

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220622001

http://www.yykxjz.cn/

李杰锋, 王焕, 李步苏, 曾祥辉, 柳淑芳, 庄志猛. 黄带拟鲈 qRT-PCR 内参基因筛选及验证. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 107-115

LI J F, WANG H, LI B S, ZENG X H, LIU S F, ZHUANG Z M. Screening and evaluating reference genes for quantitative real-time PCR in striped jack (*Pseudocaranx dentex*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 107-115

黄带拟鲈 qRT-PCR 内参基因筛选及验证*

李杰锋^{1,2} 王 焕² 李步苏^{2,3} 曾祥辉^{2,4} 柳淑芳^{2,3①} 庄志猛²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071; 4. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023)

摘要 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 是研究基因表达的一种广泛使用且有效的方法, 选用黄带拟鲈 (*Pseudocaranx dentex*) 合适的内参基因, 是 qRT-PCR 技术获得该物种基因表达可靠结果的关键。本研究首先测定了 9 个常用内参基因 (β -actin、RPL13、EF-1 α 、GAPDH、HPRT、PPIA、 β 2M、TUB 和 PP2A) 在黄带拟鲈成鱼组织中的表达丰度; 同时, 利用 BestKeeper、NormFinder、geNorm 和 RefFinder 4 种模型预测了内参基因的表达稳定性, 发现其表达稳定性排序为 RPL13 > EF-1 α > PP2A > HPRT > PPIA > TUB > β 2M > β -actin > GAPDH。进一步通过定量检测目标基因 *myod1* 在不同组织的表达情况, 验证上述预测结果的准确性。研究发现, RPL13 和 EF-1 α 单独或联合作为黄带拟鲈 qRT-PCR 内参基因, 可显著提高目标基因表达量检测结果的稳定性与可靠性。结果表明, RPL13 和 EF-1 α 可作为黄带拟鲈不同组织 qRT-PCR 分析的内参基因。同时, 也证实了并不是管家基因的表达在所有物种中都具有良好的稳定性, 需要根据实际情况筛选适宜的内参基因。本研究结果可为后续黄带拟鲈功能基因表达特征的研究提供技术支撑, 有望适用于其他鲈科鱼类。

关键词 黄带拟鲈; qRT-PCR; 内参基因; 稳定性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)06-0107-09

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 因具有灵敏度高、特异性强、重复性好和成本低等优点 (Jaiswal *et al.*, 2019), 是进行基因表达检测分析最常用的技术手段。qRT-PCR 有绝对定量或相对定量 2 种方法。其中, 在 qRT-PCR 相对定量中, 为了消除样本 RNA 质量、逆转录效率、实验操作等因素对检测结果的影响 (Bustin, 2002; Maroufi *et al.*, 2010), 通常会引入内参基因来校正相对荧光定量实验数据, 以保证实验结果的准确可靠 (Dhedra *et al.*, 2005)。内参基因通常选用管家基因,

如斑马鱼 (*Danio rerio*)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 基因表达分析使用的内参基因为 EF-1 α (McCurley *et al.*, 2008; 马骞等, 2016、2015); 布氏鲳鲈 (*Trachinotus blochii*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 基因表达研究的内参基因为 β -actin (李岩强等, 2020; 胡伟等, 2022); 鲫鱼 (*Carassius auratus auratus*) 使用了 RPL-7 为内参基因 (宋双双等, 2013)。常用的管家基因有构成细胞器骨架的基本组分的 β -actin、TUB、RPL、 β 2M 等基因和参与生物体基本生化代谢过程的

* 国家自然科学基金项目 (42076132; 42106129; 32102768) 和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系共同资助。李杰锋, E-mail: 13533418487@163.com

① 通信作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-06-22, 收修改稿日期: 2022-07-28

EF-1 α 、*GAPDH*、*PPIA* 和 *PP2A* 等基因。管家基因是维持细胞生命活动的典型基因,通常认为其表达水平受环境因素影响较小,并能在生物体几乎全部组织及各个生长阶段持续表达,但 Yang 等(2020)研究表明,管家基因的表达稳定性会受到物种和组织差异的影响,在不同物种中的表达稳定性并不一致。因此,针对特定物种筛选稳定表达的内参基因,有助于提高 qRT-PCR 结果的准确性。

