

郭雪朋,文衍红,罗福广,等.梨形环棱螺qRT-PCR内参基因的筛选[J].华中农业大学学报,2025,44(6):253-262.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.025

梨形环棱螺qRT-PCR内参基因的筛选

郭雪朋¹,文衍红²,罗福广²,王志强²,祝东梅¹,周小云¹

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070;
2. 柳州市渔业技术推广站,柳州 545006

摘要 为筛选梨形环棱螺(*Bellamya purificata*)在不同发育阶段、不同组织以及性别间各组织中表达稳定的最佳qRT-PCR内参基因,分别用geNorm、NormFinder、BestKeeper软件和比较 ΔC_t 法,以及综合分析软件RefFinder评估*actb*、*18S*、*gapdh*、*ef1a*、*ef1b*、*rps3*、*rpl4*、*tuba*、*tubb*和*sdha*共10个候选基因在梨形环棱螺的胚胎阶段、幼螺阶段和雌雄成螺各组织中的表达稳定性。结果显示,候选内参基因在胚胎和幼螺阶段的表达稳定性依次为*gapdh*>*tuba*>*18S*>*ef1a*>*ef1b*>*rps3*>*actb*>*tubb*>*sdha*>*rpl4*,在雌螺各组织中的表达稳定性依次为*ef1b*>*tuba*>*rps3*>*ef1a*>*18S*>*actb*>*gapdh*>*sdha*>*tubb*>*rpl4*,在雄螺各组织中的稳定性依次为*ef1a*>*rps3*>*ef1b*>*rpl4*>*tuba*>*actb*>*18S*>*gapdh*>*tubb*>*sdha*,在性别间各组织中的稳定性依次为*ef1b*>*ef1a*>*rps3*>*tuba*>*18S*>*actb*>*gapdh*>*rpl4*>*sdha*>*tubb*。上述结果表明,*gapdh*和*tuba*为胚胎和幼螺阶段较适宜的qRT-PCR内参基因,*ef1b*和*tuba*为雌螺组织间较适宜的qRT-PCR内参基因,*ef1a*和*rps3*为雄螺组织间较适宜的qRT-PCR内参基因,*ef1a*和*ef1b*为性别间较适宜的qRT-PCR内参基因。

关键词 梨形环棱螺; qRT-PCR; 内参基因; 表达稳定性

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0253-10

基因表达分析是研究基因功能的基础。在众多的基因表达分析方法中,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)因具有较高的灵敏度、特异性和准确性优势而得到广泛应用^[1]。但在具体工作中,由于不同样品间可能存在RNA质量、完整性、反转录效率等差异,因此,qRT-PCR需要引入合适的内参基因以最大程度地降低这些差异^[2]。作为衡量目的基因表达水平的参照标准,理想的内参基因应是在研究对象的所有组织、各个发育阶段均稳定高水平表达,且不因生理状态、环境条件等出现明显的变化。然而,越来越多的研究发现,这种理想的内参基因基本不存在,某一基因的稳定表达仅发生于特定组织或特定条件下,而盲目使用未经证实的内参基因则会导致qRT-PCR结果准确性降低甚至得出相反或错误的结论^[3-4]。因此,在实际工作中,研究人员需要按照特定物种、组织类型和生理状况等筛选合适的内参基因以提高qRT-PCR结果的准确性。

梨形环棱螺(*Bellamya purificata*)、铜锈环棱螺

(*Bellamya aeruginosa*)和方形环棱螺(*Bellamya quadrata*)是我国主要的大中型环棱螺类,在广西地区统称为“螺蛳”。近年来,在全国推行的夜市经济和以“柳州螺蛳粉”为代表的加工产业,极大地促进了市场对优质环棱螺原材料的需求,这使得环棱螺养殖业迅猛发展^[5]。在规模化种养产业中,产量的提升和质量的改进在很大程度上依赖于品种的改良。然而,环棱螺属于新兴养殖种类,其遗传学背景信息薄弱,主要经济性状(如生长、出肉率等)的遗传基础和调控机理不明确,制约了环棱螺优良品种选育的进程。筛选适宜的qRT-PCR内参基因进而开展重要功能基因表达研究,是实施环棱螺新品种选育的基础,然而,目前尚未见关于环棱螺内参基因的研究报道。

与其他环棱螺相比,梨形环棱螺具有个体大、生长快、鲜味氨基酸含量高等特点,是最具开发潜力的种类,也是目前养殖生产和开展基础研究最多的种类^[6-7]。因此,筛选qRT-PCR最佳内参基因、准确评

收稿日期:2025-01-17

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD2400700)

郭雪朋,E-mail:1610351580@qq.com

通信作者:周小云,E-mail:zhouxy@mail.hzau.edu.cn

估性状关联基因的表达水平,对精准实施梨形环棱螺新品种选育具有重要意义。在水产动物中,构成细胞骨架主要成分的 β -actin(*act\beta*)、编码核糖体亚基的18S ribosomal RNA(18S)、ribosomal protein S3(*rps3*)和ribosomal protein L4(*rpl4*)、参与mRNA翻译合成蛋白质的elongation factor 1 α (*ef1\alpha*)和elongation factor 1 β (*ef1\beta*)、构成细胞内微管的 α -tubulin(*tuba*)和 β -tubulin(*tub\beta*)、参与糖酵解和糖异生的关键酶glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*gapdh*)以及线粒体呼吸链复合体II的主要催化亚基succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A(*sdha*)等属于管家基因(house-keeping gene),通常认为这些基因在不同组织和细胞中均稳定表达,因此常被选作qRT-PCR的内参基因^[8-10]。本研究选择上述10个基因作为候选基因,以梨形环棱螺不同发育阶段的胚胎、幼螺以及雌雄成螺各组织为材料,分别用geNorm^[2]、NormFinder^[11]、BestKeeper^[12]、比较 Δ Ct法^[13]以及综合分析软件ReffInfer^[14]评估10个候选基因在梨形环棱螺不同发育阶段、不同组织间以及雌雄性别间的表达稳定性,筛选表达最稳定、最合适的qRT-PCR内参基因,旨在为后续环棱螺重要功能基因的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及样品采集

