

УДК 577.218

ОТБОР ЭТАЛОННЫХ ГЕНОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ RT-qPCR У *MUSCA DOMESTICA* L. (DIPTERA: MUSCIDAE)

К. С. Крестовина*, А. Д. Мельничук

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра Тюменского научного центра Сибирского отделения РАН (ул. Институтская, 2, Тюмень, Россия, 625041), *krutko.k.s@hotmail.com

Насекомые-вредители являются одной из основных угроз для сельскохозяйственной деятельности. Традиционно противодействие им осуществляется химическими средствами защиты (инсектицидами). Однако в их применении находят множество недостатков, основным из которых является токсикологическое воздействие на нецелевые объекты, снижение биоразнообразия и развитие резистентности у насекомых-вредителей. Для комплексной борьбы с ними необходимо знать особенности популяций – их фенотипический и генотипический состав. Сегодня молекулярно-генетические исследования все чаще используются в оценке стабильности популяций, особенно методы RT-qPCR. Однако данный метод требует внимательного подбора референсных генов. В большинстве исследований обозначаются гены, экспрессия которых изменилась в ответ на некоторое воздействие, но практически не раскрывается, в отношении каких генов производилась нормализация генов-мишеней и проводилась ли предварительная оценка стабильности эталонных генов. Наше исследование осуществлялось на *Musca domestica*. Обладая коротким жизненным циклом и высоким репродуктивным потенциалом, комнатная муха часто служит модельным организмом для изучения популяционных процессов и механизмов инсектицидной устойчивости у насекомых. В настоящее время в научных базах данных мало информации о подборе референсных генов для исследования экспрессии генов указанного объекта. В настоящей работе было протестировано четыре гена-кандидата – *RPS18*, *EF-1*, *18S*, *GAPDH* для оценки уровня транскриптов на трех линиях модельного организма *Musca domestica*. Анализ наиболее стабильных эталонных генов для 55 образцов проводился в программе RefFinder, которая использует несколько алгоритмов оценки референсных генов: Delta Ct, BestKeeper, NormFinder и geNorm. По результатам исследования наиболее надежным признан ген *EF-1*.

Ключевые слова: популяция; экспрессия генов; референсные гены; *Musca domestica*; инсектициды; резистентность

Для цитирования: Крестовина К. С., Мельничук А. Д. Отбор эталонных генов для нормализации RT-qPCR у *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) // Труды Карельского научного центра РАН. 2024. doi: 10.17076/eb1870

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках проекта №122122800052-9.

K. S. Krestonoshina*, A. D. Melnichuk. SELECTION OF REFERENCE GENES FOR RT-qPCR NORMALIZATION IN *MUSCA DOMESTICA* L. (DIPTERA: MUSCIDAE)

All-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology – Branch of Federal State Institution, Federal Research Centre, Tyumen Scientific Centre of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (2 Institutskaya St., 625041 Tyumen, Russia), *krutko.k.s@hotmail.com

Insect pests are one of the major threats to agricultural activities. Chemical pesticides (insecticides) are commonly used to combat them. However, use of chemical pesticides has many disadvantages, the main ones are the toxicological effect on non-target objects, a decrease in biodiversity and resistance development in insect pests. A comprehensive insect pests control requires the knowledge of the populations features – their phenotypic and genotypic composition. Molecular genetic studies are becoming widely used in assessing populations stability, especially RT-qPCR methods. This method nevertheless needs careful selection of reference genes. Most studies identify genes which expression has changed in response to some stimulus, but little or no information is given about which genes were normalized to the target genes or whether the stability of the reference genes was previously assessed. This study was conducted on *Musca domestica*. With a short life cycle and high reproductive potential, the housefly often serves as a model organism for studying population processes and studying the mechanisms of insecticide resistance in insects. Current scientific databases lack information about the reference genes selection for studying the gene expression of the given object. In the study, four candidate-genes (*RPS18*, *EF-1*, *18S*, *GAPDH*) were tested to assess transcript levels in three lines of the model organism *Musca domestica*. Analysis of the most stable reference genes for 55 samples was carried out in the RefFinder program, which uses several reference gene evaluation algorithms: Delta Ct, BestKeeper, NormFinder and geNorm. According to the study results, the *EF-1* gene was found to be the most reliable.

Keywords: population; gene expression; reference genes; *Musca domestica*; insecticides; resistance

For citation: Krestonoshina K. S., Melnichuk A. D. Selection of reference genes for RT-qPCR normalization in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of the Karelian Research Centre RAS*. 2024. doi: 10.17076/eb1870

Funding. The study was carried out with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of project No. 122122800052-9.

Введение

Насекомые-вредители играют заметную роль в жизни человека. Они имеют фитосанитарное, санитарно-эпидемиологическое и даже экономическое значение, нанося ущерб экономике сельскохозяйственных предприятий – от поедания культур до распространения болезней [Замотайлов и др., 2009]. Существуют разные подходы для борьбы с вредителями. Так, одним из общепринятых методов является использование химических препаратов. Однако чрезмерное и неправильное использование приводит к развитию резистентности в популяциях вредителей, а также несет серьезные экологические риски. К экологическим рискам использования инсектицидов относят токсикологическое воздействие на нецелевые организмы [Горбатов и др., 2019].

