

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20231006001

http://www.yykxjz.cn/

沈奕君, 朱奕安, 杨志华, 叶明慧, 周大颜, 李广丽, 田昌绪. 胡子鲇 qRT-PCR 内参基因的筛选. 渔业科学进展, 2024, 45(5): 144–154

SHEN Y J, ZHU Y A, YANG Z H, YE M H, ZHOU D Y, LI G L, TIAN C X. Screening for qRT-PCR internal reference genes in *Clarias fuscus*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(5): 144–154

胡子鲇 qRT-PCR 内参基因的筛选*

沈奕君^{1#} 朱奕安^{1#} 杨志华¹ 叶明慧¹
周大颜² 李广丽¹ 田昌绪^{1①}

(1. 广东海洋大学水产学院 广东省名特优鱼类生殖调控与繁育工程技术研究中心

广东省水产动物病害防控与健康养殖重点实验室 广东 湛江 524088;

2. 广西壮族自治区水产引种中心 广西 南宁 530001)

摘要 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是研究基因表达有效的工具之一, 选取合适的内参基因, 是获得可靠的基因表达结果的关键。本研究以胡子鲇 (*Clarias fuscus*) 为研究对象, 采用 qRT-PCR 技术检测了 13 个候选基因 (*actb1*、*actb2*、*ef1a*、*eef1b2*、*rpl13a*、*rpl13*、*ccdc124*、*cfl1*、*nm23*、*ef3g*、*rap1a*、*ikbkg* 和 *ywhab*) 在胡子鲇性腺不同发育阶段和成鱼不同组织中的基因表达情况, 并利用 BestKeeper、GeNorm、NormFinder 和 RefFinder 软件分析其表达稳定性, 以筛选在胡子鲇性腺发育和不同组织中稳定表达的内参基因。结果显示, 13 个候选内参基因的定量 PCR 引物均可获得特异性扩增产物。在性腺不同发育阶段, 候选基因表达稳定性顺序为 *actb2*>*rpl13*>*actb1*>*cfl1*>*rap1a*>*ef1a*>*rpl13a*>*ikbkg*>*ef3g*>*nm23*>*eef1b2*>*ywhab*>*ccdc124*, 成鱼不同组织中稳定性顺序为 *actb2*>*rpl13*>*cfl1*>*rap1a*>*ef1a*>*rpl13a*>*ikbkg*>*ef3g*>*nm23*>*actb1*>*eef1b2*>*ywhab*>*ccdc124*。随后, 选择稳定性前二的 *actb2* 和 *rpl13* 作为候选内参基因, 分析 *zp3*、*atp2b3*、*slc13a5* 和 *parp8* 基因在胡子鲇雌、雄性腺中的相对表达量, 结果进一步证实, 以 *actb2* 为内参时, 其雌雄性腺差异基因表达水平更接近于转录组结果。综合分析表明, *actb2* 基因可作为内参基因用于今后胡子鲇性腺不同发育时期和不同组织间功能基因表达特征的研究。

关键词 胡子鲇; qRT-PCR; 内参基因; 表达稳定性

中图分类号 S966 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2024)05-0144-11

胡子鲇 (*Clarias fuscus*), 隶属鲇形目 (Siluriformes)、胡子鲇科 (Clariidae)、胡子鲇属 (*Clarias*), 俗称塘虱鱼、土虱、角鱼, 该物种具有适应性强、营养价值高、肉质鲜嫩的特点, 是我国南方大面积养殖的淡水经济鱼类之一, 市场潜力巨大 (李广丽等, 2013a)。胡子鲇的

生长过程中存在明显的性别生长二态性, 在同等养殖条件下, 雄鱼的生长速度要远远高于雌鱼; 且存在雌鱼上市时性腺指数过高的问题, 导致同等规格的雄性个体更受青睐 (王文达等, 2012)。因此, 研究胡子鲇性腺分化与发育的分子调控机制, 具有重要的理论价

* 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515010733)、广东海洋大学本科生创新团队项目 (CXTD2023003)、国家级大学生创新创业训练计划 (202310566002) 和广西壮族自治区第二批农业科技自筹项目 (Z2019123) 共同资助。

共同第一作者: 沈奕君, Email: syjhaida@163.com; 朱奕安, Email: chuyian@126.com

① 通信作者: 田昌绪, Email: tiancx@gdou.edu.cn

收稿日期: 2023-10-06, 收修改稿日期: 2023-11-22

值和现实意义。研究人员对胡子鲇的形态学(程玮玮等, 2010)、生理学(王文达等, 2012; 李广丽等, 2013b; 赵莎莎等, 2014)、养殖学(吴莉芳等, 2010; 陈晓庆等, 2020)、遗传学(邓思平等, 2012b; 孙晶等, 2012)以及基因组学(林星桦等, 2023)等展开了研究, 为探究该物种的性别决定与分化相关基因的分子机制研究提供了良好的基础。

实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)实现了对基因从 PCR 定性检测到实时定量检测的突破, 因其具有较高的敏感性、准确性和特异性, 已成为当今研究基因表达的有效工具之一(苏晓燕等, 2022)。然而, 在鱼类的研究中, 许多变量会影响 qRT-PCR 结果的准确性, 如 RNA 质量、完整性、转录效率及参考基因的选择等。合适的标准化方法至关重要, 许多研究者使用稳定表达的内参基因来标准化靶基因的表达数据。在早期的研究中, 常以 *gapdh* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、18S rRNA (18S 小亚基单位核糖体核酸)、*RPL13* (核糖体蛋白 L13)等作为内参基因, 而随着技术的日益进步, 越来越多的实验证明, 内参基因的稳定性受到实验条件以及物种间种类的影响, 至今未发现适用于所有物种的内参基因, 因此, 寻找合适的内参基因至关重要(Yang *et al.*, 2020)。

目前, 在已有研究报道中, 研究者直接选取在其他物种已报道的 β -*actin* 基因作为胡子鲇内参基因开展基因表达分析(孙晶等, 2012; 李广丽等, 2013a), 尚未对内参基因在胡子鲇性腺发育和不同组织中的表达稳定性和准确性进行系统评估。因此, 本实验以胡子鲇为研究对象, 结合两种方式挑选候选基因: 一是来源于已经发表的其他相近物种内参基因, 二是来源于实验室胡子鲇性腺不同发育时期转录组中稳定表达的候选基因。本研究共筛选出 13 个内参候选基因, 利用 BestKeeper、GeNorm、NormFinder 和 RefFinder 软件从 13 个候选内参基因中挑选适合作为胡子鲇性腺不同发育阶段和成鱼不同组织 qRT-PCR 的内参基因, 以期为后续功能基因的研究提供稳定可靠的内参基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胡子鲇样品取自广东海洋大学淡水养殖实验基地。经过 MS-222 麻醉后, 分别取 II、III、IV 期精巢和 II、III、IV 期卵巢; 同时, 取性成熟脑、肌肉、皮肤、精巢、卵巢、头肾、肝脏、脾脏、肾脏、肠、心脏、胃和鳃等 13 个组织。每个样品进行 3 个技术重复, 统一收集组织-80 °C 保存, 用于后续 RNA 提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

