceps blackwelliae*

LI Jiani<sup>1</sup>, ZHANG Shu<sup>1,2</sup>, ZHANG Yongjie<sup>\*1</sup>

1 School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

2 Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Background] Gene expression is often studied by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), the stability of which largely depends on the choice of reference genes. *Cordyceps blackwelliae* is a fungus of development potential, and it is thus vital to understand the expression patterns of functional genes in this fungus. [Objective] To identify the optimal reference genes that express stably across different developmental stages (mycelia from liquid culture, mycelia from wheat grain media, and fruiting bodies) of *C. blackwelliae*. [Methods] We utilized RT-qPCR to investigate the expression of eight reference genes (18S rRNA, *gapdh*,  *$\beta$ -tubulin*, *cyclophilin A*,  *$\gamma$ -actin*, *rpl10*, *tefla*, and *ubiquitin*). The expression stability of these genes across different developmental stages was evaluated using geNorm, NormFinder, BestKeeper, and  $\Delta C_t$  algorithms. [Results] The results indicated that  *$\gamma$ -actin* and 18S rRNA exhibited more stable expression than the other genes, making them suitable reference genes for the transcriptional analysis of functional genes in *C. blackwelliae*. [Conclusion] This study successfully identified appropriate reference genes for RT-qPCR in *C. blackwelliae*, aiding future research on gene expression dynamics.

**Keywords:** *Cordyceps blackwelliae*; reference gene; real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

虫草作为珍贵的生物资源，主要寄生于动物(如昆虫、线虫和蜘蛛等)及少数其他真菌(如大团囊菌、麦角菌等)<sup>[1]</sup>。虫草含有丰富的活性成分(如虫草素、虫草多糖、腺苷等)<sup>[2-3]</sup>，表现出多种生理活性(如抗肿瘤、降血脂、降血糖等)<sup>[4]</sup>，其发酵菌丝体和子实体被广泛用于食品、药品、保健品等领域<sup>[5]</sup>。近年来，以冬虫夏草、蛹虫草、蝉花、广东虫草等为代表的虫草产业已经在我国实现了较高的经济价值和社会效益<sup>[5]</sup>。金水宝胶囊、百令胶囊、金致蛹虫草含片等虫草制剂已广泛应用于临床<sup>[6]</sup>，虫草保健茶饮品、虫草酒、虫草酱油等越来越多的虫草食品被开发出来<sup>[7]</sup>。随着虫草食药两用价值的不断发掘，

其市场需求量大幅度增加，但是野生虫草的资源日渐稀缺，人工培育虫草成为了获取虫草的重要途径。人工栽培成本低廉，培养出的虫草品质好，极大地推动了虫草产业的发展，为虫草产品的产业化奠定了基础<sup>[3]</sup>。

布莱克韦尔虫草(*Cordyceps blackwelliae*)于2018年首次报道于泰国<sup>[8]</sup>，后在越南和中国相继被发现<sup>[9-10]</sup>。该虫草在无性型和有性型形态方面，分别与细脚虫草(*Cordyceps tenuipes*)和双梭孢虫草(*Cordyceps bifusispora*)较为相似<sup>[8]</sup>。研究发现，布莱克韦尔虫草具有抗氧化和纤溶活性，对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)

等细菌,以及黑曲霉(*Aspergillus niger*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)等真菌均具有抑制效果,是一种具有开发价值的虫草菌<sup>[9]</sup>。布莱克韦尔虫草可在大米或小麦粒培养基,以及柞蚕蛹上生长出子实体<sup>[9]</sup>。子实体的形成是真菌生命周期中高度复杂的分化过程,涉及形态重建和众多基因的表达变化。了解这些关键基因的表达模式,有助于阐明子实体发育调控机制。在当今测序技术快速发展的背景下,实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)依然是基因表达分析常用的方法之一,并且转录组测序发现的差异基因通常需要采用 RT-qPCR 的方法进行验证。

RT-qPCR 是一种灵敏度高、重复性好、特异性强的基因表达分析方法<sup>[11-12]</sup>。但是,利用 RT-qPCR 分析基因表达的可靠性也受到诸多因素的影响,包括模板 RNA 质量、互补 DNA (cDNA)合成效率、引物特异性、扩增效率和标准化等<sup>[13-14]</sup>。此外,选择一个稳定的内参基因也非常重要,特别是对于表达水平波动较大的样本<sup>[15-16]</sup>,在 RT-qPCR 分析中使用不合适的内参基因将导致不可靠甚至错误的结果。真菌基因表达分析中常用的内参基因有:18S rRNA、28S rRNA、肌动蛋白(*actin*)、亲环素(*cyclophilin A*)、翻译延伸因子(*tefla*)、微管蛋白(*tubulin*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*gdpdh*)、泛素(*ubiquitin*)等<sup>[17-19]</sup>。理想的内参基因在不同条件下应能保持恒定水平的表达,并且不受实验参数的影响。但是,越来越多的研究表明,在某一环境下稳定表达的内参基因,在另一环境下有可能发生变化<sup>[20-21]</sup>。因此,要针对不同的试验条件选择最适合的内参基因,以此来提高研究结果的准确性。目前,在许多食药菌中,如冬虫夏草<sup>[22]</sup>、蛹虫草<sup>[23]</sup>、香菇<sup>[24]</sup>、杏鲍菇<sup>[25]</sup>、金针菇<sup>[26]</sup>、黑木耳<sup>[13]</sup>和灵芝<sup>[27]</sup>,都做过内参基因的筛选工作。

