

刘志成,张钧博,方正,等.甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的克隆及其表达稳定性分析[J].江苏农业科学,2022,50(17):53-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.009

甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的克隆及其表达稳定性分析

刘志成¹,张钧博¹,方正¹,吴庆珊¹,翁庆北^{1,2}

(1. 贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550001; 2. 黔南民族师范学院,贵州都匀 558000)

摘要: *U6* snRNA 是真核生物主要剪接体的重要组分,在不同物种中保守且表达水平稳定。为评估甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) *U6* snRNA 是否适合作为 miRNA (microRNA) 定量表达检测内参基因,本研究通过克隆甜菜夜蛾 *U6* snRNA 全长序列,分析其进化保守性及与其他物种 *U6* snRNA 的系统进化关系,并进一步探究除虫菊提取物、高温培养和甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 感染胁迫下 *U6* snRNA 的表达稳定性。结果表明,克隆的甜菜夜蛾 *U6* snRNA 全长 107 nt。多序列比对和系统进化分析表明,不同物种 *U6* snRNA 具较高保守性,甜菜夜蛾 *U6* snRNA 与其他鳞翅目昆虫的系统进化关系最近。利用终浓度为 LC_{50} 的除虫菊提取物或 36 °C 高温培养胁迫处理 Se301 细胞,以及 SeMNPV 感染甜菜夜蛾幼虫 (72 h),*U6* snRNA 均表达稳定。研究结果可为甜菜夜蛾 miRNA 表达检测内参基因的选择提供依据。

关键词: 甜菜夜蛾; *U6* snRNA; 克隆; 表达稳定性; 小 RNA; 内参基因

中图分类号: S433.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)17-0053-06

在真核生物基因转录后加工过程中,核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 通过与剪接体蛋白组装成主要剪接体 (major spliceosome) 和次要剪接体 (minor spliceosome),在该过程中发挥着重要的作用^[1-3]。*U6* snRNA 作为真核生物主要剪接体的重要组分,其结构高度动态,形成主要剪接体的大部分催化核心,通过与其他 snRNA、前 mRNA 底物 (pre-mRNA) 和超过 25 个蛋白质伴侣有序的相互作用,保证 mRNA 剪接过程的顺利进行^[4]。

研究基因和 microRNA (miRNA) 在特定条件下的表达是挖掘它们生物学功能的重要手段之一^[5]。反转录定量 PCR (reverse transcription-quantitative PCR, RT-qPCR) 作为一种常用的基因表达检测方法也广泛应用于鉴定各物种 miRNA 的表达^[6-7]。在 RT-qPCR 试验中,为了校正试验过程中由于

RNA 质量、反转录效率和 PCR 酶扩增效率等因素造成的试验误差^[8],通常使用肌动蛋白基因 (*actin*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (*GAPDH*) 和 18S rRNA 基因等表达稳定的管家基因作为内参基因^[5]。但由于这些基因远大于 miRNA,不适合作为 miRNA RT-qPCR 检测的内参基因。已有报道表明,*U6* snRNA 在不同物种中十分保守,序列较小,且在生物体内各种细胞中的表达水平相对稳定,因而被广泛用于各物种 miRNA RT-qPCR 的内参基因^[9-11]。

甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 属于鳞翅目 (Lepidoptera) 夜蛾科 (Noctuidae) 昆虫,作为一种杂食性害虫,可危害茄果类、瓜类、绿叶菜类等超过 80 多种农作物,具有食量大、破坏性强、繁殖速度快等特点,对每年世界各地农业生产造成重大损失^[12-13]。对甜菜夜蛾生长发育机制和病原免疫机制的了解对开发有效的甜菜夜蛾防治措施具有重要意义。近年来,许多研究发现 miRNA 通过调节靶基因的表达影响昆虫的生长发育和病毒-宿主相互作用^[14-17]。因此,研究 miRNA 在甜菜夜蛾生长发育和抗杆状病毒机制中的作用对该害虫的防治具有重要意义。目前已报道多种昆虫 miRNA 的表达研究中使用 *U6* snRNA 作为内参基因^[18-20]。但迄今,甜菜夜蛾的 *U6* snRNA 序列及其作为内参基因的研究尚未见报道。

