

# 双锯鱼(*Amphiprion*)胚胎不同发育阶段和成鱼 不同组织中内参基因的筛选及应用\*

李迎娣<sup>1, 2, 3, 4</sup> 孙志宾<sup>2, 3, 4</sup> 马爱军<sup>2, 3, 4</sup> 杨敬昆<sup>2, 3, 4</sup> 刘志峰<sup>2, 3, 4</sup> 于宏<sup>2, 3, 4</sup>  
赵亭亭<sup>2, 3, 4</sup> 常浩文<sup>2, 3, 4</sup> 朱理光<sup>2, 3, 4</sup> 刘诗颖<sup>2, 3, 4</sup> 曲江波<sup>5</sup>

(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可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 山东青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东青岛 266237; 4. 中国-东盟海水养殖技术“一带一路”联合实验室 广东广州 510275; 5. 烟台开发区天源水产有限公司 山东烟台 264003)

**摘要** 双锯鱼(*Amphiprion*)亦称为海葵鱼, 又称为小丑鱼, 是一类经济价值较高的海水观赏鱼。目前国内在双锯鱼的胚胎发育、人工饲养以及形态学观察等方面已经取得了有效成果, 但在分子生物学水平上对其基因表达的研究较少。为了筛选出适用于双锯鱼胚胎不同发育阶段以及成鱼组织的内参基因, 分析酪氨酸酶(TYR)基因的表达情况, 以眼斑双锯鱼(*A. ocellaris*)和白条双锯鱼(*A. frenatus*)为材料, 利用实时定量聚合酶链式反应(qPCR)对 *18S rRNA*、*GAPDH* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因)、*Ef-1 $\alpha$*  (转录延伸因子基因)和  $\beta$ -*actin* ( $\beta$ -肌动蛋白基因)这 4 个候选内参基因的表达水平进行检测, 同时通过 geNorm 和 Norm Finder 软件对其稳定性进行评估, 最后以合适的内参基因作为参考, 研究 TYR mRNA 的表达水平。结果表明, 在双锯鱼胚胎的不同发育阶段, *18S* 和  $\beta$ -*actin* 的表达量相对于其他基因较为稳定; 在双锯鱼的不同组织中, 稳定性依次为 *18S*> $\beta$ -*actin*>*Ef-1 $\alpha$* >*GAPDH*。以 *18S* 作为内参基因时分析发现 TYR 基因的表达在双锯鱼胚胎发育过程中呈先上升后下降的趋势, 在体节期表达量最高; 在双锯鱼各组织中均有表达, 且在眼、尾和红皮中表达量最高。

**关键词** 双锯鱼; 内参基因; TYR 基因; qPCR; geNorm; Norm Finder

中图分类号 Q954; S965 doi: 10.11693/hyhz20210800196

双锯鱼隶属于鲈形目(Perciformes)、雀鲷科(Pomacentridae)、双锯鱼属(*Amphiprion*) (白海锋等, 2011)。其与海葵共生, 为海葵去除坏死组织, 海葵为其提供保护, 亦被称为海葵鱼(叶乐等, 2008)。双锯鱼体表都有一条或两条白色条纹, 神似戏剧中的丑角, 因此俗称“小丑鱼”。双锯鱼色彩绚丽、性情温和, 且经济价值高, 是海水观赏鱼的首选品种(章霞等, 2015; 张薇等, 2018)。国内在其人工繁育和饲养、形态学观察、性别分化等方面取得了较多成就, 如滕力平等

(2005)对二线小丑鱼(*Amphiprion clarkii*)的发育进行了生态学和形态学两方面的研究, 发现胚后仔、稚、幼鱼阶段的二线小丑鱼体表色素会逐渐增加并积累; Amonrat 等(2013)用富含蛋白质、脂质和虾青素的饲料对眼斑双锯鱼进行投喂, 结果表明, 在一定范围内, 蛋白质含量较高的饲料更适合双锯鱼的生长, 而虾青素和脂质则有利于色素的积聚。但目前分子水平上对双锯鱼体色相关基因表达模式的研究还比较匮乏。

TYR (酪氨酸酶, tyrosinase)基因参与生物体黑色

\* “一带一路”沿线热带国家水产养殖科技创新合作项目, 2018~2020; 中国东盟海上合作基金项目, 2016~2020; 中国水产科学研究院基本科研业务费项目, 2020TD25 号; 青岛海洋科学与技术试点国家实验室“鳌山人才”培养计划项目, 2017ASTCP-OS04 号。李迎娣, 硕士研究生, E-mail: 1721775977@qq.com; 同等贡献第一作者: 孙志宾, E-mail: sunzb@ysfri.ac.cn

通信作者: 马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-08-31, 收修改稿日期: 2021-10-06

素(melanin)的合成,其表达量决定了生物的体色变化,在鱼类的胚胎时期就已经开始表达(蒋燕玲,2016)。通过实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)技术对 TYR 的表达进行分析有助于了解基因的功能、阐明相关基因在胚胎发育和体色变异中的调控机制(杨爱馥等,2010; Tang *et al.*, 2017; 何丽斌等,2018)。且生物体内 mRNA 水平的变化是生理变化的最早信号,会因为处于不同的发育时期或实验条件的不同而表现出不同的浓度,因此可以用来预测生物组织更高层次的变化(Franzellitti *et al.*, 2015)。

内参基因(reference gene)又称管家基因(house-keeping gene),其表达水平受环境因素影响较小,在所有细胞中都能够相对稳定的表达,不同实验条件下选用的内参基因有所不同(邓红平等,2006; 刘颖等,2013; Szczygiel *et al.*, 2021)。常用的内参基因有 18S rRNA 基因、重组蛋白基因(*rps29*)、肌动蛋白基因(*ACT*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)、转录延伸因子基因(*Ef-1 $\alpha$* )、多聚泛素酶基因(*UBQ*)、 $\beta$ -肌动蛋白基因( $\beta$ -*actin*)、 $\alpha$ -微管蛋白基因(*TUA*)和  $\beta$ -微管蛋白基因(*TUB*) (蒋素华等,2018)。内参基因在 qPCR 技术分析基因表达的过程中非常关键,其稳定表达是目标基因表达数据标准化的先决条件,可以作为数据分析的参考标准(Pfaffl *et al.*, 2004; Mitter *et al.*, 2009; 吴萍等,2017)。研究表明,在同一物种中,即使内参基

因在某一条件下能够相对稳定的表达(Mughal *et al.*, 2018),但不一定在所有实验条件下都适用,因此在 qPCR 之前需要筛选出合适的内参基因(Dheda *et al.*, 2005)。若内参基因有较大的表达误差,实验结果中存在的干扰就会增加,从而限制双锯鱼分子生物学方面的研究(Iwata *et al.*, 2008; 吕梁等,2019)。

