

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180905002

王爱云, 曹滕飞, 吕家森, 等. 亚硝态氮胁迫下菲律宾蛤仔实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(1): 153-160

Wang A Y, Cao T F, Lv J S, et al. Selection of reference genes by quantitative real-time PCR for *Ruditapes philippinarum* exposed to nitrite [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(1): 153-160 (in Chinese)

亚硝态氮胁迫下菲律宾蛤仔实时定量 PCR 内参基因的筛选

王爱云^{1,*}, 曹滕飞², 吕家森^{2,#}, 丛明³

1. 鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

2. 烟台大学生命学院, 烟台 264003

3. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003

收稿日期: 2018-09-05 录用日期: 2019-01-24

摘要: 为了更好地从基因角度研究亚硝态氮对贝类的生态毒性, 需要筛选一个合适的内参基因作为参考, 对其毒性相关基因进行定量表达分析。本研究以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)作为研究对象, 以亚硝态氮胁迫的鳃组织 cDNA 作为模板, 利用 geNorm 软件和 NormFinder 软件对 6 个候选内参基因进行表达稳定性分析, 并对 2 个结果做了综合赋权分析。结果显示, geNorm 分析的基因表达稳定性结果为 *Actin*>*CyPA*>*EF1α*>*Ubi*>*18S*>*Tubu*, NormFinder 软件分析的结果为 *Actin*>*Ubi*>*CyPA*>*EF1α*>*18S*>*Tubu*, 最后经加权赋值法综合分析获得 6 个候选基因的表达稳定性为 *Actin*>*CyPA*>*Ubi*>*EF1α*>*18S*>*Tubu*, 即 *Actin* 为表达最稳定的基因。因此, *Actin* 可以作为衡量亚硝态氮胁迫后菲律宾蛤仔鳃组织中基因表达的内参基因。

关键词: 亚硝态氮; 菲律宾蛤仔; 内参基因; 转录组学; 实时荧光定量 PCR

文章编号: 1673-5897(2019) 1-153-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Selection of Reference Genes by Quantitative Real-Time PCR for *Ruditapes philippinarum* Exposed to Nitrite

Wang Aiyun^{1,*}, Cao Tengfei², Lv Jiasen^{2,#}, Cong Ming³

1. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China

2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264003, China

3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

Received 5 September 2018 accepted 24 January 2019

Abstract: In order to well investigate the eco-toxicity of nitrite on molluscs, a suitable housekeeper gene was needed for further analysis to qualify the toxicity-related genes. In the present study, the clam *Ruditapes philippinarum* was used as the target mollusc and cDNAs templates were got from gill tissue RNA of *R. philippinarum* after nitrite exposure. Six candidate genes were assayed in terms of their expression stabilities by geNorm and NormFinder softwares, followed by a comprehensive weighting comparison. GeNorm analysis indicated that the stability order

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41876135); 鲁东大学高端人才团队建设费(108-10000318)

作者简介: 王爱云(1977-), 女, 硕士, 研究方向为生态毒理和分子遗传学, E-mail: wanay1977@126.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: wanay1977@126.com

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: lvjiasencong@aliyun.com

for the six genes were *Actin*>*CyPA*>*EF1 α* >*Ubi*>*18S*> *Tubu*. However, a little different order was suggested by the Normfinder software, *Actin*>*Ubi*>*CyPA*>*EF1 α* >*18S*> *Tubu*. After a comprehensive weighting comparison, the final stability order of the six genes was *Actin*>*CyPA*>*Ubi*>*EF1 α* >*18S*> *Tubu*. So, the *Actin* gene was the most suitable reference gene to qualify target genes for their expression levels in the clam *R. philippinarum* after nitrite exposure.

Keywords: nitrite; *Ruditapes philippinarum*; reference gene; transcriptome; quantitative real-time PCR

近岸海域是海水增养殖的重要区域,其水质状况直接制约着该区域水产养殖业的健康发展。《中国近岸海域环境质量公报》显示,我国近岸海域的局部海域水质污染程度较重,无机氮是主要的污染因子之一^[1-3],而氨氮和亚硝态氮是水环境中2种主要的有毒含氮化合物。环境中的氨氮在氨氧化细菌的作用下发生化学反应,转化成亚硝态氮,后者在硝化细菌的作用下转化成硝酸氮。由于近岸海洋环境中含氮有机污染物的浓度远远超过环境微生物的硝化能力,因此亚硝态氮成为近海海域一种常见的含氮污染物。我国浅海滩涂为贝类的黄金养殖地带,近岸的亚硝态氮也就成为贝类养殖环境中不可忽视的污染物之一,严重威胁贝类养殖业的健康发展。国内外关于亚硝态氮对贝类的生态毒理研究,主要集中在致死效应和生理生化反应等方面^[4-7],毒性相关基因的研究比较少。