Инсектициды наносят значительный ущерб окружающей среде и экосистемам, сокращая биоразнообразие и уничтожая виды, которые являются важными элементами трофических сетей [Джумаева и др., 2023]. Также остаточные вещества могут накапливаться в окружающей среде, в сельскохозяйственной продукции или питьевой воде и негативно воздействовать на здоровье человека и животных [Ананьева и др., 2021]. Разработка защитных мероприятий для прицельной борьбы с вредителями невозможна без знания эколого-генетических характеристик популяций вредителей и понимания их взаимодействия с окружающей средой. Учитывая специфику отдельных особей и целых популяций, внедряя новые знания, борьбу с вредителями можно сделать более эффективной и менее затратной, а также безопасной для нецелевых видов [Оберемок и др., 2015].

В настоящее время для оценки устойчивости популяций и их адаптивного потенциала все чаще используют молекулярно-генетические исследования. Особое внимание уделяется поиску генов и мутаций, ассоциированных с развитием резистентности в популяциях насекомых-вредителей [Menozzi et al., 2004; Riveron et al., 2014; Voaventura et al., 2020]. Большинство исследований основано на использовании разных подходов для изучения связей между фенотипом и генотипом. Анализ относительной экспрессии генов очень важен во многих областях биологических исследований. Понимание характера экспрессии генов обеспечивает наибольшую вероятность идентификации генов, связанных с новыми биологическими процессами, а также предоставляет возможность изучения сложных регуляторных сетей [Segal et al., 2003]. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-qPCR) широко используется сегодня для изучения и оценки уровня транскриптов, и для надежной количественной оценки важно правильно выбрать эталонные гены. Эталонные гены, их также называют референсные или гены домашнего хозяйства, включают в себя гены со стабильной и высокой экспрессией в разных экспериментальных условиях (разные группы, стадии развития, тип ткани и действие внешних стимулов). Наиболее часто используют гены β -актина (*ACTB*), 18S рРНК (*18S*), фактора элонгации 1 (*EF1*), тубулин (*TUB*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) [Thellin et al., 1999; Zhong et al., 2013]. Однако экспрессия эталонных генов не всегда стабильна и может изменяться в зависимости от метода отбора проб или условий, что может быть причиной неверной интерпретации результатов и невозможности воспроизводимости экспериментов [Zhou et al., 2013].

Комнатная муха – *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) обладает коротким жизненным циклом и высоким репродуктивным потенциалом, реализуемым в лабораторных условиях, что делает ее удобным модельным объектом для изучения различных генетических и популяционных процессов [Никоноров, Беньковская, 2013]. Также данный объект часто используется для изучения молекулярно-генетических основ развития резистентности к инсектицидам. Помимо прочего она имеет медицинское, санитарное и ветеринарное значение, так как является механическим переносчиком более 300 видов опасных возбудителей инфекций человека и животных, таких как амёбная дизентерия, брюшной тиф, глистные и риккетсиозные инфекции и прочее [Hussam, 2015; Hassan et al., 2022; Olagunju, 2022;

Otu-Bassey et al., 2022; Monyama et al., 2022; Nayduch et al., 2023]. Поэтому контроль численности популяции данного вида имеет важное практическое значение. На сегодняшний день очень мало информации об отборе и стабильности референсных генов для *M. domestica*. С целью обнаружения стабильно экспрессирующихся референсных генов нами были проанализированы три различных линии *M. domestica* – две лабораторные линии и одна селективная.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 10-дневные пупарии комнатной мухи *Musca domestica* двух лабораторных линий Lab TY и Lab UF, не подвергавшихся воздействию инсектицидами, и линии NikR_CI. Линия Lab TY была получена из Новосибирского аграрного университета в 2009 году, линия Lab UF – из лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в 2023 году. Линия NikR_CI была получена нами из природной популяции Nik путем селекции инсектицидом (Пирафен КЭ, д. в. хлорфенапир, 360 г/л). Особи всех линий содержались в боксах с поддержанием постоянной температуры 27 ± 1 °C и относительной влажности воздуха 50 ± 5 %. В исследовании использовали тотальную РНК (тотРНК), выделенную из 24 особей Lab TY, 19 особей Lab UF и 12 особей NikR_CI.

Тотальную РНК выделяли с помощью микроколонок HiPure Total RNA Kit (Magen, Китай), дополнительно обрабатывая ДНКазой I. Количество и качество тотРНК оценивали спектрофотометрически на приборе Nano-500 Allsheng (Китай) по соотношению оптической плотности при длине волн 260/280 нм (коэффициент поглощения 1,9–2,1). Целостность фракций тотРНК проверяли в 1% агарозном гель-электрофорезе (рис. 1). Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора MMLV RT (Evrogen, Россия) согласно инструкции производителя. Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Primer3 в сочетании с Beacon designer 5.0. ПЦР в реальном времени проводили, используя смесь BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия), на амплификаторах iQ5 (Bio-Rad, США) и Gentier 96E (TianLong, Китай). Каждую реакцию проводили не менее чем в двух повторях, для исключения загрязнения реагентов использовали нематричный контроль и негативный контроль. Стандартную кривую строили для каждого отобранного гена *M. domestica* с использованием 10-кратных серийных разведений объединенной кДНК.