收稿日期:2021-11-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31760537);贵州省微生物-植物互作及代谢调控科技创新人才团队项目(编号:黔科合平台人才[2019]5617号);贵州省优秀青年科技人才项目(编号:黔科合平台人才[2019]5655号)。

作者简介:刘志成(1995—),男,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事杆状病毒-昆虫相互作用中 miRNA 功能研究。E-mail:liuzc95@163.com。

通信作者:翁庆北,博士,教授,主要从事杆状病毒潜伏感染分子生物学及微生物资源开发研究。E-mail:wengqb@126.com。

本研究从 Se301 细胞基因组的测序注释数据中筛选甜菜夜蛾 *U6* snRNA, 克隆其全长序列, 并进行系统进化分析。进一步地分析除虫菊提取物、高温培养和甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 感染胁迫下 *U6* snRNA 的表达稳定性。本研究旨在为甜菜夜蛾 miRNA 表达检测时内参基因的选择提供了依据, 为甜菜夜蛾 miRNA 功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甜菜夜蛾、Se301 细胞与 SeMNPV 甜菜夜蛾幼虫购自河南省济源白云实业有限公司。甜菜夜蛾细胞系 Se301 细胞^[21]由荷兰瓦赫宁根大学的 Just M. Vlak 教授惠赠, SeMNPV-US1 (SeMNPV 美国加利福尼亚分离株) 由美国加州大学 Riverside 分校的 Brian. A. Federici 教授惠赠。

1.1.2 试剂 Grace 完全培养基 (Gibco) 购自于赛默飞世尔科技有限公司。小 RNA 提取试剂盒 (miRNA Kit) 购于 OMEGA 公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、miRNA 反转录试剂盒 (miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit) 和 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒 [miRcute Plus miRNA qPCR Detection Kit (SYBR Green)] 购于天根生化科技 (北京) 有限公司。高保真 DNA 聚合酶 (PrimeSTAR Max DNA 聚合酶) 和 A-T 克隆试剂盒 (DNA A-Tailing Kit 和 pMD 18-T Vector Cloning Kit) 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京擎科生物科技有限公司。99.8% 除虫菊提取物原药购自上海易恩化学技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 25 cm² 细胞培养瓶中接种 1.5×10^6 个 Se301 细胞, 加入 Grace 完全培养基 5 mL, 置 27 °C 细胞培养箱中培养约 5 d, 待细胞密集程度约 90% 时, 进行细胞传代。

1.2.2 小 RNA 提取与 cDNA 合成 2020 年 12 月分别取笔者所在实验室培养的 Se301 细胞 1×10^6 个或甜菜夜蛾幼虫血淋巴 150 μ L, 按照 miRNA 提取试剂盒说明书提取细胞或血淋巴的小 RNA, 微孔紫外分光光度计检测小 RNA 浓度和纯度后, 置于 -80 °C 保存。以提取的小 RNA 为模板, 利用 miRNA 反转录试剂盒进行 miRNA 反转录获得 cDNA。

1.2.3 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 克隆 根据甜菜夜蛾

Se301 细胞基因组测序数据 (笔者所在实验室未公开发表) 注释设计甜菜夜蛾 *U6* snRNA 全长序列扩增引物对, *U6*-F (GTACTTGCTTCGGCAGTACATAT) 和 *U6*-R (AAAAATGTGGAACGCTTCACGA)。以 Se301 细胞小 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增甜菜夜蛾 *U6* snRNA 全长序列, 反应体系如下: cDNA 1 μ L, *U6*-F 和 *U6*-R (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 2 \times PrimeSTAR Max Premix 10 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 反应程序: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 57 °C 20 s, 72 °C 10 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 连接 pMD18-T 载体, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。经菌落 PCR 鉴定后, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.4 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的多序列比对与系统进化分析 使用 MEGA7 软件的 Clustal W 算法对甜菜夜蛾等不同物种的 *U6* snRNA 进行多序列比对, GeneDoc 进行展示。使用 MEGA7 软件的最大似然法 (Maximum Likelihood Tree) 构建系统发育树, 重复抽样检测 1 000 次。

