

网络出版时间:2017-08-21 13:50 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.10.001
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170821.1350.002.html>

大鲵不同发育阶段及组织中内参基因稳定性评价

崔 丹, 蓝青景, 刘然然, 王立新
(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】研究 18S 核糖体 RNA (18S rRNA)、延伸因子 1- α (EF1- α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、 β -肌动蛋白(β -actin)和琥珀酸脱氢酶 A 亚基(SDHA)等 5 种常见内参基因在大鲵不同组织、不同发育阶段及嗜水气单胞菌感染下的稳定性,为大鲵后基因组学研究提供指导。【方法】采集 3 龄健康大鲵的肝脏、肠、胃、胰腺、肾脏、肌肉、皮肤、脾脏等组织,3 龄、2 龄、1 龄、9 月龄、1 周龄健康大鲵的皮肤组织及嗜水气单胞菌感染大鲵后第 3,5,7 天的皮肤组织,提取其 RNA,进行实时荧光定量 PCR 检测,应用 3 种内参基因稳定性评价分析工具(geNorm, NormFinder, BestKeeper)分析 5 种内参基因在大鲵不同组织、不同发育阶段以及不同病理状态下的稳定性。【结果】5 种内参基因在大鲵不同组织中表达稳定性较好的是 EF1- α 和 SDHA,而在不同发育阶段及嗜水气单胞菌感染大鲵的皮肤组织中,5 种内参基因的表达稳定性不同于在不同组织中的表达,稳定性较好的是 EF1- α 和 GAPDH。【结论】EF1- α 表达最为稳定,是大鲵定量 PCR 首选内参基因,而 SDHA、GAPDH 以及 β -actin 表达稳定性受生理状态的影响较大,作为第二内参基因时应视试验目的而定,在不同组织中进行定量 PCR 比较时应选用 SDHA,而在不同生理状态下则应选用 GAPDH 为第二或备用内参基因。

【关键词】 大鲵;嗜水气单胞菌;内参基因

【中图分类号】 S947.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2017)10-0001-06

Stability evaluation of reference genes in tissues of *Andrias davidianus* at different development stages

CUI Dan, LAN Qingjing, LIU Ranran, WANG Lixin

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The expression stability of five reference genes including 18S rRNA, EF1- α , GAPDH, β -actin, and SDHA in tissues of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) and in skin at different development stages was evaluated to provide guidance for future post-genomic studies of giant salamander. 【Method】Samples were collected from liver, intestines, stomach, pancreas, kidney, muscle, skin, spleen and other tissues of 3 years old health Chinese giant salamanders and skin of 3 years, 2 years, 1 year, 9 months and 1 week old health Chinese giant salamanders, and skin of Chinese giant salamanders 3, 5, and 7 days after *Aeromonas hydrophila* infection. RNA was extracted and the expression level was detected using real-time fluorescent quantitative PCR. Then the expression stability was evaluated using three analysis tools (geNorm, NormFinder, and BestKeeper). 【Result】The most stable reference genes in eight tissues of Chinese giant salamander in health were EF1- α and SDHA, the most stable reference genes in skin in different development and in skin after *Aeromonas hydrophila* infection were EF1- α and GAPDH. 【Con-

〔收稿日期〕 2016-09-02
〔基金项目〕 陕西省科技攻关项目(2012K01-18)
〔作者简介〕 崔 丹(1991—),女,山西运城人,在读硕士,主要从事水产动物资源保护与利用研究。E-mail:cuidanfly@163.com
〔通信作者〕 王立新(1968—),男,陕西南郑人,副教授,硕士生导师,主要从事水产动物遗传育种与种质资源保护研究。
E-mail:fisherwanglx@163.com

clusion】 The most stable reference gene was *EF1- α* , which was the first choice for qRT-PCR. The expressions of *SDHA*, *GAPDH* and *β actin* were strongly influenced by physiological state, and the selection as a second reference gene should depend on purpose. *SDHA* should be used for comparing quantitative PCR in different tissues, whereas *GAPDH* should be used in different physiological conditions.

