

多氯联苯胁迫下红树蚬荧光定量 PCR 内参基因的筛选*

Reference Gene Selection for qRT-PCR in Mangrove Mud Clam (*Polymesoda erosa*) Under PCBs Stress

莫祖英^{1,2}, 车志群^{2,3}, 廖思明^{2,4}, 杨明柳², 阎冰^{2**}

MO Zu-ying^{1,2}, CHE Zhi-qun^{2,3}, LIAO Si-ming^{2,4}, YANG Ming-liu², YAN Bing²

(1. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004; 2. 广西红树林研究中心广西红树林保护与利用重点实验室, 广西北海 536007; 3. 广西大学生命科学技术学院, 广西南宁 530005; 4. 广西科学院广西生物科学与技术研究中心, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 2. Guangxi Key Lab of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Mangrove Research Center, Beihai, Guangxi, 536007, China; 3. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 4. Guangxi Bioscience and Technology Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】筛选出多氯联苯(PCBs)胁迫下红树蚬(*Polymesoda erosa*)的实时荧光定量PCR(qRT-PCR)最适内参基因,为进一步开展分子毒理学研究奠定基础。【方法】以 β -actin、18S rRNA、GAPDH和 α -tubulin为候选内参基因,qRT-PCR测定PCBs胁迫下4个候选内参基因在红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中的表达水平,应用geNorm、NormFinder和BestKeeper软件分析其表达稳定性。【结果】geNorm软件分析表明 β -actin表达最稳定;NormFinder软件分析发现,外套膜、鳃和肝胰腺组织中 β -actin的稳定性最好,闭壳肌组织中 β -actin(0.454)表达稳定性略微低于 α -tubulin(0.425),排第2位;BestKeeper软件分析表明,外套膜和鳃组织中 β -actin最稳定,肝胰腺和闭壳肌组织中GAPDH最稳定, β -actin排第2位。【结论】筛选 β -actin为红树蚬在PCBs胁迫下的qRT-PCR最适内参基因。

关键词:红树蚬 实时荧光定量PCR 内参基因 多氯联苯胁迫

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2015)03-0350-07

Abstract: 【Objective】 To select the suitable reference genes in the mangrove mud clam (*Polymesoda erosa*) exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), which will be conducive to further research in molecular toxicology. 【Methods】 β -actin, 18S rRNA, GAPDH and α -tubulin were chosen as four candidate reference genes to test their expressed level in different tissues (mantle, gill, adductor muscle and

hepatopancreas) of the mangrove mud clam under PCBs stress by using qRT-PCR method. The expression stability of these candidate reference genes were analyzed and evaluated with three software-based approaches (geNorm, NormFinder and BestKeeper). 【Results】 geNorm analysis showed that β -actin was the most stable expressed gene among the four candidate reference genes. NormFinder analysis found that β -

收稿日期: 2015-03-04

作者简介: 莫祖英(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事生态毒理学研究。

* 广西科学院基本科研业务费项目(13YJ22HS13)和广西红树林保护与利用重点实验室基金课题(GKLMC-08)资助。

** 通讯作者: 阎冰(1966-), 男, 研究员, 主要从事红树林污染生态研究, E-mail: gxybing@tom.com。

actin was the most stable expressed gene in mantle, gill, and hepatopancreas, but in adductor muscle tissue, β -*actin* (0.454) was slightly less stable than α -*tubulin* (0.425) and ranked as the second. BestKeeper analysis showed that β -*actin* was the most stable expressed gene in mantle and gill tissues, whereas *GAPDH* was the most stable expressed gene and β -*actin* was ranked as the second in adductor muscle and hepatopancreas tissues. **【Conclusion】** β -*actin* can be used as a reference gene for mangrove mud clam under PCBs stress.