黄带拟鲮属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、鲮科(Carangidae)、拟鲮属(*Pseudocaranx*),是中上层长距离洄游鱼类(陈大刚等,2015)。为了满足深远海生物资源开发利用的理论与技术需求,本团队正在系统开展黄带拟鲮分子生物学和遗传学研究(Wang *et al.*, 2022),以黄带拟鲮为对象的适应性进化机制、骨骼肌分化及转化、线粒体能量代谢等相关研究也正在广泛开展。筛选合适的内参基因是开展黄带拟鲮分子生物学研究的基础。本研究以黄带拟鲮为研究对象,选择了硬骨鱼类 qRT-PCR 广泛使用的 9 个内参基因,对其在各组织中表达的稳定性进行评价分析,以期为黄带拟鲮功能基因的标准化和量化检测提供稳定的内参基因,为后期全面系统开展黄带拟鲮分子生物学和遗传学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄带拟鲮样品取自大连天正实业有限公司养殖场。选取健康成鱼 3 尾,体重为(1 488.72±135.95) g,体长为(36.27±0.63) cm,解剖并分别取其 10 个组织(脑、鳃、心脏、肠、肾、肝、脾、胃、慢肌和快肌)。PBS 缓冲液冲洗,去除肌膜和其他结缔组织,置于无菌冻存管,立即将样品投入液氮中速冻,转移至-80 °C 超低温冰箱中保存,用于后续总 RNA 的提取。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 合成 取 1.1 保存的 3 尾黄带拟鲮 10 个组织各 30 mg,分别剪碎、匀浆,使用 TaKaRa RNAiso Plus (宝生物)试剂分别提取总 RNA,具体操作按照说明书进行。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 样品的完整性,并利用 Nano300 微量分光光度计(奥盛)检测所提取 RNA 的浓度与纯度。总 RNA 的 OD_{260 nm/280 nm} 及 OD_{260 nm/OD_{230 nm}} 值均在 1.8~2.2 之间,表明所提取的 RNA 纯度较好。

使用 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (宝生物)将提取的 RNA 样品反转录为

cDNA,具体按照反转录操作说明书进行。将 cDNA 样品置于-20 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计和标准曲线构建 根据课题组的黄带拟鲮转录组数据(Wang *et al.*, 2022),利用在线工具 Primer5 设计 9 个内参基因(*β -actin*、*RPL13*、*EF-1 α* 、*GAPDH*、*HPRT*、*PPIA*、 *β 2M*、*TUB* 和 *PP2A*) (表 1),由青岛华大基因生物科技有限公司合成。

将 1.2.1 得到的每尾黄带拟鲮 10 个组织的 cDNA 样品等质量混合,按 1 : 3 比例进行 7 个梯度稀释(1/3、1/9、1/27、1/81、1/243、1/729、1/2187),以其为模板进行 qRT-PCR,构建标准曲线,相关系数 R^2 为 0.952~0.999;扩增效率为 94.4%~104.6% (表 1),符合 qRT-PCR 实验对引物的要求。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 将 1.2.1 得到的 cDNA 稀释 5 倍作为模板,利用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行扩增。使用 TaKaRa TB Green® Premix Ex Taq™ II (宝生物)试剂盒配制反应液,反应体系: Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μ L, ROX reference dye II (50 \times) 0.4 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L, 25 ng cDNA 模板,用双蒸水补足至 20 μ L,所有操作在冰上进行。qRT-PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 30 s 后进入循环; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 收集荧光信号,共 40 个循环;后运行熔解曲线分析程序: 95 °C 变性 15 s, 60 °C 稳定 60 s,以 0.05 °C/s 的速度上升到 95 °C,记录荧光信号的变化,95 °C 稳定 15 s, 60 °C 退火 15 s。每个样品设 3 个技术重复,并设阴性对照。

1.2.4 内参基因稳定性预测 经 7500 System SDS 软件(Applied Biosystems, 美国)处理 qRT-PCR 结果,得到内参基因循环阈值(C_t)。通过公式: $C_q = C_t \times \log(2) / \log E$ (其中, E 是每个引物对的扩增效率)将各样品 qRT-PCR 得到的 C_t 值转换为 C_q 值。

根据 4 种不同的算法预测内参基因的表达稳定性,包括 BestKeeper、NormFinder、geNorm 和 RefFinder 模型。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 $Q = 2^{C_{q_{\min}} - C_{q_{\text{sample}}}}$ 计算得到 Q 值($C_{q_{\min}}$ 为基因在样品中的最小 C_q 值; $C_{q_{\text{sample}}}$ 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 Q 值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来确定基因表达稳定性值 M (Vandesompele *et al.*, 2002)。

表 1 9 个内参基因及验证基因的引物序列
Tab.1 Primer sequences for the 9 reference genes and test gene

基因 Gene	基因名称注释 Annotation of gene	引物碱基序列 Primer sequence (5'~3')	产物长度 Product size /bp	扩增效率 Efficiency/%	相关系数 R^2
<i>β-actin</i>	Beta actin	F: GCTGTGCTATGTGGCTCTGG R: GATGCTGTTGTAGCGGTCT	202	97.465	0.999
<i>RPL13</i>	Ribosomal protein L13	F: CATCTCTGTTGACCCCG R: TGCTGTCTCCCTTCTTGG	134	95.344	0.996
<i>EF-1α</i>	Elongation factor 1 alpha	F: CCACCGAGCCCCCTTAC R: TGTCTCCGTGCCATCCA	129	95.679	0.994
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: CTCTTCCCCACTCACA R: TCACCAGACGACCGAT	126	98.569	0.996
<i>HPRT</i>	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase	F: AGGAGATGGGGGGGCAC R: TCATTGGGATGGAGCGG	123	103.742	0.994
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	F: TACCTTCCTTCCCTTCCCAC R: AACGACAACAACAACACGCC	214	95.153	0.959
<i>β2M</i>	Beta 2-microglobulin	F: CAACAGATTCCCCACAAC R: CTAAATGACAAGCAGCCC	128	94.394	0.998
<i>TUB</i>	Beta tubulin	F: CTCTGTTAGGTCTGGTCC R: ACTCCTCCCTGATTTTGC	254	104.570	0.952
<i>PP2A</i>	Serine/threonine-protein phosphatase2A catalytic subunit	F: TTAGGCGTTATCGGTTG R: AGTGTCTGACTTGGTT	205	95.413	0.986
<i>myod1</i>	Myoblast determination protein 1	F: CACGACAACGGCTTCTACCCT R: CTCTGTGCTGATCCGCTCTAC	225	99.354	0.990