TRIZOL 法提取上述胡子鲇成鱼不同组织和不同性腺发育时期(II、III 和 IV 期)的总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳评估总 RNA 完整性, 并使用 NanoDrop2000C (Thermo Scientific)测定总 RNA 浓度和纯度, 总 RNA 的 260 nm/280 nm 处的吸光度比值均在 1.8~2.1 之间的样品用于后续实验。使用耐高温全预混第一链 cDNA 合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司), 将总 RNA 反转录成 cDNA, 等量混合所有组织 cDNA 模板。将 cDNA 样品放置于-20 °C 冰箱保存备用。

1.3 引物设计

本研究从其他物种已知内参基因和实验室转录组文库中挑选了 13 个候选内参基因, 其中, 6 个基因来源于已发表的其他相近物种内参基因: 肌动蛋白 $\beta 1$ (actin beta 1, *actb1*)、肌动蛋白 $\beta 2$ (actin beta 2, *actb2*)、真核翻译延长因子 1 $\alpha 1$ (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, *e1a*)、真核翻译延长因子 1 $\beta 1$ (eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2, *eef1b2*)、核糖体蛋白 L13a (ribosomal protein L13a, *rpl13a*)、核糖体蛋白 L13 (ribosomal protein L13, *rpl13*) (Huggett *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; 张宁等, 2018), 7 个基因来源于实验室胡子鲇性腺不同发育时期转录组(登录号: CRA008348)中稳定表达的候选基因: 卷曲螺旋结构域蛋白 124 (coiled-coil domain containing 124, *ccdc124*)、丝切蛋白(cofilin 1, *cfl1*)、核苷二磷酸激酶 3 (nucleoside diphosphate kinase 3, *nm23*)、真核翻译起始因子 3 亚基 G (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G, *ef3g*)、RAS 相关蛋白-1a (RAS-related protein-1a, *rap1a*)、核因子 κ B 激酶调节亚基 γ 抑制剂 (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase regulatory subunit gamma, *ikbkg*)和酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶活化蛋白 β (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein beta, *ywhab*)。在胡子鲇基因组(Tian *et al.*, 2023)中分别获取上述 13 个候选基因的目的序列, 遵循 qRT-PCR 引物设计的原则, 采用 Primer Premier 6.0 设计出 13 对荧光定量特异引物(表 1), 由广州生工生物科技有限公司合成。

1.4 候选内参基因 qRT-PCR 扩增

使用 LightCycler480 实时定量 PCR 仪, 按照染料法荧光定量预混试剂盒进行 PCR 扩增。以胡子鲇不同时期性腺组织样品逆转录得到的 cDNA 混合液为模板, 以所得的 13 对引物进行 qRT-PCR。qRT-PCR

表 1 候选内参基因引物
Tab.1 Candidate internal reference gene primer

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'~3')	产物长度 Product size/bp	退火温度 $T_m/^{\circ}\text{C}$	扩增效率 Amplification efficiency/%
<i>actb1</i>	F: AGGCTGGATTTCGCTGGAGATGAT R: TGGTGACAATACCGTGCTCAATGG	180	60	113.52
<i>actb2</i>	F: TGAAGGACATCCGCCGTGGTAA R: GGCAATGTGAGCAGTGTGACAGT	158	60	113.70
<i>ef1a</i>	F: GTCGTCTCGCCGCTATTGTGT R: CCTCTTACGCAGGAAAGCCAAGT	134	60	110.06
<i>ee1b2</i>	F: TCTGTATGCCAACACTGTGCTGTC R: ACATCTGCTGGAAGGTGGAGAGG	191	60	344.52
<i>rpl13a</i>	F: ACCATCGGCATCGCTGTTGAC R: TATCTCCTCCACAGTGTCTCTCC	156	60	104.39
<i>rpl13</i>	F: CAACAAGAGGAGGAGGATGACGAT R: AGAAGGATGGAGGATTTGGCGATT	152	60	108.19
<i>ccdc12</i> 4	F: AGCAGAGGAAGGATGAGAAGGAGA R: TCTGAGCCCGTGTCACTTTGTTC	144	60	273.85
<i>cfl1</i>	F: TGTCCAGATGCTGCCGCCTAA R: ACTTGCCACTCGTGCTTGATACC	198	60	113.52
<i>nm23</i>	F: AGTTCTTGCAAGCGTCTGAGGA R: GGTCGTCTCTCCAGCATCAC	171	60	340.64
<i>ef3g</i>	F: TCCTTGACACAGCAGGCACAGA R: CCACCAGAATCATCGGCACATCTT	180	60	414.40
<i>rap1a</i>	F: GCTGATGACAATGCTACGATCCG R: ACACTCCTGCGATGGCTCTG	199	60	108.18
<i>ikbkg</i>	F: CAACCTGCCAATCCTCGCCAAG R: CTCGCCTTCATCTCAGCACAGAA	156	60	297.93
<i>ywhab</i>	F: CCGTTCTTCCTGGCGTGTGTCATC R: TCTTGCAGCTCAGTCTCGATCTTG	111	60	282.61

体系(10 μL): 2 $\times$ PerfectStart Green qPCR SuperMix 5 μL 、Nuclease-free 水 3 μL 、cDNA 模板 1 μL 、正反向引物各 0.5 μL 。qRT-PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 45 个循环; 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物经克隆测序后, 用 DNASTAR-Lasergene v6 软件分析测序结果, 将不同组织的 cDNA 稀释 10 倍, 各取等体积混合, 连续 4 倍稀释 7 次, 得到 8 个不同梯度的 cDNA, 并以此为模板, 用罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量仪对候选内参基因进行标准曲线扩增。反应体系: 2 $\times$ SYBR PreMix Ex Taq (TliRNaseH Plus) 8 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , cDNA 1 μL ; 反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ 120 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环, 收集荧光信号; 熔解曲线 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。根据标准曲线结果, 将所有组织 cDNA 稀释 200 倍, 对所有基因进行 qRT-PCR

扩增, 每个样品重复 3 次, 反应体系及条件同上。

1.5 实验数据处理和分析

根据 4 种不同的算法(BestKeeper、NormFinder、geNorm 和 RefFinder 模型)预测内参基因的表达稳定性。BestKeeper 根据 C_t 值的变异系数(CV)和标准差(SD)评估内参基因的表达稳定性(Pfaffl *et al*, 2004)。对于 NormFinder 和 geNorm, 利用公式 $Q=2^{C_{qmin}-C_{qsample}}$ 计算得到 Q 值(C_{qmin} 为基因在样品中的最小 C_q 值; $C_{qsample}$ 为基因在相关样品中的 C_q 值)。NormFinder 引入一个 ANOV 导向模型来计算 Q 值组内和组间变异, 并根据稳定值(SV)对内参基因进行排序(Andersen *et al*, 2004)。geNorm 通过计算内参基因相对于同一分析中包含的所有其他基因的平均成对变异值, 来确定基因表达稳定性指数 M 。综合分析工具 RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/for-researchers/>), 根据

