

二倍体和四倍体泥鳅 qRT-PCR 分析中 内参基因优选

罗双双 高泽霞 冯 兵 张曼曼 曹文怡 周小云

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为筛选在泥鳅中稳定表达的内参基因, 以确保泥鳅基因表达分析结果的可靠性, 选取 *ACTB*、*TUBA*、*EF1A*、*GAPDH*、*TUBB* 和 18S rRNA 6 个常用的内参基因作为候选内参基因, 分别用 BestKeeper、geNorm、NormFinder、 ΔC_t 和 RefFinder 软件分析这 6 个基因在二倍体和四倍体泥鳅胚胎发育阶段、成鱼组织间以及倍性间表达的稳定性。结果显示, 在胚胎发育各阶段, *TUBB* 和 *TUBA* 的表达最稳定, 可作为胚胎发育阶段 qRT-PCR 分析的内参基因; 其中, *TUBB* 在泥鳅倍性间的表达差异不显著, 因此, 可作为泥鳅胚胎发育中跨倍性 qRT-PCR 研究的内参基因。在成鱼各组织中, *ACTB* 和 18S rRNA 的表达最稳定, 可用作组织间 qRT-PCR 分析的内参基因; 其中, 18S rRNA 在倍性间的组织表达差异不显著, 因此, 可作为泥鳅组织间跨倍性 qRT-PCR 的内参基因。

关键词 泥鳅; 二倍体; 四倍体; 多倍体鱼类; 表型变异; 基因表达变异; qRT-PCR; 内参基因; 稳定表达

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0001-08

在基因表达研究中, 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 以其灵敏度高、操作便利、可检测 mRNA 丰度范围广等优势而得到广泛的应用^[1]。但 qRT-PCR 的准确性和可靠性受到多种因素的影响, 如 RNA 质量、cDNA 的反转录效率、PCR 扩增效率等^[2], 而合适的内参基因可以消除这些潜在的误差, 并最终实现对不同样品定量数据的均一化^[3]。理论上, 理想的内参基因应在不同组织、不同发育时期、不同生理状况下均能稳定表达, 但大量研究表明, 这种理想的内参基因并不存在^[4]。选择内参基因最可靠的方法是: 在特定条件下, 对候选内参基因的表达稳定性进行排序, 筛选稳定性最好的作为内参基因^[5]。目前, 国内外学者已经在许多物种中, 如植物^[3]、哺乳动物^[6]、鱼类^[4, 7]等, 筛选出特定条件下较合适的内参基因。

泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 是一种常见的小型经济鱼类。已有的研究发现, 泥鳅的染色体存在广泛的核型多态性。日本的野生泥鳅中, 除二倍体 ($2n = 50$) 外, 还存在部分三倍体 ($3n = 75$)^[8]。我国的泥鳅不仅有二倍体, 在长江流域, 人们还发现有大量的四倍体 ($4n = 100$), 通过诱导雌

核发育、雄核发育、六倍体, 以及对减数分裂染色体行为的观察, 研究人员认为这些染色体数为 100 的泥鳅为同源四倍体, 是由二倍体泥鳅经过染色体加倍形成的^[8-10]。泥鳅的这种天然四倍体与二倍体共存的现象, 使之成为研究多倍体鱼类表型变异和基因表达变异的理想模式生物^[10], 但泥鳅基因表达分析中, 筛选最适宜的 qRT-PCR 内参基因的研究目前尚未见报道。

本研究选择目前广泛使用的 6 个内参基因——*ACTB* (β -actin)、*TUBA* (tubulin- α)、*EF1A* (elongation factor 1- α)、*GAPDH*、*TUBB* (tubulin- β) 和 18S rRNA 作为候选内参基因, 以二倍体和四倍体泥鳅不同发育阶段的胚胎和成鱼各组织为材料, 分别使用 5 种基因表达稳定性分析软件, 包括 BestKeeper^[11]、geNorm^[12]、NormFinder^[13]、 ΔC_t 软件^[6]以及在线综合分析软件 RefFinder^[14], 评价 6 个候选内参基因在二倍体、四倍体泥鳅胚胎发育时期、不同组织间以及倍性间的表达稳定性, 筛选最合适的 qRT-PCR 内参基因, 旨在为今后比较不同倍性泥鳅在各发育阶段、组织的基因表达差异研究提供便利。

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900205)

