

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17018

## 脊尾白虾 *GAPDH* 基因的克隆及其内参基因稳定性分析

薛蓓<sup>1, 2, 3</sup>, 张培<sup>1, 2, 3</sup>, 李志辉<sup>1, 2, 3</sup>, 赵莲<sup>1, 2, 3</sup>, 赖晓芳<sup>1, 2, 3</sup>, 高焕<sup>1, 2, 3</sup>, 李健<sup>4</sup>,  
阎斌伦<sup>1, 2, 3</sup>

1. 淮海工学院 海洋生命与水产学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏省海洋生物产业技术创新中心, 江苏 连云港 222001;

3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014;

4. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 为比较甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、18S rRNA 和  $\beta$ -actin 基因在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)作内参基因的优劣, 本研究采用同源克隆和 RACE 技术, 克隆了脊尾白虾 *GAPDH* 基因全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: KX893516), 通过实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术, 检测 3 种基因在脊尾白虾不同组织及不同蜕壳后时间点的表达量变化, 在此基础上进行内参稳定性分析。结果显示, 脊尾白虾 *GAPDH* 基因全长 1514 bp, 开放读码框 1002 bp, 编码 333 个氨基酸, 二级结构预测显示 GAPDH 蛋白具有一个高度保守的 NAD<sup>+</sup>结合功能域(NAD binding domain)和行使糖运输和代谢的催化功能域。分析 qRT-PCR 结果并结合 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种软件的分析发现, 在不同组织和不同蜕壳后时间点, 3 种内参基因的稳定性由高到低依次为 18S rRNA、*GAPDH*、 $\beta$ -actin。因此, 在脊尾白虾不同组织和不同蜕壳后时间点的定量分析中, 选取单内参基因时, 推荐使用 18S rRNA 为内参基因, 双内参时推荐 18S rRNA 和 *GAPDH*, 而 18S rRNA、 $\beta$ -actin 和 *GAPDH* 在其他生理条件下作内参基因的稳定性还有待进一步研究。

**关键词:** 脊尾白虾; *GAPDH*; 内参基因; 组织; 蜕壳后时间点

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1003-10

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是广泛分布于黄、渤海区域的中国特有的养殖经济虾类<sup>[1]</sup>, 具有繁殖能力强、适应性广和生长速度快等优点<sup>[2]</sup>。近年来, 养殖规模不断扩大, 产量可占中国东部沿海混养池塘总产量的 1/3<sup>[3]</sup>。该虾的基础生物学研究也日益受到重视, 尤其是在繁殖发育及免疫相关基因研究方面<sup>[4-6]</sup>。为阐释不同生理条件下基因调控特征和机理, 需要分析大量的基因表达特征, 这些基因表达的定量分析需要以一个内参基因(reference gene)作为参考, 因此内参基因表达稳定性的好坏直接决定了定量是否准确。内参基

因通常是各种管家基因(housekeeping genes), 是指其表达水平不受研究条件的影响, 且可以在多种样本间恒定表达的已知参照基因<sup>[7]</sup>。然而, 大量的研究结果表明, 在所有组织、发育时期、生理条件下均稳定表达的理想的内参基因是不存在的<sup>[8]</sup>。目前常用的内参基因主要是 18S rRNA、 $\beta$ -actin、*GAPDH* 和转录延伸因子(elongation factors, EF)等<sup>[9]</sup>。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是糖酵解过程的一种重要的能量代谢酶, 参与第 6 步反应, 在 NAD<sup>+</sup>和无机磷酸(Pi)的参与下将甘油醛-3-磷

收稿日期: 2017-01-13; 修订日期: 2017-03-02.

基金项目: 江苏省农业科技支撑计划项目(BE2013363); 江苏省高校“青蓝工程”培养基金项目; 江苏省 2015 年度普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX15\_1486); 连云港市产学研合作项目(CXY1517); 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室研究基金项目(2015HS001).

作者简介: 薛蓓(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物繁殖与遗传育种学. E-mail: malvsy@163.com

通信作者: 阎斌伦(1962-), 男, 教授, 研究方向为甲壳类种质资源开发及利用. E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

酸的醛基氧化为羧基并将氧化过程产生的能量贮存到 ATP 分子中, 具有高度保守性, 常作为内参基因用于基因表达定量的研究中<sup>[10]</sup>。但近几年随着对其研究的深入, 发现 GAPDH 参与到细胞凋亡<sup>[11]</sup>、基因转录<sup>[12]</sup>以及氧化应激下的代谢过程<sup>[13]</sup>等生理活动中, 基因的表达水平并不稳定, 作为内参基因存在一定的争议<sup>[14-15]</sup>。为了比较 GAPDH 与其他两种内参基因(18S rRNA、 $\beta$ -actin)在脊尾白虾生长发育过程中的表达稳定性, 以便筛选适合脊尾白虾生长发育过程中基因表达定量更稳定的内参基因, 本研究通过 RACE 技术从脊尾白虾中克隆得到 GAPDH 的 cDNA 全序列, 结合已知的 2 种内参基因 18S rRNA 和  $\beta$ -actin, 评估 3 种基因在脊尾白虾不同组织和不同蜕壳后时间点作为内参基因的稳定性, 旨在为在脊尾白虾中进行功能基因的表达分析和调控机制的研究时, 选择最适内参基因提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用脊尾白虾均为连云港赣榆养殖池塘繁而来的个体, 体长: (6.67±0.61) cm, 体重: (1.61±0.42) g, 实验前在实验室暂养 1 周, 暂养期间保持连续充气, 水温维持在 26℃左右, 盐度 28, pH 8.0, 每日早晚各投喂饵料(虾类专用配合饲料) 1 次, 定时吸污换水 1 次。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 脊尾白虾不同组织样品的获取** 选取 3 只脊尾白虾, 分别取其眼柄、鳃、心脏、肝胰腺、卵巢、胃、肠和肌肉共 8 个组织迅速用液氮冷冻后, 置于-80℃保存, 用于后续 RNA 的提取。

