

doi: 10.7541/2020.021

苯酚胁迫下多刺裸腹蚤实时定量PCR内参基因的筛选

王茜 刘文秀 高菲 王兰

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 为研究苯酚胁迫下多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)相关基因的表达情况, 筛选用于实时定量PCR分析的最佳内参基因。利用内参基因表达的cycle threshold(*Ct*值)非参数检验、GeNorm、NormFinder和Best-Keeper四种方法对 β -actin、16S rRNA和12S rRNA进行分析, 筛选出苯酚胁迫下多刺裸腹蚤表达相对稳定的内参基因。结果显示, 从*Ct*值初步判定不同浓度苯酚胁迫后, 多刺裸腹蚤体内 β -actin、16S rRNA和12S rRNA均可稳定表达, 且稳定性顺序为: 16S rRNA>12S rRNA> β -actin, 从GeNorm软件分析显示内参基因的稳定性顺序为: 16S rRNA= β -actin>12S rRNA, NormFinder和Bestkeeper分析显示的稳定性顺序均为: 16S rRNA> β -actin>12S rRNA。基于以上四种方法对三个候选内参基因的筛选, 确定了16S rRNA作为多刺裸腹蚤实时定量PCR的最佳内参基因, 有助于提高qRT-PCR分析的准确性, 为进一步研究苯酚胁迫多刺裸腹蚤后目的基因功能的表达提供了基础。

关键词: 多刺裸腹蚤; 实时定量PCR; 内参基因; 苯酚

中图分类号: Q938.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)01-0180-07

枝角类是生态毒理学中常用的化学物质生态毒性评价模型之一^[1]。多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)作为常见的枝角类, 是除大型蚤(*Daphnia magna*)和蚤状蚤(*Daphnia pulex*)之外的又一理想材料, 是山西省水体中的优势物种, 全身透明、繁殖率高、对农药等化学品具有高的敏感性^[2], 常被用于水环境的生物监测。目前关于多刺裸腹蚤分子生物学方面的研究较少, 相关分子生物学信息匮乏, 限制了外源化学物质对其毒性效应的分子机制的研究。

实时定量PCR(Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR)是在传统聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的基础上发展起来的一项新的核酸定量技术^[3], 操作快速灵敏、具有特异性强、定量准确、检验范围广等特点, 随着技术的不断成熟, 广泛应用于多个领域^[4]。qRT-PCR主要有绝对定量和相对定量两种方法, 其中相对定量不需要已

知的标准品, 相对简便因而被大量采用^[5], 但前提是需要稳定的内参基因。

内参基因是指在对某一个目的基因进行定量研究时, 在实验条件下待测样品中表达相对恒定的一类基因, 其作用是校正目的基因的定量过程^[6]。常用的内参基因大多是管家基因(House-keeping gene), 包括编码组蛋白基因、线粒体蛋白基因、编码核糖体蛋白基因、生物代谢途径中各种关键酶的基因等, 如rRNA、 β -actin、cyclophilin、hsp、gapdh、rpl13等^[7]。这些管家基因大多参与了生物体基本代谢活动, 因而具有稳定表达的特性^[8]。但内参基因并非在所有生理条件下都能稳定表达, 在特定实验条件或某些组织细胞中各基因的表达稳定性有差异^[9], 至今还未发现一个适合所有条件下基因表达分析的内参基因^[10]。镉胁迫斑马鱼(*Danio rerio*)后, *ef1a*、*rpl13a*、*gapdh*和*rplp2*分别是在肾脾脏、肝脏、鳃和肠道中稳定表达的内参

收稿日期: 2018-11-21; 修订日期: 2019-08-16

基金项目: 环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金研究课题(KF2018-14); 山西省重点研发计划(社会发展领域)项目(201803D31026)资助 [Supported by the State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences (KF2018-14); the Key Research and Development Projects of Shanxi Province (201803D31026)]

作者简介: 王茜(1978—), 女, 山西运城人; 博士, 讲师; 主要研究方向为环境毒理学。E-mail: wangqian@sxu.edu.cn

通信作者: 王兰(1960—), 女, 博士, 教授, 博士生导师; 主要从事典型环境污染物的生物学效应与分子机制方面的研究。E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