罗双双, 硕士研究生。研究方向: 鱼类表观遗传学。E-mail: 598874009@qq.com

通信作者: 周小云, 博士, 副教授。研究方向: 鱼类表观遗传学、鱼类遗传育种学。E-mail: zhouxy@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集二倍体、四倍体泥鳅各发育阶段的胚胎各 30 个,包括受精、2 细胞期、8 细胞期、64 细胞期、囊胚期、原肠中期、原肠晚期、神经胚期、肌节期、眼囊形成期、耳囊形成期、心跳期及破膜期。选取体型正常、无病无伤的 1 龄二倍体、四倍体泥鳅各 6 尾,分别取血液、皮肤、肌肉、肝脏、脾脏、肠、性腺、肾脏、心脏、鳃和脑 11 个组织。所有采集的样品在液氮中速冻 30 min 后,置于-80 ℃冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 合成及检测

用 Trizol 法提取各样品的总 RNA,分别用 NanoDrop 2000 分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳

检测其浓度、纯度及完整性。选择高质量的 RNA,用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, Japan)将其反转录为 cDNA。为检测反转录的效果,用泥鳅的 *ACTB* 和 *GAPDH* 基因设计引物,以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,若能得到明亮而单一的目的条带,则表明反转录效果良好,否则重新反转录。

1.3 候选内参基因 qRT-PCR 引物设计

基于泥鳅肝脏转录组数据(SRP127013),经生物信息学分析后得到 *ACTB*、*TUBA*、*EF1A*、*GAPDH*、*TUBB* 和 18S rRNA 共 6 个管家基因的部分 cDNA 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物(表 1),以 11 个成鱼组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物用 1%琼脂糖电泳检测

表 1 用于 qRT-PCR 分析的 6 个候选内参基因引物序列

Table 1 Primer sequences for six candidate reference genes used in the qRT-PCR analysis				
引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段大小/bp Amplicon length	扩增效率/% PCR efficiency	回归系数 Regression coefficient
ACTB	F:ACGGTATTGTGACCAACTGGGACG	179	97.7	0.998
	R:CATGGCAGGGGTGTTGAAGGTCT			
TUBA	F:GAGCCTACAGTCATTGATGAGGTCCG	105	106.1	0.995
	R:GCGGGCATAGTTATTCGCAGCAT			
EF1A	F:CTGGAGACAGCAAGAACGACCCACC	114	96.4	0.998
	R:GGCAATCCAGCACTGGAGCATAGCC			
GAPDH	F:TGACCCGTGCTGCTTTCCACTCC	220	95.9	0.998
	R:CCTGCATCACCCCACTTGATGTTG			
TUBB	F:CAGCGTAGTGCCCTCCCCTAAAGTCTCC	174	98.2	0.999
	R:AGGTCGCCGTATGTGGGTGTTGTGA			
18S rRNA	F:TCGTGATCGGGACTGGGGATTGCA	126	95.0	1.000
	R:AATCGGTTAGTAGCGACGGGCGGTGT			

引物的特异性。

1.4 荧光定量标准品的制备

验证 qRT-PCR 引物特异性良好后,以各样品的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,纯化回收 PCR 产物后,将其连接到质粒上形成重组质粒,将重组质粒导入感受态细胞中进行扩大培养,然后提取重组质粒,用紫外分光光度计测定重组质粒的浓度。根据公式 $N=C/(M\times 324.5)\times 6.02\times 10^{23}$ 计算单位体积重组质粒的拷贝数,其中, N 为每 μL 的拷贝数, C 为质粒浓度, M 为质粒的碱基数, 6.02×10^{23} 为阿弗加德罗常数。

取部分质粒原液,将其稀释为 1.0×10^9 copies/mL 的储存液,随后将储存液梯度稀释为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 copies/mL 的标准品。以标准品为模板进行 qRT-PCR 扩增,制作标准曲线,计算各定量引物的扩增效率。

1.5 qRT-PCR 反应

用 LightCycler® 480 实时荧光定量 PCR 系统进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 20 μL ,包括 $2\times$ SYBR Green Mix(TaKaRa)10 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL ,cDNA 1 μL ,ddH₂O 7.4 μL 。反应程序为:95 ℃预变性 5 s;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析,首先 95 ℃变性 15 s,然后从 60 ℃开始,按照 0.1 ℃/s 的速度逐渐上升到 95 ℃,连续记录荧光信号的变化。

1.6 数据处理及候选内参基因稳定性评估

将各样品的 Ct 值导出至 Excel 和 SPSS 软件中,分别用 BestKeeper、geNorm、NormFinder 软件和比较 ΔCt 法对各候选内参基因的表达稳定性进行分析,然后在线综合分析软件 RefFinder 评估 6 个候选内参基因在二倍体、四倍体泥鳅胚胎发育各阶段以及成鱼各组织中的表达稳定性,筛选最佳内参基因。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因引物特异性及扩增效率分析

分别用 6 个候选内参基因的引物进行 PCR 预扩增及熔解曲线检测,结果显示,PCR 产物的大小与目的条带一致、无引物二聚体,熔解曲线无杂峰、曲线重复性好(图 1),表明内参基因引物特异性良好。