目前对双锯鱼内参基因筛选的研究较少,为了进一步探索 TYR 基因的表达机制,本实验以白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的组织及不同发育阶段的胚胎作为样品,综合利用 Norm Finder 和 geNorm 软件对 *GAPDH*、18S rRNA、*Ef-1 $\alpha$*  和  $\beta$ -*actin* 这 4 个候选内参基因的稳定性进行分析,并选出相对稳定的内参基因,以 TYR 基因作为目的基因检测其表达规律,为获得最优内参基因提供理论依据,为双锯鱼相关基因的分析奠定应用基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试胚胎、组织均取自黄海水产研究所实验室内经驯化后的野生白条双锯鱼(番茄小丑鱼) (*Amphiprion frenatus*)和眼斑双锯鱼(公子小丑鱼) (*Amphiprion ocellaris*) (图 1)。实验期间将双锯鱼成对饲养在养殖缸中,即一对白条双锯鱼,一对眼斑双锯鱼,水温用加热棒维持在(27 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,盐度为 30~35,光照周期为 14L:10D,每天在 8:00 和 14:00 投喂人工饵料。白条

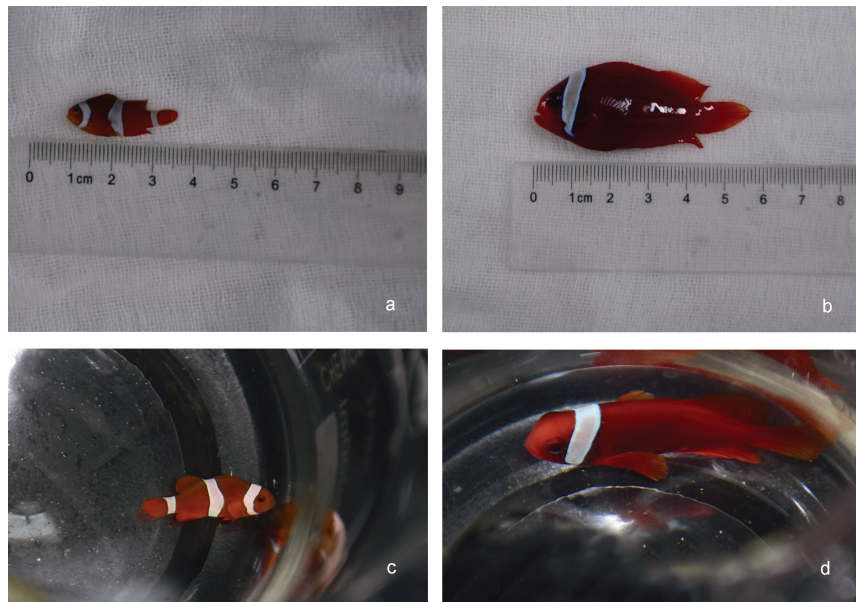


图 1 眼斑双锯鱼和白条双锯鱼外观

Fig.1 Picture of Fales-Clown anemone fish (*A. ocellaris*) and tomato clownfish (*A. frenatus*)

注: a、c: 眼斑双锯鱼; b、d: 白条双锯鱼

双锯鱼通常在 12:00~13:00 产卵, 孵化期为 8~9 d; 眼斑双锯鱼通常在 15:00~16:00 产卵, 孵化期为 9~10 d。分别取这两种双锯鱼的 6 个胚胎发育时期(25 个胚胎/时期, 三个重复): 2 hpf (hours post fertilization, 受精后小时数) (卵裂期)、33 hpf (体节期, 出现黑色素细胞, 图 2)、57 hpf (翻转期)、81 hpf (血管形成期)、105 hpf (器官形成期)、225 hpf (孵化期) (图 3, 图 4)。取这两种双锯鱼的成鱼组织(三月龄, 三个重复): 心脏、脑、脾脏、眼、肠、鳃、白皮、红皮、肌肉、尾(图 5, 以眼斑双锯鱼为例)。将取得的胚胎和组织样品迅速浸泡在 RNA 保护液中, 然后储存在 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 用于后续总 RNA 的提取。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

根据总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN)中的操作说明, 从胚胎

和组织样品中提取总 RNA。由于 RNA 易污染, 提取

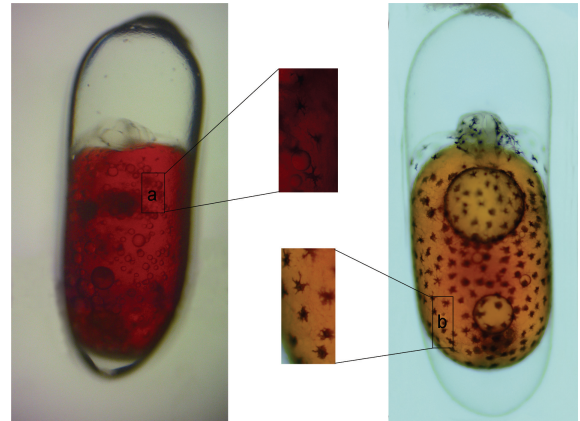


图 2 两种双锯鱼体节期胚胎的黑色素细胞  
Fig.2 Melanocytes of the somite embryos of two anemone fish (*A. frenatus* and *A. ocellaris*)  
注: a. 白条双锯鱼; b. 眼斑双锯鱼

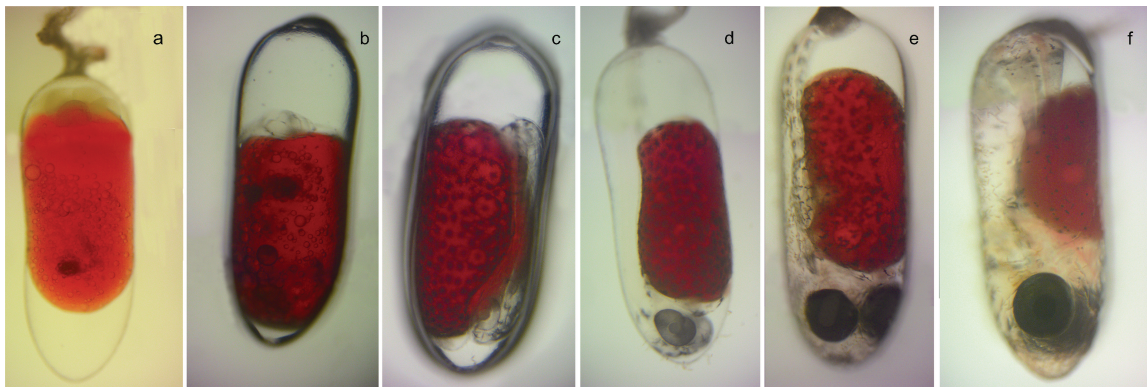


图 3 白条双锯鱼胚胎不同发育时期  
Fig.3 Different stages of embryonic development of tomato clownfish (*A. frenatus*)  
注: a. 卵裂期; b. 体节期; c. 翻转期; d. 血管形成期; e. 器官形成期; f. 孵化期