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(Xie *et al*, 2011)。

1.2.5 内参基因稳定性验证 利用qRT-PCR分析成肌分化蛋白基因*myod1*在黄带拟鲮红肌、白肌2个肌肉组织与肾、鳃2个非肌肉组织的表达情况,引物设计方法同1.2.2(表1),qRT-PCR方法参照1.2.3。在引入上述分析预测得到的稳定性较好的*RPL13*和*EF-1 α* ,及稳定性较差的 *β 2M*、 *β -actin*和*GAPDH*分别为内参基因的情况下,对*myod1*在同一个组织中的相对表达水平进行差异性分析,验证所选内参基因稳定性和可靠性。

1.2.6 数据统计分析 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对基因表达进行相对量化(Livak *et al*, 2001),用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。使用SPSS软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和*t*检验进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 内参基因表达丰度

qRT-PCR的*Ct*值可直接反映基因的表达丰度,*Ct*值大小与该基因表达量高低呈负相关。如图1所示,9个内参基因在黄带拟鲮所有组织的平均*Ct*值范围为20.85~32.92,表达丰度从高到低排序依次是

RPL13> *EF-1 α* > *β 2M*> *β -actin*> *PPIA*> *HPRT*> *TUB*> *PP2A*> *GAPDH*。其中,*RPL13*的平均*Ct*值最小,说明该基因的表达丰度最高;*GAPDH*的平均*Ct*值最大,说明该基因的表达丰度最低。

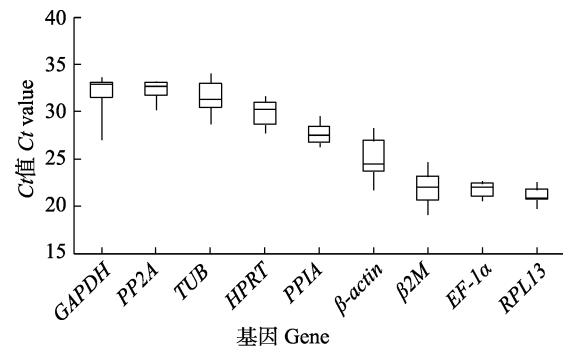


图 1 9 个内参基因在黄带拟鲮不同组织中 qRT-PCR 检测的 *Ct* 值

Fig.1 *Ct* values of 9 reference genes in different tissues of *P. dentex* by qRT-PCR

箱体表示 *Ct* 值的集中范围,箱体中的横线表示中位数,箱体上下边分别表示上/下四分位数,直线上下两端分别表示最大/小值。

The box represents the concentrated range of *Ct* values, the horizontal line in the box represents the median, the upper and lower sides of the box respectively represent the upper/lower quartiles, and the upper and lower ends of the box respectively indicate the maximum/minimum value.

2.2 内参基因稳定性预测

2.2.1 BestKeeper 分析 BestKeeper 通过计算标准偏差(SD)和变异系数(CV)来反映内参基因的稳定性。其中, SD 值的默认阈值(图 2 横线)为 1.0, 低于该值即认为表达稳定(Pfaffl *et al*, 2004); CV 值反映内参基因在不同组织中的表达水平变异程度。SD 值和 CV 值与基因的稳定性均呈负相关性。BestKeeper 分析结果如图 2 显示, 其稳定性从高到低依次是: *EF-1 α* (SD=0.72; CV=3.29)>*RPL13* (SD=0.78; CV=3.69)>*PP2A* (SD=0.81; CV=2.49) >*PPIA* (SD=0.95; CV=3.41) > *HPRT* (SD=1.20; CV=4.03) > β 2M (SD=1.42; CV=6.51) > *TUB* (SD=1.43; CV=4.51) > *GAPDH* (SD= 1.74; CV=5.48) > β -actin (SD=1.81; CV=7.20); 有 4 个基因的 SD 值小于 1.0, 说明 *EF-1 α* 、*RPL13*、*PP2A* 和 *PPIA* 基因在黄带拟鲈 10 个不同组织中表达较为稳定。

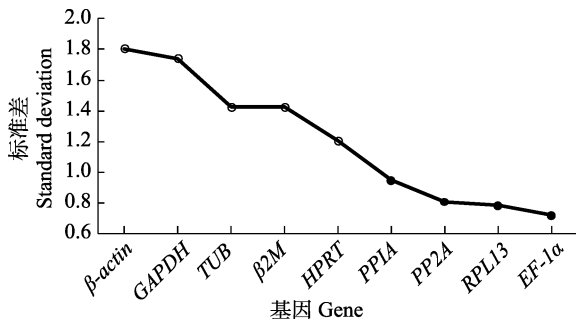


图 2 BestKeeper 分析 9 个内参基因的标准差
Fig.2 Analysis of standard deviation of 9 reference genes by BestKeeper

横线代表 SD 值为 1.0 的默认阈值, 实心点代表表达稳定的基因, 空心点代表表达不稳定的基因。

The horizontal line indicates the BestKeeper cut-off value of 1.0, solid point indicates stable reference genes, and hollow point indicates unstable reference genes.