研究所用梨形环棱螺为笔者所在实验室人工养殖个体。选取螺壳完整无破损、活动力强的1龄雌雄个体各9个,解剖取头部肌肉、腹足肌肉、肝脏、外套膜、鳃、肠道、胃、心脏、肾脏、精巢和卵巢组织;收集雌螺子宫内不同发育阶段的胚胎,包括受精卵、卵裂期、囊胚期、担轮幼虫期、面盘幼虫期、匍匐幼虫期、仔螺形成期。另取100个体质健壮的雌螺,用短期阴干和升温刺激的方法催产获得约300个螺苗,于水泥池中进行养殖,收集1周龄、2周龄、3周龄、4周龄、2月龄的个体各30个。所有样品在液氮中速冻后转移至-80℃保存。

1.2 RNA提取及与反转录

用Trizol法提取上述各样品的总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳评估所提取RNA的完整性,用NanoDrop 2000分光光度计检测浓度和纯度。取28S:18S值为2~2.7:1、OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值为1.8~2.0的9个个体的RNA,将每3个个体的RNA等量混合作为1个样本。用HiScript®III RT SuperMix for qPCR

(+gDNA wiper)试剂盒将各RNA样本反转录成cDNA后置于-20℃保存备用。

1.3 引物设计及PCR扩增

从笔者所在实验室前期测序获得的梨形环棱螺转录组中提取10个候选内参基因(*act\beta*、18S、*gapdh*、*ef1\alpha*、*ef1\beta*、*rps3*、*rpl4*、*tuba*、*tub\beta*和*sdha*)的CDS序列,用Primer Premier 6.0设计各基因的荧光定量引物如表1所示,以成螺各组织的cDNA为模板,用各候选基因的引物进行PCR扩增。PCR体系共20 μ L,含2 \times GS Taq PCR Mix 10 μ L, Forward/Reverse Primer (10 μ mol/L)各0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L;程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 15 s, 循环34次;72℃延伸5 min。用1%琼脂糖凝胶电泳对引物的特异性进行评估。

1.4 候选内参基因扩增效率计算

以成螺11种组织的cDNA作为母液,进行5倍梯度稀释,对稀释后的cDNA(5⁰、5⁻¹、5⁻²、5⁻³和5⁻⁴)进行qRT-PCR扩增,每个样本设置3次重复。分析定量结果并建立稀释浓度与Ct值的标准曲线,计算每个基因的扩增效率及其回归系数(R²)。

1.5 qRT-PCR反应

qRT-PCR反应在Applied Biosystems® QuantStudio™ 7 Flex实时定量PCR仪上进行。反应体系为:2 \times SYBR PreMix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 10 μ L, Forward/Reverse Primer (10 μ mol/L)各0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, 加ddH₂O至20 μ L。程序为:95℃ 30 s;95℃ 5 s, 60℃ 15 s, 72℃ 15 s, 循环40次。扩增完成后,检测各反应的熔解曲线,程序为:95℃变性15 s后,从60℃起,以0.1℃/s的速率程序性升温至95℃,同时收集荧光信号变化情况。

1.6 候选内参基因稳定性分析

导出各原始Ct值(cycle threshold)至Excel中,依次用geNorm、NormFinder、BestKeeper软件和比较 Δ Ct法分析各候选基因在胚胎、幼螺、成螺不同组织和性别间各组织中的表达稳定性。其中,geNorm和NormFinder软件是在计算出每个样本每个基因的相对定量值(2^{- Δ Ct})的基础上,比较每个基因的稳定性值,值越小表明基因表达越稳定;geNorm软件还能分析一定条件下最佳内参基因数目,即计算内参基因两两组合的变异系数(V值),当V_n/V_{n+1}值小于0.15时,认为使用n个内参基因是足够的,否则需要增加内参基因的数量;BestKeeper利用各样本的Ct值计算标准差(standard deviation, SD)与变异系数

表 1 本研究所用的 10 个候选内参基因引物特征

Table 1 Characteristics of 10 candidate reference gene primers used in this study

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Amplicon length	扩增效率/% PCR efficiency	回归系数 Regression coefficient
<i>18S</i>	F: TGACATGGGTGATGGGATGC R: ACTGAAATACTGCCCGTGCT	179	108.36	0.992
<i>ef1α</i>	F: CACATTGGGTGTGAAGCAGC R: TGTAGCTGCCGACCTCTTTC	110	104.47	0.999
<i>gapdh</i>	F: AATGGCTTTGGTTCGATTGG R: ACGGTGCCCTTGATGTTCC	155	105.01	0.999
<i>rpl4</i>	F: CGTCAGTGGCATCGCAAAAT R: AATGCGCTTCAGCAAAGCAA	198	103.36	0.995
<i>rps3</i>	F: AGGTGGTGGTTTCTGGCAAA R: CCTTGATCCCAAGCACACCT	153	105.22	0.998
<i>tuba</i>	F: TGGGTCCGGTTTCACATCTC R: TACCATGAAGGCACAGTCCG	178	98.76	0.999
<i>tubβ</i>	F: CTGTGACTGCCTGCAAGGAT R: AAGTTGGTGAACGGACAGGG	199	95.53	0.994
<i>actβ</i>	F: CACTGGCATCGTCTTGGACT R: CTCGGCTGTTGTGGTAAAGC	172	96.78	0.991
<i>ef1β</i>	F: CGCTGGTGACGCAAAAGAAG R: TCCCAAGGTTTCACGTCCAG	186	107.00	0.998
<i>sdha</i>	F: CTTGCACCTCTGCTCACACT R: ACAAGGAAACCACCTCACC	163	107.17	0.994

(coefficient of variation, CV), SD 和 CV 值越小表明其表达越稳定; Δ Ct 法比较各 Ct 值的平均标准差, 值越小表明该基因越稳定。最后用在线软件 RefFinder 综合上述 4 种方法的分析结果, 确定最适宜的内参基因。

2 结果与分析

2.1 引物质量检测

用普通 PCR 检测 10 个候选基因引物的特异性, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析显示, 所有候选基因的 PCR 产物条带单一、大小与目标片段一致、无引物二聚体(图 1A)。同时, 所有候选基因的溶解曲线均呈单一主峰、曲线重复性良好(图 1B~K), 说明各候选基因的引物有较高的特异性, 可用于后续 qRT-PCR 研究。用梯度稀释的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增, 绘制标准曲线分析候选基因的扩增效率, 结果显示, 10 对引物扩增效率范围为 95.53%~108.36%, 表明所设计的引物扩增效率良好; 回归系数 (R^2) 范围为 0.991~0.999(表 1), 符合 $R^2>0.980$ 的要求。

