

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20130304001

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 (in Chinese)

栉孔扇贝内参基因稳定性研究

刘颖^{1,2}, 王双耀¹, 高乔¹, 安立会^{2,*}, 张鹏¹, 孙静娴¹, 姜志强¹, 郑丙辉²

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023

2. 中国环境科学研究院国家环境保护河口与海岸带重点实验室, 北京 100012

摘要: 合适的内参基因对准确定量目标基因表达水平非常重要。利用实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)分析了不同发育阶段和雌激素暴露条件下栉孔扇贝性腺组织中 β -actin、 β -TUB、EF-1 α 、18S rRNA和GAPDH 5个内参基因的表达水平, 并利用RefFinder软件对其表达稳定性进行了分析。结果表明: 在所考察的内参基因中, EF-1 α 在栉孔扇贝不同发育阶段和雌激素暴露下的表达均最为稳定, 可作为定量目标基因表达水平的内参基因之一。

关键词: 内参基因; 栉孔扇贝; 实时定量PCR(RT-qPCR); RefFinder; EF-1 α

文章编号: 1673-5897(2013)4-616-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Study on the Expression Stability of Reference Genes in *Chlamys Farreri*

Liu Ying^{1,2}, Wang Shuangyao¹, Gao Qiao¹, An Lihui^{2,*}, Zhang Peng¹, Sun Jingxian¹, Jiang Zhiqiang¹, Zheng Binghui²

1. College of Aquaculture and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

2. State Environmental Protection Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, Chinese Research Academy for Environment Sciences, Beijing 100012, China

Received 4 March 2013 **accepted** 3 June 2013

Abstract: Appropriate reference gene is very important to precisely quantify the target gene expression. In this present study, five reference genes mRNA expressions, including β -actin, β -TUB, EF-1 α , 18S rRNA and GAPDH in *Chlamys farreri* gonad, were quantified using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Their expression stability was analyzed online using RefFinder software. The results showed that EF-1 α expression was the most stable among these five reference genes in gonad of different development stages and estrogen exposure, suggesting that EF-1 α is one of suitable reference gene for quantifying genes expressions in *Chlamys farreri* gonad.

Keywords: reference genes; *Chlamys farreri*; real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); RefFinder; EF-1 α

内参基因通常是管家基因(reference or house-keeping genes), 常用于校正实验过程中可能出现的各

种误差, 保证实验数据的准确性和实验结果的可靠性^[1]。一般认为, 内参基因应受环境因素影响较小, 在

收稿日期: 2013-03-04 录用日期: 2013-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(21177117); 国家科技支撑计划(2010BAC69B02)

作者简介: 刘颖(1987-), 女, 硕士, 研究方向为水环境毒理学, E-mail: liuyinglmeng@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: anlhui@163.com

生物体各个生长发育阶段持续表达并且表达水平相对稳定。理想的内参基因应满足以下 4 个条件^[2-4]:(1)表达水平稳定并且在不同组织中的表达量接近;(2)高度或中度表达,最好与目标基因的表达水平相近;(3)表达水平与细胞周期以及细胞是否活化无关;(4)表达水平不受任何内源性或外源性因素的影响。

目前,在多数研究中常用的内参基因包括 18S 核糖体 RNA(18SrRNA)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、转录延伸因子(EF- α)、多聚泛素酶(UBQ)、肌动蛋白(β -actin)、 α 微管蛋白和 β 微管蛋白基因(α -TUA, β -TUB)等^[1,5-7]。并且,随着研究深入,越来越多的内参基因被逐渐开发和使用,如核糖体蛋白 L-7(RPL-7)^[8]。然而,现有数据和资料表明^[9-11],还没有一个能够满足上述条件、并且适用于不同生物、不同研究目的通用内参基因。因此,这就需要根据特定研究对象、特定研究目的选择合适的内参基因开展研究^[12-17]。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*),属于无脊椎双壳类动物,营滤食性生活,是我国北方沿海重要的经济贝类之一;同时,栉孔扇贝是典型的雌雄异体发育,可作为揭示环境内分泌干扰物诱导无脊椎动物发生雌性化的作用机制研究的生物材料。并且,有关栉孔扇贝繁殖与发育的生物学研究^[18-19]以及栉孔扇贝的高通量测序结果^[20]也为相关研究提供了丰富的分子生物学信息。然而,到目前为止,对于栉孔扇贝内参基因表达的稳定性、尤其对于雌激素作用下内参基因的稳定性尚未开展针对性研究。为此,本文利用实时定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)分析了不同发育时期和雌激素暴露下栉孔扇贝 18SrRNA、GAPDH、EF- α 、 β -TUB 和 β -actin 5 个内参基因的稳定性,并筛选出适用于定量雌激素作用下目标基因表达水平的内参基因,这为今后开展栉孔扇贝基因表达的相关研究奠定了基础。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 样品采集