几何平均值(GM)对内参基因的稳定性进行分析, 对 13 个候选内参基因的稳定性进行评估, 从而筛选出在胡子鲇性腺不同发育阶段和成鱼不同组织中表达相对稳定的内参基因。

1.6 内参基因稳定性的验证

为进一步验证候选内参基因的稳定性, 选取稳定性分析结果前二的基因作为候选内参基因, 随机挑选胡子鲇不同发育时期性腺转录组中 4 个差异表达基因(*zp3*、*atp2b3*、*slc13a5* 和 *parp8*), 通过 qRT-PCR 检测其表达水平, 并与转录组差异基因结果进行对比, 以评估差异表达量的准确性。

2 结果

2.1 定量引物质量检测

候选内参基因引物 PCR 扩增后, 均可获得单一的 PCR 产物, 无引物二聚体和非特异性扩增(图 1), 扩增效果良好。qRT-PCR 定量实验标准曲线分析显示, 其相关系数 R^2 值为 0.83~1.00 (不同组织)、0.88~1.00 (不同时期性腺)(表 2), 符合 qRT-PCR 实验对引物的要求。进一步分析 13 个候选内参基因的熔解曲线, 峰值(T_m)均为单一值, 扩增曲线重复性好, 引物特异性高(图 2), qRT-PCR 结果准确可靠, 可用于表达稳定性分析。

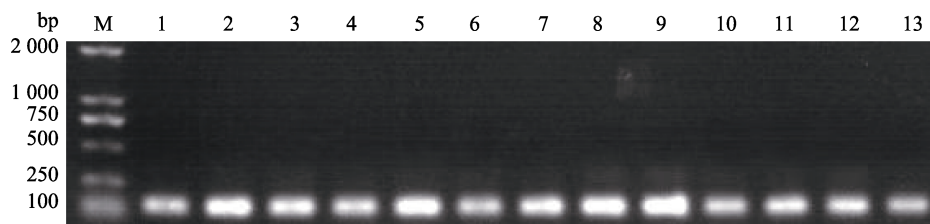


图 1 13 个候选内参基因 PCR 扩增产物
Fig.1 PCR amplification products by 13 candidate internal reference genes

M: DL 2000 DNA Marker; 1: *actb1*; 2: *actb2*; 3: *efla*; 4: *rpl13a*; 5: *rpl13*; 6: *eef1b2*; 7: *ccdc124*; 8: *cfl1*; 9: *nm23*; 10: *rap1a*; 11: *EIF3G*; 12: *ikbkg*; 13: *ywhab*

表 2 13 个候选内参基因验证结果
Tab.2 Verification results of 13 candidate internal reference genes

基因 Gene	不同组织相关系数 Correlation coefficient of different tissues R^2	不同时期性腺相关系数 Correlation coefficient of different stages of gonadal development R^2	不同组织 C_t 值 C_t values of different tissues	不同时期性腺 C_t 值 C_t values of different stages of gonadal development
<i>actb1</i>	0.90	1.00	20.86	18.22
<i>actb2</i>	1.00	1.00	17.16	16.68
<i>efla</i>	0.99	0.99	19.22	19.59
<i>eef1b2</i>	0.90	0.97	20.94	20.53
<i>rpl13a</i>	0.99	0.99	19.34	19.91
<i>rpl13</i>	0.99	1.00	17.49	18.10
<i>ccdc124</i>	0.83	0.96	21.28	21.54
<i>cfl1</i>	0.99	0.99	17.93	18.79
<i>nm23</i>	0.91	0.99	20.49	20.23
<i>EIF3G</i>	0.92	0.99	20.14	20.11
<i>rap1a</i>	0.99	0.99	18.77	19.33
<i>ikbkg</i>	0.95	0.99	19.60	20.03
<i>ywhab</i>	0.89	0.88	20.99	21.13

2.2 内参基因表达丰度

qRT-PCR 的 C_t 值可直接反映基因的表达丰度, C_t 值的大小与基因表达的丰度呈负相关。如表 2 所示,

所有 13 个内参基因在不同组织中的平均 C_t 值为 17.16~21.28, 在雌雄不同时期性腺的 C_t 值为 16.68~21.54。其中, *actb2* 的 C_t 值在不同组织与雌雄不同时期性腺中均最小, 说明该基因的表达丰度最高。

