

文章编号: 1000-0615(2018)05-0663-10

DOI: 10.11964/jfc.20170110688

## 菲律宾蛤仔不同发育时期及成体不同组织中内参基因筛选

牟政强, 闫路路, 王化敏, 霍忠明, 闫喜武\*

(大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 为筛选出菲律宾蛤仔17个发育时期及成体7个组织中的最适内参基因, 实验采用3个内参基因筛选方法geNorm、NormFinder及 $\Delta\text{Ct}$ 对菲律宾蛤仔不同发育时期和成体不同组织中的12个候选内参基因延伸因子1 $\alpha$ 基因(*EF1A*)、TATA盒结合蛋白基因(*TBP*)、组蛋白H3基因(*HIS*)、细胞色素b5基因(*CYTB5*)、泛素缀合酶基因(*UCE*)、核糖体蛋白L8基因(*RPL8*)、核糖体蛋白S23基因(*RPS23*)、核糖体蛋白L2基因(*RPL2*)、细胞色素C基因(*CYTC*)、生长因子受体结合蛋白2基因(*GFRP2*)、肌动蛋白基因(*ACT*)和微管蛋白基因(*TUB*)进行表达稳定性分析。结果显示, 菲律宾蛤仔不同发育时期qRT-PCR分析需要3个内参基因, 分别为*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*; 菲律宾蛤仔成体不同组织qRT-PCR分析需要2个内参基因, 分别为*CYTB5*和*GFRP2*。*ACT*在菲律宾蛤仔不同发育阶段和不同组织中表达最不稳定。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; 内参基因; 实时荧光定量PCR; 不同发育时期; 不同组织

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)俗称花蛤、沙蚬子、蚬子, 属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、帘形目(Veneroidea)、帘蛤科(Veneridae)、蛤仔属<sup>[1]</sup>。我国是菲律宾蛤仔养殖大国, 年产量约300万t, 是我国单种产量最高的养殖贝类, 占世界养殖产量的90%以上。菲律宾蛤仔具有味道鲜美、生长快、养殖周期短、养殖方法简便等特点, 深受消费者和养殖业者喜爱<sup>[2]</sup>。

实时荧光定量PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)具有检测速度快、重复性好、灵敏性高和拥有完善的自动化系统等优点, 已在动、植物及微生物的基因表达水平检测中广泛应用<sup>[3-10]</sup>。在qRT-PCR分析时, 其内参基因稳定性可直接影响目的基因相对表达量结果。因此, 筛选理想的内参基因, 即筛选能够在不同类型细胞、组织及不同处理条件下恒定表达的基因<sup>[11]</sup>极为重要。然而, 大量

研究表明多数常用的内参基因只能在特定细胞、组织或特定处理条件下稳定表达, 而且在不同类型的细胞中RNA质量、反转录效率等存在差异<sup>[12-14]</sup>。因此, 针对不同类型的实验和不同的生物样品都有必要对内参基因进行严格地筛选。

菲律宾蛤仔生活史中存在由浮游生活变为底栖生活的发育过程, 这与传统模式生物(如小鼠和果蝇等)相比具有独特的发育特征。然而关于其发育相关基因的转录调控机制研究一直鲜有报道, 因此, 深入了解菲律宾蛤仔早期胚胎发育、幼虫变态以及器官形成等过程的分子调控机制极为重要。研究菲律宾蛤仔个体不同发育阶段的分子生物学问题, 可以为养殖产业提供一定的理论基础。通过对菲律宾蛤仔不同发育时期内参基因的筛选, 可以为后期研究其发育过程中关键基因的转录表达水平提供基础。生物各组织都有其特有的功能, 研究基因在不

收稿日期: 2017-01-13 修回日期: 2017-05-18

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

通信作者: 闫喜武, E-mail: yanxiwu@dlou.edu.cn

同组织中的表达情况可为预估基因功能提供参考,因此有必要筛选菲律宾蛤仔不同组织中的内参基因。

本实验首次基于菲律宾蛤仔基因组平台筛选出常用候选内参基因,选用内参基因评估软件geNorm<sup>[15]</sup>、NormFinder<sup>[16]</sup>及 $\Delta\text{Ct}$ 法<sup>[17]</sup>分别对菲律宾蛤仔的17个发育阶段及7个不同组织进行内参基因表达稳定性分析,为菲律宾蛤仔不同发育时期和不同组织的研究提供最适内参基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

用于本实验不同发育时期研究的菲律宾蛤仔父母本取自大连獐子岛野生群体,通过人工授精的方式进行繁育。取样时,水温(22±1)°C,盐度31±1, pH 8.1±0.1。取样时期及时间见表1。将80%以上的胚胎或幼虫所处时期确定为取样时期,每个时期取3管,每管不少于500粒胚胎或幼虫,用手持式离心机轻微离心去除上层海水后迅

表1 取样时间  
Tab. 1 Sampling time

发育时期	development stage	取样时间	sampling time
卵	egg	0 min	
受精卵	zygote	3 min	
第一极体	first polar body	15 min	
第二极体	second polar bodies	18 min	
二细胞	2 cell	27 min	
四细胞	4 cell	50 min	
八细胞	8 cell	1 h 10 min	
十六细胞	16 cell	1 h 40 min	
三十二细胞	32 cell	2 h 20 min	
原肠胚	gastrula	6 h	
前期担轮幼虫	early trochophora	8 h 50 min	
后期担轮幼虫	later trochophora	16 h 10 min	
D形幼虫	D-shaped larvae	21 h 30 min	
壳顶幼虫	umbo larvae	3 d	
匍匐幼虫	pediveliger	13 d	
稚贝	juvenile	43 d	
出现壳色的稚贝	coloured juvenile	48 d	