为了更好地研究亚硝态氮对贝类的毒性效应,尤其是从基因角度评价亚硝态氮毒性效应,需要一个合适的内参基因作为评价标准。据文献报道,0.1~0.5 mg·L⁻¹的亚硝酸盐(以氮计)能对水生生物造成中毒症状,超过0.1 mg·L⁻¹时会造成鱼虾等慢性中毒,而当亚硝酸氮浓度达到0.5 mg·L⁻¹时,则会导致养殖生物大面积死亡^[8-9]。为了研究低浓度亚硝态氮对贝类的毒性影响情况,本实验采用0.2 mg·L⁻¹亚硝酸氮作为胁迫浓度。贝类的鳃组织是重要的摄食、呼吸器官,也是与外界海水环境进行接触的主要器官,因此被认为是最易受到外界环境胁迫的靶器官。本研究以菲律宾蛤仔的鳃组织为研究对象,采用0.2 mg·L⁻¹亚硝酸氮作为胁迫浓度对菲律宾蛤仔进行不同时间(1 d、7 d)的胁迫实验,利用内参基因分析软件geNorm和NormFinder筛选稳定表达的内参基因。本研究的顺利开展,将为研究菲律宾蛤仔鳃组织的毒理机制,筛选毒性关键基因提供基础数据;为从基因的角度系统研究亚硝态氮对贝类的致毒机理,防治亚硝态氮引致的危害奠定基础。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

实验用菲律宾蛤仔购于山东省烟台市大润发超市,选取足部伸缩有力、健康的菲律宾蛤仔(11±2.0)g作为实验对象,暂养10 d。暂养和胁迫期间,全天连续充气,水温(20±2)℃,盐度30.0,pH值8±0.1,实验用海水经过3级沙滤,每日喂食螺旋藻液1次(终浓度为5×10³ cells·mL⁻¹左右),在喂食前和喂食2 h后100%换水各1次。每天喂食换水后,在胁迫组水体中加入新鲜配制的亚硝酸钠母液,使其氮浓度达到0.2 mg·L⁻¹。亚硝酸氮浓度每天于喂食换水前和喂食2 h换水后各检测1次(检测方法参照GB/T 7493—1987),亚硝酸氮浓度范围为(0.24±0.04) mg·L⁻¹。实验设置胁迫时间为7 d,分别在实验的第1和7天取样,作为急性和亚急性胁迫样品。

实验用亚硝态氮源为亚硝酸钠(国药集团化学试剂有限公司生产,分析纯),烘干至恒重,用0.22 μm滤膜过滤除菌的海水配成1 mol·L⁻¹的母液,避光冷藏保存,备用。本实验设2组:对照组(0 mol·L⁻¹),胁迫组(0.2 mol·L⁻¹),每组设3个重复,每个重复用菲律宾蛤仔30只。每个重复随机选取6只菲律宾蛤仔,取其鳃组织,将其完全浸入TRIzol液中,-20℃保存。

1.2 总RNA的提取及cDNA制备

用Trizol (TaKaRa)试剂盒提取菲律宾蛤仔鳃组织的总RNA,用琼脂糖凝胶电泳(12.0 g·L⁻¹)检测其完整性和纯度,用紫外分光光度计NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, America)确定RNA浓度,-80℃保存样品总RNA。用试剂盒EraserPrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连)去除基因组DNA (gDNA)后,再进行反转录实验,获得菲律宾蛤仔鳃组织的cDNA。采用SYBR Green qPCR (染料法)使用20.0 μL的反转录体系,加入总RNA 1.0 μg、去除gDNA的反应液10 μL,其他成分和用量参照试剂盒说明;反转录程序:37℃、15 min,85℃、5 s,4℃储存,最后于-20℃保存反转录产物。

