

# 内标 *18S* rRNA 和 $\beta$ -*actin* mRNA 比较: 肉鸡十二指肠 *SGLT1* mRNA 的发育规律

王修启, 谭会泽, 苏海林, 宋予震, 冯定远

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**  $\beta$ -*actin* mRNA 和 *18S* rRNA 因其在相同试验条件下的稳定表达, 而被广泛用作内标基因来确定目的基因的表达量。试验分别使用这 2 种内标基因, 用相对定量 RT-PCR 的方法对肉鸡(0~58 d)十二指肠钠葡萄糖共转运载体 1(Sodium glucose cotransporter 1, *SGLT1*) 的发育规律进行了分析研究, 比较不同内标基因对 *SGLT1* mRNA 表达水平检测结果的影响, 以确定两者在一致试验条件下表达的相似度。结果表明, 分别以  $\beta$ -*actin* mRNA 和 *18S* rRNA 作为内标, *SGLT1* mRNA 表达发育规律完全一致, 均表现为 2~30 d 不断升高, 44 d 下降, 58 d 回升; 2 d 和 44 d 的 *SGLT1* mRNA 丰度显著低于 16 d ( $P < 0.05$ ) 和 30 d ( $P < 0.05$ ), 58 d 的 *SGLT1* mRNA 表达水平显著低于 30 d ( $P < 0.05$ )。提示这 2 种管家基因均可以作为内标用于肉鸡肠道转运载体基因 mRNA 发育规律的相对定量研究。

**关键词:** *18S* rRNA;  $\beta$ -*actin* mRNA; 内标; *SGLT1* mRNA; 肉鸡

中图分类号: S831 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)03-0112-05

## Comparison Between *18S* rRNA and $\beta$ -*actin* mRNA as Internal Standard: Ontogenetic Expression of *SGLT1* mRNA in Duodenum of Broiler Chicken

WANG Xi-qi, TAN Huì-ze, SU Hai-lin, SONG Yù-zhen, FENG Ding-yuan

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** *Beta-actin* mRNA and *18S* rRNA are widely employed as internal control genes, with the assumption that they are expressed constitutively to a similar degree under same experimental conditions. The objective of this study was to investigate the *SGLT1* (Sodium glucose cotransporter 1) mRNA ontogenetic expression in duodenum of broiler chicken (0~58 d) by a semi-quantitative RT-PCR, using *beta-actin* mRNA and *18S* rRNA as internal standard respectively. In this study, we tested this assumption by assessment of the transcription of these two genes in chicken intestinal tissues using a semi-quantitative RT-PCR. The results indicate showed that the *SGLT1* mRNA ontogenetic expression were consistent whether *beta-actin* mRNA or *18S* rRNA was acted as internal control. The *SGLT1* mRNA abundance in duodenum of chicken increased from day 2 to day 30, then started to decline from day 44, and increased again from day 58. The *SGLT1* mRNA expression level on day 2 and day 44 were lower significantly than that on day 16 ( $P < 0.05$ ) and day 30 ( $P < 0.05$ ) respectively. And the *SGLT1* mRNA abundance on day 58 was lower significantly than that on day 30 ( $P < 0.05$ ). It suggested that both *beta-actin* mRNA and *18S* rRNA could be used as internal standard for semi-quantitative analysis of transport carrier gene mRNA in intestinal ontogenesis of broiler chicken.