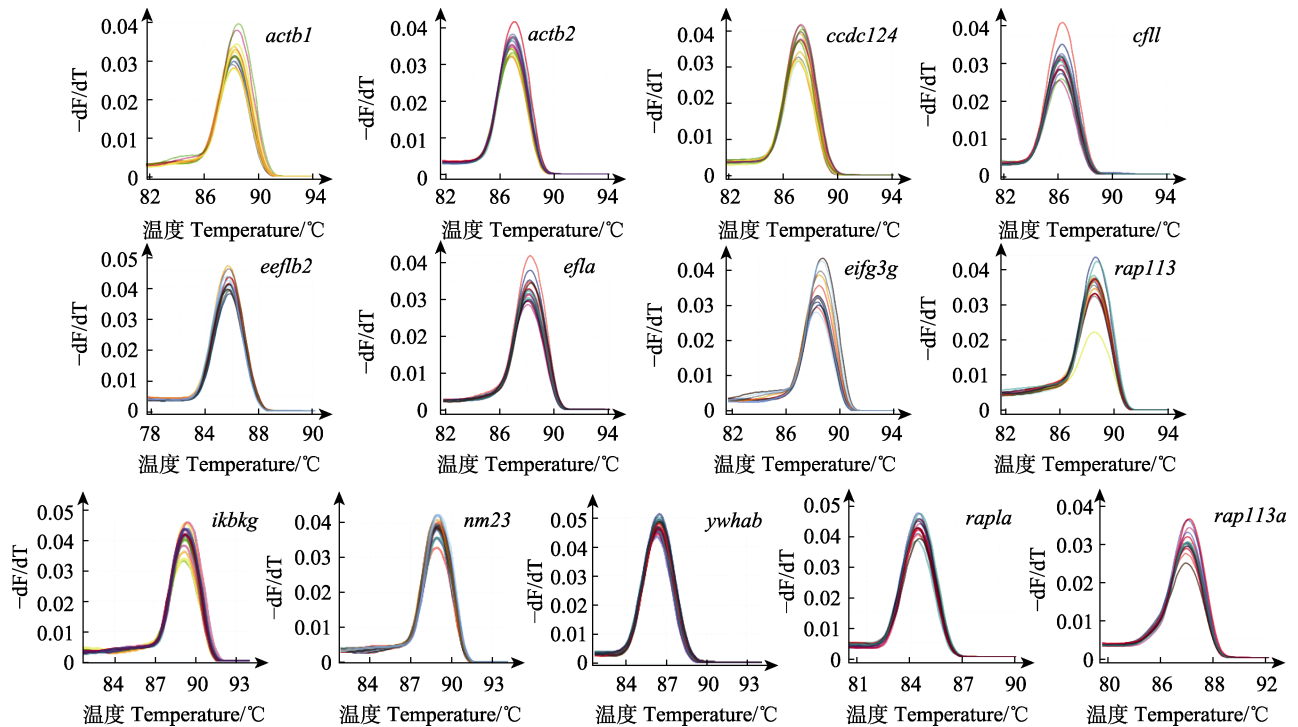


图 2 13 个候选内参基因熔解曲线分析

Fig.2 Melting curve analysis of 13 candidate internal reference genes

2.3 候选内参基因稳定性分析

2.3.1 Bestkeeper 软件分析结果 BestKeeper 分析结果如图 3 所示。在胡子鲇成鱼不同组织中，基因稳定性依次为 *actb1* (SD=0.08; CV=3.84) > *actb2* (SD=0.13; CV=1.73) = *efla* (SD=0.13; CV=2.59) > *rpl13* (SD=0.16; CV=1.97) > *ywhab* (SD=0.22; CV=6.00) > *eef1b2* (SD=1.76; CV=5.66) > *rpl13a* (SD=1.90; CV=2.83) > *nm23* (SD=1.91; CV=3.64) > *eif3g* (SD=1.92; CV=3.46) > *ccdc124* (SD=2.07; CV=6.09) > *rapla* (SD=2.11; CV=2.38) > *cfl* (SD=2.14; CV=2.11) > *ikbkg* (SD=2.66; CV=3.13)。 *actb1*、*actb2*、*efla*、*rpl13* 和 *ywhab* 5 个基因的 SD 值小于 1.0，说明上述基因在 13 个不同组织中表达较为稳定。

在胡子鲇雌雄性腺不同发育时期中，基因稳定性依次为 *actb2* (SD=0.01; CV=1.73) > *rpl13* (SD=0.07; CV=1.97) > *efla* (SD=0.09; CV=2.67) > *rpl13a* (SD=0.09; CV=3.01) > *actb1* (SD=0.10; CV=2.01) > *ywhab* (SD=0.24; CV=5.78) > *cfl* (SD=0.79; CV=2.35) > *rapla* (SD=0.86; CV=2.49) > *eef1b2* (SD=0.95; CV=5.51) > *eif3g* (SD=0.98; CV=3.56) > *ccdc124* (SD=1.00; CV=5.90) > *ikbkg* (SD=1.01; CV=3.23) > *nm23* (SD=1.04; CV=3.70)。有 10 个基因的 SD 值小于 1.0，说明 *actb2*、*rpl13*、*efla*、*rpl13a*、*actb1*、*ywhab*、*cfl*、*rapla*、*eef1b2* 和 *eif3g* 基因在雌雄性腺不同发育时期中表达稳定。

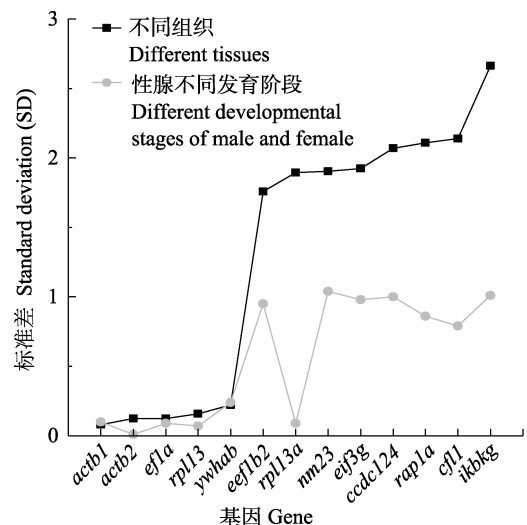


图 3 BestKeeper 分析不同组织和雌雄性腺不同发育时期的候选内参基因表达稳定值

Fig.3 BestKeeper analysis of the expression stability of candidate reference genes in different tissues and different developmental stages of male and female gonads

2.3.2 NormFinder 软件分析结果 NormFinder 软件分析结果如图 4 所示，在胡子鲇成鱼不同组织中，13 个候选内参基因的稳定性依次为 *actb2* (SV=0.04) = *rpl13* (SV=0.04) > *actb1* (SV=0.17) > *rpl13a* (SV=0.32) > *ywhab* (SV=0.37) > *nm23* (SV=0.47) > *rapla* (SV=0.47) > *cfl* (SV=0.47) > *eif3g* (SV=0.62) > *efla* (SV=0.65) > *ccdc124* (SV=0.71) > *ikbkg* (SV=0.73) > *eef1b2* (SV=0.84)。

雌雄性腺不同发育时期中, 13 个候选内参基因稳定性依次为 *actb2* (SV=0.04) = *actb1* (SV=0.04) > *rpl13* (SV=0.07) > *ef1a* (SV=0.12) > *rpl13a* (SV=0.22) > *cfl1* (SV=0.31) > *ywhab* (SV=0.37) > *rap1a* (SV=0.47) > *nm23* (SV=0.47) > *ef3g* (SV=0.62) > *ccdc124* (SV=0.71) > *ikbkg* (SV=0.73) > *eef1b2* (SV=0.75)。其中, *actb2*、*rpl13* 基因与 *actb2*、*actb1* 基因的 SV 值分别在成鱼不同组织与雌雄性腺不同发育时期中比其他基因的 SV 值低, 即稳定性比其他基因强, 同时可观察到 *eef1b2* 基因的稳定性最差。

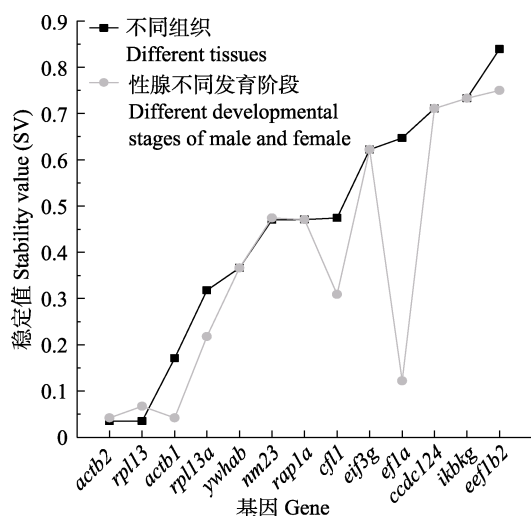


图 4 NormFinder 分析不同组织和雌雄性腺不同发育时期的候选内参基因表达稳定值

Fig.4 NormFinder analysis of the expression stability of candidate reference genes in different tissues and different developmental stages of male and female gonads

