

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.02.5

# 孟氏隐唇瓢虫 qRT-PCR 分析中内参基因的筛选

潘 畅<sup>1</sup>, 张宇宏<sup>2</sup>, 庞 虹<sup>1\*</sup>

(1. 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 中山大学生命科学学院, 广州 510275;

2. 广东省昆虫研究所, 广东省农业害虫综合治理重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260)

**摘要:** 选择合适的内参基因是 qRT-PCR 研究的关键。本文以孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant 为研究材料, 利用 qRT-PCR 技术, 对孟氏隐唇瓢虫 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  $\beta$ -*tubulin* 的 mRNA 的表达量进行了分析, 并用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件分析它们在孟氏隐唇瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织中的表达稳定性。结果表明, 以成虫不同组织为材料时, 综合三种软件分析结果显示 4 个候选基因表达稳定性平均等级值排名为 *RPS23* (rank = 1) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 2.3) > *GAPDH* (rank = 3) > *Actin* (rank = 3.7), 以不同发育时期虫体为材料时, 综合分析结果显示 4 个候选内参基因表达稳定性平均等级值排名为 *RPS23* (rank = 1.7) > *Actin* (rank = 2) > *GAPDH* (rank = 2.7) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 3.7)。综合分析在瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织两种处理下, 三种软件的评价效果, 4 个候选基因表达稳定性等级值的总平均排名为 *RPS23* (rank = 1.3) > *Actin* (rank = 2.8) = *GAPDH* (rank = 2.8) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 3)。RPS23 在瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织中均显示出较高的表达稳定性及与其它基因之间极大的相关性, 可以确定为孟氏隐唇虫不同发育阶段及成虫不同组织基因表达分析中一个稳定表达的基因, 可作为单个内参基因或者其它内参基因的协同基因, 本实验为开展孟氏隐唇瓢虫功能基因表达分析奠定了方法学基础。

**关键词:** 孟氏隐唇瓢虫; qRT-PCR; 内参基因; 表达稳定性; GeNorm 软件; NormFinder 软件; BestKeeper 软件

中图分类号: Q963; S476

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 02-0261-10

## Selection of the reference genes for gene expression studies in *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant by qRT-PCR

PAN Chang<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Hong<sup>2</sup>, PANG Hong<sup>1\*</sup> (1. State Key Laboratory of Biocontrol, Ecology and Evolution, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

**Abstract:** Selection of suitable reference genes was a critical step in qRT-PCR analysis. In this study, by the method of qRT-PCR, the mRNA levels of four candidate reference genes such as *Actin*, *RPS23*, *GAPDH* and  $\beta$ -*tubulin* from *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant were assessed. The stability of above four candidate reference genes in different developmental stages and different adult tissues of *C. montrouzieri* were respectively ranked based on three softwares (GeNorm, NormFinder and BestKeeper). The results showed that, through comprehensive analysis of above three softwares, the mean rank values of the expression stability of above four candidate reference genes were *RPS23* (rank = 1) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 2.3) > *GAPDH* (rank = 3) > *Actin* (rank = 3.7) from *C. montrouzieri* in different adult tissues and *RPS23* (rank =

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2013CB127600); 国家自然科学基金面上项目 (31171899, 31572052); 国家自然科学基金项目 (31301720)

作者简介: 潘畅, 女, 1989 年生, 硕士, 研究方向为昆虫分子生物学与害虫生物防治, E-mail: dwpanchang@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: Lshpang@mail.sysu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-02-22; 接受日期 Accepted: 2016-03-17

1.7) > *Actin* (rank = 2) > *GAPDH* (rank = 2.7) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 3.7) from *C. montrouzieri* in different developmental stages. The average rank values of the expression stability of above four candidate reference genes were *RPS23* (rank = 1.3) > *Actin* (rank = 2.8) = *GAPDH* (rank = 2.8) >  $\beta$ -*tubulin* (rank = 3) in both experimental condition groups. In conclusion, *RPS23* can be determined to be a stable reference gene to be a single reference gene or cooperated reference gene in the gene expression of *C. montrouzieri* in different developmental stages or different adult tissues as it has the highest stability in both experimental conditions. The work done by this study provides methodological basis for further research on the expression of functional genes from *C. montrouzieri*.

**Key words:** *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant; qRT-PCR; reference genes; expression stability; GeNorm; NormFinder; BestKeeper

实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, qRT-PCR) 是在传统 PCR 基础上发展起来的一种新型核酸定量技术, 通过荧光信号对 PCR 全程进行实时监测, 既可应用于定性研究, 如杂合子、纯合子鉴定, SNPs (single nucleotide polymorphisms, 单核苷酸多态性) 分析等, 也可用于定量研究, 如计算基因拷贝数目、对病毒和病原菌进行分析等绝对定量研究以及 mRNA 表达量分析、基因芯片结果验证等相对定量研究 (Pfaffl *et al.*, 2004; Kubiś *et al.*, 2013; 郭长宁, 2014; Zeng *et al.*, 2014)。作为分子生物学领域的一次革命性飞跃, qRT-PCR 由于操作简单、灵敏度高、重复性好及高通量等优点而应用于植物 (黄雪玲等, 2012; 韩晓雪等, 2015; 张德辉等, 2015)、动物 (阙友雄等, 2009; Zhao *et al.*, 2011; 彭然, 2012; Zeng *et al.*, 2014; Kaszubowska *et al.*, 2015) 及微生物 (赵文静等, 2010; Kubiś *et al.*, 2013) 的基因表达、临床诊断或转录组分析研究中。其应用于昆虫转录组分析或者内参基因筛选研究也有报道 (Kim *et al.*, 2013; 郭长宁, 2014; 薛承美等, 2014; 袁森, 2014; 宋旺等, 2015)。