2.2 候选内参基因表达丰度

候选内参基因在胚胎和幼螺的各发育阶段, 以及雌、雄成螺的各个组织中均有表达, 无组织特异

性, Ct 值范围为 12.81~28.92(见网络版, 附表 1)。但 10 个候选基因在表达丰度上呈现出明显的差异, 其中, *ef1α* 在各个发育阶段(图 2A)、雌性成螺各组织(图 2B)和雄性成螺的各组织(图 2C)的表达丰度均最高, 而 *18S* 的表达丰度均最低(图 2A~C); 性别间各组织中的表达丰度亦是如此(图 2D)。此外, *gapdh* 和 *tuba* 在胚胎及幼螺各阶段间的 Ct 值离散程度较低(图 2A), *ef1α* 和 *ef1β* 在雌雄成螺各组织中的 Ct 值离散程度较低(图 2B~D), 表明他们具有相对稳定的表达水平。

2.3 候选内参基因表达稳定性

1) geNorm 分析结果。以各样本 qRT-PCR 的 Ct 值为基础, 用 geNorm 计算各候选基因的平均表达稳定性值 (M), 内参基因的 M 值应小于 1.5, 并且 M 值越小稳定性越好。结果显示, 除 *tubβ* 在雄螺各组织、性别间各组织中的 M 值大于 1.5 外, 其余候选内参基因的 M 值均小于 1.5(图 3A)。为确定一定条件下最佳内参基因数目, 本研究用 geNorm 分析了配对变量值 V_n/V_{n+1} , 结果显示, 在胚胎和幼螺不同发育阶段, $V_3/V_4<0.15$, 因此建议选择 3 个内参基因降低系统偏差; 雌性、雄性成螺不同组织中的 V_2/V_3 均小于 0.15, 表明 2 个内参基因即可满足归一化指标; 性别

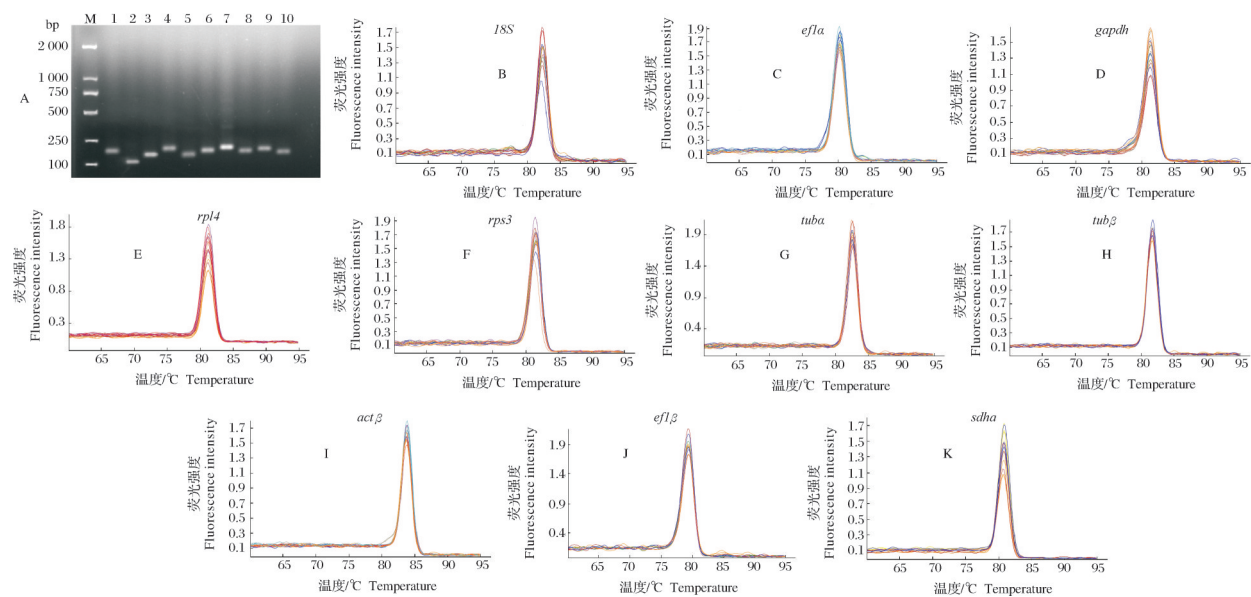


图 A 中 M 和 1~10 分别代表 marker、*18S*、*ef1a*、*gapdh*、*rpl4*、*rps3*、*tuba*、*tubβ*、*actβ*、*ef1β* 和 *sdha* 的 PCR 产物电泳结果;图 B~K 为各基因的 qRT-PCR 溶解曲线,顺序同图 A。The M and 1~10 in figure 1A represent electrophoresis results of PCR products of marker, *18S*, *ef1a*, *gapdh*, *rpl4*, *rps3*, *tuba*, *tubβ*, *actβ*, *ef1β* and *sdha*, respectively. Figure B-K exhibit the qRT-PCR melting curve of each gene, with the order as in figure A.

图 1 候选内参基因的引物特异性 PCR 产物电泳检测结果(A)和 qRT-PCR 溶解曲线(B~K)

Fig.1 Primer-specific PCR product electrophoresis detection results (A) and qRT-PCR melting curve (B-K) of the candidate reference genes