实验于 2012 年 4 月至 6 月每隔 2 周连续采集大连海区野生成熟栉孔扇贝(壳长 (54.82 ± 4.80) mm;壳宽 (59.70 ± 5.40) mm),称量性腺质量与软体部质量,用于计算性腺指数(公式 1)。同时取少量性腺组织快速置于 RNA 保存液中低温保存。

性腺指数(GSI, %) = (性腺质量(g) × 100) / 软体部质量(g) (1)

另于同年 10 月从该海区采集野生成熟栉孔扇贝,在实验室暂养 2 周后用于雌激素暴露。将扇贝随机分成 2 组(每组雌雄各 10 只),置于 40 L 水族

缸中,加入雌二醇(17β -E₂,溶于 DMSO)至暴露终浓度($500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)。每天换水 2 次,每次 20 L,并于每次换水后投喂新鲜小球藻。暴露期间水温维持 $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光周期设定 14 h(白):10 h(昼)。暴露 10 d 后取部分性腺置于液氮中冻存。

1.2 RNA 提取与逆转录

取 20~30 mg 性腺组织,加入 1 mL Trizol(Invitrogen,美国)后冰浴 5 min。用均质器(Precellys 24, Bertin, 法国)进行快速震荡破碎: $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 s。重复 2 次,每次间隔 30 s。将匀浆液转移至 1.5 mL 离心管中,加入 0.2 mL 氯仿,颠倒混匀,室温静置 3~5 min。离心: 4°C , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min。小心吸取上层水相至新的离心管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀。离心弃上清,将 RNA 沉淀用体积分数为 75% 的酒精(含体积分数为 1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC))洗涤 3 次,在超净台中吹至近干。然后将 RNA 溶于 1% DEPC (v/v) 的灭菌水。紫外分光光度计检测样品 RNA 纯度和浓度, A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0 的 RNA 样品进行后续实验。

调整 RNA 浓度至 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。取 4 μL 总 RNA, 4 μL dNTPs($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 宝生物公司,大连), 1 μL Oligo(dT)₁₅ ($500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Promega Co., 美国)和 1 μL M-MLV 逆转录酶($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, Invitrogen Ltd., 美国),加灭菌水补足到 20 μL 充分混合。另取等量灭菌水作为阴性对照。按照 M-MLV 逆转录试剂说明逆转录合成样品 cDNA。

1.3 内参基因选择

研究选择了 5 个常用内参基因。其中, β -actin、 β -UTB、EF- α 、18SrRNA 4 个基因序列来自 NCBI 数据库(接收号见表 1)。GAPDH 利用 Bioedit 7.0 软件比对 NCBI 数据库中已发表的其他生物 GAPDH 基因序列^[4],利用 Primer Premier 5.0 在保守区设计兼并引物:正向引物为 5'-GT(t,c)GC(t,c,a)(g,a)TCAA(t,c)GA(t,c)CC(a,t,g,c)TTCAT-3',反向引物为 5'-GG(a,t,g)CC(a,g)GA(a,g,c)AC(a,t,g)GTCTT(t,c)TG-3'。以上述合成的 cDNA 为模板,利用 MyCycler™ PCR 仪(BioRad, 美国)扩增栉孔扇贝的 GAPDH 基因:第 1 阶段: 94°C , 5 min, 1 个循环;第 2 阶段: 94°C , 30 s; 54°C , 45 s; 72°C , 60 s, 40 个循环;最后,在 72°C 条件下延伸 10 min。反应体积为 50 μL 。所得 PCR 扩增产物利用 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳后染色,回收并纯化目标条带,送至大连宝生物公司测序。将测序结果利用 BLAST 在线比对、确认,并提交至 NCBI 数据库。