1.2.5 除虫菊提取物处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响 铺 1×10^6 个 Se301 细胞于直径 35 mm 的细胞培养皿中, 贴壁过夜。加入含除虫菊提取物终浓度为半数致死浓度 (lethal concentration 50, LC₅₀) 的培养基溶液, 孵育 24 h, 提取细胞小 RNA, 反转录为 cDNA。以不含除虫菊提取物的培养基溶液培养细胞为空白对照, 按 miRNA 荧光定量试剂盒说明书, 荧光定量 PCR 方法分析 *U6* snRNA 表达情况。

1.2.6 高温处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响 铺 1×10^6 个 Se301 细胞于直径 35 mm 的细胞培养皿中, 贴壁过夜。分别置于 36 °C 和 27 °C 条件下培养 1 h 后, 收取细胞样品, 提取小 RNA, 反转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 方法分析 *U6* snRNA 的表达情况。

1.2.7 SeMNPV 感染对甜菜夜蛾 *U6* snRNA 表达的影响 选取发育状态良好的 4 龄甜菜夜蛾幼虫 20 头, 用带有 SeMNPV 多角体 (2×10^4 个/幼虫) 的人工饲料喂食, 以加无菌水的人工饲料喂食幼虫为对照。72 h 后收取幼虫血淋巴, 提取小 RNA, 反转录为 cDNA, 荧光定量 PCR 方法定量分析 *U6* snRNA 的表达情况。

1.2.8 统计与分析 使用 SPSS 21.0 软件对试验结果进行独立样本 t 检验分析。数据作图采用 GraphPad Prism 7 软件。

2 结果与分析

2.1 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的克隆

从笔者所在课题组的甜菜夜蛾 Se301 细胞的基因组测序数据的注释结果中筛选到了甜菜夜蛾 *U6* snRNA, 其序列为(5'→3'): GUACUUGCUUCGGCAG UACAUAUACUAAAAUUGGAACGAUACAGAGAAG AUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGGAUGACACGCA AAAUCGUGAAGCGUCCACAUUUUU, 共 107 nt。提取 Se301 细胞小 RNA, 通过 RT-PCR 扩增甜菜夜蛾 *U6* snRNA。结果显示, 以 Se301 细胞 cDNA 和 DNA 为模板, PCR 均扩增出约 107 nt 的目的条带, 与预期大小相符(图 1)。