基因^[11]。弧菌免疫后拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的血细胞选择*efla*、*UPQ*作为内参基因,但其他组织选择18S rRNA和*efla*作为内参基因^[12]。因此,在进行目的基因相对定量分析中,不同的实验条件甚至同一实验条件不同组织都需要进行内参基因的筛选。目前对多刺裸腹蚤进行实时定量PCR分析研究的报道较少^[13],有关内参基因的信息缺乏。鉴于此,本研究设计合成了多刺裸腹蚤 β -actin、16S rRNA和12S rRNA的特异性引物,利用内参基因表达水平(*Ct*值)^[11, 14]、GeNorm^[15]、NormFinder^[16]和BestKeeper^[17]四种方法分析了苯酚胁迫下各基因的表达稳定性,从中筛选出最佳内参基因,为进一步研究苯酚胁迫下多刺裸腹蚤相关目的基因的表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)采自山西省太原市小店区北张村,在本实验室经过三代以上孤雌生殖培养,其敏感度达到GB/T 13266—91的要求^[18]。

1.2 实验方法

苯酚处理及样品采集 选取健康状况良好的一日龄幼蚤,分别接种到盛有不同浓度苯酚(0、0.25、0.75、1.25、1.75和2.25 mg/L)的烧杯中,水温控制在(25±1)℃,光照周期为光:暗=16h:8h。培养期间不喂食。在苯酚染毒处理后,将存活的多刺裸腹蚤过滤、用DEPC水清洗、吸掉多余水分,称量0.1 g置于提前装有1 mL Trizol的无RNA酶的EP管中,于-80℃保存。实验重复3次,每次2个平行。

总RNA提取和cDNA合成 用Trizol法^[19]提取总RNA,经凝胶电泳和分光光度计检测总RNA的质量。利用5×All-In-One RT MasterMix试剂盒(镇江ABM公司提供)将总RNA合成cDNA并置于-20℃保存备用。

引物设计、内参基因的扩增及PCR产物纯化 从NCBI数据库获得多刺裸腹蚤三个内参基因 β -actin、16S rRNA和12S rRNA的CDS序列,并利用Primer 3软件设计了特异性引物(表1)。以不同浓度苯酚处理样品的cDNA等量混合物为模板,扩增反应条件为94℃预变性3min, 94℃变性30s, 60℃退火30s, 72℃延伸1min, 35个循环, 72℃延伸8min。将PCR扩增产物按照SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工提供)方法进行两轮回收,得到三个纯化的PCR产物作为标准品,用分光光度计检测标准品浓度,并送公司测序(上海生工)。

表1 候选内参基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of candidate reference genes			
基因 Gene	NCBI序列号 Access No.	引物序列Sequence (5'-3')	目的片段长度 Sequence length (bp)
β -actin	AJ292554.1	TGATCTTGCGGCTTTGGT	215
		TGTGCCGTGCTCAATTG	
16S rRNA	JN657695.1	GGTAT	186
		TGAAGGCTGGTATGAAT	
12S rRNA	AY163661.1	GGATGTCGCCCCAACAA	168
		AAGTCT	
HR3	FJ755466.1	GGAGAGTGACGGGCGAT	142
		ATGTTTCAGGTCAAGGTG	
		CAGCTT	
		AAGAGTTCGGGCGTCCA	
		TGGCATCGGTTGCGGTT	
		GA	

实时定量PCR分析 参照EvaGreen 2×qP-CR MasterMix试剂盒(镇江ABM公司提供)说明书,将纯化的三个基因标准品分别稀释 10^1 — 10^7 倍为标准溶液作为模板,利用ABI 7500实时定量PCR系统对三个内参基因进行实时定量PCR分析。反应体系为15 μ L,反应条件:50℃ 2min, 94℃ 10min; 40个循环:95℃ 15s, 60℃ 1min。根据循环*Ct*值和拷贝数制作标准曲线。

标准曲线的建立:通过标准溶液的浓度,计算出拷贝数。

拷贝数/ μ L= 6.02×10^{23} (copies/mol)×模板浓度(g/ μ L)/平均分子量(g/mol)

其中:平均分子量(MW g/mol)=碱基数(bp)×660 (D/bp)

以拷贝数的对数为横坐标, *Ct*值为纵坐标,制作标准曲线。

以不同浓度苯酚胁迫下的多刺裸腹蚤cDNA作为模板,将三个内参基因和目的基因蜕皮激素接受子3(Hormone receptor 3, HR3)按照以上方法实时定量PCR。HR3基因在多刺裸腹蚤中的相对表达量(*R*)的计算公式如下: $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