2.3.3 geNorm 分析结果 在胡子鲇成鱼不同组织中, 13 个候选内参基因的稳定性如图 5 所示, 依次为 *actb2* ($M=0.07$) = *rpl13* ($M=0.07$) > *rpl13a* ($M=0.17$) > *actb1* ($M=0.26$) > *ef1a* ($M=0.39$) > *ccdc124* ($M=0.47$) > *ywhab* ($M=0.50$) > *rap1a* ($M=0.64$) > *ef3g* ($M=0.72$) > *nm23* ($M=0.76$) > *eef1b2* ($M=0.80$) > *ikbkg* ($M=0.84$) > *cfl1* ($M=0.89$), 其中, *actb2* 和 *rpl13* 基因的 M 值最小, 其基因稳定性最高, 其次为 *rpl13a*、*actb1* 和 *ef1a*, *cfl1* 基因稳定性最差。

雌雄性腺不同发育时期中 13 个候选内参基因的稳定性依次为 *actb1* ($M=0.08$) = *rpl13* ($M=0.08$) > *actb2* ($M=0.10$) > *ef1a* ($M=0.13$) > *rpl13a* ($M=0.16$) > *cfl1* ($M=0.21$) > *ywhab* ($M=0.47$) = *ccdc124* ($M=0.47$) > *rap1a* ($M=0.64$) > *ef3g* ($M=0.72$) > *nm23* ($M=0.76$) > *eef1b2* ($M=0.80$) > *ikbkg* ($M=0.84$), 其中, *actb1* 和 *rpl13* 基因的 M 值最小, 其基因稳定性最高, 其次为 *actb2*、*ef1a* 和 *rpl13a*, *ikbkg* 基因稳定性最差。

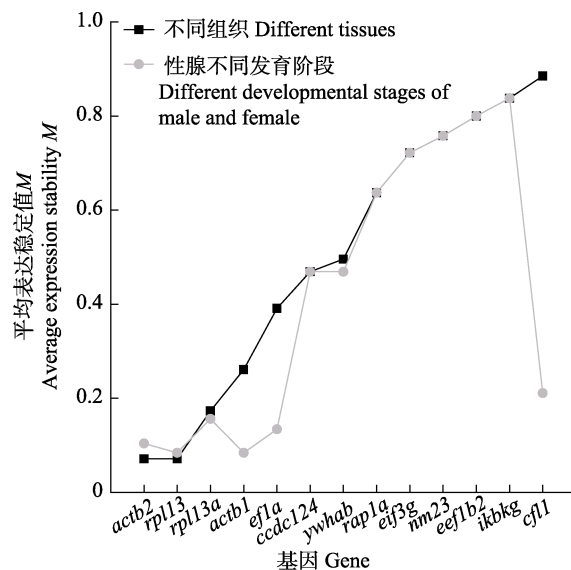


图 5 GeNorm 分析不同组织和雌雄性腺不同发育时期的候选内参基因表达稳定值

Fig.5 GeNorm analysis of the expression stability of candidate reference genes in different tissues and different developmental stages of male and female gonads

2.4 RefFinder 分析

使用 RefFinder 对 Bestkeeper、geNorm、NormFinder 3 种模型进行整合分析, 综合比较和排名内参基因的表达稳定性(Xie *et al*, 2011)。RefFinder 分析结果如图 6 所示, 在胡子鲇成鱼不同组织中各基因的稳定性依次为 *actb2* ($GM=1.73$) > *rpl13* ($GM=1.97$) > *cfl1* ($GM=2.11$) > *rap1a* ($GM=2.38$) > *ef1a* ($GM=2.59$) > *rpl13a* ($GM=2.83$) > *ikbkg* ($GM=3.13$) > *ef3g* ($GM=3.46$) > *nm23* ($GM=3.64$) > *actb1* ($GM=3.84$) > *eef1b2* ($GM=5.66$)

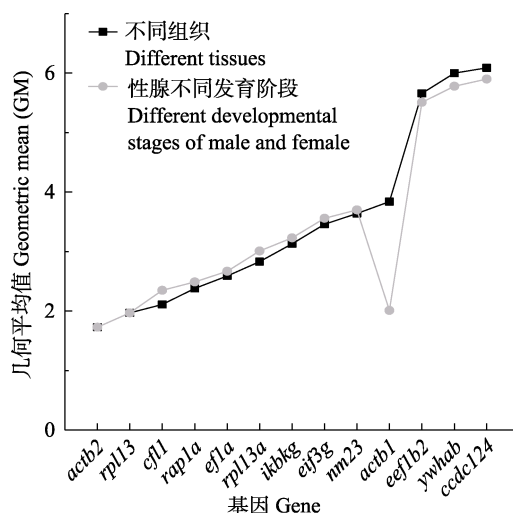


图 6 RefFinder 分析不同组织和雌雄性腺不同发育时期的候选内参基因表达几何平均值

Fig.6 RefFinder analysis of geometric means of candidate endogenous gene expression in different tissues and at different developmental periods in male and female gonads

>ywhab (GM=6.00) >ccdc124 (GM=6.09), *actb2* 的表达稳定性最好。在胡子鲇雌雄性腺不同发育时期各基因的稳定性为 *actb2* (GM=1.73) > *rpl13* (GM=1.97) > *actb1* (GM=2.01) > *cf11* (GM=2.35) > *rap1a* (GM=2.49) > *ef1a* (GM=2.67) > *rpl13a* (GM=3.01) > *ikbkg* (GM=3.23) > *eif3g* (GM=3.56) > *nm23* (GM=3.70) > *eef1b2* (GM=5.51) > *ywhab* (GM=5.78) > *ccdc124* (GM=5.90), *actb2* 表达稳定性最好。

2.5 内参基因稳定性的验证

为进一步验证 4 种分析软件对结果的准确性,以 *actb2* 和 *rpl13* 作为内参基因分析 *zp3*、*atp2b3*、*slc13a5* 和 *papr8* 四个差异表达基因在雌、雄性腺中的相对表达量(图 7)。结果显示,以 *actb2* 基因作为内参基因获得的差异倍数更接近于转录组分析结果,说明 *actb2* 相比于 *rpl13* 更稳定,更适于作为胡子鲇性腺不同发育阶段和成鱼不同组织的内参基因。

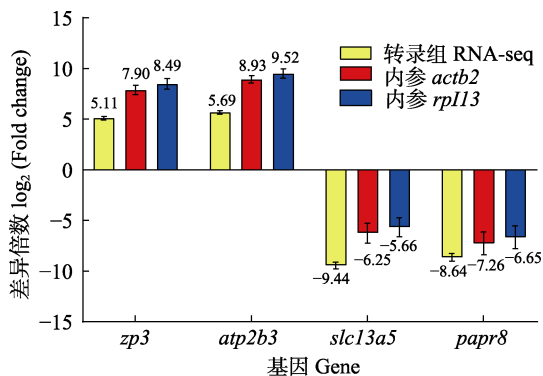


图 7 不同内参基因分析 4 种不同基因在性腺组织中的相对表达水平

Fig.7 Relative expression levels of 4 different genes in gonadal tissues analyzed by different internal reference genes

