

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19295

达氏鲟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

武梦斌^{1,2}, 叶欢², 岳华梅², 阮瑞², 杜浩², 周从利², 向浩², 李创举^{1,2}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是基因表达研究的常用方法, 筛选达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) 稳定表达的内参基因, 是保证该物种基因表达 qRT-PCR 分析结果准确性的基础。本研究选取了达氏鲟 β 肌动蛋白 (β -actin)、延伸因子 1 α (*EF-1 α*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*)、核糖体蛋白 L8 (*RPL8*)、18S 核糖体 RNA (*18S rRNA*)、琥珀酸脱氢酶复合物 A 亚基 (*SDHA*) 和 α 微管蛋白 (α -tubulin) 共 7 个常用内参基因作为候选基因, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 4 个软件分析这 7 个候选基因在达氏鲟成鱼不同组织和不同发育时期胚胎及性腺的表达稳定性。结果表明, 7 个候选内参基因的定量 PCR 引物均可获得特异性扩增产物和理想的扩增效率。在成鱼不同组织中, 候选内参基因稳定性由高到低的顺序为 *EF-1 α* > β -actin>*SDHA*>*RPL8*>*18S rRNA*> α -tubulin>*GAPDH*; 在不同发育时期胚胎中, 候选内参基因稳定性由高到低的顺序为 *EF-1 α* > β -actin>*SDHA*> α -tubulin>*18S rRNA*>*GAPDH*>*RPL8*; 在不同发育时期精巢中, 候选内参基因稳定性由高到低的顺序为 *EF-1 α* >*RPL8*> β -actin>*SDHA*>*18S rRNA*> α -tubulin>*GAPDH*; 在不同发育时期卵巢中, 候选内参基因稳定性由高到低的顺序为 *RPL8*>*EF-1 α* >*SDHA*> β -actin=> α -tubulin>*18S rRNA*>*GAPDH*。因此, 达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期胚胎和精巢最稳定表达内参基因是 *EF-1 α* , 而不同发育卵巢最稳定表达的内参基因是 *RPL8*。本研究旨在为今后达氏鲟不同组织、不同发育时期胚胎及性腺的基因表达差异研究提供理论基础。

关键词: 达氏鲟; 荧光定量 PCR; 内参基因; 稳定性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)07-0759-12

在基因表达的研究中, 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 以其灵敏度高、特异性强、重现性好、操作简便等诸多优点而广泛地应用于医学、农业、检测等领域^[1-3]。然而, 许多因素会影响 qRT-PCR 结果的准确性, 包括 RNA 质量、cDNA 逆转录效率、引物的特异性及扩增效率等^[4-5]。因此, 为了减少实验误差, 确保实验结果的可靠性, 需要引入内参基因对实验数据进行标准化和校正^[2]。动物中, 常用的内参基因有许多, 包括 β 肌动蛋白 (β -actin)、延伸因子 1 α (*EF-1 α*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*)、核糖体蛋白 L8 (*RPL8*)、18S 核糖体 RNA (*18S rRNA*)、琥

珀酸脱氢酶复合物 A 亚基 (*SDHA*) 和 α 微管蛋白 (α -tubulin) 等^[6-8], 已被广泛用于 qRT-PCR 分析。理想情况下, 内参基因应该在不同发育时期、不同组织、不同生理条件下均具有稳定的表达水平^[9]。然而, 很多研究表明, 内参基因的表达量并不稳定, 会随着实验条件不同而发生变化^[10-11]。因此, 为了保证 qRT-PCR 结果的准确性, 在特定条件下, 需要对内参基因的表达稳定性排序, 筛选得到最稳定的内参基因或其组合。

达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) 隶属于鲟形目 (*Acipenseriformes*) 鲟属 (*Acipenser*), 主要分布于长江上游, 为中国特有的大型淡水定居性鱼类^[12]。

收稿日期: 2019-10-14; 修订日期: 2019-12-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802282); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2018JBF10).

作者简介: 武梦斌(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类生殖发育研究. E-mail: wumengbin@163.com

通信作者: 李创举, 研究员. E-mail: lcj@yfi.ac.cn

由于过度捕捞、水利工程建设、栖息地退化等原因,达氏鲟野生资源量急剧下降,已被国家列为一级重点保护动物、极度濒危物种^[13-14]。目前,有关达氏鲟的研究涉及繁殖^[15]、养殖^[16-17]、资源^[13]、生殖发育调控^[18-19]、营养^[20-21]、疾病^[22]等方面,其中很多研究涉及基因表达水平的分析。然而,鲟内参基因稳定性方面的研究很少,仅有研究报道了内参基因 β -actin、*GAPDH* 和 *EF-1 α* 在成体达氏鲟 14 个不同组织的稳定性^[23]。

本研究以达氏鲟成鱼的不同组织、不同发育时期的胚胎和性腺为实验材料,利用 qRT-PCR 技术分析了常用的 7 个内参基因(β -actin、*EF-1 α* 、*GAPDH*、*RPL8*、*18S rRNA*、*SDHA* 和 α -tubulin)在上述实验材料中的表达情况,结合 geNorm^[24]、NormFinder^[25]、BestKeeper^[26]和 RefFinder^[27]软件对 7 个内参基因的稳定性进行了综合性的评价分析,筛选出合适的内参基因,为今后达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期的胚胎和性腺的基因表达研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验材料取自中国水产科学研究院长江水产研究所太湖试验场(湖北荆州),为全人工繁殖的达氏鲟。选取 2 龄达氏鲟雌、雄各 3 尾,解剖后分别采取各组织,包括肝、肠、脾、肾、心脏、肌肉、鳃、垂体、下丘脑、卵巢和精巢,样品精巢和卵巢发育均处于 II 期。在达氏鲟全人工繁殖期间,采集 3 组来源于不同亲本的不同发育时期胚胎,分别为未受精期、2 细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、心脏原基期、心跳期和出膜期。另外,取性腺处于 I~IV 期达氏鲟雌、雄各 3 尾,其中性腺 I 期达氏鲟体长和体重分别为(17.12±0.30) cm 和(0.03±0.01) kg;性腺 II 期达氏鲟体长和体重分别为(65.70±3.21) cm 和(1.91±0.27) kg;性腺 III 期达氏鲟体长和体重分别为(86.05±5.33) cm 和体重(5.34±0.41) kg;性腺 IV 期达氏鲟体长和体重分别为(124.05±8.17) cm 和体重(10.61±1.04) kg。其中 III 期和 IV 期达氏鲟性腺通过活体手术取样。将样品置于 RNA later (Bio-

logical Industries, 以色列), 4 °C 过夜,然后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取约 30 mg 组织剪碎匀浆,按照 RNeasy[®] Plus Mini Kit 试剂盒(QIAGEN, 德国)说明书提取达氏鲟组织总 RNA。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量,用 NanoDrop[™] Lite (Thermo Scientific, 美国)核酸测定仪检测 RNA 浓度和纯度,将总 RNA 分装后放于 -80 °C 冰箱备用。提取的 RNA 按照 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)逆转录试剂盒说明书步骤合成单链 cDNA,将合成的 cDNA 分装后置于 -20 °C 保存,用于后续的 qRT-PCR。