根据获得序列,利用 Primer Premier 3.0 设计各目标基因的实时定量 PCR 引物(见表 1),并在下述条件下扩增上述所得性腺 cDNA 样品:SYBR Green PCR Master Mix 10 μL ,正向和反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),cDNA 模板 5 μL ,加灭菌的蒸馏水补足至 20 μL ,充分混合。扩增条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$,15 s;60 $^{\circ}\text{C}$,1 min,40 个循环(ABI Prism[®] 7500,美国)。在最后 1 个循环结束后做溶解曲线以验证定量引物的特异性。所有样品均为 3 个平行测定。

表 1 栉孔扇贝内参基因号与对应定量引物序列

Table 1 Accession number and sequences of quantifying primers of reference gene of *Chlamys Farreri*

名称	接收号	引物(5'-3')
β -actin	AY335441.2	F:TTCTTGGGAATGGAATCTGC R:ATTGTGCTACCACCGAAAG
β -TUB	AY395571.1	F:TCCCCGTCTCCATTTCTTC R:GCTGGCTACCACGAGATGTGA
EF-1 α	DT716075.1	F:GCCATACCGCTCACATTGCT R:CCAGAACGACGGTCGAGTTT
18SrRNA	AF526253.1	F:GCCGGAGTTGCTTCAATGAC R:CCCCGAACCCAAAACTT
GAPDH	KC573783.1	F:TGTCATGGGAGTCAATCACACA R:TGGTGGTACAGGAAGCATTGC

在确定定量引物序列后,随机选择 3 个样品的 cDNA 以十倍稀释法稀释成 5 个浓度梯度,在上述条件下进行扩增。在 C_t 值(扩增循环数)与样品稀释度之间建立相对标准曲线。筛选两条标准曲线斜率差小于 0.1、且扩增效率处于 90%~110%之间(见公式(2))的引物为最终定量引物。在此基础上,利用上述方法定量所有样品各内参基因的 C_t 值(表 2)。

$$\text{扩增效率}(E) = 10^{(-1/\text{斜率})} - 1 \quad (2)$$

1.4 数据分析

采用 RefFinder^[21] 在线分析了各内参基因在栉孔扇贝性腺发育过程中和外源雌激素暴露条件下表达水平的稳定性。RefFinder 综合了 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和比较 delta-Ct 法 4 种评价方法,即在 4 种方法分析结果的基础上赋予每个内参基因合适的权重,继而计算各内参基因排序值的几何平均数(geomean of ranking values),最终根据计算结果的大小确定最稳定的内参基因。其中,GeNorm 软件^[22] 是专门用于 RT-PCR 方法选择内参基因的程序,一般会筛选出 2 个或 2 个以上的内参基因以利于得到更为可靠的定量结果;NormFinder 软件^[23] 原理与 geNorm 程序类似,即首先根据各内参基因的稳定值(M)排序,然后

将表达稳定值最小的基因作为最稳定的内参基因;BestKeeper 软件^[24] 是针对内参基因和目标基因进行选择程序,根据每个内参基因 C_t 值的几何平均数确定最稳定内参基因;比较 delta-Ct 法^[25] 是在各目标基因扩增效率接近一致的前提下,分别以不同基因作为内参基因进行一一比较后对各内参基因的表达水平进行标准化,最后选取表达最为稳定的基因作为内参基因。

2 结果与讨论(Results and discussion)

从大连海区采集处于性腺发育期的野生栉孔扇贝。从性腺发育指数(图 1)可知,随着实验进行,栉孔扇贝性腺逐渐发育成熟并于第 4 次采样时性腺发育达到排卵期。继而第 5 次采样时开始呈下降趋势,说明排卵(精)后的性腺开始自然退化,这也反映了生物体繁殖周期的生理生化变化的过程。