数据处理与分析 利用琼脂糖凝胶电泳技术对总RNA质量和内参基因目的片段进行检测,所得结果采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(One-Way-ANOVA),采用Waller-Duncan进行非参数检验,呈现显著性差异($P<0.05$)的整体数据,继续采用Tukey HSD检验两组数据之间的统计学差异,所得结果用平均值±标准误差表示(Mean±SD)。GeNorm根据*M*(平均表达稳定值)的大小进行稳定性比较, *M*值越小稳定性越好^[15]。NormFinder根据运算出内参基因*S*(稳定性)分析内参基因表达稳定性, *S*值越小表示稳定性越好^[16]。BestKeeper用于比较内参基因表达稳定性和基因表达水平的软件,Geo mean(几何平均数)、SD(标准变异系数)越小

稳定性越好^[17]。

2 结果

2.1 总RNA质量检测和内参基因目的片段的扩增

图 1 显示, 在不同浓度的苯酚处理后多刺裸腹蚤总RNA样品条带清晰, 无降解, 28S rRNA与18S rRNA的亮度比值至少为1:1。定量检测结果显示各样品 A_{260}/A_{280} 值均在2.0左右, 说明多刺裸腹蚤总RNA较完整且纯度高, 可以进行后续实验。用不同浓度苯酚处理后的样品cDNA等量混合, 分别扩增了 β -actin、16S rRNA和12S rRNA的目的DNA片段, 琼脂糖凝胶电泳分析显示三个内参基因条带与预期大小一致, 且均为单一条带(图 2), 而且测序结果

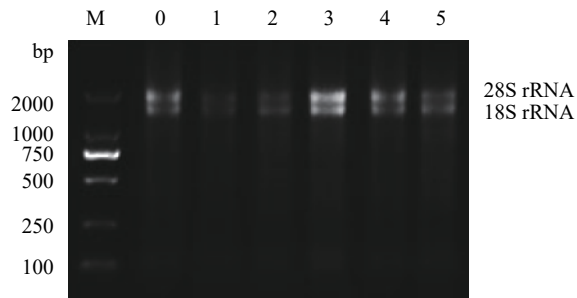


图 1 多刺裸腹蚤总RNA琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *M. macrocopa*

M. DL2000 Maker; 0. 对照组; 1. 苯酚浓度0.25 mg/L; 2. 苯酚浓度0.75 mg/L; 3. 苯酚浓度1.25 mg/L; 4. 苯酚浓度1.75 mg/L; 5. 苯酚浓度2.25 mg/L

M. DL2000 Maker; 0. control; 1. phenol concentration 0.25 mg/L; 2. phenol concentration 0.75 mg/L; 3. phenol concentration 1.25 mg/L; 4. phenol concentration 1.75 mg/L; 5. phenol concentration 2.25 mg/L

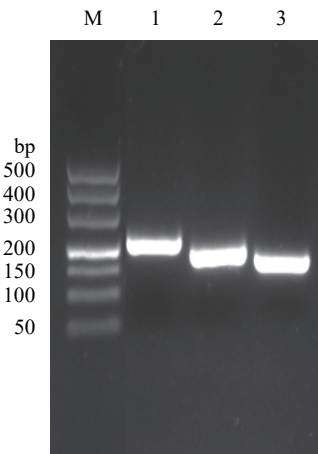


图 2 候选内参基因的表达

Fig. 2 PCR products of candidate reference genes

M. DL500 Marker; 1. β -actin; 2. 16S rRNA; 3. 12S rRNA

也正确。这表明各内参基因的目的条带正确, 引物具有较好的特异性, 可以用于后续实时定量PCR分析。

2.2 实时定量PCR分析

图 3 为 β -actin、16S rRNA和12S rRNA三个内参基因的标准曲线, 相关系数 R^2 分别为0.996, 0.998和0.995, 线性关系好, 可靠性高。引物的扩增效率在97.43%—105.54%(表 2), 符合实时定量PCR对扩增效率的要求。各个内参基因的熔解曲线有明显的单一信号峰, 样品间的重复性高, 在阴性对照中未检测到荧光信号。表明实时定量PCR反应中模板与引物结合良好, 具有高的特异性。