为计算内参基因引物的扩增效率,以梯度稀释的重组质粒为模板进行 qRT-PCR 扩增并制作标准曲线,梯度 qRT-PCR 扩增曲线如图 2 所示。扩增效率分析结果显示,6 个候选内参基因引物的扩增效率为 95.0%~106.1%,表明引物扩增效率良好;回归系数为 0.995~1.000,表明计算得到的扩增效率值可靠(表 1)。

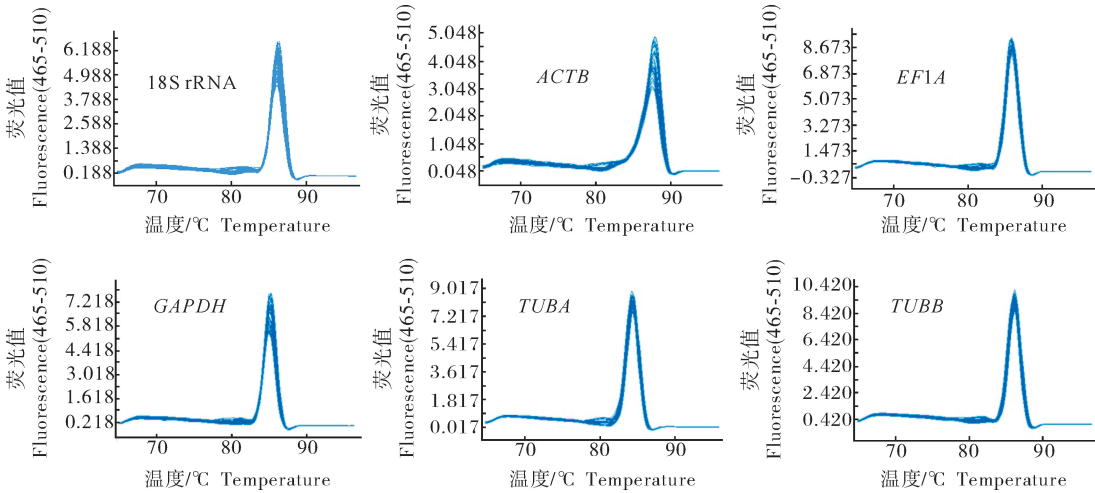


图 1 候选内参基因 qRT-PCR 的熔解曲线

Fig.1 Melting curvefor qRT-PCR of the six candidate reference genes

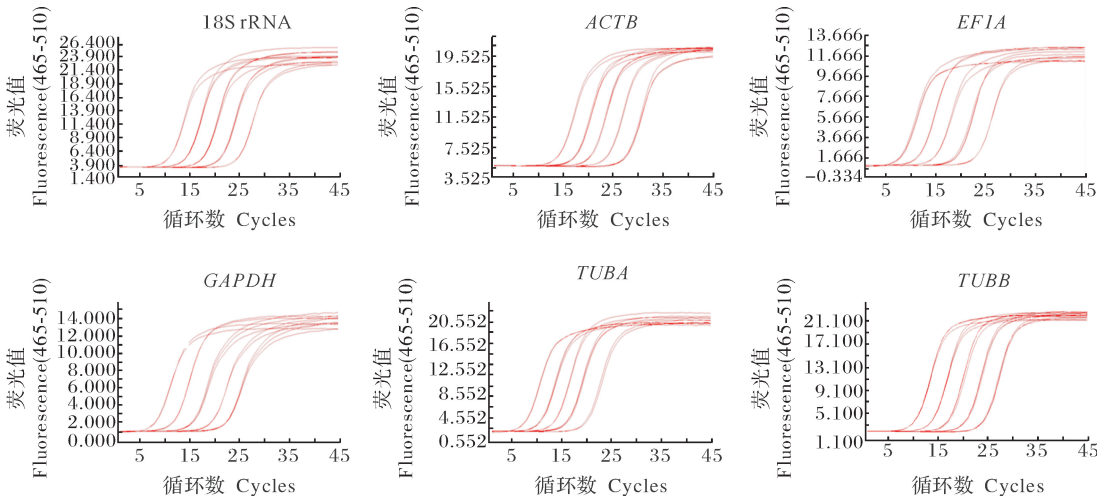


图 2 候选内参基因标准品扩增曲线

Fig.2 Amplification curves of standards for the candidate reference gene

2.2 候选内参基因的表达丰度分析

候选内参基因在胚胎发育各阶段及成鱼各组织中的绝对定量结果(Ct 值)如图 3 所示,6 个候选内参基因在胚胎发育及各组织中均有表达、无组织特异性,且在二倍体、四倍体泥鳅间的表达趋势相似。但 6 个基因的表达丰度存在明显的差异,其中,18S rRNA 的表达丰度在胚胎发育各阶段及成鱼各