速冷冻于液氮中,之后保存于-80 °C超低温冰箱。

用于本实验的成体菲律宾蛤仔取自大连庄河地区的养殖群体,壳长(3.2±0.3) cm,砂滤海水中暂养1周[水温(22±1)°C,盐度31±1, pH 8.1±0.1],取样前24 h停止投饵。取9个个体,分别解剖分离其闭壳肌、性腺、外套膜、鳃、内脏团、足和水管,液氮速冻后保存于-80 °C超低温冰箱。

### 1.2 总RNA的提取

菲律宾蛤仔不同发育时期及不同组织的RNA均使用TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Thermo Scientific, 美国)提取,且所有的操作均在低温条件下进行。所得RNA通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用NanoDrop<sup>®</sup> 2000c核酸分析仪(Thermo Scientific, 美国)检测RNA的浓度及纯度,实验选用OD260/280值为1.9~2.1的RNA进行实验,检测合格后分装冻存于-80 °C超低温冰箱。

### 1.3 cDNA的合成

菲律宾蛤仔不同发育时期cDNA模板合成取750 ng各发育时期总RNA,使用PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaTa, 大连),按照说明书去除基因组DNA,并进行反转录。转录后产物稀释5倍作为qRT-PCR模板,并于-20 °C冻存。

菲律宾蛤仔不同组织cDNA模板合成取900 ng各组织总RNA以同样方法反转录为cDNA,同一组织的9管cDNA模板中每3管等RNA量混合,制成3管cDNA混合液并稀释6倍作为qRT-PCR模板,于-20 °C冻存。

### 1.4 引物来源

根据本实验室菲律宾蛤仔基因组数据库,获得常用内参基因*EF1A*、*UCE*、*TBP*、*HIS*、*CYTB5*、*RPL8*、*RPS23*、*RPL2*、*CYTC*、*GFRP2*的编码序列,采用AlleleID6 (<http://www.premierbiosoft.com/>)对序列进行qRT-PCR的引物设计(表2)。另外*ACT*<sup>[18]</sup>和*TUB*<sup>[19]</sup>的引物序列来源于已发表的文章。

### 1.5 PCR产物测序

实时荧光定量PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,确保产物单一条带后,紫外灯下快速切取目的条带,用SanPrep柱式DNA胶回收试剂

表2 引物序列及扩增效率

Tab. 2 Sequence and efficiency of the primers

基因名称 gene name	引物序列(5'—3') primer sequence (5'—3')	扩增片段长度/bp amplicon length	扩增效率/% efficiency
延伸因子1 $\alpha$ elongation factor 1 alpha ( <i>EF1A</i> )	F:TGTAGAGAGGAAGGAAGGAAATGC R:GTCTTGCTGGTGAAGGATGG	77	97.75
泛素缀合酶 ubiquitin-conjugating enzyme ( <i>UCE</i> )	F:CTAAGAAAGCGTGCCTCATATCG R:ATCAGTGTCAAGCATTCCAAGC	164	99.65
TATA框结合蛋白 TATA-box binding protein ( <i>TBP</i> )	F:TACCGTTGTGGCAAAGAAAGAC R:CGTGTGTAGAGTTCAGTTCAATG	190	100.30
组蛋白H3 histone ( <i>HIS</i> )	F:ACCGTTGCTCTCCGTGAAATC R:AGTATGCTTCGCTGGCTTCC	166	95.95
细胞色素b5 cytochrome b5 ( <i>CYTb5</i> )	F:CGGATGCCAGAGAATTGATGAAAG R:CAGCCAGCCTGACCAACTAC	134	103.55
核糖体蛋白L8 ribosomal protein L8 ( <i>RPL8</i> )	F:GGTTATGTGAAGGGAGTCGTAAAG R:TGTAGCGTAGTTGCCAGATGC	291	102.10
核糖体蛋白S23 ribosomal protein S23 ( <i>RPS23</i> )	F:GGTGTGGTTGCTGGTTTGG R:TTGGTTCCTTCTTCTTCTCTG	128	100.55
核糖体蛋白L2 ribosomal protein L2 ( <i>RPL2</i> )	F:GGTGCCAAACAAAGAATTAGACTG R:GCTGCCACTGGATACTGAGG	227	102.40
细胞色素C cytochrome C ( <i>CYTc</i> )	F:CAAATGCCTTGACGGTAATGATC R:AGCCAAACTTATAGACAATCTGC	87	100.00
生长因子受体结合蛋白2 growth factor receptor-bound protein 2 ( <i>GFRP2</i> )	F:CTGATGGGGCTTCTCTGGTTC R:GTAGTTCTCCTCGCTCTTGTGG	315	102.95
微管蛋白 tubulin ( <i>TUB</i> )	F:AAGCGTCTATGATTCTGG R:GGTAAGGGCAAAGGTAT	120	96.70
肌动蛋白 $\beta$ -actin ( <i>ACT</i> )	F:CTCCCTTGAGAAGAGCTACGA R:GATACCAGCAGATTCCATACCC	121	102.75

盒(生工生物工程上海股份有限公司)进行胶回收, 将回收的DNA片段与pEASY-T1克隆载体连接, 随后将载体转化至Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞中, 37 °C平板培养过夜, 通过蓝白斑方法对克隆质粒进行筛选。选取单克隆白斑菌株通过PCR初步鉴定后送往生工生物工程上海股份有限公司进行质粒测序, 结果与NCBI数据库及本实验室的菲律宾蛤仔基因组库进行比对。