Key words: *Polymesoda erosa*, quantitative real-time PCR, reference genes, polychlorinated biphenyls stress

0 引言

【研究意义】实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)是检测基因表达水平的常规手段^[1,2]。为了降低各种因素的影响(如 RNA 提取质量、反转录效率、PCR 扩增效率等)而导致的定量结果不准确,通常选择表达相对稳定的管家基因作为内参基因用于校正^[3]。理想的内参基因应在不同的组织、发育阶段以及胁迫的环境条件下都能稳定地表达,然而近年来的研究表明,目前常用的内参基因都只能在一定的组织类型和环境条件下有范围地相对稳定表达,因此,qRT-PCR 结果的准确性在很大程度上取决于选择合适的内参基因^[4,5]。根据研究目的筛选最优的内参基因,对提高研究结果的准确性有重要意义。**【前人研究进展】**常用的内参基因主要有 18S 核糖体 RNA(18S *rRNA*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)、 α 微管蛋白基因(α -*tubulin*)、肌动蛋白基因(β -*actin*)、转录延伸因子基因(*EF*)、多聚泛素酶基因(*UBQ*)等^[6],内参基因的筛选研究已有越来越多的报道,不同的物种、器官组织和发育阶段以及不同的环境条件胁迫,其最适内参基因存在差异。目前,主要采用基于统计学的软件 BestKeeper^[7]、geNorm^[8]和 NormFinder^[9]分析候选内参基因的表达稳定性,选择稳定性最好的作为内参基因。**【本研究切入点】**污染胁迫对生物体的效应最先体现在相关基因表达的诱导或抑制,随后代谢发生改变,直至出现毒性症状^[10],污染物对基因表达调节的研究受到关注,相关的污染早期诊断预警分子生物标志物已成为生态毒理学研究的热点^[11,12]。红树蚬(*Polymesoda erosa*)是广泛分布于热带、亚热带红树林滩涂的双壳贝类^[13,14],具有作为海洋污染监测指示物种的潜力^[15-17]。双壳贝类内参基因筛选的研究极少,尚未见红树蚬的相关研究报道。**【拟解决的关键问题】**通过检测常用的 4 种内参基因在多氯联苯(PCBs)胁迫下红树蚬不同组织中的表达量,分析其表达的稳定性,筛选最适内参基因,为进一步开展分子毒理学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2014 年 10 月在广西北海市草头村红树林林下滩涂采集红树蚬,选择个体大小基本一致的用于实验。

1.1.2 仪器及试剂

PCBs(Aroclor 1242),Accustandard 公司产品;二甲基亚砜(DMSO),Sigma-Aldrich 公司产品;RNAiso plus 试剂、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒、Ex TaqTM(Mg²⁺ free Buffer)试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品;AstraGene 核酸蛋白分析仪为 AstraNet Systems 公司产品;Mini Opticon 荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品;TECHNE TC-PLUS 梯度 PCR 仪为 Bibby Scientific 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 红树蚬的驯养

将采集回的红树蚬在室温下海水微充气饲养驯化 2 周,海水用量 0.5 L/只,每天彻底换水 1 次。每天换水后投喂螺旋藻干粉,投喂量 30 mg/只。实验用海水为砂滤自然海水用自来水调至盐度 15,充气 3 d 后使用。实验用红树蚬壳长(47.56±3.60)mm,壳宽(27.03±4.80)mm,壳高(46.44±5.40)mm。

1.2.2 胁迫处理

驯养后的红树蚬随机分成两组,胁迫处理前,彻底换水后不投喂、微充气。胁迫组海水中加入 PCBs(0.05% DMSO 助溶)至终浓度 50 μ L/L,对照组(空白组)加入等体积的 0.05% DMSO。处理 24 h 后,每组取 3 个红树蚬个体,解剖后取外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺,分别放入已标号的冻存管中,液氮速冻,-80℃保存。为了排除性别差异的影响,本研究仅选用雌性个体取样。

1.2.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取保存于-80℃的样品(约 100 mg 组织)放入

已预冷的研钵中加入液氮,小心研磨至粉末状。使用 RNAiso plus 试剂提取外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中的总 RNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 As-tragen 核酸蛋白分析仪检测所提取总 RNA 的质量和浓度。将提取的总 RNA 浓度调至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行逆转录合成 cDNA 的第一链, 逆转录产物 -20℃ 保存。

1.2.4 引物设计及合成

根据红树蚬转录组测序所获得的 β -actin、18S rRNA、GAPDH 和 α -tubulin 序列(待发表), 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物并送上海英潍捷基公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 用于 qRT-PCR 各候选内参基因的引物序列