内参基因作为检测基因表达水平变化的参照物, 其能否在不同细胞或不同生理状态下稳定表达往往决定了 qRT-PCR 实验结果的准确与否。因此, 18S 核糖体 RNA (18S rRNA)、甘油醛-3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*)、转录延伸因子基因 (*EF*)、肌动蛋白基因 (*Actin*)、微管蛋白基因 (*Tubulin*)、组蛋白基因 (*H2A*)、多聚泛素酶基因 (*UBQ*)、核糖体蛋白基因 (*RPS*) 等组成性表达的看家基因常作为内参基因的首选, 因为它们或参与生物体基本生化代谢过程, 或是细胞器骨架的基本组成成分, 理论上能够在不同细胞或者生理状态下稳定表达。但大量实验结果表明, 看家

基因的表达稳定性只是在一定范围内的相对稳定 (王彦杰等, 2012), 同一看家基因的表达水平在不同物种或同一物种的不同组织、不同环境胁迫条件下可能存在较大的差异 (刘洪峰等, 2015; 郑夏生等, 2015; 张德辉等, 2015)。因此, 筛选出特定实验材料及特定实验条件下稳定表达的一个或多个内参基因尤为重要。

孟氏隐唇瓢虫 *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant 原产于澳大利亚, 属鞘翅目 Coleoptera 瓢虫科 Coccinellidae 小毛瓢虫亚科 Scymninae, 被广泛用来防治半翅目昆虫如粉蚧、螨、蚜虫、飞虱等 (Jayanthi *et al.*, 2014), 特别是在防治 *Pseudococcus* 属的粉蚧, 如石栗粉蚧 *Pseudococcus* sp. (庞雄飞, 1979) 和湿地松粉蚧 *Oracella acuta* (Lobedell) (汤才等, 1995) 方面取得显著成功。利用 qRT-PCR 技术对孟氏隐唇瓢虫转录组分析 (张宇宏, 2012; Li *et al.*, 2015) 或基因表达 (Zhang *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2015) 研究已有报道, 但对内参基因的挖掘仍属空白。

本研究选取了孟氏隐唇瓢虫不同发育时期 (2 龄幼虫、3 龄幼虫、4 龄幼虫、蛹期幼虫、雌性成虫、雄性成虫) 及成虫不同组织 (头、胸、腹、翅) 共 10 份实验材料, 利用 qRT-PCR 检测了来自转录组数据库的 4 个看家基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  $\beta$ -*tubulin* 在孟氏隐唇瓢虫不同发育时期及成虫不同组织中的表达水平, 并利用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件评估了各候选基因的表达稳定性, 不仅得到了在代表性实验条件下的相对稳定水平, 而且筛选出在两种典型处理下均能够稳定表达的内参基因 *RPS23*, 这对孟氏隐唇瓢虫后续的基因表达研究提供了参考依据, 具有重要的实用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 供试昆虫

孟氏隐唇瓢虫在中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室于 25℃ ± 1℃, 14L:10D, RH = 60% ± 10% 条件下, 用南瓜上的柑橘粉蚧 *Planococcus citri* Risso 饲养 (李丽英, 1993)。

随机取 2 龄幼虫、3 龄幼虫、4 龄幼虫、蛹期幼虫各 10 头, 雌性成虫、雄性成虫各 3 头, 液氮处理后迅速置于 -80℃ 保存备用; 随机取成虫 20 头, 分别取其头、胸、腹及翅, 液氮处理后迅速置于 -80℃ 保存备用。

#### 1.1.2 主要试剂

第一链合成试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix, 荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagen 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 引物由华大科技 (深圳) 公司合成, 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取与纯化

按照 Trizol Reagen 说明书的要求, 分别提取孟氏隐唇瓢虫不同发育时期及成虫不同组织 10 份样品的总 RNA, 并用 DNA 酶处理, 去除基因组 DNA 的污染。用 Thermo Scientific™ 核酸分析仪分别测定总 RNA 的浓度及纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。所得产物直接用于下一步或者于 -80℃ 保存。

#### 1.2.2 cDNA 第一条链的合成

按照第一链合成试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书的要求, 于 0.2 mL PCR 管中配制 10 μL 反应体系: 总 RNA 少于 500 ng, 5 × PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) 2 μL, 加 RNase-Free H<sub>2</sub>O 补足到 10 μL。轻柔混匀后, 37℃ 15 min, 85℃ 变性 5 s, 反应结束后用 Easy Dilution 稀释到合适倍数, 所得产物直接用于下一步反应或者于 -20℃ 保存。

#### 1.2.3 内参基因的获得及引物设计

参考相关的文献报导 (董晓丽等, 2009; 王彦杰等, 2012; 苏晓娟等, 2013; Xie *et al.*, 2015), 根据本实验建立的孟氏隐唇瓢虫转录组文库 (Genbank 登录号为 SRR343064) (张宇宏, 2012), 选取了 4 个传统的看家基因, 通过 Primer Express 3.0 软件设计 qRT-PCR 的引物, 候选内参基因及其引物信息见表 1。

表 1 Real-time PCR 检测中所用 4 个候选内参基因及引物序列

Table 1 Four candidate reference genes and their primer sequences used in Real-time PCR analysis

基因名称	基因全称	基因序列号	引物序列 (5'-3')	扩增子 (bp)
Gene name	Gene full name	Accession number	Primer sequences	Amplicon size
<i>Actin</i>	肌动蛋白 Actin	KU513758	<i>Actin</i> - F: ACCCATGTAATACCTGTGGCTGAA <i>Actin</i> - R: GTAATGTTGCGACCGCAATAG	99
<i>RPS23</i>	核糖体蛋白 23 Ribosomal protein 23	KU513760	<i>RPS23</i> - F: ACAAGGGCTGCTGACTGAT <i>RPS23</i> - R: CCTTCGGAGGAAAGGCTCA	100
<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	KU513759	<i>GAPDH</i> - F: TCCCATGTATGTCTGTGGTGTCA <i>GAPDH</i> - R: TGGTGGTGCAGGAAGCATTG	101
<i>β-tubulin</i>	β-微管蛋白 Beta tubulin	AD124738.1	<i>Tubulin</i> - F: CACGGAAGGTACTTACTGTGTTG <i>Tubulin</i> - R: GCTGCTGTTCTTGTGTTGGATG	108