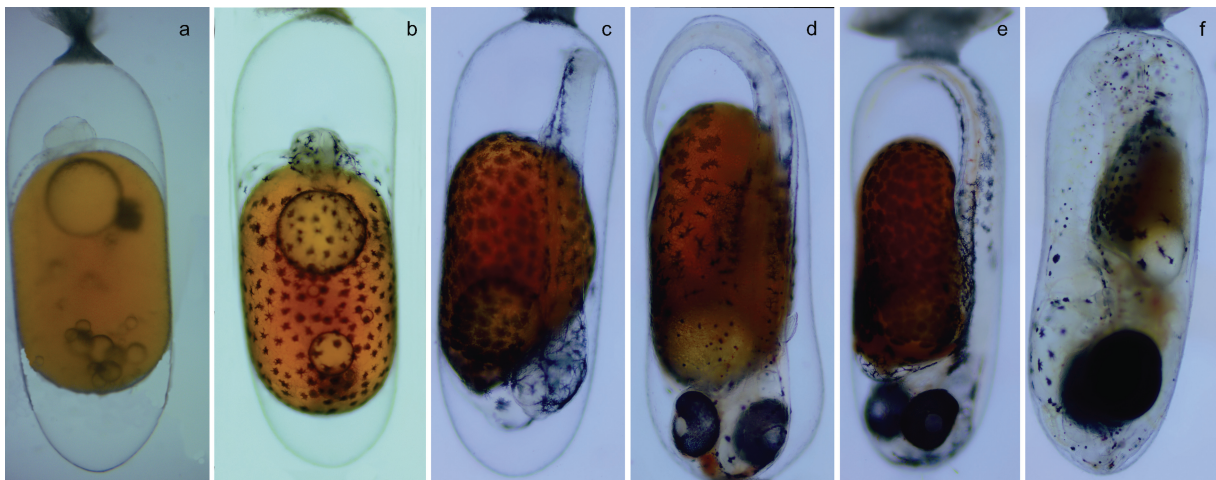


图 4 眼斑双锯鱼胚胎不同发育时期  
Fig.4 Different stages of embryonic development of Fales-Clown anemone fish (*A. ocellaris*)  
注: a. 卵裂期; b. 体节期; c. 翻转期; d. 血管形成期; e. 器官形成期; f. 孵化期

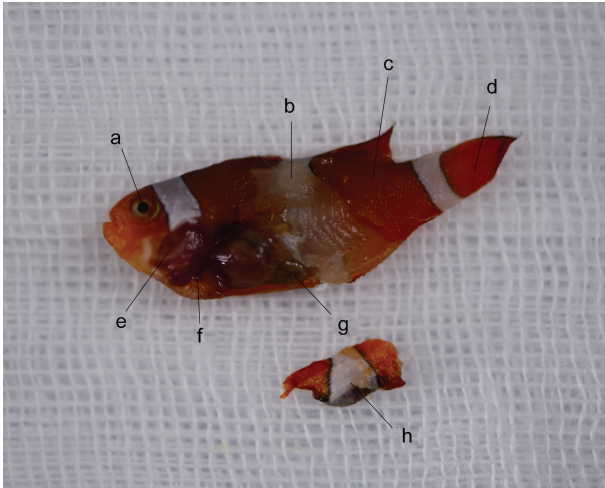


图 5 成鱼组织(以眼斑双锯鱼为例)

Fig.5 Different tissue of adult fish (taking *A. ocellaris* as an example)

注: a. 眼; b. 肌肉; c. 红皮; d. 尾; e. 鳃; f. 心; g. 肠; h. 白皮

完成后迅速将其储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 中。随后,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并使用分光光度计(260 nm)检测总 RNA 的浓度和纯度(王玉成等,

2006)。取 $5\ \mu\text{L}$ 总 RNA,根据 TransScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(TransGen, 北京)提供的说明书将 mRNA 反转录成 cDNA,然后用无菌去离子水稀释 5 倍(1:5),置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 中保存备用。

**1.2.2 引物设计** 从 NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库中获得候选内参基因的编码序列,用 Primer Premier 5.0 设计出上、下游引物(表 1)。

**1.2.3 引物特异性检测** 以双锯鱼组织样品逆转录得到的 cDNA 混合液为模板,对这 4 个候选内参基因进行普通 PCR 反应,检测引物的特异性。反应体系( $20\ \mu\text{L}$ )为: ddH<sub>2</sub>O  $10\ \mu\text{L}$ ,  $2\times\text{TSINGKE}^{\text{®}}$  Master Mix  $7.4\ \mu\text{L}$ , 上游引物  $0.8\ \mu\text{L}$ , 下游引物  $0.8\ \mu\text{L}$ , cDNA  $1\ \mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序设置为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。普通 PCR 扩增得到的产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,观察得到的条带是否单一。

表 1 4 个候选内参基因的相关信息及引物

Tab.1 Primers and related information of four candidate reference genes

基因	基因功能	引物序列(5'-3')	产物大小/bp	$T_m/^{\circ}\text{C}$	NCBI 序列号
<i>18S rRNA</i>	组成核糖体	F: CGGTCGGCGTCCAACCTTCTTAG R: TCTCGGCGAAGGGTAGACACAC	183	60	XR_002748043.1
<i>GAPDH</i>	参与糖酵解反应	F: ACCGCCACACAGAAGACAGTT R: GGGGACACGGAAGCCATAC	146	60	XM_023263785.2
<i>Ef-1<math>\alpha</math></i>	蛋白质翻译	F: CCGCCTTACGCCAGAAAC R: CAGCCAGAAATGGGAACAAAC	179	61	XM_023293606.1
<i><math>\beta</math>-actin</i>	细胞骨架蛋白	F: GCCTCCCCTCAGTAAAGCCAGAT R: CGCCTTCCTCCTCAAGTCAAACA	145	61	XM_023294531.1

**1.2.4 qPCR 试验以及数据分析** 使用 TOROGreen<sup>®</sup> qPCR Master Mix 试剂盒进行 qPCR, 反应应用 StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System 仪器完成, 每份样品重复三次。反应体系( $20\ \mu\text{L}$ )为:  $2\times\text{TSINGKE}^{\text{®}}$  Master Mix  $10\ \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $6.4\ \mu\text{L}$ , 上游引物  $0.8\ \mu\text{L}$ , 下游引物  $0.8\ \mu\text{L}$ , cDNA  $2\ \mu\text{L}$ 。

qPCR 反应程序设置为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 40 个循环。

将 qPCR 得到的数据进行标准化处理, 然后运用 geNorm 和 Norm Finder 这两种软件对以上 4 个候选内参基因进行统计学分析, 从而筛选出在双锯鱼胚胎发育和不同组织中表达相对稳定的内参基因。

**1.2.5 内参基因的应用** 本研究选用 *18S* 作为内参基因, 对 TYR 基因的表达进行分析。TYR 基因的 NCBI 序列号为 XP\_023132182.1, 利用 Primer Premier 5.0 设计得到正、反向引物, 与内参基因的引

物一并交由上海生工生物工程有限公司合成。

正向引物: TGGTTCCTTCTTCCCTCTC

反向引物: GGTTACGCTTCCACTTCCCTTC

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的质量评估及普通 PCR 产物检测

利用分光光度计对提取的双锯鱼胚胎和成鱼组织样品的总 RNA 进行测定, 其中, OD<sub>260/280</sub> 值为 1.8~2.0, 浓度为 340~590 ng/ $\mu\text{L}$ 。数据表明样品的总 RNA 质量较好, 可以用于后续实验。

通过 1%的琼脂糖凝胶电泳对普通 PCR 的产物进行检测, 这 4 个候选内参基因的引物与组织 cDNA 结合之后均得到一个单一的条带, 没有引物二聚体(图 6)。