Table 1 The primer sequences of candidate reference genes used in qRT-PCR analysis

| 基因 Gene | 引物序列 Primer sequences(5'-3') | 扩增片段 Amplicon size(bp) |
|-------------------|---|------------------------------|
| β -actin | F: ACAGGGAAGCCAAGATGGAA R: TTGCCGACAGAATGCAGAAG | 132 |
| 18S rRNA | F: GTACCAGGAGACCAGCTTCACA R: TTCACCACTTCAACTACTCTTCC | 98 |
| GAPDH | F: AATACGGAAAGAGGCGGAAAAC R: TCAACAGCGTGCCCATACC | 87 |
| α -tubulin | F: ATGCCTGCTGGGAGCTGTA R: CCCCGTCTCGCTAAAGAATG | 119 |

1.2.5 PCR 扩增目的片段

以等量混合的红树蚬各组织总 RNA 经反转录合成的 cDNA 为模板, 使用 Ex Taq™ (Mg²⁺ free Buffer) 试剂盒, 在 TECHNE TC-PLUS 梯度 PCR 仪上进行 PCR 扩增候选内参基因目的片段。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 送上海立菲生物技术有限公司测序。

1.2.6 荧光定量 PCR 和标准曲线分析

使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 在 Mini Opticon 荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 扩增。反应体系: SYBR® Premix E× Taq™ II (2×) 12.5 μL , 上下游引物 (10 mM) 各 1 μL , 稀释的 cDNA 模板 2 μL , 加无菌超纯水至 25 μL 。反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 39 个循环。通过梯度 PCR 确定各内参基因的最佳退火温度, 调整模板浓度、引物浓度和退火时间, 确定扩增效果符合要求的反应条件和反应体系。以等量混合的红树蚬各组织总 RNA 经反转录

合成的 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 扩增, 从 65℃ 到 95℃ 在延伸阶段收集信号进行融解曲线分析, 每个循环增温 0.5℃, 保持 0.05 s; 以第一链 cDNA 合成产物按 1:10 稀释成的 5 个浓度梯度液为模板进行 qRT-PCR 扩增, 制作标准曲线, 每个反应设置 3 个重复。以 PCBs 胁迫组和空白对照组红树蚬各组织样品的第一链 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 扩增, 取每个样品 3 次重复的平均 Ct 值用于基因表达稳定性分析。

1.2.7 数据分析

应用 CFX Manager™ software (Bio-Rad) 绘制标准曲线, 计算扩增效率。应用 BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 软件分析各候选内参基因的表达稳定性, 具体操作参照文献[18], 选择表达最稳定的作为内参基因。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取质量检测

如图 1 所示, 红树蚬各组织样品总 RNA 中 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰。总 RNA 的 A260/A280 值为 2.0 左右, A260/A230 > 2.0, RNA 浓度在 500 ng/ μL 左右, 符合后续定量实验对 RNA 质量的要求, 但 18S rRNA 的亮度远大于 28S rRNA。

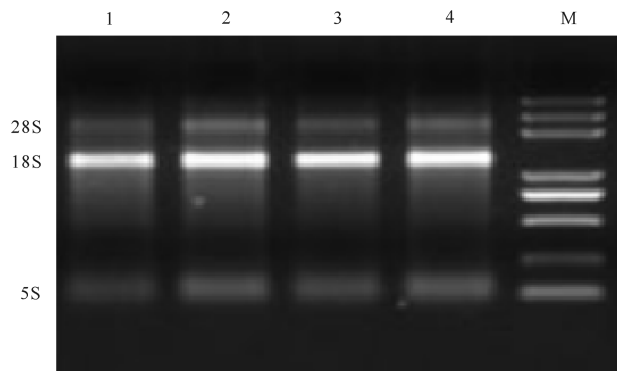


图 1 不同组织总 RNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis for total RNA extracted from different tissues

1. 闭壳肌; 2. 外套膜; 3. 鳃; 4. 肝胰腺; M: Marker.