组织中均较高,而 *TUBA*、*TUBB* 及 *GAPDH* 的表达丰度相对较低。

2.3 候选内参基因在胚胎发育中的表达稳定性

在二倍体泥鳅胚胎发育中,geNorm 分析结果显示;*TUBA*、*TUBB*、18S rRNA 和 *ACTB* 的 M 值均小于 1.5,因此,适合作为内参基因,其中,*TUBA* 和 *TUBB* 的 M 值最小,因此最稳定。用 BestKeep-

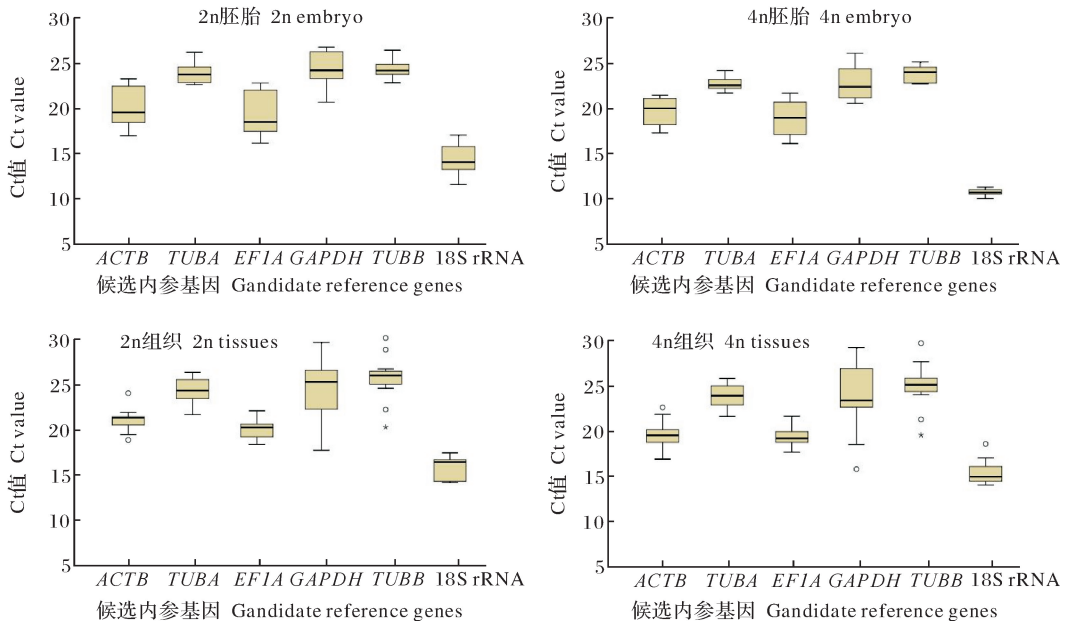


图 3 二倍体、四倍体泥鳅胚胎发育阶段和成鱼各组织候选内参基因表达丰度

Fig.3 Expression abundance (threshold cycles, Ct) of the six candidate reference genes in embryo developmental periods and adult tissues of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

er 分析的结果与 geNorm 的相似。用 NormFinder 和 ΔCt 软件分析得出的稳定性排序也基本相同: $TUBA > TUBB > 18S\ rRNA > ACTB > (GAPDH/EF1A)$ 。4 种软件分析得出的各基因的稳定性排序相似,但不完全相同(图 4)。因此,用 RefFinder 进行综合分析,结果显示,候选内参基因的稳定性排序依次为: $TUBA > TUBB > 18S\ rRNA > ACTB > GAPDH > EF1A$ 。

在四倍体胚胎发育中,geNorm 分析显示: $TUBB$ 、 $TUBA$ 、 $ACTB$ 、 $18S\ rRNA$ 和 $EF1A$ 均符合内参基因的条件($M < 1.5$),其中, $TUBB$ 和 $TUBA$ 的表达最稳定。用 BestKeeper 分析的结果与 geNorm 的结果差别较大: $18S\ rRNA$ 最稳定,其次为 $TUBA$ 。用 NormFinder 和 ΔCt 得出的结果相似: $(TUBB/TUBA) > (18S\ rRNA/ACTB) > (GAPDH/EF1A)$ (图 4)。用 RefFinder 分析显示,6 个基因的稳定性依次为: $TUBB > TUBA > 18S\ rRNA > ACTB > EF1A > GAPDH$ 。

2.4 候选内参基因在成鱼各组织中的表达稳定性

用 geNorm 等软件分析 6 个基因在血液、肝脏等 11 个组织中表达的稳定性,结果如图 5 所示。在二倍体泥鳅各组织中,geNorm 分析结果显示: $ACTB$ 和 $18S\ rRNA$ 的表达最稳定,而 $GAPDH$ 和 $TUBB$ 不符合内参基因的筛选条件($M > 1.5$)。BestKeeper 分析结果显示, $EF1A$ 表达最稳定,其