2.2.2 NormFinder 分析 NormFinder 基于组间方差与组内方差计算 stability value (SV), 而 SV 值的大小与内参基因的稳定性呈负相关(Andersen *et al*, 2004)。NormFinder 分析结果如图 3 显示, 9 个内参基因在黄带拟鲈不同组织部位的稳定性排名从高到低依次是: *RPL13* (SV=0.525) > *EF-1 α* (SV=0.595) > *HPRT* (SV=0.904) > *TUB* (SV=0.946) > *PP2A* (SV=1.077) > *PPIA* (SV=1.284) > β 2M (SV=1.775) > *GAPDH* (SV=2.521) > β -actin (SV=2.563)。其中, *RPL13*、*EF1A* 的 SV 值较接近, 且相比其他基因的 SV 值较低, 说明这 2 个内参基因的稳定性较强。

2.2.3 geNorm 分析 根据 geNorm 基于单个内参基因相对于所有其他测试对照基因的成对变异进行分析。通过比较计算内参基因稳定性的 *M* 值, 逐步

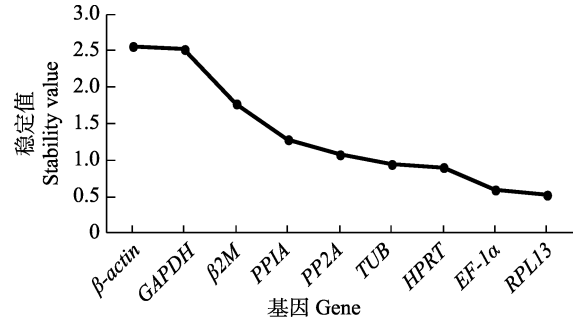
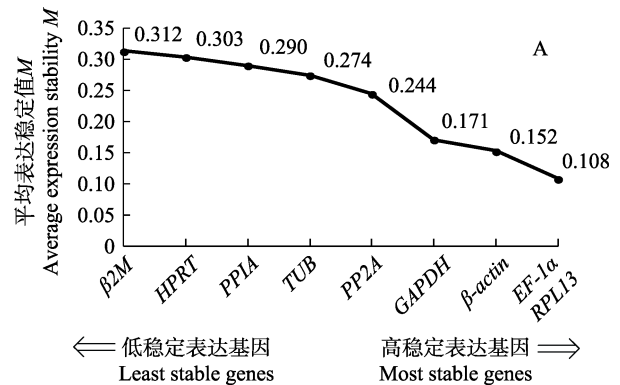


图 3 NormFinder 分析 9 个内参基因的稳定性
Fig.3 Analysis of stability value of 9 reference genes by NormFinder

排除最不稳定的内参基因, 得到剩余内参基因的平均表达稳定性 *M* 值(Vandesompele *et al*, 2002)。从左边最不稳定的基因开始, 根据表达稳定性的增加对基因进行排序, 以右边最稳定的 2 个基因结束, 以确定表达最稳定的内参基因。geNorm 分析得到剩余内参基因的平均表达稳定性 *M* 值结果(图 4A), 表明 9 个内参基因稳定性排名从高到低依次是: *RPL13*=*EF-1 α* > β -actin > *GAPDH* > *PP2A* > *TUB* > *PPIA* > *HPRT* > β 2M。



← 低稳定表达基因 Least stable genes 高稳定表达基因 Most stable genes →

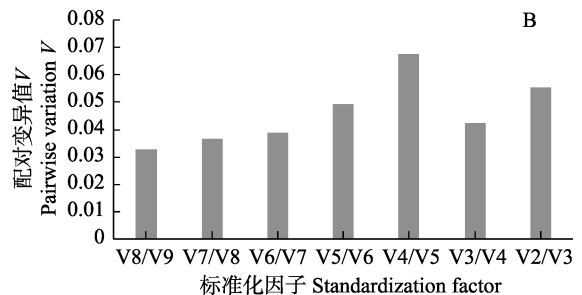


图 4 geNorm 分析 9 个内参基因的平均表达稳定值(A)和成对变异值(B)
Fig.4 Average expression stabilities of 9 reference genes (A) and the pairwise variation (B) analyzed by geNorm

进一步利用 geNorm 分析计算成对变异值 *V* 确定所需内参基因的最佳数量。内参基因的最佳数量必须

满足 $V_{n/(n+1)}$ 低于临界值 0.15。当 $V_{n/(n+1)} < 0.15$, n 个内参基因已达到校正目的基因表达量要求; 反之, 则需 $n+1$ 个目的基因进行校正。图 4B 结果显示, 所有的成对变异系数 $V_{n/(n+1)}$ 均小于临界值 0.15, 即加入更多个数的内参基因对 V 值影响不大, 因此, 2 个内参基因(*RPL13* 和 *EF-1 α*)联合使用, 可达到校正目的基因表达量要求。