### 1.2.2 不同蜕壳后时间点脊尾白虾样品的获取

每 2 个个体作为一组放入规格为 28 cm×18 cm×20 cm (长×宽×高)的透明塑料箱中进行养殖, 全天 24 h 不间断观察各养殖水箱中脊尾白虾活动状况, 分别在蜕壳后的第 0 min (对照)、1 min、5 min、10 min、15 min 取样, 每个时间点各取 3 次(3 次重复)。同时以同一养殖水箱中与蜕壳个体共同养殖的未发生蜕壳的脊尾白虾个体作为对照。取各脊尾白虾肌肉组织约 50 mg 用于提

取总 RNA。

**1.2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 将各组织样品经液氮研磨为粉末后, 转入液氮预冷过的无 RNase 的 Eppendorf 管中, 利用 Trizol 试剂盒(生工生物工程有限公司)提取总 RNA (包括 mRNA 及 rRNA), 提取后的 RNA 置于-80℃保存。用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性, 并用第一链 cDNA 合成试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix, TaKaRa, 中国)逆转录获得 cDNA, 试剂盒中所用反转录引物为 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 两种, 能够保证 18S rRNA 在 PCR 反应中被逆转录, 并作为后续定量实验中的模板。将 cDNA 浓度统一稀释至 50 ng/ $\mu$ L, 置于-20℃保存。8 个组织各取 10  $\mu$ L 组成混合 cDNA, 作为基因克隆及引物验证的模板。

**1.2.4 脊尾白虾 GAPDH 基因的克隆** 根据已知中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, HM053701.1)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*, EU919707.1)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*, JX268543.1)的 GAPDH 基因序列, 以 Primer premier 5.0 软件设计得到兼并引物(表 1)。以脊尾白虾各组织混合 cDNA 为模板, 利用 GAPDH-F/R 为引物, 以 30  $\mu$ L PCR 反应体系扩增 GAPDH 基因的保守片段, 其中包括 3  $\mu$ L 10×PCR buffer, 1.8  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 0.6  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L), 0.6  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L), 0.6  $\mu$ L 混合 cDNA 模板, 1.2  $\mu$ L GAPDH-F, 1.2  $\mu$ L GAPDH-R 和 21  $\mu$ L 灭菌水。PCR 反应条件为: 94℃预变性 3min; 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。将扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶验证后, 参照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工生物工程有限公司)说明回收纯化扩增产物, 并连接至 pEASY-T3 载体, 重组质粒转化至大肠杆菌 Trans-T1, 经蓝白斑筛选后选取白色菌落送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

针对测序得到的核心序列片段设计 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)所用引物(表 1), 利用 SMART™ RACE cDNA amplification kit 试剂盒进行 5' 和 3'RACE。将克隆测序得到的 5' 和 3' 端序列与核心序列拼接即可获得 GAPDH 基因的 cDNA

全长序列。

**1.2.5 脊尾白虾 GAPDH 基因的序列分析** 利用 DNASTar lasergene v7.1 将 3 次测序获得的 cDNA 序列进行拼接; 利用 NCBI BLAST 进行核苷酸序列及预测氨基酸序列的比对; 利用 SignalP 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测; 利用 Compute pI/Mw 软件([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))计算理论等电点(pI)和分子量; 利用 protparam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白质理化性质预测; 用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析蛋白结构域; 利用 Clustal W 软件对脊尾白虾 GAPDH 基因及其他物种的 GAPDH 基因所翻译的氨基酸序列进行多重比对; 用 MEGA 6.0 软件进行 NJ 系统进化树的构建, 重复 1000 次计算 Bootstrap 值。

**1.2.6 脊尾白虾 3 种内参基因的荧光定量引物扩增效率的验证** 将脊尾白虾各组织混合 cDNA 按照 1 : 5 梯度依次稀释成 5 个梯度, 并以此为模板进行 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 的扩增体系为 20 μL, 其中包括 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, cDNA 模板 4 μL, 灭菌水 4 μL。采用 StepOnePlus™型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems Inc.)进行扩增, 反应程序为: 先 95℃ 预变性 30 s, 再以 95℃ 变性 5 s、60℃ 复性 31 s 进行 40 个循环, 最后是一个熔解曲线程序(95℃

进行 15 s, 60℃ 进行 60 s, 再 95℃ 15 s)。通过熔解曲线验证引物扩增的专一性, 并以 cDNA 浓度的(log<sub>5</sub>)值为横坐标, 以测得的 C<sub>t</sub> 值为纵坐标, 绘制标准曲线。根据公式  $E=(5^{(-1/\text{slope})}-1)\times 100\%$  计算各个内参基因的扩增效率(E)。

### 1.2.7 脊尾白虾 3 种内参基因的荧光定量分析

以上述不同组织和不同蜕壳后时间点的脊尾白虾 cDNA 样品为模板, 分别进行针对 18S rRNA (GenBank 登录号: HQ172894.1)、β-actin (GenBank 登录号: JQ045354.1) 和 GAPDH 基因的 qRT-PCR, 荧光定量引物见表 1。qRT-PCR 的扩增体系及程序同 1.2.6。

**1.2.8 数据处理和分析** 分别用原始 C<sub>t</sub> 值以及 geNorm (ver. 3.5)、NormFinder (ver. 0953) 和 Best-Keeper (ver. 1.0) 软件分析 3 个基因的表达稳定值。

## 2 结果与分析

### 2.1 GAPDH 基因全长 cDNA 克隆和序列分析

利用同源克隆和 RACE 技术获得的脊尾白虾 GAPDH 基因 cDNA 序列全长 1514 bp (GenBank 登录号: KX893516)(图 1), 其中开放读码框 1002 bp, 5' 非编码区 69 bp, 3' 非编码区 443 bp, 编码一个由 333 个氨基酸残基组成的蛋白质, 包括带负电荷氨基酸残基(Asp, Glu)38 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg, Lys)37 个, 其分子量为 35.71 kD, 理论等电点为 6.61, 不稳定指数(instability index)为 22.26,