回收目的片段, 连接 pMD18-T 载体并转化大

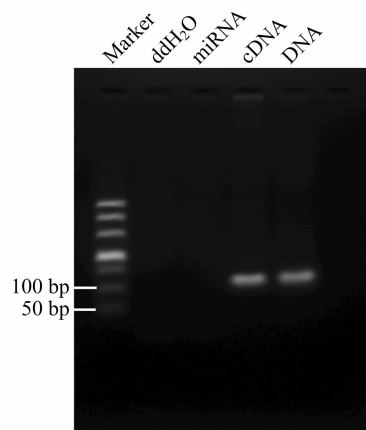
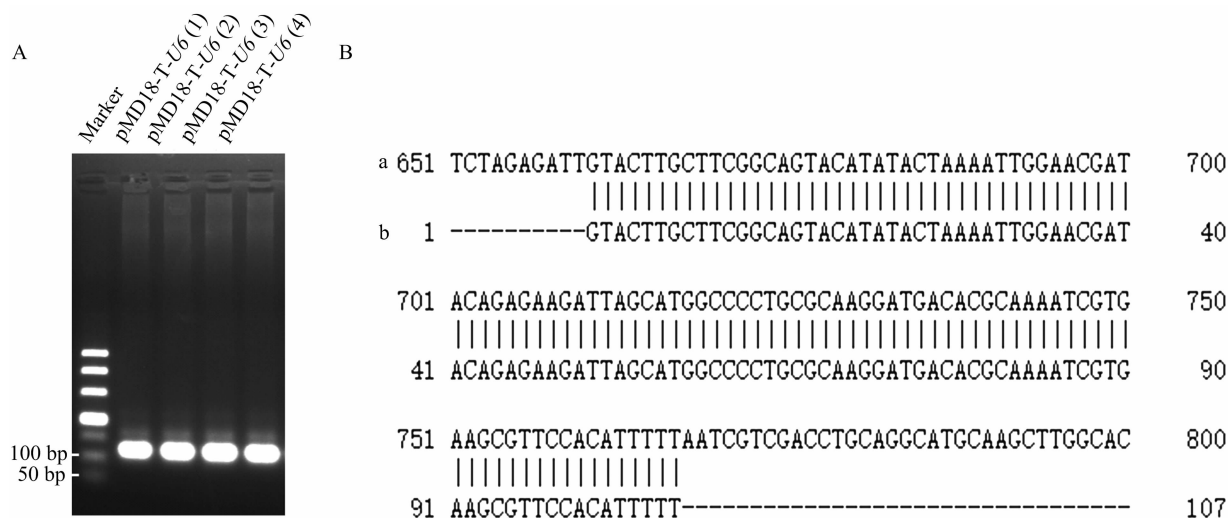


图1 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的 RT-PCR 电泳

肠杆菌 DH5 α 感受态。使用 *U6*-F/*U6*-R 引物进行菌落 PCR 鉴定, 结果见图 2-A。挑取阳性克隆, 重组质粒 pMD18-T-*U6* 的测序结果表明克隆的 *U6* snRNA 与 Se301 细胞基因组测序注释结果中 *U6* snRNA 的序列一致(图 2-B)。



(A)pMD18-T-*U6* 菌落 PCR 鉴定电泳图; (B)pMD18-T-*U6* 测序结果的序列比对,

a 为 pMD18-T-*U6*, b 为 Se301 细胞基因组测序数据中的 *U6* snRNA

图2 pMD18-T-*U6* 菌落 PCR 鉴定电泳图和测序结果

2.2 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的保守性与系统进化分析

通过 MEGA7 软件对甜菜夜蛾的 *U6* snRNA 进行系统进化分析。将克隆分析得到的甜菜夜蛾 *U6* snRNA 与从 GenBank 中搜索获得的人 *Homo sapiens* (NR_004394.1)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, X06669.1)、家蚕 (*Bombyx mori*, AY649381.1)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*, KF307745.1)、褐色桔蚜 (*Aphis citricidus*, KX638479.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NR_141593.1)、庆

网蛱蝶 (*Melitaeta cinxia*, JX878560.1)、小鼠 (*Mus musculus*, X06980.1)、四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*, X53790.1) 和非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, NR_033272.1) 的 *U6* snRNA 序列进行多序列比对, 结果见图 3。多序列比对结果表明 *U6* snRNA 在不同物种中是高度保守的。

对不同物种 *U6* snRNA 的系统进化分析表明, 甜菜夜蛾的 *U6* snRNA 与家蚕、小菜蛾和庆网蛱蝶这 3 个鳞翅目昆虫的 *U6* snRNA 进化关系最近, 说明甜菜夜蛾 *U6* snRNA 与其他鳞翅目昆虫 *U6* snRNA