1. Adductor muscle; 2. Mantle; 3. Gill; 4. Hepatopancreas; M: Marker.

2.2 PCR 扩增产物分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 每对引物扩增出的片段大小与设计的目的片段大小吻合, 扩增产物经序列测定, 与目的片段序列一致, 说明所设计的引物能特异性扩增目的片段。

2.3 候选内参基因 qRT-PCR 分析

4 个候选内参基因的扩增效率介于 93.8% ~ 107.4%, 相关系数均在 0.99 以上(表 2), 融解曲线

都只有单一峰(图2),说明所设计的引物适宜,无非特异性扩增,也没有形成引物二聚体,符合 qRT-PCR 分析要求。

表2 候选内参基因定量引物扩增效率

Table 2 Amplification efficiency of candidate reference genes of quantifying primers

| 基因 Gene | 扩增效率(%) Amplification efficiency | 相关系数(r^2) Correlation coefficient |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| β -actin | 101.2 | 0.990 |
| 18S rRNA | 107.4 | 0.995 |
| GAPDH | 98.6 | 0.997 |
| α -tubulin | 93.8 | 0.994 |

表3 各候选内参基因的 Ct 值

Table 3 Ct values of candidate reference genes

| 基因 Gene | 分组 Group | 外套膜 Mantle | 鳃 Gill | 闭壳肌 Adductor muscle | 肝胰腺 Hepatop- ancreas |
|-------------------|-------------|---------------|-----------|---------------------------|----------------------------|
| β -actin | 胁迫 Stress | 24.83 | 24.19 | 24.15 | 29.27 |
| | 对照 Control | 26.44 | 24.57 | 29.66 | 26.61 |
| 18S rRNA | 胁迫 Stress | 20.48 | 22.88 | 20.06 | 28.83 |
| | 对照 Control | 24.18 | 20.92 | 25.83 | 25.06 |
| GAPDH | 胁迫 Stress | 29.38 | 24.01 | 26.48 | 27.30 |
| | 对照 Control | 27.20 | 27.47 | 27.86 | 25.47 |
| α -tubulin | 胁迫 Stress | 23.36 | 26.48 | 23.14 | 29.33 |
| | 对照 Control | 28.40 | 24.83 | 29.14 | 25.40 |

2.4 内参基因的选择

根据 NormFinder 软件分析结果(表4),在 PCBs 胁迫条件下,红树蚬外套膜、鳃和肝胰腺组织中 β -actin 的表达稳定性最好,而闭壳肌组织中 β -actin (0.454)略微低于 α -tubulin (0.425)排第2位。

表4 候选内参基因表达稳定性值的 NormFinder 分析

Table 4 Expression stability of candidate reference genes analyzed by Norm Finder

| 基因 Gene | 外套膜 Mantle | 鳃 Gill | 闭壳肌 Adductor muscle | 肝胰腺 Hepatop- ancreas |
|-------------------|---------------|-----------|---------------------------|----------------------------|
| β -actin | 0.133 | 0.177 | 0.454 | 0.189 |
| 18S rRNA | 0.694 | 0.636 | 0.555 | 0.307 |
| GAPDH | 1.801 | 1.494 | 1.308 | 0.531 |
| α -tubulin | 1.159 | 0.572 | 0.425 | 0.326 |

geNorm 软件分析结果显示,在 PCBs 胁迫条件下,红树蚬外套膜、闭壳肌和鳃组织中各候选内参基因的表达稳定性排序都是 β -actin/ α -tubulin > 18S rRNA > GAPDH,在肝胰腺组织中是 β -actin/18S rRNA > α -tubulin > GAPDH,表明在红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中, β -actin 的表达最稳定(图3)。

BestKeeper 软件分析结果显示,在 PCBs 胁迫条件下,候选内参基因在红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中表达的稳定性排序分别为 β -actin > GAPDH > 18S rRNA > α -tubulin, β -actin > α -