Key words: *Andrias davidianus*; *Aeromonas hydrophila*; reference genes

实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 是分子生物学中基因表达和转录分析的最常用方法^[1-2], 但在 qRT-PCR 过程中, 由于 RNA 的产量、质量、转录效率, 以及反应过程中温度、引物、酶的活性等因素都可能影响 PCR 反应的准确性, 因此为了减少试验误差, 确保试验数据的真实性和可靠性, 常采用内参基因进行数据校正和均一化^[3]。

内参基因又称看家基因, 是所有细胞中均表达的一类基因, 其产物是维持细胞基本生命活动所必需的^[4]。内参基因的种类很多, 常用的内参基因有 18S rRNA、28S rRNA、*GAPDH*、*EF1- α* 、 *β actin*、*SDHA* 等^[5-6]。理想的内参基因是在不同组织器官、发育阶段以及各种状态下持续表达的基因^[7]。但近年来大量的研究表明, 环境、物种、组织来源、发育阶段及试验条件等因素的影响均会导致内参基因表达量发生变化, 理想化的内参基因是不存在的^[8-10]。因此, 选择内参基因时, 不同生物需要在各类组织、细胞及试验条件下进行筛选, 以最大限度保证试验结果的可靠性。

大鲵 (*Andrias davidianus*) 是现存两栖动物中个体最大和最珍贵的物种, 其地位的特殊性及其独特的原始结构, 是研究生物进化、物种多样性、性别决定的分子机制等问题的好材料^[11]。近年来大鲵的研究主要集中在遗传多样性^[12-13]、生物学特性^[14]、病害防治^[15]、生殖发育^[16]和分子免疫^[17]等方面, 而有关大鲵基因定量 PCR 内参基因稳定性的研究尚未见报道。为此, 本研究对 5 种常用内参基因在大鲵不同组织、不同发育阶段及嗜水气单胞菌感染下的稳定性进行了综合评价, 以期为大鲵后基因组学研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验大鲵均来自陕西省留坝县人工养殖场。其中 3 龄大鲵 3 尾, 体质量 (508 ± 24) g/尾, 体长 (43 ± 8) cm; 2 龄大鲵 3 尾, 体质量 (130 ± 6) g/尾,

体长 (30 ± 0.5) cm; 1 龄大鲵 3 尾, 体质量 (50 ± 7) g/尾, 体长 (22 ± 1.5) cm; 1 周龄大鲵 3 尾, 体长 (3.68 ± 0.08) cm; 9 月龄大鲵 3 尾, 体质量 (6.43 ± 0.63) g/尾, 体长 (9.50 ± 0.10) cm; 另外用于嗜水气单胞菌感染的大鲵为 3 尾 3 龄大鲵, 体质量 (303 ± 37) g/尾, 体长 (41 ± 0.8) cm。

主要化学试剂: Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自 TianGen 公司, PrimeScript™ RT reagent Kit 购自 TaKaRa 公司, uLtra SYBR Mixture (With ROX I) 购自康为公。大鲵嗜水气单胞菌由西北农林科技大学王高学教授实验室赠送。其他常规试剂均为国产分析纯级试剂。

主要仪器设备: 核酸测定仪 (Bio-Rad 公司), 高速冷冻离心机 (Sigma3-18K 设备, Dynamica VE-LOCITY 18R 设备), 普通 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), 凝胶电泳系统 (北京邦科公司), 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 嗜水气单胞菌感染试验 无菌条件下, 将嗜水气单胞菌菌株接种到无菌肉汤培养液中, 37°C 、200 r/min 振荡 4 h 后, 测得 600 nm 吸光度 (OD_{600}) 达到 0.455, 通过显微计数法测得细菌密度为 6×10^8 CFU/mL, 达到感染试验要求。将菌液 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 沉淀加等量无菌生理盐水, 如此反复清洗 3 次后, 加等量生理盐水, 然后稀释 10 倍制成 6×10^7 CFU/mL 的菌悬液作为注射液。根据大鲵体质量的不同, 将菌悬液以 2.6×10^5 CFU/g 的剂量腹腔注射 3 尾 3 龄健康大鲵, 每天观察和记录大鲵发病情况。于注射后的第 3, 5, 7 天分别取 1 尾感染大鲵进行剖检和皮肤组织样品采集。