本课题组在对布莱克韦尔虫草进行转录组测序后,找到一些差异表达的基因,需要通过 RT-qPCR 进行验证,但哪些基因适合作为内参基因尚不清楚。

本研究选择 8 个基因作为候选内参基因:18S rRNA、*gapdh*、 *$\beta$ -tubulin*、*cyclophilin A*、 *$\gamma$ -actin*、*tefla*、*ubiquitin* 和核糖体蛋白 L10 (*rpl10*)。利用 RT-qPCR 技术,结合 geNorm、NormFinder、BestKeeper、 $\Delta C_t$  4 种算法及综合评估软件 RefFinder 对这些候选内参基因在布莱克韦尔虫草不同发育阶段(液体发酵菌丝体、小麦粒培养基菌丝体和子实体)的表达稳定性进行评估,以期筛选出适宜的内参基因,为布莱克韦尔虫草生长发育调控研究奠定基础,也为其他虫草内参基因的选择提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

布莱克韦尔虫草菌株由本实验室分离,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),编号为 M2022663。采用先前工作中描述的方法进行人工栽培<sup>[9]</sup>,分别对液体发酵菌丝体(马铃薯葡萄糖培养基)、小麦粒培养基菌丝体和子实体 3 个阶段进行取样,各阶段设 3 次生物学重复。收集的样品经液氮速冻后保存在超低温冰箱(-80 °C)备用。

TransScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 和 2×PerfectStart<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix, 全式金生物技术有限公司;CFX Connect<sup>™</sup> 实时 PCR 仪,Bio-Rad 公司;NanoDrop<sup>™</sup> One 超微量 UV-Vis 分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Agilent 2100 生物分析仪,安捷伦公司。

### 1.2 RNA 的提取和逆转录

将-80 °C 保存的样本在液氮中研磨成粉

末, 使用 Trizol 试剂提取总 RNA。通过 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 浓度、总量和完整性, 并进一步将 RNA 逆转录成 cDNA。采用 NanoDrop™ One 超微量 UV-Vis 分光光度计测定 cDNA 浓度, 进一步用无核酸酶水将 cDNA 稀释到 200 ng/μL, 用于 RT-qPCR 检测。

### 1.3 候选内参基因的选择与引物设计

使用在线网站 Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) 设计引物。引物设计原则为: 目标片段大小在 100–250 bp 之间, 熔解温度 57–62 °C, 最佳长度 20 bp, G+C 含量 45%–55%。通过 DNAMAN 6.0 检查引物是否存在发夹结构等影响 PCR 扩增的因素, 并且引物能量值不超过 4.2 kcal/mol, 同时检查正、反引物间是否会形成明显的二聚体。基因名称及引物序列信息见表 1。在进行 RT-qPCR 前, 先对设计的引物进行普通 PCR 扩增。反应体系(25 μL): 正、反向引物(10 μmol/L) 各 0.75 μL, cDNA 模板(200 ng/μL) 0.5 μL,

2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 8 min。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果, 如果扩增产物大小与预期一致, 琼脂糖凝胶电泳显示一条清晰的条带, 则该引物对可用于后续分析。

### 1.4 RT-qPCR 分析

使用 CFX Connect™ 实时荧光定量 PCR 仪按如下反应体系进行: 2×PerfectStart® Green qPCR SuperMix 10 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) 各 0.4 μL, cDNA 模板(200 ng/μL) 3 μL, 无核酸酶水 6.2 μL。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 56 °C 25 s, 72 °C 20 s, 共 41 个循环。在延伸阶段收集荧光信号, 并在循环结束后设定熔解曲线以检测产物的特异性。该程序能够验证所产生的荧光来自单一 PCR 产物, 而不代表 PCR 过程中形成的引物二聚体或非特异性产物<sup>[28]</sup>。各阶段样品进行 3 次重复。

表 1 候选内参基因的引物序列

Table 1 Primers used to amplify candidate reference genes

基因名称 Gene name	描述 Description	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Amplicon size (bp)
18S rRNA	18S 核糖体 RNA 18S ribosomal RNA	F: GCCTCACCTAACTGTACCAT R: CCAGCCATCCACAGAACCC	169
<i>gapdh</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: AGGTCATCATCTCTGCTCCC R: TCTTCTGGGTTGCGGTGTAG	167
<i>β-tubulin</i>	β-微管蛋白 β-tubulin	F: CCAGTTCTCCGCCATGTTTC R: TCGTATTCTCCTCGTCGTC	122
<i>cyclophilin A</i>	亲环素 A Cyclophilin A	F: CCCC AAGACGGCTGATAACT R: TCAGGGTGAAGTTCTCGTCG	154
<i>γ-actin</i>	γ-肌动蛋白 γ-actin	F: CGCCATCTCGCAGTATCATG R: CTCACGGTTGGACTTAGGGT	199
<i>rpl10</i>	核糖体蛋白 L10 Ribosomal protein L10	F: ATCTTCGATCTTGGCCGCA R: TCCTTGCCGCTGTTCTTGAC	113
<i>tefla</i>	翻译延长因子 1α Translational elongation factor 1α	F: CACTGTCATTGATGCTCCCG R: GGTCTCCTTGATAATCTCCTGGT	213
<i>ubiquitin</i>	泛素 Ubiquitin	F: GAAACCACGACACGGCAAAT R: CTTCTCCTCCTGTAGCGACC	144

F: 正引物序列; R: 反引物序列。

F: Forward primer; R: Reverse primer.