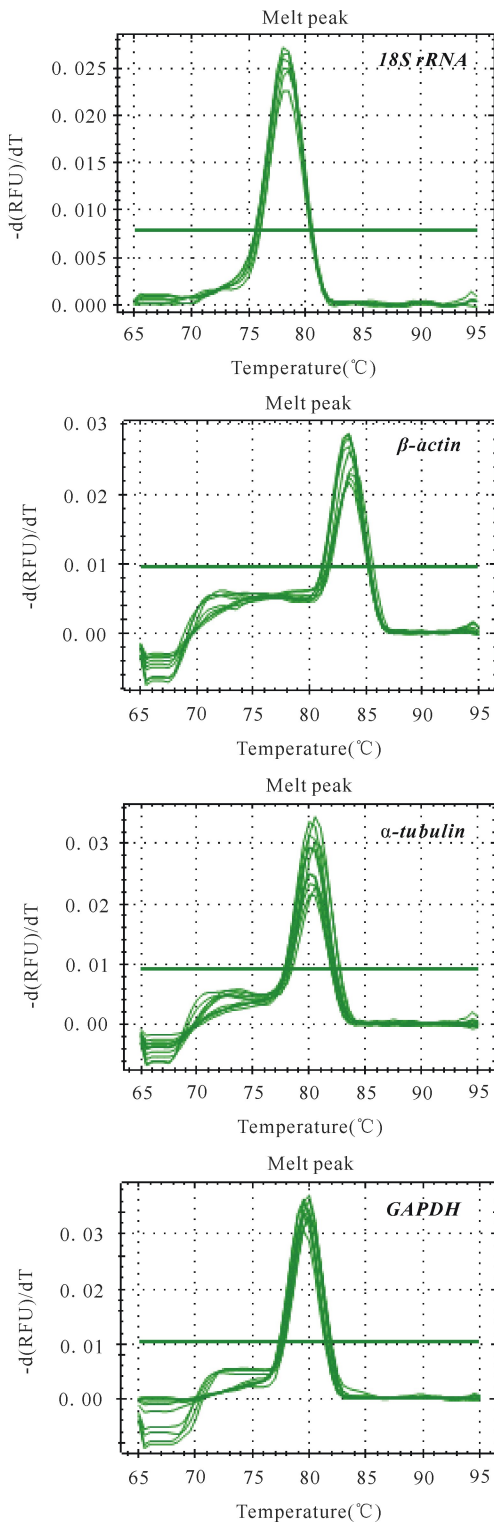


图2 候选内参基因 qRT-PCR 扩增的熔解曲线

Fig. 2 The melting curve of qRT-PCR amplification of candidate reference genes

4 个候选内参基因的 Ct 值在同一实验组(胁迫或非胁迫)的不同组织间,以及相同组织在 PCBs 胁迫与非胁迫情况下均存在差异(表3)。

tubulin > 18S *rRNA* > *GAPDH*、*GAPDH* > β -*actin* > α -*tubulin* > 18S *rRNA* 和 *GAPDH* > β -*actin* > 18S *rRNA* > α -*tubulin*。外套膜和鳃组织中 β -*actin* 表达最稳定, 肝胰腺和闭壳肌组织中 *GAPDH* 表达稳定性最高(表 5)。