次为 $ACTB$ 和 $18S\ rRNA$ 。NormFinder 和 ΔCt 分析结果均显示, $ACTB$ 在各组织中的表达最稳定。综合软件 RefFinder 分析结果显示,6 个候选内参基因的稳定性依次为: $ACTB > 18S\ rRNA > EF1A > TUBA > TUBB > GAPDH$ 。

在四倍体泥鳅各组织中,用 geNorm 软件的分析结果与二倍体相似: $ACTB$ 和 $18S\ rRNA$ 最稳定,其次为 $EF1A$ 。BestKeeper 分析结果显示, $EF1A$ 的表达最稳定,其次为 $18S\ rRNA$ 和 $TUBA$ 。NormFinder 分析显示, $TUBA$ 的表达最稳定,其次为 $ACTB$ (图 5)。综合软件 RefFinder 分析结果,6 个基因的稳定性依次为: $ACTB > 18S\ rRNA > EF1A > TUBA > TUBB > GAPDH$,与二倍体相同。

2.5 候选内参基因在泥鳅不同倍性间的稳定性

为分析各基因在二倍体、四倍体泥鳅间表达的稳定性,即筛选出适用于泥鳅跨倍性分析的内参基因,对 6 个基因在胚胎发育各阶段、成鱼各组织的绝对定量值进行配对样本 t 检验,分析其绝对表达量是否存在倍性间差异。配对样本 t 检验结果显示,在胚胎发育各阶段, $TUBA$ 和 $18S\ rRNA$ 在二倍体、四倍体间的表达差异显著($P < 0.05$);而 $ACTB$ 、 $TUBB$ 、 $EF1A$ 和 $GAPDH$ 的表达无显著性差异($P > 0.05$),因此,可作为倍性间基因表达分析的内参基因(表 2)。结合上述各基因在二倍体、四倍体泥鳅胚胎发育阶段的稳定性, $TUBB$ 为泥鳅