利用 qPCR 反应得到的这 4 个候选内参基因的熔解曲线, 均为单一峰且重复性好(图 7), 进一步说明引物的特异性好。

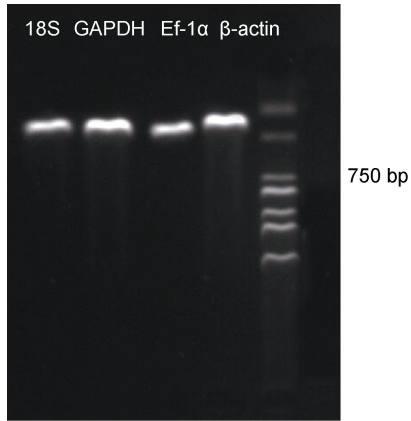


图 6 候选内参基因 PCR 产物

Fig.6 PCR products of candidate reference genes

## 2.2 4 个候选内参基因稳定性分析

### 2.2.1 4 个候选内参基因 Ct 值分析 利用 qPCR

反应对这 4 个候选内参基因进行扩增, 模板分别取自双锯鱼的胚胎和成鱼组织, 数据见表 2, Ct 值分布范围为 13.67~36.71。其中, 最小的 Ct 值出现在 *18S rRNA* 基因的表达中, 表明其在胚胎和组织中的表达水平相对较高; 最大的 Ct 值出现在 *Ef-1α* 的表达中, 表明其表达水平较低, 分布范围为 28.00~36.00 (图 8)。

**2.2.2 Norm Finder 以及 geNorm 稳定性分析** 向内参基因筛选软件中输入标准化后的定量数据, geNorm 会得出相应的表达稳定值( $M$  值);  $M$  值越小, 基因表达越稳定(吴建阳等, 2017); 还有配对变异分析  $V_n/V_{n+1}$  结果, 若  $V_n/V_{n+1} > 0.15$ , 则表明适合内参基因的数量有  $n+1$  个(胡金川, 2008)。Norm Finder 会给出候选内参基因表达稳定值且得到一个最佳选择(滕彦娇等, 2021)。

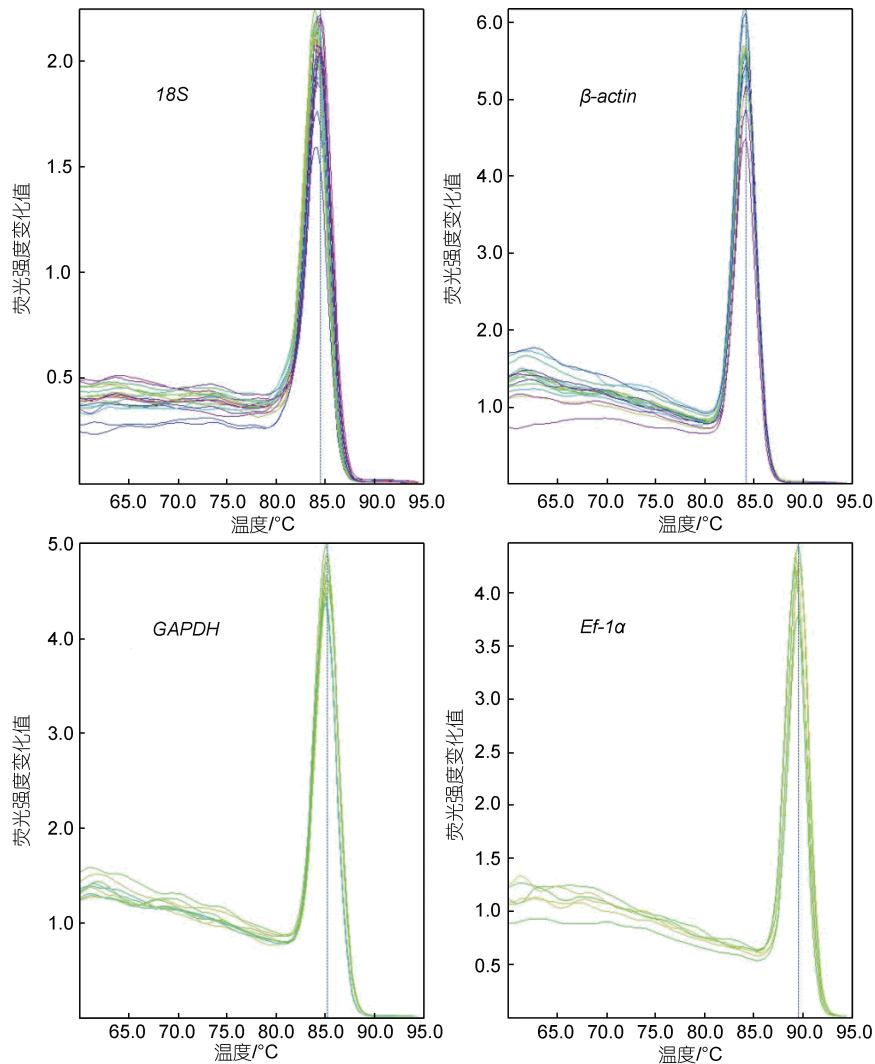


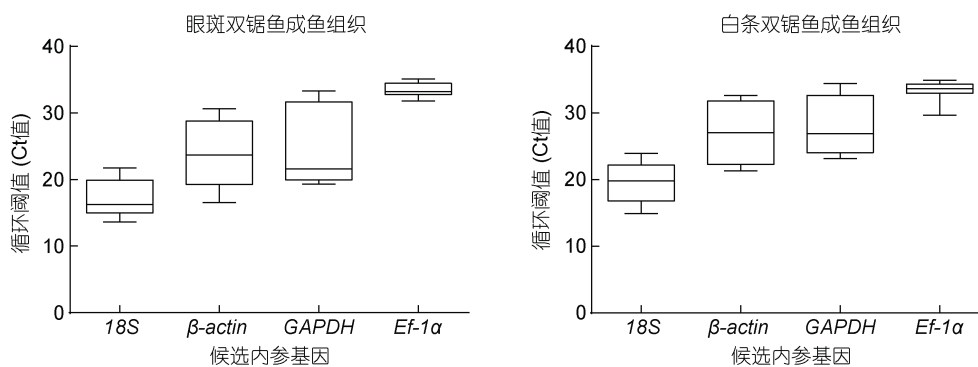
图 7 候选内参基因熔解曲线分析

Fig.7 The melting curve analysis of candidate reference genes

表 2 双锯鱼胚胎不同发育时期以及成鱼组织中 4 个候选内参基因的 Ct 值

Tab.2 The Ct values of 4 candidate reference genes in the embryos and in the adult tissues of two anemone fish (*A. frenatus* and *A. ocellaris*)