2.2.4 RefFinder 分析 RefFinder 对 geNorm、NormFinder、BestKeeper 3 种模型进行整合分析, 为单个基因分配适当的权重, 综合比较和排名内参基因的表达稳定性(Xie *et al.*, 2011)。RefFinder 分析结果显示, 各基因稳定性综合排名由高到低依次为 *RPL13* (GM=1) > *EF-1 α* (GM=1.86) > *PP2A* (GM=2.71) > *HPRT* (GM=4.23) > *PPIA* (GM=4.73) > *TUB* (GM=6.24) > $\beta 2M$ (GM=6.74) > β -actin (GM=8.24) > *GAPDH* (GM=8.74)。其中, *RPL13* 和 *EF-1 α* 的表达稳定性最好。

2.3 内参基因稳定性验证

根据 4 个模型对内参基因稳定性的预测结果, 选

择稳定性较好的 *RPL13* 和 *EF-1 α* , 及稳定性较差的 $\beta 2M$ 、 β -actin 和 *GAPDH* 分别为内参基因, 测定目标基因 *myod1* 在黄带拟鲮各组织的相对表达, 并进行不同内参基因引入条件下其相对表达水平的差异性分析, 以验证软件预测结果的可靠性。结果如图 5 所示, 在单独或联合使用 *RPL13* 和 *EF-1 α* 为 qRT-PCR 内参基因时, *myod1* 基因在黄带拟鲮的同一组织中的相对表达水平均无显著性差异(图 5 深灰色条形柱); 但以 $\beta 2M$ 、 β -actin 和 *GAPDH* 为内参基因时, 在多数组织中其相对表达水平表现出显著性差异(图 5 浅灰色条形柱)。结果表明, 单独或联合使用 *RPL13* 和 *EF-1 α* 作为黄带拟鲮不同组织基因表达的内参基因, 能保证 qRT-PCR 结果的准确性和可靠性。

3 讨论

3.1 qRT-PCR 内参基因筛选的意义

当前, qRT-PCR 是检测基因表达的重要方法, 也是深入挖掘基因功能必不可少的实验技术。稳定的内

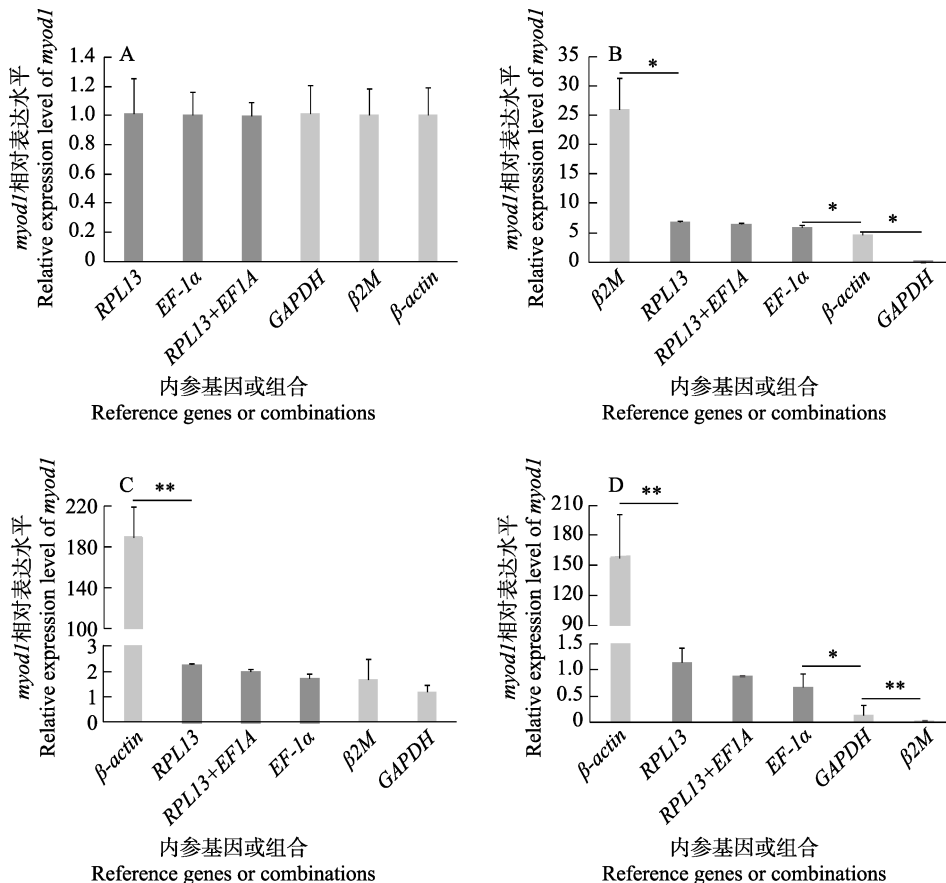


图 5 不同内参基因或组合分析 *myod1* 在黄带拟鲮慢肌(A)、快肌(B)、肾(C)、鳃(D) 4 个组织中的相对表达水平

Fig.5 Relative expression level of *myod1* in slow-twitch muscle (A), fast-twitch muscle (B), kidney (C) and gill (D) of *P. dentex* using different reference genes or combinations

*表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

* shows the significant difference ($P < 0.05$), and ** shows the highly significant difference ($P < 0.01$).