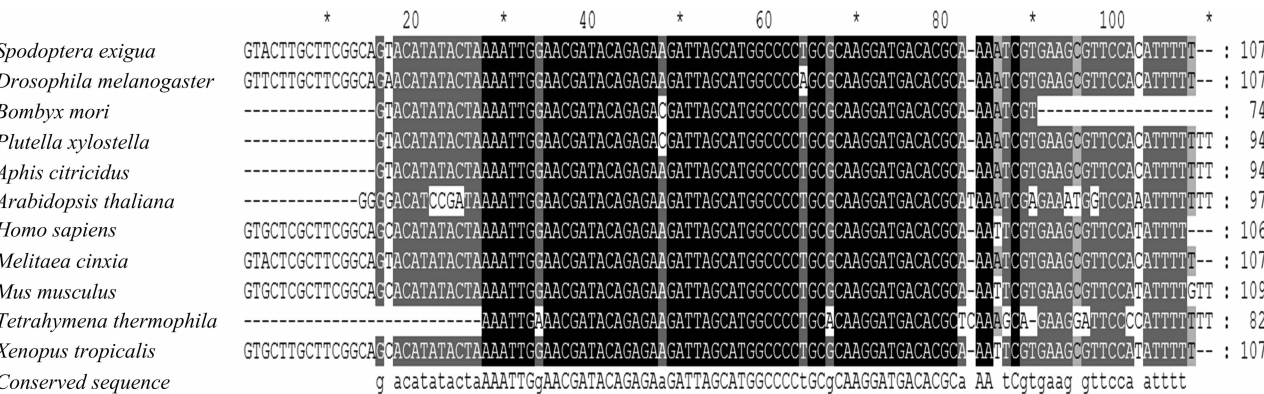


图3 不同物种 *U6* snRNA 的多序列比对

同源性最高。此外,鳞翅目昆虫的 *U6* snRNA 的同源性,与同为昆虫纲物种的褐色橘蚜和黑腹果蝇也比较高。在系统进化分析中可以看出由于甜菜夜蛾 *U6* snRNA 与四膜虫 *U6* snRNA 的系统进化关系

最远,其 *U6* snRNA 同源性最低,结果见图 4。该结果反映了甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的系统进化情况,进一步证实甜菜夜蛾 *U6* snRNA 序列的正确性。

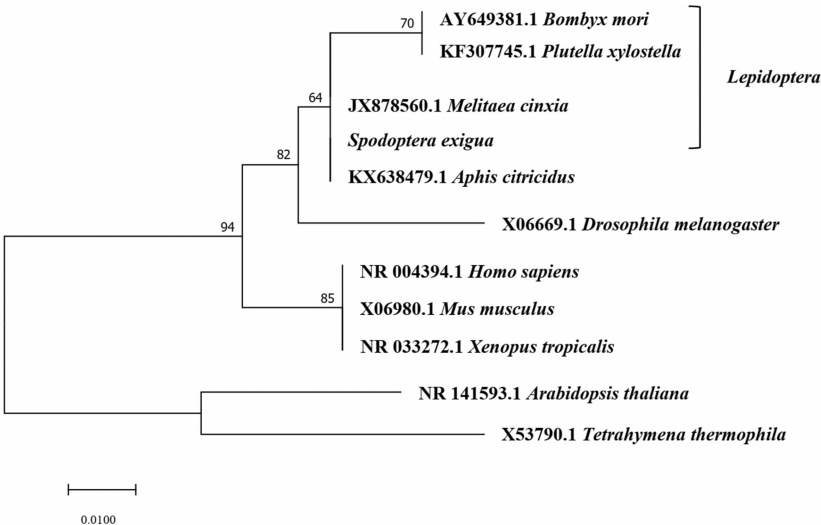
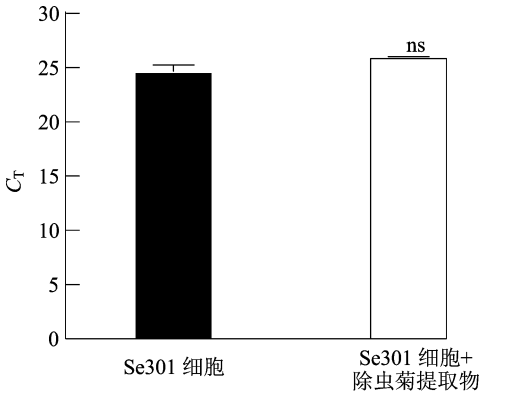