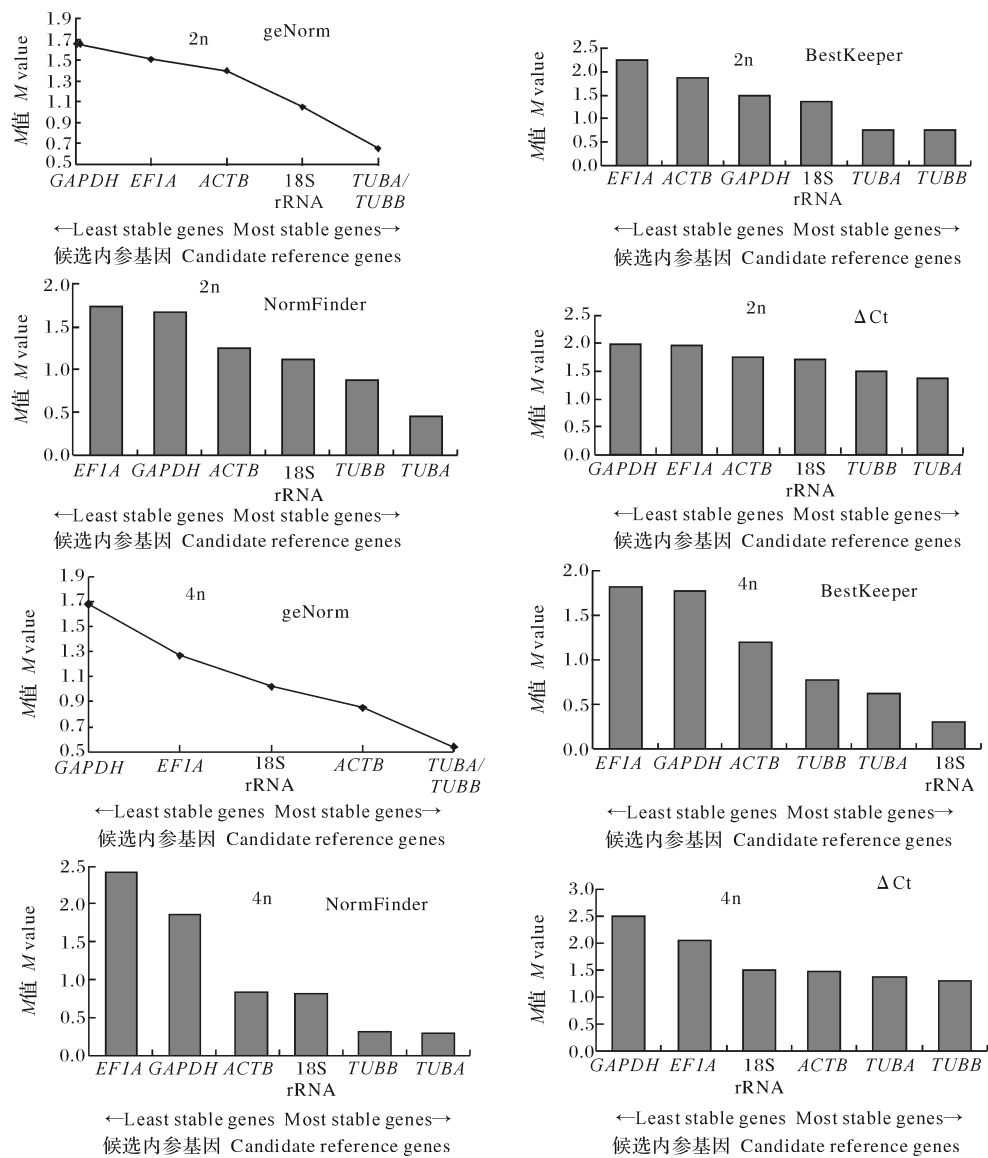


图 4 候选内参基因在二、四倍体胚胎发育时期稳定值排序

Fig.4 Stability values of the candidate reference genes in different embryo developmental periods of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

胚胎发育中最适合的跨倍性 qRT-PCR 研究的内参基因。

在成鱼各组织间, *ACTB* 和 *TUBB* 在二倍体、四倍体间的表达差异显著 ($P < 0.05$), 而 *TUBA*、*EF1A*、*GAPDH* 和 18S rRNA 在二倍体、四倍体各组织间的表达差异不显著 ($P > 0.05$)。结合上述各基因在二倍体、四倍体泥鳅各组织间的稳定性, 18S rRNA 可用作组织间跨倍性 qRT-PCR 研究的内参基因。

3 讨论

目前, qRT-PCR 已经成为基因表达研究中最常

用的方法。在 qRT-PCR 分析中, 内参基因的引入为原始定量数据的校正提供了基础, 使得基因在不同组织、不同发育阶段以及不同处理条件下样品中的表达比较结果可信。内参基因多是在管家基因 (house-keeping genes) 中筛选, 管家基因是一类在生命活动各时期、各组织中表达相对稳定的基因, 其基因表达产物是维持细胞基本生命活动所必需的^[15], 如构建细胞骨架结构的蛋白 (*ACTB*, *TUB*)、参与糖酵解相关的酶 (*GAPDH*)、蛋白质合成 (*EF1A*) 及核糖体的重要组成成分 (18S rRNA) 等。本研究分析了这 6 个常用的内参基因在二倍体、四倍体泥鳅胚胎发育阶段及成鱼各组织中的稳定性,