参基因要求其表达水平不受研究条件的影响且在不同组织之间稳定表达(Zhang *et al.*, 2005), 能够准确量化 qRT-PCR 相对定量结果。但 Yang 等(2020)研究发现, 有的内参基因的表达会受到不同物种、不同组织、不同发育阶段以及不同环境条件的影响。因此, 并不是所有的物种和条件下都适合选用同一种管家基因, 如 18S rRNA 是青鳉(*Oryzias latipes*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)较为理想的内参基因(Zhang *et al.*, 2007; 薛蓓等, 2017), 但在菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、草鱼等物种中却不适用(蒋彩云等, 2020; 费越越等, 2020; 苏晓燕等, 2022; 周瑞雪等, 2009)。目前, 没有发现一种不受外界因素影响、能够在所有物种和组织细胞中都能稳定表达的理想内参基因(Bruge *et al.*, 2011), 因此, 在 qRT-PCR 实验之前, 针对特定物种筛选其各组织均能稳定表达的内参基因就显得尤为重要。

3.2 内参基因的稳定性评价

qRT-PCR 内参基因常常选择在不同组织中具有一定保守性的管家基因, 通常认为管家基因在不同的组织细胞中能够稳定表达。本研究选择 9 个常用的管家基因为内参基因, 根据其在黄带拟鲮 10 个组织的表达情况, 运用 4 种模型预测其稳定性。结果显示, 4 种模型预测结果的排序基本一致, 即 *RPL13* 和 *EF-1 α* 在黄带拟鲮不同组织的表达最具稳定性。其中, 与三倍体虹鳟 5 个内参基因的 CV 值范围 3.94~15.36 (苏晓燕等, 2022)相比, 本研究 BestKeeper 分析 9 个内参基因 2.49~7.20 的 CV 值范围更低; 本研究 NormFinder 分析 9 个内参基因的 SV 值范围 0.525~2.563, 与三倍体虹鳟(苏晓燕等, 2022)、达氏鲟(*Acipenser dabryanus*) (武梦斌等, 2020)的研究结果接近。同时, *RPL13*、*EF-1 α* 在黄带拟鲮不同组织的表达丰度较适中, 符合理想内参基因的条件(朱芷葳等, 2006)。已有研究表明, *RPL13* 在驼背鲈(*Cromileptes altivelis*)不同免疫器官和尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewarti*)中被鉴定为表达最稳定的内参基因(Chen *et al.*, 2021; 孙海成等, 2019); *EF-1 α* 是斑马鱼、黄鳝(*Monopterus albus*)、达氏鲟表达最稳定的内参基因(McCurley *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2014; 武梦斌等, 2020)。同时, 4 种模型预测到其他 7 个内参基因的稳定性均较差, 但排序结果稍有差异, 这可能是内参基因稳定性算法的不同造成的(Ward *et al.*, 2015)。

在多内参基因表达稳定性分析方面, Bustin 等(2009)建议在一些对基因表达定量准确度要求非常高的实验中选取适宜的 2 个基因作为内参基因。因为双内参组合能更准确地分析目的基因在不同组织的相对表达量, 提高实验结果的精确度, 确保目的基因相对表达结果的可靠性(苏晓燕等, 2022)。本研究也证实了联合使用 *RPL13* 和 *EF-1 α* 两个内参基因, 结果具有更好的稳定性和准确性。

3.3 内参基因稳定性评价结果的验证

为了进一步验证模型预测结果的准确性, 本研究利用 *myod1* 在黄带拟鲮慢肌、快肌、肾、鳃等各组织的相对表达进行不同内参基因引入条件下的相对表达量分析。*myod1* 是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主导调控基因之一, 对骨骼肌的形成和分化起关键作用。以 *GAPDH* 为内参基因时 *myod1* 在快肌(图 5B)基本无表达, 与单独或联合使用 *RPL13* 和 *EF-1 α* 为内参基因时 *myod1* 主要在快肌中表达的结果截然相反, 也显然与 *myod1* 主要在骨骼肌中表达的现象(孔祥福等, 2021)相矛盾; 以 *β -actin* 为内参基因时, *myod1* 在肾(图 5C)和鳃(图 5D)中超高表达, 与 *myod1* 在非肌肉细胞中的表达受抑制的研究结果(Weintraub *et al.*, 1991)相矛盾。该结果验证了 4 个模型的预测结果, 表明 *RPL13* 和 *EF-1 α* 稳定性确实较好, 是适用于黄带拟鲮多个组织的基因表达水平研究的内参基因。本研究筛选了黄带拟鲮不同组织中稳定的内参基因, 可为后期全面系统开展黄带拟鲮分子生物学和遗传学研究提供依据。