表 1 脊尾白虾 GAPDH 基因克隆及表达分析引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in GAPDH cloning and characterizing in *Exopalaemon carinicauda*

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
GAPDH-F	GGTTGTGGCBGTGAATGA	简并引物
GAPDH-R	AATGACACGGTGGARTAG	degenerate primers
GAPDH-GSP1	GGTAAGCTTGCCGTTGAGTCAGGGAA	5' RACE 特异引物
GAPDH-GSP1-1	AAGTTTCGTCAGGACCTTGGCAAC	5' RACE primers
GAPDH-GSP1-2	GCCGTTGACCACCAGAGCACCGTCCT	
GAPDH-GSP2	CCCCGTTGCCAAGGTCTGCACGAAA	3' RACE 特异引物
GAPDH-GSP2-1	TCCCTGAACCAACGGCAAGCTTACC	3' RACE primers
GAPDH-GSP2-2	CATCCAGCTCAGCAAACCTCGTGA	
GAPDH-Q-F	GCTGGTGCCGAATACATTGTTG	荧光定量引物
GAPDH-Q-R	TTACCTTCTTAGCACCACCCCTG	real-time PCR primers
18S-Q-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	
18S-Q-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	
β-actin-Q-F	AACTTCAACACCCCAGCCA	
β-actin-Q-R	TCTCCAGAGTCCAGCACGAT	

1 ATGGGCTAGTCAGACCAGAGTGAAGTCTCTCGACACCTCGCCCCGACTTCCACCAACTCAACCAAC 69  
 70 ATGTCTAAGATCGGAATCAACGGTTTGGCCGCATTGGTCGCTCTGTGCTCTTCGCTGCTCTTGAAAGGGCCGCCAGGGTTGTGTAATGATCCCTTCATTGGCTCTGATTACATG 189  
 1 M S K I G I N G F G R I G R L V L R A A L L K G A E V V A V N D P F I A L D Y M 40  
 190 GTTTACATGTTCAAGTATGACTCCACACATGGTGCTTCAGGGTGAGGTGAAGGCTGAGGGCCTGCTCTGGGTGCAACGCCACAAGATCCAGGTCTTCAATGAAATGAAGCCCAG 309  
 41 V Y M F K Y D S T H G V F K G E V K A E D G A L V V N G H K I Q V F N E M K P E 80  
 310 AACATCCATGGAGCAAGGCTGGTGCAGAACATTTGTTGAATCAACTGGTGATTACCCACATTGAGAAAGCCTGCCCACCTTCCAGGGTGGTGTAAAGAAGGTAAATCATCTGCT 429  
 81 N I P W S K A G A E Y I V E S T G V F T T I E K A S A H F Q G G A K K V I I S A 120  
 430 CCATCTGCTGATGCCCATGTTGCTGTGCAACCTGGAAAAGTACTCCAAGGACATGAAAGTAGTTCAAATGCTTCCATGCCACCAACTGCCCTGCCCCGTTGCCAAGGTC 549  
 121 P S A D A P M F V C G V N L E K Y S K D M K V V S N A S C T T N C L A P V A K V 160  
 550 CTGCACGAAAATTCGAGATTGTTGAAGGCTCATGACCACTGTCATGCTGTTACTCGACTCGAGAGCTGTTGATGGACCCCTCGCAAGGACTGGCGTGGTGGCGTGGTGC 669  
 161 L H E N F E I V E G L M T T V H A V T A T Q K T V D G P S A K D W R G G R G A A 200  
 670 CAGAACATCATCCCTCATCTAGTGCTGCTAGGCTGTGGTAAGGTTACCGCTGACACTCAACGGCAAGCTTACCGGCATGGCTTCCGTCGACCTACCCCGATGTTGTA 789  
 201 Q N I I P S S T G A A K A V G K V I P E L N G K L T G M A F R V P T P D V S V V 240  
 790 GATCTCACAGTCCGCTTGGCAAGGAGTGTGCTAGTGAATTAAGGCTGCAATGAAAGGCTGCTGCTGAGGGTCCATTGAATGGCGCTTGGATACACTGAGGATGATGTTGCTCC 909  
 241 D L T V R L G K E C S Y D D L K A A M K A A A E G P L N G V L G Y T E D D V V S 280  
 910 TGTGACTTCACTGGTGATGAGAGGTCTTCAATCTTGATGCCAAGGCTGCCATCCAGCTCAGCAAAACCTCTGTGAAGGTTGCTCTGGATGACAACGATGGCTACTCTAACCGT 1029  
 281 C D F T G D E R S S I F D A K A G I Q L S K T F V K V V S W Y D N E F G Y S N R 320  
 1030 GTCATTGATCTTGAAGCACATGCAGAAAAGTATGCTAA 1071  
 321 V I D L L K H M Q K V D A \* 333  
 1072 AGAGTGTACTCTTCAGATTCTCTGAATATGCTGAAAGGTTTGTAAAGGGGCCGAAAGGTTGCTCAGGTTATCTTAAAGGTTGATGAAAGTACACAGTCTWGAAACCACCTGTA 1191  
 1192 ATTAAACAAATTATTTATTAGCAAAGTTATGCTGCTGCAAGTCATGTTTCCATTATTTCTAGCAGAGGTATGAAAGTGTAGGATTATGCTTAAAGTT 1311  
 1312 AGTTTTGACATAGGAGGGAAAGTGGAAACAAACCTTACACAGTTATCACTTTATTTCAAATAACAAATGTTCTCTGTGCTAGTCTACAACCCCAATGCTTGTGCTT 1431  
 1432 TAAGAAGTATGTAAGTGACCGACTGGATGCCAATAATAAAAGTTATTCAAAAA 1514

图 1 脊尾白虾 GAPDH 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

ATG 为起始密码子, TAA 为终止密码子, AATAAA 为多聚腺苷酸加尾信号, 实线下划线部分为 Gp-dh-N 区,  
虚线下划线部分为 Gp-dh-C 区。

Fig. 1 The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *Exopalaemon carinicauda* GAPDH gene  
ATG indicates start codon. TAA indicate stop codon. AATAAA indicates putative polyadenylation signals.  
The underline sequence is the domain Gp-dh-N (full line) and the domain Gp-dh-C (imaginary line).