## 1.5 候选内参基因的稳定性分析

利用 4 种统计算法对候选内参基因的稳定性、参考基因的最佳数量进行分析, 包括 geNorm v3.5<sup>[29]</sup>、NormFinder v20<sup>[30]</sup>、BestKeeper<sup>[31]</sup> 和  $\Delta C_t$ <sup>[32]</sup>。通过 RefFinder 程序<sup>[33]</sup>对 8 个内参基因稳定性进行综合排名。其中, geNorm 采用逐级排除最不稳定基因的方法, 建立内参基因稳定性排序, 并推荐最稳定基因, 判定标准为: 稳定性值  $M < 1.5$  即可作为内参基因,  $M$  值越小内参基因稳定性越好, 反之, 稳定性越差。该软件还可计算引入一个新的内参基因后归一化因子的配对变异值  $V$ , 并根据  $V_n/V_{n+1}$  值来确定所需最适内参基因的数目。如果  $V_n/V_{n+1}$  值  $< 0.15$ , 则最适内参基因的数量是  $n$  个, 反之, 则需要引入额外的内参基因。NormFinder 原理与 geNorm 相似, 判定标准为表达稳定值 stability 最小的内参基因为最合适的内参基因。BestKeeper 是一个基于 Excel 的工具, 通过该工具可获得变异系数 (coefficient of variation, CV) 和标准差 (standard deviation, SD), CV 和 SD 最低的基因被认为是表达最稳定的。 $\Delta C_t$  法根据基因表达差异的可重复性对候选基因稳定性进行排序, 计算公式为  $Q = E \Delta C_t$ , 值越小, 内参基因稳定性越好。RefFinder 是一个基于网络的集成工具, 它集成了 geNorm、Normfinder、BestKeeper 和  $\Delta C_t$  方法, 根据每个程序的排名为单个基因分配适当的权重, 并计算其权重的几何平均值, 以获得最终的整体排名。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选内参基因引物特异性验证

对 8 个候选内参基因进行普通 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示均为单一条带 (图 1), 没有非特异性扩增条带, 说明引物特异性较好。对 8 个候选内参基因进行 RT-qPCR 扩增, 所有

样本的熔解曲线均为单峰 (图 2), 说明扩增产物单一, 进一步验证了引物的特异性。

### 2.2 候选内参基因表达稳定性分析结果

各候选内参基因的扩增曲线整体平滑, 指数期明显, 未见异常, 所有样品指数期重复性好 (图 3)。对候选内参基因在所有样本中  $C_t$  值变化范围进行分析, 发现 8 个候选内参基因的  $C_t$  值在 15–31 之间, 其中  $\gamma$ -actin 的  $C_t$  值变化范围最小, 样品间最多相差 1.23 个循环; cyclophilin A 的  $C_t$  值变化范围最大, 样品间最多相差 3.79 个循环 (图 4)。

通过 geNorm 程序分析, 发现 8 个候选内参基因的  $M$  值均小于 1.5, 均可作为布莱克韦尔虫草不同发育时期的内参基因; 稳定性由高到低依次为: 18S rRNA、 $\gamma$ -actin > *tef1a* >  $\beta$ -tubulin > *gapdh* > *ubiquitin* > *rpl10* > *cyclophilin A* (表 2)。为了确定内参基因的最优数量, 使用 geNorm 计算所有样本的归一化因子之间的成对变异值  $V_n/V_{n+1}$ , 临界值为 0.15。结果表明,  $V_2/V_3 = 0.127 < 0.15$  (图 5), 说明只有 2 个内参基因就足以使这些样

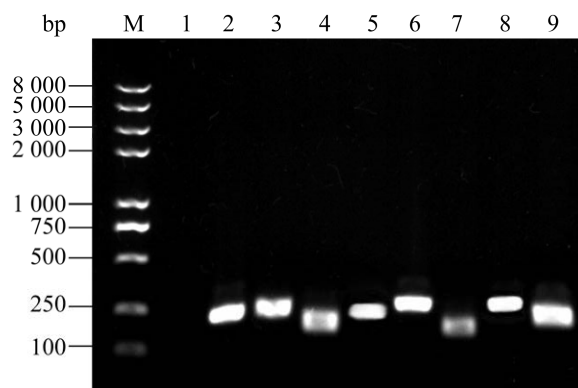


图 1 琼脂糖凝胶电泳检验候选内参基因引物特异性

Figure 1 Specificity test of primers for candidate reference gene amplification by agarose gel electrophoresis. M: Trans2K Plus II DNA Marker; 1: ddH<sub>2</sub>O; 2: 18S rRNA; 3: *gapdh*; 4:  $\beta$ -tubulin; 5: *cyclophilin A*; 6:  $\gamma$ -actin; 7: *rpl10*; 8: *tef1a*; 9: *ubiquitin*.