1.3 候选内参基因的引物设计和标准曲线制作

本实验选取常用的 7 个内参基因作为达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期胚胎、精巢和卵巢的候选内参基因,包括 β -actin、*EF-1 α* 、*GAPDH*、*RPL8*、*18S rRNA*、*SDHA* 和 α -tubulin。根据这 7 个候选内参基因在 GenBank 数据库中的核苷酸序列,其基因登录号分别为 MH790260、MH790258、MH790259、MG722843、FJ688019、MN750321、MN750320,运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列见表 1,所有引物均由天一辉远生物科技有限公司合成,以 11 个成鱼组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性,克隆并测序。将 11 个达氏鲟成体组织的 cDNA 等重量混合,按照 1:5 比例稀释 5 个梯度(1、1/5、1/25、1/125、1/625),以其为模板进行 qRT-PCR 扩增,绘制标准曲线,计算扩增效率和相关系数。

1.4 实时荧光定量 PCR 扩增

采用 SYBR Green I 荧光染料法,使用荧光定量仪 QuantStudio6 Flex (Life Technologies, 新加坡)进行内参基因表达分析,实时荧光定量 PCR 反应按 PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix 试剂盒说明书进行操作,扩增体系为 20.0 μ L: cDNA 模板 1 μ L, 2×Mix 10 μ L, 10 nmol/L 正、反引物各 0.4 μ L, ddH₂O 补足至 20.0 μ L。扩增反应程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 40 个循环。

表 1 候选内参基因的引物序列
Tab. 1 Primer sequences for the candidate reference genes

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence	产物长度/bp product size	扩增效率/% efficiency	相关系数(R^2) coefficient
β -actin-F	CCTTCTTGGGTATGGAATCTTGC	222	95.914	0.999
β -actin-R	CAGAGTATTTACGCTCAGGTGGG			
EF-1 α -F	GCGTGGCATCACCATTGACATCT	148	100.462	0.997
EF-1 α -R	GGCAACAATCAGCACAGCACAGT			
GAPDH-F	TGAAGGGTGGGGCTAAGCGTGT	219	97.792	0.998
GAPDH-R	GTGTGGCTGTGTAGGCATGGACT			
RPL8-F	GAACATCCCTTCGGTGGTGGTA	134	99.124	0.996
RPL8-R	ACGGTCTTTGTTCCACGCAGTCT			
18S rRNA-F	CTGAGAAACGGCTACCACATC	118	103.420	0.996
18S rRNA-R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAGA			
SDHA-F	AGGAGGTGCTCGGCAGTTTCAC	176	105.867	0.998
SDHA-R	TAAAGCCAGCCTCAGACAAACCAA			
α -tubulin-F	CTTGGTGCCCTACCCCGTATC	231	101.294	0.998
α -tubulin-R	ATGGTGGAATAGCAGCGTTGA			

PCR 扩增结束后进行熔解曲线分析, 首先 95 °C 变性 15 s, 然后从 60 °C 开始, 以 0.05 °C/s 的速度上升到 95 °C, 记录荧光信号的变化。每个样品 3 个生物学重复和 3 次技术重复。

1.5 数据处理及内参基因表达分析

将每个样品的 C_t 值导入到 Microsoft Excel 和 Origin 9.0 软件, 分别用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 3 个软件进行内参基因表达稳定性分析, 然后用 RefFinder 软件综合评估 7 个候选内参基因在达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期胚胎、精巢和卵巢的表达稳定性, 筛选得到最稳定的内参基因。

2 结果与分析

2.1 内参基因引物特异性和扩增效率

将 7 个内参基因的引物进行 RT-PCR 扩增和熔解曲线分析, 结果显示, 产物大小同目的片段一致, 且无引物二聚体, 熔解曲线均呈现单一峰 (图 1), 说明内参基因引物特异性较好。以梯度稀释的 cDNA 为模板制作标准曲线, 结果表明, 7 个内参基因引物的扩增效率为 95.914%~105.867%, 相关系数(R^2)均大于 0.996 (表 1)。这些结果表明 7 个内参基因的引物符合 qRT-PCR 对引物的要求, 可进行表达稳定性分析。

2.2 候选内参基因表达丰度分析

通过计算平均 C_t 值来比较 7 个候选内参基因的表达丰度, 结果表明, 各候选内参基因在达氏鲟成鱼不同组织和不同发育时期的胚胎、精巢及卵巢均有表达, 无组织特异性。在成鱼不同组织间, 18S rRNA 的表达量较低, C_t 值最大为 32.99, 平均 C_t 值为 27.90; EF-1 α 的表达量较高, C_t 值最小为 16.57, 平均 C_t 值 19.81 (图 2)。在不同发育时期的胚胎中, SDHA 的表达量较低, C_t 值最大为 28.37, 平均 C_t 值为 26.38; β -actin 的表达量较高, C_t 值最小为 15.43, 平均 C_t 值 19.93 (图 2)。在不同发育时期的精巢中, SDHA 的表达量较低, C_t 值最大为 26.73, 平均 C_t 值为 26.28; EF-1 α 的表达量较高, C_t 值最小为 17.22, 平均 C_t 值 17.88 (图 2)。在不同发育时期的卵巢中, SDHA 的表达量较低, C_t 值最大为 25.68, 平均 C_t 值为 23.62; β -actin 的表达量较高, C_t 值最小为 15.57, 平均 C_t 值 16.40 (图 2)。

2.3 候选内参基因的表达稳定性分析

利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 4 个软件, 分析 7 个候选内参基因在达氏鲟成鱼各组织和不同发育时期胚胎、精巢及卵巢的表达稳定性, 筛选出最稳定的内参基因。