图4 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 的系统进化分析

2.3 除虫菊提取物处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响

分析除虫菊提取物农药胁迫下,Se301 细胞中 *U6* snRNA 的表达稳定性。前期分析测定表明,除虫菊提取物处理 Se301 的 LC_{50} 为 0.29% (体积分数)。使用含 0.29% (体积分数)除虫菊提取物培养基处理 Se301 细胞后 24 h,提取细胞小 RNA,RT-qPCR 检测 *U6* snRNA 表达结果显示(图 5),除虫菊提取物处理细胞 (C_T 值为 26.00)与无药物处理的 Se301 细胞对照 (C_T 值为 24.67)中 *U6* snRNA 表达量相当。表明除虫菊提取物 LC_{50} 浓度处理对 Se301 细胞中 *U6* snRNA 的表达无显著影响 ($P = 0.057 > 0.05$)。



柱上标注 * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; ns 代表没有显著性差异。下图同

图5 除虫菊提取物处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响

2.4 高温处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响

检测高温培养 (36 °C) 对 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响。结果表明, Se301 细胞在 36 °C 和 27 °C 培养 1 h 后, 细胞 *U6* snRNA 的表达量相当, C_T 值分别为 25.04 和 25.06 (图 6)。表明 36 °C 高温处理 1 h 对 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达无显著影响 ($P = 0.935 > 0.05$)。

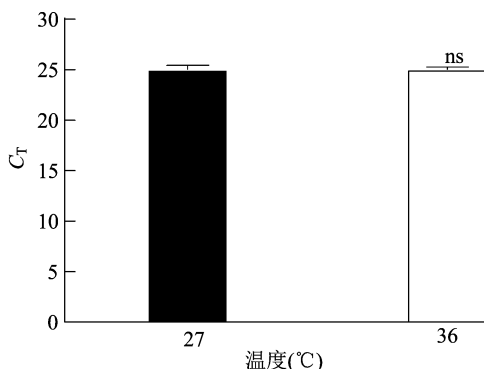


图6 高温处理对甜菜夜蛾 Se301 细胞中 *U6* snRNA 表达的影响

2.5 SeMNPV 感染对甜菜夜蛾 *U6* snRNA 表达的影响

进一步探究生物胁迫 SeMNPV 病毒感染对甜菜夜蛾 *U6* snRNA 表达的影响。收集 SeMNPV 病毒感染 4 龄甜菜夜蛾幼虫 72 h 后的血淋巴, 提取小 RNA, RT-qPCR 检测 *U6* snRNA 的表达。结果表明, SeMNPV 病毒感染对甜菜夜蛾血淋巴中 *U6* snRNA 的表达无显著影响 ($P = 0.345 > 0.05$), 其中, SeMNPV 感染甜菜夜蛾试验组的 C_T 值为 24.03, 未感染的甜菜夜蛾对照组 C_T 值为 23.70, 结果见图 7。

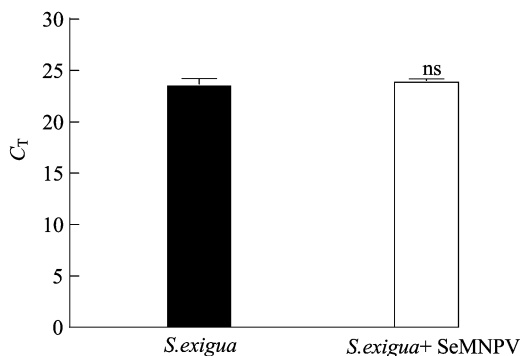


图7 SeMNPV 感染对甜菜夜蛾 *U6* snRNA 表达的影响

3 讨论与结论

U6 snRNA 作为主要剪接体的重要组分, 在各

种真核生物细胞中的表达较为稳定, 常被用作昆虫等物种 miRNA 表达检测的内参基因^[4,19,22-23]。本研究克隆甜菜夜蛾的 *U6* snRNA 序列, 分析其系统进化关系以及在不同胁迫条件下的表达稳定性, 为其作为内参基因的使用提供依据。