在体外为较稳定蛋白质。应用 SignalP 软件对 GAPDH 预测蛋白进行信号肽分析, 显示该蛋白不含有信号肽序列。运用 SMART 在线程序对 GAPDH 蛋白保守结构域预测, 结果显示该蛋白具有一个高度保守的 NAD<sup>+</sup>结合功能域(NAD binding domain)Gp-dh-N 区, 位于 3~149 aa; 以及行使糖运输和代谢的催化功能域 Gp-dh-C 区, 位于 154~311aa。

## 2.2 GAPDH 基因同源性分析

利用 NCBI BLASTP 软件, 将获得的脊尾白虾 GAPDH 基因编码的氨基酸序列与其他甲壳动物, 如中华绒螯蟹、日本大眼蟹(*Macrophthalmus japonicus*)、三疣梭子蟹、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、拟穴青蟹、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)和胡钩虾(*Gammarus locusta*)的氨基酸序列进行同源比对, 结果显示, GAPDH 蛋白在甲壳类动物中具有很高的同源性, 与日本大眼蟹同源性最高(95.50%), 其他依次为拟穴青蟹(95.21%)、红螯螯虾(95.21%)、中华绒螯蟹(94.59%)、三疣梭子蟹(94.91%)和克氏原螯虾(94.91%), 与胡钩虾相

似度最低为 87.13%。

使用 MEGA6.0 软件(Neighbor-Joining 法)对脊尾白虾 GAPDH 进行聚类分析, 构建进化树(图 2)。从图 2 中可以看出脊尾白虾 GAPDH 与其他甲壳纲聚为一支, 之后与昆虫纲聚为一支, 最后与鱼类、鼠和人等脊椎动物聚为一支。同时发现脊尾白虾 GAPDH 在进化上与拟穴青蟹和三疣梭子蟹亲缘关系最近, 而与同为虾类的克氏原螯虾和红螯螯虾的亲缘关系略远。

## 2.3 3 种内参基因 qRT-PCR 引物扩增特异性与扩增效率分析

对 18S rRNA、 $\beta$ -actin 和 GAPDH 基因进行 qRT-PCR 分析, 结果显示, 各内参基因的熔解曲线为显著的单一信号峰, 曲线重复性好, 表明 qRT-PCR 反应专一性高, 结果准确可信(图 3)。根据测定的  $C_t$  值, 以 cDNA 浓度稀释倍数的  $\log_2$  的值为横坐标, 以测得的  $C_t$  值为纵坐标, 绘制标准曲线(图 4)。其中, 18S rRNA 基因的标准曲线回归方程为:  $y=-2.4047x+5.1960$ ,  $R^2=0.9998$ , 扩增效率为 95.285%;  $\beta$ -actin 基因的标准曲线回归方