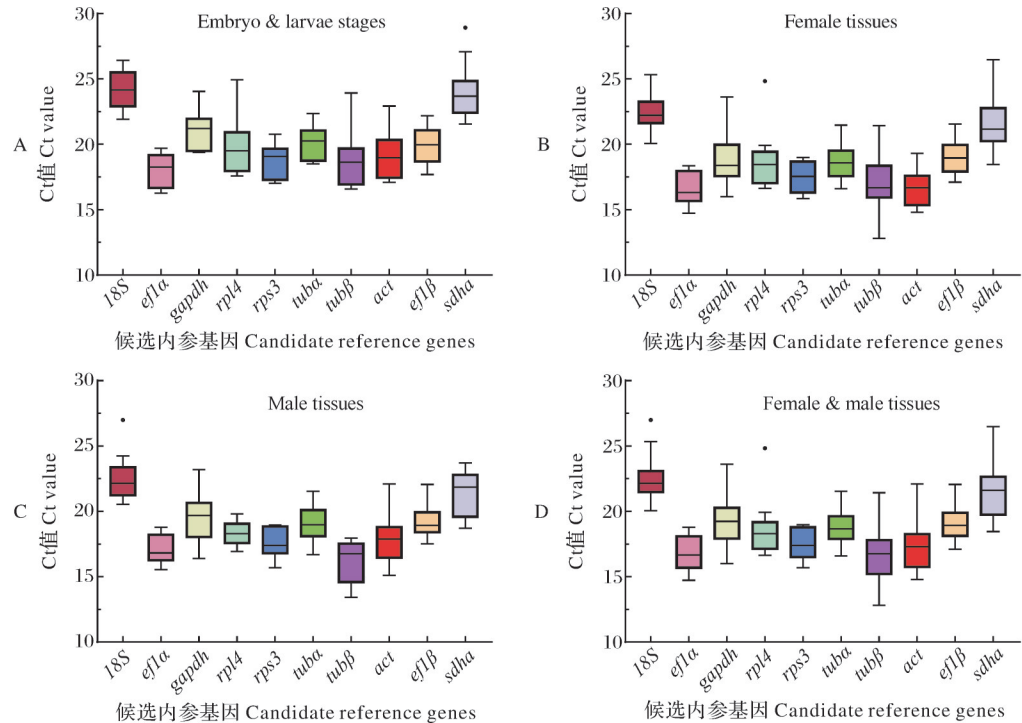
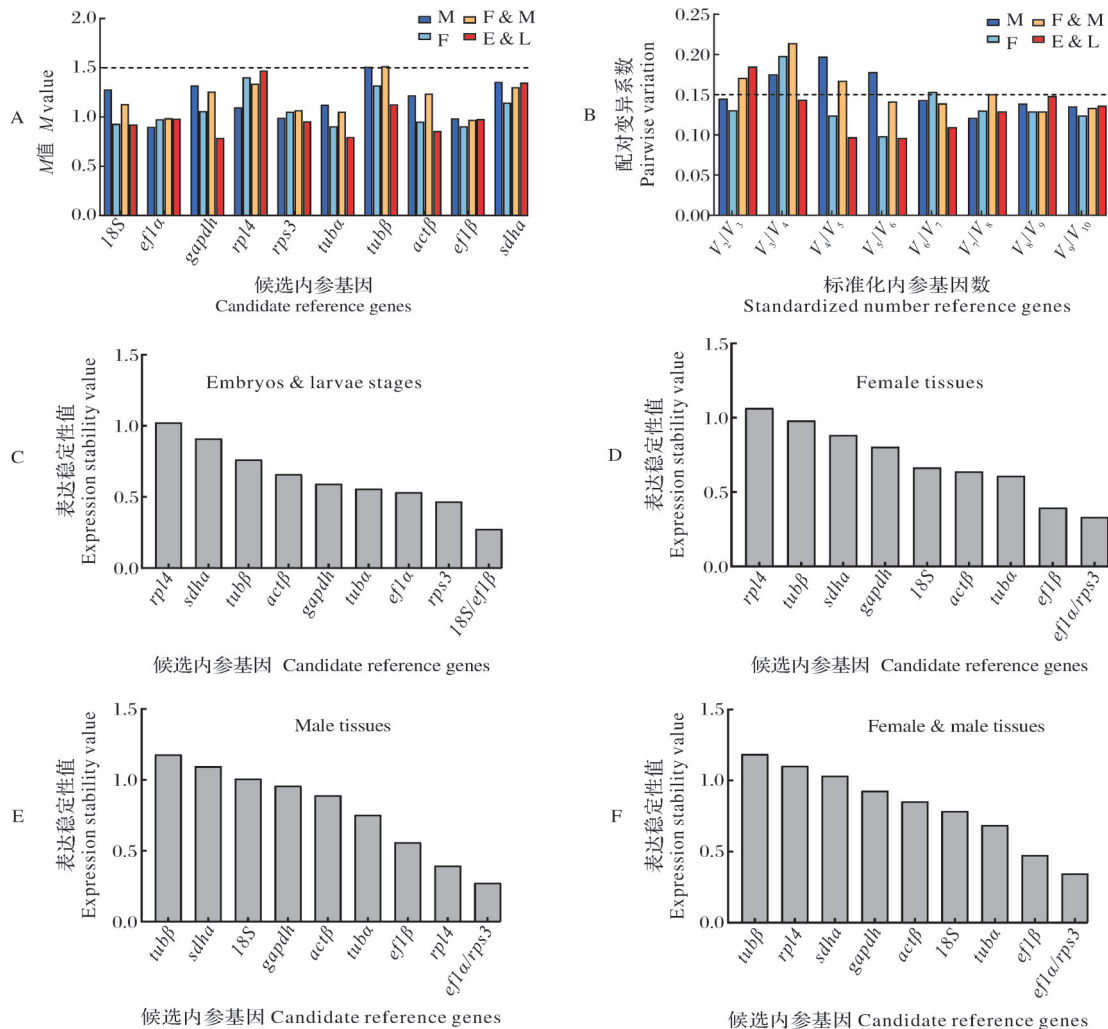


图 2 候选基因在梨形环棱螺胚胎和幼螺各阶段(A),以及雌螺(B)、雄螺(C)和性别间(D)各组织中的表达丰度

Fig.2 Expression abundance of the candidate genes in embryo and larvae stages (A), as well as in adult tissues of female (B), male (C) and female-male mix (D) of *B. purificata*

间各组织中, $V_5/V_6 < 0.15$, 因此建议用 5 个内参基因校正系统偏差(图 3B)。稳定性排序结果显示, 在胚胎和幼螺的各个阶段, *ef1β* 和 *18S* 表达最稳定(图 3C); 在雌螺、雄螺不同组织中以及性别间各组织中,



图A为各候选基因的表达稳定性值(M值),图B中V值为内参基因两两组合的变异系数,图A和B中的M、F、F&M和E&L分别代表雄螺不同组织、雌螺不同组织、性别间各组织、以及胚胎和幼螺的不同发育阶段。Figure A shows the expression stability values (M values) of each candidate gene. The V value in figure B represents the variation coefficient of pairwise combinations of reference genes. The M, F, F & M and E&L in figure A and B represent male tissues, female tissues, tissues of between-sex and embryo & larvae stages, respectively.

