

Selection and Validation of Reference Genes for Gene Expression in *Bactericera gobica* Loginova Under different Insecticide Stresses

Hongshuang Wei ¹, Jingyi Zhang ¹, Mengke Yang ¹, Yao Li ¹, Kun Guo ¹, Haili Qiao ¹,
Rong Xu ¹, Sai Liu ^{1,*}, and Changqing Xu ^{1,*}

- 1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Med-ical College, Beijing, 100193, China
* Correspondence: cqxu@implad.ac.cn

Table S1. Best BLAST hits for candidate reference genes and target gene identified in the transcriptome database of *Bactericera gobica* adults and nymphs.

Gene name	transcriptome ID	Length	aa	Complete ORF	Description	E value	Identity (%)	Accession
Reference genes:								
<i>β-actin</i>	TRINITY_DN1329_c16_g1	1508	337	Y	Actin 1 [<i>Laodelphax striatellus</i>]	0	98.67%	AGJ84696.1
<i>EF1α</i>	TRINITY_DN5961_c2_g1	2703	325	Y	elongation factor 1 alpha [<i>Bactericera cockerelli</i>]	0	99.03%	ALX81339.1
<i>EF2</i>	TRINITY_DN8489_c0_g3	4520	844	Y	PREDICTED: translation elongation factor 2 [<i>Neodiprion lecontei</i>]	0	93.84%	XP_015509932.1
<i>GAPDH</i>	TRINITY_DN1344_c7_g3	1936	332	Y	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Bactericera cockerelli</i>]	0	98.80%	ALX81341.1
<i>α-TUB</i>	TRINITY_DN999_c1_g1	1328	360	3'lost	tubulin alpha-1 chain-like [<i>Diaphorina citri</i>]	0	97.78%	XP_008480775.1
<i>β-TUB</i>	TRINITY_DN22746_c0_g1	3072	447	Y	tubulin beta-1 chain [<i>Diaphorina citri</i>]	0	99.11%	XP_008480683.1
<i>Ferritin</i>	TRINITY_DN1667_c1_g1	4196	239	Y	ferritin heavy chain-like precursor [<i>Diaphorina citri</i>]	3.00E-98	62.35%	NP_001316112.1
<i>GST</i>	TRINITY_DN13130_c0_g2	1495	216	Y	glutathione S-transferase 1-like [<i>Diaphorina citri</i>]	2.00E-148	93.98%	XP_026680107.1
<i>AK</i>	TRINITY_DN9312_c5_g1	3070	259	Y	arginine kinase isoform X2 [<i>Diaphorina citri</i>]	8.00E-175	91.41%	XP_026680842.1
<i>RPL8</i>	TRINITY_DN7930_c5_g1	1301	200	Y	60S ribosomal protein L8 [<i>Diaphorina citri</i>]	1.00E-139	97.50%	XP_008478127.1
<i>RPL10</i>	TRINITY_DN207_c11_g1	1605	219	Y	60S ribosomal protein L10 isoform X4 [<i>Diaphorina citri</i>]	2.00E-151	94.52%	XP_008471214.1
<i>RPL32</i>	TRINITY_DN7277_c2_g1	1090	134	Y	60S ribosomal protein L32-like [<i>Diaphorina citri</i>]	3.00E-91	99.25%	XP_008468712.1
<i>RPS11</i>	TRINITY_DN35443_c0_g1	670	152	Y	40S ribosomal protein S11 isoform X3	9.00E-105	98.03%	XP_008470793.1

<i>RPS15</i>	TRINITY_DN24856_c0_g1	1046	130	Y	[<i>Diaphorina citri</i>] 40S ribosomal protein S15Aa [<i>Diaphorina citri</i>]	2.00E-88	99.23%	NP_001284622.1
<i>RPS20</i>	TRINITY_DN12526_c3_g1	554	131	Y	40S ribosomal protein S20 [<i>Diaphorina citri</i>]	7.00E-83	96.18%	XP_008476677.1
Target gene:								
<i>CYP6a1</i>	TRINITY_DN4781_c0_g1	3341	585	Y	cytochrome P450 CYP6a1 [<i>Diaphorina citri</i>]	0	77.49%	QBQ34510.1

Table S2. Mean Ct values ± SE of the studied reference genes in the different samples from *Bactericera gobica*.