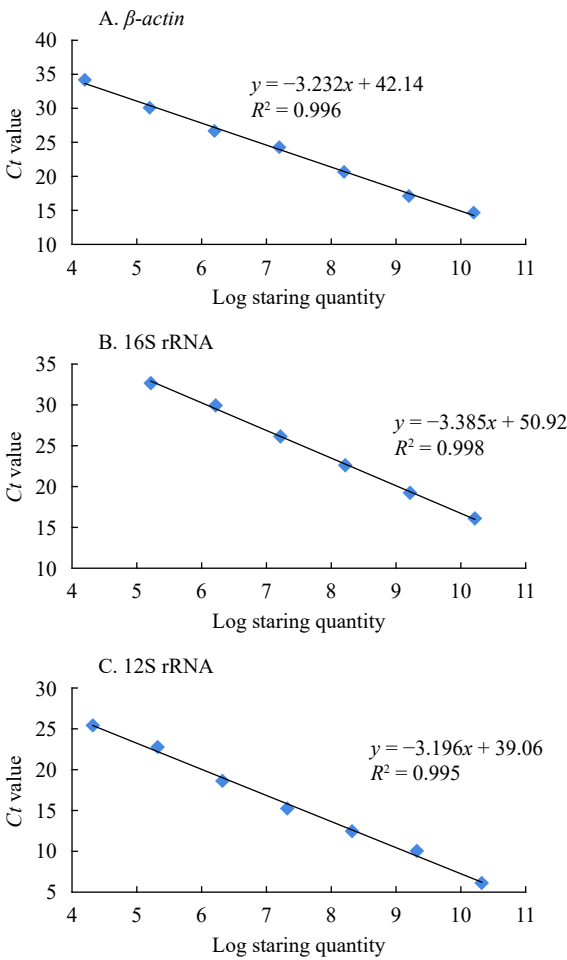


图 3 候选内参基因的标准曲线

Fig. 3 Standard curve equation of the candidate reference genes

表 2 三个内参基因的相关系数及扩增效率

Tab. 2 Correlation coefficient and amplification efficiency of three internal reference genes

基因Gene	相关系数 R^2 (%)	扩增效率 E (%)	斜率 a
β -actin	99.60	103.89	-3.232
16S rRNA	99.80	97.43	-3.385
12S rRNA	99.50	105.54	-3.196

2.3 内参基因表达的稳定性分析

内参基因在样品中的表达水平(*Ct*值) 图 4 利用比较*Ct*值的方法评估各候选内参基因在所有样本中的表达水平。结果显示不同苯酚浓度下的 β -*actin*、16S rRNA和12S rRNA的表达无显著性差异(β -*actin*, $P=0.163$; 16S rRNA, $P=0.490$; 12S rRNA, $P=0.165$), 表明三个基因均可以作为多刺裸腹蚤的内参基因, 并且三个基因的稳定性依次为16S rRNA>12S rRNA> β -*actin*。

内参基因的GeNorm分析 图 5利用GeNorm软件比较*M*值确定稳定的内参基因, 结果显示在苯酚胁迫下, 三个内参基因在多刺裸腹蚤中表达稳定性由高到低的顺序为16S rRNA= β -*actin*>12S rRNA。

内参基因的NormFinder分析 利用NormFinder

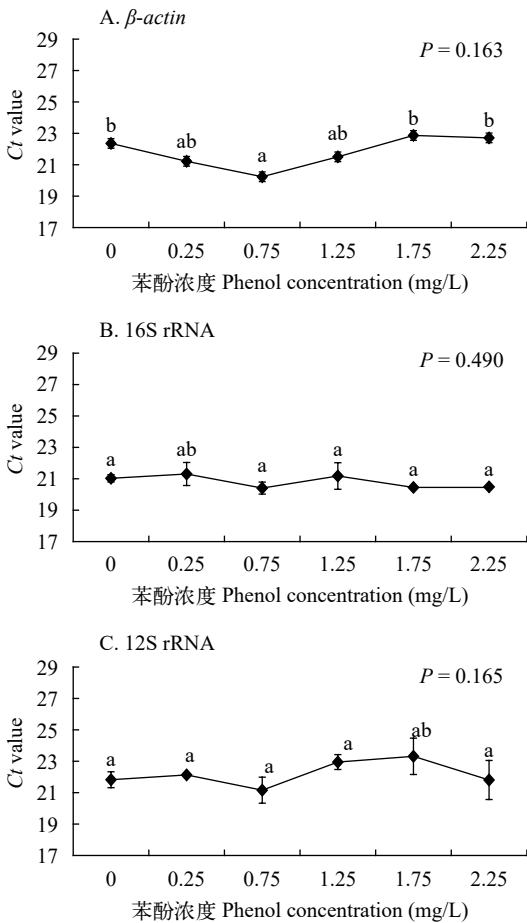


图 4 苯酚胁迫下多刺裸腹蚤候选内参基因表达水平(*Ct*值)
Fig. 4 Transcript levels of candidate reference genes of *M. macrocopa* exposed to phenol
图中不含相同字母的处理组之间有显著性差异, 数据用平均值 $\pm$ 标准误差来表示
Groups without same letters represent the significant differences ($P<0.05$). Data were presented as mean $\pm$ standard error values