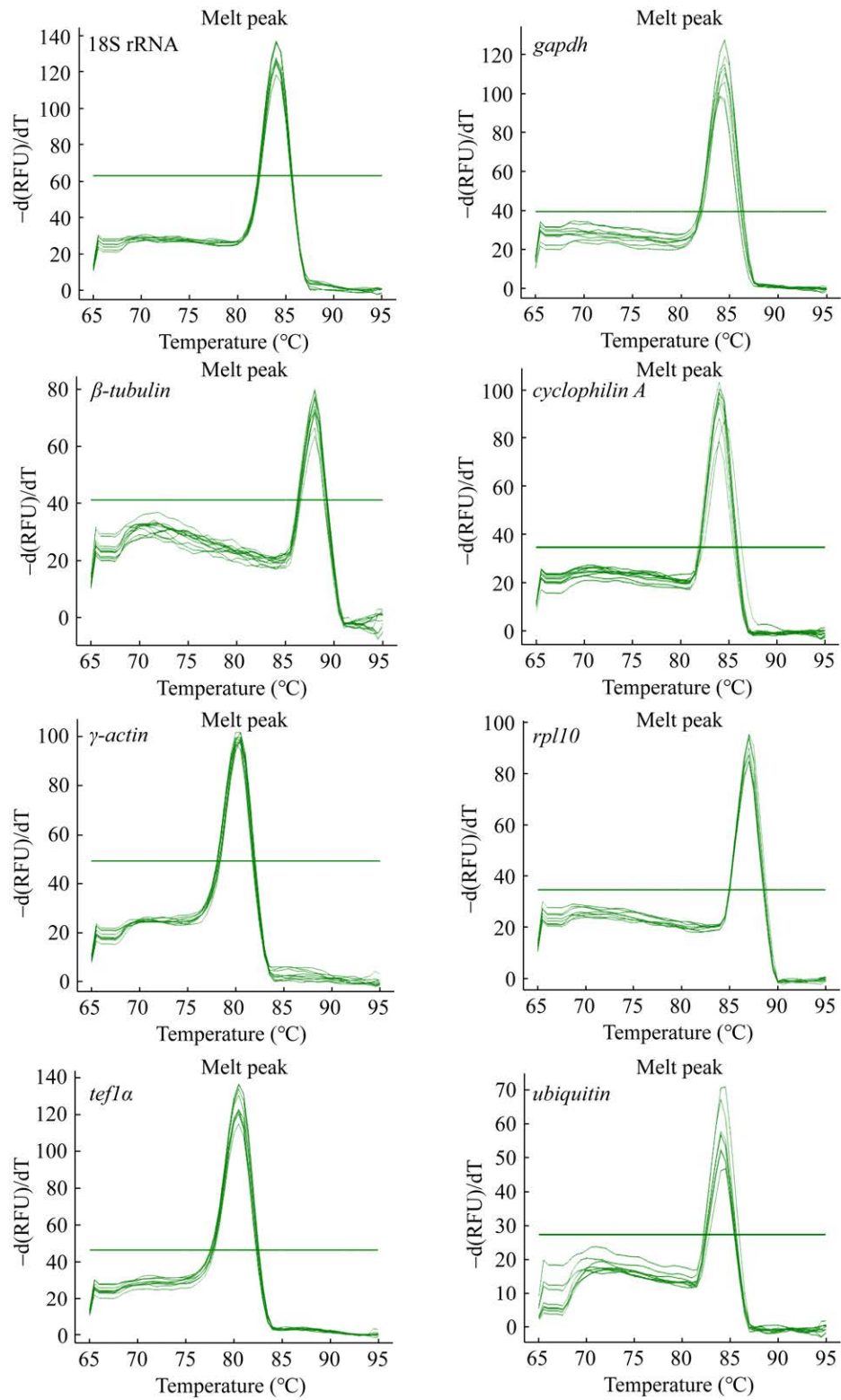


图 2 候选内参基因的熔解曲线

Figure 2 Melting curves of candidate reference genes.