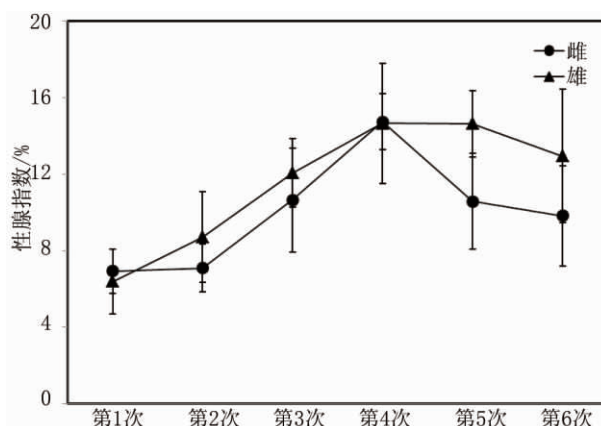


图 1 采样期间栉孔扇贝性腺指数

Fig. 1 Gonadosomatic index of *Chlamys Farreri* in sampling periods

利用上述设计的兼并引物,分离、扩增并测序得到栉孔扇贝 GAPDH 基因部分序列(447 bp)。根据三联体密码子规则,该部分碱基对应着 149 个氨基酸(图 2)。经 BLAST 在线比对确认后提交至 NCBI 数据库(Genebank 接收号:KC573783.1)。经与 NCBI 数据库登记的其他物种 GAPDH 比对,本研究扩增的栉孔扇贝 GAPDH 基因氨基酸序列与大型溞(*Daphnia magna*, CAB99475)、北美负鼠(*Didelphis virginiana*, ABD77177)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*, AEG78378)、游离尾蝠(*Tadarida brasiliensis*, ABD77189)、非洲象(*Loxodonta africana*, ABD77180)、星虫凤凰螺(*Phascolion strombus*, ABM97666)和人(*Homo sapiens*, ABD77190)的相似度均为 95%(图 3)。