本研究克隆获得全长为 107 nt 的甜菜夜蛾 *U6* snRNA 序列。与已报道的果蝇等其他物种序列相同, 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 3' 末端为 5 个 U 的特殊终止序列, 符合 RNA 聚合酶 III 的转录产物特征^[4,24]。由于基因转录后加工的可变剪接在真核生物中是普遍存在的, *U6* snRNA 作为主要剪接体的重要组分, 在不同真核生物中的进化保守性高^[25]。进化分析表明甜菜夜蛾 *U6* snRNA 与家蚕、小菜蛾和庆网蛱蝶这 3 个鳞翅目昆虫及同翅目昆虫褐橘蚜的 *U6* snRNA 亲缘关系最近。目前昆虫 *U6* snRNA 序列克隆报道尚不多, *U6* snRNA 在夜蛾科及昆虫纲中的保守性和进化关系有待更多物种的 *U6* snRNA 序列分析研究。

选择在不同生理和环境条件下都能稳定表达的内参基因对定量分析结果的准确性十分重要^[26-27]。封冰等研究发现小菜蛾 *U6* snRNA 在幼虫各发育阶段和马拉硫磷等 9 种农药的胁迫下能稳定表达^[10]。已报道 *U6* snRNA 作为内参基因用于果蝇、家蚕、草地贪夜蛾和褐飞虱等昆虫 miRNA 表达检测^[18,20,23,28]。本研究利用除虫菊提取物处理、36 °C 高温培养和 SeMNPV 感染处理, 细胞或幼虫受胁迫条件下, 甜菜夜蛾 *U6* snRNA 表达均未受到显著影响, 能稳定表达。结果表明甜菜夜蛾 *U6* snRNA 适合作为内参基因用于甜菜夜蛾细胞和昆虫 miRNA 表达定量检测的内参基因, 以校正因样品处理和试验操作等原因造成的试验误差。进一步可分析 *U6* snRNA 在甜菜夜蛾不同发育时期、不同组织细胞、不同病原菌侵染和不同时相等条件下的表达稳定性。

参考文献:

- [1] Bessonov S, Anokhina M, Will C L, et al. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core[J]. Nature, 2008, 452 (7189): 846-850.
- [2] Tarn W Y, Steitz J A. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron *in vitro*[J]. Cell, 1996, 84 (5): 801-811.
- [3] Dietrich R C, Padgett R A, Shukla G C. The conserved 3' end domain of *U6atac* snRNA can direct *U6* snRNA to the minor