软件对内参基因的稳定性(*S*值)进行分析(表 3), 在苯酚胁迫下, 三个内参基因在多刺裸腹蚤中表达稳定性由高到低的顺序为16S rRNA> β -*actin*>12S rRNA。

内参基因的Bestkeeper分析 Bestkeeper软件通过参数的大小反映内参基因稳定性差异。该软件默认的*SD*值大于1时, 内参基因的稳定性较差。从表 4中可以看出, 苯酚胁迫下多刺裸腹蚤16S rRNA的*SD*、Geo Mean、*CV*、Min和Max在三个内参中值都最小, β -*actin*的*SD*次之, 12S rRNA的*SD*值最大, 所以三个内参基因在多刺裸腹蚤中表达稳定性由高到低的顺序为16S rRNA> β -*actin*>12S rRNA, 故16S rRNA为表达最稳定的内参基因。

苯酚处理后多刺裸腹蚤*HR3*的表达 本研究选择*HR3*基因评估选定的内参基因对分析目的基因相对表达量的影响。如图 6所示, 随着苯酚浓

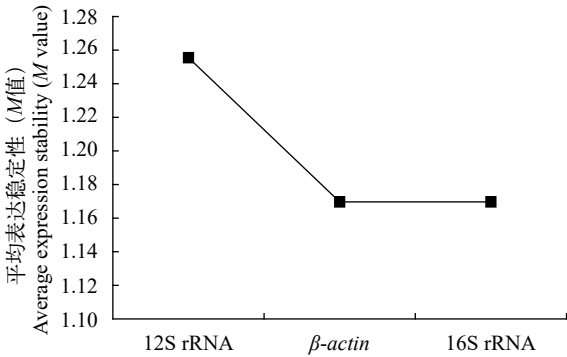


图 5 GeNorm软件分析候选内参基因稳定性
Fig. 5 Stability of candidate reference genes analyzed by GeNorm

表 3 NormFinder软件分析候选内参基因稳定性
Tab. 3 Stability of candidate reference genes analyzed by NormFinder

实验材料 Material	内参(<i>S</i> 值) Reference gene (<i>S</i> value)	内参(<i>S</i> 值) Reference gene (<i>S</i> value)	内参(<i>S</i> 值) Reference gene (<i>S</i> value)	最稳定基因 The most stable gene
多刺裸腹蚤 <i>M. macrocopa</i>	β - <i>actin</i> (0.676)	16S rRNA (0.448)	12S rRNA (0.697)	16S rRNA

表 4 Bestkeeper软件分析候选内参基因稳定性
Tab. 4 Stability of candidate reference genes analyzed by Bestkeeper

参数 Parameter	β - <i>actin</i>	16S rRNA	12S rRNA	稳定基因 The stable gene
Geo mean [<i>Ct</i>]	22.170	20.801	21.787	16S rRNA
Ar Mean [<i>Ct</i>]	22.197	20.809	21.816	
Min [<i>Ct</i>]	20.089	19.949	19.993	
Max [<i>Ct</i>]	24.925	22.373	23.407	
Stddev [$\pm$ <i>Ct</i>]	0.734	0.462	0.994	
<i>CV</i> [% <i>Ct</i>]	3.305	2.222	4.650	

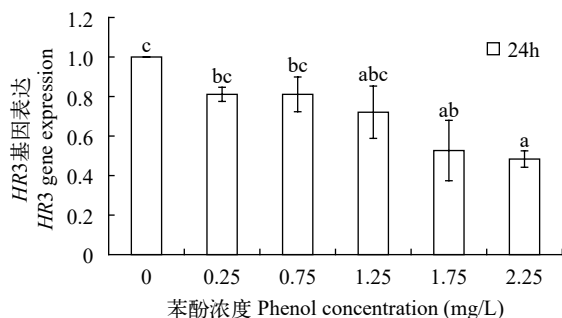


图 6 不同浓度的苯酚胁迫下, 多刺裸腹蚤 *HR3* 相对于 16S rRNA 的表达变化

Fig. 6 The effect of phenol exposure on the *HR3* level of *M. macrocopa*

不含相同字母的处理组之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 数据用平均值 $\pm$ 标准误差来表示