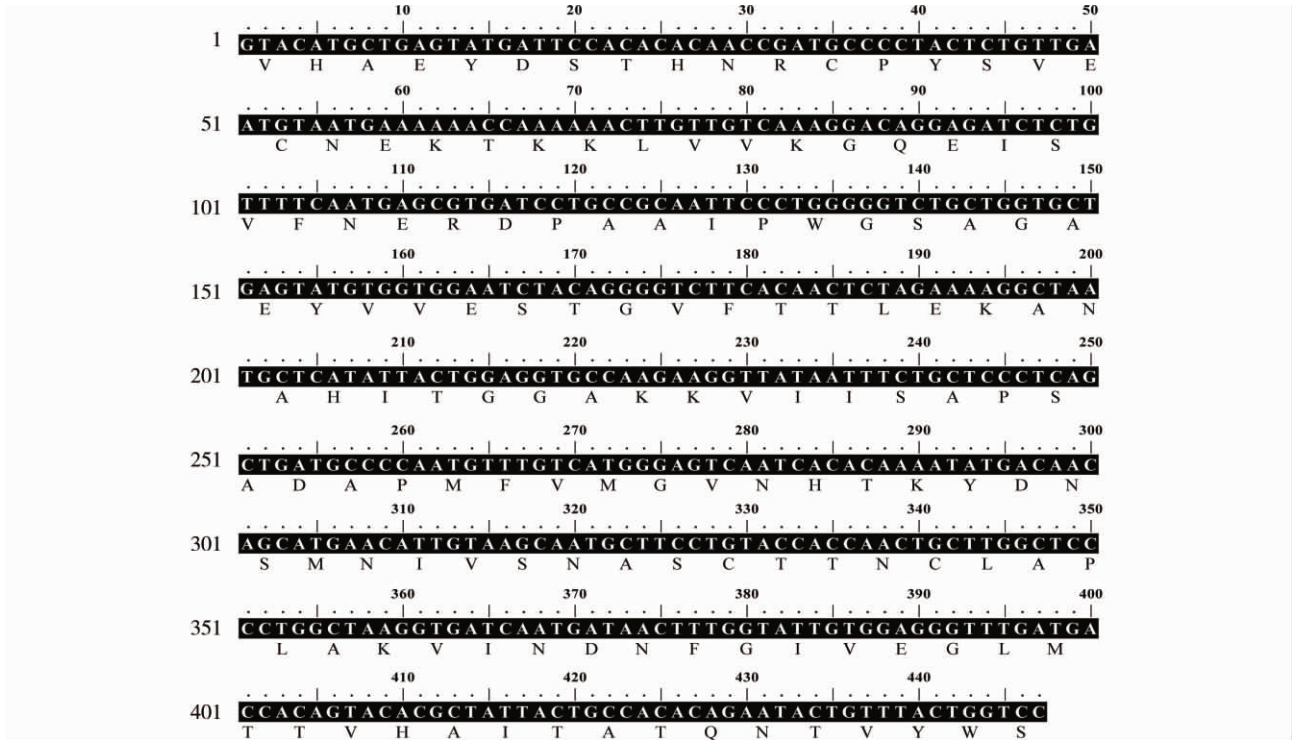


图 2 栉孔扇贝 GAPDH 基因碱基与对应的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleobase and corresponding amino acid sequences of GAPDH gene of *Chlamys Farreri*

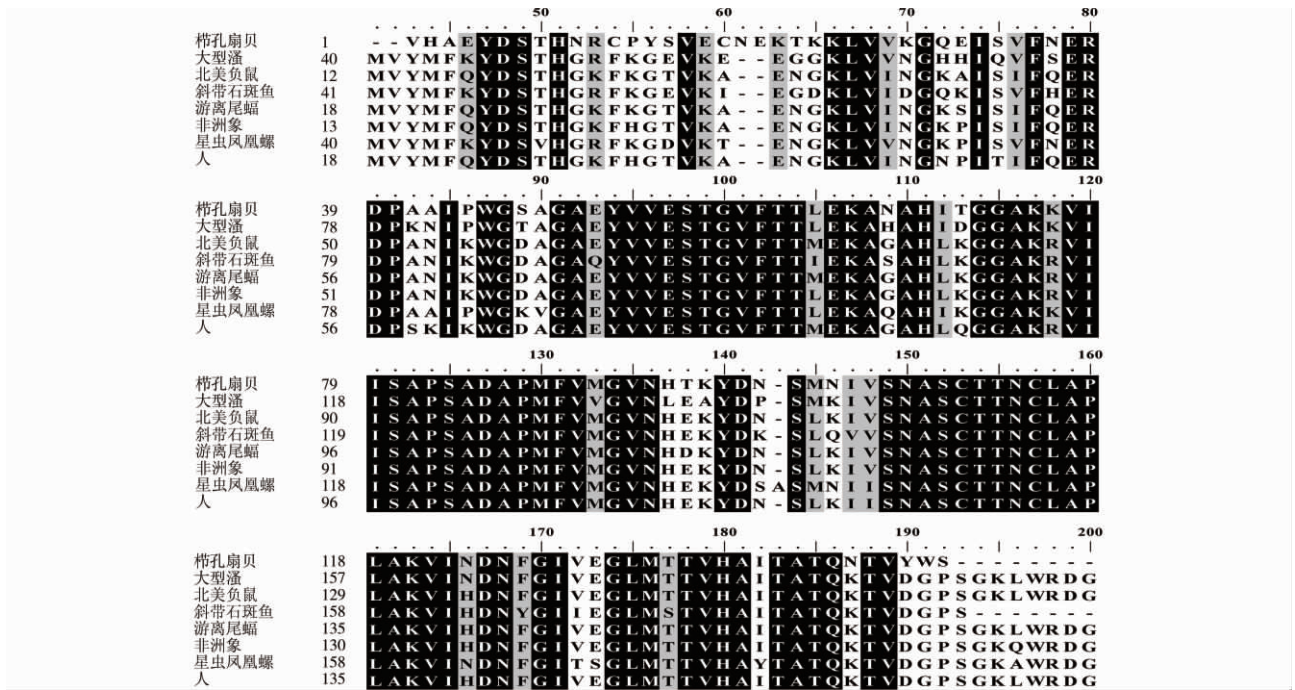


图 3 栉孔扇贝 GAPDH 基因部分氨基酸序列与大型蚤 (CAB99475)、北美负鼠 (ABD77177)、斜带石斑鱼 (AEG78378)、游离尾蝠 (ABD77189)、非洲象 (ABD77180)、星虫凤凰螺 (ABM97666) 和人 (ABD77190) GAPDH 氨基酸序列比对