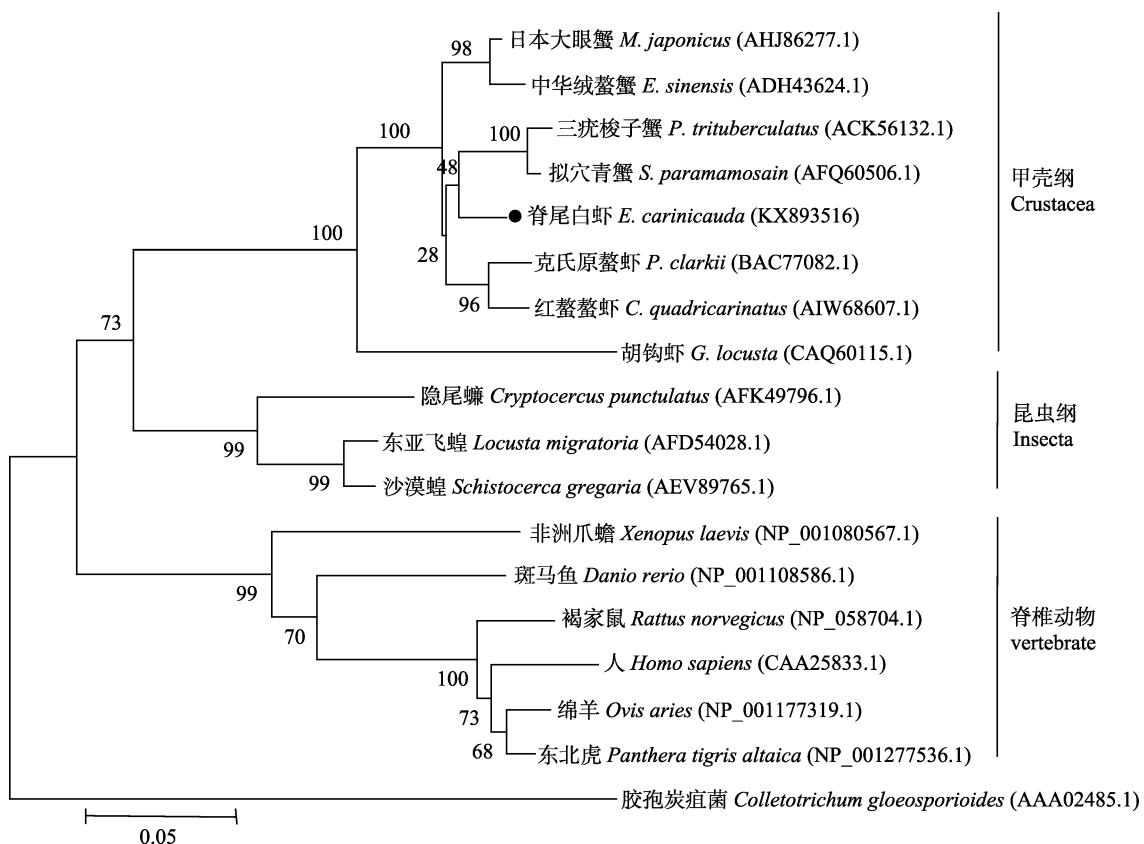


图2 脊尾白虾 GAPDH NJ 系统进化树

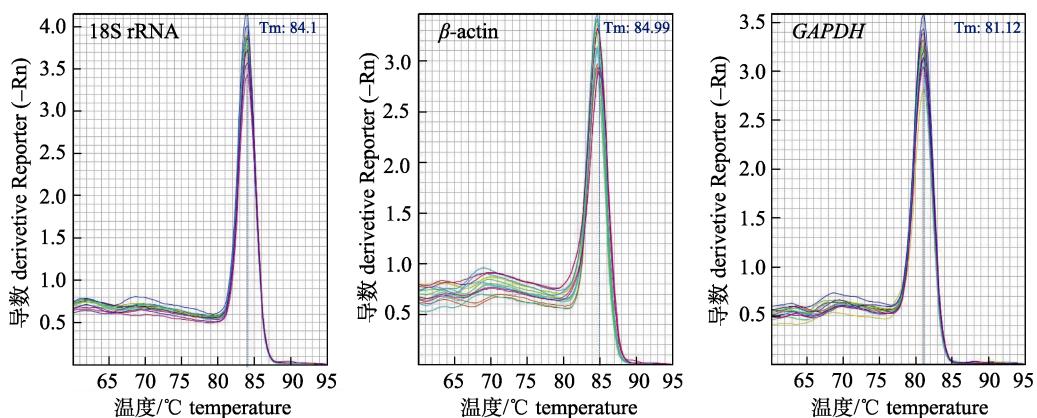
Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on *GAPDH* amino acid sequences of *Exopalaemon carinicauda* and other organisms

图3 脊尾白虾 3 种内参基因的熔解曲线

Fig. 3 Melting curve of three reference genes of *Exopalaemon carinicauda*

程为:  $y = -2.3782x + 16.5590$ ,  $R^2 = 0.9998$ , 扩增效率为 96.47%; *GAPDH* 基因的标准曲线回归方程为:  $y = -2.2498x + 16.5240$ ,  $R^2 = 0.9982$ , 扩增效率为 104.494%。各内参基因的相关系数  $R^2$  均大于 0.9980, 扩增效率在 95%~105%, 符合 qRT-PCR 对扩增效率的要求。

#### 2.4 3 种内参基因稳定性的比较

18S rRNA、 $\beta$ -actin 和 *GAPDH* 基因在脊尾白虾不同组织及蜕壳后不同时间点的原始  $C_t$  值数据见表 2。可以发现, 在不同组织或者不同蜕壳后时间点, 脊尾白虾 18S rRNA、 $\beta$ -actin 和 *GAPDH* 基因的表达水平均存在差异。在不同组织中,  $C_t$  值变

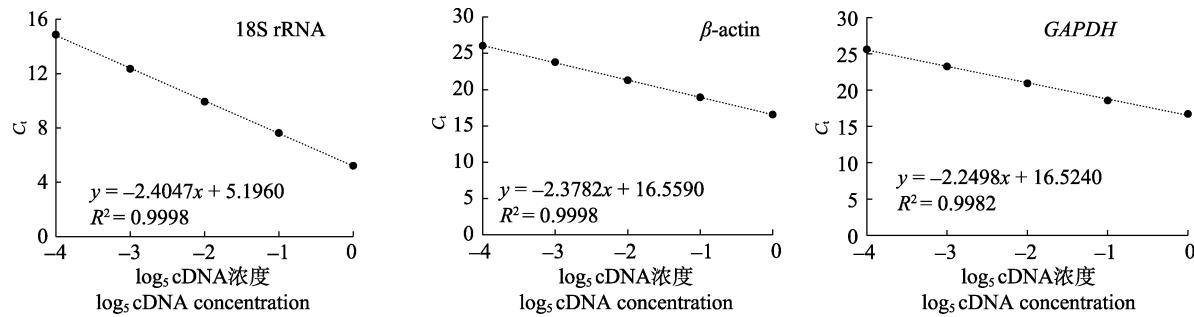


图 4 脊尾白虾 3 种内参基因的荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 4 Standard curves of three reference genes of *Exopalaemon carinicauda* by real-time PCR

表 2 内参基因的原始 Ct 值数据

Fig. 2 The original  $C_t$  value of reference genes

样品 sample	内参基因 reference gene	$C_t$ 值范围 $C_t$ range	平均 $C_t$ 值 average $C_t$ value	$\Delta C_t$ 值 $\Delta C_t$ value
不同组织 different tissues	18S rRNA	8.45–14.64	10.36	6.19
	$\beta$ -actin	19.39–28.24	24.27	8.85
	GAPDH	19.03–27.34	22.44	8.31
不同蜕壳后时间点 different post-molt time	18S rRNA	8.44–14.11	10.98	5.67
	$\beta$ -actin	24.55–34.75	29.58	10.20
	GAPDH	19.19–31.53	24.24	12.34

化范围较小的内参基因是 18S rRNA, 变化范围最大的为  $\beta$ -actin; 在不同蜕壳后时间点, 18S rRNA 的  $C_t$  值变化范围依旧最小, GAPDH 变化范围最大。由此可见, 各内参基因在不同组织或者不同蜕壳后时间的  $C_t$  值是有波动的, 并不是一个固定值。因此, 在具体实验条件下进行内参基因的筛选是必要的。

geNorm 软件是通过在给定的生物样本和内参基因的矩阵内进行成对比较和几何平均算法来确定基因表达稳定性的  $M$  值, 进而分析内参基因的表达稳定性,  $M$  值越大, 稳定性越差; 反之稳定性越好; 系统默认  $M$  值为 1.5<sup>[16]</sup>。与 geNorm 软件相似, NormFinder 软件同样是内参基因的稳定性, 其越低说明该基因越稳定, 不过 NormFinder 是通过各内参基因的组合和组间方差相结合来对内参基因的稳定性进行评价<sup>[17]</sup>。利用 geNorm 和 NormFinder 软件分别对不同组织和不同蜕壳后时间点的脊尾白虾 3 种内参基因表达稳定性进行分析, 具体数值见表 3。分析发现, 在不同组织中 geNorm 分析的稳定性最高的内参基因为 18S rRNA, 其次为  $\beta$ -actin, GAPDH 稳定性最差; NormFinder 中同样是 18S rRNA 的稳定性最高, 其次是 GAPDH,