geNorm 和 NormFinder 软件分析结果较为一

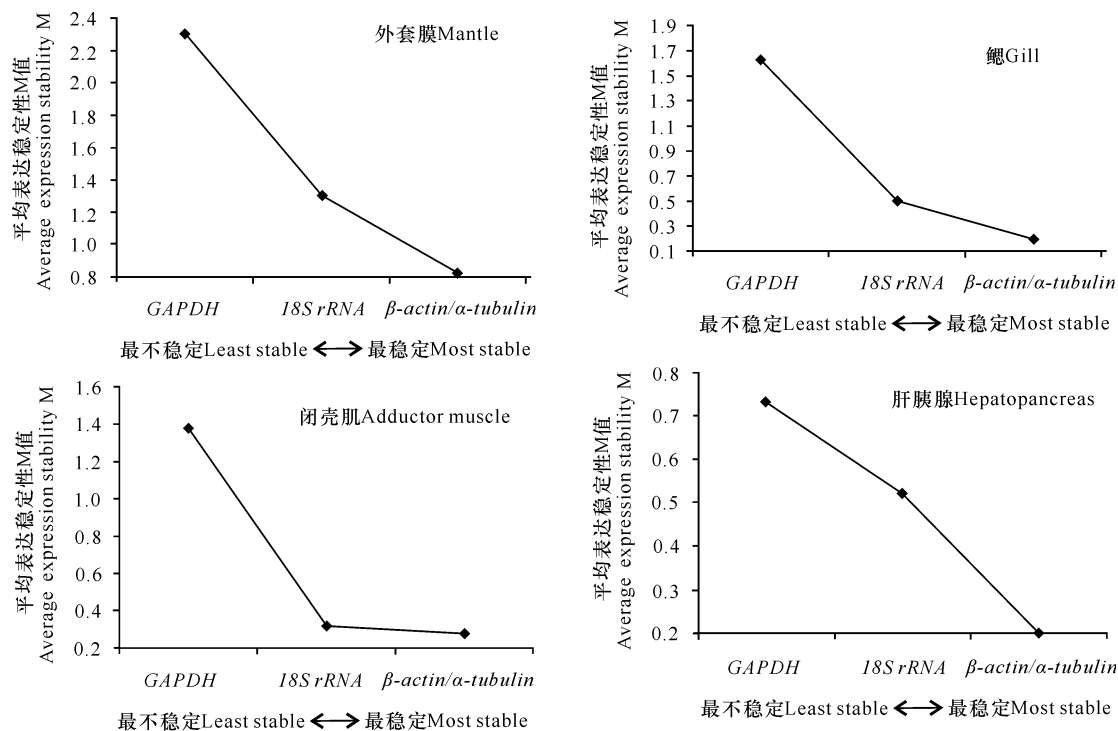


图 3 候选内参基因表达稳定性值(M)的 geNorm 分析

Fig. 3 Expression stability of candidate reference genes by geNorm analyzed

表 5 候选内参基因表达稳定性的 BestKeeper 软件分析

Table 5 Expression stability of candidate reference genes analyzed by BestKeeper

| 基因 Gene | 组织 tissues | 几何平均值 GeoMean(CP) | 算术平均值 Ar Mean(CP) | 最小值 Min(CP) | 最大值 Max(CP) | 标准差 Std Dev(\pm CP) | 变异系数 CV(%CP) |
|---------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|------------------------|--------------|
| β - <i>actin</i> | 外套膜 Mantle | 25.6 | 25.6 | 24.8 | 26.5 | 0.8 | 3.1 |
| | 鳃 Gill | 24.9 | 24.9 | 24.5 | 25.2 | 0.3 | 3.1 |
| | 闭壳肌 Adductor muscle | 26.8 | 26.9 | 24.1 | 29.9 | 2.8 | 10.2 |
| | 肝胰腺 Hepatopancreas | 27.9 | 27.9 | 26.5 | 29.4 | 1.3 | 4.8 |
| 18S <i>rRNA</i> | 外套膜 Mantle | 22.3 | 22.3 | 20.4 | 24.3 | 1.8 | 8.3 |
| | 鳃 Gill | 21.9 | 21.9 | 20.9 | 22.9 | 1.0 | 4.5 |
| | 闭壳肌 Adductor muscle | 22.8 | 22.9 | 20.0 | 26.3 | 2.9 | 12.6 |
| | 肝胰腺 Hepatopancreas | 26.9 | 26.9 | 24.9 | 28.9 | 1.9 | 7.0 |
| <i>GAPDH</i> | 外套膜 Mantle | 28.3 | 28.3 | 27.2 | 31.4 | 1.2 | 4.2 |
| | 鳃 Gill | 25.7 | 25.7 | 23.9 | 28.7 | 1.7 | 6.8 |
| | 闭壳肌 Adductor muscle | 27.2 | 27.2 | 26.2 | 28.1 | 0.7 | 2.5 |
| | 肝胰腺 Hepatopancreas | 26.4 | 26.4 | 25.3 | 27.6 | 0.9 | 3.5 |
| α - <i>tubulin</i> | 外套膜 Mantle | 25.8 | 25.9 | 23.3 | 28.8 | 2.5 | 9.7 |
| | 鳃 Gill | 25.6 | 25.7 | 24.7 | 26.5 | 0.8 | 3.2 |
| | 闭壳肌 Adductor muscle | 26.0 | 26.1 | 23.0 | 29.2 | 3.0 | 11.5 |
| | 肝胰腺 Hepatopancreas | 27.3 | 27.4 | 25.3 | 29.6 | 2.0 | 7.2 |