#### 1.2.4 内参基因的荧光定量反应

按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书的要求, 并通过梯度 qRT-PCR 的扩增结果, 调整模板、引物浓度及引物退火温度, 获得最佳反应条件。反应体系为: 10 μL

SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 ×), 少于 100 ng cDNA 模板, ROX Reference Dye II 终浓度为 1 ×, 上下游引物 (10 μM) 各 0.8 μL, 补足去离子水至 20 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 20 s, 40 个循环, 延伸阶段

收集信号,从 55℃ 到 95℃,每个循环增加 0.5℃,持续 0.05 s 获得解链温度,采集融解曲线荧光信号,每个样品 3 个生物学重复,并设置阴性对照及空白对照。

### 1.2.5 引物扩增效率验证和标准曲线的绘制

取孟氏隐唇瓢虫头部 cDNA 样品为模板,用 Easy Dilution 依次稀释 6 个梯度,每个梯度稀释 4 倍,cDNA 初始浓度分别为 1、1/4、1/16、1/64、1/256、1/1024,每个反应设 3 次生物学重复,按 1.2.4 的反应体系及反应程序进行反应。标准曲线相关系数,斜率等系列参数通过 Stratagene Mx 3000P 仪器自带计算软件得到。

### 1.2.6 数据处理与分析

利用比较循环阈值 (Cycle Threshold, CT) 法,分析 4 个候选内参基因在不同处理下的表达水平,每个处理都设置 3 个生物学重复。根据公式  $Q = E^{\Delta CT}$ ,利用 Excel 2003 计算各基因的相对定量  $Q$ 。其中  $E$  为基因扩增效率 (一般情况下将基因扩增设为理想扩增, $E$  默认为 2), $\Delta CT = CT_{\min} - CT_{\text{样品}}$  ( $CT_{\min}$  为所有样品中最低 CT 值, $CT_{\text{样品}}$  为每个样品的 CT 值) (孙美莲等,2010; 张力等,2013; 郑夏生等,2015)。

利用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个内参基因评价软件分析 4 个候选内参基因的表达稳定性,并平衡三种软件的评价效果,筛选出不同发育时期及成虫不同组织处理下,qRT-PCR 分析中最优的内参基因。利用 SPSS 19.0 单因素方差 (one-way ANOVA) 进行不同样品之间的差异显著性分析 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取与纯化

按照 Trizol Reagen 说明书的要求,分别提取不同发育时期及成虫不同组织样品的总 RNA。用 Thermo Scientific™ 核酸分析仪测定总 RNA 的浓度及纯度 (表 2), $A_{260/280} \approx 1.8 - 2.1$ , $A_{260/230} > 2.0$ ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,条带清晰,无 DNA 及其它杂质污染,28S 与 18S 条带比值大于 1:1,符合下一步实验的要求。

### 2.2 内参基因引物的特异性检测

取孟氏隐唇瓢虫成虫头部 qRT-PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测表明,4 个候选内参基因扩增产物长度与预期一致 (图 1),融解曲线显

示为单一峰,说明无引物二聚体,无非特异性扩增,不添加模板的阴性对照没有采集到荧光信号,每个待测样品的 PCR 扩增曲线重复性非常好,说明 qRT-PCR 的结果是可靠的。

表 2 孟氏隐唇瓢虫不同发育时期和成虫不同组织总 RNA 质量

Table 2 Quality of total RNA extracted from different developmental stages and different adult tissues from *Cryptolaemus montrouzieri*

	$A_{260/280}$	浓度 (ng/ $\mu$ L) Concentration
成虫组织 Adult tissues		
头 Head	1.846	206
胸 Breast	1.964	254
腹 Belly	1.967	956
翅 Wing	1.967	280
发育阶段 Developmental stages		
2 龄幼虫 Second instar	1.947	148
3 龄幼虫 Third instar	2.047	528
4 龄幼虫 Fourth instar	2.023	352
蛹期幼虫 Pupa	1.948	378
雄性成虫 Male adult	1.900	152
雌性成虫 Female adult	1.892	246

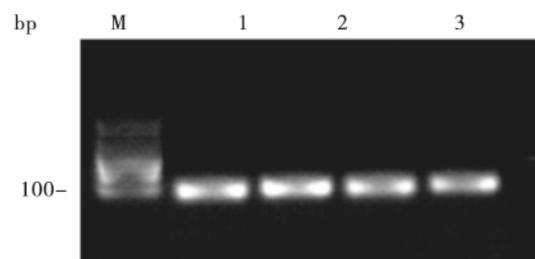


图 1 孟氏隐唇瓢虫成虫头部 qRT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis of the qRT-PCR products of reference genes in adult head from *Cryptolaemus montrouzieri*

M, DL2000 DNA 标记; 1, 肌动蛋白; 2, 核糖体蛋白 23; 3, 甘油醛-3-磷酸甘油醛脱氢酶; 4,  $\beta$ -微管蛋白。M, DL2000 DNA marker; 1, *Actin*; 2, *RPS23*; 3, *GAPDH*; 4,  $\beta$ -*tubulin*.