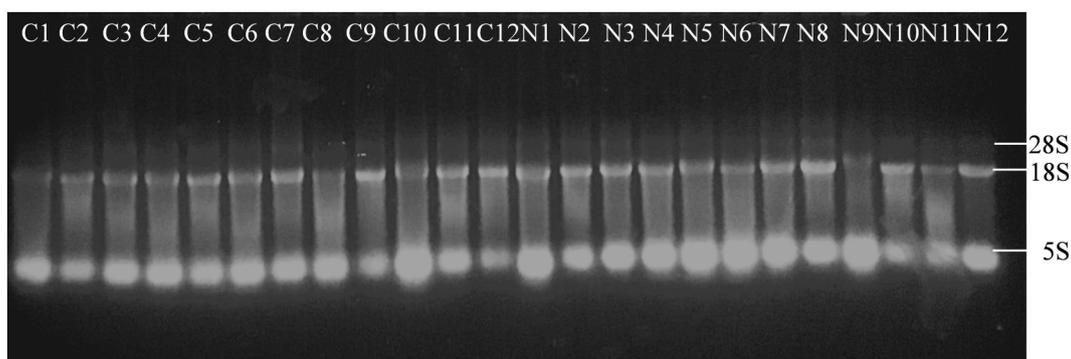


图 1 对照组和亚硝态氮胁迫组菲律宾蛤仔鳃组织总 RNA 凝胶电泳图谱

注: C1~12, Control 组样品 1~12; N1~12, 亚硝态氮胁迫组样品 1~12。

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA samples from the gill tissues of *R. philippinarum* in the control and nitrite-exposed groups

Note: C1-12 represented samples from the control groups; N1-12 represented samples from the nitrite-exposed groups.

1.3 引物特异性检测

本研究选取微管蛋白基因(beta-tubulin, *Tubu*)、肌动蛋白基因(β -actin, *Actin*)、转录延伸因子基因(elongation factor 1-alpha, *EF1 α*)、核糖体(18S rRNA, 18S)、泛素蛋白基因(Ubiquitin, *Ubi*)和亲环素基因(cyclophilin A, *CyPA*)等 6 个基因作为候选内参基因。根据课题组前期实验结果^[10], 选用 6 对候选内参基因的引物并交由生工生物技术(上海)有限公司合成。利用普通 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳($12.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)验证 6 对引物的可靠性。20.0 μL 的 PCR 反应体系包括 10 \times PCR Buffer 2.0 μL , dNTP Mixture 1.5 μL , MgCl_2 1.2 μL , Taq 0.2 μL , 上、下游引物各 1.0 μL , 以等量混合的胁迫组和对照组鳃组织 RNA 反转录合成的 cDNA 做模板, 用量 1.0 μL , RNAase-Free Water 10.1 μL 。反应程序为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 36 次, 最后 72 $^\circ\text{C}$ 保温 10 min, 产物 4 $^\circ\text{C}$ 储存。

1.4 实时荧光定量 PCR 的扩增

将亚硝态氮胁迫的实验组及对照组的 cDNA 各取 2.0 μL 混匀, 将其浓度分别稀释 20、50、100、200、500 倍作 cDNA 模板。按照 SYBR Select Master qRT-PCR 试剂盒 (MixApplied Biosystems, America) 使用说明, 在 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, America) 上进行扩增反应。20.0 μL 的反应体系包括 SYBR Select Master Mix 10.0 μL , 上、下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.6 μL , cDNA(50 \times)模板 5 μL , ddH₂O 3.8 μL 。qRT-PCR 反应程序为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 7 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s; 60 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s; 循环 40 次。扩增实验结束后, 进行熔解曲线分

析。

1.5 数据处理

根据 7500 System Software 获取的 qRT-PCR 扩增曲线, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[11] 计算样本的相对表达量; 分别利用软件 geNorm 和 NormFinder 对 6 个内参基因的表达稳定性值(expression stability value, *M*) 进行评价, 再采用加权赋值法^[12] 综合比较基因的表达稳定性, 从而确定最适合的内参基因。

2 结果(Results)

2.1 总 RNA 提取

随机选取 2 个处理组的 24 个样品进行琼脂糖凝胶($1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)电泳检测, 发现样品总 RNA 28S、18S、5S 的条带清晰(图 1)。NanoDrop 2000 检测其 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 范围内, A_{260}/A_{230} 均大于 2.0, 说明 RNA 的提取质量符合后续的 qRT-PCR 要求。