3 讨论

总 RNA 的完整性鉴定一般采用电泳图谱中 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 条带清晰和 28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 条带的两倍为初步判断标准。本研究中所提取的红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织总 RNA,其电泳条带中 18S rRNA 条带亮度最大(图 1),使用不同的提取试剂并反复实验,结果一致。利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测(北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成)发现,红树蚬 4 种组织样品总 RNA 提取产物的 RNA Integrity Number (RIN)介于 7.9~8.7,证明所提取的总 RNA 完整性好。说明不同于大部分真核生物物种,红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中 18S rRNA 含量高于 28S rRNA。

双壳类不同物种的最适内参基因不尽相同, *GAPDH* 和 *EF1- α* 适用于欧洲扁牡蛎^[19], *Ubi*、*Rpl18* 和 *EF-1 α* 适用于三角帆蚌^[20],而适用于合浦珠母贝^[21]、栉孔扇贝^[22]、和红树蚬(本研究)的 *β -actin*,在欧洲扁牡蛎和三角帆蚌中却是最不稳定的候选内参基因。同一物种不同组织、发育阶段以及环境条件,其最适内参基因也不一样。饥饿胁迫下,虾夷扇贝成体鳃、肾和闭壳肌组织的最适内参基因是 *β -actin*,外套膜和血淋巴中是 *α -tubulin*,肝胰腺中是 *tbp*;致病菌感染和环境水温变化胁迫下,虾夷扇贝成体血淋巴的最适内参基因分别为 *GAPDH/ α -tubulin* 和 *GAPDH/cyt b*^[23]。正常环境中, *HELI*、*UBQ* 和 *RPL16* 适用于虾夷扇贝成体,而其胚胎和幼体则要选用 *Cyt B*、*Cyt C* 和 *His3.3*^[24]。因此,利用 qRT-PCR 研究基因表达,内参基因的选择必须针对具体的物种、组织及环境胁迫条件,并根据研究目的筛选适宜的内参基因。

本研究利用 BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 分析结果大体一致,但仍存在一定的差异。geNorm 分析结果表明,红树蚬 4 种组织中均为 *β -actin* 表达最稳定; NormFinder 分析发现,红树蚬外套膜、鳃和肝胰腺组织中 *β -actin* 的表达稳定性最好,但闭壳肌组织中 *α -tubulin* 表达稳定性最好, *β -actin* 以微弱的差距排列第 2; BestKeeper 分析结果显示,红树蚬外套膜和鳃组织中 *β -actin* 表达最稳定,肝胰腺和闭壳肌组织中 *GAPDH* 最稳定, *β -actin* 排列第 2。另外,上述 3 种软件分析给出的各候选内参基因在同一组织中的表达稳定性排序也不一致。说明采用单个软件筛选出来的结果存在片面性,综合多个软件的分析结果可提高研究的准确性。

Xie^[25]等开发的免费在线分析软件 RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)可通过整合 BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 等软件分析结果,给出候选内参基因表达稳定性的综合排名。

4 结论

本研究以 *β -actin*、18S rRNA、*GAPDH* 和 *α -tubulin* 为候选内参基因,采用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行表达稳定性分析,研究结果表明,PCBs 胁迫下红树蚬外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺组织中 *β -actin* 表达稳定,适合作为内参基因用于 qRT-PCR,为进一步开展分子毒理学研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 386-401.
- [2] 陈旭,齐凤坤,康立功,等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(8): 148-155.
Chen X, Qi F K, Kang L G, et al. Advance and application of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(8): 148-155.
- [3] Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4): 279-284.
- [4] 张玉芳,赵丽娟,曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用 [J]. *植物生理学报*, 2014, 50 (8): 1119-1125.
Zhang Y F, Zhao L J, Zeng Y L. Selection and application of reference genes for gene expression studies [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50 (8): 1119-1125.
- [5] Cubero-Leon E, Ciocan C M, Minier C, et al. Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19(7): 2728-2733.
- [6] Radonić A, Thulke S, Mackay I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004(313): 856-862.
- [7] 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 Letter*, 2004, 26(6): 509-515.
- [8] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): Research 0034. 1-0034.