表 3 内参基因表达差异的 geNorm 和 NormFinder 分析  
Fig. 3 Analysis of reference genes by geNorm and NormFinder

样品 sample	内参基因 reference gene	geNorm-M 值 M value of geNorm	NormFinder 稳定值 stable value of NormFinder
不同组织 different tissues	18S rRNA	1.470	0.067
	$\beta$ -actin	2.064	0.078
	GAPDH	2.369	0.069
不同蜕壳 后时间点 different post-molt time	18S rRNA	1.030	0.031
	$\beta$ -actin	1.819	0.060
	GAPDH	1.357	0.030

$\beta$ -actin 稳定性最差。在不同蜕壳后时间点的内参基因稳定性分析中发现, geNorm 中 18S rRNA 的稳定性最高, 而 NormFinder 中 GAPDH 的稳定性最高, 稳定性最差的内参基因均为  $\beta$ -actin。

BestKeeper 软件是通过对各内参基因  $C_t$  值的比对产生配对的相关系数( $r$ )、标准偏差(SD)和变异系数(CV), 根据其值的大小进行比较, 相关系数越高, 标准偏差和变异系数越小, 稳定性则越好<sup>[18]</sup>。利用 BestKeeper 对不同组织和不同蜕壳后时间点的脊尾白虾 3 个内参基因的表达量进行分析, 分析结果见表 4。不论是不同组织还是不同蜕

壳后时间点, 18S rRNA 的相关系数均最高, 目标偏差最低, 但其变异系数相对略高。鉴于 BestKeeper 综合多因素, 故而无法给出具体内参基因

稳定性的排序。综合  $\Delta C_t$  值及 geNorm 和 NormFinder 的分析结果, 各内参基因的稳定性排序见表 5。

**表 4 内参基因表达差异的 BestKeeper 分析**  
**Fig. 4 Analysis of reference genes by BestKeeper**

样品 sample	内参基因 reference gene	相关系数 co-efficient of correlation	标准偏差 standard deviation	变异系数/% coefficient of variation
不同组织 different tissues	18S rRNA	0.969	1.25	12.07
	$\beta$ -actin	0.862	1.98	8.16
	GAPDH	0.904	2.07	9.22
不同蜕壳后时间点 different post-molt time	18S rRNA	0.983	0.90	8.21
	$\beta$ -actin	0.946	1.34	4.54
	GAPDH	0.976	2.09	8.61

**表 5 内参基因稳定性排序**  
**Fig. 5 Ranking of the reference genes according to their stability value**

样品 sample	内参基因 reference gene	$\Delta C_t$ 值排序 ranking by $\Delta C_t$ value	geNorm 排序 ranking by geNorm	NormFinder 排序 ranking by NormFinder
不同组织 different tissues	18S rRNA	1	1	1
	$\beta$ -actin	3	2	3
	GAPDH	2	3	2
不同蜕壳后时间点 different post-molt times	18S rRNA	1	1	2
	$\beta$ -actin	2	3	3
	GAPDH	3	2	1

### 3 讨论

qRT-PCR 作为分析基因表达特征的一种重要的生物学手段, 目前被广泛应用于分子生物学实验中。为了获得准确可信的结果, 在对特定条件下目的基因的表达特征进行分析时, 通常需要引入一个或多个内参基因作为标准以保证实验结果的准确性<sup>[9]</sup>。然而, 常用的内参基因在不同条件下的表达可能是不稳定的, Ponton 等<sup>[19]</sup>发现在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中雄果蝇和雌果蝇不同组织基因表达分析的最佳内参基因并不相同; 在现代月季中的研究同样发现需根据不同情况选择最优内参基因<sup>[20]</sup>。因此, 在基因表达分析中进行合适内参基因的选择尤为重要。筛选最优的内参一般用 delta  $C_t$  法及软件如 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper。Sliver 等<sup>[21]</sup>通过 delta  $C_t$  法比较不同的内参基因在 31 个样本间表达量的可重复性, 认为 GAPDH 是网织红细胞中最稳定的内参基因。

而在不同条件下最适内参基因的选择过程中, 人们一般选取两种及以上算法相结合来确定内参基因。武志娟等<sup>[22]</sup>采用 delta  $C_t$  值分析法、geNorm 和 NormFinder 软件分析法综合比较发现, 在大针茅(*Stipa grandis*)根中最稳定的内参基因组合为 18S rRNA 和 *EF-1 $\alpha$* , 在叶中最稳定的内参基因组合为 18S rRNA 和 *TLF*; 姜琼等<sup>[23]</sup>综合上述 4 种算法分析发现 *ELF1B* 和 *CYP2* 适合作为大豆根系盐胁迫响应基因研究的内参基因; Lin 等<sup>[24]</sup>通过对不同温度下龙眼树(*Dimocarpus longan*)体细胞胚发生过程中各内参基因的表达分析发现, 不同算法得出的结果存在很大差异, 并最终综合 geNorm、BestKeeper 和 NormFinder 的结果认为最佳的内参基因组合为 *UBQ* 和 *Fe-SOD*。以上研究结果证明, 在确定不同条件下进行目的基因表达特征分析的内参基因时, 需要综合不同的算法进行分析, 从而获得较为可靠的候选内参基因。