### 2.3 标准曲线的绘制

4 个候选内参基因引物扩增的标准曲线见

表 3, 结果显示, 4 个候选内参基因的标准曲线相关系数  $R^2$  变化范围为 0.990 - 0.999, 说明它们线性关系很好, 扩增效率变化范围为 94.3% - 111.4%, 且 4 个内参基因的熔解曲线只呈现单一的信号峰, 符合 qRT-PCR 的实验要求。

表 3 Real-time PCR 分析中 4 个候选内参基因相关参数  
Table 3 The parameters derived from qRT-PCR analysis of four candidate reference genes

基因	标准曲线斜率	相关系数 ( $R^2$ )	扩增效率 (%)
Gene	Slop	Correlation	Efficient
<i>Actin</i>	-3.467	0.990	94.3
<i>RPS23</i>	-3.075	0.992	111.4
<i>GAPDH</i>	-3.229	0.999	104.0
<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	-3.237	0.997	103.7

## 2.4 内参基因在转录水平的表达

用比较循环阈值 (cycle threshold, CT) 法分析四个候选内参基因在不同处理下的表达水平, 基因的表达丰度越高, CT 值越小, 反之 CT 值

越大。

结果显示, 本实验两种处理条件下, 四个候选内参基因的表达水平都有一定的变化, 但各个候选内参基因的表达水平在 3 个重复之间的变异都很小。在孟氏隐唇瓢虫成虫不同组织实验中 (图 2A), 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  *$\beta$ -tubulin* 的 CT 值变化范围分别是 24 - 28、24 - 27、20 - 23 和 20 - 24, 均呈中度表达, 且 *Actin* 表达丰度相对较低。*Actin*、*RPS23* 和  *$\beta$ -tubulin* 3 个候选内参基因呈现出从翅 - 胸 - 头 - 腹, 表达丰度依次升高的规律。在孟氏隐唇瓢虫不同发育时期实验中 (图 2B), 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  *$\beta$ -tubulin* 的 CT 值变化范围分别是 23 - 29、22 - 29、18 - 24 和 17 - 23, *GAPDH* 和  *$\beta$ -tubulin* 表达丰度相对较高, *Actin* 和 *RPS23* 表达丰度相近, 推测可以将 *Actin* 和 *RPS23* 作为组合基因, 各候选内参基因的表达丰度无一定的规律。由结果推测, 孟氏隐唇瓢虫的发育时期及成虫组织类型可能影响这些内参基因表达丰度的高低。

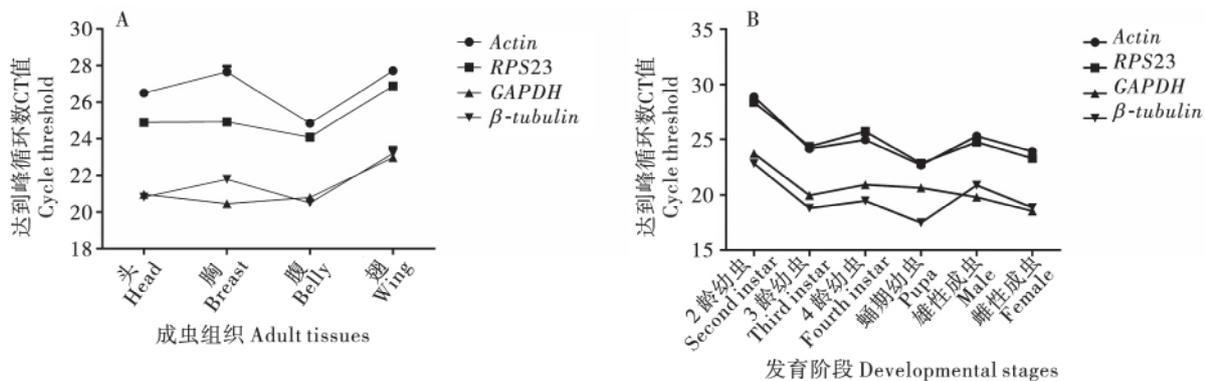


图 2 孟氏隐唇瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织中 4 个候选内参基因 CT 值的比较

Fig. 2 CT values of four candidate reference genes in different developmental stages and different adult tissues from *Cryptolaemus montrouzieri*

## 2.5 内参基因的表达稳定性分析

### 2.5.1 GeNorm 软件的评价效果

GeNorm 软件研究的是样品中每个基因相对量比率的变化 (韩晓雪等, 2015), 根据基因相对表达量  $Q$  计算其表达稳定度  $M$ ,  $M$  值越小, 稳定性越强。此外, 还可根据引入 1 个新的内参基因后标准化因子 (normalization factor) 的配对差异 (pairwise variation)  $V$  值进行配对差异分析 ( $V_{n/n+1}$ ), 从而判定所需内参基因的最适数目 (胡瑞波等, 2009; 阙友雄等, 2009; 袁伟, 2012)。

默认的  $M$  取值为 1.5,  $M$  值小于 1.5 的内参基因认为相对较稳定; 默认的  $V$  值为 0.15, 如果  $V_{n/n+1}$  大于 0.15, 则有必要引入第  $n+1$  个基因, 反之, 则不必引入新的内参基因。

GeNorm 结果表明, 在成虫不同组织实验中, 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  *$\beta$ -tubulin* 的  $M$  值分别为 1.024、0.601、0.858 和 0.636, 均小于 1.5, 说明 4 个候选内参基因均较为稳定, 且表达稳定度由高到低为  $RPS23 > \beta$ -tubulin  $> GAPDH > Actin$  (图 3A),  $V_{2/3} = 0.196 >$

0.15 且  $V_{3/4} = 0.251 > 0.15$  (图 3C), 说明需要引入第 5 个内参基因。在不同发育时期实验中, *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  $\beta$ -*tubulin* 的 M 值分别为 1.005、0.963、1.346 和 1.377, 均小于 1.5, 说

明 4 个候选内参基因均较为稳定, 且表达稳定度由高到低为  $RPS23 > Actin > GAPDH > \beta$ -*tubulin* (图 3B),  $V_{2/3} = 0.383 > 0.15$  且  $V_{3/4} = 0.317 > 0.15$  (图 3D), 说明需要引入第 5 个内参基因。