2.2 cDNA 质量和引物特异性检测

以鳃组织的混合 cDNA 为模板进行普通 PCR 扩增后, 用 $12.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增产物均为单一清晰条带, 且产物大小与目标产物大小匹配。荧光定量 PCR 熔解曲线分析显示, 6 对引物的扩增产物均呈现单一峰且重复性好(图 2)。由此说明, 所采用的 6 对引物不存在非特异性扩增, 也没有形成引物二聚体, 均适用于 qRT-PCR 分析。将模板进行不同浓度梯度稀释后用引物扩增, 结果表明, cDNA 模板稀释 50 倍时, 内参基因的 Ct 值均在 12.0~25.0 范围内, 适合作为检测的模板浓度。

2.3 内参基因表达的稳定性评估

2.3.1 geNorm 软件评估

将对照组和亚硝态氮胁迫(1 d、7 d)的菲律宾蛤

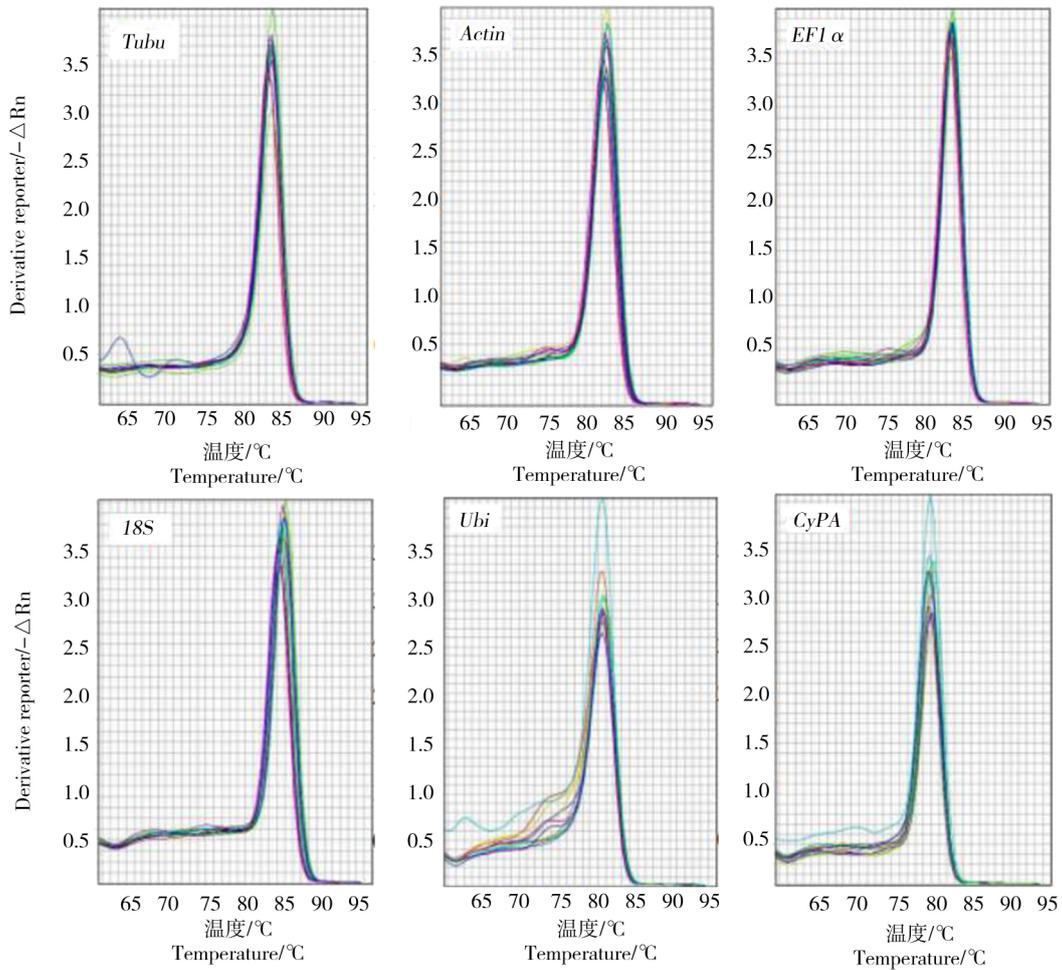


图 2 菲律宾蛤仔 6 个候选内参基因扩增产物的熔解曲线
 Fig. 2 Melting curves of 6 candidate reference genes from *R. philippinarum*