**Key words:** *18S* rRNA;  $\beta$ -*actin* mRNA; Internal standard; *SGLT1* mRNA; Broiler chicken

mRNA 的相对定量检测, 常用方法包括 RT-PCR 和 Northern blot, 这 2 种方法均需要采用内标来确定目

标基因的相对表达量。管家基因  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -*actin*), *18S* rRNA 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*) 是

收稿日期: 2005-12-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2004CB117501); 广东省自然科学基金项目(05300836)

作者简介: 王修启(1968-), 男, 河南新乡人, 在站博士后, 副研究员, 主要从事动物分子营养学研究; 冯定远为通讯作者。

最为常用的内标基因, 在多数情况下,  $\beta$ -actin 是优先的内标选择<sup>[1]</sup>。也有学者认为, 在细胞周期中 18S rRNA 的稳定性优于  $\beta$ -actin, 作为内标更为合适<sup>[2]</sup>。近年来, 越来越多的研究者发现, 不同的试验条件如细胞分化增殖的不同时期、动物生长发育的不同阶段、不同的组织器官以及健康或病理状态下, 不同的内标基因  $\beta$ -actin、18S rRNA 和 GAPDH 会存在表达水平波动等缺点, 从而影响试验结果的正确性。Solanas 等报道, rRNA 不适于作为研究大鼠乳腺癌 mRNA 水平变化的内标基因<sup>[3]</sup>。Bas 等研究认为, 在人 T 淋巴细胞的静息期和激活期, 内标基因的稳定性依次为 18S rRNA >  $\beta$ -actin mRNA > GAPDH mRNA<sup>[4]</sup>。Tricarico 等研究指出, 用于人活体组织检查时, 使用单个的管家基因或 rRNA 作为内标是不合适的<sup>[5]</sup>。Yamada 等报道, 用 Northern blot 研究大鼠肠道激素 mRNA 基因表达的最佳内标是 18S rRNA<sup>[6]</sup>。在研究目的基因表达水平时, 不同的研究条件, 应该选用表达波动最小的内标基因。选用不同的内标基因进行校正, 是内标选择的有效手段之一。

钠葡萄糖共转运载体 1 (Sodium glucose cotransporter 1, SGLT1) 是肠道葡萄糖吸收的主效基因。Garriga 等研究表明, 鸡小肠对甲基-D-葡萄糖苷的最大转运速度与 SGLT1 蛋白的密度具有良好的相关性, 葡萄糖吸收增加的原因是 SGLT1 载体数量的增加<sup>[7]</sup>。Barfull 等以 18S rRNA 用 Northern blot 研究了白色来航鸡 SGLT1 的发育性表达<sup>[8]</sup>。有关肉鸡 SGLT1 发育模式的研究, 尚未见到相关的报道。

本研究选用遗传背景相同的 1 d 父母代雄性 AA 肉雏鸡, 于 2, 16, 30, 44, 58 d, 采集十二指肠样品, 分别以  $\beta$ -actin mRNA 和 18S rRNA 作为内标基因, 运用相对定量 RT-PCR 方法研究肉鸡十二指肠 SGLT1 mRNA 表达的发育规律, 同时观察 2 种内标基因对研究结果的影响, 为更好地选用内标, 准确反映试验结果提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物与样品采集

1.1.1 试验动物 选用遗传背景相同、同批次、发育正常的 1 d 雄性 Arbor Acre(AA) 父母代(购自广东穗屏科宝种鸡场)肉雏鸡 120 羽, 按照平均体重一致的原则, 随机分为 4 个重复, 每个重复 30 只鸡。

1.1.2 日粮组成及营养水平 参照 NRC(1994) 和国家标准(1986)0~8 周龄肉鸡营养需要设计饲料配方。日粮组成和营养水平列于表 1。于试验 31 d 开始采用逐步换料的方法, 至 34 d 结束更换为后期日粮。

1.1.3 饲养管理与免疫 试验在华南农业大学动物科学学院种鸡场进行, 粉料饲喂。红外取暖, 自由饮水和采食, 人工持续光照, 保持正常育雏温度, 常规免疫。

1.1.4 组织采样 分别于 2, 16, 30, 44, 58 日龄, 每组取接近平均体重的鸡, 每重复 2 只共 80 只, 断颈宰杀, 宰前不禁食。分离肠道, 沿纵向剖开, 用 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液中洗, 吸水纸吸干。从十二指肠 U 状弯曲的起始处向下取 3 cm 肠段作为十二指肠样品。放入 1.5 mL 离心管中, 置液氮速冻, -70℃ 冷冻保存。