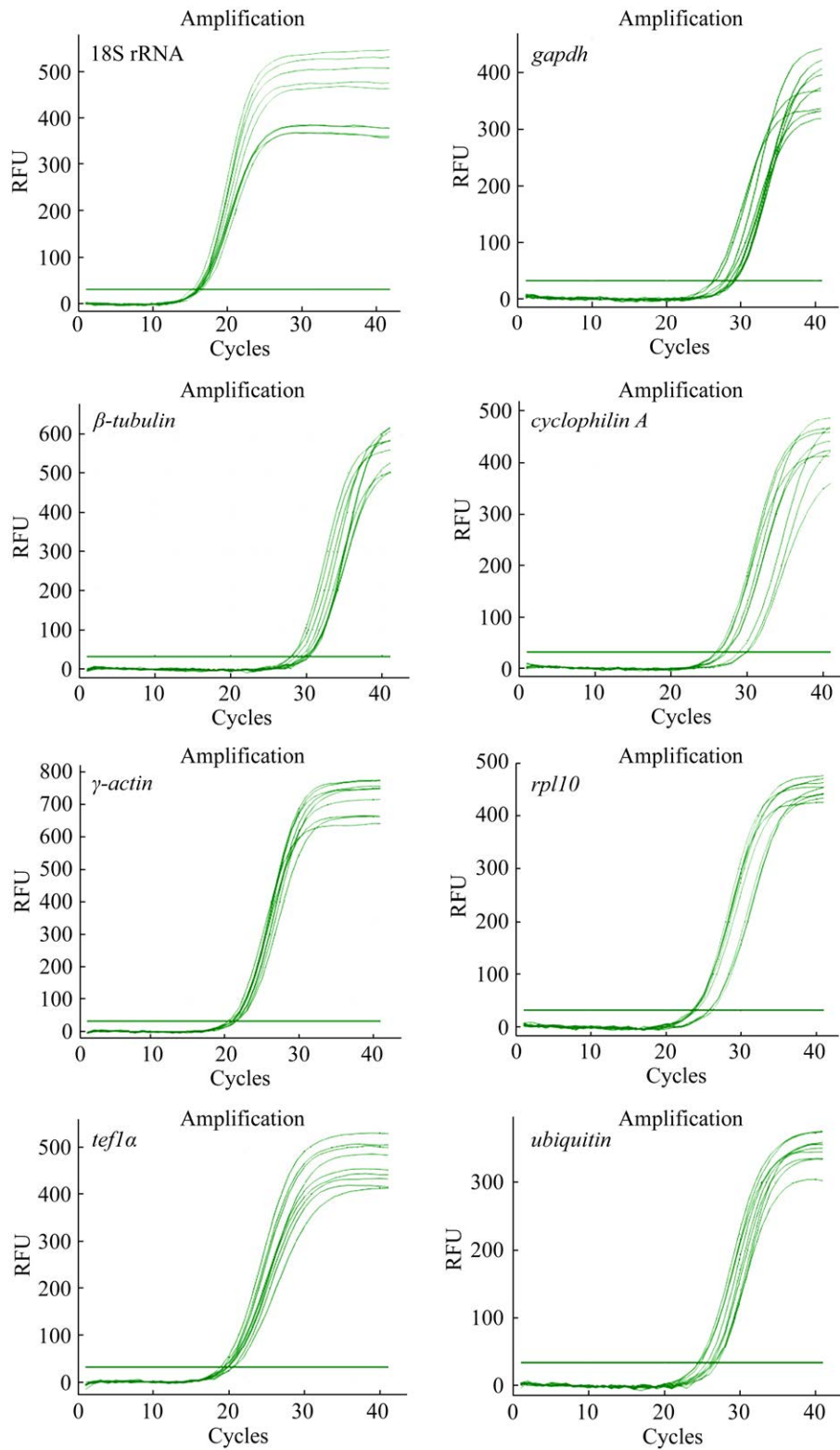


图 3 候选内参基因的扩增曲线

Figure 3 Amplification curves of candidate reference genes.

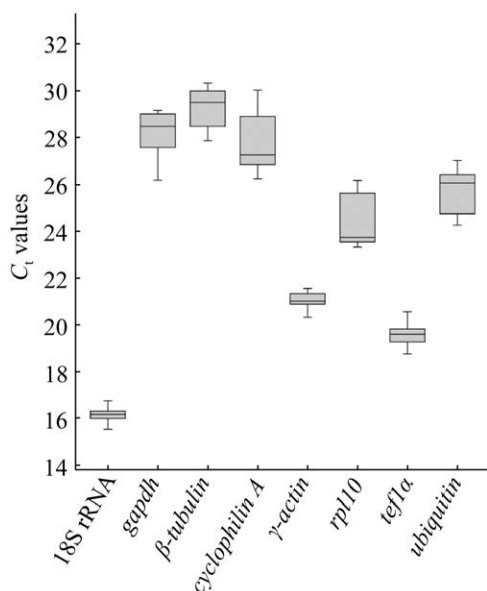


图 4 候选内参基因  $C_t$  值分布 箱体中的横线为中位数；箱子的上下边表示上下四分位数；上下界线分别表示最大值和最小值。

Figure 4 Distribution of  $C_t$  values of candidate reference genes. A line across the box is depicted as the median; The top and lower quartiles are displayed in the box; Whiskers represent the maximum and minimum values.

品的基因表达标准化。由此，建议选用 18S rRNA 和  $\gamma$ -actin 用于校正该菌不同发育阶段的 mRNA 表达水平。

不同于 geNorm 算法，NormFinder 在归一化因子的计算中考虑了组内和组间变化。NormFinder 同样将 18S rRNA、 $\gamma$ -actin、*tef1a* 认定为排名前三的稳定表达基因。与 geNorm 结果相比，NormFinder 将 *ubiquitin* 的排名前移了两位，而 *rpl10* 和 *cyclophilin A* 的表达稳定性依然是最差的(表 2)。

使用 BestKeeper 软件对不同生长期的 8 个内参基因表达量进行分析，大多数候选内参基因的标准差 SD 值小于 1 (表 2)，说明其表达稳定性较好。其中， $\gamma$ -actin 和 18S rRNA 的变异系数  $CV \pm SD$  最小，稳定性最好。相反地，*cyclophilin A* 的 SD 大于 1，表达稳定性最差。