Gene name	Insecticide treatment	Temperature treatment	Odor stimulation	Developmental stages	Sex	All samples
<i>β-actin</i>	20.64 ± 0.47	17.33 ± 0.00	16.74 ± 0.05	17.22 ± 0.30	17.34 ± 0.00	18.34 ± 0.30
<i>EF1α</i>	20.33 ± 0.26	17.74 ± 0.09	16.73 ± 0.12	17.57 ± 0.29	17.23 ± 0.09	18.37 ± 0.24
<i>EF2</i>	22.14 ± 0.26	20.15 ± 0.09	20.01 ± 0.07	20.17 ± 0.28	19.31 ± 0.21	20.69 ± 0.19
<i>Ferritin</i>	22.68 ± 0.37	21.17 ± 0.14	20.05 ± 0.13	20.75 ± 0.32	19.49 ± 0.05	21.21 ± 0.22
<i>GAPDH</i>	21.70 ± 0.23	19.65 ± 0.13	18.58 ± 0.08	19.80 ± 0.44	18.20 ± 0.15	20.03 ± 0.23
<i>α-TUB</i>	26.96 ± 0.23	25.54 ± 0.32	20.79 ± 0.21	25.11 ± 1.33	21.04 ± 0.27	24.69 ± 0.46
<i>β-TUB</i>	23.92 ± 0.16	23.88 ± 0.48	22.05 ± 0.22	21.24 ± 0.16	21.38 ± 0.17	22.38 ± 0.21

<i>AK</i>	21.08 ± 0.35	20.82 ± 0.15	18.95 ± 0.14	21.41 ± 0.76	18.77 ± 0.06	20.50 ± 0.25
<i>GST</i>	21.65 ± 0.39	20.41 ± 0.31	20.57 ± 0.30	20.62 ± 0.31	19.55 ± 0.07	20.77 ± 0.19
<i>RPL8</i>	20.36 ± 0.22	20.32 ± 0.14	19.03 ± 0.05	19.50 ± 0.34	18.17 ± 0.07	19.71 ± 0.16
<i>RPL10</i>	18.22 ± 0.41	19.08 ± 0.18	19.83 ± 0.14	20.20 ± 0.18	19.87 ± 0.15	19.22 ± 0.19
<i>RPL32</i>	19.44 ± 0.31	20.98 ± 0.11	28.10 ± 0.57	31.44 ± 0.49	22.35 ± 0.09	23.69 ± 0.72
<i>RPS11</i>	20.86 ± 0.59	20.89 ± 0.16	20.05 ± 0.34	20.21 ± 0.23	19.40 ± 0.10	20.43 ± 0.23
<i>RPS15</i>	19.80 ± 0.36	18.96 ± 0.17	20.06 ± 0.21	20.10 ± 0.34	18.88 ± 0.04	19.60 ± 0.16
<i>RPS20</i>	22.10 ± 0.63	21.50 ± 0.29	19.84 ± 0.27	21.06 ± 0.28	20.56 ± 0.06	21.27 ± 0.26

Note: mean \pm SE.

Table S3. Expression stability ranking of 15 candidate RGs was calculated using Delta Ct, GeNorm and NormFinder and BestKeeper under five different insecticide stresses. The average expression stability (M value,) is listed by Delta Ct, GeNorm and NormFinder analysis, and standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were given by BestKeeper analysis (the lower, the most stable).

The stability decreased from top to bottom.