*GAPDH* 作为常用的内参基因, 近几年对于其是否适合用作内参基因的研究存在很大的争议<sup>[14, 25–26]</sup>。为研究其在脊尾白虾的定量分析中作为内参基因的稳定性, 本研究获得了脊尾白虾 *GAPDH* 基因 cDNA 序列。通过结构域预测发现, *GAPDH* 蛋白具有高度保守的位于 C 末端的催化功能区和位于 N 末端的 NAD<sup>+</sup>结合域, 与其他甲壳动物 *GAPDH* 蛋白结构域一致<sup>[14]</sup>。有研究表明, NAD<sup>+</sup>结合域存在 RNA、磷酯酰丝氨酸和谷胱甘肽的结合位点, 可以调节 mRNA 的稳定性翻译并发挥膜功能<sup>[27–28]</sup>; 另一个高度保守的催化结构域则含有一个带有游离巯基(–SH)的半胱氨酸, 与 *GAPDH* 在细胞凋亡及氧化应激中发挥功能相关<sup>[29–31]</sup>。而 *GAPDH* 在脊尾白虾中除参与糖酵解过程外, 其他生理功能还有待进一步研究。经 BlastP 分析发现, 脊尾白虾 *GAPDH* 氨基酸序列与甲壳动物的 *GAPDH* 的同源性高达 95%, 仅与胡钩虾的同源性略低, 为 87.13%。并且在构建的系统进化树中, 脊尾白虾 *GAPDH* 蛋白与甲壳纲聚为一支后与昆虫纲聚为一支, 说明 *GAPDH* 能较好地反映各物种间的亲缘关系, 进一步证明 *GAPDH* 可作为研究物种进化与分类的分子模型<sup>[32]</sup>。

为比较 18S rRNA、 $\beta$ -actin 和 *GAPDH* 3 个基因在脊尾白虾不同组织和不同蜕壳后时间点的内参稳定性, 本研究中通过 qRT-PCR, 利用比较  $C_t$  值变化及 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个软件进行计算, 综合 4 种算法的结果, 发现在不同组织和不同蜕壳后时间点的最适内参基因均为 18S rRNA, 其次为 *GAPDH*,  $\beta$ -actin 稳定性最差。因此在不同组织和不同蜕壳后时间点的定量分析中, 选取单内参基因时, 推荐利用 18S rRNA 为内参基因; 选取双内参时, 推荐 18S rRNA 和 *GAPDH*。然而, 与在龙眼树中的结果相类似<sup>[24]</sup>, 本研究中各个软件分析结果之间存在一定的差异。例如, 在不同组织中, geNorm 分析中稳定性最差的是 *GAPDH*, 而 NormFinder 中是  $\beta$ -actin; 在不同蜕壳后时间点, geNorm 分析中稳定性最高的是 18S rRNA, 而 NormFinder 中是 *GAPDH*, 这可能是由于软件之间具有不同的算法造成的<sup>[9]</sup>。本研究结果为不同组织和不同蜕壳后时间点的脊尾

白虾 qRT-PCR 检测基因表达中内参基因的选择提供了依据, 但在其他生理条件下的还需要进一步验证以确定合适的内参基因。

## 参考文献:

- [1] Wang X E. Preliminary observation of reproductive biology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Chinese Journal of Zoology, 1987, 22(1): 7–10. [王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察[J]. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7–10.]
- [2] Wang X Q, Yan B L, Ma S, et al. Study on the biology and cultural ecology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Shandong Fisheries, 2005(8): 21–23. [王兴强, 阎斌伦, 马甡, 等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业, 2005(8): 21–23.]
- [3] Xu W, Xie J, Shi H, et al. Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China[J]. Aquaculture, 2010, 300: 25–31.
- [4] Liang J P, Li J, Li J T, et al. Molecular cloning of the vitellogenin receptor and its expression during ovarian development of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 800–812. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾 *VgR* 基因克隆及其在卵巢发育过程中的表达分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 800–812.]
- [5] Duan Y F, Jian L, Zhe Z, et al. Characterization of ADP ribosylation factor 1 gene from *Exopalaemon carinicauda*, and its immune response to pathogens challenge and ammonia-N stress[J]. Fish Shellfish Immun, 2016, 55: 123–130.
- [6] Wang Y K, Liu P, Duan Y F, et al. The cloning and expression of Alpha2-Macrogloblin gene of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(2): 63–70. [王有昆, 刘萍, 段亚飞, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) α2-巨球蛋白 cDNA 全长的克隆和表达分析[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 63–70.]
- [7] Dong E N, Liang Q, Li L, et al. The selection of reference gene in real-time quantitative reverse transcription PCR[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(11): 92–96. [董恩妮, 梁青, 李利, 等. 实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(11): 92–96.]
- [8] Hu R B, Fan C M, Fu Y F. Reference gene selection in plant real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-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.]
- [9] Zhang Y F, Zhao L J, Zeng Y L. Selection and application of reference genes for gene expression studies[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(8): 1119–1125. [张玉芳, 赵丽娟,