Fig. 3 Comparison of partial amino acid sequence alignments of GAPDH genes of *Chlamys Farreri* with those of *aphnia magna* (CAB99475), *Didelphis virginiana* (ABD77177), *Epinephelus coioides* (AEG78378), *Tadarida brasiliensis* (ABD77189), *Loxodonta africana* (ABD77180), *Phascolion strombus* (ABM97666) and *Homo sapiens* (ABD77190)

利用设计的定量引物扩增各内参基因。结果显示,各内参基因溶解曲线均呈现单一峰,并且解链温度均高于 80 °C,说明产物单一,引物特异性较好。同时,根据稀释倍数计算各基因的定量标准曲线和扩增效率。从表 2 可知,各内参基因标准曲线的相关系数均大于 99.9%,扩增效率在 98.1% ~ 108.1%之间。另外,样品的阴性对照无扩增信号,说明实验体系无污染,实验样品可用于后续研究。

在本研究中,利用 NormFinder 软件评价 5 次采样(代表了不同发育时期)和雌激素暴露栉孔扇贝性腺中 5 个内参基因表达的最稳定性结果为:GAPDH、18S rRNA、EF-1 α 、EF-1 α 、EF-1 α 和 EF-1 α ; GeNorm 软件评价的结果为: β -TUB | EF-1 α 、18S rRNA | EF-1 α 、EF-1 α | GAPDH、EF-1 α | GAPDH、

表 2 栉孔扇贝内参基因定量引物扩增参数

Table 2 Parameters of reference genes of quantifying primers for *Chlamys Farreri*

名称	扩增长度	斜率	相关系数(r^2)	扩增效率/%
β -actin	155	-3.306	0.999	98.1
β -TUB	182	-3.142	0.999	108.1
EF-1 α	153	-3.335	0.999	99.5
18SrRNA	163	-3.306	0.999	100.7
GAPDH	155	-3.334	0.999	99.5

18S rRNA | EF-1 α 和 β -Actin | EF-1 α ; BestKeeper 软件评价的结果为:EF-1 α 、EF-1 α 、18S rRNA、 β -Actin、EF-1 α 和 18S rRNA; 比较 delta-Ct 法的评价结果为:GAPDH、EF-1 α 、EF-1 α 、EF-1 α 、EF-1 α 和 EF-1 α 。由上可知,不同软件的分析结果并不完全一致,这是