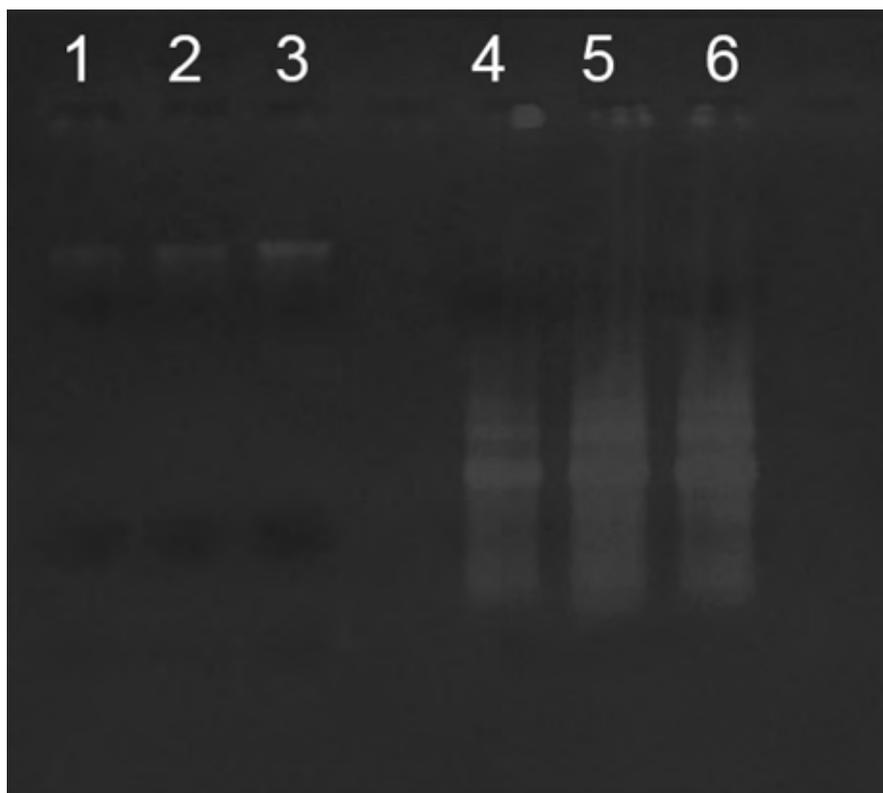


Рис. 1. Электрофореграмма образцов после одновременного выделения геномной ДНК и суммарной РНК, 1% агарозный гель:

1–3 – разные образцы выделенной ДНК; 4–6 – выделенная РНК из этих же образцов

Fig. 1. Electrophoregram of samples after simultaneous isolation of genomic DNA and total RNA, 1% agarose gel:

1–3 – different samples of isolated DNA; 4–6 – isolated RNA from the same samples

Проверка специфичности праймеров для RT-qPCR проводилась в несколько этапов:

1. Выравнивание последовательности праймера в BLAST NCBI;
2. Анализ кривых плавления продукта ПЦР (рис. 2);
3. Электрофорез продуктов ПЦР в 6% ПААГ-геле.

Условия амплификации были одинаковы для каждого праймера: на первом этапе преинкубация при 95 °С в течение 5 минут, далее 35 циклов денатурация по 1 минуте при 95 °С, отжиг 20 секунд при 58 °С и элонгация 20 секунд при 72 °С.

Статистическую обработку данных и ранжирование по коэффициенту нормализации проводили в программе RefFinder по необработанным значениям пороговых циклов (Ct). Анализ кривых плавления продукта ПЦР выполняли с помощью стандартного ПО амплификатора Gentier 96E (рис. 2). Значения Ct рассчитаны стандартным ПО амплификаторов при значении пороговой линии 50.

Результаты представлены в виде Box-plot с обозначением медиан, верхнего и нижнего квартилей, а также усов, обозначающих минимум и максимум. Построение графика делали при помощи программного обеспечения Python 3.11.

Результаты и обсуждение

Кандидаты в референсные гены отбирались по двум критериям: 1) наибольшая частота использования в аналогичных исследованиях и 2) разница в функциональном классе. Были выбраны гены 18SPHK, 18S (GeneBank: 1135100218) – цитозольная малая рибосомальная субъединица; GAPDH, (GenBank: DQ386609.1) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, оксидоредуктаза в гликолизе и глюконеогенезе; рибосомальный протеин S18, RPS18 (GeneBank: KC424479.1) – компонент 40S субъединицы рибосомы и фактор элонгации 1, EF-1 (GeneBank: GQ465788.1) – катализ GTP-зависимого связывания аминоксил-тРНК и рибосомы (табл.).