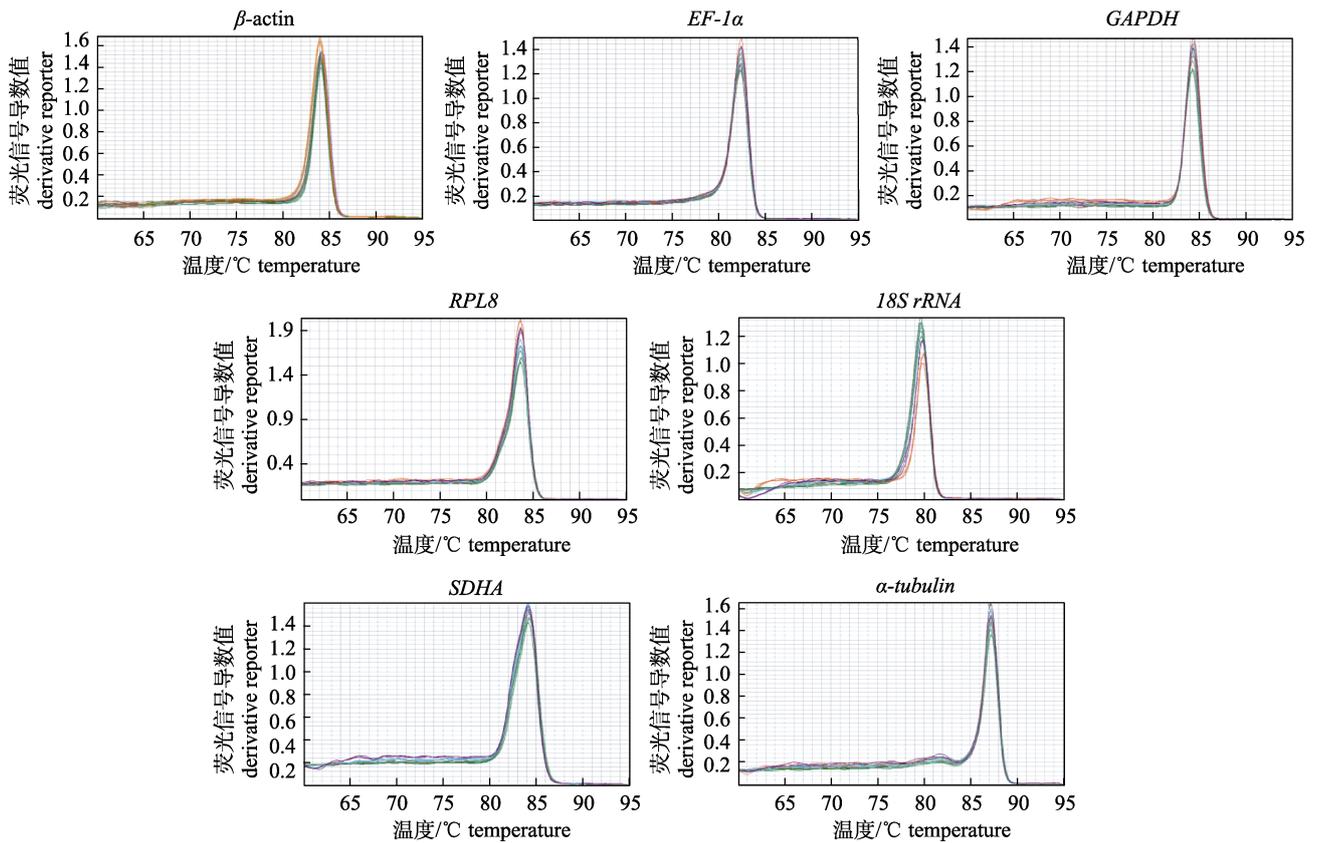


图 1 候选内参基因 qRT-PCR 的溶解曲线

Fig. 1 Melting curve for qRT-PCR of candidate reference genes

2.3.1 候选内参基因在不同组织的表达稳定性分析 geNorm 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的稳定性 M 值排序为: $GAPDH > \alpha\text{-tubulin} > RPL8 > 18S\ rRNA > SDHA > \beta\text{-actin} = EF\text{-}1\alpha$ (图 3), M 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 $EF\text{-}1\alpha$ 和 $\beta\text{-actin}$ 的 M 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。另外, 标准化因子配对差异分析显示, 加入不同个数的候选内参基因对 V 值影响不大(图 4), 因此至少需要 2 个内参基因($EF\text{-}1\alpha$ 和 $\beta\text{-actin}$)才能达到准确的校正目的。NormFinder 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的表达稳定性 M 值排序为: $GAPDH > \alpha\text{-tubulin} > 18S\ rRNA > RPL8 > \beta\text{-actin} > SDHA > EF\text{-}1\alpha$ (图 3), M 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 $EF\text{-}1\alpha$ 的 M 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。Best-Keeper 软件主要根据标准偏差(SD)和变异系数(CV)评价候选内参基因表达稳定性, 其中 SD 和 CV 越小, 说明内参基因稳定性越高。BestKeeper 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因稳定性排序为:

$RPL8 > EF\text{-}1\alpha > \beta\text{-actin} > SDHA > GAPDH > \alpha\text{-tubulin} > 18S\ rRNA$ (图 3), 其中 $RPL8$ 标准偏差及变异系数最小, 即表达稳定性最高。RefFinder 软件对 7 个候选内参基因表达稳定性综合排序为: $EF\text{-}1\alpha > \beta\text{-actin} > SDHA > RPL8 > 18S\ rRNA > \alpha\text{-tubulin} > GAPDH$ (图 3)。因此, 相比其他候选内参基因, $EF\text{-}1\alpha$ 为达氏鲟成鱼不同组织最稳定的内参基因。

2.3.2 候选内参基因不同发育时期胚胎的表达稳定性分析 geNorm 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的稳定性 M 值排序为: $18S\ rRNA > GAPDH > SDHA > RPL8 > \alpha\text{-tubulin} > \beta\text{-actin} = EF\text{-}1\alpha$ (图 5), M 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 $EF\text{-}1\alpha$ 和 $\beta\text{-actin}$ 的 M 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。另外, 标准化因子配对差异分析显示, 加入不同个数的候选内参基因对 V 值影响不大, 因此至少需要 2 个内参基因($EF\text{-}1\alpha$ 和 $\beta\text{-actin}$)才能达到准确校正的目的(图 4)。NormFinder 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的表达稳定性值排序为: $18S\ rRNA > RPL8 >$