## 1.6 实时荧光定量PCR

采用SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)(TaKaRa, 大连)对候选内参基因进行扩增, 反应由LightCycler® 480定量PCR仪完成, 20  $\mu$ L PCR扩增反应体系:SYBR® Premix Ex SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, cDNA (<100 ng) 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L, PCR Forward/ Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, 每个样品设置3组重复。实时荧光定量PCR反应条件为95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C复性30 s, 共40个循环。熔解曲线反应条件为95 °C变性5 s, 60 °C复性1 min, 60~95 °C以0.11 °C/s的速率升温, 每摄氏度采集5次荧光信号; 50 °C降温30 s。将菲律宾蛤仔不同组织RNA反转录所得的全部cDNA各取1  $\mu$ L混合, 作为cDNA的混合模板, 按照3<sup>0</sup>、3<sup>1</sup>、3<sup>2</sup>、3<sup>3</sup>、3<sup>4</sup>、3<sup>5</sup>倍数进行梯度稀释, 用于制备标准曲线。

## 1.7 数据分析

实验选用geNorm (version 3.5), NormFinder (version 0.953)和 $\Delta C_t$ 法<sup>[15-17]</sup>对qRT-PCR产生的原始C<sub>t</sub>值进行数据分析, 运用LightCycler 480 software (version 1.5.1.62)的最大二阶导数法计算产物的扩增效率。

## 2 结果

### 2.1 引物的特异性评价

用于qRT-PCR的引物需满足以下3个条件: (1)熔解曲线为单峰; (2)PCR产物序列为目的基因序列; (3)引物的扩增效率在90%到110%之间<sup>[20]</sup>。

本实验中12个候选内参基因的熔解曲线均为单峰(图1), qRT-PCR产物经测序确定为目的片段序列, 基因的扩增效率在95.96%到103.55%之间(表2), 标准曲线相关系数( $R^2$ ) $\geq$ 0.990。结果表明, 本实验中12个基因的引物特异性好, 可以用于qRT-PCR实验。

### 2.2 菲律宾蛤仔不同发育时期候选内参基因表达稳定性评估

菲律宾蛤仔的17个发育阶段中, 12个基因的C<sub>t</sub>值分布在15.30到33.91之间。*HIS*的基因表达水平最高, C<sub>t</sub>值在分布在15.30~18.94, 而*RPL2*的