样品		18S	$\beta$ -actin	GAPDH	Ef-1 $\alpha$
白条双锯鱼 胚胎不同时期	卵裂期	20.233 203 89	25.674 508 41	29.277 252 20	32.196 454 37
	体节期	16.748 215 36	20.474 146 53	27.209 703 45	32.359 635 67
	翻转期	15.737 508 14	16.256 411 87	19.087 019 60	32.642 943 06
	血管形成期	15.722 440 08	16.599 465 69	17.217 384 97	32.366 768 14
	器官形成期	19.776 355 11	19.285 518 65	18.475 953 42	33.355 667 11
	孵化期	16.910 668 69	22.922 412 24	17.811 621 35	36.706 408 18
眼斑双锯鱼 胚胎不同时期	卵裂期	20.222 445 17	26.838 653 56	31.984 596 89	28.165 008 54
	体节期	16.829 250 34	18.672 692 62	20.899 373 37	34.057 744 34
	翻转期	17.921 131 77	17.694 208 15	20.695 796 33	34.300 362 90
	血管形成期	18.422 943 12	17.104 501 72	20.288 960 77	34.078 220 37
	器官形成期	19.897 961 30	16.444 176 99	18.930 776 60	34.195 220 95
	孵化期	18.943 976 72	17.059 791 56	18.780 651 73	36.153 385 16
白条双锯鱼 成鱼组织	脑	19.604 449 80	31.802 319 42	32.193 656 07	34.485 516 23
	白皮	17.555 663 85	22.446 880 34	24.226 675 03	33.309 556 54
	红皮	14.895 516 29	24.355 391 82	24.157 561 62	33.661 858 45
	眼	14.895 516 29	24.355 391 82	24.157 561 62	33.661 858 45
	肠	20.018 682 48	29.740 699 56	33.973 227 83	34.305 686 38
	心	20.598 351 37	31.882 079 44	23.165 037 58	29.639 093 19
	脾	17.419 445 36	32.643 692 65	34.429 874 84	32.211 217 46
	鳃	22.472 355 10	21.329 067 23	29.698 423 39	33.661 944 71
	尾	22.074 438 73	21.784 748 08	29.626 211 80	33.197 558 72
	肌肉	23.921 159 74	29.890 197 97	23.689 308 38	34.933 262 61
眼斑双锯鱼 成鱼组织	脑	20.417 102 81	30.651 219 26	31.172 313 37	34.264 852 77
	白皮	16.068 778 36	19.582 672 75	20.008 410 14	33.236 911 99
	红皮	14.664 040 46	19.894 173 94	19.722 485 86	32.842 303 38
	眼	13.666 399 53	23.348 739 84	22.207 817 08	34.954 510 79
	肠	17.942 029 95	24.017 220 60	33.303 523 59	32.495 918 91
	心	21.746 465 47	28.551 180 73	20.381 635 45	35.072 257 15
	脾	19.750 886 71	29.513 195 04	33.019 158 26	33.210 472 53
	鳃	15.100 910 93	16.546 852 75	21.012 755 92	31.778 099 27
	尾	15.541 249 17	18.285 227 46	23.272 449 28	34.287 048 34
	肌肉	16.406 237 60	27.077 861 57	19.316 722 66	32.947 932 56



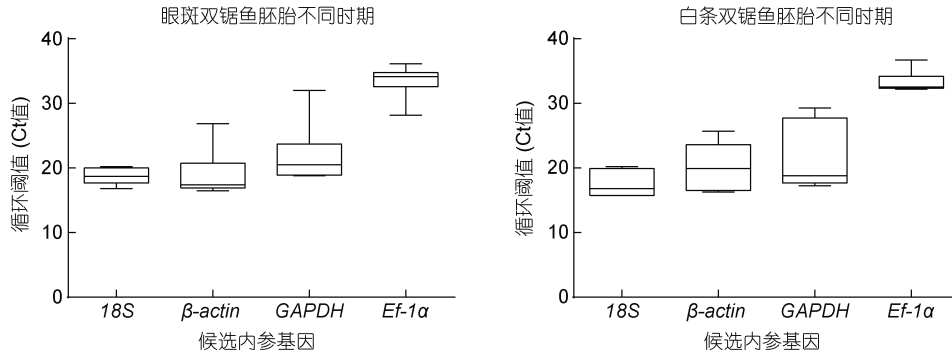


图 8 双锯鱼胚胎不同发育时期以及成鱼组织中 4 个候选内参基因的 Ct 值分布

Fig.8 The Ct distribution of 4 candidate reference genes in the embryos and in the adult tissues of two anemone fish (*A. frenatus* and *A. ocellaris*)

geNorm 分析结果表明, 在眼斑双锯鱼和白条双锯鱼的胚胎中, 18S 和  $\beta$ -actin 的 M 值最小; 在眼斑双锯鱼和白条双锯鱼的成鱼组织中, 18S、GAPDH 和  $\beta$ -actin 的 M 值最小(图 9)。又因为配对变异分析结果  $V_{2/3}=0.904>0.15$  (图 10), 因此在眼斑双锯鱼和白条双锯鱼的成鱼组织、胚胎中, 适合的内参基因有 3 个, 即 18S、GAPDH 和  $\beta$ -actin。

利用 Norm Finder 软件对标准化后的数据进行分析, 在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的胚胎、成鱼组织样品中, 候选内参基因的稳定性排序为 18S rRNA>

$\beta$ -actin>Ef-1 $\alpha$ >GAPDH (稳定性值见表 3), 这与 geNorm 分析结果相符, 表明 18S 和  $\beta$ -actin 在这 4 个候选基因中较为稳定。

因此, 综合 geNorm 和 NormFinder 对候选内参基因稳定性的分析结果, 18S 和  $\beta$ -actin 的表达相对稳定, 且 18S 的 M 值最小, 更适合作为双锯鱼 qPCR 分析实验中的内参基因。

### 2.3 TYR 基因表达分析

利用 qPCR 技术, 以 18S 作为内参基因检测 TYR 基因在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的胚胎及成鱼组织