表 1 日粮组成和营养水平

Tab. 1 Diets composition and calculated nutrients level

组分 Ingredients	含量 Content(%)		营养水平 Calculated nutrients level		
	0~ 30 d	31~ 58 d	项目 Item	0~ 30 d	31~ 58 d
玉米 Com	65.00	67.65	代谢能 AME( Kcal/ kg)	2900	3050
玉米蛋白粉 Com gluten meal	2.70	4.00	粗蛋白 Crude protein (%)	20.0	18.0
豆粕 Soybean meal	26.20	22.02	赖氨酸 Lys(%)	1.10	1.00
豆油 Soybean oil		2.00	蛋氨酸 Met(%)	0.52	0.45
鱼粉 Fish meal		2.00	蛋+ 胱 Met+ Cys(%)	0.85	0.76
石粉 Limestone	0.80	0.87	钙 Calcium(%)	0.85	0.80
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	1.57	1.62	磷 Phosphorus(%)	0.67	0.61
赖氨酸 Lys (78%)	0.16	0.27	有效磷 AP(%)	0.45	0.40
蛋氨酸 Met (98%)	0.18	0.15			
食盐 NaCl	0.29	0.34			
氯化胆碱 Choline chloride(75%)	0.10	0.08			
预混料* Premix	1.00	1.00			

注: \* . 提供至每千克全价料: Cu 5.00 mg, Fe 69.00 mg, Zn 84.00 mg, Mn 98.6 mg, I 1.14 mg, Se 0.30 mg; VA 15000IU, VD<sub>3</sub> 3000 IU, VE 25.5 mg, VK<sub>3</sub> 2.1 mg, VB<sub>1</sub> 2.4 mg, VB<sub>2</sub> 9 mg, VB<sub>6</sub> 5.1 mg, VB<sub>12</sub> 0.02 mg, 泛酸钙 12 mg, 烟酸 48 mg, 叶酸 1.2 mg, 生物素 0.06 mg; 洛克沙肿 50 mg, 盐霉素 90 mg

Note: \* . Supplied per kg feed: Cu 5.00mg, Fe 69.00 mg, Zn 84.00mg, Mn 98.6 mg, I 1.14 mg, Se 0.30 mg; VA 15000IU, VD<sub>3</sub> 3000 IU, VE 25.5 mg, VK<sub>3</sub> 2.1 mg, VB<sub>1</sub> 2.4 mg, VB<sub>2</sub> 9 mg, VB<sub>6</sub> 5.1 mg, VB<sub>12</sub> 0.02 mg, Calpan 12 mg, Niacin 48 mg, Folic acid 1.2 mg, Biotin 0.06 mg; Roxarsone 50 mg, Salinomycin 90 mg

## 1.2 十二指肠 *SGLT1* mRNA 的相对定量 RT-PCR

1.2.1 样品总 RNA 提取和 RNA 电泳 采用 Trizol (北京赛百盛基因技术有限公司) 一步抽提法提取组织样的总 RNA, 紫外比色法测定总 RNA 的浓度和纯度(Eppendorf BioPhotometer 260 nm)。用 1.4% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 根据 28S rRNA 和 18S rRNA 的灰度比评价 RNA 的质量。

1.2.2 反转录 分别准确量取 2  $\mu$ g 各样品的总 RNA 进行反转录。建立各样品 RNA 的 cDNA (RT product)。反转录反应体积为 20  $\mu$ L, 其中含随机引物 Random(10) 5  $\mu$ mol/L 引物, 1 mmol/L dNTP(北京赛百盛基因技术有限公司), 20 U RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor, Takara, 大连), 200 U 反转录酶(MMLV RT, Promega), 4  $\mu$ L 5  $\times$  RT Buffer (含 250 mol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 250 mol/L KCl, 50 mol/L DTT, 2.5 mol/L Spermidine)。样品总 RNA、Random(10) 和 dNTP 在反转录前 70  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰上放置 5 min, 再加入其余试剂, 混匀后于 42  $^{\circ}$ C 反应