1	<i>GST</i>	0.07	<i>AK</i>	0.00	<i>AK</i>	0.00	<i>RPL10</i>	0.01	0.04
2	<i>RPS15</i>	0.07	<i>RPL10</i>	0.00	<i>RPL10</i>	0.00	<i>AK</i>	0.01	0.04
3	<i>RPL10</i>	0.07	<i>RPS15</i>	0.00	<i>RPS15</i>	0.00	<i>RPS15</i>	0.01	0.06
4	<i>AK</i>	0.07	<i>GST</i>	0.01	<i>GST</i>	0.01	<i>GAPDH</i>	0.02	0.07
5	<i>GAPDH</i>	0.07	<i>GAPDH</i>	0.02	<i>GAPDH</i>	0.02	<i>GST</i>	0.02	0.09
6	<i>RPS20</i>	0.09	<i>RPS20</i>	0.04	<i>RPS20</i>	0.04	α -TUB	0.03	0.10
7	<i>EF2</i>	0.09	<i>EF2</i>	0.05	<i>EF2</i>	0.05	<i>EF2</i>	0.03	0.16
8	<i>EF1\alpha</i>	0.09	<i>EF1\alpha</i>	0.05	<i>EF1\alpha</i>	0.05	<i>EF1\alpha</i>	0.03	0.17
9	α -TUB	0.10	α -TUB	0.05	α -TUB	0.05	<i>RPS20</i>	0.05	0.25
10	<i>RPL8</i>	0.12	<i>RPL8</i>	0.10	<i>RPL8</i>	0.10	<i>Ferritin</i>	0.08	0.39
11	<i>RPS11</i>	0.12	<i>RPS11</i>	0.10	<i>RPS11</i>	0.10	<i>RPL8</i>	0.09	0.45
12	β -TUB	0.15	<i>Ferritin</i>	0.13	<i>Ferritin</i>	0.13	<i>RPS11</i>	0.09	0.45
13	<i>Ferritin</i>	0.15	β -TUB	0.14	β -TUB	0.14	β -TUB	0.11	0.49
14	<i>RPL32</i>	0.16	<i>RPL32</i>	0.14	<i>RPL32</i>	0.14	<i>RPL32</i>	0.11	0.58
15	β -actin	0.20	β -actin	0.19	β -actin	0.19	β -actin	0.12	0.61

Thiamethoxam

1	<i>RPL10</i>	0.09	<i>RPL10</i>	0.01	<i>GAPDH</i>	0.01	<i>AK</i>	0.01	0.03
2	<i>RPS11</i>	0.09	<i>AK</i>	0.02	<i>RPS15</i>	0.01	<i>RPL10</i>	0.01	0.07

3	<i>AK</i>	0.09	<i>RPS11</i>	0.02	<i>RPS11</i>	0.01	<i>RPS11</i>	0.01	0.07
4	<i>RPS15</i>	0.10	<i>RPS15</i>	0.04	<i>AK</i>	0.02	<i>GAPDH</i>	0.02	0.10
5	<i>GAPDH</i>	0.10	<i>GAPDH</i>	0.05	<i>RPL10</i>	0.03	<i>RPS15</i>	0.02	0.10
6	β -actin	0.10	β -actin	0.05	<i>EF1\alpha</i>	0.03	<i>EF1\alpha</i>	0.03	0.15
7	<i>EF1\alpha</i>	0.11	<i>EF1\alpha</i>	0.07	β -actin	0.05	β -actin	0.05	0.25
8	<i>RPS20</i>	0.12	<i>RPS20</i>	0.08	β -TUB	0.05	β -TUB	0.06	0.24
9	β -TUB	0.12	β -TUB	0.08	<i>RPS20</i>	0.07	<i>GST</i>	0.07	0.34
10	<i>GST</i>	0.13	<i>GST</i>	0.09	<i>GST</i>	0.08	<i>RPS20</i>	0.08	0.40
11	<i>RPL32</i>	0.15	<i>RPL32</i>	0.14	<i>RPL32</i>	0.09	<i>EF2</i>	0.09	0.42
12	<i>EF2</i>	0.16	<i>EF2</i>	0.14	<i>RPL8</i>	0.10	<i>RPL8</i>	0.11	0.57
13	<i>RPL8</i>	0.16	<i>RPL8</i>	0.15	α -TUB	0.11	<i>Ferritin</i>	0.12	0.55
14	α -TUB	0.17	α -TUB	0.16	<i>EF2</i>	0.12	<i>RPL32</i>	0.12	0.66
15	<i>Ferritin</i>	0.20	<i>Ferritin</i>	0.20	<i>Ferritin</i>	0.13	α -TUB	0.14	0.51
λ-cyhalothrin									
1	<i>RPL10</i>	0.05	<i>RPL32</i>	0.01	<i>RPL10</i>	0.01	<i>EF1\alpha</i>	0.00	0.02
2	<i>RPL32</i>	0.05	<i>RPS11</i>	0.01	<i>RPL32</i>	0.01	<i>RPL32</i>	0.01	0.05
3	<i>RPS11</i>	0.05	<i>RPL10</i>	0.02	<i>EF2</i>	0.02	<i>EF2</i>	0.01	0.06
4	<i>EF1\alpha</i>	0.05	<i>Ferritin</i>	0.02	<i>EF1\alpha</i>	0.02	<i>Ferritin</i>	0.01	0.06
5	<i>Ferritin</i>	0.05	<i>RPS15</i>	0.02	<i>Ferritin</i>	0.02	<i>RPL10</i>	0.02	0.08