If there was not any same letter between any two experimental groups, it represented the significance ($P < 0.05$). Data were presented as mean $\pm$ standard error values

度的升高, 多刺裸腹蚤的 *HR3* mRNA 水平逐渐下降。在苯酚浓度 1.75 和 2.25 mg/L 时, *HR3* mRNA 的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

实时定量 PCR 技术具有强特异性、高准确性和灵敏度成为转录水平检测目标基因表达的有效方法之一, 因此内参基因的相关研究越来越多^[20]。在进行目标基因的相对定量分析中, 稳定的内参基因可以消除因不同样本引起的 RNA 提取质量和反转录效益上的误差, 因此, 筛选最适内参基因极为重要, 不稳定的内参基因会直接影响结果的可靠性^[21, 22]。筛选内参基因需要参考前人研究结果, 然后再筛选稳定表达的常用内参基因, 并做进一步的实验验证^[23, 24]。

本研究选用内参基因的表达水平 *Ct* 值、GeNorm、NormFinder 和 Bestkeeper 四个常用的分析方法对 β -actin、16S rRNA 和 12S rRNA 基因进行稳定性分析。*Ct* 值分析结果显示苯酚胁迫多刺裸腹蚤三个内参基因的稳定性顺序为 16S rRNA > 12S rRNA > β -actin, GeNorm 软件分析的稳定性结果为 16S rRNA = β -actin > 12S rRNA, NormFinder 的结果同 Bestkeeper 软件分析结果一致, 稳定性顺序为 16S rRNA > β -actin > 12S rRNA。因此确定 16S rRNA 作为苯酚胁迫下多刺裸腹蚤实时定量 PCR 最适内参基因。在此基础上进一步探讨了蜕皮级联反应中的关键因子 *HR3* 基因来评估 16S rRNA 作为内参基因对分析目标基因的相对表达量。研究表明, 节肢动物的生长发育过程中受到污染物胁迫后,

HR3 表达被抑制, 致使机体不能正常完成蜕皮过程, 甚至导致幼虫死亡^[25]。在本研究中, 随着苯酚浓度的升高, *HR3* 基因表达显著下调 ($P < 0.05$), 与 Tao^[25] 的结果一致。验证了 16S rRNA 可以作为苯酚胁迫下多刺裸腹蚤实时定量 PCR 的内参基因。

目前, 在大型蚤 (*Daphnia magna*)、蚤状蚤 (*Daphnia pulex*)、隆线蚤 (*Daphnia carinata*)、剑水蚤 (*Tigriopus japonicus*) 等枝角类中筛选出了在不同实验条件下表达最为稳定的内参基因^[26-29]。研究结果表明, 内参基因 β -actin 在中华拟同形蚤 (*Daphnia similoides sinensis*) 中表达较稳定^[30], 而在隆线蚤中的表达稳定性较差^[28]; 18S rRNA 在蚤状蚤中能稳定表达^[26], 而在大型蚤中稳定性较差^[29]。在研究三丁基锡对大型蚤的毒性作用时, 选择 β -actin 和 *gapdh* 作为最适内参基因来评估目标基因 *HR3* 的表达情况^[31]。本研究中 16S rRNA 为苯酚胁迫下的多刺裸腹蚤最适内参基因, 与大型蚤、蚤状蚤等的结果不一致, 表明内参基因在不同物种中没有绝对的通用性。因此, 在相对定量分析目标基因的表达时, 内参基因的筛选是十分必要的^[32]。

四种方法对三个内参基因的稳定性分析时, *Ct* 值的筛选结果和其他三种方法有部分结果不一致, 这种差异的原因可能是分析的统计学原理不一致造成的^[33]。本研究利用实时定量 PCR 技术, 采用四种常用内参基因稳定性分析法研究了苯酚胁迫下多刺裸腹蚤 β -actin、16S rRNA 和 12S rRNA 三个基因的表达稳定性, 确定了 16S rRNA 作为苯酚胁迫下多刺裸腹蚤实时定量 PCR 的最佳内参基因。为后续多刺裸腹蚤相关基因的定量表达分析提供了参考依据。

致谢:

感谢实验室李少钦老师、张左兵老师、刘娜老师和井维鑫老师以及郎朗博士等对实验的帮助和文章的修改。

参考文献:

- [1] Pereira J L, Hill C J, Sibly R M, et al. Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(3): 268-276.
- [2] Peng F, Wang Q, Wang L. Effect of deltamethrin on acute toxicity and detoxification metabolism in water flea, *Moina macrocopa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 530-534. [彭方, 王茜, 王兰. 溴氰菊酯对多刺裸腹蚤急性毒性及解毒代谢的影响 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(3): 530-534.]