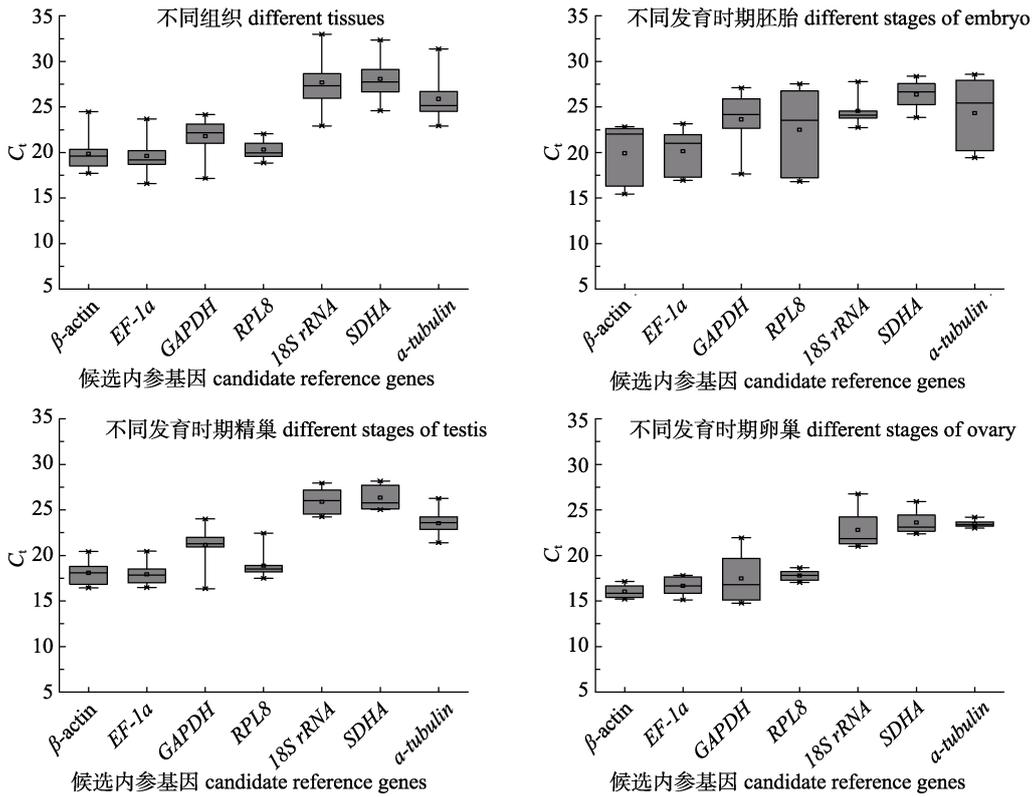


图 2 候选内参基因的表达丰度
 Fig. 2 Expression levels of candidate reference genes

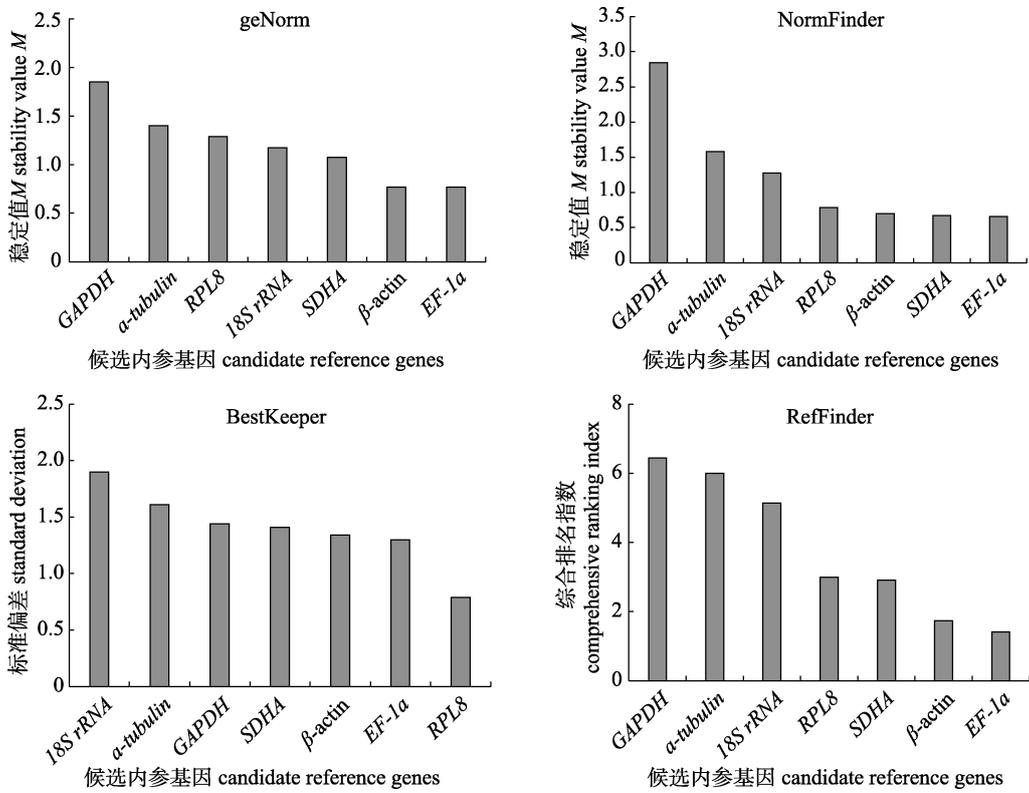


图 3 候选内参基因在达氏鲟不同组织中的稳定值排序
 Fig. 3 Stability value of candidate reference genes in different tissues of *Acipenser dabryanus*

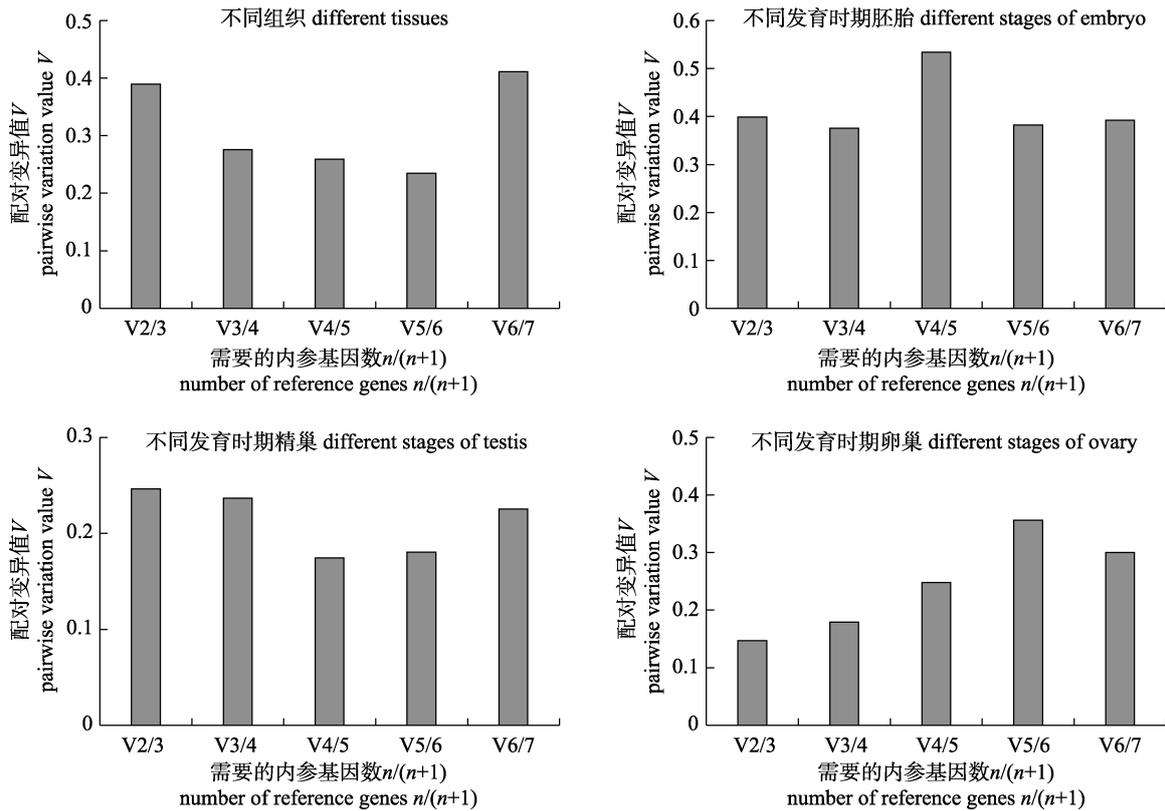


图 4 geNorm 软件分析最优内参基因数目

Fig. 4 Analysis of the optimal number of reference genes by geNorm software

GAPDH>*α-tubulin*>*SDHA*>*EF-1α*>*β-actin* (图 5), *M* 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 *β-actin* 的 *M* 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。BestKeeper 软件主要根据 SD 和 CV 评价候选内参基因表达稳定性, 其中 SD 和 CV 越小, 说明内参基因稳定性越高。BestKeeper 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因稳定性排序为: *18S rRNA*>*SDHA*>*EF-1α*>*GAPDH*>*β-actin*>*α-tubulin*>*RPL8* (图 5), 其中 *18S rRNA* 的标准偏差及变异系数最小, 表达稳定性最高。RefFinder 软件对 7 个候选内参基因表达稳定性排序综合排序为: *EF-1α*>*β-actin*>*SDHA*>*α-tubulin*>*18S rRNA*>*GAPDH*>*RPL8* (图 5)。因此, 相比其他候选内参基因, *EF-1α* 为达氏鲟不同发育时期胚胎最稳定的内参基因。