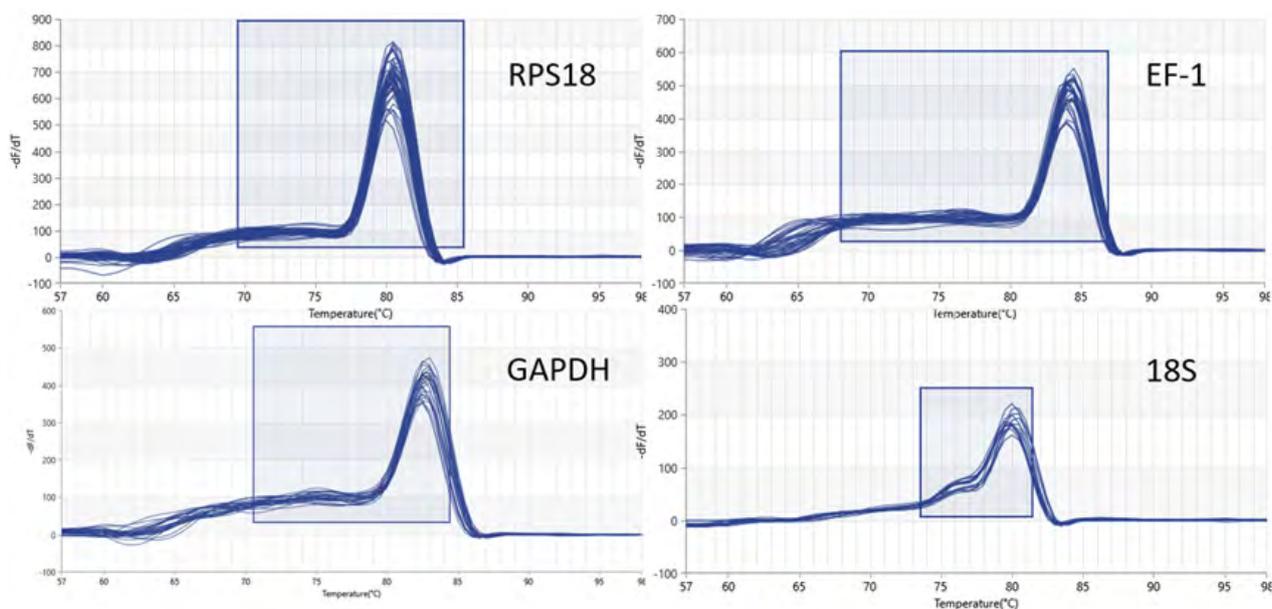


Рис. 2. Кривые плавления продуктов RT-qPCR (TianLong, Китай)

Fig. 2. Melting curves of RT-qPCR products (TianLong, China)

Эталонные гены-кандидаты, оцененные в этом исследовании

Reference candidate genes evaluated in this study

Символ гена Gene symbol	Название гена Gene name	Последовательность праймера (5' → 3') прямой/обратный Primer sequence (5' → 3') forward/reverse	T _m	Длина ампликона (bp) Amplicon size (bp)
<i>RPS18</i>	Рибосомальный белок s18 Ribosomal proteins 18	ATCGTCACCATCATCTCCAAC TTCTTCAAGCGTTCCAATCG	59	149
<i>EF-1</i>	Фактор элонгации Elongation factor	TAAGGAAGGTAACGCTGAAGG CAAGGGCAAACGCAAAGG	59	9
<i>18S</i>	18S рибосомальная РНК 18S ribosomal RNA	CTACAACGATGATGAAGCCAAG ACCAGAACCACAGCCAATATC	59.2	145
<i>GAPDH</i>	Глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	GTCATCATCTCCGCTCCATC GTCTGGCTTGTAGGCATCC	57.4	85

Значения Ct, отражающие уровень экспрессии выбранных для исследования референсных генов, варьировали от 14 до 27 циклов (рис. 3). Для *RPS18* были характерны самые низкие значения пороговых циклов Ct (от 14,855), что говорит о наиболее высоком уровне транскриптов. Экспрессия гена *18S* характеризовалась поздними пороговыми циклами (> 25 Ct) и, следовательно, низким уровнем экспрессии, что не соответствует критериям для эталонных генов. Ранжирование по коэффициенту нормализации проводили в программе RefFinder, которая использует несколько алгоритмов оценки референсных генов: Delta Ct, BestKeeper, NormFinder и geNorm. На основе рейтингов

каждой программы присваивается соответствующий вес отдельному гену и рассчитывается среднее геометрическое их весов для общего итогового рейтинга.

Анализ Delta Ct представляет собой метод, при котором происходит сравнение относительной экспрессии «пар генов» в каждом образце. Принимая во внимание все гены и сравнивая все возможные комбинации генов, формируется закономерность, согласно которой гены имеют тенденцию ассоциироваться либо с повышенным, либо с пониженным уровнем отклонения ΔCt и, следовательно, с увеличением или со снижением уровня вариабельности экспрессии генов [Silver et al., 2006].