图3 基于geNorm分析的10个候选基因表达稳定性M值(A)、最佳内参基因数(B)及表达稳定性排序(C~F)

Fig. 3 The expression stability M-value (A) and optimal reference gene number (B), as well as stability ranking (C~F) of the 10 candidate genes based on geNorm analysis

*ef1a*和*rps3*表达最稳定(图3D~F)。

2) NormFinder分析结果。以各样本qRT-PCR的Ct值为基础,用NormFinder软件比较各候选基因的表达稳定性。结果显示,在胚胎和幼螺的各个发育阶段,*gapdh*表达最稳定,其次为*tuba*;在雌性成螺各组织中,*ef1b*表达最稳定,其次为*18S*;在雄性成螺各组织中,*ef1a*表达最稳定,其次为*ef1b*;在性别间各组织中,*ef1b*最稳定,其次为*ef1a*(表2)。

3) BestKeeper分析结果。如表3所示,在胚胎和幼螺的各发育阶段,*ef1a*和*tuba*的SD值和CV值均较小,因此为表达较稳定的基因;在雌螺不同组织中,*rps3*和*tuba*的SD值和CV值均较小,因此为表达

较稳定的基因;在雄螺不同组织中,*rpl4*和*ef1b*为表达较稳定的基因;在性别间各组织中,*ef1b*和*rps3*的表达较稳定。

4) Δ Ct分析结果。 Δ Ct分析是通过计算Ct值变化量来评估候选内参基因的表达稳定性。分析结果显示,在胚胎和幼螺的不同发育阶段,*tuba*和*gapdh*的表达较稳定(图4A);雌性成螺不同组织中,*tuba*和*ef1b*的表达较稳定(图4B);雄性成螺不同组织中,*ef1a*和*ef1b*的表达较稳定(图4C);性别间各组织中,*ef1b*和*ef1a*的表达较稳定(图4D)。

5) RefFinder分析结果。分析上述4种算法(geNorm、NormFinder、BestKeeper软件和比较 Δ Ct法)

表 2 基于 NormFinder 分析的 10 个候选基因表达稳定性值

Table 2 Expression stability values of the 10 candidate genes based on NormFinder software analysis

候选内参基因 Candidate reference gene	胚胎和幼螺阶段 Embryo and larvae stages	雌螺各组织 Female tissues	雄螺各组织 Male tissues	性别间各组织 Tissues of between-sex
<i>18S</i>	0.440	0.364	0.675	0.523
<i>ef1a</i>	0.510	0.486	0.185	0.369
<i>gapdh</i>	0.139	0.516	0.761	0.665
<i>rpl4</i>	0.935	0.801	0.520	0.701
<i>rps3</i>	0.507	0.579	0.384	0.473
<i>tuba</i>	0.212	0.371	0.487	0.428
<i>tubβ</i>	0.601	0.769	0.917	0.918
<i>actβ</i>	0.246	0.431	0.674	0.668
<i>ef1β</i>	0.537	0.340	0.339	0.324
<i>sdha</i>	0.807	0.630	0.760	0.692

表 3 基于 BestKeeper 分析的 10 个候选基因表达稳定性参数

Table 3 Stability parameter of the 10 candidate genes based on BestKeeper software analysis

组别 Group	Ct 参数 Ct parameter	<i>18S</i>	<i>ef1a</i>	<i>gapdh</i>	<i>rpl4</i>	<i>rps3</i>	<i>tuba</i>	<i>tubβ</i>	<i>actβ</i>	<i>ef1β</i>	<i>sdha</i>
E&L	SD	1.32	1.01	1.12	1.86	1.06	1.05	1.44	1.29	1.23	1.63
	CV/%	5.45	5.60	5.33	9.28	5.68	5.20	7.66	6.73	6.17	6.76
F	SD	1.12	1.11	1.55	1.58	1.07	1.08	1.70	1.16	1.11	1.64
	CV/%	5.00	6.65	8.25	8.45	6.15	5.81	10.00	6.93	5.84	7.62
M	SD	1.38	1.00	1.45	0.77	0.99	1.14	1.38	1.44	0.95	1.55
	CV/%	6.11	5.87	7.40	4.22	5.64	5.97	8.54	8.08	4.94	7.26
F&M	SD	1.24	1.06	1.57	1.20	1.03	1.14	1.48	1.36	1.02	1.58
	CV/%	5.52	6.29	8.16	6.47	5.85	6.02	8.91	7.87	5.32	7.36

注:表中M,F,F&M和E&L分别代表雄螺不同组织、雌螺不同组织、性别间各组织,以及胚胎和幼螺的不同发育阶段。Note:The M,F,F&M and E&L in table represent male tissues ,female tissues ,tissue of between-sex and embryo & larvae stages ,respectively.

的结果发现,不同算法得出的候选基因稳定性排序相似,但并不完全相同。在线网站 RefFinder 可将 4 种分析方法的结果赋予一定加权比后重新进行评估,得到综合性的排序结果。鉴于此,本研究进一步用 RefFinder 软件对 10 个候选基因的稳定性进行综合排序,结果显示,在胚胎和幼螺的各个发育阶段,10 个候选基因的表达稳定性依次为 *gapdh*>*tuba*>*18S*>*ef1a*>*ef1β*>*rps3*>*actβ*>*tubβ*>*sdha*>*rpl4*(图 5A);在雌螺不同组织中的表达稳定性依次为 *ef1β*>*tuba*>*rps3*>*ef1a*>*18S*>*actβ*>*gapdh*>*sdha*>*tubβ*>*rpl4*(图 5B);在雄螺不同组织中的表达稳定性依次为 *ef1a*>*rps3*>*ef1β*>*rpl4*>*tuba*>*actβ*>*18S*>*gapdh*>*tubβ*>*sdha*(图 5C);在性别间各组织中的表达稳定性依次为 *ef1β*>*ef1a*>*rps3*>*tuba*>*18S*>*actβ*>*gapdh*>*rpl4*>*sdha*>*tubβ*(图 5D)。

3 讨 论

内参基因的稳定性直接决定了 qRT-PCR 结果的准确性,因此,选用合适的内参基因对 qRT-PCR 非常重要^[15]。鉴于此,在实际工作中,应针对特定的对象和条件,用不同软件评估、比较多个候选内参基因的表达稳定性,选择其中最稳定的作为内参基因。本研究分别采用 geNorm、BestKeeper、NormFinder 和 ΔCt 对 10 个常用的候选内参基因在梨形环棱螺不同发育阶段、雌雄成螺不同组织以及性别间各组织中的表达稳定性进行评估,结果显示,虽然排名趋势基本相似,但不同的软件分析得到的内参基因稳定性排序略有差异。以 *rps3* 为例,基于 geNorm 和 BestKeeper 的分析显示 *rps3* 在雌雄成螺各组织间的稳定性较好,而基于 NormFinder 和 ΔCt 的分析结果显示其稳定性排名稍微靠后,这可能是由于不同软件采用的统计模型不同所致^[16],这种现象也在青鳉(*Ory-*