- 11.
- [9] Andersen C L, Jensen J L, Orntoft 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.
- [10] Nakamori T, Fujimori A, Kinoshita K, et al. mRNA expression of a cadmium-responsive gene is a sensitive biomarker of cadmium exposure in the soil collembolan *Folsomia candida* [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5):1689-1695.
- [11] Dondero F, Dagnino A, Jonsson H, et al. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78: S13-24.
- [12] 陈春, 周启星, 刘潇威. 抗氧化酶基因作为多环麝香污染分子标志物研究 [J]. *环境科学*, 2012, 33(8): 2855-2861.
Chen C, Zhou Q X, Liu X W. Antioxidant enzyme gene expression as molecular biomarkers of exposure to polycyclic musks [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(8): 2855-2861.
- [13] 蔡英亚, 黄翔鹤, 吴洞科. 红树蚬的生态观察 [J]. *热带海洋*, 1995, 14(1): 94-98.
Cai Y Y, Huang X H, Wu D K. Studies on the ecology of *Polymesoda erosa* (Solander) [J]. *Tropic Oceanology*, 1995, 14(1): 94-98.
- [14] 周浩郎, 张俊杰, 邢永泽, 等. 广西红树蚬的分布特征及影响因素分析 [J]. *广西科学*, 2014, 21(2): 147-152.
Zhou H L, Zhang J J, Xing Y Z, et al. Characteristics of distribution and the influential factors of mangrove clam, *Polymesoda erosa* (Solander 1768), in Guangxi [J]. *Guangxi Sciences*, 2014, 21(2): 147-152.
- [15] Yap C K, Azri M A. Heavy metal concentration (Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn) in clam, *Polymesoda erosa* collected from intertidal area of Tok Bali and Kuala Kemasin, Kelantan [J]. *Malaysian Applied Biology*, 2009, 38(1): 81-84.
- [16] 赖廷和, 何斌源, 范航清, 等. 重金属 Cd 胁迫对红树蚬的抗氧化酶、消化酶活性和 MDA 含量的影响 [J]. *生态学报*, 2011, 31(11): 3044-3053.
Lai T H, He B Y, Fan H Q, et al. Effects of cadmium stress on the activities of antioxidant enzymes, digestive enzymes and the membrane lipid peroxidation of the mangrove mud clam *Geloina coxans* (Gmelin) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(11): 3044-3053.
- [17] 武文丽, 杨明柳, 吴斌, 等. 露空对红树蚬生物标志物的影响 [J]. *广西科学*, 2014, 21(2): 153-157, 163.
Wu W L, Yang M L, Wu B, et al. The effect of air exposure on biomarkers of mangrove mud clam (*Polymesoda erosa*) [J]. *Guangxi Sciences*, 2014, 21(2): 153-157, 163.
- [18] 陈芳, 陆永跃. 热胁迫下棉花粉蚧内参基因的筛选 [J]. *昆虫学报*, 2014, 57(10): 1146-1154.
Chen F, Lu Y Y. Selection of reference genes in *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) under heat stress [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57(10): 1146-1154.
- [19] Morga B, Arzul I, Faury N, et al. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 937-945.
- [20] Bai Z, Lin J, Ma K, et al. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*, during biomineralization [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(4): 717-725.
- [21] 王琦, 何毛贤. 合浦珠母贝实时定量 PCR 内参基因的稳定性比较 [J]. *南方水产科学*, 2013, 9(6): 33-40.
Wang Q, He M X. Stability comparison of reference genes of *Pinctada fucata* by real-time qPCR [J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(6): 33-40.
- [22] 刘颖, 王双耀, 安立会, 等. 栉孔扇贝内参基因稳定性研究 [J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(4): 616-622.
Liu Y, Wang S Y, An L H, et al. Study on the expression stability of reference genes in *Chlamys farreri* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(4): 616-622.
- [23] 鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量 PCR 中表达稳定性的比较 [J]. *水产科学*, 2011, 30(10): 603-608.
Bao X B, Liu W D, Jiang B, et al. Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(10): 603-608.
- [24] Feng L, Yu Q, Li X, et al. Identification of reference genes for qRT-PCR analysis in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75609.
- [25] Xie F L, Xiao P, Chen D L, et al. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80(1): 75-84.

(责任编辑: 陆雁)