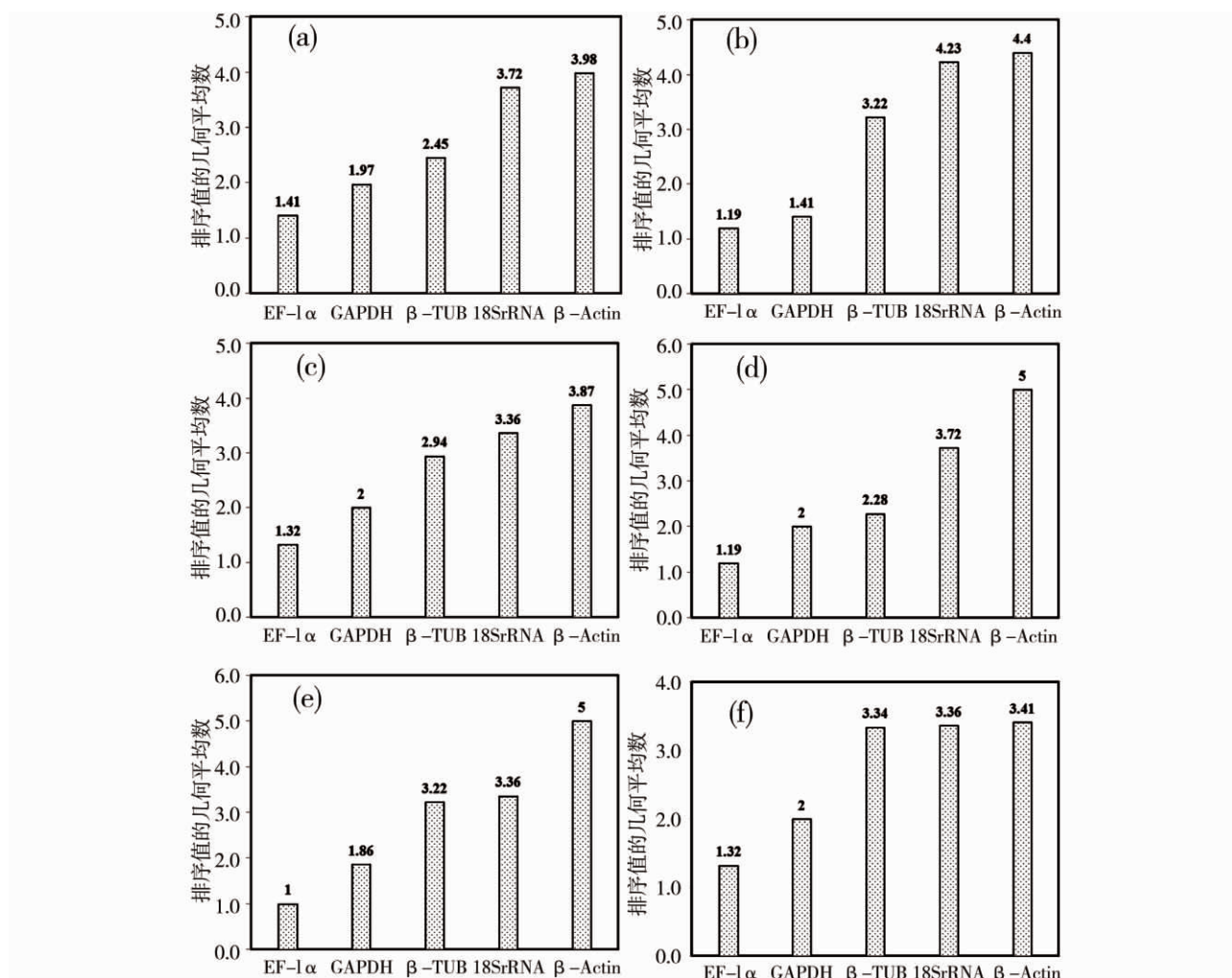


图 4 栉孔扇贝性腺发育过程与雌激素暴露不同内参基因稳定性(卵巢和精巢样本各 6 例)

注:(a) 第 1 次采样;(b) 第 2 次采样;(c) 第 3 次采样;(d) 第 4 次采样;(e) 第 5 次采样;(f) 雌激素暴露

Fig. 4 Reference genes expression stability during gonadal development and E_2 exposure of *Chlamys Farreri* ($n=6$)

Note: (a) first sampling; (b) second sampling; (c) third sampling; (d) fourth sampling; (e) fifth sampling; (f) E_2 -exposure

由于 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和比较 delta-Ct 法 4 种评价方法分析目标的侧重点不同,因此对于同一数据的分析结果略有差异。为此,仅以一种方法筛选稳定内参基因有一定程度的局限性,有可能造成分析结果存在误差。为了避免这个问题,我们利用同时包含上述 4 种评价方法的 RefFinder 软件在线分析栉孔扇贝性腺发育期和雌激素暴露性腺各内参基因表达的稳定性(图 4(a)-(e)),其结果比单一方法的评价结果更为可靠。从图 4 中可知,性腺发育过程中以 EF-1 α 的排序值几何平均数最小,即 EF-1 α 在性腺发育过程中的表达最为稳定。而其他内参基因在性腺发育过程中的变化幅度均大于 EF-1 α 。另外,处于外源雌激素(500 ng·L⁻¹)暴露条件下,EF-1 α 在各内参基因表达排序值的几何平均数亦为最小,即处于外源雌激素暴露条件下以 EF-1 α 的表达最为稳定(图 4(f))。因此,本实验结果证明:EF-1 α 可作为判别栉孔扇贝性腺发育过程和雌激素作用下相关基因表达变化的稳定内参基因之一。由此可以看出,RefFinder 是在上述 4 种方法评价结果的基础上,通过比较得出 EF-1 α 是本研究 5 个内参基因中表达最稳定的内参基因。