- [3] Liu Y X, Lan X X, Cao J, *et al.* Screening of qRT-PCR reference genes for *Chenopodium album* and *C. glaucum* of Chenopodiaceae [J]. *Guihaia*, 2016, **36**(12): 1511-1518. [刘艳霞, 兰欣欣, 曹婧, 等. 藜科植物藜和灰绿藜实时荧光定量PCR内参基因的选择 [J]. *广西植物*, 2016, **36**(12): 1511-1518.]
- [4] Xu H Y, Cao L Z, Liu B, *et al.* Development of the standard curve for detecting pig *IGF1*, *EGFR*, *EGF*, β -actin mRNA with fluorescence quantitative polymerase chain reaction [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2017, **40**(5): 84-89. [徐环叶, 曹玲芝, 刘博, 等. 猪*IGF1*, *EGFR*, *EGF*, β -actin荧光定量PCR标准曲线的建立 [J]. *河北农业大学学报*, 2017, **40**(5): 84-89.]
- [5] Li M Z, Mai K S, He G, *et al.* Establishment and application of Real-Time quantitative PCR reaction system for study in gene expression of $\Delta 5$ fatty acyl desaturase in abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(2): 328-334. [李明珠, 麦康森, 何艮, 等. 实时荧光定量PCR检测皱纹盘鲍 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶基因表达方法的建立及应用 [J]. *水生生物学报*, 2014, **38**(2): 328-334.]
- [6] Huo X P, Zhang L P, Zhao X R, *et al.* Effects of RNA quality on the selection of internal reference genes and evaluation of qRT-PCR result [J]. *Letters in Biotechnology*, 2018, **29**(3): 415-418. [霍雪萍, 张琳萍, 赵向绒, 等. RNA质量对内参基因选择和qRT-PCR结果评价的影响 [J]. *生物技术通讯*, 2018, **29**(3): 415-418.]
- [7] Wan Q, Chen S, Shan Z, *et al.* Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different conditions [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(12): e0189405.
- [8] Rocha D J P, Santos C S, Pacheco L G C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, **108**(3): 685-693.
- [9] Nascimento C S, Barbosa L T, Brito C, *et al.* Identification of suitable reference genes for Real Time quantitative polymerase chain reaction assays on *Pectoralis major* muscle in chicken (*Gallus gallus*) [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(5): e0127935.
- [10] Eisenberg E, Levanon E Y. Human housekeeping genes, revisited [J]. *Trends in Genetics*, 2013, **29**(10): 569-574.
- [11] Lang X, Wang L, Zhang Z. Stability evaluation of reference genes for Real-Time PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and subsequently infected by bacteria *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, **170**: 240-250.
- [12] Fang Y B. Cloning and expression profile of two immune-related genes and studies on the applicability of eleven internal reference genes in mud crab, *Scylla paramamosain* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 31-39. [房娅博. 拟穴青蟹免疫相关基因的克隆及内参基因的适用性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 31-39.]
- [13] Toyota K, Kato Y, Sato M, *et al.* Molecular cloning of *doublesex* genes of four cladocera (water flea) species [J]. *BMC Genomics*, 2013(14): 239-251.
- [14] Cui F F, Meng C, Wang Y, *et al.* Reference genes selection for quantitative Real-Time PCR in Chinese cabbage-cabbage translocation lines [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2018, **33**(5): 60-67. [崔菲菲, 孟川, 王彦, 等. 大白菜-结球甘蓝易位系实时荧光定量PCR内参基因的筛选 [J]. *华北农学报*, 2018, **33**(5): 60-67.]
- [15] 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 Biology*, 2002, **3**(7): 1-11.
- [16] 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 datasets [J]. *Cancer Research*, 2004, **64**(15): 5245-5250.
- [17] 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.
- [18] State Environmental Protection Administration. Water quality-determination of the acute toxicity of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna* Straus) (GB/T 13266—91) [S]. Beijing. 1991: 1-8. [国家环境保护总局. 水质、物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法(GB/T 13266—91) [S]. 北京. 1991: 1-8.]
- [19] Phongsisay V, Perera V N, Fry B N. Expression of the *htrB* gene is essential for responsiveness of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* to harsh environments [J]. *Microbiology*, 2007, **153**(1): 254-262.
- [20] Shakeel M, Rodriguez A, Tahir U B, *et al.* Gene expression studies of reference genes for quantitative Real-Time PCR: an overview in insects [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, **40**(2): 227-236.
- [21] Ponton F, Chapuis M P, Pernice M, *et al.* Evaluation of potential reference genes for reverse transcription qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, **57**(6): 840-850.
- [22] Kong Q S, Yuan J X, Niu P H, *et al.* Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription quantitative Real-Time PCR analysis in melon [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e87197.
- [23] Wei Y D, Chen Y, Guo H P, *et al.* Selection of reference genes for Real-Time quantitative RT-PCR in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) under nutrient deficiency [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2013, **21**(11): 1302-1312. [魏毅东, 陈玉, 郭海萍, 等. 水稻缺素胁迫下