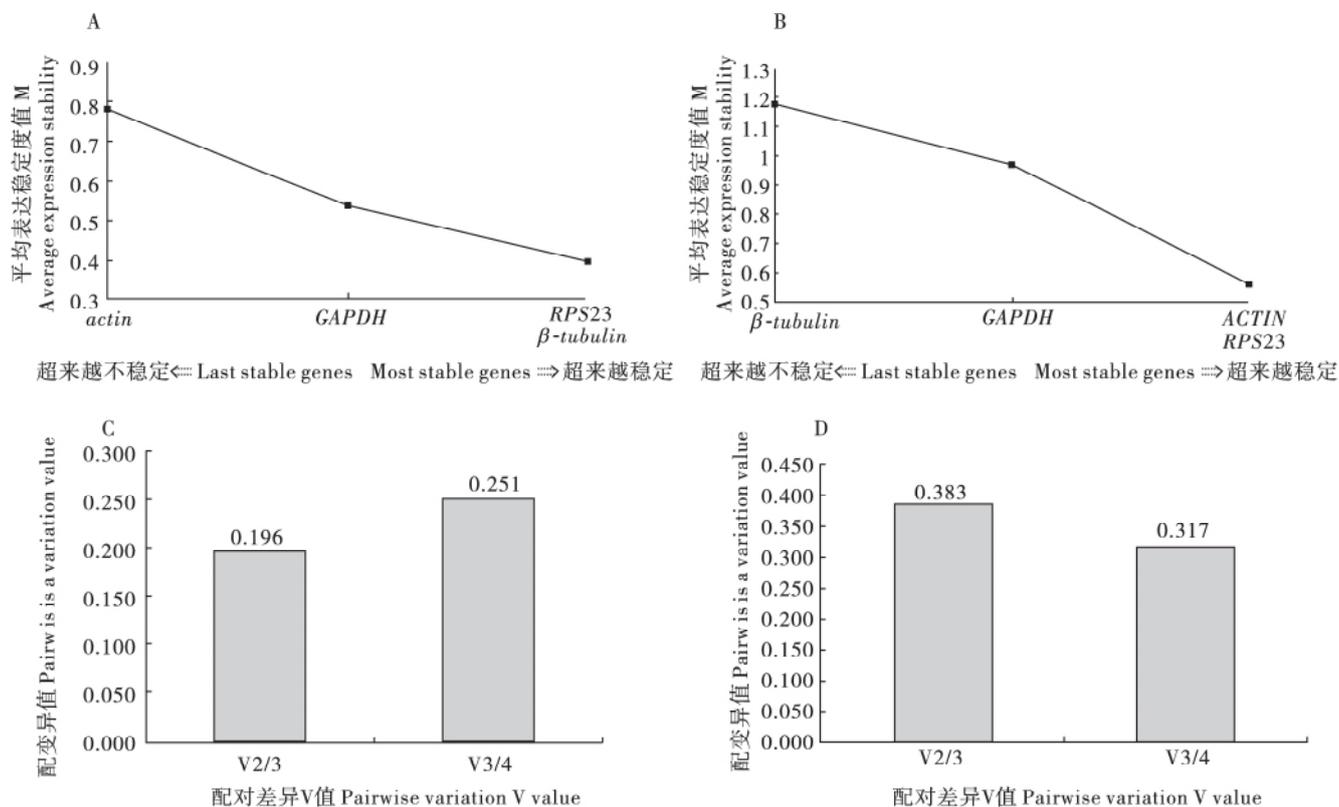


图 3 孟氏隐唇瓢虫不同发育时期及成虫不同组织 4 个候选内参基因表达水平 M 值的比较和最适内参基因数目判定

Fig. 3 Average expression stability values and determination of the ideal number of reference genes for normalization of four candidate reference genes in different developmental stages and different adult tissues from *Cryptolaemus montrouzieri*

### 2.5.2 NormFinder 软件的评价效果

NormFinder 是基于方差分析评价内参基因在不同样品中的稳定性。其工作原理和 GeNorm 相同, 软件根据相对表达量  $Q$  计算出基因表达稳定指数  $M$ ,  $M$  值越小, 基因表达越稳定。但与 GeNorm 软件不同之处在于, NormFinder 软件无法确定所需内参基因的最适数目。

NormFinder 结果显示 (表 4), 在成虫不同组织实验中, 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  $\beta$ -*tubulin* 的  $M$  值分别为 0.257、0.078、0.343 和 0.116, 均较为稳定, 且表达稳定度由高到低为  $RPS23 > \beta$ -*tubulin*  $> Actin > GAPDH$ , 若选择单个基因作为内参, 则 *RPS23* 基因是合适的; 在不同发育时期实验中, 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和  $\beta$ -*tubulin* 的  $M$  值分别为 0.083、0.069、0.413 和 0.330, 均较为稳定, 且表达稳定

度由高到低为  $RPS23 > Actin > \beta$ -*tubulin*  $> GAPDH$ , 若选择单个基因作为内参, 则 *RPS23* 基因是合适的。

### 2.5.3 Bestkeeper 软件的评价效果

BestKeeper 软件是在 EXCEL 基础上建立起来的软件, 可直接根据样品的 CT 值进行统计标准误差 (standard deviation)、变异系数 (coefficient of variation)、相关性系数  $R$  (correlation coefficient) 等分析, 进而确定最适内参基因。该软件计算相对表达量的公式为  $Q = 2^{-\Delta\Delta CT}$ , 并用 Tukey 法检验处理间的差异显著性 (Pfaffl *et al.*, 2004)。

SD 或者 CV 越小, 认为该基因在不同样品或者重复样品之间的稳定性高, 适合作为单个内参基因。 $R$  越大, 认为该基因的表达与其它基因的相关性越大, 常常考虑作为协同基因,  $SD > 1$  视为不可接受。由 BestKeeper 分析结果可见 (表 5),

表 4 NormFinder 软件分析获得的 4 个候选内参基因的稳定性 M 排序

Table 4 The ranking order of the expression stability values (M) of four candidate reference genes by NormFinder

基因 Gene	成虫不同组织 Different adult tissues		不同发育时期 Different developmental stages	
	稳定度 ± 标准误 (M ± SE)	稳定度排名	稳定度 ± 标准误 (M ± SE)	稳定度排名
	M value ± Standard error	Stability rank	M value ± Standard error	Stability rank
<i>Actin</i>	0.257 ± 0.128	3	0.083 ± 0.151	2
<i>RPS23</i>	0.078 ± 0.154	1	0.069 ± 0.175	1
<i>GAPDH</i>	0.343 ± 0.151	4	0.413 ± 0.140	4
<i>β-tubulin</i>	0.116 ± 0.124	2	0.330 ± 0.123	3