60 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min。反转录产物(RT Products) – 20  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 目的基因引物设计和 PCR 反应条件 PCR 引物采用 Primer 5.0 软件设计, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。引物序列及参数列于表 2。分别以 18S rRNA 和  $\beta$ -actin mRNA 作为内标, 对 *SGLT1* mRNA 进行相对定量分析。PCR 反应在 MJR PTG-200 PCP 仪上进行。

内标基因 18S rRNA: 选用 Ambion Universal 18S internal standard, 产物长度 315 bp。

内标基因  $\beta$ -actin Primers (10  $\mu$ mol/L) 和 Competimers (10  $\mu$ mol/L): 参照 Diffenbach<sup>[9]</sup> 所提供的方法, 将  $\beta$ -actin Primers 的 3' 端进行修饰(北京赛百盛基因技术有限公司), 使其在 PCR 过程中只能与模板结合而不能延伸, 得到  $\beta$ -actin Competimers。将  $\beta$ -actin Primers 和 Competimers 均稀释至 10  $\mu$ mol/L 备用。

表 2 目的基因 *SGLT1* 和内标基因  $\beta$ -actin 引物参数

Tab. 2 Parameters of primer pairs for *SGLT1* and  $\beta$ -actin gene

目的基因 Target gene	引物位置 Localization		引物序列 Primer sequence	产物(bp) Product
<i>SGLT1</i> (AJ236903 Genbank)	46-65	Sense	5'-TG GTT GTT CTAGGATGGGTG-3'	489
	534-515	Antisense	5'-CAGTGACAGCATCTCGGAAG-3'	
$\beta$ -actin (U08165 Genbank)	83-101	Sense	5'-TGCTGCGCTCGTTGTTGAG-3'	291
	373-355	Antisense	5'-GGGTGCTCCTCAGGGGCTA-3'	

PCR 反应条件: 采用单管法进行 PCR 扩增, 以混合样(待测样品等比例混合)对 PCR 反应条件、循环圈数以及目的基因 *SGLT1* 分别与不同内标基因 18S 或  $\beta$ -actin 的引物浓度等进行优化。在 25  $\mu$ L 的反应体系中含有 2  $\mu$ L RT Products, 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 0.8  $\mu$ mol/L 目的基因 *SGLT1* 的 primer pair, 0.4  $\mu$ L 18S 或 1.2  $\mu$ L  $\beta$ -actin primer pair, 1.6  $\mu$ L 18S Competimers 或 0.8  $\mu$ L  $\beta$ -actin Competimers, 0.5 U Tag DNA polymerase (Fermentas, Lietuva)。94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 25 圈; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

电泳及灰度分析: 取 10  $\mu$ L PCR 产物在 2.0% EtBr 染色的琼脂糖凝胶上电泳。图象处理及灰度分析用 LabWorks Image Acquisition and Analysis Software 4.0 (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) 进行, 根据目的基因与 18S 或  $\beta$ -actin PCR 产物的灰度比, 确定样品中 *SGLT1* mRNA 基因表达的相对含量。