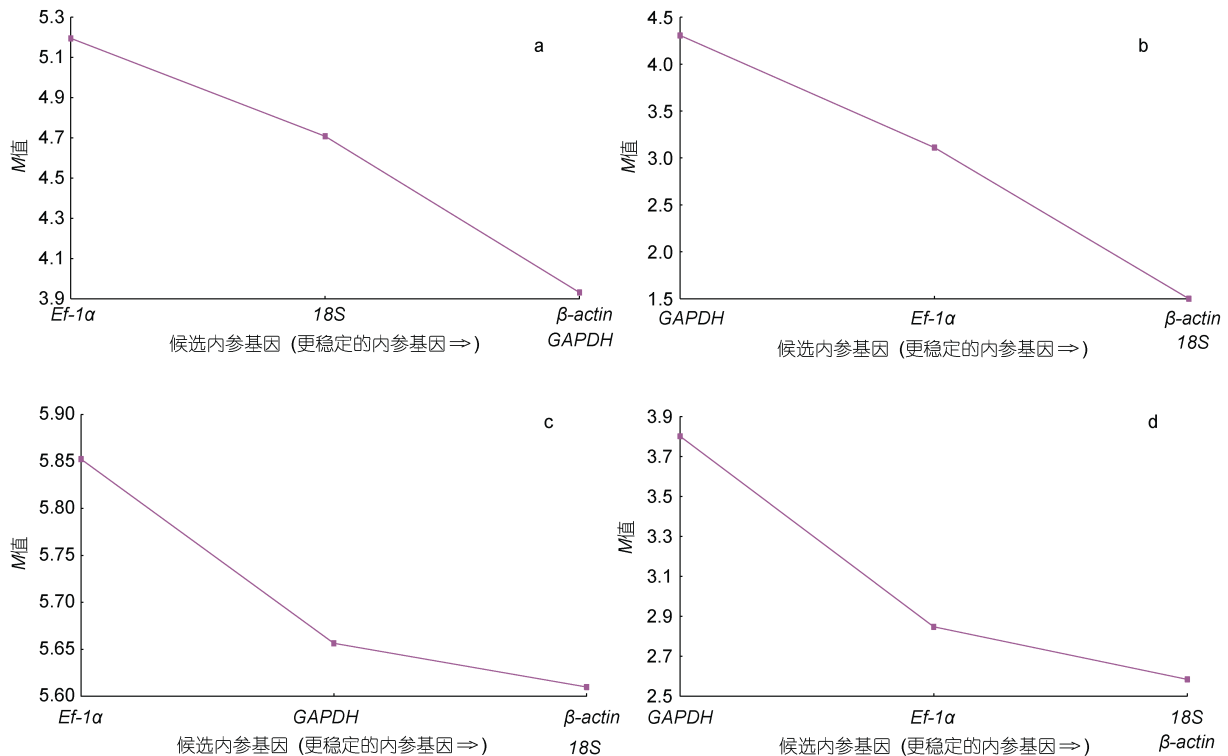


图 9 4 个候选参考基因的平均表达稳定值

Fig.9 The mean expression stability values of candidate reference genes

注: a. 眼斑双锯鱼成鱼组织; b. 眼斑双锯鱼胚胎不同发育时期; c. 白条双锯鱼成鱼组织; d. 白条双锯鱼胚胎不同发育时期

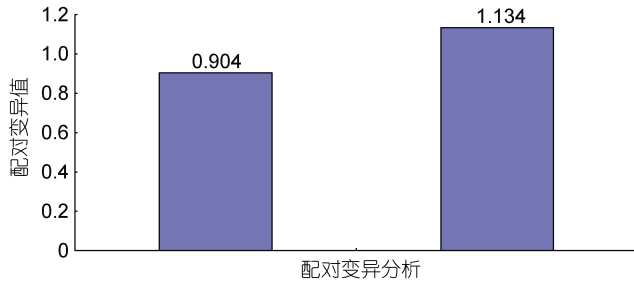


图 10 标准化控制基因数量的确定

Fig.10 Determination of the optimal number of control genes for normalization

中的表达情况, 数据见表 4。结果显示 TYR 基因在双锯鱼胚胎时期就已经开始表达, 表达水平呈先上升后下降的趋势, 在体节期达到最高。且在胚胎观察

过程中发现, 黑色素细胞亦出现在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的体节期(参考图 3, 图 4); 在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼成鱼的眼、红皮以及尾中表达量相对较高(图 11)。

### 3 讨论

实时定量 PCR (qPCR)是目标基因准确表达的首选工具, 内参基因则是 qPCR 数据分析的参考标准, 但不是所有内参基因在实验中都能够稳定表达(Vandesompele *et al*, 2002)。因此, 在进行 qPCR 之前需要根据样品和实验条件选择合适的内参基因。geNorm 和 Norm Finder 软件是专门用来筛选内参基因的, 但分析结果略有不同。其中, Norm Finder 是

表 3 利用 Norm Finder 程序获得的  $M$  值  
Tab.3 The  $M$  value obtained using the Norm Finder program

基因	白条双锯鱼胚胎	白条双锯鱼成鱼组织	眼斑双锯鱼胚胎	眼斑双锯鱼成鱼组织
<i>18S</i>	1.38	3.15	1.22	2.07
<i><math>\beta</math>-actin</i>	1.49	3.17	1.84	2.86
<i>Ef-1<math>\alpha</math></i>	2.41	3.31	2.67	3.27
<i>GAPDH</i>	3.42	3.38	3.07	3.56

表 4 TYR 基因在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的胚胎及成鱼组织中的表达

Tab.4 The expression of TYR gene in the embryos and adult tissues of tomato clownfish (*A. frenatus*) and Fales-Clown anemone fish (*A. ocellaris*)

样品	表达值	方差	
白条双锯鱼胚胎不同时期	卵裂期	0.064 700 329	0.014 031 195
	体节期	20.985 859 680	4.366 306 772
	翻转期	8.080 906 002	3.139 288 718
	血管形成期	1.829 702 667	0.220 074 797
	器官形成期	0.684 392 815	0.068 085 951
	孵化期	0.086 264 321	0.020 710 141
	眼斑双锯鱼胚胎不同时期	卵裂期	0.006 143 738
体节期		25.406 642 290	3.618 796 182
翻转期		0.552 635 445	0.085 370 738
血管形成期		1.173 101 338	0.164 337 016
器官形成期		5.204 407 300	1.545 504 665
孵化期		1.556 491 153	0.414 764 253
白条双锯鱼成鱼组织	脑	1.979 600 353	0.839 208 295
	白皮	2.086 598 358	1.447 061 984
	红皮	17.873 852 740	6.024 160 485
	眼	20.769 397 450	3.064 902 810
	心	1.129 389 057	0.946 304 624
	肠	0.098 956 221	0.120 741 096
	脾	0.005 908 475	0.002 985 394
	鳃	3.499 220 193	3.091 848 081
	尾	29.834 047 950	5.862 954 725
	肌肉	0.004 298 665	1.546 804 270



续表

样品	表达值	方差
眼斑双锯鱼成鱼组织	脑	0.553 707 659
	白皮	4.339 093 184
	红皮	16.485 693 880
	眼	8.937 691 557
	心	0.913 546 080
	肠	0.969 164 233
	脾	0.024 136 951
	鳃	0.403 210 861
	尾	10.851 223 170
	肌肉	0.024 572 363