2.3.3 候选内参基因不同发育时期精巢的表达稳定性分析 geNorm 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的稳定性 *M* 值排序为: *GAPDH*>*α-tubulin*>*18S rRNA*>*SDHA*>*β-actin*>*EF-1α*>*RPL8* (图 6), *M* 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 *RPL8* 和 *EF-1α* 的 *M* 值最小, 在所有候选内参

基因中表达稳定性最高。另外, 标准化因子配对差异分析显示, 加入不同个数的候选内参基因对 *V* 值影响不大, 因此至少需要 2 个内参基因(*RPL8* 和 *EF-1α*)才能达到准确校正的目的(图 4)。NormFinder 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的表达稳定性值排序为: *GAPDH*>*α-tubulin*>*β-actin*>*18S rRNA*>*SDHA*>*RPL8*>*EF-1α* (图 6), *M* 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 *EF-1α* 的 *M* 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。BestKeeper 软件主要根据 SD 和 CV 评价候选内参基因表达稳定性, 其中 SD 和 CV 越小, 说明内参基因稳定性越高。BestKeeper 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因稳定性排序为: *β-actin*>*EF-1α*>*RPL8*>*α-tubulin*>*SDHA*>*18S rRNA*>*GAPDH* (图 6), 其中 *β-actin* 的标准偏差及变异系数最小, 表达稳定性最高。RefFinder 软件对 7 个候选内参基因表达稳定性排序综合排序为: *EF-1α*>*RPL8*>*β-actin*>*SDHA*>*18S rRNA*>*α-tubulin*>*GAPDH* (图 6)。因此, 相比其他候选内参基因, *EF-1α* 为达氏鲟不同发育时期精巢最稳定的内参基因。

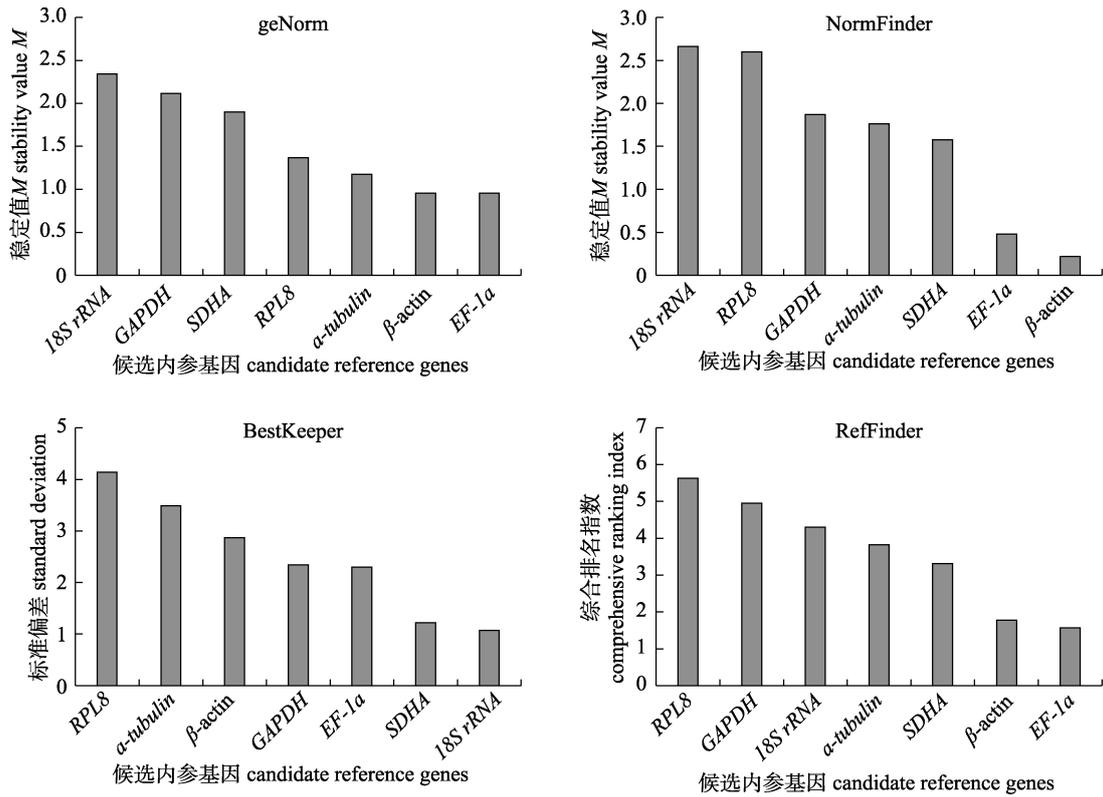


图 5 候选内参基因在达氏鲟不同发育时期胚胎的稳定值排序

Fig. 5 Stability value of candidate reference genes in different stages of embryo of Dabry's sturgeon