3 讨论

3.1 qRT-PCR 内参基因筛选的意义

当前, qRT-PCR 是研究基因调控机制的重要方法,是准确测定基因表达量的首选方法(Forlenza *et al.*, 2012; Gadkar *et al.*, 2014)。在基因表达分析中,通常会使用合适的内参基因对实验数据进行校对,以确保实验结果的可信程度(Dhedra *et al.*, 2005)。理想的内参基因应满足:在不同的组织中表达水平中等或较高,不是过高或过低;在不同组织或者不同时间表达基本一致;表达水平不受内源性因素或外源性因素影响(Schmid *et al.*, 2003)。并不是所有物种都适用同一套内参基因(Yang *et al.*, 2020),如:在大西洋鲑(*Salmo salar*) (Olsvik *et al.*, 2005)、斑马鱼(*Danio rerio*) (McCurley *et al.*, 2008)、黄鳝(*Monopterus albus*) (Hu *et al.*, 2014)以及黄

带拟鲈(*Pseudocaranx dentex*) (李杰峰等, 2023)中,不同组织间最为稳定表达的内参基因为 *EF-1a*;而在多鳞鱖(*Sillago sihama*)的不同组织中, *EF-1a* 并不适合作为不同组织间的内参基因(张宁等, 2018)。此外,管家基因 18S rRNA 也经常被用作内参基因,如青鳉(*Oryzias latipes*) (Zhang *et al.*, 2007)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (Su *et al.*, 2011)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (罗双双等, 2019)。因此,对于特定的研究对象,需要筛选特定生理状态和实验条件下的可靠内参基因,以确保基因功能分析的准确性。

3.2 内参基因的表达丰度与稳定性评价

理想的内参基因表达丰度应在 15~30 之间(Wan *et al.*, 2011),过高或过低的 C_t 值会使 qRT-PCR 数据分析时很难准确减去基线值(Vandesompele *et al.*, 2002),而本研究所使用的 13 个候选内参基因的 C_t 值均在理想的 C_t 值范围内,可以作为候选内参基因进行实验研究。

基于上述结论,本研究采用了 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对 13 个候选内参基因在胡子鲇性腺不同发育阶段和成鱼不同组织的表达稳定性进行评估,结果显示,上述候选基因的表达稳定性排序各不相同。以 *ef1a* 基因为例,该基因作为多数鱼类的内参基因,在胡子鲇成鱼不同组织中的稳定性基于不同软件的分析评价结果有较大的差异,基于 BestKeeper 和 GeNorm 软件的结果显示 *ef1a* 基因较为稳定,而 NormFinder 软件的结果显示其稳定性较差,这可能是由于不同软件采用了不同的统计模型所致(Ward *et al.*, 2015),这种现象也在方格星虫(*Sipunculus nudus*) (彭冰冰等, 2022)、多鳞鱖(张宁等, 2018)等的实验结果中出现。因此,为了减少统计模型差异造成的误差,通常使用 RefFinder 综合评估上述 3 个软件的排序结果,以获得最终的稳定性排序(胡秀芹等, 2023)。

本研究基于 RefFinder 综合评估发现, *actb2* 基因在胡子鲇性腺发育不同阶段和成鱼不同组织中表达最为稳定,可作为后续研究胡子鲇分子表达调控的内参基因。本研究 *actb2* 基因在不同组织使用 NormFinder 软件分析得到的 SV 值为 0.35,与青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*) (刘思嘉等, 2023)的研究结果接近;相比达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)不同性腺发育时期 β -*actb* 基因的 GM 值区间在 2~4 (武梦斌等, 2020),本研究使用 RefFinder 分析 *actb2* 基因的 GM 更低,即表达稳定性更高,且表达丰度适中,符合理想内参基因条件(朱芷葳等, 2006)。为了进一步验证 4 个软件对于预测结果的准确性,本研究以 *actb2*

与 *rpl13* 为内参基因, 挑选了 4 个基因研究在雌、雄性腺中的相对表达量, 实验结果进一步证实 *actb2* 的结果更靠近转录组, 是适合胡子鲇不同性腺发育时期的内参基因。

肌动蛋白(actin)是一种高度保守的蛋白, 其基因也具有高度保守性, 富含于许多细胞之中, 尤其在肌肉细胞中含量较高, 对于细胞的结构以及运动有着重要的影响, 因此, 肌动蛋白家族的基因是在 qRT-PCR 实验中使用频率较高的内参基因家族, 尤以 *actb1* 基因为主(Huggett *et al*, 2005)。本研究所获得的内参基因 *actb2*, 属于 β -肌动蛋白的异构体之一, 鉴于其自身的性质, 符合作为内参基因的要求。目前, 使用 *actb2* 作为内参基因已在斑马鱼中有相关研究报道, 斑马鱼 6 个不同胚胎发育阶段和 6 个成年个体的组织中, *actb2* 表达变异性较低, 适合作为斑马鱼的内参基因(Casadei *et al*, 2011); 但由于肌动蛋白是一个庞大的基因家族, *actb2* 与 *actb1* 具有较高的同源性, 为 89%, 目前设计其特异性引物较为困难(Sun *et al*, 2012), 因此, 是否能广泛地作为其他物种的内参基因仍待进一步研究。

4 结论

本研究采用 qRT-PCR 技术, 利用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 等软件对胡子鲇 13 个候选基因进行表达稳定性分析, 以筛选在胡子鲇不同性腺发育时期及成鱼不同组织中稳定表达的内参基因。结果表明, 在胡子鲇性腺发育不同阶段和成鱼不同组织, *actb2* 表达最稳定, 可作为胡子鲇性腺发育不同阶段和成鱼不同组织 qRT-PCR 分析的最适单内参基因, 研究结果为后续开展胡子鲇分子生物学的研究提供了数据支撑和基础资料。