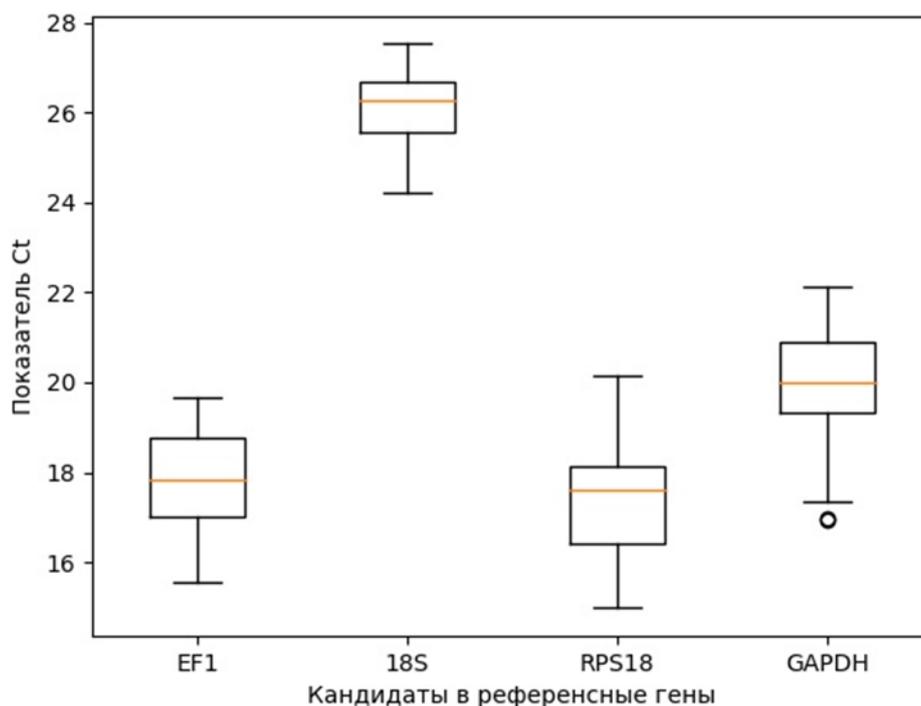


Рис. 3. Значения Ct референсных генов

Fig. 3. Ct values of reference genes

При соблюдении показателя меры стабильности экспрессии (M) не более 1,5 ген считается стабильным. В анализе этот показатель не выполнялся для двух генов: *GAPDH* (M = 1,94) и *RPS18* (M = 1,583) во всех трех популяциях (Lab TY, Lab UF и NikR_CL). *EF-1* демонстрировал наиболее стабильную экспрессию (M = 1,293) по отношению к остальным генам-кандидатам.

Анализ BestKeeper также оценивает взаимосвязи между возможными парами эталонных генов, проводя многократный анализ корреляций с использованием исходных значений Ct для каждого гена. BestKeeper присваивает собственный индекс, основанный на среднем геометрическом значении Ct всех потенциальных референсных генов, а также считает коэффициент вариации (CV) и стандартное отклонение (SD) каждого гена-кандидата на основе всех значений Ct. Алгоритм считает наиболее стабильными генами те, в которых был наименьший коэффициент вариации и стандартного отклонения (CV+SD). Гены со стандартным отклонением выше 1 рекомендуется отбрасывать [Pfaffl et al., 2004]. Учитывая данные показатели, алгоритм BestKeeper ранжировал гены-кандидаты в следующем порядке: *18S* (0,721), *EF-1* (0,993), *RPS18* (1,166), *GAPDH* (1,206), где *18S* наиболее стабильный ген.

Анализ NormFinder основан на математической модели, которая автоматически вычисляет

значение стабильности для всех генов – кандидатов на нормализацию, протестированных на наборе образцов, содержащем любое количество образцов, организованных в любое заданное количество групп. Более стабильные гены должны иметь более низкое среднее значение M [Andersen et al., 2004]. NormFinder ранжировал гены от наиболее стабильно экспрессирующихся к наименее в следующем порядке: *EF-1* (M = 0,185) > *18S* (M = 0,81) > *RPS18* (M = 1,216) > *GAPDH* (M = 1,757).

Анализ geNorm основан на том принципе, что соотношение экспрессии двух идеальных генов внутреннего контроля идентично во всех образцах, независимо от экспериментальных условий или типа клеток. Таким образом, изменение коэффициентов экспрессии двух реальных генов «домашнего хозяйства» отражает тот факт, что один (или оба) гена не экспрессируются (экспрессируются) постоянно, при этом увеличение вариации соотношения соответствует снижению стабильности экспрессии. Для каждого контрольного гена определяется парная вариация со всеми другими контрольными генами как стандартное отклонение логарифмически преобразованных коэффициентов экспрессии и определяется показатель стабильности внутреннего контрольного гена M как средняя парная вариация конкретного гена со всеми другими контрольными генами.

Гены с наименьшими значениями *M* имеют наиболее стабильную экспрессию. Предполагается, что контрольные гены не регулируются совместно, а следовательно, поэтапное исключение гена с самым высоким значением *M* приводит к комбинации двух конститутивно экспрессируемых генов домашнего хозяйства, которые имеют наиболее стабильную экспрессию в тестируемых образцах [Vandesompele et al., 2002]. Ранжирование генов-кандидатов по значению *M* привело к следующим результатам: *18S* | *EF-1* (*M* = 1,056) > *RPS18* (*M* = 1,19) > *GAPDH* (*M* = 1,565), где гены *18S* и *EF-1* являются наиболее стабильно экспрессирующимися.