6	<i>RPL8</i>	0.05	<i>RPL8</i>	0.02	<i>RPS11</i>	0.03	<i>RPS11</i>	0.02	0.09
7	<i>EF2</i>	0.05	<i>EF1α</i>	0.02	<i>RPL8</i>	0.03	<i>RPS20</i>	0.03	0.11
8	<i>RPS15</i>	0.06	<i>EF2</i>	0.03	<i>RPS15</i>	0.03	<i>AK</i>	0.03	0.13
9	β -actin	0.06	β -actin	0.03	β -actin	0.03	<i>RPL8</i>	0.03	0.14
10	<i>AK</i>	0.07	<i>AK</i>	0.04	<i>AK</i>	0.04	β -actin	0.03	0.15
11	<i>RPS20</i>	0.07	<i>RPS20</i>	0.05	<i>RPS20</i>	0.04	<i>RPS15</i>	0.03	0.15
12	<i>GST</i>	0.08	<i>GST</i>	0.06	<i>GST</i>	0.04	<i>GST</i>	0.05	0.21
13	β -TUB	0.08	β -TUB	0.07	β -TUB	0.05	α -TUB	0.06	0.22
14	α -TUB	0.11	α -TUB	0.11	α -TUB	0.06	β -TUB	0.06	0.23
15	<i>GAPDH</i>	0.17	<i>GAPDH</i>	0.17	<i>GAPDH</i>	0.07	<i>GAPDH</i>	0.13	0.57
Abamectin									
1	<i>RPL10</i>	0.07	<i>RPS15</i>	0.01	<i>GAPDH</i>	0.01	<i>RPS15</i>	0.01	0.05
2	<i>RPS15</i>	0.07	<i>RPL10</i>	0.01	<i>RPL10</i>	0.01	<i>RPL10</i>	0.01	0.06
3	<i>GAPDH</i>	0.08	<i>EF1α</i>	0.02	<i>RPS15</i>	0.02	<i>GAPDH</i>	0.01	0.06
4	<i>RPL32</i>	0.08	<i>GAPDH</i>	0.02	<i>RPL32</i>	0.02	<i>RPL32</i>	0.02	0.09
5	<i>EF1α</i>	0.08	<i>RPL32</i>	0.03	<i>RPS11</i>	0.03	<i>EF1α</i>	0.02	0.11
6	<i>EF2</i>	0.09	<i>EF2</i>	0.04	<i>EF1α</i>	0.03	<i>RPS11</i>	0.03	0.16
7	<i>RPS11</i>	0.09	<i>RPS11</i>	0.06	<i>Ferritin</i>	0.04	<i>EF2</i>	0.04	0.19
8	<i>GST</i>	0.09	<i>GST</i>	0.06	<i>EF2</i>	0.05	<i>Ferritin</i>	0.05	0.23