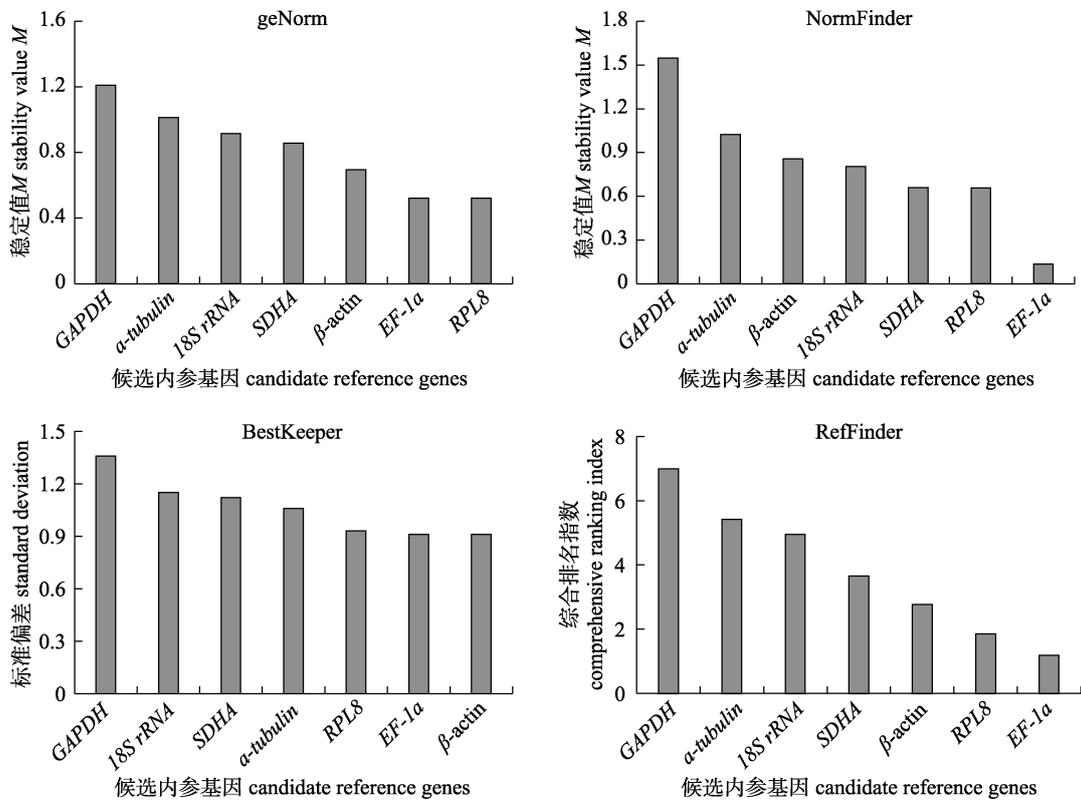


图 6 候选内参基因在达氏鲟不同发育时期精巢的稳定值排序

Fig. 6 Stability value of candidate reference genes in different stages of testis of *Acipenser dabryanus*

2.3.4 候选内参基因不同发育时期卵巢的表达稳定性分析 geNorm 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的稳定性 M 值排序为: $GAPDH > 18S\ rRNA > SDHA > EF-1\alpha > \alpha\text{-tubulin} > \beta\text{-actin} = RPL8$ (图 7), M 值越小, 内参基因表达稳定性越高, 其中 $RPL8$ 和 $\beta\text{-actin}$ 的 M 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。另外, 标准化因子配对差异分析显示, $V_{2/3} < 0.15$, 因此需要 2 个内参基因($RPL8$ 和 $\beta\text{-actin}$) 就能达到准确的校正目的(图 4)。NormFinder 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因的表达稳定性值排序为: $GAPDH > 18S\ rRNA > \beta\text{-actin} > \alpha\text{-tubulin} > RPL8 > EF-1\alpha > SDHA$ (图 7), M 值越小, 内参基因表

达稳定性越高, 其中 $SDHA$ 的 M 值最小, 在所有候选内参基因中表达稳定性最高。BestKeeper 软件主要根据 SD 和 CV 评价候选内参基因表达稳定性, 其中 SD 和 CV 越小, 说明内参基因稳定性越高。BestKeeper 软件分析结果表明, 7 个候选内参基因稳定性排序为: $\alpha\text{-tubulin} > RPL8 > \beta\text{-actin} > EF-1\alpha > SDHA > 18S\ rRNA > GAPDH$ (图 7), 其中 $\alpha\text{-tubulin}$ 的标准偏差及变异系数最小, 表达稳定性最高。ReffFinder 软件对 7 个候选内参基因表达稳定性综合排序为: $RPL8 > EF-1\alpha > SDHA > \beta\text{-actin} = \alpha\text{-tubulin} > 18S\ rRNA > GAPDH$ (图 7)。因此, 相比其他候选内参基因, $RPL8$ 为达氏鲟不同发育时期卵巢最稳定的内参基因。

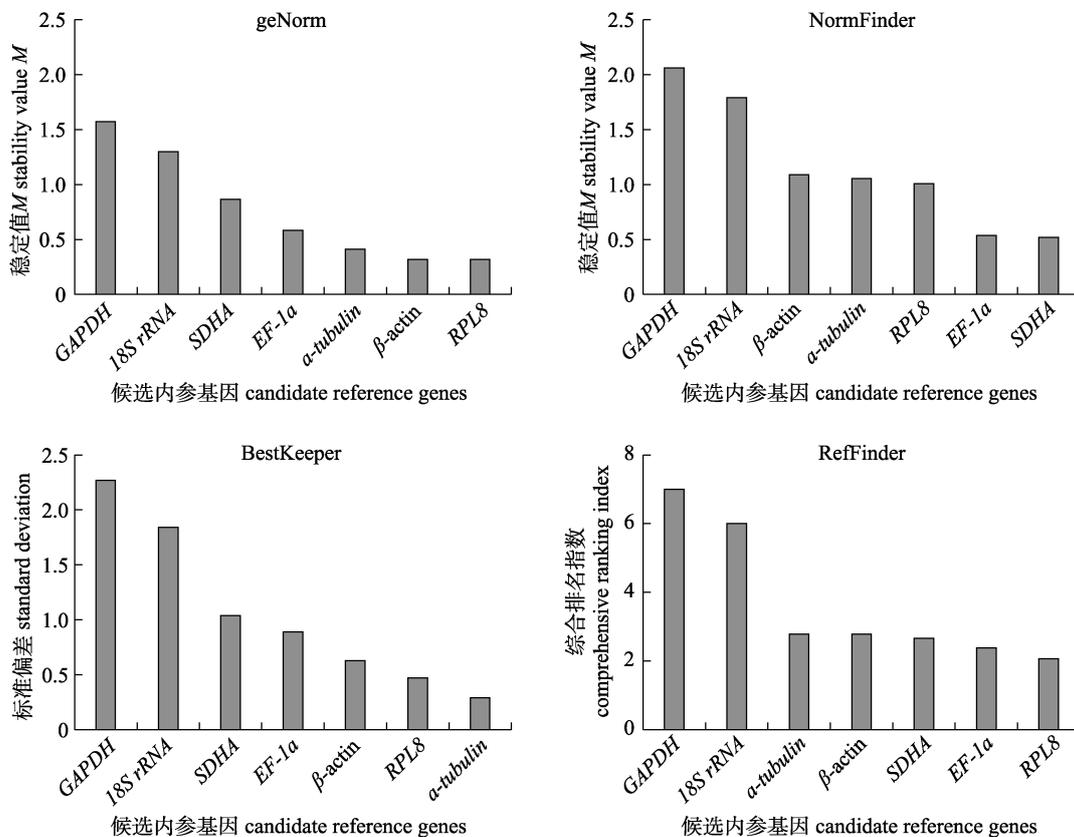


图 7 候选内参基因在达氏鲟不同发育时期卵巢的稳定值排序

Fig. 7 Stability value of candidate reference genes in different stages of ovary of *Acipenser dabryanus*

3 讨论

目前, qRT-PCR 技术是基因表达分析的常规手段。研究表明, 不同实验条件下稳定表达的内参基因会有不同^[9]。因此, 根据具体的实验筛选合适的内参基因对基因表达的研究至关重要。然而,

有关鲟内参基因的研究非常少, 因此, 本研究分析了 7 个常见内参基因在达氏鲟成鱼组织间和不同发育时期胚胎、精巢及卵巢的表达稳定性, 发现 $EF-1\alpha$ 在达氏鲟成鱼不同组织和发育时期胚胎、精巢的表达最稳定, 而 $RPL8$ 在卵巢发育各时期最稳定。龙治海等^[23]也研究了 3 个内参基因