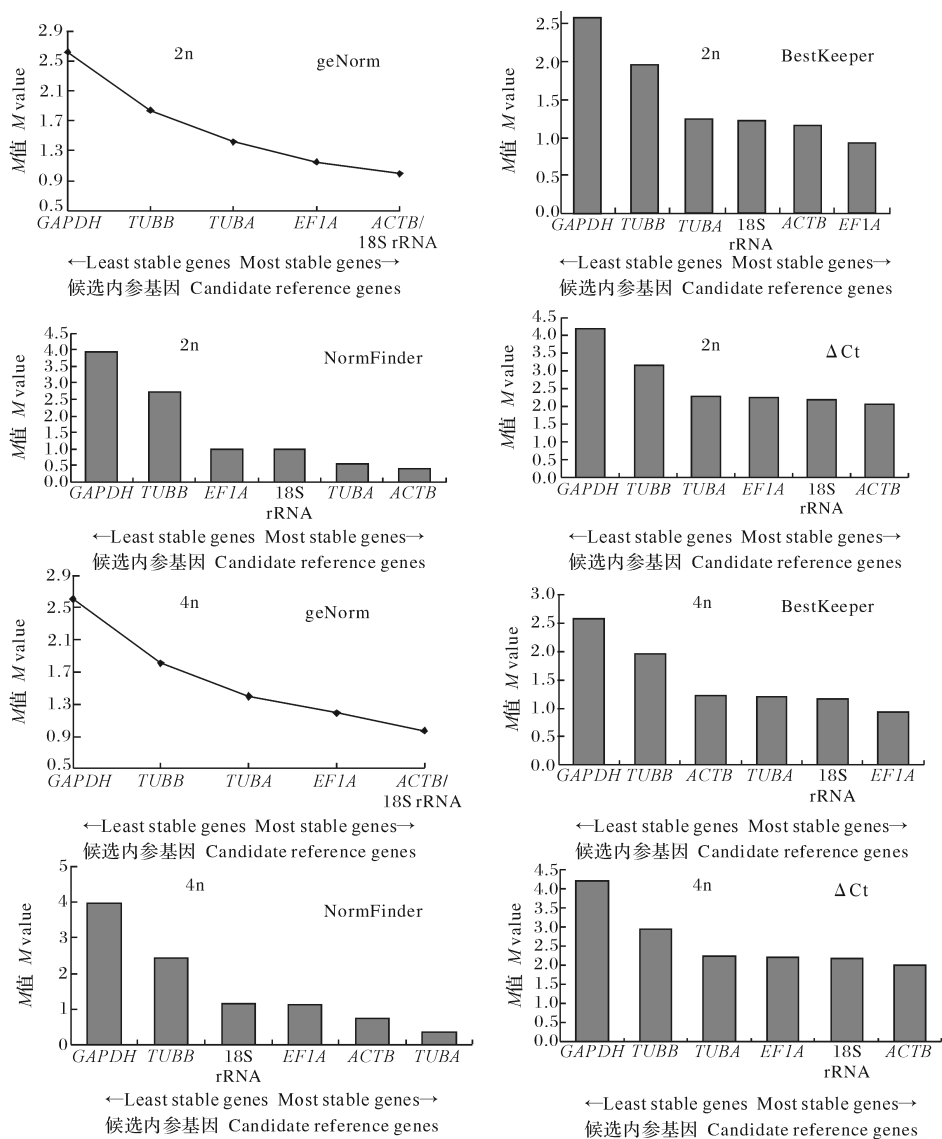


图 5 候选内参基因在二倍体、四倍体泥鳅各组织稳定值排序

Fig.5 Stability values of the six candidate reference genes in different tissues of diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus*

表 2 内参基因在二倍体、四倍体泥鳅间表达水平的配对样本 *t* 检验

Table 2 Paired sample <i>t</i> test of the expression level of the candidate reference genes in diploid and tetraploid <i>M. anguillicaudatus</i>			
候选内参基因 Candidate reference genes	相关系数 Correlation coefficient	两两配对相关性 <i>P</i> 值 <i>P</i> value of pairwise correlation	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
胚胎发育各阶段 Stages of embryonic development			
ACTB	0.824	0.001	0.974
TUBB	0.725	0.005	0.912
EF1A	0.903	0	0.305
GAPDH	0.444	0.129	0.116
TUBA	0.281	0.352	0.034
18S rRNA	−0.105	0.733	0
成鱼各组织 Tissues of adult fish			
18S rRNA	0.497	0.087	0.797
GAPDH	0.956	0	0.487
TUBA	0.988	0	0.417
EF1A	0.969	0	0.172
TUBB	0.995	0	0.024
ACTB	0.939	0	0.007

发现 *TUBB*、*TUBA* 和 18S rRNA 在胚胎发育各阶段的表达较为稳定,这与在文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)^[16]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[17]和比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)^[18]中的研究结论相似。在二倍体、四倍体泥鳅成鱼各组织中,*ACTB* 和 18S rRNA 2 个内参基因的表达较为稳定,这与在大西洋鲑(*Salmo salar*)^[19]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[20-21]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[22]和草鱼(*Oryzias latipes*)^[23]等研究中的结论相同。

近年来,基于微阵列和新一代测序技术的研究结果表明,大量的基因在不同物种间、不同倍体水平和不同组织间的转录水平存在差异^[24],但由于物种间没有通用的 qRT-PCR 内参基因,使得这种差异很难通过 qRT-PCR 分析得到准确的验证。其他基因表达水平检测方法,如检测转录比,即计算 mRNA 与基因组 DNA 浓度的比例,检测在每个转录组即单细胞中基因的表达丰度^[25],虽然理论上可以使结果更为精准,但这些方法大大增加了 qRT-PCR 实验的复杂性和难度。因此,本研究采用一种更直接的方法,即筛选出稳定的内参基因。泥鳅作为一种多种倍性共存的小型淡水鱼类,今后极可能会成为研究脊椎动物基因组多倍体化与物种进化等方向的模式动物。本研究中筛选得到的内参基因,为今后比较不同倍性泥鳅在各发育阶段、组织的基因表达差异研究提供了基础。