9	<i>Ferritin</i>	0.10	<i>Ferritin</i>	0.08	<i>GST</i>	0.06	<i>GST</i>	0.05	0.24
10	<i>AK</i>	0.11	<i>AK</i>	0.09	<i>β-actin</i>	0.06	<i>β-actin</i>	0.06	0.33
11	<i>β-actin</i>	0.11	<i>β-actin</i>	0.09	<i>RPL8</i>	0.07	<i>AK</i>	0.07	0.36
12	<i>RPL8</i>	0.13	<i>RPL8</i>	0.11	<i>AK</i>	0.08	<i>RPL8</i>	0.08	0.39
13	<i>α-TUB</i>	0.13	<i>α-TUB</i>	0.12	<i>α-TUB</i>	0.09	<i>α-TUB</i>	0.09	0.35
14	<i>β-TUB</i>	0.15	<i>β-TUB</i>	0.14	<i>β-TUB</i>	0.09	<i>β-TUB</i>	0.10	0.44
15	<i>RPS20</i>	0.17	<i>RPS20</i>	0.16	<i>RPS20</i>	0.10	<i>RPS20</i>	0.11	0.54

Matrine

1	<i>RPL10</i>	0.09	<i>RPL8</i>	0.01	<i>GST</i>	0.01	<i>RPL10</i>	0.01	0.06
2	<i>RPL8</i>	0.09	<i>RPL10</i>	0.01	<i>AK</i>	0.01	<i>RPL8</i>	0.01	0.06
3	<i>GAPDH</i>	0.10	<i>GAPDH</i>	0.03	<i>RPL8</i>	0.03	<i>AK</i>	0.03	0.13
4	<i>AK</i>	0.10	<i>AK</i>	0.04	<i>RPL10</i>	0.03	<i>GAPDH</i>	0.03	0.14
5	<i>GST</i>	0.10	<i>GST</i>	0.05	<i>Ferritin</i>	0.05	<i>GST</i>	0.04	0.16
6	<i>β-actin</i>	0.10	<i>β-actin</i>	0.05	<i>EF1α</i>	0.05	<i>RPS15</i>	0.04	0.16
7	<i>RPS15</i>	0.10	<i>RPS15</i>	0.05	<i>RPS15</i>	0.06	<i>β-actin</i>	0.05	0.20
8	<i>EF2</i>	0.11	<i>EF2</i>	0.07	<i>GAPDH</i>	0.07	<i>EF2</i>	0.05	0.23
9	<i>RPS20</i>	0.12	<i>RPS20</i>	0.08	<i>β-actin</i>	0.07	<i>RPS20</i>	0.06	0.24
10	<i>Ferritin</i>	0.13	<i>Ferritin</i>	0.10	<i>EF2</i>	0.08	<i>EF1α</i>	0.07	0.32
11	<i>EF1α</i>	0.13	<i>EF1α</i>	0.10	<i>RPS20</i>	0.08	<i>Ferritin</i>	0.07	0.26

12	α -TUB	0.15	α -TUB	0.12	RPL32	0.09	RPL32	0.08	0.40
13	RPL32	0.15	RPL32	0.12	α -TUB	0.10	α -TUB	0.09	0.31
14	EF2	0.65	RPS11	0.18	RPS11	0.11	RPS11	0.11	0.46
15	α -TUB	0.84	β -TUB	0.22	β -TUB	0.13	β -TUB	0.16	0.66

Table S4. Comprehensive gene stability ranking of 15 candidate reference genes in all samples was calculated using ReFFinder. The Genes Geomean of ranking values is listed, and the stability decreased from top to bottom.