表 5 4 个候选内参基因表达稳定性的 BestKeeper 软件统计分析

Table 5 Descriptive statistics of four candidate reference genes based on their cycle threshold values analyzed by BestKeeper

基因 Gene	几何平均值 Geometric Mean	算术平均值 Arithmetic mean	最小值 Min	最大值 Max	标准误 SD	变异系数 CV	相关系数 R	P 值 P value	稳定性等级 Stability rank
成虫不同组织 Different adult tissues									
<i>Actin</i>	26.66	26.68	24.75	28.00	1.01	0.038	0.808	0.001	4
<i>RPS23</i>	25.17	25.19	24.03	26.97	0.85	0.034	0.988	0.001	1
<i>GAPDH</i>	21.28	21.30	20.40	23.00	0.83	0.039	0.862	0.001	2
<i>β-tubulin</i>	21.55	21.58	20.47	23.56	0.91	0.042	0.974	0.001	3
不同发育时期 Different developmental stages									
<i>Actin</i>	24.91	24.99	22.32	29.00	1.41	0.057	0.986	0.001	2
<i>RPS23</i>	24.82	24.89	22.80	28.39	1.44	0.058	0.982	0.001	3
<i>GAPDH</i>	20.55	20.61	18.51	23.87	1.16	0.057	0.869	0.001	1
<i>β-tubulin</i>	19.65	19.72	17.24	22.93	1.42	0.072	0.939	0.001	4

在孟氏隐唇瓢虫成虫不同组织实验中, 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和 *β-tubulin* 的 SD 分别是 1.01、0.85、0.83 和 0.91, CV 值分别为 0.038、0.034、0.039 和 0.042, 综合分析两者, 它们的表达稳定度由高到低为 *RPS23* > *GAPDH* > *β-tubulin* > *Actin*, 且 *Actin* 的 SD = 1.01 > 1, 视为不可接受作为内参基因。在孟氏隐唇瓢虫成虫不同发育时期实验中, 4 个候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和 *β-tubulin* 的 SD 分别是 1.41、1.44、1.16 和 1.42, 均大于临界值 1, 故均视为不可接受作为内参基因。

#### 2.5.4 综合评价效果

为了平衡 3 种软件的排名结果, 将 4 种候选内参基因 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 和 *β-tubulin* 在 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种软件中表达稳定性等级进行了平均值分析 (表 6), 平均等级值是 3 种软件分析出的稳定性等级的平均值。在孟氏隐唇瓢虫成虫不同组织实验中, 3 种软件分析

结果略有差异, 但 *RPS23* 和 *β-tubulin* 稳定性排名相同分列第一和第二, 综合 3 种软件分析结果, 4 个候选基因表达稳定性平均等级值排名为 *RPS23* (rank = 1) > *β-tubulin* (rank = 2.3) > *GAPDH* (rank = 3) > *Actin* (rank = 3.7), *RPS23* 表达最稳定。在孟氏隐唇瓢虫不同发育时期实验中, 3 种软件分析结果有差异, 但 *RPS23* 和 *Actin* 均显示出较高的稳定性, 综合分析结果显示 4 个候选内参基因表达稳定性平均等级值排名为 *RPS23* (rank = 1.7) > *Actin* (rank = 2) > *GAPDH* (rank = 2.7) > *β-tubulin* (rank = 3.7), *RPS23* 表达最稳定。综合 2 种处理, 4 个候选内参基因表达稳定性等级值的总平均排名为 *RPS23* (rank = 1.3) > *Actin* (rank = 2.8) = *GAPDH* (rank = 2.8) > *β-tubulin* (rank = 3), *RPS23* 表达最稳定, *Actin* 和 *GAPDH* 次之, *β-tubulin* 最不稳定, 因此本研究认为, *RPS23* 可以作为孟氏隐唇虫在不同发育时期及成虫不同组织处理实验中基因表达分析的内参基因。

表 6 4 个候选基因在全部实验条件下的稳定性等级排序

Table 6 Overall stability rank of four candidate reference genes in all experimental conditions

基因 Gene	成虫不同组织 Different adult tissues			均等级 Mean rank	不同发育时期 Different developmental stages			平均等级 Mean rank	总平均等级 Average rank
	GeNorm	NormFinder	BestKeeper		GeNorm	NormFinder	BestKeeper		
	<i>Actin</i>	4	3	4	3.7	2	2	2	2
<i>RPS23</i>	1	1	1	1	1	1	3	1.7	1.3
<i>GAPDH</i>	3	4	2	3	3	4	1	2.7	2.8
<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	2	2	3	2.3	4	3	4	3.7	3

### 3 结论与讨论

qRT-PCR 技术作为定量分析 mRNA 表达中一种通用、高效且简单的方法，具有极强的灵敏性和特异性，但它对 RNA 质量和完整性、模板 cDNA 质量、酶、引物的特异性、内参基因的表达稳定性以及实验操作等要求严格。一个微小的失误都可能造成实验结果的差异，影响实验结果，甚至得到相反的结论。内参基因能够对实验结果进行校正，使各种误差统一化和标准化。因此，在 qRT-PCR 实验之前，筛选出在特定实验材料及特定实验条件下稳定表达的内参基因至关重要。

18S rRNA 也是 qRT-PCR 分析中的常用内参基因，但其不包括 ploy (A) 尾，在以 oligo (dT) 为引物的 cDNA 合成中不能被逆转录 (陈凤花, 2005) 且由于 18S rRNA 特异引物不仅能以 18S rRNA 为模板还能以 18S rDNA 为模板扩增出目的条带，因此对样本纯度要求很高 (王冲等, 2006)，也有研究发现，能在昆虫不同处理条件下稳定表达的基因有 *Tubulin*, *RPS*, *GAPDH*, *Actin* 和 *EF*，而 18S rRNA 相对不稳定 (岳秀利等, 2013; 陈芳和陆永跃, 2014; 郭长宁, 2014; 宋旺等, 2015)，因此本实验中选取了 *Actin*、*RPS23*、*GAPDH* 及  *$\beta$ -tubulin* 作为待研究的内参基因。