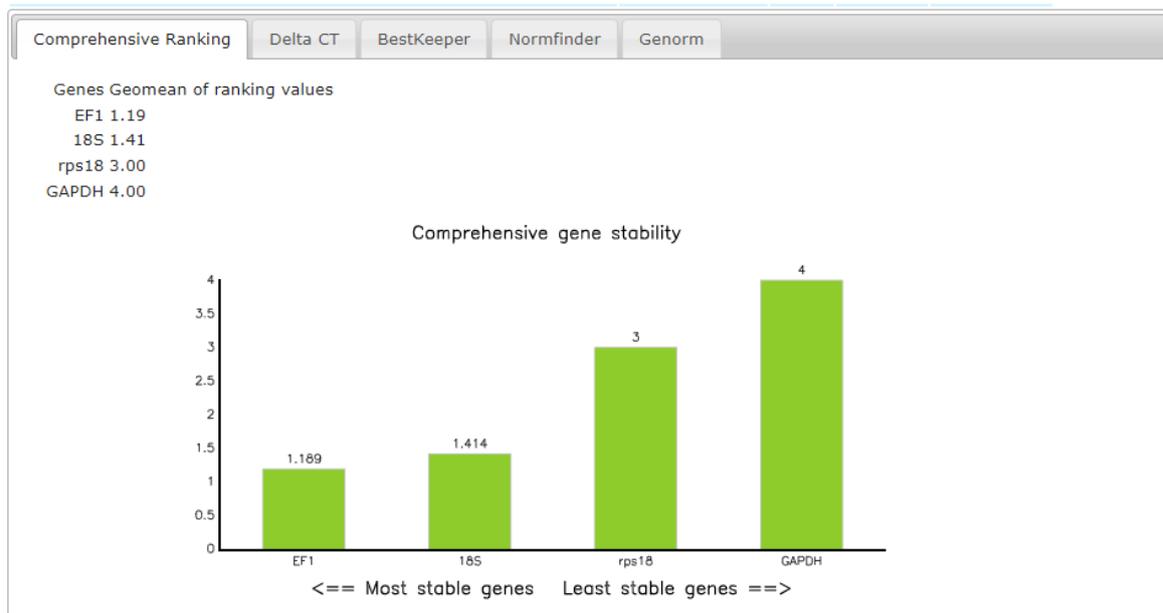
Результаты всех четырех алгоритмов несколько отличались между собой, а ранжирование по итоговому баллу всех алгоритмов в программе RefFinder представило следующий рейтинг: *EF-1* (*M* = 1,189) > *18S* (*M* = 1,414) > *RPS18* (*M* = 3) > *GAPDH* (*M* = 4), где *EF-1* – наиболее стабильный ген для всех трех исследуемых популяций *M. domestica*, а *GAPDH* – наименее стабильный (рис. 4).

В 2000 году Судзуки с соавторами показали, что в исследованиях по оценке уровня экспрессии генов, результаты которых опубликованы во влиятельных журналах, использовали один ген домашнего хозяйства, и это до сих пор является обычной практикой [Suzuki et al., 2000].

Однако совершенно очевидно, что многие из этих контрольных генов могут демонстрировать значительную вариабельность экспрессии в зависимости от ткани, возраста объекта, экспериментальных условий и т. д. [Zhong, Simons, 1999; Deindl et al., 2002; Radonić et al., 2004]. Поэтому соответствующая проверка генов домашнего хозяйства в любой новой экспериментальной системе имеет решающее значение и использование более одного референсного гена приведет к более точным и воспроизводимым результатам в дальнейшем.

Заключение

В нашем исследовании с использованием нескольких алгоритмов наиболее стабильно экспрессирующимися генами признаны *EF-1* и *18S*. Однако *18S*, несмотря на то, что экспрессируется с минимальной вариабельностью в разных группах, демонстрирует достаточно низкую экспрессию (> 25 Ct), что делает его неподходящим кандидатом для дальнейших исследований. *RPS18* был исключен алгоритмами Delta Ct и BestKeeper, что наводит на сомнения в дальнейшем его использовании в качестве референсного гена. *GAPDH* продемонстрировал наибольшую вариабельность экспрессии для всех четырех алгоритмов (Delta Ct, BestKeeper, NormFinder и geNorm),



References

Рис. 4. Ранжирование референсных генов по комплексному рейтингу программы RefFinder (скриншот программы RefFinder): слева наиболее стабильные гены, справа наименее стабильные гены

Fig. 4. Ranking of the reference genes by comprehensive ranking of the RefFinder program (screenshot of the RefFinder program): the most stable genes are shown on the left, the least stable genes – on the right

что делает его использование в качестве референсного гена невозможным. В результате мы можем использовать только один из рассмотренных эталонных генов – *EF-1*, что является недостаточным. Поэтому необходимо расширять исследование и изучать другие гены-кандидаты, например тубулин, β -актин и др.

Качественные исследования генетических и эпигенетических механизмов приспособления позволят более точно оценить устойчивость популяционных генофондов и спрогнозировать направление эволюционных процессов. Опираясь на эти знания, можно разработать более точные стратегии по борьбе с вредителями, а значит, свести к минимуму экологические риски.

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории генетики Института биологии КарНЦ РАН за возможность проведения научной стажировки, обучения и выполнения части исследовательской работы на базе ЦКП КарНЦ РАН.

Литература

Ананьева Е. Е., Мацкало Л. Л., Буторина А. А. Оценка токсического действия системных инсектицидов на мышевидных грызунов на примере степной пеструшки (*Lagurus lagurus*) // Проблемы биологии, зоотехнии и биотехнологии: Сборник трудов науч.-практ. конф. (Новосибирск, 14–18 декабря 2020 г.). Новосибирск, 2021. С. 60–65.

Горбатов В. С., Астайкина А. А., Аптикаев Р. С., Тихонов В. В. Сравнительная оценка опасности и риска пестицидов для водных организмов // Агрехимия. 2019. № 11. С. 17–26. doi: 10.1134/S0002188119110061

Джумаева М. К. Воздействие сельскохозяйственных пестицидов на окружающую среду // Central Asian Journal of Medical and Natural Science. 2023. Vol. 4. no. 1. P. 381–385.

Замотайлов А. С., Попов И. Б., Белый А. И. Экология насекомых. Краткий курс лекций. Краснодар: КубГАУ, 2009. 184 с.