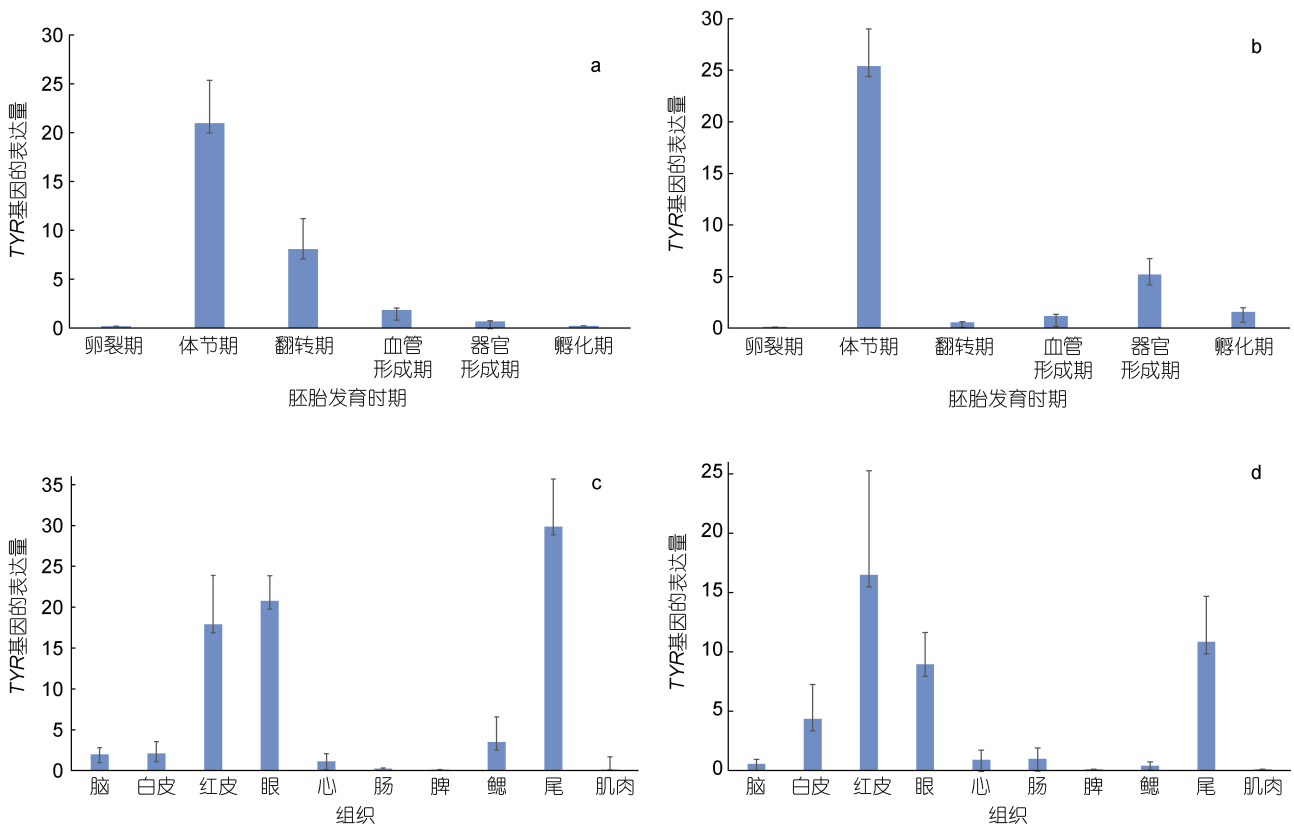


图 11 TYR 基因在白条双锯鱼和眼斑双锯鱼的胚胎及成鱼组织中的表达

Fig.11 The expression of TYR gene in the embryos and adult tissues of tomato clownfish (*A. frenatus*) and Fales-Clown anemone fish (*A. ocellaris*)

注: a. 白条双锯鱼胚胎不同发育时期; b. 眼斑双锯鱼胚胎不同发育时期; c. 白条双锯鱼成鱼组织; d. 眼斑双锯鱼成鱼组织

根据内参基因的稳定性大小对其进行排序, 并得到每个实验条件下最稳定的内参基因; geNorm 则是可以得出适合实验的最佳内参基因组合(吴建阳等, 2017)。

用于鱼类胚胎不同发育阶段以及不同组织研究的内参基因种类很多, 常见的有 *Ef-1a* 基因, 在真核生物中参与蛋白质的翻译, 是总蛋白含量的 1%~2% (唐永凯等, 2008); *18S rRNA* 是一类编码核糖体小亚

基的 rRNA (周晓馥等, 2016); *GAPDH* 基因参与糖降解反应(Pei *et al.*, 2007);  $\beta$ -actin 基因是肌肉及细胞骨架的主要成分, 广泛分布于各组织中(唐永凯等, 2013)。更多的研究为了真实地反映目标基因的表达水平, 会筛选出两个或两个以上的内参基因作为数据分析过程中的参考, 如张宁等(2018)通过实验选择了 *rpl7* 和 *rpl7a* 作为多鳞鱧研究中的内参基因; 在对

不同处理条件下的异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)组织和尾鳍细胞的研究中, 实验结果表明  $\beta$ -actin 可以作为肾脏组织和细胞研究的适合内参基因, 而 *Ef-1 $\alpha$*  适合在病毒刺激下作为数据分析的内参基因(费越越等, 2020); 茅华华等(2016)对斑鳢(*Channa maculata*)的胚胎不同时期和成鱼组织进行分析, 结果得出  $\beta$ -actin 和 *tmem104* 适合作为组织相关基因表达分析的内参基因, 而 *sep15* 和 *tmem256* 可以作为胚胎相关研究的内参基因。

目前, 关于双锯鱼的研究多倾向于胚胎发育和饲养、繁殖, 而对内参基因筛选的研究少之又少。本研究通过 geNorm 和 Norm Finder 软件对  $\beta$ -actin、*18S rRNA*、*Ef-1 $\alpha$*  和 *GAPDH* 的稳定性进行分析, 最终选择 *18S* 作为双锯鱼基因表达研究的合适内参基因。这与陈张帆等(2018)在牙鲆胚胎中的筛选结果相似。TYR 是黑色素合成的关键酶, TYR 基因的表达决定了生物体色的变化程度(张植元等, 2017)。结果表明, 在双锯鱼胚胎发育过程中就已经出现了黑色素细胞(图 2), 即 TYR 基因开始表达, 在体节期表达量最高; 在成鱼的眼、尾和红皮中表达量最高。只有筛选出合适的内参基因, qPCR 技术在目标基因的研究中才能发挥重要作用, 否则就会出现一定的误差(吕梁等, 2019)。旨在为后期研究双锯鱼相关基因的表达机制提供应用基础, 使数据分析结果更有效、可靠。

## 4 结论

为了筛选出合适的内参基因, 本实验以眼斑双锯鱼和白条双锯鱼的胚胎、组织为研究对象, 对  $\beta$ -actin、*18S rRNA*、*Ef-1 $\alpha$*  和 *GAPDH* 的表达稳定性进行分析, 虽然 geNorm 和 Norm Finder 显示的结果略有不同, 但 *18S rRNA* 相对于其他内参基因稳定值更高, 并选其作为 TYR 基因相对定量数据分析的参考标准, 以期研究双锯鱼胚胎、个体发育过程中基因的表达水平提供有效的数据和应用基础。

## 参 考 文 献

王玉成, 张国栋, 姜静, 2006. 一种适用范围广的总 RNA 提取方法[J]. 植物研究, 26(1): 84-87.  
 邓红平, 何继亮, 2006. 几种管家基因突变试验及其研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 24(11): 702-704.  
 叶乐, 王雨, 杨其彬, 等, 2008. 小丑鱼规模化繁育技术研究[J]. 中国水产(12): 59-60.  
 白海锋, 李晓光, 张霖, 等, 2011. 八种小丑鱼与五种海藻相容性的初步研究[J]. 水产养殖, 32(11): 11-13.  
 吕梁, 张子平, 万海付, 等, 2019. 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, 26(3):