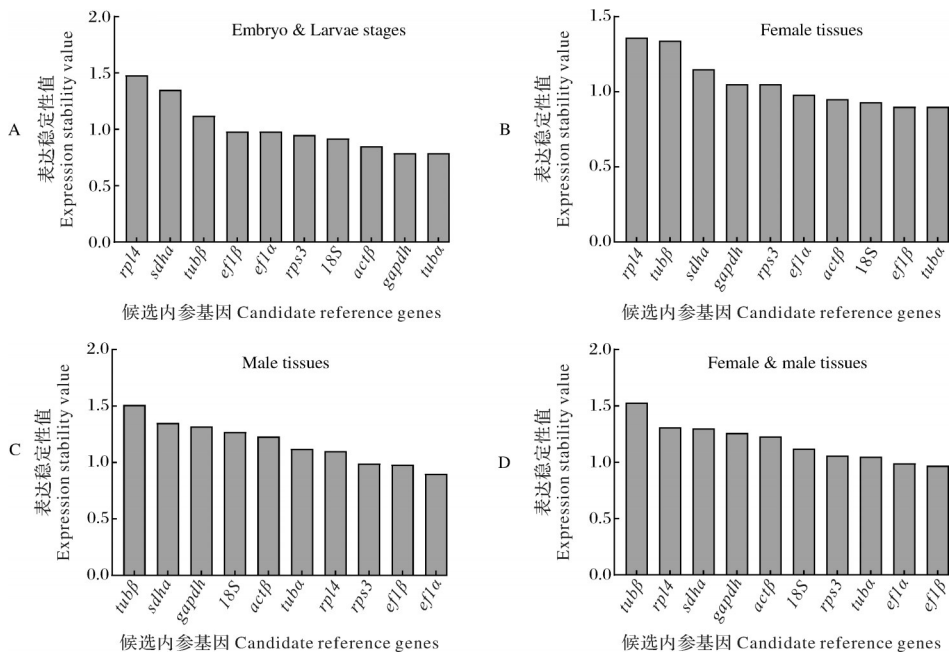


图 A,B,C 和 D 分别表示各候选内参基因在胚胎和幼螺的不同发育阶段、雌螺不同组织、雄螺不同组织和性别间各组织中的表达稳定性值。下同。Figure A,B,C 和 D shows the expression stability values of each candidate gene in embryo and larvae stages, female tissues, male tissues and tissues of between-sex, respectively. The same as below.

图 4 基于比较 ΔCt 法的 10 个候选基因稳定性

Fig. 4 Stability of the 10 candidate genes based on comparative ΔCt method

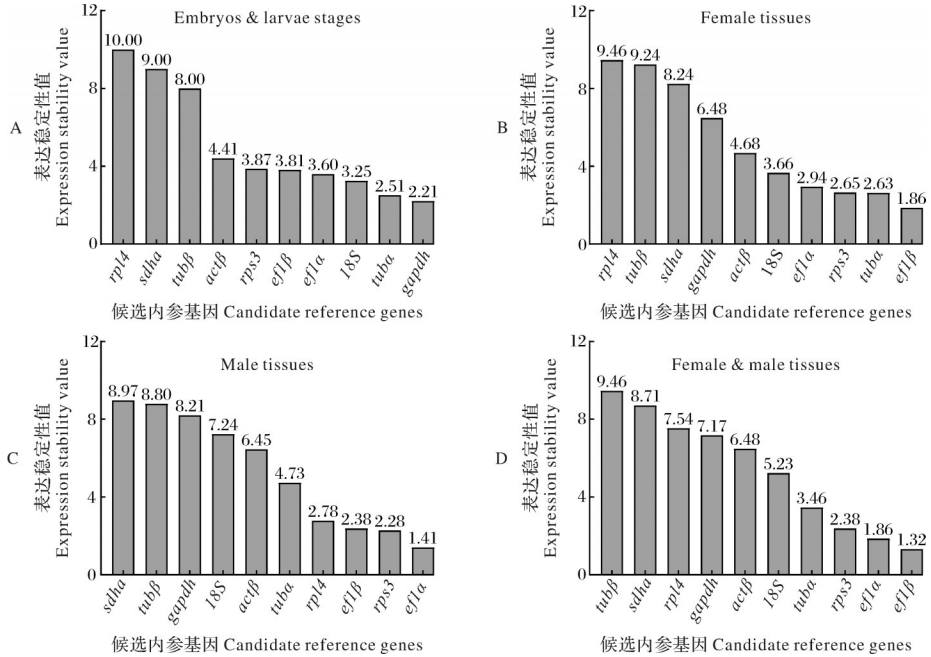


图 5 基于 RefFinder 软件分析的 10 个候选基因稳定性

Fig. 5 Expression stability of the 10 candidate genes analyzed by RefFinder software

zias latipes)^[17]、胡子鲇 (*Clarias fuscus*)^[18]、青鲫 (*Carassius indigentiaus*)^[19]等的研究结果中出现。因此,为了减少由于统计模型不同造成的误差,本研究进一步采用综合分析软件 RefFinder 对上述 4 个软件的排序结果进行优化,结果显示,在胚胎和幼螺的不

同发育阶段, *gapdh* 和 *tuba* 表达稳定性较好;而在雌雄成螺不同组织中, *ef1a* 和 *ef1p* 的表达稳定性则较好。因此, *gapdh* 和 *tuba* 可作为胚胎和幼螺不同发育阶段的 qRT-PCR 内参基因,而 *ef1a* 和 *ef1p* 可作为雌雄成螺不同组织中的 qRT-PCR 内参基因。