$\Delta C_t$  方法的结果与 BestKeeper 结果几乎相同，只是 *beta-tubulin* 和 *ubiquitin* 互换了位置(表 2)。8 个候选基因中  $\gamma$ -actin 的平均标准差最小，表达稳定性最好，其次为 18S rRNA 和 *tef1a*；*cyclophilin A* 的平均标准差值最大，稳定性最差。

RefFinder 综合排序结果显示，在布莱克韦尔虫草 3 个不同生长阶段，8 个候选内参基因的表达稳定性排名依次为： $\gamma$ -actin>18S rRNA>*tef1a*>*beta-tubulin*>*ubiquitin*>*gapdh*>*rpl10*>*cyclophilin A*。在用作 RT-qPCR 内参基因时，可选择 2 个内参

表 2 NormFinder、geNorm、BestKeeper 和  $\Delta C_t$  法分析候选内参基因的稳定性

Table 2 Stability analysis of candidate reference genes by NormFinder, geNorm, BestKeeper and  $\Delta C_t$  methods

基因名称 Gene name	NormFinder 稳定值 Stability value	BestKeeper 变异系数 CV	标准差 SD	$\Delta C_t$ 平均标准差 Average of SD	geNorm M 值 M value
18S rRNA	0.287	2.10	0.34	1.05	0.563
<i>gapdh</i>	1.145	3.30	0.93	1.42	0.941
<i>beta-tubulin</i>	1.022	2.68	0.78	1.34	0.832
<i>cyclophilin A</i>	1.501	4.31	1.20	1.72	1.324
$\gamma$ -actin	0.312	1.44	0.30	1.01	0.563
<i>rpl10</i>	1.337	3.99	0.97	1.59	1.193
<i>tef1a</i>	0.665	2.26	0.44	1.16	0.702
<i>ubiquitin</i>	0.843	3.39	0.87	1.29	1.025



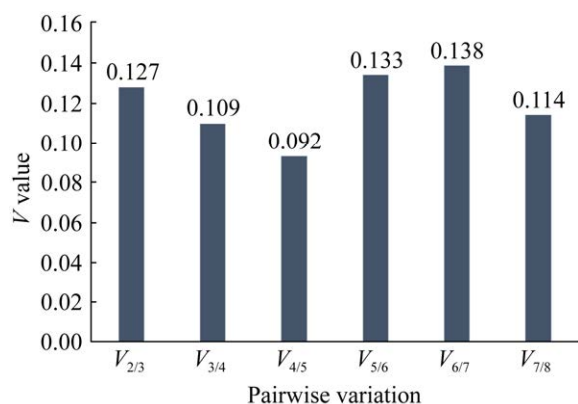


图5 八个候选内参基因成对变异( $V_n/V_{n+1}$ )分析 通过 geNorm 程序挑选 2 个或 2 个以上的内参基因组合来校正数据( $n>1$ )。

Figure 5 Pairwise variation ( $V_n/V_{n+1}$ ) analysis of eight candidate reference genes. Two or more combinations of reference genes were selected by geNorm program to rectify the data ( $n>1$ ).

基因即  $\gamma$ -actin 和 18S rRNA 从而更好地减少误差。rpl10 和 cyclophilin A 在 4 种方法中的排名都靠后, 说明它们在不同生长阶段下的表达稳定性差, 应避免将其选作内参基因。

### 3 讨论

多数研究表明, 基因的表达具有时空特性, 受到多种因素影响, 所以内参基因的稳定性也受限于特定的试验条件<sup>[34]</sup>。Vandesompele 等<sup>[29]</sup>和孟青艳等<sup>[35]</sup>认为, 应该使用 2 个以上内参基因进行基因表达数据规范化, 为了克服基因表达中可能出现的不稳定性, 使用多个基因是合理的。本研究在对所有实验样本进行评估时, 4 种评估方法都将  $\gamma$ -actin 和 18S rRNA 确定为合适的内参基因, 尽管它们的排序在不同方法之间略有变化。18S rRNA 是一个经典的管家基因, 被广泛用作真菌基因表达分析的参考基因, 如黑松露<sup>[36]</sup>、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)<sup>[37]</sup>和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[38]</sup>。18S

rRNA 的  $C_t$  值通常较低, 即意味着其表达水平较高, 这与 rRNA 占细胞总 RNA 的比例较高、其表达水平远高于 mRNA 有关<sup>[38-39]</sup>。根据 RT-qPCR 内参基因知识库 ICG (<https://ngdc.cncb.ac.cn/icg/>) 的统计,  $\gamma$ -actin 是真菌中最常使用的内参基因。例如, 在冬虫夏草 3 种菌丝形态内参基因筛选研究中,  $\gamma$ -actin 被认定为排名前三的稳定表达的内参基因<sup>[22]</sup>。然而, 在蛹虫草不同发育阶段内参筛选的研究中,  $\gamma$ -actin 被认定为最不稳定表达基因<sup>[23]</sup>。这进一步表明, 不存在适用于所有物种的通用参考基因, 所以在研究基因表达或用于实验应用之前, 验证参考基因的稳定性是有必要的。