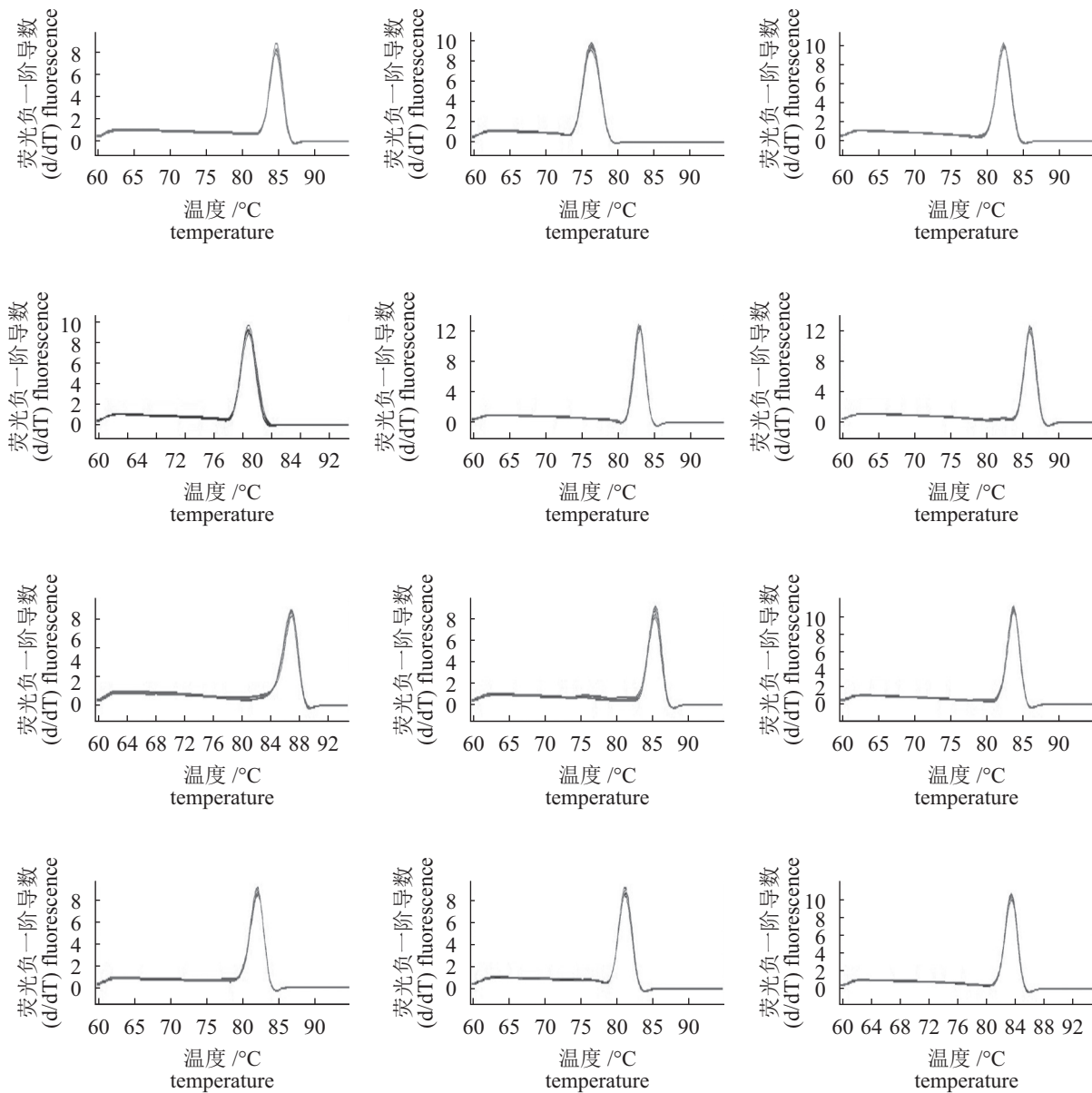


图1 菲律宾蛤仔中12个候选内参基因的熔解曲线

Fig. 1 The melting curves of twelve reference genes of *R. philippinarum*

1. *ACT*, 2. *CYTC*, 3. *CYTB5*, 4. *EF1A*, 5. *GFRP2*, 6. *HIS*, 7. *RPL2*, 8. *RPL8*, 9. *RPS23*, 10. *TBP*, 11. *TUB*, 12. *UCE*

基因表达水平最低,  $C_t$ 值在29.28~33.91(图2)。 *HIS*的 $C_t$ 值变化程度最小, 在各样本间标准差为0.919; *ACT*的 $C_t$ 值变化程度最大, 其标准差为最大(6.380)。

geNorm通过对候选内参基因进行两两比对计算, 得到各基因 $M$ 值, 通过 $M$ 值对基因稳定性进行排序,  $M$ 值越小说明表达越稳定。geNorm还通过 $V_n/n+1$ 的比值来决定实验所需内参基因的数量, 当首次出现 $V_n/n+1 < 0.15$ 时,  $n$ 即为所需的内参基因的数量<sup>[14-15]</sup>。geNorm对菲律宾蛤仔不同发

育时期中12个候选内参基因的评估结果显示, 需要3个内参基因才能够获得理想的目标基因定量结果(图3, 表3)。geNorm分析结果表明前3位候选基因分别为*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*。

NormFinder与geNorm算法类似, 不同的是NormFinder是通过一个计算群体计算不同的候选内参基因从而得到稳定值, 数值越小证明该基因表达越稳定<sup>[16]</sup>。NormFinder分析结果中最稳定的前5个候选基因与geNorm完全相同, 但是排序略有不同, NormFinder得到最稳定的候选基因排



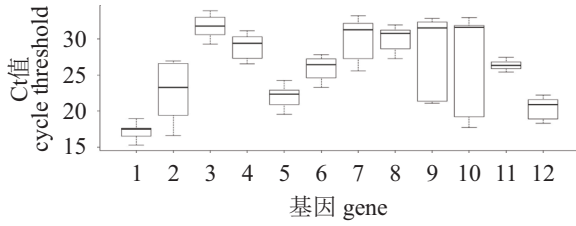


图2 菲律宾蛤仔不同发育时期中12个候选内参基因的Ct值分布

黑色方框表示上下边界, 代表四分之一位数和四分之三位数, 中间黑色粗线表示Ct值的中位数, 上下误差线代表最大值和最小值, 下同

Fig. 2 Distribution of cycle threshold (Ct) values for 12 candidate reference genes in different development stages of *R. philippinarum*

1. *HIS*, 2. *EF1A*, 3. *RPL2*, 4. *GFRP2*, 5. *RPL8*, 6. *CYTB5*, 7. *TBP*, 8. *CYTC*, 9. *TUB*, 10. *ACT*, 11. *UCE*, 12. *RPS23*. The upper and lower boundaries of the black boxes indicate 75 and 25 percentiles of Ct values. The black centre line indicates the median Ct. Whiskers mean the largest/smallest Ct value, the same below

序为 *RPL8*>*RPS23*>*GFRP2*>*CYTB5*>*CYTC* (表3)。

$\Delta Ct$ 分析法不需要限定RNA的起始浓度, 可直接对同一样本的不同基因进行两两Ct值差值比较, 从而得到更为精确的结果<sup>[17]</sup>。在菲律宾蛤仔不同发育时期内参基因稳定性评估中,  $\Delta Ct$ 法的分析结果与geNorm法的分析结果相似, 最稳定的前5位中仅前2位的顺序相互颠倒(表3)。

综合3种方法并结合  $Vn/n+1$  值表明, 需要3个内参基因才能够获得理想的目标基因定量结果, 因而推荐 *CYTC*、*CYTB5* 和 *RPS23* 为菲律宾蛤仔不同发育时期目标基因相对定量中可靠的内参。

### 2.3 菲律宾蛤仔成体不同组织候选内参基因表达稳定性评估

实验检测了菲律宾蛤仔成体内7种组织中各候选内参基因的表达水平, 所得Ct值的分布情况如图4所示。不同组织中12个候选内参基因的Ct值介于14.59到31.14之间。其中, *TUB*和*ACT*的表达水平受组织差异影响较大, 最大和最小Ct值分别相差4.35和6.77个循环; *RPS23*的Ct值变化较小, 最大和最小Ct值相差0.72个循环。此外实验发现, *ACT*在闭壳肌、水管、足及外套膜中的表达量较高, *RPS23*在鳃、性腺、内脏团中表达量较高。*TBP*, *RPL2*, *CYTC*在7个组织中基因表达