参 考 文 献

- ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT 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. *Cancer Research*, 2004, 64(15): 5245–5250
- CASADEI R, PELLERI M C, VITALE L, *et al*. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(3/4): 271–276
- CHEN X J, ZHANG X Q, HUANG S, *et al*. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR on gene expression in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Polish Journal Veterinary Sciences*, 2017, 20(3): 583–594
- CHEN X Q, ZHANG Y, TAN J H, *et al*. Effect of flocs concentration on the performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) in bioflocs aquaculture systems. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(7): 779–788 [陈晓庆, 张扬, 谭竞宏, 等. 絮团浓度对革胡子鲇零换水养殖效果的影响. *中国水产科学*, 2020, 27(7): 779–788]
- CHENG W W, FANG Q. Study on morphological variations *Silurus meridionalis* and *Clarias lazera*. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2010, 16(9): 194–195 [程玮玮, 方遵. 大口鲇和革胡子鲇形态特征研究. *安徽农学通报(上半月刊)*, 2010, 16(9): 194–195]
- DENG S P, WANG J J, WU T L, *et al*. cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012a, 36(4): 610–617 [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析. *水生生物学报*, 2012a, 36(4): 610–617]
- DENG S P, ZHANG Y Y, ZHU C H, *et al*. Analysis on genetic structure of three cultured populations *Claris fuscus* with AFLP markers. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012b, 32(3): 24–28 [邓思平, 张艳艳, 朱春华, 等. 胡子鲇 3 个养殖群体遗传结构的 AFLP 分析. *广东海洋大学学报*, 2012b, 32(3): 24–28]
- DHEDA K, HUGGETT J F, CHANG J S, *et al*. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry*, 2005, 344(1): 141–143
- FORLENZA M, KAISER T, SAVELKOUL H F J, *et al*. The use of real-time quantitative PCR for the analysis of cytokine mRNA levels. *Cytokine Protocols*. Totowa: Humana Press, 2012, 820: 7–23
- GADKAR V Y, FILION M. New developments in quantitative real-time polymerase chain reaction technology. *Current Issues in Molecular Biology*, 2014, 16: 1–6
- 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. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(6): 1721–1730
- HU X Q, WANG J H, SONG H, *et al*. Screening of internal reference genes in flower bud and different organs during sex differentiation of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. *Molecular Plant Breeding*, 2023: 1–10 [胡秀芹, 王婧华, 宋晗, 等. 栝楼性别分化期花芽及不同器官内参基因的筛选. *分子植物育种*, 2023: 1–10]
- HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, *et al*. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4): 279–284
- LI G L, DENG S P, SUN J, *et al*. Effects of aromatase inhibitor letrozole on sex differentiation and related gene expression in *Clarias fuscus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013a, 20(5): 911–917 [李广丽, 邓思平, 孙晶, 等. 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲇性腺分化及相关基因表达的

- 影响. 中国水产科学, 2013a, 20(5): 911–917]
- LI G L, DENG S P, WANG W D, *et al.* Effects of sex steroid hormones on sex differentiation of *Clarias fuscus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013b, 37(6): 1020–1027 [李广丽, 邓思平, 王文达, 等. 性类固醇激素对胡子鲶性分化的影响. 水生生物学报, 2013b, 37(6): 1020–1027]
- LI J F, WANG H, LI B S, *et al.* Screening and evaluating reference genes for quantitative real-time PCR in striped Jack (*Pseudocaranx dentex*). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(6): 107–115 [李杰峰, 王焕, 李步苏, 等. 黄带拟鲷 qRT-PCR 内参基因筛选及验证. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 107–115]
- LIN X H, ZHOU D Y, SHEN Y J, *et al.* The genome survey analysis of male and female Hongkong catfish (*Clarias fuscus*). *Genomics and Applied Biology*, 2023, 42(6): 610–619 [林星桦, 周大颜, 沈奕君, 等. 胡子鲶(*Clarias fuscus*)雌雄基因组 Survey 分析. 基因组学与应用生物学, 2023, 42(6): 610–619]
- LIU S J, QI D L, QI H F, *et al.* Selection and validation of reference genes in *Gymnocypris przewalskii* by quantitative real-time PCR. *Fisheries Science*, 2023, 42(3): 413–423 [刘思嘉, 祁得林, 祁洪芳, 等. 青海湖裸鲤实时荧光定量 PCR 内参基因筛选与验证. 水产科学, 2023, 42(3): 413–423]
- LUO S S, GAO Z X, FENG B, *et al.* Preferential selection of internal reference genes in qRT-PCR analysis of diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *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. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 1–8]
- 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. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9(1): 102
- 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. *BMC Molecular Biology*, 2005, 6: 21
- PENG B B, BING D C, ZHOU Y N, *et al.* Selection of reference genes for real-time quantitative PCR of peanut worm *Sipuculus nudus*. *Fisheries Science*, 2022, 41(2): 304–310 [彭冰冰, 宾东超, 周于娜, 等. 方格星虫实时荧光定量 PCR 内参基因的选择与验证. 水产科学, 2022, 41(2): 304–310]
- 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. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509–515
- SCHMID H, COHEN C D, HENGER A, *et al.* Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 2003, 64(1): 356–360
- 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*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(3): 830–835
- SU X Y, HAN B Y, MENG Y Q, *et al.* Stability of reference genes in different tissues of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by quantitative real-time PCR. *Fisheries Science*, 2022, 41(1): 35–43 [苏晓燕, 韩步鹰, 孟玉琼, 等. 三倍体虹鳟实时荧光定量 PCR 内参基因稳定性分析. 水产科学, 2022, 41(1): 35–43]
- SUN J, LI G L, ZHU C H, *et al.* Molecular cloning and expression of *Cyp19a1b* cDNA in *Clarias fuscus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 408–415 [孙晶, 李广丽, 朱春华, 等. 胡子鲶脑型芳香化酶基因全长 cDNA 克隆及表达. 中国水产科学, 2012, 19(3): 408–415]
- SUN Y, LI Y, LUO D, *et al.* Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *Public Library of Science One*, 2012; 7(8): e41659
- TIAN C X, LIN X H, ZHOU D Y, *et al.* A chromosome-level genome assembly of Hongkong catfish (*Clarias fuscus*) uncovers a sex-determining region. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 291
- 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. *Genome Biology*, 2002, 3(7): 0034
- WARD D S, DERN-WIELOCH J, WEIGEL R, *et al.* Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122515
- WAN H, YUAN W, RUAN M, *et al.* Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 416(1/2): 24–30
- WANG W D, ZHU C H, DENG S P, *et al.* Occurrence and differentiation of gonad in *Clarias fuscus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(5): 993–997 [王文达, 朱春华, 邓思平, 等. 胡子鲶性腺发生与分化组织学研究. 水生生物学报, 2012, 36(5): 993–997]
- WANG Y F, ZHANG S C. EF-1 α is a useful internal reference for studies of gene expression regulation in amphioxus *Branchiostoma japonicum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1068–1073
- WU L F, QIN G X, SUN Z W, *et al.* Effect of dietary dehulled soybean meal replacing fish meal on the activity of digestive enzyme and the intestinal tissue of *Clarias lazera*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2010, 49(4): 99–105 [吴莉芳, 秦贵信, 孙泽威, 等. 饲料中去皮豆粕替代鱼粉对埃及胡子鲶消化酶活力和肠道组织的影响. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 49(4): 99–105]
- WU M B, YE H, YUE H M, *et al.* Identification of reference