延伸因子 1α (EF1 α) 和 1β (EF1 β) 是真核生物蛋白质翻译的关键因子, 其中, EF1 α 在蛋白质翻译过程中将氨基酰 tRNA 运送到核糖体 A 位点从而促进多肽链的延伸, 而 EF1 β 则催化 EF1 α ·GDP 转换成 EF1 α ·GTP, 并使 EF1 α 恢复转运氨基酰 tRNA 的活性, 以调控肽链正常延伸, EF1 α 和 EF1 β 在真核生物中的结构和功能高度保守, 在细胞内的含量仅次于肌动蛋白^[20]。efl α 的稳定性表达已经在多个物种中得到证实, 并常被选作水产动物的内参基因, 比如在大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[21-22]、达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*)^[23]、大鲵 (*Andrias davidianus*)^[24] 和梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[25] 中的研究发现, efl α 的表达均最稳定; 甚至在异育银鲫^[26]、大鲵 (*A. davidianus*)^[24] 和梭子蟹 (*P. trituberculatus*)^[25] 病理状态下, efl α 的表达依然被证实是最稳定的。有研究发现, 在虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)^[27] 中, efl β 在其早期发育阶段、成贝不同组织中和性腺发育的不同阶段均比其他常用内参基因表达更稳定; 在高粱蚜虫 (*Melanaphis sacchari*) 中, efl β 在不同组织中、不同发育阶段以及不同温度条件下均能稳定表达, 因此被认为是高粱蚜虫的最佳内参基因^[28]。本研究分析发现, 在雄性成螺不同组织、雌性成螺不同组织以及性别间各组织中, efl α 和 efl β 的表达均是最稳定的, 与已有的研究报道比较类似。因此, 本研究确定 efl α 和 efl β 为雌雄成螺不同组织以及性别间各组织中 qRT-PCR 的适宜内参基因。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 是糖酵解和糖异生过程的关键酶, 并在 DNA 复制、细胞外分泌和细胞骨骼结构方面发挥重要作用^[29]。作为管家基因中的重要成员, gapdh 几乎在所有组织中都高水平表达, 并高度保守^[30], 因此, gapdh 常被用于基因表达数据的标准化。本研究发现, 在梨形环棱螺胚胎及幼螺不同发育阶段, gapdh 的表达最稳定, 类似的结果在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)^[31] 中也有报道。然而, gapdh 用作 qRT-PCR 的内参基因也存在一定的争议, 比如, Tang 等^[32] 在对斑马鱼胚胎发育研究中发现, gapdh 是 9 种候选内参基因中表达最不稳定的, 因此最不适合用作斑马鱼胚胎阶段的内参基因。Glare 等^[33] 认为, gapdh 是糖酵解和糖异生过程的关键酶, 容易不稳定, 而本研究中的梨形环棱螺样品来自笔者所在实验室人工养殖, 饲料投喂稳定, 这可能是本研究中 gapdh 表达稳定的原因之一。微管蛋白 α (TUB α) 是构成真核细胞骨架的主要成分, 在细胞有丝分裂和染色体分离中起关键作用, 也是 qRT-

PCR 实验中常用的一种内参基因。本研究发现, tuba 在梨形环棱螺胚胎及幼螺不同发育阶段的表达较为稳定, 这与在泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[34] 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[35] 中的研究结果类似。因此, 本研究确定 gapdh 和 tuba 为梨形环棱螺胚胎和幼螺阶段 qRT-PCR 的最佳内参基因。

本文的附加材料见网络版



参考文献 References

- [1] VANGUILDER 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.
- [2] 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/OL]. Genome biology, 2002, 3(7): research0034 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- [3] GUTIERREZ L, MAURIAT M, GUÉNIN S, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants[J]. Plant biotechnology journal, 2008, 6: 609-618.
- [4] ROJAS-HERNANDEZ N, VÉLIZ D, VEGA-RETTET C. Selection of suitable reference genes for gene expression analysis in gills and liver of fish under field pollution conditions [J/OL]. Scientific reports, 2019, 9(1): 3459 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40196-3>.
- [5] 文衍红, 覃惠明, 黄杰, 等. 环棱螺相关产品加工业餐饮业市场现状及前景展望[J]. 中国水产, 2018(10): 42-45. WEN Y H, QIN H M, HUANG J, et al. Current situation and prospect of food and beverage market in processing industry of *Bellamya* related products[J]. China fisheries, 2018(10): 42-45 (in Chinese with English abstract).
- [6] JIN W, CAO X J, MA X Y, et al. Chromosome-level genome assembly of the freshwater snail *Bellamya purificata* (Caenogastropoda) [J]. Zoological research, 2022, 43(4): 683-686.
- [7] YUAN C, LI Z, ZHOU K Q, et al. Genetic diversity and population structure of *Bellamya purificata* in Guangxi [J/OL]. PLoS One, 2024, 19(6): e0305197 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305197>.
- [8] XU H, LI C, ZENG Q, et al. Genome-wide identification of suitable zebrafish *Danio rerio* reference genes for normalization of gene expression data by RT-qPCR [J]. Journal of fish biology, 2016, 88(6): 2095-2110.
- [9] HEMBROM P S, DEEPTHI M, BISWAS G, et al. Reference genes for qPCR expression in black tiger shrimp, *Penaeus mon-*