参 考 文 献

- ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTTOFT 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
- BRUGE F, VENDITTI E, TIANO L, *et al.* Reference gene validation for qPCR on normoxia-and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: Is *β -actin* a reliable normalizer for photoaging studies? *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(3): 153–162
- BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611–622
- BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29(1): 23–39
- CHEN D G, ZHANG M Z. Marine fishes of China. Qingdao:

- China Ocean University Press, 2015, 1096–1097 [陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015, 1096–1097]
- CHEN X, SUN Y, ZHANG P, *et al.* Screening of stable internal reference genes by quantitative real-time PCR in humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(5): 15
- 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
- FEI Y Y, NAN X Y, YU L, *et al.* Screening of reference genes in allogynogenetic silver crucian carp *Carassius auratus gibelio*. *Fisheries Science*, 2020, 39(3): 306–315 [费越越, 南星羽, 余路, 等. 异育银鲫内参基因的筛选. *水产科学*, 2020, 39(3): 306–315]
- 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 W, WU H, YUAN H W, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the melatonin receptor gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(1): 141–152 [胡伟, 吴慧, 袁汉文, 等. 草鱼褪黑激素受体 *Mtnr1* 基因克隆及组织表达分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(1): 141–152]
- JAISSWAL P S, KAUR N, RANDHAWA G S. Identification of reference genes for qRT-PCR gene expression studies during seed development and under abiotic stresses in *Cyamopsis tetragonoloba*. *Crop Science*, 2019, 59(1): 252–265
- JIANG C Y, QIAO K, XU M, *et al.* Selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis in *Takifugu flavidus*. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(2): 105–116 [蒋彩云, 乔琨, 许旻, 等. 利用 RT-qPCR 技术筛选菊黄东方鲀的最适内参基因. *渔业研究*, 2020, 42(2): 105–116]
- KONG X F, HE Y, SONG W H, *et al.* Preliminary functional analysis of *MyoD* genes in regulating the myoblast differentiation in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2021, 51(2): 53–62 [孔祥福, 贺艳, 宋伟豪, 等. 许氏平鲷 *MyoD* 基因的鉴定及其调控成肌细胞分化功能的初步研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 51(2): 53–62]
- LI Y Q, GUO C H, YE H Z, *et al.* Cloning and tissue expression analysis of *VEGFA* gene in *Trachinotus blochii*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(3): 1020–1027 [李岩强, 郭辰浩, 叶恒振, 等. 布氏鲷 *VEGFA* 基因克隆与组织表达分析. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(3): 1020–1027]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MA Q, FENG W R, LIU S F, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *BMP4* gene in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 500–512 [马骞, 冯文荣, 柳淑芳, 等. 半滑舌鲷骨形态发生蛋白 4 基因的克隆和表达分析. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 500–512]
- MA Q, ZHUANG Z M, FENG W R, *et al.* Temporal expression of transcription factors *Runx2* and *Osterix* during early development of *Cynoglossus semilaevis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(5): 1–7 [马骞, 庄志猛, 冯文荣, 等. 转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 早期发育阶段的时序性表达分析. *渔业科学进展*, 2015, 36(5): 1–7]
- MAROUFI A, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M. Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11(1): 15–26
- 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
- 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
- SONG S S, AN L H, ZHENG B H, *et al.* Vitellogenin mRNA expression in wild crucian carp (*Carassius auratus auratus*) from Hun River. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(1): 121–129 [宋双双, 安立会, 郑丙辉, 等. 浑河流域野生鲫鱼卵黄蛋白原基因表达. *生态毒理学报*, 2013, 8(1): 121–129]
- 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 H C, LU X N, TONG G X, *et al.* Screening of reference genes for real-time quantitative PCR in Stewart's naked high-Asian-carp *Oxygymnocypris stewarti*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(3): 370–375 [孙海成, 吕晓楠, 佟广香, 等. 尖裸鲤实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(3): 370–375]
- 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. *Genome Biology*, 2002, 3(7): H34
- WANG H, LI B, YANG L, *et al.* Expression profiles and transcript properties of fast-twitch and slow-twitch muscles in a deep-sea highly migratory fish, *Pseudocaranx dentex*. *PeerJ*, 2022, 10: e12720
- WARD D S, JUTTA D W, ROSWITHA W, *et al.* Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS One*, 2015, 10(3): e122515
- WEINTRAUB H, DAVIS R, TAPSCOTT S, *et al.* The *myoD* gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 1991, 251(4995): 761–766
- WU M B, YE H, YUE H M, *et al.* Identification of the 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. PLoS One, 2011, 6(11): e26980
- XUE B, ZHANG P, LI Z H, *et al.* Cloning, expression and stability analysis of the reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) in *Exopalaemon carinicauda*. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1003–1012 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾 *GAPDH* 基因的克隆及其内参基因稳定性分析. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1003–1012]
- 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 X, DING L, SANDFORD A J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. BMC Molecular Biology, 2005, 6(1): 4
- 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
- ZHOU R X, MENG T, ZHAO F L, *et al.* Comparative research on the stability of internal control genes based on mRNA expression analysis of *MYH* gene in the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(5): 896–900 [周瑞雪, 蒙涛, 赵发兰, 等. 草鱼 *MYH* mRNA 表达量分析中采用的内参基因稳定性比较. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 896–900]
- 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 and Evaluating Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Striped Jack (*Pseudocaranx dentex*)