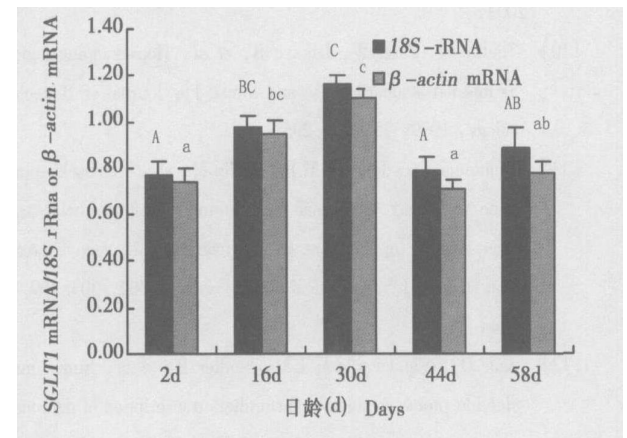
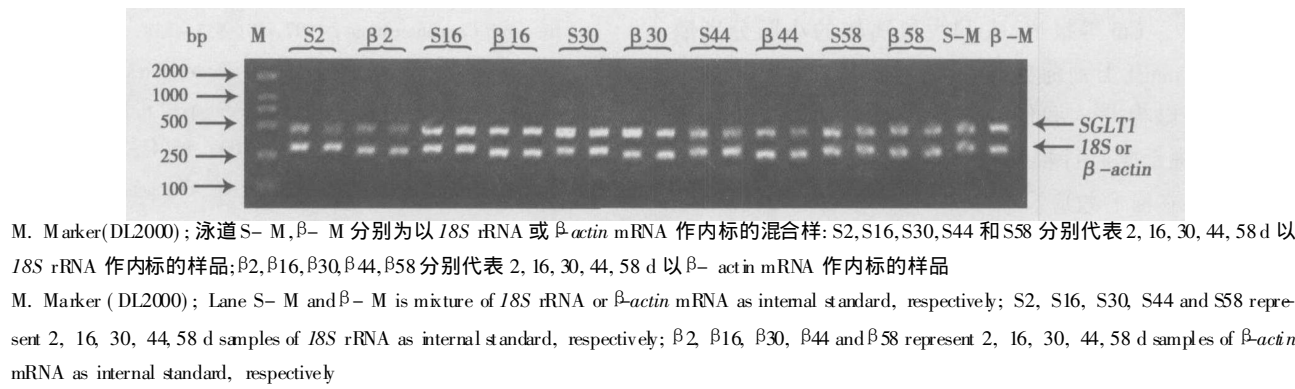
RT-PCR 全过程至少重复 3 次。

## 1.3 数据分析

试验数据以平均数  $\pm$  标准误(X  $\pm$  S. E. M) 表示, 用 SPSS 11.5 统计软件进行单因子方差分析(one-way ANOVA), 以 Duncan 方法进行多重比较。

## 2 结果

AA 肉鸡十二指肠 *SGLT1* mRNA 表达的发育规律结果见图 1。图 1 条形图为 *SGLT1* mRNA 与不同内标基因 RT-PCR 产物代表性琼脂糖凝胶电泳图, 柱状图为用  $\beta$ -actin mRNA 和 18S rRNA 作内标对比分析 AA 肉鸡不同日龄十二指肠 *SGLT1* mRNA 基因表达的相对丰度。以  $\beta$ -actin mRNA 作内标 AA 鸡 *SGLT1* mRNA 的表达丰度和以 18S rRNA 作内标时的表达丰度具有相同趋势, 即从 2 d 到 30 d 不断升高, 44 d 下降, 58 d 回升; 2 和 44 d 的 *SGLT1* mRNA 丰度显著低于 16 d 和 30 d ( $P < 0.05$ ), 58 d 的 *SGLT1* mRNA 表达水平显著低于 30 d ( $P < 0.05$ )。



18S rRNA 和  $\beta$ -actin mRNA 分别代表不同的内标。无相同字母者 (大写字母, 18S; 小写字母,  $\beta$ -actin), 表示不同日龄之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),  $n = 8$

18S rRNA and  $\beta$ -actin mRNA represent different internal standard, respectively. Without the same letters (capital letters for 18S rRNA and lower case letters for  $\beta$ -actin mRNA) indicate significant difference between days ( $P < 0.05$ ),  $n = 8$