早先的内参基因稳定性评价软件有 REST (relative expression software tool)，其工作原理和 BestKeeper 相同，但缺点在于最多只能比较 1 个内参基因和 1 个目标基因的 16 种不同处理 (Pfaffl *et al.*, 2002)。BestKeeper 则可以比较 10 个内参基因和 10 个目标基因的 100 种不同处理 (Pfaffl *et al.*, 2004)。目前发展比较成熟的内参基因稳定

性评价软件有 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper。在本研究中，3 种软件的分析结果并不完全一致，这种现象在其它物种研究中也存在 (陈芳和陆永跃, 2014; 郑夏生等, 2015)，这可能与 3 种软件的算法及评价指标不同有关，但三种分析结果一致之处在于，无论是在孟氏隐唇瓢虫不同发育时期还是成虫不同组织实验中，*RPS23* 均是表达稳定性最高的基因，鉴于它与其它内参基因的相关性也大，本次研究可以确定把 *RPS23* 作为孟氏隐唇瓢虫不同发育阶段及成虫不同组织 qRT-PCR 分析中的单个内参基因或者其它内参基因的协同基因，这为孟氏隐唇瓢虫基因表达研究奠定了基础，也为进一步研究孟氏隐唇瓢虫在不同环境胁迫下的表达差异提供了参考。

### 参考文献 (References)

- Chen F, Lu YY. Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (10): 1146–1154. [陈芳, 陆永跃. 热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (10): 1146–1154]
- Chen FH, Wang L, Hu LH. Reference gene selection in real-time quantitative reverse transcription PCR [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2005, 23 (5): 393–395. [陈凤花, 王琳, 胡丽华. 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的选择 [J]. 临床检验杂志, 2005, 23 (5): 393–395.]
- Dong XL, Wang JQ, Bo DP, *et al.* The reviews of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36 (9): 83–85. [董晓丽, 王加启, 卜登攀, 等. 内参基因在实时定量 PCR 中的应用的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36 (9): 83–85]
- Guo CL. Cloning and Stability Analysis of Reference Gene from *Phyllonorycter Ringoniella* [D]. Master Dissertation. Northwest A. and F. University, 2014, 68. [郭长宁. 金纹细蛾内参基因克隆分析及稳定性评价 [D]. 硕士论文. 西北农林科技大学, 2014, 68]

- Han XX, Han JX, Jiang J. Screening the reference genes for the studies of quantitative real-time RT-PCR in tomato under abiotic stress [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13 (4): 822 – 831. [韩晓雪, 韩佳轩, 姜晶. 番茄在非生物胁迫下实时定量 RT-PCR 中内参基因的筛选 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (4): 822 – 831]
- Huang XL, Feng H, Kang ZS. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Puccinia Striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20 (2): 181 – 187. [黄雪玲, 冯浩, 康振生. 小麦条锈菌实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20 (2): 181 – 187]
- Hu RB, Fan CM, Fu YF. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11 (6): 30 – 36. [胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11 (6): 30 – 36]
- Jue YX, Xu LP, Xu JS, et al. Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in sugarcane [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30 (3): 274 – 278. [阙亚雄, 许莉萍, 徐景升, 等. 甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 热带作物学报, 2009, 30 (3): 274 – 278]
- Jayanthi PDK, Rajinikanth R, Ravishankar KV, et al. Influence of eGMP on feeding potential of predatory Coccinellid, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant and isolation of partial foraging gene [J]. *Journal of Insect Behavior*, 2014, 27 (3): 385 – 394.
- Kubiś P, Materniak M, Kuźmak J. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 194 (1–2): 94 – 101.
- Kaszubowska L, Wierzbicki PM, Karsznia S, et al. Optimal reference genes for qPCR in resting and activated human NK cells-flow cytometric data correspond to qPCR gene expression analysis [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2015, 422: 125 – 129.
- Kim EJ, Bauer C, Grevelding CG, et al. Improved PCR/nested PCR approaches with increased sensitivity and specificity for the detection of pathogens in hard ticks [J]. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2013, 4 (5): 409 – 416.
- Li HS, Jin MJ, Ślipiński A, et al. Genetic differentiation in native and introduced populations of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) and its implications for biological control programs [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2015, 108 (4): 743 – 747.
- Li LY. The research and application prospects of *Cryptolaemus montrouzieri* in China [J]. *Natural of Enemies of Insects*, 1993, 15 (3): 142 – 152. [李丽英. 我国孟氏隐唇瓢虫研究与应用展望 [J]. 昆虫天敌, 1993, 15 (3): 142 – 152]
- Liu HF, Gao LX, Hu YH. Reference genes discovery and selection for quantitative real-time PCR in tree peony seed and petal tissue of different development stages [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23 (12): 1639 – 1648. [刘洪峰, 高乐旋, 胡永红. 牡丹不同发育阶段种子和花瓣组织实时荧光定量 PCR 中内参基因的挖掘与筛选 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23 (12): 1639 – 1648]
- Li S, Gul Y, Wang WM, et al. PPAR $\gamma$ , an important gene related to lipid metabolism and immunity in *Megalobrama amblycephala*: Cloning, characterization and transcription analysis by geNorm [J]. *Gene*, 2013, 512 (2): 321 – 330.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best keeper-excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (6): 509 – 515.
- Prafl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST $\text{®}$ ) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (9): e36 – e36.
- Peng R. Analysis of Reference Genes Expression for Real Time PCR based on Relative Quantitative and Dual Spike-in Strategy in the Silkworm *Bombyx mori* [D]. Soochow University Master Dissertation, 2012, 78. [彭然. 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 [D]. 苏州大学硕士论文, 2012, 78]
- Pang XF, Li LY. Studies on the *Cryptolaemus montrouzieri* setting control of mealbug harm in Guangzhou and other places [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1979, 1 (3): 50. [庞雄飞, 李丽英. 孟氏隐唇瓢虫在广州等地定居控制石粟粉蚧的危害 [J]. 昆虫天敌, 1979, 1 (3): 50]
- Sun W. Expression Characteristic of Esterase Genes Suffering the Stress of Pesticide in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) [D]. Southwest University Master Dissertation, 2010, 71. [孙伟. 药剂胁迫下朱砂叶螨酯酶基因的表达特征 [D]. 西南大学硕士论文, 2010, 71]
- Su XJ, Fan BG, Yuan LC, et al. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of gene expression in *Populus trichocarpa* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2013, 48 (5): 507 – 518. [苏晓娟, 樊保国, 袁丽钗, 等. 实时荧光定量 PCR 分析中毛果杨内参基因的筛选和验证 [J]. 植物学报, 2013, 48 (5): 507 – 518]
- Song W, Wang XJ, Guo RJ, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Dastarcus helphoroides* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24 (2): 156 – 161. [宋旺, 王小纪, 郭瑞坚, 等. 花绒寄甲荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 西北农业学报, 2015, 24 (2): 156 – 161]
- Sun ML, Wang YS, Yang DQ, et al. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, 45 (5): 579 – 587. [孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2010, 45 (5): 579 – 587]
- Tang C, Ren SX, Pang XF, et al. Study on the *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, feeding on loblolly pine mealybug *Oracella acuta* (Lobdel) [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1995, 17 (1): 9 – 12. [汤才, 任顺祥, 庞雄飞, 等. 孟氏隐唇瓢虫捕食湿地松粉蚧的研究 [J]. 昆虫天敌, 1995, 17 (1): 9 – 12]
- Wang YJ, Dong L, Zhang C, et al. Reference gene selection for real-