表 1 geNorm 评估 6 个候选内参基因的稳定性情况
 Table 1 Stability values of 6 candidate reference genes calculated by geNorm

样品 Samples	18S	<i>Actin</i>	<i>Tubu</i>	<i>EF1α</i>	<i>Ubi</i>	<i>CyPA</i>	Normalisation factor (<i>M</i>)
C1	2.36E-01	1.83E-01	3.53E-01	2.51E-01	1.73E-01	4.25E-01	0.8223
C2	1.16E-01	1.50E-01	7.75E-01	1.98E-01	1.98E-01	5.36E-01	0.8245
C3	5.13E-01	4.38E-01	1.00E+00	6.89E-01	1.00E+00	4.96E-01	2.0952
1day-1	1.34E-01	4.03E-01	5.10E-01	4.75E-01	1.25E-01	5.27E-01	0.9916
1day-2	1.00E+00	1.00E+00	3.08E-01	1.00E+00	5.04E-01	1.00E+00	2.3559
1day-3	2.58E-01	1.98E-01	1.76E-01	2.52E-01	2.21E-01	2.48E-01	0.7182
7day-1	1.56E-01	1.00E-01	7.75E-02	2.18E-01	1.87E-01	1.42E-01	0.4449
7day-2	2.55E-01	4.04E-01	8.00E-01	5.66E-01	4.93E-01	3.81E-01	1.4589
7day-3	4.33E-01	2.19E-01	1.77E-01	8.58E-02	1.51E-01	3.04E-01	0.6465
<i>M</i> <1.5	1.066	0.829	1.195	0.938	0.948	0.882	

注: C1、C2、C3 表示对照组 1、2、3 号样品; 1day-1、1day-2、1day-3 表示亚硝态氮胁迫 1 天的样品 1、2、3 号; 7day-1、7day-2、7day-3 表示亚硝态氮胁迫 7 天的样品 1、2、3 号。

Note: C1, C2, C3 stand for control 1, control 2, control 3; 1day-1, 1day-2, 1day-3 stand for sample 1, sample 2, sample 3 exposed to nitrite for 1 day; 7day-1, 7day-2, 7day-3 stand for sample1, sample 2, sample 3 exposed to nitrite for 7 days.

仔的鳃组织 cDNA 分别进行 qRT-PCR 扩增,用- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出各候选基因的相对表达量,将其值输入 geNorm 软件进行分析。根据分析结果,获得 6 个候选内参基因的平均表达稳定值 M : 18S (1.066)、*Actin* (0.829)、*Tubu* (1.195)、*EF1 α* (0.938)、*Ubi* (0.948) 和 *CyPA* (0.882) (表 1)。依据 geNorm 软件的分析原则, M 值越小,则说明该基因表达越稳定。因此,候选内参基因的表达稳定性由高到低依次排序为 *Actin*>*CyPA*>*EF1 α* >*Ubi*>18S>*Tubu*,即 *Actin* 和 *CyPA* 的表达相对稳定。

为了校正系统偏差,geNorm 软件一般选出 2 个以上的候选基因作为内参基因。内参基因数目的多少主要通过计算内参基因的配对差异值 V_n/V_{n+1} 来确定,其配对差异值以 0.15 为默认取舍值。当配对差异值小于 0.15 时,候选内参基因中适合作为 qRT-PCR 内参基因的数目确定为 n 个^[13]。本研究中配对差异值均大于 0.15(图 3)。

2.3.2 NormFinder 软件评估

NormFinder 软件通过程序运行生成基因表达的稳定性值,稳定性越低表明内参基因表达越稳定^[14]。由软件分析结果可知(表 2),基因的稳定性由高到低依次为 *Actin*>*Ubi*>*CyPA*>*EF1 α* >18S>*Tubu*,即 *Actin* 的表达稳定性最好。

2.3.3 内参基因表达稳定性综合分析

根据软件 geNorm 和 NormFinder 的分析结果,采用加权赋值法^[12],对每个基因的表达稳定性分别赋值后再求和,依据分数越小稳定性越好的原则,对结果重新排序,分数最小者排在第 1 位,其他依次排名为 2、3、4、5、6 位。统计结果显示(表 3),得分最低的是 *Actin*(2 分),排名第 1,说明 6 个候选内参基因中 *Actin* 的表达稳定性最高,其他依次为 *CyPA*、*Ubi*、*EF1 α* 、18S、*Tubu*。由此说明,菲律宾蛤仔受到