457-464.  
 刘颖, 王双耀, 高乔, 等, 2013. 栉孔扇贝内参基因稳定性研究[J]. 生态毒理学报, 8(4): 616-622.  
 杨爱馥, 周遵春, 董颖, 等, 2010. 仿刺参 *cytb* 和  $\beta$ -actin 基因表达稳定性比较[J]. 中国农业科技导报, 12(1): 79-84.  
 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等, 2017. 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(5): 278-281.  
 吴萍, 张方亮, 杨程涌, 等, 2017. 翘嘴鲮 *per1* mRNA 表达量分析中采用的内参基因稳定性比较[J]. 激光生物学报, 26(4): 379-384.  
 何丽斌, 陈芳, 朱志煌, 等, 2018. 基于线粒体 *16S rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因探讨 11 种小丑鱼的系统发育关系[J]. 福建农业学报, 33(3): 230-235.  
 张宁, 杜文文, 王中铎, 等, 2018. 多鳞鱖不同组织荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 广东海洋大学学报, 38(5): 8-14.  
 张植元, 魏东, 乔秀亭, 等, 2017. 饲料浮萍水平对大正三色锦鲤 TYR 及 MC1R 基因表达的影响[J]. 水产科学, 36(2): 172-177.  
 张薇, 孙志宾, 马爱军, 等, 2018. 双锯鱼属(*Amphiprion*)四种鱼种比较胚胎学研究和进化探讨[J]. 海洋与湖沼, 49(3): 671-681.  
 陈张帆, 宋莉妮, 王鹏飞, 等, 2018. 牙鲆胚胎低温处理下内参基因筛选及 *CIRP* 和 *Hsp70* 基因表达分析[J]. 农业生物技术学报, 26(8): 1382-1391.  
 茅华华, 陈昆慈, 赵建, 等, 2016. 斑鳢实时定量 PCR 内参基因的分鉴定[C]. // 2016 年中国水产学会学术年会论文摘要集. 成都: 中国水产学会.  
 周晓馥, 王晶, 史宏伟, 等, 2016. *18S rRNA* 作为植物实时荧光定量 PCR 内参基因的探究[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 37(2): 115-119.  
 胡金川, 2008. 如何利用 geNorm 软件筛选基因表达测定的内参基因? [J]. 中华检验医学杂志, 31(8): 918.  
 费越越, 南星羽, 余路, 等, 2020. 异育银鲫内参基因的筛选[J]. 水产科学, 39(3): 306-315.  
 唐永凯, 李建林, 李红霞, 等, 2008. 奥利亚罗非鱼 *EF-1 $\alpha$*  基因的克隆与结构分析[J]. 动物学杂志, 43(5): 7-12.  
 唐永凯, 俞菊华, 徐跑, 等, 2013. 建鲤内参基因  $\beta$ -actin 的实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 浙江农业学报, 25(1): 31-36.  
 章霞, 李伟业, 傅荣兵, 等, 2015. 观赏小丑鱼人工繁育技术的研究[J]. 科学养鱼(8): 78.  
 蒋素华, 马杰, 梁芳, 等, 2018. 一个白及内参基因 *EF1 $\alpha$*  及其应用: CN109022448A [P]. [2018-12-18].  
 蒋燕玲, 2016. 橘色双冠丽鱼体色发育变化及体色相关基因 TYR 的克隆与表达研究[D]. 上海: 上海海洋大学.  
 滕力平, 杨担光, 李晓光, 等, 2005. 二线小丑鱼的人工繁殖[J]. 水产科学, 24(2): 26-28.  
 滕彦娇, 王宏鹏, 王菁, 等, 2021. 大花红景天内参基因筛选与 POD 基因表达分析[J]. 中药材, 44(6): 1341-1347.  
 AMONRAT K, RAWIWAN W, VORATHEP M, et al, 2013. Effects of dietary protein, lipid and astaxanthin levels on growth and carotenoid accumulation in anemone fish, *Amphiprion ocellaris* [J]. Journal of Science, Technology, and Humanities, 11(2): 95-103.  
 DHEDA K, HUGGETT J F, CHANG J S, et al, 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization [J]. Analytical Biochemistry, 344(1): 141-143.

- FRANZELLITTI S, KIWAN A, VALBONESI P, *et al*, 2015. Selection of best-performing reference gene products for investigating transcriptional regulation across silencing in the European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Scientific Reports*, 5(1): 16966.
- IWATA E, NAGAI Y, HYODOU M, *et al*, 2008. Social environment and sex differentiation in the false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris* [J]. *Zoological Science*, 25(2): 123-128.
- MITTER K, KOTOULAS G, MAGOULAS A, *et al*, 2009. Evaluation of housekeeping genes for quantitative expression studies in the European seabass *D. labrax* [C]. // *Proceedings of the 9th Symposium on Oceanography & Fisheries*, 2nd: 1178-1182.
- MUGHAL B B, LEEMANS M, SPIRHZANLOVA P, *et al*, 2018. Reference gene identification and validation for quantitative real-time PCR studies in developing *Xenopus laevis* [J]. *Scientific Reports*, 8(1): 496.
- PEI D S, SUN Y H, CHEN S P, *et al*, 2007. Zebrafish GAPDH can be used as a reference gene for expression analysis in cross-subfamily cloned embryos [J]. *Analytical Biochemistry*, 363(2): 291-293.
- PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, *et al*, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnology Letters*, 26(6): 509-515.
- SZCZYGIEL J, KAMIŃSKA-GIBAS T, PETIT J, *et al*, 2021. Re-evaluation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) housekeeping genes for gene expression studies - considering duplicated genes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 115: 58-69.
- TANG X, ZHANG N, SI H J, *et al*, 2017. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress [J]. *Plant Methods*, 13: 85.
- VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, *et al*, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biology*, 3(7): RESEARCH0034.

## SCREENING AND APPLICATION OF REFERENCE GENE IN ANEMONE FISH (*AMPHIPRION*) EMBRYOS IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES AND ADULT TISSUES

LI Ying-Di<sup>1,2,3,4</sup>, SUN Zhi-Bin<sup>2,3,4</sup>, MA Ai-Jun<sup>2,3,4</sup>, YANG Jing-Kun<sup>2,3,4</sup>, LIU Zhi-Feng<sup>2,3,4</sup>,  
YU Hong<sup>2,3,4</sup>, ZHAO Ting-Ting<sup>2,3,4</sup>, CHANG Hao-Wen<sup>2,3,4</sup>, ZHU Li-Guang<sup>2,3,4</sup>, LIU Shi-Ying<sup>2,3,4</sup>,  
QU Jiang-Bo<sup>5</sup>

(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 Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 4. China-ASEAN Belt and Road Joint Laboratory on Marine Aquaculture Technology, Guangzhou 510275, China; 5. Yantai Tianyuan Aquatic Co. Ltd., Yantai 264003, China)

**Abstract** Anemone fish (*Amphiprion*), or known as clownfish, is a class of economically valuable seawater ornamental fish. Outstanding results have been achieved in the embryo development, artificial breeding, and morphological observation of anemone fish, but few studies are made on its gene expression at molecular biological level. To screen out the reference genes that are suitable for different development stages of anemone fish embryos and the adult fish tissues and to analyze the expression of tyrosinase (TYR) genes, we conducted this experiment using Fales-Clown anemone fish (*Amphiprion ocellaris*) and tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*) as the materials, for which quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was applied to determine the expression levels of four candidate reference genes: *18S rRNA* gene, *GAPDH*, *Ef-1 $\alpha$*  and  *$\beta$ -actin*. Meanwhile, the stability of these four candidate reference genes is evaluated with software geNorm and Norm Finder. Finally, an appropriate reference gene was used to study the expression level of TYR mRNA. Results show that the expression of *18S* and  *$\beta$ -actin* was relatively stable in anemone fish embryos at different development stages. In different tissues of anemone fish, *18S* was the most stable. When *18S* was used as the reference gene, the expression of TYR gene was first increased and then decreased during the development of anemone fish embryos and the highest expression level was found at the body segmentation stage. The TYR gene was expressed in all tissues and the expression level peaked in eye, tail, and red skin. A reference gene suitable for the anemone fish was selected and applied to analyze the expression of TYR gene in different stages of embryo and adult tissues.

**Key words** anemone fish *Amphiprion*; reference gene; TYR gene; qPCR; geNorm; Norm Finder