LI Jiefeng^{1,2}, WANG Huan², LI Busu^{2,3}, ZENG Xianghui^{2,4}, LIU Shufang^{2,3①}, ZHUANG Zhimeng²

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

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China;

4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) is one of the most widely used molecular techniques, often implemented to allow for the detection and quantitation of gene expression because of its high sensitivity, specificity, and reproducibility. However, reliable and comparable relative quantitative results using qRT-PCR require the application of appropriate reference genes in order to eliminate non-biological variations caused by initial RNA templates, efficiency of cDNA synthesis, and laboratory procedures. However, previous studies have reported that the stability of many reference genes may vary across species, tissue types, cell lines, developmental stages, and experimental treatments, yielding inaccurate or incorrect gene expression results. Therefore, the selection and validation of stable reference genes for different tissues from a specific species are especially important for obtaining accurate target gene expression results. The striped jack, *Pseudocaranx dentex*, belonging to the order Perciformes and family Carangidae, is a pelagic migratory fish with high nutritional value. This fish has already received extensive attention in global aquaculture production and is regarded as a candidate species for far-reaching marine aquaculture in China. Given this, there are currently a large number of fairly extensive molecular

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

biology and genetics studies of *P. dentex* underway, which in turn have increased the demand for quantitative gene expression analysis by qRT-PCR in these animals. However, few studies have evaluated the reference genes for this species. Thus, the objective of this study was to identify suitable reference genes in different tissues of *P. dentex*, in an effort to provide the necessary tools to support subsequent gene expression pattern analysis.

We evaluated nine commonly used reference genes, including beta actin (β -actin), ribosomal protein L13 (*RPL13*), elongation factor 1 alpha (*EF-1 α*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*HPRT*), peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*), beta 2-microglobulin (β 2M), beta tubulin (*TUB*), and serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit (*PP2A*) using qRT-PCR analysis across various *P. dentex* tissues. These evaluations included the study of their expression stability across ten tissues, including the brain, gill, heart, intestine, kidney, liver, spleen, stomach, slow-twitch muscle, and fast-twitch muscle, from three adult individuals of *P. dentex* using four independent methods, namely BestKeeper, NormFinder, geNorm, and RefFinder. These results were then validated in the qRT-PCR profiling of the myoblast determination protein 1 (*myod1*) gene in both muscle (slow-twitch and fast-twitch muscles) and non-muscle tissues (kidney and gills) using the various recommended reference genes or their combinations.

Expression analysis showed that *RPL13* was the most highly expressed gene in these samples, followed by *EF-1 α* , β 2M, β -actin, *PPIA*, *HPRT*, *TUB*, and *PP2A*, whereas *GAPDH* was the most weakly expressed across all ten *P. dentex* tissues. In addition, all nine candidate reference genes exhibited relatively inconsistent variations in *Ct* value across various tissues, with the BestKeeper stability assay, which uses standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) to score the candidates, suggesting that these genes could be ordered from most stable to least stable as follows: *EF-1 α* > *RPL13* > *PP2A* > *PPIA* > *HPRT* > β 2M > *TUB* > *GAPDH* > β -actin. NormFinder suggested that the ranking was best described as follows: *RPL13* > *EF-1 α* > *HPRT* > *TUB* > *PP2A* > *PPIA* > β 2M > *GAPDH* > β -actin. Evaluations using geNorm, which is based on the idea that the lower the expression stability value (*M*), the better the stability of gene expression, suggested that the expression stability of these genes is best described as follows: *RPL13* = *EF-1 α* > β -actin > *GAPDH* > *PP2A* > *TUB* > *PPIA* > *HPRT* > β 2M. Finally, RefFinder analysis showed that the comprehensive stability ranking of each gene was *RPL13* > *EF-1 α* > *PP2A* > *HPRT* > *PPIA* > *TUB* > β 2M > β -actin > *GAPDH*. In addition, all of the paired coefficients of variation, $V_{n/(n+1)}$, reference genes had little effect on the *V* value. The combination of the two best reference genes is a valid normalization strategy, and the results can be used to correct the expression levels of various target genes. Given this, we can conclude that *RPL13* and *EF-1 α* are the two best reference genes for adult tissues. These outcomes were then validated in a *myod1* expression assay in the slow-twitch muscle, fast-twitch muscle, kidney, and gills. These experiments revealed no significant differences in relative outcomes when using *RPL13*, *EF-1 α* , and their combination as reference genes, whereas significant differences were identified when using the three least stable genes β 2M, β -actin and *GAPDH*. This result confirmed that stability evaluation using the four methods was both necessary and effective.

Based on our evaluations, we recommend that *RPL13*, *EF-1 α* , and their combination are the ideal reference gene combinations for all previously evaluated adult tissue types in *P. dentex*, as verified by four individual algorithms. The results of this study provide the basis for improved standardization of qRT-PCR and transcriptomic evaluations in this species, which in turn should support more accurate evaluation of functional genes and provide technical support for the comprehensive and systematic molecular evaluation of more mature *P. dentex* samples.

Key words *Pseudocaranx dentex*; qRT-PCR; Reference gene; Stability