### 4 结论

本研究明确了布莱克韦尔虫草在 3 个主要生长发育时期稳定表达的内参基因, 为挖掘影响虫草发育调控和形态建成等方面的重要基因奠定基础, 为虫草和其他近缘物种的基因表达提供更好的指导。然而, 本研究筛选出的内参基因在布莱克韦尔虫草的其他生长发育阶段(如分生孢子、子囊孢子)是否仍然稳定表达尚不清楚。

### REFERENCES

- [1] 陈万浩, 梁建东, 韩燕峰, 邹晓, 张永军, 梁宗琦. 纵观虫草(真菌)的来世今生[J]. 菌物学报, 2021, 40(11): 2894-2905.  
CHEN WH, LIANG JD, HAN YF, ZOU X, ZHANG YJ, LIANG ZQ. Research overviews of *Cordyceps*: past, present and future[J]. Mycosystema, 2021, 40(11): 2894-2905 (in Chinese).
- [2] 袁源, 戚梦, 张凤培, 刘钊, 刘昆, 吴小平, 张君丽, 傅俊生. 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的生物活性评价[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1446-1457.  
YUAN Y, QI M, ZHANG FP, LIU Z, LIU K, WU XP, ZHANG JL, FU JS. Evaluation of the biological activities of four species of *Cordyceps* (*Isaria*, *Beauveria*) mycelial crude polysaccharides[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1446-1457 (in Chinese).
- [3] CHEN B, SUN YL, LUO FF, WANG CS. Bioactive metabolites and potential mycotoxins produced by *Cordyceps* fungi: a review of safety[J]. Toxins, 2020, 12(6): 410.

- [4] 肖建辉, 李彦, 肖瑜, 钟建江. 虫草属真菌的生物活性及机制研究现状与展望[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 640-647.  
XIAO JH, LI Y, XIAO Y, ZHONG JJ. Advance and prospect of studies on bioactivity and mechanism of *Cordyceps* fungi[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(5): 640-647 (in Chinese).
- [5] DONG CH, GUO SP, WANG WF, LIU XZ. *Cordyceps* industry in China[J]. Mycology, 2015, 6(2): 121-129.
- [6] SHI TN, GUAN YM, CHEN LH, HUANG SY, ZHU WF, JIN C. Application of near-infrared spectroscopy analysis technology to total nucleosides quality control in the fermented *Cordyceps* powder production process[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2020, 2020: 8850437.
- [7] 王雅玲, 代玲玲, 赵轶男, 马堃. 蛹虫草功能食品的最新研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 285-287.  
WANG YL, DAI LL, ZHAO YN, MA K. New development of food with *Cordyceps militaris* function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(11): 285-287 (in Chinese).
- [8] MONGKOLSAMRIT S, NOISRIPOOM W, THANAKITPIPATTANA D, WUTIKHUN T, SPATAFORA JW, LUANGSA-ARD J. Disentangling cryptic species with isaria-like morphs in *Cordycipitaceae*[J]. Mycologia, 2018, 110(1): 230-257.
- [9] 樊香萍, 张姝, 张永杰. 布莱克韦尔虫草的生物活性评价及其子实体的人工培育[J]. 菌物学报, 2022, 41(11): 1807-1818.  
FAN XP, ZHANG S, ZHANG YJ. Evaluation of biological activities and artificial cultivation of fruiting bodies of *Cordyceps blackwelliae*[J]. Mycosystema, 2022, 41(11): 1807-1818 (in Chinese).
- [10] 段东娥. 越南虫草科分类及系统发育研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019.  
DUAN DE. Taxonomy and phylogeny of *Cordycipitaceae* from Vietnam[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese).
- [11] BUSTIN SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2002, 29: 23-39.
- [12] GOMES AÉI, STUCHI LP, SIQUERIA NMG, HENRIQUE JB, VICENTINI R, RIBEIRO ML, DARREUX M, FERRAZ LFC. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using reverse transcription quantitative real-time PCR[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 9001.
- [13] 张越, 姚方杰, 孙文娟, 方明, 武春爽. 黑木耳实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 菌物学报, 2020, 39(8): 1510-1519.  
ZHANG Y, YAO FJ, SUN WJ, FANG M, WU CS. Screening of reference genes for qRT-PCR amplification in *Auricularia heimuer*[J]. Mycosystema, 2020, 39(8): 1510-1519 (in Chinese).
- [14] BAI B, REN J, BAI F, HAO L. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR[J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227927.
- [15] BOLLMANN F, CASPER I, HENKE J, PAUTZ A. qRT-PCR: a method and its difficulties[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2012, 385(10): 949-951.
- [16] DUŠANIĆ D, BOLHA L, NARAT M, OVEN I. Setting up a gene expression study for tissue cells by method of quantitative real-time PCR[J]. Acta Agriculturae Slovenica, 2012, 100(1): 19-28.
- [17] YANG YY, XU XY, JING ZH, YE J, LI H, LI XY, SHI L, CHEN MY, WANG TY, XIE BG, TAO YX. Genome-wide screening and stability verification of the robust internal control genes for RT-qPCR in filamentous fungi[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(9): 952.
- [18] 李兵, 刘柳, 单婷婷, 邢咏梅, 郭顺星. 蜜环菌 (*Armillaria mellea*) 内参基因的筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 473-482.  
LI B, LIU L, SHAN TT, XING YM, GUO SX. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR of *Armillaria mellea*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 473-482 (in Chinese).
- [19] 郑永钦, 郑正, 陈燕玲, 黄洪霞, 许美容. 柑橘黄龙病菌内参基因的筛选与评估[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2985-2995.  
ZHENG YQ, ZHENG Z, CHEN YL, HUANG HX, XU MR. Screening and evaluation of reference genes for *Candidatus Liberibacter asiaticus*[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2985-2995 (in Chinese).
- [20] MA R, XU S, ZHAO YC, XIA B, WANG R. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 536.
- [21] LI MY, WANG F, JIANG Q, WANG GL, TIAN C, XIONG AS. Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 313.
- [22] 苏强军, 夏樱霞, 谢放, Uwitugabiye VESTINE, 陈照禾, 周刚. 冬虫夏草菌实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 菌物学报, 2021, 40(7): 1712-1722.  
SU QJ, XIA YX, XIE F, VESTINE U, CHEN ZH, ZHOU G. Screening of the reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in *Ophiocordyceps sinensis*[J]. Mycosystema, 2021, 40(7): 1712-1722 (in Chinese).
- [23] LIAN TT, YANG T, LIU GJ, SUN JD, DONG CH. Reliable reference gene selection for *Cordyceps militaris* gene expression studies under different developmental stages and media[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 356(1): 97-104.
- [24] XIANG QJ, LI J, QIN P, HE ML, YU XM, ZHAO K, ZHANG XP, MA MG, CHEN Q, CHEN XQ, ZENG XF, GU YF. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR studies in *Lentinula edodes*[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190226.
- [25] 秦晓艺, 王杰. 杏鲍菇采后木质化相关基因实时定量 PCR 中内参基因的选择[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2015, 43(7): 219-227.  
QIN XY, WANG J. Selection of reference gene for quantitative real-time PCR analysis of lignification related genes in postharvest *Pleurotus eryngii*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2015, 43(7): 219-227 (in Chinese).
- [26] 武晨剑, 袁学文, 宋淋浩, 常明昌, 刘靖宇, 邓冰, 孟