亚硝态氮胁迫后,鳃组织中 *Actin* 基因的表达比较稳定,适合作为内参基因对其他基因的表达水平进行标准化分析。

3 讨论(Discussion)

使用 qRT-PCR 技术分析目标基因的表达趋势时,往往把内参基因作为数据标准化的对照进行校正^[15]。在贝类生物中,开展了很多筛选相关内参基

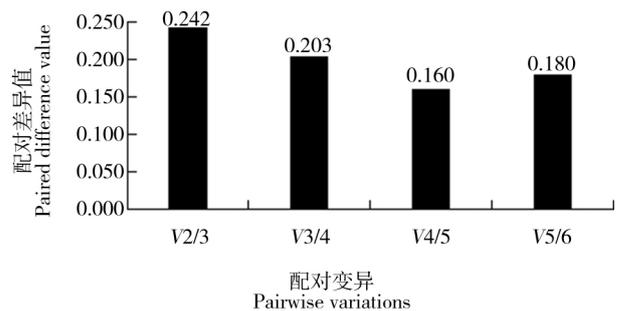


图 3 geNorm 评估 6 个内参基因的稳定性
Fig. 3 Stability values of 6 reference genes calculated by geNorm

表 2 NormFinder 评估 6 个内参基因的稳定性
Table 2 Stability values of 6 reference genes calculated by NormFinder

基因名称 Gene name	基因稳定值 Stability value	标准误 Standard error
18S	0.948	0.337
<i>Actin</i>	0.402	0.241
<i>Tubu</i>	1.259	0.419
<i>EF1α</i>	0.750	0.290
<i>Ubi</i>	0.445	0.242
<i>CyPA</i>	0.553	0.254
Best gene	<i>Actin</i>	

表 3 内参基因稳定性的综合分析

Table 3 Comprehensive weighting comparison of reference genes' stability

基因 Gene	geNorm(得分) GeNorm (Score)	NormFinder(得分) NormFinder (Score)	综合性评价排名(得分) Comprehensive Weighting Ranking (Score)
18S	5	5	5 (10)
<i>Actin</i>	1	1	1 (2)
<i>Tubu</i>	6	6	6 (12)
<i>EF1α</i>	3	4	4 (7)
<i>Ubi</i>	4	2	3 (6)
<i>CyPA</i>	2	3	2 (5)

因的工作,为进一步研究贝类分子毒理学提供了参考依据。Bai等^[16]筛选出了三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)在生物矿化过程中的内参基因 *Ubi*、*Rpl18* 和 *EF1 α* ;不同组织和发育时期的合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[17]、不同发育阶段和雌激素暴露后的栉孔扇贝(*Chlamys farrer*)^[18]、以及多氯联苯胁迫下红树蚬(*Polymesoda erosa*)^[19]体内最稳定的内参基因均为 *Actin*。鲍相渤等^[20]分别探讨了饥饿、致病菌感染和环境水温胁迫条件下虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)成体的鳃、肾、闭壳肌组织、外套膜、血淋巴和胰腺腺等不同组织的适宜内参基因。本研究通过 qRT-PCR 比较了菲律宾蛤仔在亚硝态氮胁迫下鳃组织的 6 个候选内参基因的表达稳定性,确定了 *Actin* 为其最适内参基因。

有大量研究认为,同一管家基因在不同细胞类型和不同生理状态下的表达并不是恒定不变的^[19,21-22],但 *Actin* 基因的表达量在超过 90% 研究条件下都处于稳定状态,适合单独作为 qRT-PCR 的内参基因^[23]。本研究测试的 6 个表达量相对稳定的基因中, *Actin* 基因同样是表达水平最为稳定的一个。曹腾飞等^[10]确定了氨氮胁迫后菲律宾蛤仔鳃组织中最适宜的内参基因为 *EF1 α* 。由此可见,利用 qRT-PCR 研究基因表达的稳定性时,即便是同一物种的同一组织处于不同胁迫条件下,内参基因的选择也会不同^[19],需要具体情况具体分析。