Rank	Insecticide treatment		Temperatures		Odor stimulation		Developmental stages		Both sexes		All samples	
	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM
1	EF2	2.21	EF1a	1.73	EF1a	2.34	Actin	1.5	Actin	1.5	EF2	2
2	RPL32	3.6	Actin	2.21	RPL8	3.16	EF2	2	RPS15	2.63	RPL8	2.78
3	GAPDH	3.98	RPL32	2.83	Ferritin	3.44	RPS15	4.36	RPL8	3.64	GST	2.94
4	EF1a	5.03	RPL8	3.94	Actin	4.03	GST	4.56	Ferritin	3.71	Ferritin	3.66
5	GST	5.07	Ferritin	4.14	EF2	4.16	RPS11	5.01	AK-1	3.98	GAPDH	4.03
6	α -TUB	5.18	EF2	4.7	α -TUB	5.2	RPS20	5.48	RPS20	4.76	RPS15	4.53
7	RPS15	5.18	RPL10	6.82	GAPDH	5.58	β -TUB	6.45	GST	6.05	EF1a	7
8	RPL8	5.90	GAPDH	7.14	RPS15	6.48	RPL10	7.01	RPL32	6.82	RPS11	7.71
9	AK-1	6.12	AK-1	8.61	RPL10	7.2	Ferritin	7.48	EF1a	7.75	RPL10	9.01
10	β -TUB	6.85	RPS11	9.43	AK-1	7.2	EF1a	7.97	RPS11	9.49	RPS20	9.39
11	Ferritin	8.68	RPS15	10.22	β -TUB	8.24	GAPDH	9.43	GAPDH	11	AK-1	9.43
12	RPL10	9.19	RPS20	12	GST	11.98	RPL8	9.72	RPL10	12	Actin	10.47
13	Actin	12.24	α -TUB	13.24	RPS11	13.24	AK-1	13.24	β -TUB	13	β -TUB	10.61
14	RPS11	14	GST	13.74	RPS20	13.47	RPL32	13.74	EF2	14	α -TUB	14
15	RPS20	15	β -TUB	15	RPL32	15	α -TUB	15	α -TUB	15	RPL32	15

Rank	Imidacloprid		Thiamethoxam		λ -cyhalothrin		Abamectin		Matrine	
	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM	Gene	GM
1	<i>RPL10</i>	1.57	<i>RPL10</i>	1.78	<i>RPL32</i>	1.19	<i>RPS15</i>	1.32	<i>RPL10</i>	1.68
2	<i>RPS15</i>	2.06	<i>AK-1</i>	2.21	<i>RPL10</i>	2.34	<i>RPL10</i>	1.68	<i>RPL8</i>	1.86
3	<i>AK-1</i>	2.21	<i>RPS11</i>	2.71	<i>EF1a</i>	3.25	<i>GAPDH</i>	2.45	<i>AK-1</i>	2.83
4	<i>GST</i>	2.99	<i>RPS15</i>	2.83	<i>RPS11</i>	3.83	<i>RPL32</i>	4.23	<i>GST</i>	3.5
5	<i>GAPDH</i>	4.73	<i>GAPDH</i>	3.34	<i>Ferritin</i>	4.16	<i>EF1a</i>	4.61	<i>GAPDH</i>	3.83
6	<i>EF2</i>	6.74	<i>EF1a</i>	6.48	<i>EF2</i>	5.09	<i>RPS11</i>	6.19	<i>RPS15</i>	6.44
7	<i>RPS20</i>	7.14	<i>Actin</i>	6.48	<i>RPL8</i>	6.9	<i>EF2</i>	6.7	<i>Actin</i>	6.9
8	<i>EF1a</i>	7.74	β -TUB	8.49	<i>RPS15</i>	7.52	<i>GST</i>	8.24	<i>Ferritin</i>	8.41
9	α -TUB	8.13	<i>RPS20</i>	8.71	<i>AK-1</i>	9.46	<i>Ferritin</i>	8.45	<i>EF2</i>	8.46
10	<i>RPL8</i>	10.72	<i>GST</i>	9.74	<i>Actin</i>	9.46	<i>Actin</i>	10.49	<i>EF1a</i>	9.45
11	<i>RPS11</i>	10.74	<i>RPL32</i>	11.68	<i>RPS20</i>	9.82	<i>AK-1</i>	10.72	<i>RPS20</i>	9.46
12	<i>Ferritin</i>	11.93	<i>EF2</i>	12.2	<i>GST</i>	12	<i>RPL8</i>	11.74	<i>RPL32</i>	12.49
13	β -TUB	12.72	<i>RPL8</i>	12.49	β -TUB	13	α -TUB	13	α -TUB	12.49
14	<i>RPL32</i>	13.74	α -TUB	13.98	α -TUB	14	β -TUB	14	<i>RPS11</i>	14
15	<i>Actin</i>	15	<i>Ferritin</i>	14.47	<i>GAPDH</i>	15	<i>RPS20</i>	15	β -TUB	15

Note: GM, geometric mean

Table S5. FPKM values of *B. gobica* nymphs and adults before and after imidacloprid treatment in the transcriptome data. FPKM: fragments per kilobase of exon model per million mapped reads.