(β -actin、*GAPDH* 和 *EF-1 α*) 在达氏鲟 14 个组织间的表达稳定性, 得出 *EF-1 α* 的表达最为稳定。本研究增加了 4 个内参基因, 但是得到达氏鲟不同组织间最为稳定的内参基因与其一致。此外, 本研究首次鉴定了在鲟不同发育时期胚胎、精巢及卵巢的稳定表达内参基因, 为后续鲟基因表达研究提供基础。

虽然目前有关鱼类内参基因表达稳定性的研究较多, 但是结果不尽相同。在大西洋鲑(*Salmo salar*)^[6]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]和黄鳝(*Monopterus albus*)^[28]中, 不同组织间最为稳定表达的内参基因也为 *EF-1 α* ; 然而, 在青鳉(*Oryzias latipes*)^[29]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[9]和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[30]中, *18S rRNA* 在不同组织间的表达最为稳定。不同发育阶段胚胎稳定表达内参基因的研究结果也不尽相同。在斑马鱼、青鳉、鳊(*Siniperca chuatsi*)^[31]和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[32]中, *EF-1 α* 和/或 *18S rRNA* 的表达最稳定, 而泥鳅中 β -tubulin 最稳定。此外, 有关不同发育时期性腺稳定表达内参基因的研究相对较少。对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 6 个不同发育时期卵巢的研究结果表明, *EF-1 α* 表达最稳定^[33]。与之相似, 鲤(*Cyprinus carpio*)^[34]卵母细胞成熟过程中和黄鳝不同发育时期性腺^[28], *EF-1 α* 的表达也较为稳定。在达氏鲟中, 我们发现不同发育时期精巢稳定表达的内参基因为 *EF-1 α* , 而不同发育时期卵巢稳定表达的内参基因为 *RPL8*。以上研究表明, 不同物种内参基因的稳定性不尽相同。因此, 在开展 qRT-PCR 实验前, 需要筛选合适的内参基因, 以确保研究结果的准确性。

本研究首先采用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个软件分析了达氏鲟内参基因的稳定性, 不同软件得到的结果不完全一致。这可能是由于不同软件使用的统计模型不同所引起的。geNorm 和 NormFinder 2 个软件算法相似, 计算出相应的表达稳定度平均值(*M* 值), *M* 值越小, 则基因稳定性越高^[24-25]。BestKeeper 软件则直接导入 C_t 值计算每个候选参考基因的 SD 和 CV, SD 和 CV 越低则候选内参基因越稳定^[26]。在达氏鲟成鱼不同组织, 3 个软件计算得到最稳定的基因分

别是 *EF-1 α* 与 β -actin、*EF-1 α* 和 *RPL8*; 达氏鲟不同发育时期胚胎, 3 个软件计算得到最稳定的基因分别是 *EF-1 α* 与 β -actin、 β -actin 和 *18S rRNA*; 达氏鲟不同发育时期精巢, 3 个软件计算得到最稳定的基因分别是 *EF-1 α* 与 *RPL8*、*EF-1 α* 和 β -actin; 达氏鲟不同发育时期卵巢, 3 个软件计算得到最稳定的基因分别是 β -actin 与 *RPL8*、*SDHA* 和 α -tubulin。由于 RefFinder 软件综合 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 个软件的算法, 避免 3 个软件各自的片面性, 给出内参基因综合稳定性, 因此, 本研究最终以 RefFinder 软件综合分析结果为准, 即达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期胚胎和精巢中最稳定表达的内参基因为 *EF-1 α* , 而不同发育时期卵巢中最稳定表达的内参基因为 *RPL8*。

然而, 在一些对基因表达定量准确度要求非常高的实验中, 通常单个内参基因的校正作用有限, 需要同时使用两个或多个稳定表达的内参基因对目的基因的表达量进行校正^[5]。geNorm 软件还可以引入 1 个新的内参基因后的配对变异 *V* 值, 根据配对差异分析($V_{n/n+1}$)来确定内参基因最合适的数目, 使得定量的结果更为精确^[35]。*n* 为最佳内参基因数目, *V* 默认为 0.15, 分析结果表明, $V_n/V_{(n+1)} < 0.15$ 时, 最适内参基因的数量为 *n* 个; 如果 $V_n/V_{(n+1)} > 0.15$, 最适内参基因的数量为 *n*+1 个。根据 geNorm 软件对达氏鲟成鱼不同组织、不同发育时期的胚胎、精巢和卵巢的 7 个候选内参基因的分析结果显示(图 4), 选取不同数目的内参基因对 *V* 值得影响不大, 同时考虑到实验工作的复杂性和成本, 因此选择 2 个内参基因就能够获得目标基因较为准确的定量结果, 其内参基因分别是 β -actin 与 *EF-1 α* 、 β -actin 与 *EF-1 α* 、*RPL8* 与 *EF-1 α* 、 β -actin 与 *RPL8*。本研究筛选得到的内参基因, 为达氏鲟在不同组织、不同发育时期胚胎和性腺的基因表达差异分析提供理论基础。

参考文献:

- [1] Valasek M A, Repa J J. The power of real-time PCR[J]. *Advances in Physiology Education*, 2005, 29(3): 151-159.
- [2] Liang P, Guo Y J, Zhou X G, et al. Expression profiling in *Bemisia tabaci* under insecticide treatment: indicating the