目前,用于评价内参基因表达稳定性的常用软件有 geNorm、NormFinder、BestKeeper 等,但是采用不同软件分别分析得到的排序结果之间往往存在差异,导致排序不一致,而综合多个软件的分析结果相互验证则可提高研究的准确性^[19,24-25]。geNorm 是 Vandesompele 等^[26]2002 年开发的一款用于微软 Excel 平台的 VBA 宏程序,将计算平均表达稳定值 M 作为基因稳定性的评价指标,据 M 值分析得出配对差异值(V_n/V_{n+1}),其配对差异值一般以 0.15 为默认取舍值,若 $V_n/V_{n+1} < 0.15$,则最适内参基因的数量为 n 个;若 $V_n/V_{n+1} > 0.15$,则最适内参基因的数量为 $(n+1)$ 个。NormFinder 是 Andersen 等^[14]2004 年研发的筛选稳定性内参基因的另一款程序,其程序计算原理和 geNorm 相似,也是先获得内参基因的表达稳定值 M ,再根据 M 值的大小来筛选最适合的内参基因, M 值越小越稳定。前者可用于筛选任何样品的任何数量的内参基因,通过程序分析后确定适合的内参基因和最适宜的内参基因数目;后者则不仅能

比较内参基因的表达差异,还可以计算样品组间的差异,但只能筛选出一个最适合的内参基因^[27]。考虑到两者程序计算原理的相似性,本实验采用了 geNorm 和 NormFinder 两个筛选软件的评价结果相互验证,但两个软件所获得的基因表达稳定性顺序出现了不一致,故利用 Su 等^[12]的加权赋值法,综合比较了 geNorm 和 NormFinder 的评价结果,从而获得了这 6 个内参基因表达稳定性,表达较为稳定的基因为 *Actin* 和 *CyPA*, *Actin* 为最稳定的内参基因。

使用 geNorm 软件分析内参基因稳定性时,可根据 $V_n/V_{n+1} (< 0.15)$ 来确定内参基因的适宜数目,但 geNorm 使用指南中也明确地指出 0.15 并非严格标准值。多项实验研究中也出现了差异分析值大于 0.15 的情况,鲍相渤等^[20]认为不同组织间的 V_n/V_{n+1} 大于 0.15,是不同组织的细胞类型和比例不同以及实验中的候选基因有限所致。Li 等^[28]认为,在人类卵巢肿瘤的内参基因选择中, V_n/V_{n+1} 大于 0.15 是由内参基因的表达受组织类型及患者年龄、肿瘤的所处阶段等生理因素和病理因素的影响不同而造成的。Penning 等^[29]比较猫不同组织中的 10 个候选内参基因的表达稳定性时发现,需同时选用 6 个内参基因才能保证对所有组织进行最佳标准化,而此时的 V_n/V_{n+1} 亦大于 0.15。蒋婷婷等^[30]对石蒜属(*Lycoris*)植物内参基因的筛选、曹腾飞等^[10]在筛选氨氮胁迫下菲律宾蛤仔的内参基因时均遇到了 V_n/V_{n+1} 大于 0.15 的情况,但结果并未拘泥于 $V_n/V_{n+1} \leq 0.15$ 。本实验中差异分析值 V_n/V_{n+1} 大于取舍值 0.15,可能是在亚硝态氮胁迫后的不同时间段取材所导致的。

通讯作者简介:王爱云(1977-),女,硕士,讲师,研究方向为生态毒理和分子遗传学。

共同通讯作者简介:吕家森(1976-),男,博士,讲师,研究方向为海洋生物学。

参考文献(References):

- [1] 中国环境监测总站. 2014 年中国近岸海域环境质量公报 [EB/OL]. (2017-06-06) [2019-04-20]. <http://www.cnemc.cn/jcbg/zgjahyhjzlg/201706/W020181008686377029520.pdf>
- [2] 中国环境监测总站. 2015 年中国近岸海域环境质量公报 [EB/OL]. (2017-06-05) [2019-04-20]. http://www.cnemc.cn/jcbg/zgjahyhjzlg/201706/t20170605_647011.shtml
- [3] 中国环境监测总站. 2016 年中国近岸海域环境质量公报 [EB/OL]. (2018-06-19) [2019-04-20]. <http://www.cnemc.cn>