- genes for qRT-PCR in Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(7): 759–770 [武梦斌, 叶欢, 岳华梅, 等. 达氏鲟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. 中国水产科学, 2020, 27(7): 759–770]
- 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. Public Library of Science One, 2011, 6(11): e26980
- YANG C L, YUAN X Y, ZHANG J, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of reference genes for fruit development of *Euscaphis konishii*. PeerJ, 2020, 8: e8474
- ZHANG C N, SAMAD R, LU K L, *et al.* Molecular characterization of p38 MAPK from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and its expression after ammonia stress, and lipopolysaccharide and bacterial challenge. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 84: 848–856
- ZHANG N, DU W W, WANG Z D, *et al.* Screening of reference genes for real-time PCR in different tissues from *Sillago sihama*. Journal of Guangdong Ocean University, 2018, 38(5): 8–14 [张宁, 杜文文, 王中铎, 等. 多鳞鲈不同组织荧光定量 PCR 内参基因筛选. 广东海洋大学学报, 2018, 38(5): 8–14]
- 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. Toxicological Sciences, 2007, 95(2): 356–368
- ZHAO S S, DING L J. Composition, microscopy and ultrastructure of peripheral blood cells in *Clarias fuscus*. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(10): 220–223 [赵莎莎, 丁丽军. 胡子鲇外周血细胞的组成及显微与超微结构. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 220–223]
- ZHU Z R, DONG C S. The stability comparison of housekeeping genes as internal standards. Letters in Biotechnology, 2006, 17(5): 807–809 [朱芷葳, 董常生. 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 807–809]

(编辑 冯小花)

Screening for qRT-PCR Internal Reference Genes in *Clarias fuscus*

SHEN Yijun^{1#}, ZHU Yian^{1#}, YANG Zhihua¹, YE Minghui¹,
ZHOU Dayan², LI Guangli¹, TIAN Changxu^{1①}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Disease Control and Healthy Culture, Guangdong Research Center on Reproductive Control and Breeding Technology of Indigenous Valuable Fish Species, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Aquatic Cultivation and Breeding Centre of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001, China)

Abstract Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) is one of the most widely used molecular techniques, which allows the detection and quantification of gene expression due to its high sensitivity, specificity, and reproducibility. To increase the reliability of the experimental results, internal reference genes are used to normalize the data. However, previous studies have shown that the stability of internal reference genes is influenced by experimental conditions and interspecies variations, and no universal internal reference genes have been identified for all species. Therefore, suitable internal reference genes must be identified for each species. The Hong Kong catfish (*Clarias fuscus*) has strong adaptability, high nutritional value, and tender flesh, and it was first introduced to large-scale aquaculture in the Guangdong and Guangxi provinces in the early 1970s. Currently, it is a key aquaculture species in the Guangdong-Guangxi region and one of the freshwater economic fish cultured in southern China. Thus, fairly extensive molecular biology and genetics studies of *C. fuscus* have been conducted, which in turn has increased the demand for quantitative gene expression analysis by qRT-PCR in these animals. Consequently, there is a growing demand for quantitative gene expression analysis by qRT-PCR in *C. fuscus* for various molecular biology and genetics studies. However, few

① Corresponding author: TIAN Changxu, Email: tiancx@gdou.edu.cn

studies have evaluated the internal reference genes for this species. Therefore, we aimed to identify suitable internal reference genes in different tissues and different stages of gonadal development of males and females to provide the necessary tools to support subsequent gene expression pattern analysis.

In this study, we examined the expression of 13 internal reference genes (*actb1*, *actb2*, *efla*, *eef1b2*, *rpl13a*, *rpl13*, *ccdc124*, *cfl1*, *nm23*, *EIF3G*, *rap1a*, *ikbkg*, and *ywhab*) in different stages of gonadal development and different tissues of adult fish of *C. fuscus*. We used four software tools, namely BestKeeper, GeNorm, NormFinder, and RefFinder, to evaluate the expression stability of the internal reference genes. BestKeeper software evaluates the stability of internal reference genes by calculating the standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV). The results showed that in different tissues of adult fish, the stability ranking of these genes was as follows: *actb1* > *actb2* = *efla* > *rpl13* > *ywhab* > *eef1b2* > *rpl13a* > *nm23* > *EIF3G* > *ccdc124* > *rap1a* > *cfl1* > *ikbkg*. In different stages of male and female gonadal development, the stability ranking of these genes was as follows: *actb2* > *rpl13* > *efla* > *rpl13a* > *actb1* > *ywhab* > *cfl1* > *rap1a* > *eef1b2* > *EIF3G* > *ccdc124* > *ikbkg* > *nm23*. NormFinder suggested that the best stability ranking was as follows: *actb2* = *rpl13* > *actb1* > *rpl13a* > *ywhab* > *nm23* > *rap1a* > *cfl1* > *EIF3G* > *efla* > *ccdc124* > *ikbkg* > *eef1b2* in different tissues of adult fish and *actb2* = *actb1* > *rpl13* > *efla* > *rpl13a* > *cfl1* > *ywhab* > *rap1a* > *nm23* > *EIF3G* > *ccdc124* > *ikbkg* > *eef1b2* in different stages of male and female gonadal development. The geNorm screens for the most stable internal reference genes by comparing the stability value (*M*) of each internal reference gene. It indicated that the final stability ranking in different tissues was *actb2* = *rpl13* > *rpl13a* > *actb1* > *efla* > *ccdc124* > *ywhab* > *rap1a* > *EIF3G* > *nm23* > *eef1b2* > *ikbkg* > *cfl1*, and *actb1* = *rpl13* > *actb2* > *efla* > *rpl13a* > *cfl1* > *ywhab* > *ccdc124* > *rap1a* > *EIF3G* > *nm23* > *eef1b2* > *ikbkg* in different stages of male and female gonadal development. Finally, RefFinder analysis integrated the results of the other three software tools and showed that the comprehensive stability ranking of each gene in different tissues was *actb2* > *rpl13* > *cfl1* > *rap1a* > *efla* > *rpl13a* > *ikbkg* > *EIF3G* > *nm23* > *actb1* > *eef1b2* > *ywhab* > *ccdc124*. In different stages of male and female gonadal development, the comprehensive stability ranking was *actb2* > *rpl13* > *actb1* > *cfl1* > *rap1a* > *efla* > *rpl13a* > *ikbkg* > *EIF3G* > *nm23* > *eef1b2* > *ywhab* > *ccdc124*. Given this, we can conclude that *actb2* is the best internal reference gene for *C. fuscus*. To validate the accuracy of the results, we selected *actb2* and *rpl13* as internal reference genes and compared their expression levels with those of four genes (*zp3*, *atp2b3*, *slc13a5* and *parp8*) from transcriptome RNA-seq data. The fold changes in the expression levels were closer to the transcriptome data when using *actb2* than when using *rpl13*, indicating that *actb2* is more stable than *rpl13*.

This study demonstrated that *actb2* showed good stability among the 13 internal reference genes and could be used as an internal reference gene for different stages of gonadal development and different tissues of adult fish in *C. fuscus*. The results can provide technical support for the subsequent research on the functional gene expression patterns of *C. fuscus* and are expected to be applicable to other catfish species.

Key words *Clarias fuscus*; qRT-PCR; Reference gene; Stability of expression