- odon* [J/OL]. Molecular biology reports, 2024, 51 (1) : 422 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09409-5>.
- [10] CHEN X T, YU Y J, GAP T, et al. Determination of stable reference genes for gene expression analysis in black rockfish (*Sebastes schlegeli*) under hypoxia stress [J/OL]. Genes (Basel), 2024, 16 (1) : 9 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3390/genes16010009>.
- [11] 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 research, 2004, 64 (15) : 5245-5250.
- [12] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. Biotechnology letters, 2004, 26 (6) : 509-515.
- [13] SCHROEDER A, MUELLER O, STOCKER S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements [J/OL]. BMC molecular and cell biology, 2006, 7 (1) : 3 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>.
- [14] XIE F L, WANG J Y, ZHANG B H. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes [J/OL]. Functional and integrative genomics, 2023, 23 (2) : 125 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7>.
- [15] KOZERA B, RAPACZ M. Reference genes in real-time PCR [J]. Journal of applied genetics, 2013, 54 (4) : 391-406.
- [16] WARD D S, DERN-WIELOCH J, WEIGEL R, et al. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages [J/OL]. PLoS One, 2015, 10 (3) : e0122515 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>.
- [17] ZHANG Z B, HU J Y. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR [J]. Toxicological sciences, 2007, 95 (2) : 356-368.
- [18] 沈奕君, 朱奕安, 杨志华, 等. 胡子鲇 qRT-PCR 内参基因的筛选 [J]. 渔业科学进展, 2024, 45 (5) : 144-154. SHEN Y J, ZHU Y A, YANG Z H, et al. Screening for qRT-PCR internal reference genes in *Clarias fuscus* [J]. Progress in fishery sciences, 2024, 45 (5) : 144-154 (in Chinese with English abstract).
- [19] 曾丹, 李菁菁, 周馨雨, 等. 青鲫 qRT-PCR 内参基因的筛选及评价 [J]. 湖南文理学院学报 (自然科学版), 2024, 36 (3) : 50-57. ZENG D, LI J J, ZHOU X Y, et al. Screening and evaluating reference genes for real-time quantitative PCR in *Carassius auratus indigenticus* [J]. Journal of Hunan University of Arts and Science (science and technology), 2024, 36 (3) : 50-57 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周峰, 刘燕, 马永贵, 等. 真核翻译延伸因子 1A 蛋白家族功能位点的进化踪迹分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29 (8) : 773-782. ZHOU F, LIU Y, MA Y G, et al. Evolutionary trace analysis of functional sites of the eEF1A family [J]. Chinese journal of biochemistry and molecular biology, 2013, 29 (8) : 773-782 (in Chinese with English abstract).
- [21] 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]. BMC molecular and cell biology, 2005, 6 (1) : 21-29.
- [22] INGERSLEV H C, PETTERSEN E F, JAKOBSEN R A, et al. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Molecular immunology, 2006, 43 (8) : 1194-1201.
- [23] 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 [J]. 中国水产科学, 2020, 27 (7) : 759-770. WU M F, YE H, YUE H M, et al. Identification of reference genes for qRT-PCR in Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus* [J]. Journal of fishery sciences of China, 2020, 27 (7) : 759-770 (in Chinese with English abstract).
- [24] 崔丹, 蓝青景, 刘然然, 等. 大鲵不同发育阶段及组织中内参基因稳定性评价 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2017, 45 (10) : 1-6. CUI D, LAN Q J, LIU R R, et al. Stability evaluation of reference genes in tissues of *Andrias davidianus* at different development stages [J]. Journal of Northwest A&F University (natural science edition), 2017, 45 (10) : 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [25] ZHOU S M, TAO Z, SHEN C, et al. β -actin gene expression is variable among individuals and not suitable for normalizing mRNA levels in *Portunus trituberculatus* [J]. Fish and shellfish immunology, 2018, 81 : 338-342.
- [26] 费越越, 南星羽, 余路, 等. 异育银鲫内参基因的筛选 [J]. 水产科学, 2020, 39 (3) : 306-315. FEI Y Y, NAN X Y, YU L, et al. Screening of reference genes in allogynogenetic silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* [J]. Fisheries science, 2020, 39 (3) : 306-315 (in Chinese with English abstract).
- [27] LI Y J, ZHANG L L, LI R J, et al. Systematic identification and validation of the reference genes from 60 RNA-Seq libraries in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* [J/OL]. BMC genomics, 2019, 20 (1) : 288 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5661-x>.
- [28] ZOU K L, WANG T H, GUAN M H, et al. Identification and evaluation of qRT-PCR reference genes in *Melanaphis sacchari* [J/OL]. Insects, 2024, 15 (7) : 522 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.3390/insects15070522>.
- [29] YAN H Z, LIOU R F. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica* [J]. Fungal genetics and biol-

- ogy, 2006, 43(6): 430-438.
- [30] NICHOLLS C, LI H, LIU J P. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions [J]. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2012, 39(8): 674-679.
- [31] 吕梁, 张子平, 万海付, 等. 拟穴青蟹不同发育时期胚胎基因表达的内参基因的筛选 [J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 457-464. LÜ L, ZHANG Z P, WAN H F, et al. Identification of internal reference genes for quantification of gene expression in different embryonic developmental stages of the mud crab *Scylla paramamosain* [J]. Journal of fishery sciences of China, 2019, 26(3): 457-464 (in Chinese with English abstract).
- [32] TANG R, DODD A, LAI D, et al. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization [J]. Acta biochimica et biophysica sinica, 2007, 39(5): 384-390.
- [33] 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.
- [34] 罗双双, 高泽霞, 冯兵, 等. 二倍体和四倍体泥鳅 qRT-PCR 分析中内参基因优选 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 1-8. LUO S S, GUO Z X, FENG B, et al. Screening of optimal internal reference genes for qRT-PCR in diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(5): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [35] LIU C H, 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 [2025-01-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091715>.

Screening of optimal internal reference genes for qRT-PCR in *Bellamya purificata*

GUO Xuepeng¹, WEN Yanhong², LUO Fuguang², WANG Zhiqiang², ZHU Dongmei¹, ZHOU Xiaoyun¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Wuhan 430070, China;
2. Liuzhou Aquaculture Technology Extending Station, Liuzhou 545006, China

Abstract To select optimal reference genes to improve the accuracy of qRT-PCR analysis results in the freshwater snail *Bellamya purificata*, ten commonly used reference genes, including *actβ*, *18S*, *gapdh*, *ef1α*, *ef1β*, *rps3*, *rpl4*, *tubα*, *tubβ* and *sdha* were chosen as candidate genes, and geNorm, NormFinder, BestKeeper, ΔCt and RefFinder were used to assess their expression stability during the embryonic and larval stages, as well as across different tissues and between sexes in adult individuals. The results showed that, the expression stability of the candidate genes during the embryonic and larval stages was ranked as follows: *gapdh* > *tubα* > *18S* > *ef1α* > *ef1β* > *rps3* > *actβ* > *tubβ* > *sdha* > *rpl4*. In terms of inter-tissue expression stability between female and male individuals, the expression stability of the candidate genes were ranked as *ef1β* > *tubα* > *rps3* > *ef1α* > *18S* > *actβ* > *gapdh* > *sdha* > *tubβ* > *rpl4* for females, and *ef1α* > *rps3* > *ef1β* > *rpl4* > *tubα* > *actβ* > *18S* > *gapdh* > *tubβ* > *sdha* for males, respectively. In terms of tissue expression stability between sexes, the ranking was as follows: *ef1β* > *ef1α* > *rps3* > *tubα* > *18S* > *actβ* > *gapdh* > *rpl4* > *sdha* > *tubβ*. Consequently, *gapdh* and *tubα* are recommended as reference genes for qRT-PCR analysis during the embryonic and larval stages, *ef1β* and *tubα* are suggested as reference genes for qRT-PCR analysis across female snail tissues, *ef1α* and *rps3* are suggested as reference genes for qRT-PCR analysis across male snail tissues, while *ef1α* and *ef1β* are the most appropriate for qRT-PCR analysis between sexes in *B. purificata*.

Keywords *Bellamya purificata*; qRT-PCR; reference gene; expression stability

(责任编辑:边书京)