参 考 文 献

- [1] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective [J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34 (3): 597-601.
- [2] MAHONEY D J, CAREY K, FU M H, et al. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise [J]. Physiol genomics, 2004, 18(2): 226-231.
- [3] 肖翠, 严佳文, 龙桂友, 等. 柑橘内参基因的稳定性评价 [J]. 果树学报, 2012, 29(6): 978-984.
- [4] TANG R, DODD A, LAI D, et al. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization [J]. Acta Biochem Biophys Sin, 2007, 39(5): 384-390.
- [5] ROMANOWSKI T, MARKIEWICZ A, BEDNARZ N, et al. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR [J]. Postep Hig Med Dosw, 2007, 61(3): 500-510.
- [6] SILVER N, BEST S, JIANG J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J/OL]. BMC Mol Biol, 2006, 7: 33 [2019-05-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1609175>.
- [7] FILBY A L, TYLER C R. Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish [J/OL]. BMC Mol Biol, 2007, 8(1): 10 [2019-05-05]. <https://omictools.com/50982eb8b11c846e17483632f7e97025-protocol>.
- [8] ARAI K. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, recent progress and perspective [J]. Folia Biol (Kraków), 2003, 51 (suppl): 107-117.
- [9] LI Y J, YU Z, ZHANG M Z, et al. The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations [J]. Genetica, 2011, 139(6): 805-811.
- [10] 张曼曼, 冯兵, 罗双双, 等. 二倍体和四倍体泥鳅全基因组 DNA 甲基化的比较 [J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(5): 95-103.
- [11] 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]. Biotechnol Lett, 2004, 26 (6): 509-515.
- [12] VANDESOMPELE J, PRETER K D, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biol, 2002, 3(7): 1-11.
- [13] 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 [J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [14] XIE F, SUN G, STILLER J W, et al. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database [J/OL]. PLoS One, 2011, 6 (11): e26980 [2019-05-05]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026980>.
- [15] EISENBERG E, LEVANON E Y. Human housekeeping genes are compact [J]. Trends Genet, 2003, 19(7): 362-365.
- [16] ZHANG Q L, ZHU Q H, LIAO X, et al. Selection of reliable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR from different developmental stages and tissues in amphioxus [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 37549 [2019-05-05]. <https://www.nature.com/articles/srep37549>.
- [17] LIU C, XIN N, ZHAI Y, et al. Reference gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) at different developmental stages, in various tissue types and on exposure to chemicals [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(3): e91715 [2019-05-05]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091715>.
- [18] FERNANDES J M, MOMMENS M, HAGEN O, et al. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development [J]. Comp Biochem Phys B, 2008, 150(1): 23-32.

- [19] OLSVIK P A, LIE K K, JORDAL A E, et al. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon [J/OL]. BMC Mol Biol, 2005, 6(1):21[2019-05-05]. <https://www.researchgate.net/publication/7475772>.
- [20] PARK S J, KIM Y H, HUH J W, et al. Selection of new appropriate reference genes for RT-qPCR analysis via transcriptome sequencing of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(4):e60758[2019-05-05]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060758>.
- [21] MCCURLEY A T, CALLARD G V. Characterization of house-keeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment [J/OL]. BMC Mol Biol, 2008, 9(1):102[2019-05-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588455>.
- [22] ZHANG Z, HU J. 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]. Toxicol Sci, 2007, 95(2):356-368.
- [23] SU J, ZHANG R, 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 Immunol, 2011, 30(3): 830-835.
- [24] LOVEN J, ORLANDO D A, SIGOVA A A, et al. Revisiting global gene expression analysis [J]. Cell, 2012, 151(3): 476-482.
- [25] COATE J E, DOYLE J J. Quantifying whole transcriptome size, a prerequisite for understanding transcriptome evolution across species: an example from a plant allopolyploid [J]. Genome Biol Evol, 2010, 2(1):534-546.

Screening of optimal internal reference genes for qRT-PCR in diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*

LUO Shuangshuang GAO Zexia FENG Bing ZHANG Manman CAO Wenyi ZHOU Xiaoyun

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract To identify the optimal internal reference genes for qRT-PCR analysis in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), six commonly used reference genes, including *ACTB*, *TUBA*, *EF1A*, *GAPDH*, *TUBB* and 18S rRNA were selected as candidates, and their expression stability during different developmental stages, across-tissues and between-ploidy were evaluated by using BestKeeper, geNorm, NormFinder, ΔC_t and RefFinder software. The results showed that, during the process of embryonic development, the expression levels of *TUBB* and *TUBA* were more stable than the other genes, suggesting that they can be used as reference genes. Besides, the expression level of *TUBB* showed no significant difference between diploids and tetraploids ($P > 0.05$), suggesting it is the most suitable internal reference genes for qRT-PCR analysis during embryonic development between-ploidy. Among different tissues of diploids and tetraploids, the expression levels of *ACTB* and 18S rRNA were more stable than the other genes, thus they can be used as internal control genes. Of which, 18S rRNA was considered as the most suitable internal control genes, because the expression level of it exhibited no significant difference in different tissues between diploids and tetraploids ($P > 0.05$).

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; diploid; tetraploid; polyploid fish; phenotypic variation; gene expression variation; qRT-PCR; internal control genes; stable expression

(责任编辑:边书京)