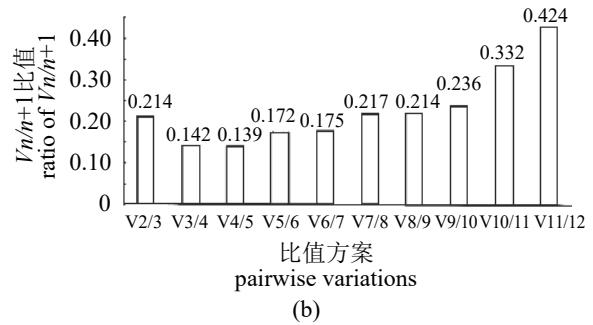
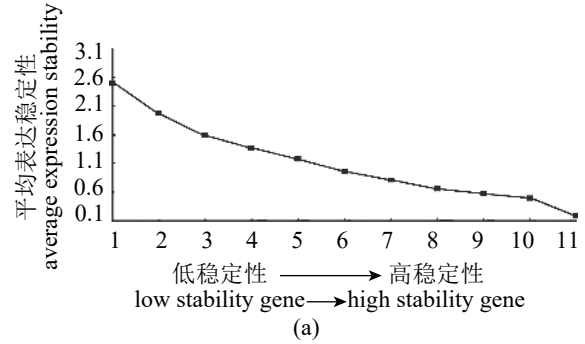


图3 菲律宾蛤仔不同发育时期中geNorm法分析候选内参基因稳定性结果

(a) 候选内参基因平均表达稳定性结果; (b) 确定最优数量的候选基因, n为所需内参基因数量, 下同

Fig. 3 Stability of the candidate reference genes calculated by geNorm in different development stages of *R. philippinarum*

(a) average expression stability value of candidate reference genes; (b) determination of the optimal number of candidate reference genes 1. *ACT*, 2. *TUB*, 3. *EF1A*, 4. *HIS*, 5. *TBP*, 6. *UCE*, 7. *RPL2*, 8. *RPL8*, 9. *RPS23*, 10. *GFRP2*, 11. *CYTB5* and *CYTC*, n is the required number of reference genes, the same below

量较低, Ct值为26.86~31.14。

geNorm分析结果表明, *CYTB5*和*GFRP2*在菲律宾蛤仔不同组织中的表达最稳定, 其次为*RPL8*、*RPS23*和*UCE* (图5-a)。V2/3值小于0.15, 所以需要选取2个内参基因(图5-b)。

Normfinder分析结果表明, *CYTB5*和*GFRP2*为菲律宾蛤仔不同组织中表达最稳定的2个基因, 受到组织差异的影响最小, 与geNorm分析结果一致(表4)。

$\Delta Ct$ 法分析结果表明,  $\Delta Ct$ 法与geNorm法结果几乎一致, 仅在5、6位略有不同(表4)。 $\Delta Ct$ 法同样认为*CYTB5*和*GFRP2*在菲律宾蛤仔不同组织中的表达最稳定。

综合3种分析方法并结合  $Vn/n+1$  值, 最终认为 *CYTB5* 和 *GFRP2* 为菲律宾蛤仔不同组织中最佳内参基因组合。同时还发现, *ACT* 和 *TUB* 在3种

表3 菲律宾蛤仔不同发育时期中候选内参基因表达稳定性排名  
Tab.3 Ranks of the candidate reference genes for qRT-PCR analysis in different development stages of *R. philippinarum*

	geNorm	Normfinder	$\Delta Ct$	综合排名 comprehensive ranking
<i>CYTC</i>	1	5	2	2
<i>GFRP2</i>	4	3	4	4
<i>CYTB5</i>	2	4	1	1
<i>RPS23</i>	3	2	3	3
<i>RPL8</i>	5	1	5	5
<i>RPL2</i>	6	7	6	6
<i>TBP</i>	8	11	7	9
<i>HIS</i>	9	12	10	10
<i>UCE</i>	7	10	8	7
<i>EF1A</i>	10	6	9	8
<i>TUB</i>	11	9	11	11
<i>ACT</i>	12	8	12	12

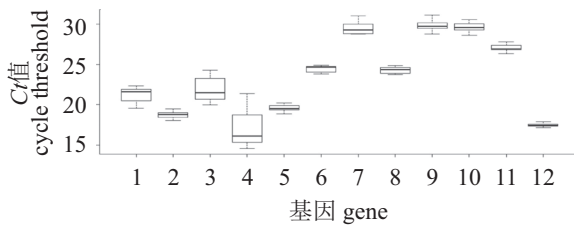


图4 菲律宾蛤仔成体不同组织中12个候选内参基因的Ct值分布

Fig.4 Distribution of cycle threshold (Ct) values for 12 candidate reference genes in different tissues of *R. Philippinarum*

1. *HIS*, 2. *EF1A*, 3. *TUB*, 4. *ACT*, 5. *RPL8*, 6. *CYTB5*, 7. *RPL2*, 8. *GFRP2*, 9. *TBP*, 10. *CYTC*, 11. *UCE*, 12. *RPS23*

分析方法中均被认为是12种基因中受到组织差异影响最大的2个管家基因。

### 3 讨论

实时荧光定量PCR技术具有精确度高、操作简便等优点，广泛应用于目标基因的定量检测中。如今，很多学者发现一些常用管家基因在不同组织、不同实验条件、不同发育时期的表达不稳定，如*ACT*、*TUB*、*GAPDH*等<sup>[21-27]</sup>。因此这些