Никонов Ю. М., Беньковская Г. В. Селекция на продолжительность жизни в лабораторных линиях комнатной мухи *Musca domestica* // Биомика. 2013. Т. 5, № 1-2. С. 44–47.

Оберемок В. В., Зайцев А. С., Левченко Н. Н., Ниадар П. М. Краткий обзор наиболее популярных современных инсектицидов и перспективы создания ДНК-инсектицидов // Энтомологическое обозрение. 2015. Т. 94, № 3. С. 507–518.

Andersen C. L., Jensen J. L., Ørntoft T. F. 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 Res. 2004. Vol. 64, no. 15. P. 5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Boaventura D., Martin M., Pozzebón A., Mota-Sanchez D., Nauen R. Monitoring of target-site mutations conferring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* // Insects. 2020. Vol. 11, no. 8. P. 545. doi: 10.3390/insects11080545

Deindl E., Boengler K., van Royen N., Schaper W. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries // Mol. Cell. Biochem. 2002. Vol. 236. P. 139–146. doi: 10.1023/a:1016166127465

Hassan A. O., Obeagu E. I., Oluwasinmile B. O. Evaluation of different microbial pathogens associated with the external surfaces of houseflies and to determine the antibiotic susceptibility pattern of recovered bacterial pathogens in Owo // Int. J. Curr. Res. Med. Sci. 2022. Vol. 8, no. 1. P. 1–13. doi: 10.22192/ijcrms.2022.08.01.001

Hussam S. A. Role of house flies (*Musca domestica*) as vector host for parasitic pathogens in Al-Diwaniya Province / Iraq // Int. J. Sci. Res. 2015. Vol. 4, iss. 4. P. 1961–1965.

Menozzi P., Shi M. A., Lougarre A., Tang Z. H., Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations // BMC Evol. Biol. 2004. Vol. 4. P. 1–7. doi: 10.1186/1471-2148-4-4

Monyama M. C., Onyiche E. T., Taioe M. O., Nkhebenyane J. S., Thekiso O. M. Bacterial pathogens identified from houseflies in different human and animal settings: A systematic review and meta-analysis // Vet. Med. Sci. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 827–844. doi: 10.1002/vms3.496

Nayduch D., Neupane S., Pickens V., Purvis T., Olds C. House flies are underappreciated yet important reservoirs and vectors of microbial threats to animal and human health // Microorganisms. 2023. Vol. 11, no. 3. P. 583. doi: 10.3390/microorganisms11030583

Olagunju E. A. Housefly: Common zoonotic diseases transmitted and control // Journal of Zoonotic Diseases. 2022. Vol. 6, no. 1. P. 1–10. doi: 10.22034/jzd.2022.14378

Otu-Basse I. B., Efreteui G. K., Mbah M. Gut Parasites of medical importance harboured by *Musca domestica* in Calabar, Nigeria // Trop. Parasitol. 2022. Vol. 12, no. 2. P. 99. doi: 10.4103/tp.tp_51_21

Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations // Biotechnol. Lett. 2004. Vol. 26. P. 509–515. doi: 10.1023/b:bile.0000019559.84305.47

Radonić A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siebert W., Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 313, no. 4. P. 856–862. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.177

Riveron J. M., Yunta C., Ibrahim S. S., Djouaka R., Irving H., Menze B. D., Ismail H. M., Hemingway J., Ranson H., Albert A., Wondji C. S. A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector // Genome Biol. 2014. Vol. 15, no. 2. P. 1–20. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r27

Segal E., Shapira M., Regev A., Pe'er D., Botstein D., Koller D., Friedman N. Module networks: identifying

regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data // *Nat. Genet.* 2003. Vol. 34, no. 2. P. 166–176. doi: 10.1038/ng1165

Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR // *BMC Mol. Biol.* 2006. Vol. 7, no. 1. P. 1–9.

Suzuki T., Higgins P. J., Crawford D. R. Control selection for RNA quantitation // *Biotechniques.* 2000. Vol. 29, no. 2. P. 332–337. doi: 10.2144/00292rv02

Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits // *J. Biotechnol.* 1999. Vol. 75. P. 291–295. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7

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 // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, no. 7. P. 1–12. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Zhong H., Simons J. W. Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. Vol. 259, no. 3. P. 523–526. doi: 10.1006/bbrc.1999.0815

Zhong M., Wang X., Wen J., Cai J., Wu C., Aly S. M. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in the house fly (*Musca domestica* L.) using reverse transcription quantitative real-time PCR // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2013. Vol. 45, no. 12. P. 1069–1073. doi: 10.1093/abbs/gmt111

Zhou C. F., Lin P., Yao X. H., Wang K. L., Chang J., Han X. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in six oil-tea *Camellia* based on RNA-seq // *Mol. Biol.* 2013. Vol. 47, no. 6. P. 836–851. doi: 10.1134/S0026893313060198

References

Anan'eva E. E., Matskalo L. L., Butorina A. A. Assessment of the toxic effect of systemic insecticides on mouse-like rodents on the example of the steppe lemming (*Lagurus lagurus*). *Problemy biologii, zootehnologii i biotekhnologii: Sbornik trudov nauch.-prakt. konf. (Novosibirsk, 14–18 dekabrya 2020 g.) = Problems of biology, animal science and biotechnology: Proceedings of the scientific and practical conference (Novosibirsk, Dec. 14-18, 2020)*. Novosibirsk; 2021. P. 60–65. (In Russ.)