- necessity for custom reference gene selection[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e87514.
- [3] Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27(2-3): 95-125.
- [4] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [5] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611-622.
- [6] Olsvik P A, Lie K K, Jordal A E O, et al. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon[J]. BMC Molecular Biology, 2005, 6: 21.
- [7] Suzuki T, Higgins P J, Crawford D R. Control selection for RNA quantitation[J]. BioTechniques, 2000, 29(2): 332-337.
- [8] McCurley A T, Callard G V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: Male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9(1): 102.
- [9] Su J G, Zhang R F, Dong J, et al. Evaluation of internal control genes for qRT-PCR normalization in tissues and cell culture for antiviral studies of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 830-835.
- [10] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000, 46(1-2): 69-81.
- [11] Artico S, Nardeli S M, Brilhante O, et al. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 49.
- [12] Wei Q J, He J, Yang D G, et al. Status of sturgeon aquaculture and sturgeon trade in China: A review based on two recent nationwide surveys[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2004, 20(5): 321-332.
- [13] Zhuang P, Ke F E, Wei Q W, et al. Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze River[J]. Environmental Biology of Fishes, 1997, 48(1-4): 257-264.
- [14] Zhang H, Wei Q W, Du H, et al. Present status and risk for extinction of the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in the Yangtze River watershed: A concern for intensified rehabilitation needs[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2): 181-185.
- [15] Gong Q, Liu Y, Du J, et al. Study on artificial reproduction of cultured *Acipenser dabryanus* Dumeril[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(4): 1710-1714. [龚全, 刘亚, 杜军, 等. 达氏鲟全人工繁殖技术研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(4): 1710-1714.]
- [16] He B, Chen X J, Du J, et al. Study on growth characteristics of *Acipenser dabryanus* Dumeril under artificial culturing conditions[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(1): 335-339. [何斌, 陈先均, 杜军, 等. 人工养殖条件下达氏鲟生长特性的研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 335-339.]
- [17] Du H, Wei Q W, Xie X, et al. Improving swimming capacity of juvenile Dabry's sturgeon, (*Acipenser dabryanus* Duméril, 1869) in current-enriched culture tanks[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2014, 30(6): 1445-1450.
- [18] Li C J, Shan X S, Yue H M, et al. Effects of recombinant GH on growth, blood biochemistry, and body composition of juvenile Dabry's sturgeon *Acipenser dabryanus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(6): 1106-1113. [李创举, 单喜双, 岳华梅, 等. GH 重组蛋白对达氏鲟生长、血液生化和体组成的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(6): 1106-1113.]
- [19] Yue H M, Ye H, Ruan R, et al. Molecular cloning of *gpr54* genes and effects of kisspeptin intraperitoneal injection on its expression in *Acipenser dabryanus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 896-902. [岳华梅, 叶欢, 阮瑞, 等. 达氏鲟 *gpr54* 基因的克隆及 Kisspeptin 注射对其表达的影响[J]. 水生生物学报, 2018, 42(5): 896-902.]
- [20] Zhang L, Wei Q W, Zhang S H, et al. Effects of dietary protein level on growth performance, body composition, digestive enzyme activities and blood biochemical parameters of juvenile *Acipenser dabryanus*[J]. Freshwater Fisheries, 2016, 46(6): 79-85. [张磊, 危起伟, 张书环, 等. 饲料蛋白水平对达氏鲟幼鱼生长性能、体组成、消化酶活性以及血液生化指标的影响[J]. 淡水渔业, 2016, 46(6): 79-85.]
- [21] Chu Z P, Wei Q W, Du H, et al. Effects of different carbohydrate sources on growth performance, body composition, and physiological and biochemical parameters of juvenile Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 284-294. [褚志鹏, 危起伟, 杜浩, 等. 不同糖源对达氏鲟幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 284-294.]
- [22] Di J, Chu Z P, Zhang S H, et al. Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 711-719.
- [23] Long Z H, Chen H, Wang B, et al. Cloning and expression stability of reference genes β -actin, *GAPDH* and *EF1- α* in *Acipenser dabryanus*[J]. Journal of Agricultural Biotechnol-

- ogy, 2018, 26(11): 1846-1855. [龙治海, 陈虎, 汪斌, 等. 达氏鲟内参基因 β -actin、*GAPDH* 和 *EF1- α* 的克隆及表达稳定性[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(11): 1846-1855.]
- [24] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002, 3: research0034.1.
- [25] 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 Research*, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [26] 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 pair-wise correlations[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509-515.
- [27] Xie F L, Sun G L, Stiller J W, et al. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e26980.
- [28] Hu Q, Guo W, Gao Y, et al. Reference gene selection for real-time RT-PCR normalization in rice field eel (*Monopterus albus*) during gonad development[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(6): 1721-1730.
- [29] Zhang Z B, Hu J Y. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR[J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 95(2): 356-368.
- [30] Luo S S, Gao Z X, Feng B, et al. Screening of optimal internal reference genes for qRT-PCR in diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(5): 1-8. [罗双双, 高泽霞, 冯兵, 等. 二倍体和四倍体泥鳅 qRT-PCR 分析中内参基因优选[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 1-8.]
- [31] Li D, Wu P, He M F, et al. Screening of reference genes in *Siniperca chuatsi* for qRT-PCR analysis[J]. *Life Science Research*, 2016, 20(3): 214-217. [李迪, 吴萍, 何美凤, 等. qRT-PCR 分析鳊鱼内参基因的筛选[J]. 生命科学研究, 2016, 20(3): 214-217.]
- [32] Lyu L, Zhang Z P, Wan H F, et al. Identification of internal reference genes for quantification of gene expression in different embryonic developmental stages of the mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 457-464. [吕梁, 张子平, 万海付, 等. 拟穴青蟹不同发育时期胚胎基因表达的内参基因的筛选[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 457-464.]
- [33] Jiang H C, Qian Z J, Lu W, et al. Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp crawfish *Procambarus clarkii*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 21591-21605.
- [34] Shi Y Y, Lu J, Wang Y L, et al. Reference gene validation for quantification of gene expression during final oocyte maturation induced by $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 910-919. [史艳艳, 卢洁, 王艺磊, 等. $17\alpha, 20\beta$ 双羟孕酮诱导鲤卵母细胞最终成熟相关基因表达内参基因的筛选[J]. 中国水产科学, 2014, 21(5): 910-919.]
- [35] Kidd M, Nadler B, Mane S, et al. GeneChip, geNorm, and gastrointestinal tumors: Novel reference genes for real-time PCR[J]. *Physiological Genomics*, 2007, 30(3): 363-370.

Identification of reference genes for qRT-PCR in Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*

WU Mengbin^{1,2}, YE Huan², YUE Huamei², RUAN Rui², DU Hao², ZHOU Congli², XIANG Hao², LI Chuangju^{1,2}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: In order to identify the most stable reference gene for the real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*), seven commonly used reference genes, including beta actin (β -actin), elongation factor-1 (*EF-1 α*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), ribosomal protein L8 (*RPL8*), 18S ribosomal RNA (*18S rRNA*), succinate dehydrogenase complex subunit A (*SDHA*), and alpha-tubulin (*α -tubulin*) were selected as candidates. Their expression stability was evaluated in different adult tissues, and in the tissue of embryos, testes, and ovaries during different developmental stages. We used geNorm, NormFinder, BestKeeper, and RefFinder software to conduct the analyses. Results verified that optimal amplification efficiency was obtained from the primers of these candidate genes. In adult tissues, the stability of these reference genes was as follows: *EF-1 α* > β -actin>*SDHA*>*RPL8*>*18S rRNA*> *α -tubulin*>*GAPDH*; during different developmental stages of embryos, the stability of these reference genes was: *EF-1 α* > β -actin>*SDHA*> *α -tubulin*>*18S rRNA*>*GAPDH*>*RPL8*; during different developmental stages of testes, the stability of these reference genes was: *EF-1 α* >*RPL8*> β -actin>*SDHA*>*18S rRNA*> *α -tubulin*>*GAPDH*; during different developmental stages of ovaries, the stability of these reference genes was: *RPL8*>*EF-1 α* >*SDHA*> β -actin=> *α -tubulin*>*18S rRNA*>*GAPDH*. Overall, the most stable reference gene in adult tissue, embryos, and testes was *EF-1 α* . For ovary tissue, we found *RPL8* to be most stable. This study provides a useful basis for future work examining gene expression in Dabry's sturgeon.

Key words: *Acipenser dabryanus*; qRT-PCR; reference genes; stability

Corresponding author: LI Chuangju. E-mail: lcj@yfi.ac.cn