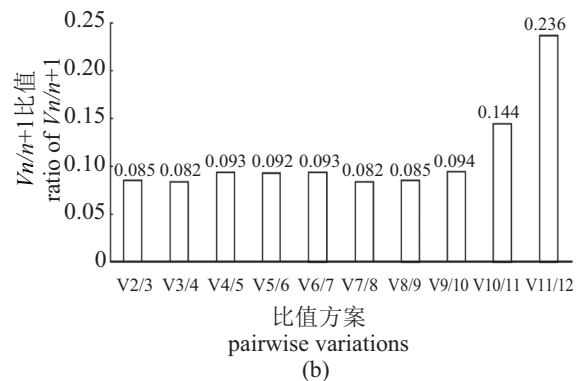
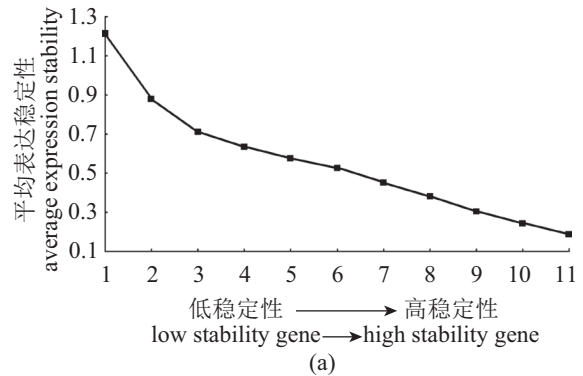


图5 菲律宾蛤仔成体中geNorm法分析候选内参基因稳定性结果

(a) 候选内参基因平均表达稳定性结果；(b) 确定最优数量的候选基因

Fig.5 Stability of candidate reference genes calculated by geNorm in different tissues of *R. Philippinarum*

(a) average expression stability value of candidate reference genes; (b) determination of the optimal number of candidate reference genes 1. *ACT*, 2. *TUB*, 3. *HIS*, 4. *CYTC*, 5. *RPL8*, 6. *TBP*, 7. *EF1A*, 8. *UCE*, 9. *RPS23*, 10. *RPL2*, 11. *CYTB5* and *GFRP2*

基因在某些情况中并不是最理想的内参基因。为了追求更加准确的定量结果，运用标准化的程序进行理想内参基因的筛选变得尤为重要。

基于Excel平台的NormFinder，geNorm和 $\Delta Ct$ 法是筛选内参基因的常用方法<sup>[28-29]</sup>，本实验为得到理想的内参基因，同时采用这3种方法对候选内参基因稳定性进行评估。在菲律宾蛤仔不同发育时期内参基因稳定性分析中发现，geNorm和 $\Delta Ct$ 法得出的结果几乎一致，即*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*为前3位最稳定内参基因。而NormFinder分析结果略有不同，其认为最稳定的候选基因的排序为*RPL8*>*RPS23*>*GFRP2*>*CYTB5*>*CYTC*。综合3种软件分析，最终推荐*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*为菲律宾蛤仔胚胎发育各时期中最稳定的内参基因组合。在对菲律宾蛤仔不同

表 4 菲律宾蛤仔不同组织中候选内参基因表达稳定性排名

Tab. 4 Ranks of the candidate reference genes for qRT-PCR analysis in different tissues of *R. philippinarum*

	geNorm	Normfinder	$\Delta C_t$	综合排名 comprehensive ranking
<i>CYTC</i>	9	6	9	9
<i>GFRP2</i>	2	1	2	2
<i>CYTB5</i>	1	1	1	1
<i>RPS23</i>	4	3	4	3
<i>RPL8</i>	3	7	3	4
<i>RPL2</i>	8	5	8	8
<i>TBP</i>	7	3	7	7
<i>HIS</i>	10	10	10	10
<i>UCE</i>	5	9	6	6
<i>EF1A</i>	6	8	5	5
<i>TUB</i>	11	11	11	11
<i>ACT</i>	12	12	12	12

组织内参基因筛选时发现, 3种分析方法结果均表明*CYTB5*和*GFRP2*为最稳定内参基因, 之后为*RPS23*、*RPL8*和*EF1A*。

菲律宾蛤仔胚胎/幼虫发育经历卵裂期、桑葚胚、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、匍匐幼虫、单水管稚贝和双水管稚贝, 直到呈现壳色的稚贝大约需要一个半月到两个月的时间<sup>[1]</sup>, 期间生活习性由浮游生活变为底栖生活。目前关于软体动物中胚胎各发育时期内参筛选的研究已有一些报道。王琦等<sup>[30]</sup>认为*ACT*为合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)不同胚胎发育期中最稳定的内参基因。王圣<sup>[31]</sup>收集了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的10个发育阶段的样本, 发现*ACT*和细胞色素*b*基因是皱纹盘鲍不同发育时期的最适内参基因。Feng等<sup>[14]</sup>对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)5个不同发育阶段进行了12个候选内参基因表达稳定性评估, 最终确认*CYTC*和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因可作为虾夷扇贝不同发育时期的内参基因。而在本实验中发现*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*为菲律宾蛤仔17个不同发育时期中最适内参基因组合, 与以上其他双壳贝类实验结果有所不同, 这可能是由物种特异性决定的, 即不同物种在发育过程中其管家基

因行使的具体功能和转录表达水平有所不同<sup>[21]</sup>。

关于软体动物不同组织内参基因筛选已在皱纹盘鲍<sup>[31]</sup>、仿刺参(*Apostichopus japonicus*)<sup>[27]</sup>、虾夷扇贝<sup>[14]</sup>等物种中有所研究。王琦等<sup>[30]</sup>认为*ACT*是合浦珠母贝不同组织中的最适内参基因; Pu等<sup>[32]</sup>对葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)7个不同组织中的8个候选内参基因进行表达稳定性分析, 认为泛素结合蛋白基因与*TUB*为最稳定的内参基因; 王圣<sup>[31]</sup>对皱纹盘鲍5个组织中的7个候选内参基因进行分析, 最终认为细胞色素*b*基因为最适内参基因; Feng等<sup>[14]</sup>对虾夷扇贝中6个不同组织中的12种候选内参基因进行表达稳定性评估, 最终发现DEAD盒RNA解旋酶类似蛋白基因、泛素结合蛋白基因和60S核糖体蛋白L16基因为最佳内参基因组合。本实验中发现*CYTB5*和*GFRP2*为菲律宾蛤仔7种不同组织中最稳定的内参基因组合, 这与仿刺参<sup>[27]</sup>和皱纹盘鲍<sup>[31]</sup>不同组织内参基因筛选结果部分一致, 但与合浦珠母贝<sup>[30]</sup>、虾夷扇贝<sup>[14]</sup>的结果相异。这证明在不同物种中即便是同源内参基因也没有绝对的通用性, 它们的稳定性不尽相同<sup>[33]</sup>。因此, 在进行相对定量实验前, 先进行内参基因的筛选是十分必要的。