Andersen C. L., Jensen J. L., Ørntoft T. F. 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 Res.* 2004;64(15):5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Boaventura D., Martin M., Pozzebon A., Mota-Sanchez D., Nauen R. Monitoring of target-site mutations conferring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda*. *Insects.* 2020;11(8):545. doi: 10.3390/insects11080545

Deindl E., Boengler K., van Royen N., Schaper W. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol. Cell. Biochem.* 2002;236:139–146. doi: 10.1023/a:1016166127465

Dzhumaeva M. K. The impact of agricultural pesticides on the environment. *Central Asian Journal of Medical and Natural Science.* 2023;4(1):381–385. (In Russ.)

Gorbatov V. S., Astaikina A. A., Aptikaev R. S., Tikhonov V. V. Comparative assessment of the hazard and risk of pesticides to aquatic organisms. *Agrochemistry.* 2019;11:17–26. doi: 10.1134/S0002188119110061 (In Russ.)

Hassan A. O., Obeagu E. I., Oluwasinmole B. O. Evaluation of different microbial pathogens associated with the external surfaces of houseflies and to determine the antibiotic susceptibility pattern of recovered bacterial pathogens in Owo. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.* 2022;8(1):1–13. doi: 10.22192/ijcrms.2022.08.01.001

Hussam S. A. Role of house flies (*Musca domestica*) as vector host for parasitic pathogens in Al-Diwaniya Province / Iraq. *Int. J. Sci. Res.* 2015;4(4):1961–1965.

Menozzi P., Shi M. A., Lougarre A., Tang Z. H., Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol. Biol.* 2004;4:1–7. doi: 10.1186/1471-2148-4-4

Monyama M. C., Onyiche E. T., Taioe M. O., Nkhebenyane J. S., Thekisoe O. M. Bacterial pathogens identified from houseflies in different human and animal settings: A systematic review and meta-analysis. *Vet. Med. Sci.* 2022;8(2):827–844. doi: 10.1002/vms3.496

Nayduch D., Neupane S., Pickens V., Purvis T., Olds C. House flies are underappreciated yet important reservoirs and vectors of microbial threats to animal and human health. *Microorganisms.* 2023;11(3):583. doi: 10.3390/microorganisms11030583

Nikonorov Yu. M., Benkovskaya G. V. Selection by the life span in the *Musca domestica* laboratory strains. *Biomika = Biomics.* 2013;5(1-2):44–47. (In Russ.)

Oberemok V. V., Zaitsev A. S., Levchenko N. N., Niadar P. M. A brief overview of the most popular modern insecticides and prospects for the creation of DNA insecticides. *Entomologicheskoe obozrenie = Entomological Review.* 2015;94(3):507–518. (In Russ.)

Olagunju E. A. Housefly: Common zoonotic diseases transmitted and control. *Journal of Zoonotic Diseases.* 2022;6(1):1–10. doi: 10.22034/jzd.2022.14378

Otu-Basse I. B., Efreteui G. K., Mbah M. Gut Parasites of medical importance harboured by *Musca domestica* in Calabar, Nigeria. *Trop. Parasitol.* 2022;12(2):99. doi: 10.4103/tp.tp_51_21

Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best-Keeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 2004;26:509–515. doi: 10.1023/b:bi.0000019559.84305.47

Radonić A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;313(4):856–862. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.177

Riveron J. M., Yunta C., Ibrahim S. S., Djouaka R., Irving H., Menze B. D., Ismail H. M., Hemingway J., Ranson H., Albert A., Wondji C. S. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol.* 2014;15(2):1–20. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r27

Segal E., Shapira M., Regev A., Pe'er D., Botstein D., Koller D., Friedman N. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat. Genet.* 2003;34(2):166–176. doi: 10.1038/ng1165

Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 2006;7(1):1–9.

Suzuki T., Higgins P. J., Crawford D. R. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 2000;29(2):332–337. doi: 10.2144/00292rv02

Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 1999;75:291–295. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00163-7

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. *Genome Biol.* 2002;3(7):1–12. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Zamotailov A. S., Popov I. B., Bely A. I. Ecology of insects. A short course of lectures. Krasnodar: KubGAU; 2009. 184 p. (In Russ.)

Zhong H., Simons J. W. Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;259(3):523–526. doi: 10.1006/bbrc.1999.0815

Zhong M., Wang X., Wen J., Cai J., Wu C., Aly S. M. Selection of reference genes for quantitative gene expression studies in the house fly (*Musca domestica* L.) using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2013;45(12):1069–1073. doi: 10.1093/abbs/gmt111

Zhou C. F., Lin P., Yao X. H., Wang K. L., Chang J., Han X. J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in six oil-tea *Camellia* based on RNA-seq. *Mol. Biol.* 2013;47(6):836–851. doi: 10.1134/S0026893313060198

Поступила в редакцию / received: 11.01.2024; принята к публикации / accepted: 08.02.2024.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крестовина Ксения Сергеевна

заведующая лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии насекомых

e-mail: krutko.k.s@hotmail.com

Мельничук Анастасия Дмитриевна

младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии насекомых

e-mail: melnichukad1999@gmail.com

CONTRIBUTORS:

Krestonoshina, Ksenia

Head of Laboratory

Melnichuk, Anastasia

Junior Researcher