Sample names	FPKM values		
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Nymphs without imidacloprid treatment	2.86	2.11	0.24
Nymphs with imidacloprid treatment	0.90	1.50	1.74

Adults without imidacloprid treatment	11.43	7.10	11.77
---------------------------------------	-------	------	-------

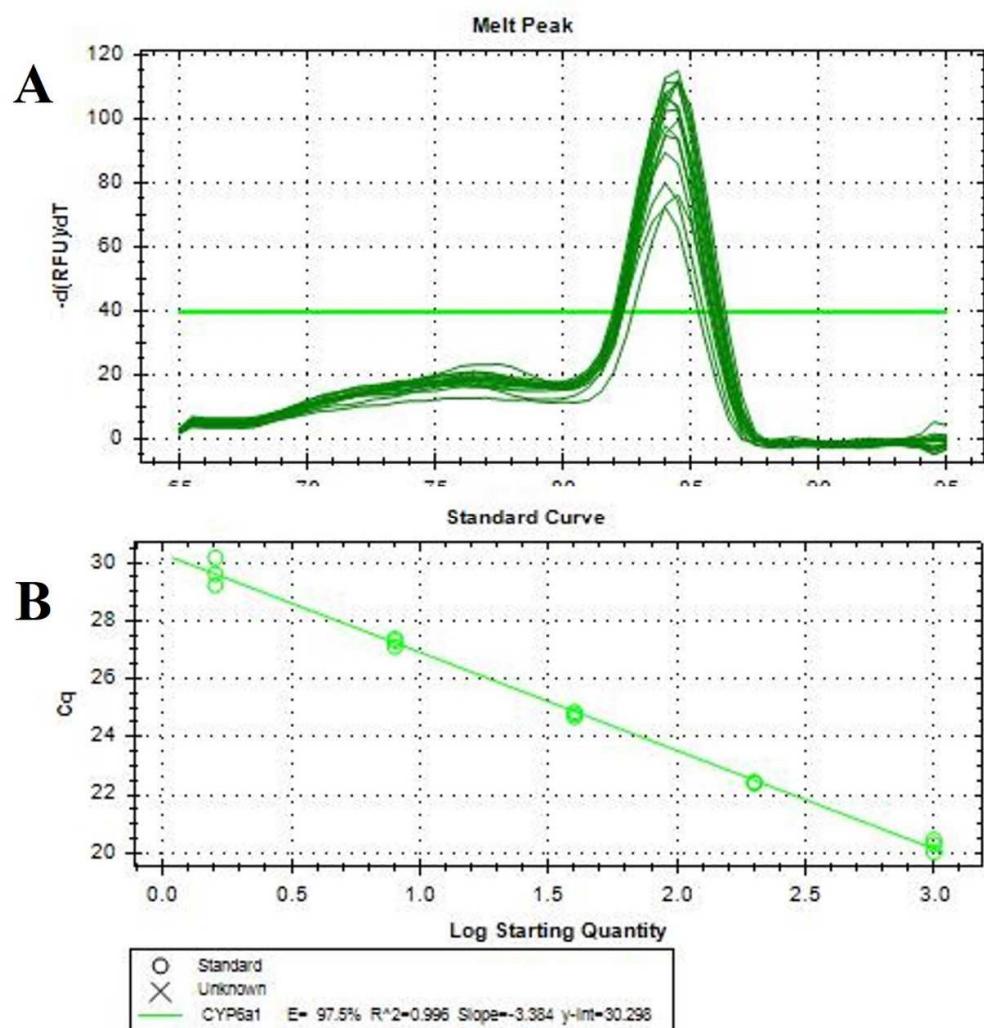


Figure S1. Specificity and amplification efficiency of primer pairs of target gene *CYP6a1* by RT-qPCR in *B. gobica*. A: The melt peaks of primers of *CYP6a1*. B: The standard curve of primers of *CYP6a1*.