3种分析方法一致认为, 在菲律宾蛤仔不同发育时期及不同组织的表达中, *ACT*是12个候选内参基因中最不稳定的基因, 这与Feng等<sup>[14]</sup>在虾夷扇贝中的分析结果一致, 但与王琦<sup>[30]</sup>对合浦珠母贝的研究结果相反。*ACT*作为常用的内参基因广泛应用于双壳贝类基因定量实验中<sup>[34-37]</sup>, 然而其稳定性却被越来越多学者质疑。有研究结果表明, *ACT*的表达会受不同实验条件及组织的影响<sup>[13, 37-39]</sup>, 所以不经过筛选直接将*ACT*作为内参基因可能会对实验结果有直接的影响。本实验分析表明, *ACT*为菲律宾蛤仔不同发育时期及不同组织中变化最大的候选基因, 同时还发现*CYTC*、*CYTB5*和*RPS23*为菲律宾蛤仔胚胎发育不同时期的理想内参基因组合, *CYTB5*和*GFRP2*为菲律宾蛤仔中不同组织的理想内参基因组合。相较于其他常用的内参基因, 本实验结果更能获得精确的定量实验结果, 为后期研究菲律宾蛤仔发育过程中的关键基因、不同组织中基因的表达水平提供实验基础和数据支撑。

#### 参考文献:

- [1] 张国范, 闫喜武. 蛤仔养殖学[M]. 北京: 科学出版社,

- 2010.
- Zhang G F, Yan X W. Clam Aquaculture Study[M]. Beijing: Science Press, 2010 (in Chinese).
- [ 2 ] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.
- Wang R C, Wang Z P. Science of Marine Shellfish Culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008 (in Chinese).
- [ 3 ] Bustin S A, Benes V, Nolan T, *et al.* Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34(3): 597-601.
- [ 4 ] 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.
- [ 5 ] van Guilder H D, Vrana K E, Freeman W M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis[J]. Biotechniques, 2008, 44(5): 619-626.
- [ 6 ] 岳志芹, 汪俊, 梁成珠, 等. 实时定量RT-PCR方法检测太平洋牡蛎中的诺沃克样病毒[J]. 海洋科学, 2008, 32(8): 1-4.
- Yue Z Q, Wang J, Liang C Z, *et al.* Detection of Norwalk-like virus in oysters (*Crassostrea gigas*) by real-time quantitative RT-PCR[J]. Marine Sciences, 2008, 32(8): 1-4(in Chinese).
- [ 7 ] 吴绍强, 李海艳, 林祥梅, 等. 贝类派琴虫实时荧光定量PCR检测方法的建立和应用[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 58-63.
- Wu S Q, Li H Y, Lin X M, *et al.* Establishment and application of real-time PCR method for detection of *Perkinsus* sp. in bivalves[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 58-63(in Chinese).
- [ 8 ] Wang H, Song L S, Li C H, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Molecular Immunology, 2007, 44(5): 722-731.
- [ 9 ] 钱曦, 华雪铭, 黄旭雄, 等. 异育银鲫c型溶菌酶全长cDNA序列的生物信息学分析及其组织表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(4): 337-347.
- Qian X, Hua X M, Huang X X, *et al.* Molecular cloning of full-length c-type lysozyme from *Carassius auratus gibelio* and its tissue-specific expression and bioinformatic analysis[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 24(4): 337-347(in Chinese).
- [10] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2000, 25(2): 169-193.
- [11] 董晓丽, 王加启, 卜登攀, 等. 内参基因在实时定量PCR中应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(9): 83-85.
- Dong X L, Wang J Q, Bu D P, *et al.* Research progress of reference genes in realtime fluorescent quantitative PCR[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(9): 83-85.
- [12] Filby A L, Tyler C R. Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish[J]. BMC Molecular Biology, 2007, 8(1): 10-22.
- [13] 鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量PCR中表达稳定性的比较[J]. 水产科学, 2011, 30(10): 603-608.
- Bao X B, Liu W D, Jiang B, *et al.* Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Fisheries Science, 2011, 30(10): 603-608(in Chinese).
- [14] Feng L Y, Yu Q, Li X, *et al.* Identification of reference genes for qRT-PCR analysis in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75609.
- [15] 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(7): research0034.1-0034.11.
- [16] 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.
- [17] 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 Molecular Biology, 2006, 7(1): 1-9.
- [18] Wang Q, Ning X X, Chen L L, *et al.* Responses of thioredoxin 1 and thioredoxin-related protein 14 mRNAs to cadmium and copper stresses in *Venerupis philippinarum*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2011, 154(3): 154-160.
- [19] Wan Q, Whang I, Choi C Y, *et al.* Validation of house-



- keeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 153(3): 259-268.
- [20] Olias P, Adam I, Meyer A, *et al.* Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99678.
- [21] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择[J]. *植物学报*, 2012, 47(4): 427-436.
- Yuan W, Wan H J, Yang R J. Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(4): 427-436(in Chinese).
- [22] Glare E M, Divjak M, Bailey M J, *et al.*  $\beta$ -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels[J]. *Thorax*, 2002, 57(9): 765-770.
- [23] 叶文静, 侯配强, 赵晓民, 等. 荧光定量聚合酶链反应法比较标准管家基因3-磷酸甘油醛脱氢酶、 $\beta$ -肌动蛋白、酸性核糖体磷蛋白P0及18S核糖体RNA在老年大鼠不同组织中的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(18): 3515-3518.
- Ye W J, Hou P Q, Zhao X M, *et al.* Comparison of standard housekeeping genes G3pd, ACTB, Arbp and 18S rRNA expression levels in aging rat tissues by real-time fluorescent polymerase chain reaction[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12(18): 3515-3518(in Chinese).
- [24] Yang C G, Wang X L, Tian J, *et al.* Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 183-192.
- [25] 阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 等. 甘蔗基因表达定量PCR分析中内参基因的选择[J]. *热带作物学报*, 2009, 30(3): 274-278.
- Que Y X, Xu L P, Xu J S, *et al.* Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in sugarcane[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30(3): 274-278(in Chinese).
- [26] 杨桂梅, 鲍宝龙, 任大明. 3-磷酸甘油醛脱氢酶、 $\beta$ -肌动蛋白和18SrRNA作为相对定量的内标在牙鲆发育阶段的稳定性比较[J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14(1): 84-88.
- Yang G M, Bao B L, Ren D M. Comparison between ribosomal 18S rRNA, GAPDH and  $\beta$ -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in development of flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, 14(1): 84-88(in Chinese).
- [27] 杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参 $cytb$ 和 $\beta$ -actin基因表达稳定性比较[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(1): 79-84.
- Yang A F, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Stability comparison of  $cytb$  and  $\beta$ -actin genes expression in Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(1): 79-84(in Chinese).
- [28] Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, *et al.* Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(6): 805-816.
- [29] 张莉恒, 王师, 常亚青, 等. 夏眠期仿刺参肠组织实时荧光定量PCR分析中内参基因的筛选[J]. *中国海洋大学学报*, 2016, 46(7): 35-43.
- Zhang L H, Wang S, Chang Y Q, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR of *Apostichopus japonicus* intestine during different periods of aestivation[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(7): 35-43(in Chinese).
- [30] 王琦, 何毛贤. 合浦珠母贝实时定量PCR内参基因的稳定性比较[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(6): 33-40.
- Wang Q, He M X. Stability comparison of reference genes of *Pinctada fucata* by real-time qPCR[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(6): 33-40(in Chinese).
- [31] 王圣. 皱纹盘鲍内参基因筛选及C型凝集素基因表达规律的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Wang S. Study on the selection of reference genes and the expression regulation of C-type lectin gene in *Haliotis discus hannai*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [32] Pu F, Yang B Y, Ke C H. Characterization of reference genes for qPCR analysis in various tissues of the Fujian oyster *Crassostrea angulata*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 30(4): 838-845.
- [33] 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.
- Zhang Y F, Zhao L J, Zeng Y L. Selection and applica-

- tion of reference genes for gene expression studies[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(8): 1119-1125(in Chinese).
- [34] He C B, Yu H N, Liu W D, *et al.* A goose-type lysozyme gene in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*): cDNA cloning, mRNA expression and promoter sequence analysis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 162(1-3): 34-43.
- [35] Gao X G, He C B, Liu H, *et al.* Intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from hard clam *Meretrix meretrix*: its cDNA cloning, mRNA expression and enzyme activity[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 10713-10722.
- [36] Zhang Z H, Zhang Q Z. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu<sup>2+</sup> and malachite green[J]. *Gene*, 2012, 497(2): 172-180.
- [37] Araya M T, Siah A, Mateo D, *et al.* Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, 99(3): 326-331.
- [38] Cubero-Leon E, Ciocan C M, Minier C, *et al.* Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19(7): 2728-2733.
- [39] Morga B, Arzul I, Faury N, *et al.* Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 937-945.

## The selection of reference genes in different development stages and different tissues of *Ruditapes philippinarum*

MU Zhengqiang, YAN Lulu, WANG Huamin, HUO Zhongming, YAN Xiwu\*

(Engineering Research Center of Shellfish Culture and Breeding in Liaoning Province,  
College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** To select the reference genes applicable for 17 development stages and 7 tissues of *Ruditapes philippinarum*, expression stabilities of elongation factor 1 alpha gene (*EF1A*), TATA-box binding protein gene (*TBP*), histone gene (*HIS*), cytochrome b5 gene (*CYTb5*), ubiquitin-conjugating enzyme gene (*UCE*), ribosomal protein L8 gene (*RPL8*), ribosomal protein S23 gene (*RPS23*), ribosomal protein L2 gene (*RPL2*), cytochrome C gene (*CYTC*), growth factor receptor-bound protein 2 gene (*GFRP2*),  $\beta$ -actin gene (*ACT*) and tubulin gene (*TUB*) were then evaluated with three algorithms—geNorm, NormFinder and  $\Delta$ Ct methods, respectively. The results suggest that *CYTC*, *CYTb5* and *RPS23* were the optimal reference gene combination for different development stages; *CYTb5* and *GFRP2* were recommended for qRT-PCR normalization of different tissues. The *ACT* was proved to be the most unstable in different development stages and different tissues of *R. philippinarum*.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; reference genes; qRT-PCR; different development stages; different tissues

**Corresponding author:** YAN Xiwu. E-mail: yanxiwu@dloou.edu.cn

**Funding projects:** Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-48)