- time quantitative PCR normalization in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20 (5): 521–528. [王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20 (5): 521–528]
- Wang C, Chen JS, Hong J, et al. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of three lily viruses using 18S rRNA as internal control [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36 (3): 204–211. [王冲, 陈集双, 洪健, 等. 以 18S rRNA 为内参照的多重 RT-PCR 检测 3 种百合病毒 [J]. 植物病理学报, 2006, 36 (3): 204–211]
- Xue CM, Xie TN, Ye SD, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Pandora neoaphidis* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22 (12): 1575–1583. [薛承美, 解廷娜, 叶素丹, 等. 利用实时荧光定量 PCR 筛选新蚜虫病毒内参基因 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22 (12): 1575–1583]
- Xie JQ, Patrick De Clercq, Pan C, et al. Larval nutrition-induced plasticity affects reproduction and gene expression of the ladybeetle, *Cryptolaemus montrouzieri* [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2015, 15 (1): 1–9.
- Yuan M. Selection of Potential Reference Genes in *Nilaparvata lugens* and the Molecular Characterization of Arginine Kinase Gene [D]. Huazhong Agricultural University PhD Dissertation, 2014, 128. [袁淼. 褐飞虱内参基因的筛选及精氨酸激酶基因的分子特性研究 [D]. 华中农业大学博士论文, 2014, 128]
- Yuan W, Wan HJ, Yang YJ. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47 (4): 427–436. [袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学通报, 2012, 47 (4): 427–436]
- Yue XL, Gao XJ, Wang JJ, et al. Selection of reference genes and study of the expression levels of detoxifying enzymes of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) [J]. *Science Agricultura Sinica*, 2013, 46 (21): 4542–4549. [岳秀丽, 高新菊, 王进军, 等. 二斑叶螨内参基因的筛选及解毒酶基因的表达水平 [J]. 中国农业科学, 2013, 46 (21): 4542–4549]
- Zhao WJ, Xu J, Bao QH, et al. Selection of reference gene for real-time quantitative PCR [J]. *Microbiology China*, 2010, 37 (12): 1825–1829. [赵文静, 徐洁, 包秋华, 等. 实时荧光定量 PCR 中内参基因的选择 [J]. 微生物学通报, 2010, 37 (12): 1825–1829]
- Zheng XS, Ye GB, Ji XY, et al. Selection of reference gene for real-time PCR study in *Ilex asprella* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36 (6): 1119–1124. [郑夏生, 叶国兵, 纪晓宇, 等. 岗梅实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 热带作物学报, 2015, 36 (6): 1119–1124]
- Zhang L, Yu XY, Fu HY, et al. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Lorpetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29 (10): 11–17. [张力, 于晓英, 符红艳, 等. 红花檵木实时荧光定量 PCR 分析内参基因的选择 [J]. 中国农学通报, 2013, 29 (10): 11–17]
- Zhang YH. Transcriptome Analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant under Different Stresses Based on High-throughput Sequencing [D]. Sun Yat-sen University PhD Dissertation, 2012, 144. [张宇宏. 基于高通量测序的逆境胁迫下的孟氏隐唇瓢虫转录组分析 [D]. 中山大学博士论文, 2012, 144]
- Zhang DH, Sun YL, Zhao L, et al. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Medicago lupulina* under zinc stress [J]. *China Environmental Science*, 2015, 35 (3): 833–838. [张德辉, 孙亚丽, 赵亮等. 天蓝苜蓿锌胁迫下实时定量 PCR 内参基因筛选 [J]. 中国环境科学, 2015, 35 (3): 833–838]
- Zeng CJ, He L, Peng WP, et al. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (1): 113–121.
- Zhao YH, Gul Y, Li S, et al. Cloning, identification and accurate normalization expression analysis of PPAR $\alpha$  gene by geNorm in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31 (3): 462–468.
- Zhang YH, Jiang RX, Wu HS, et al. Next-generation sequencing-based transcriptome analysis of *Cryptolaemus montrouzieri* under insecticide stress reveals resistance-relevant genes in ladybirds [J]. *Genomics*, 2012, 100 (1): 35–41.