- 俊龙. 金针菇实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 30-39.
- WU CJ, YUAN XW, SONG LH, CHANG MC, LIU JY, DENG B, MENG JL. Screening of reference genes for qRT-PCR amplification in *Flammulina filiformis*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(1): 30-39 (in Chinese).
- [27] XU J, XU ZC, ZHU YJ, LUO HM, QIAN J, JI AJ, HU YL, SUN W, WANG B, SONG JY, SUN C, CHEN SL. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Ganoderma lucidum*[J]. Current Microbiology, 2014, 68(1): 120-126.
- [28] de ALMEIDA MR, RUEDELL CM, RICACHENEVSKY FK, SPEROTTO RA, PASQUALI G, FETT-NETO AG. Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during *in vitro* adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill[J]. BMC Molecular Biology, 2010, 11: 73.
- [29] VANDESOMPELE J, de PRETER K, PATTYN F, POPPE B, van ROY N, de PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): RESEARCH0034.
- [30] ANDERSEN CL, JENSEN JL, ØRNTOFT TF. 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[J]. Cancer Research, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [31] PFAFFL MW, TICHOPAD A, PRGOMET C, NEUVIANS TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 509-515.
- [32] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method[J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1101-1108.
- [33] ZSÓRI KS, MUSZBEK L, CSIKI Z, SHEMIRANI AH. Validation of reference genes for the determination of platelet transcript level in healthy individuals and in patients with the history of myocardial infarction[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(2): 3456-3466.
- [34] 闫慧文, 关体坤, 张国庆, 陈青君. 皱环球盖菇实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 菌物学报, 2023, 42(6): 1298-1310.
- YAN HW, GUAN TK, ZHANG GQ, CHEN QJ. Screening of the reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Stropharia rugosoannulata*[J]. Mycosystema, 2023, 42(6): 1298-1310 (in Chinese).
- [35] 孟青艳, 尹荣华, 叶纯, 邱银生. 黄芩苷铝胁迫下产肠毒素大肠杆菌内参基因的筛选[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1160-1170.
- MENG QY, YIN RH, YE C, QIU YS. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in enterotoxigenic *Escherichia coli* exposed to baicalin-aluminum complexes[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1160-1170 (in Chinese).
- [36] ZARIVI O, CESARE P, RAGNELLI AM, AIMOLA P, LEONARDI M, BONFIGLI A, COLAFARINA S, POMA AM, MIRANDA M, PACIONI G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Périgord black truffle (*Tuber melanosporum*) developmental stages[J]. Phytochemistry, 2015, 116: 78-86.
- [37] ZHOU YH, ZHANG YJ, LUO ZB, FAN YH, TANG GR, LIU LJ, PEI Y. Selection of optimal reference genes for expression analysis in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during development, under changing nutrient conditions, and after exposure to abiotic stresses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 679-685.
- [38] TESTE MA, DUQUENNE M, FRANÇOIS JM, PARROU JL. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10: 99.
- [39] TAO YX, van PEER AF, HUANG QH, SHAO YP, ZHANG L, XIE B, JIANG YJ, ZHU J, XIE BG. Identification of novel and robust internal control genes from *Volvariella volvacea* that are suitable for RT-qPCR in filamentous fungi[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29236.