图1 18S rRNA 和  $\beta$ -actin mRNA 作内标比较: AA 鸡十二指肠 SGLT1 mRNA 表达的发育规律

Fig 1 Comparison 18S rRNA and  $\beta$ -actin mRNA as internal standard: Ontogenesis of SGLT1 mRNA expression in duodenum of AA chicken

### 3 讨论

理论上, 一个理想的内标应该在各种不同的细胞类型、不同发育阶段、采用不同处理方法时都能稳定表达, 一个稳定的内标是确定目标基因相对表达量的基础<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -actin 是 actin 家族的一员, 在维持细胞结构、细胞内运动、细胞分裂等细胞生理活动方面发挥着重要的作用<sup>[10, 11]</sup>。在细胞分裂的过程中, 需要骨架的支持, 因而 actin 相对来说表达量较为稳定。但作为骨架蛋白其表达量和细胞的分裂发育是密切相关的, 不同细胞种类在不同状态下, actin 的表达有可能不同。在一些试验中, 研究者经常采用的管家基因  $\beta$ -actin 的表达水平往往出现波动, 这种

现象在大鼠的纤维原细胞<sup>[2]</sup>、脾脏和脑<sup>[12]</sup>, 癌细胞浸润和没有癌细胞浸润的人黑色素细胞<sup>[13]</sup>, 兔子的肠黏膜、胃黏膜以及胰腺<sup>[6]</sup>都已发现。许多研究者在试验中将 18S rRNA 作为内标基因, 因为它的功能是同整个基因谱有关的 (负责装配), 表达相对稳定; 更重要的是, 它占总 RNA 的比例高达 80%, 影响 mRNA 表达的条件一般不导致其表达发生变化, 所以相对而言更准确<sup>[11, 14]</sup>。虽然很多报道都指出 18S rRNA 是诸多管家基因中表现较为稳定的内标<sup>[4, 6, 10]</sup>, 但是 18S rRNA 也存在有自身的缺点, 有研究者认为 18S rRNA 是核糖体 RNA, 而不是 mRNA, 它的数量并不总是代表细胞内的 mRNA 的数量, 因而不适于作为内标研究不同组织 mRNA 表达的差异<sup>[1]</sup>。而且, 在细胞或组织生长发育和快速分化的过程中, rRNA 的水平会有一些的差异, 对于 Northern blot 而言, 18S rRNA 并不总是最好的内标<sup>[3]</sup>。因此, 有研究者认为, 在 mRNA 水平的检测过程中, 采用单一的内标所得到的分析结果往往并不可靠<sup>[5]</sup>, 选用一种以上的内标, 可以使校正结果更准确<sup>[1]</sup>。也有研究者认为, 试验应在一致的条件下, 至少有 3~4 次的重复, 才能基本保障结果的相对准确<sup>[10]</sup>。

在本试验中, 发现 18S rRNA 和  $\beta$ -actin mRNA 作为内标对比分析肉鸡十二指肠 SGLT1 mRNA 表达丰度的结果基本一致, 均为从 2 d 到 30 d 不断升高, 44 d 下降, 58 d 回升; 试验后期 SGLT1 mRNA 表达量的降低, 可能与 31~34 d 换料有关。Kaput 等指出, 日粮的化学组成可以直接或间接影响基因表达<sup>[15]</sup>。有研究表明, 大鼠断奶时 SGLT1 的活性显著降低<sup>[16]</sup>。本试验中 SGLT1 的表达 44 d 时突然下降至显著低于 30 d ( $P < 0.05$ ), 推测肉鸡生产中换料与哺乳动物断奶类似, 可以下调 SGLT1 mRNA 的表达。Ferraris 指出, 肠腔内日粮信号的改变, 可以影响 SGLT1 的转录, 24 h 以后就会增加或降低葡萄糖的