- spliceosome[J]. RNA,2009,15(6):1198–1207.
- [4] Didychuk A L, Butcher S E, Brow D A. The life of *U6* small nuclear RNA, from cradle to grave[J]. RNA,2018,24(4):437–460.
- [5] 杨 婷, 薛珍珍, 李 娜, 等. 铁十字秋海棠斑叶发育过程内参基因筛选及验证[J]. 园艺学报,2021,48(11):1–12.
- [6] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research,2005,33(20):e179.
- [7] Forero D A, González-Giraldo Y, Castro-Vega L J, et al. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs[J]. Biotechniques,2019,67(4):192–199.
- [8] 易小哲, 邬 兰, 向 丽, 等. 艾 *Artemisia argyi* 实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 中国中药杂志,2022,47(3):659–667.
- [9] Wu W, Ren Q P, Li C J, et al. Characterization and comparative profiling of MicroRNAs in a sexual dimorphism insect, *Eupolyphaga sinensis* Walker[J]. PLoS One,2013,8(4):e59016.
- [10] 封 冰, 梁 沛, 高希武. 小菜蛾 *U6* snRNA 基因的克隆及作为 miRNA 定量表达分析内参基因的评价[J]. 昆虫学报,2014,57(3):286–292.
- [11] 朱云芬, 韩威, 苏一军, 等. 两种内参基因在鸡循环 miRNA 相对定量检测中的比较分析[J]. 中国家禽,2016,38(24):18–21.
- [12] Smaghe G, Pineda S, Carton B, et al. Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Pest Management Science,2003,59(11):1203–1209.
- [13] 李国华, 宋元园. 上海地区有机蔬菜甜菜夜蛾的综合防治技术[J]. 上海蔬菜,2021(4):50–51,55.
- [14] Tang Q, Qiu L P, Li G H. Baculovirus-encoded microRNAs: a brief overview and future prospects[J]. Current Microbiology,2019,76(6):738–743.
- [15] 吴 萍. MicroRNA 在昆虫-病毒互作中的作用研究进展[J]. 江苏科技大学学报(自然科学版),2016,30(2):183–188.
- [16] 柴连琴, 王 乐, 苗迎春. miRNA 对完全变态昆虫发育的调控作用研究进展[J]. 河南农业科学,2015,44(8):13–16.
- [17] Hyun S, Lee J H, Jin H, et al. Conserved microRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K[J]. Cell,2009,139(6):1096–1108.
- [18] Shi X J, Ran Z H, Li S S, et al. The effect of microRNA *bantam* on baculovirus AcMNPV infection *in vitro* and *in vivo*[J]. Viruses,2016,8(5):136.
- [19] Kang L Q, Wang M L, Cao X L, et al. Inhibition of expression of BmNPV *cg30* by bmo-miRNA-390 is a host response to baculovirus invasion[J]. Archives of Virology,2018,163(10):2719–2725.
- [20] Chen J, Liang Z K, Liang Y K, et al. Conserved microRNAs miR-8-5p and miR-2a-3p modulate chitin biosynthesis in response to 20-hydroxyecdysone signaling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology,2013,43(9):839–848.
- [21] Hara K, Funakoshi M, Kawarabata T. A cloned cell line of *Spodoptera exigua* has a highly increased susceptibility to the *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus[J]. Canadian Journal of Microbiology,1995,41(12):1111–1116.
- [22] Duan Z Y, Cai G Y, Li J J, et al. *U6* can be used as a housekeeping gene for urinary sediment miRNA studies of IgA nephropathy[J]. Scientific Reports,2018,8(1):10875.
- [23] Monsanto-Hearne V, Asad S, Asgari S, et al. *Drosophila* microRNA modulates viral replication by targeting a homologue of mammalian *cJun*[J]. Journal of General Virology,2017,98(7):1904–1912.
- [24] Martin M P, Gerlach V L, Brow D A. A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast *U6* RNA gene is altered[J]. Molecular and Cellular Biology,2001,21(19):6429–6439.
- [25] Brow D A, Guthrie C. Spliceosomal RNA *U6* is remarkably conserved from yeast to mammals[J]. Nature,1988,334(6179):213–218.
- [26] Bustin S A, Beaulieu J F, Huggett J, et al. MIQE précis: practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments[J]. BMC Molecular Biology,2010,11:74.
- [27] Su Y, He W B, Wang J, et al. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in the Mediterranean species of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex[J]. Journal of Economic Entomology,2013,106(3):1446–1455.
- [28] Wu P, Shang Q, Dweteh O A, et al. Over expression of bmo-miR-2819 suppresses BmNPV replication by regulating the *BmNPV ie-1* gene in *Bombyx mori*[J]. Molecular Immunology,2019,109:134–139.