- 实时荧光定量RT-PCR的内参基因的选择 [J]. *农业生物技术学报*, 2013, **21**(11): 1302-1312.]
- [24] Tang R, Dodd A, Lai D, *et al.* Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative Real-Time RT-PCR normalization [J]. *Acta Biochimic et Biophysica Sinica*, 2007, **39**(5): 384-390.
- [25] Yao T. Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation [J]. *Cell*, 1992, **71**(1): 63-72.
- [26] Zou X. Cloning and expression analysis of *Chk1* and *Hsp90* correlated reproduction from *Daphnia pulex* [D]. Zhejiang: Ningbo University, 2013: 44-52. [邹秀. 蚤状溞生殖转化相关功能基因 *Chk1* 和 *Hsp90* 的克隆与表达分析 [D]. 浙江: 宁波大学, 2013: 44-52.]
- [27] Liu Z, Yu P, Cai M, *et al.* Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex* [J]. *Chemosphere*, 2019(215): 74-81.
- [28] Liu A J. Cloning and expression pattern of a senescence-associated protein gene and a cuticular protein gene in *Daphnia* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2014: 38-43. [刘阿静. 枝角类衰老相关蛋白基因和表皮蛋白基因的克隆及表达 [D]. 上海: 华东师范大学, 2014: 38-43.]
- [29] Liu Y, Wang L, Pan B, *et al.* Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017(183): 104-113.
- [30] Xu X, Zhang Y N, Peng S, *et al.* Effects of *Microcystis aeruginosa* on the expression of nuclear receptor genes in *Daphnia similoides sinensis* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018(150): 344-352.
- [31] Wang Y H, Kwon G, Li H, *et al.* Tributyltin synergizes with 20-Hydroxyecdysone to produce endocrine toxicity [J]. *Toxicological Sciences an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2011, **123**(1): 71-79.
- [32] Mu Z Q, Yan L L, Wang H M, *et al.* The selection of reference genes in different development stages and different tissues of *Ruditapes philippinarum* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, **42**(5): 663-672. [牟政强, 闫路路, 王化敏, 等. 菲律宾蛤仔不同发育时期及成体不同组织中内参基因筛选 [J]. 水产学报, 2018, **42**(5): 663-672.]
- [33] Hu R B, Fan C M, Fu Y F. Reference gene selection in plant Real-Time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, **11**(6): 30-36. [胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量PCR内参基因的选择 [J]. 中国农业科技导报, 2009, **11**(6): 30-36.]

REFERENCE GENE SELECTION FOR QUANTITATIVE REAL-TIME PCR NORMALIZATION IN *MOINA MACROCOPA* EXPOSED TO PHENOL

WANG Qian, LIU Wen-Xiu, GAO Fei and WANG Lan

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: To search suitable reference genes for normalization of quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) in *Moina macrocopa*, we tested three reference genes of β -actin, 16S rRNA and 12S rRNA by using four analysis methods: (1) expression level of the genes (cycle threshold value); (2) GeNorm; (3) NormFinder; and (4) BestKeeper. The results showed that the *Ct* values of the β -actin, 16S rRNA and 12S rRNA genes remained unchanged in *M. macrocopa* treated with different concentrations of phenol, and the order of the stability was 16S rRNA>12S rRNA> β -actin. GeNorm analysis revealed that the order of the stability was 16S rRNA= β -actin>12S rRNA. Both NormFinder and BestKeeper software analysis demonstrated that the order of the stability was 16S rRNA> β -actin>12S rRNA. These results indicated that 16S rRNA was the best-fit reference gene for qRT-PCR in *M. macrocopa*, at least under phenol treatment, which provide useful information for future functional investigations of target gene expressions in *M. macrocopa* in response to environmental stress.

Key words: *Moina macrocopa*; Quantitative Real-Time PCR; Reference gene; Phenol