吸收<sup>[17]</sup>。Cui 等报道, 人和大鼠离体的小肠分别灌注 100 mmol/L 葡萄糖或果糖, 对 *SGLT1* mRNA 的丰度没有影响<sup>[18]</sup>。我们的研究结果支持 Ferraris 的观点, 但提示肠腔日粮信号对 *SGLT1* mRNA 表达调控可能存在滞后效应。

Barfull 等用 18S rRNA 作内标, 采用同一日粮饲喂的白色来航公鸡, 其 2 d 和 35 d *SGLT1* mRNA 的表达量非常接近, 差异不显著<sup>[8]</sup>。本研究结果表明, 饲喂前期日粮的 AA 肉鸡, 无论以 18S rRNA 还是以  $\beta$ -actin mRNA 作内标, RT-PCR 显示 2 d 的 *SGLT1* mRNA 丰度显著低于 16 d ( $P < 0.05$ ) 和 30 d ( $P < 0.05$ ), 而且有关 *SGLT1* mRNA 的发育规律, 使用两种内标的其他统计结果也完全相同。推测肉鸡和蛋鸡(来航鸡), 由于基因型和生长速度不同, 其 *SGLT1* mRNA 表达丰度达到差异显著水平的时程也不相同, 与检测 mRNA 表达时选用的内标基因无关。因此, 我们认为在研究肉鸡肠道转运载体 mRNA 表达水平时,  $\beta$ -actin mRNA 和 18S rRNA 作为内标都是可行的。

#### 参考文献:

- [1] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantitation[J]. *BioTechniques*, 2000, 29: 332– 337.
- [2] Selvey S, Thompson E W, Matthaei K, *et al.*  $\beta$ -actin—an unsuitable internal control for RT-PCR[J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(5): 307– 311.
- [3] Solanas M, Moral R, Escribá E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 288: 99– 102.
- [4] Bas A, Forsberg G, Hammarström S, *et al.* Utility of the housekeeping genes 18S rRNA,  $\beta$ -Actin and glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2004, 59: 566– 573.
- [5] Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 309: 293– 300.
- [6] Yamada H, Chen D, Monstein H J, *et al.* Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper Digestive Tract of Rats[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 231: 835– 838.
- [7] Gariga C, Moreto M, Planas J M. Effects of resalination on intestinal glucose transport in chickens adapted to low  $\text{Na}^+$  intakes[J]. *Experimental Physiology*, 2000, 85(4): 371– 378.
- [8] Barfull A, Garriga C, Mitjans M, *et al.* Ontogenetic expression and regulation of  $\text{Na}^+$ -D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken[J]. *American Journal of Physiology— Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 282: 559– 564.
- [9] Dieffenbach C W. PCR Primer: A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> edition)[M]. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [10] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 75: 291– 295.
- [11] Blanquicett C, Johnson M R, Heslin M, *et al.* Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 303: 209– 214.
- [12] Saur D, Vanderwinden J M, Seidler B, *et al.* Single nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101(6): 1662– 1667.
- [13] Deane E E, Kelly S P, Luk J C, *et al.* Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin like growth factor I expression in black sea bream[J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002, 4 (2): 193– 205.
- [14] Goidin D, Mamessier A, Staquet M J, *et al.* Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations[J]. *Anal Biochem*, 2001, 295 (1): 17– 21.
- [15] Kaput J, Rodriguez R L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era [J]. *Physiological Genomics*, 2004, 16: 166– 177.
- [16] O'Connor T P, Diamond J. Ontogeny of intestinal safety factors: lactase capacities and lactose loads[J]. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Compare Physiology*, 1999, 276: 753 – 765.
- [17] Ferraris R P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 360(2): 265– 276.
- [18] Cui X L, Jiang L, Ferraris R P. Regulation of rat intestinal GLUT2 mRNA abundance by luminal and systemic factors [J]. *Biochimica et Biophysica Acta— Biomembranes*, 2003, 1612(2): 178– 185.