- 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1119–1125.]
- [10] Xing Z B, Wu P, Chen L, et al. Cloning and sequence analyses of *Eleutherococcus senticosus* GAPDH[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(1): 155–158. [邢朝斌, 吴鹏, 陈龙, 等. 刺五加 GAPDH 基因的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 155–158.]
- [11] Tarze A, Deniaud A, Le B M, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization[J]. Oncogene, 2006, 26(18): 2606–2620.
- [12] Zheng L, Roeder R G, Luo Y. S Phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component[J]. Cell, 2003, 114(2): 255–266.
- [13] Agarwal A R, Zhao L, Sancheti H, et al. Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs[J]. Am J Physiol-Lung C, 2012, 303(10): 889–898.
- [14] Fu C R, Ye H H, Chen X L, et al. Cloning and expression analysis of the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in the mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 55–62. [付春茹, 叶海辉, 陈学雷, 等. 拟穴青蟹 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆与表达 [J]. 水产学报, 2013, 37(1): 55–62.]
- [15] Moe T K, Ziliang J, Barathi A, et al. Differential expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in postnatal rabbit sclera[J]. Curr Eye Res, 2009, 33(1): 44–50.
- [16] Vandesompele J, De P K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genom Biol, 2002, 3(7): 1–12.
- [17] 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[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5245–5250.
- [18] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pairwise correlations[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(6): 509–515.
- [19] Ponton F, Chapuis M P, Pernice M, et al. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*[J]. J Insect Physiol, 2011, 57(6): 840–850.
- [20] Meng Y, Li N, Tian J, et al. Identification and validation of reference genes for gene expression studies in postharvest rose flower (*Rosa hybrida*)[J]. Sci Hortic-AMSTERDA, 2013, 158(4): 16–21.
- [21] Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR[J]. BMC Mol Biol, 2006, 7(1): 1–9.
- [22] Wu Z J, Wang Z L, Han B, et al. Screening and verification of the best combination of reference genes of *Stipa grandis* under drought stress[J]. Chinese Journal of Grassland, 2016, 38(4): 8–12. [武志娟, 王照兰, 韩冰, 等. 大针茅干旱胁迫下最佳内参基因组合的筛选及验证 [J]. 中国草地学报, 2016, 38(4): 8–12.]
- [23] Jiang Q, Wang Y N, Wang L X, et al. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in soybean root tissue under salt stress[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2015, 50(6): 754–764. [姜琼, 王幼宁, 王利祥, 等. 盐胁迫下大豆根组织定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2015, 50(6): 754–764.]
- [24] Lin Y L, Lai Z X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. Plant Sci, 2010, 178(4): 359–365.
- [25] Barber R D, Harmer D W, Coleman R A, et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues[J]. Physiol Genom, 2005, 21(3): 389–395.
- [26] Hu H Y, Ren C L, Shang X L, et al. Cloning, expression, and analysis of the stability of a reference gene, GAPDH, of *Musca domestica*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2016, 11(3): 250–256. [胡红元, 任春丽, 尚小丽, 等. 家蝇 GAPDH 基因的克隆、表达及作为内参的可靠性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(3): 250–256.]
- [27] Kondo S, Kubota S, Mukudai Y, et al. Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored repression in ccn2, mRNA[J]. Biochem Biophys Res Co, 2011, 405(405): 382–387.
- [28] Ikeda Y, Yamaji R, Irie K, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates cyclooxygenase-2 expression by targeting mRNA stability[J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 528(2): 141–147.
- [29] Nakajima H, Amano W, Fujita A, et al. The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death[J]. J Biol Chem, 2007, 282(36): 26562–26574.
- [30] Hara M, Cascio M, Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress[J]. BBA-Mol Basis Dis, 2006, 1762(5): 502–509.
- [31] Sirover M A. Structural analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functional diversity[J]. Int J Biochem

- Cell B, 2014, 57: 20–26.
- [32] Song S Y, Guo J, Li J, et al. Conservative of 3 dimensional structure of D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Acta Biophysica Sinica, 1998, 14(3): 401–406. [宋时英, 郭剑, 李军, 等. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶结构的保守性[J]. 生物物理学报, 1998, 14(3): 401–406.]

## Cloning, expression and stability analysis of the reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in *Exopalaemon carinicauda*

XUE Bei<sup>1, 2, 3</sup>, ZHANG Pei<sup>1, 2, 3</sup>, LI Zhihui<sup>1, 2, 3</sup>, ZHAO Lian<sup>1, 2, 3</sup>, LAI Xiaofang<sup>1, 2, 3</sup>, GAO Huan<sup>1, 2, 3</sup>, LI Jian<sup>4</sup>, YAN Binlun<sup>1, 2, 3</sup>

1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology; Marine Life and Fisheries College, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;
2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222001, China;
3. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China;
4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

**Abstract:** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) is a powerful and commonly used method for in-depth analysis of gene expression that offers increased sensitivity and specificity over other methods. However, in order to obtain accurate results when using qRT-PCR to study gene expression, one or several internal control genes for normalization are needed. Housekeeping genes are known as such a class of genes that their expression levels are expected to remain constant in the cells or tissues in response to any environmental or physiological stress. But, in fact, no any housekeeping gene always stably expressed under all physiological conditions as ideal reference genes. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a classic key glycolysis enzyme presented in all tissues, is one of the most common housekeeping genes used in the analysis of comparing gene expression levels as reference genes. Nowadays, the role of GAPDH as the reference gene was being questioned and challenged by accumulated experiment evidences. To investigate the stability of GAPDH as a reference gene, the full-length cDNA sequence was cloned from the ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*, which mRNA was measured in different tissues and at different post-molt times. The obtained full-length cDNA of GAPDH was 1514bp, including 69 bp of 5'-untranslated region (UTR), 1002 bp of open reading frame (ORF), 443 bp of 3'-UTR containing a canonical polyadenylation signal sequence AATAAA prior to a poly A tail. The ORF of GAPDH encoded 333 amino acids without signal peptide analyzed by SignalP software which is highly conserved across the phylogenetic scale. The molecular mass was calculated to be 35.71 kDa, and the pI was estimated to be 6.61. By alignment, the amino acid sequence of *E. carinicauda* GAPDH contains two major domains, the NAD<sup>+</sup> binding domain (amino acids 3–149) and the catalytic domain (amino acids 154–311). In order to compare the expression stability of three endogenous candidate genes (18S rRNA, β-actin and GAPDH) in qRT-PCR analysis in different tissues and different post-molt times, eight tissues (eyestalk, gill, heart, hepatopancreas, ovary, stomach, intestines and abdominal muscle) and 4 different post-molt times (1, 5, 10 and 15 min) of *E. carinicauda* were collected for qRT-PCR. Comprehensive analysis of the results using delta C<sub>t</sub> method and the software packages geNorm, NormFinder and BestKeeper revealed that 18S rRNA was the most stable reference gene in both different tissues and different post-molt times, then was the GAPDH and β-actin in decreasing order. In conclusion, the best choice for single reference gene is 18S rRNA, and 18S rRNA and GAPDH can be together as double reference genes if needed in *E. carinicauda*.

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; GAPDH; reference gene; tissue; post-molt time

**Corresponding author:** YAN Binlun. E-mail: yanbl@hhit.edu.cn