- cn/jcbg/zgjahyhjzlg/201806/P020181010532795202154.pdf
- [4] Soucek D J, Dickinson A. Acute toxicity of nitrate and nitrite to sensitive freshwater insects, mollusks and a crustacean [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 62(2): 233-242
- [5] 张晓森, 宁军号, 常亚青, 等. 氨氮和亚硝酸氮对偏顶蛤的急性毒性研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(8): 115-117
- Zhang X S, Ning J H, Chang Y Q, et al. Acute toxicity of ammonia nitrogen and nitrite to *Modiolus modiolus* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(8): 115-117 (in Chinese)
- [6] 郭增华, 王秋燕. 亚硝酸盐氮对方斑东风螺毒性的研究[J]. 海洋水产研究, 2014, 27(6): 88-92
- Guo Z H, Wang Q Y. Study on the toxicity of nitrite nitrogen to *Babylonia areolata* [J]. Marine Fisheries Research, 2014, 27(6): 88-92 (in Chinese)
- [7] 罗杰, 陈加辉, 刘楚吾. 管角螺稚贝对亚硝酸盐耐受力的研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 42-48
- Luo J, Chen J H, Liu C W. Study on tolerance of *Hemifusus tuba* juvenile at to nitrite [J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(2): 42-48 (in Chinese)
- [8] 陆锦天, 林惠山. 罗氏沼虾规模性育苗的水质标准及水质优化技术[J]. 水产科技情报, 2001, 28(4): 157-160, 162
- [9] 姚传付. 养鱼慎防亚硝酸盐[J]. 北京水产, 2006, 11(2): 44
- [10] 曹滕飞, 丛明, 李兆艳, 等. 氨态氮对菲律宾蛤仔毒理机制研究的内参基因筛选[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 182-190
- Cao T F, Cong M, Li Z Y, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR in *Ruditapes philippinarum* exposed to ammonia nitrogen [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 182-190 (in Chinese)
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [12] 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*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(3): 830-835
- [13] 张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(5): 546-550
- Zhang Y J, Zhu Z F, Lu R, et al. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2007, 34(5): 546-550 (in Chinese)
- [14] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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
- [15] Gutierrez L, Mauriat M, Guenin S, et al. The lack of a systemic 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(6): 609-618
- [16] 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
- [17] 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 (in Chinese)
- [18] 刘颖, 王双耀, 高乔, 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, Gao Q, et al. Study on the expression stability of reference genes in *Chlamys farrer* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 616-622 (in Chinese)
- [19] 莫祖英, 车志群, 廖思明, 等. 多氯联苯胁迫下红树蚬荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 广西科学, 2015, 22(3): 350-356
- Mo Z Y, Chen Z Q, Liao S M, et al. Reference gene selection for qRT-PCR in mangrove mud clam (*Polymesoda erosa*) under PCBs stress [J]. Guangxi Sciences, 2015, 22(3): 350-356 (in Chinese)
- [20] 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 (in Chinese)
- [21] Barbler R D, Harmer D W, Coleman R A, et al. GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues [J]. Physiological Genomics, 2005, 21(3): 389-395
- [22] Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR

- [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2013, 54(4): 391-406
- [23] 陈凤花, 王琳. 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的选择[J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(5): 393-395
- [24] 曾文韬, 柴春月, 袁道龙. 适用于大豆实时荧光定量 PCR 分析的内参基因的筛选和验证[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(5): 787-795
Zeng W T, Chai C Y, Dou D L. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis in soybean [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(5): 787-795 (in Chinese)
- [25] 胡宁宁, 郭慧琴, 李西良, 等. 羊草不同组织实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. *草业科学*, 2017, 34(7): 1434-1441
Hu N N, Guo H Q, Li X L, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR of *Leymus chinensis* in different tissues [J]. *Praracultural Science*, 2017, 34(7): 1434-1441 (in Chinese)
- [26] 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 Biology*, 2002, 3(7): research 0034.1-0034.11
- [27] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. *现代农业科技*, 2017(5): 278-281
Wu J Y, He B, Du Y J, et al. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017(5): 278-281 (in Chinese)
- [28] Li Y L, Ye F, Hu Y, et al. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 394(1): 110-116
- [29] Penning L C, Vrieling H E, Brinkhof B, et al. A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen tissues [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 120(3-4): 212-222
- [30] 蒋婷婷, 高燕会, 董再康. 石蒜属植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. *园艺学报*, 2015, 42(6): 1129-1138
Jiang T T, Gao Y H, Tong Z K. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lycoris* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(6): 1129-1138 (in Chinese)
- ◆