另外,从采集的栉孔扇贝性腺发育指数可以看出(图 1),本研究期间栉孔扇贝性腺发育经历了增值、成熟和退化的一个过程。根据生物的生理发育周期,可知栉孔扇贝的整个发育期间,体内各项生理参数和功能会随着性腺发育而改变,如糖类合成、蛋白合成以及激素水平等^[26-27]。因此,这个过程表达相对更为稳定的基因——EF-1 α ,受雌激素影响较小(这在后续雌激素暴露实验中也得到了验证),可作为研究雌激素作用下栉孔扇贝各目标基因表达的稳定内参基因之一。

通讯作者简介:安立会(1975—),男,环境科学博士,副研究员,主要研究方向为水生态毒理与风险评价,发表学术论文 30 余篇。

参考文献:

- [1] Radoni 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(4): 856—862
- [2] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 75(2-3): 291—295
- [3] Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: Trends and problems [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29(1): 23—29
- [4] Dheda K, Huggett J F, Bustin S A, et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(1): 112—119
- [5] Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies [J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 19(7): 32
- [6] Pombo S M, Calaza M, Gomez-Reino J J, et al. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage [J]. *BMC Molecular Biology*, 2008, 9: 17
- [7] 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 Biology*, 2006, 43(6): 430—438
- [8] 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
- [9] Amy L F, Charles R T. Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish [J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8: 10
- [10] Glare E M, Divjak M, Bailey M J, et al. β -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
- [11] Ann-Britt N, Claus B J, Susanna C, et al. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8: 67
- [12] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, et al. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(7): 1734—1735
- [13] Tunbridge E M, Eastwood S L, Harrison P J. Changed relative to what? Housekeeping genes and normalization strategies in human brain gene expression studies [J]. *Biological Psychiatry*, 2011, 69(2): 173—179
- [14] 侯维海, 孙鹏, 陈全家, 等. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(17): 76—81
- Hou W H, Sun P, Chen Q J, et al. Selection of the

- reference genes for gene expression studies in *Rehmannia glutinosa* by real-time quantitative PCR [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(17): 76–81 (in Chinese)
- [15] 计红, 王忠伟, 郭景茹, 等. 产蛋前期和产蛋期籽鹅组织内参基因的稳定性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2260–2266
- Ji H, Wang Z W, Guo J R, et al. Stability of endogenous reference genes in green-goose tissues during prelaying and laying periods [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(11): 2260–2266 (in Chinese)
- [16] 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)
- [17] 徐安定, 谭少华, 屈洋. 缺氧时星形胶质细胞定量 mRNA 表达的内部参照标准研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5): 774–778
- Xu A D, Tan S H, Qu Y. Internal standards for mRNA quantitative expression in hypoxic astrocytes [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2004, 20(5): 774–778 (in Chinese)
- [18] 廖成义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期[J]. 水产学报, 1983, 7(1): 1–12
- Liao C Y, Xu Y F, Wang Y L. Reproductive cycle of the scallop *Chlamys farreri* [J]. Journal of Fisheries of China, 1983, 7(1): 1–12
- [19] 匡世焕, 孙慧玲, 李锋, 等. 栉孔扇贝生殖活动前后的滤食和生长[J]. 海洋水产研究, 1996, 17(2): 80–85
- Kuang S H, Sun H L, Li F, et al. Feeding and growth of scallop *Chlamys farreri* before and after spawning [J]. Marine Fisheries Research, 1996, 17(2): 80–85
- [20] 秦贞奎. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)性别分化相关基因的筛选以及两个相关基因的表达分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 31–33
- Qin Z K. Screening of sex differentiation genes of *Chlamys farreri* and expression analysis of two sex-related genes [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011: 31–33
- [21] Zhang B H, Xie F L. Refinder[CP/OL]. (2012-11-5). <http://www.leonxie.com/referencegene.php>
- [22] 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): research0034.1-0034.11
- [23] 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
- [24] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 509–515
- [25] Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 33
- [26] Tosti E, Di Cosmo A, Cuomo A, et al. Progesterone induces activation in *Octopus vulgaris* spermatozoa [J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 59(1): 97–105
- [27] D'Aniello A, Di Cosmo A, Di Cristo C, et al. Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* lam [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 227(3): 782–788