1.2.2 候选内参基因的选择及引物的设计 从本实验室构建的大鲵转录组数据库中筛选出常用的内参基因, 经过生物信息学分析鉴定后选取 18S rRNA、*EF1- α* 、*GAPDH*、 *β actin* 和 *SDHA* 作为候选的内参基因。用 Primer Premier 5.0 软件设计 5 种候选内参基因引物, 具体引物信息见表 1, 并送至南京金斯瑞生物公司合成。

表 1 大鲵候选内参基因实时定量 PCR 引物			
Table 1 Primers of <i>Andrias davidianus</i> candidate reference genes for qRT-PCR			
基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Tm	产物长度/bp Product length
18S rRNA	F-CCCCTTGATGCTCTTGACTGA R-ACCGGCCTGCTTTGAACACT	60	143
GAPDH	F-GACCACTGTCCACGCAGTCAC R-GATGTTCTGGTTGGCACCTCT	60	94
EF1-α	F- GGACAGACCCGTGAACATGC R-CTTCCTTAGTGATCTCCTCGTAGC	60	130
SDHA	F-GCTGTTACTCGCCCTCTTCACT R- GTTGAACCCAGCCTCAGACA	60	174
βactin	F-GCCATCAATCGTCCACCG R-CCGCATCAAGCACCAGAA	60	132

1.2.3 大鲵组织样品的采集、RNA 的提取及 cDNA 的合成 将供试大鲵麻醉致死,在无菌条件下,取 3 龄健康大鲵的肝脏、肠、胃、胰腺、肾脏、肌肉、皮肤、脾脏等 8 种组织,用于 5 种内参基因在不同组织中表达稳定性的研究;取不同年龄阶段以及嗜水气单胞菌感染大鲵的皮肤组织,用于 5 种内参基因在大鲵不同发育阶段和病理状态下表达稳定性的研究。样品采集后迅速放入液氮中,按照 Trizol 试剂盒说明书提取以上组织的总 RNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪检测总 RNA 的质量,参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书,进行基因组 DNA 的消除和反转录,反转录产物于-20℃保存备用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 实时定量 PCR 在 Bio-Rad CFX-96 检测系统上进行,反应体系(25 μL):2×SYBR Green Mix 12.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL,Template DNA 1.0 μL,RNase Free dH₂O 9.5 μL。整个反应通过两步法进行扩增:95℃预变性 2 min;95℃变性 5 s,60℃退火并延伸 30 s,40 个循环。在扩增结束后进行熔解曲线分析,95℃变性 15 s,然后从 60℃开始,按 0.1℃/s 的速度逐渐升温到 95℃,连续记录荧光信号变化。获得的数据通过 Excel 进行统计,按照 2^{-ΔΔC_t} 计算内参基因的相对表达量,采用 SPSS 软件分析差异显著性。

1.2.5 基因表达稳定性评价 用 BestKeeper、geNorm 和 NormFinder 3 种软件分析 5 种内参基因在不同组织、不同发育阶段及嗜水气单胞菌感染大鲵后不同时期皮肤中的表达稳定性,筛选出最理想的内参基因。

1.3 数据分析

采用 Excel 和 SPSS PASW Statistics 18 软件进行数据分析,图表制作采用 GraphPad Prism 6。显著性分析使用 One-Way ANOVA,统计学显著性

设定为 $P<0.05$,数据结果以“平均值±标准差”的形式表示。

2 结果与分析

2.1 5 种候选内参基因在大鲵不同组织中的表达稳定性

将所提取的 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,可以明显地看出有 5S、18S、28S 3 条带,表明所提取的 RNA 完整且质量较好。稀释后的总 RNA 经核酸分析仪测定后,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均介于 1.8~2.2,表明所提取的 RNA 无蛋白质污染,可以直接使用。

以 RNA 反转录获得的 cDNA 为模版,采用实时定量 PCR 检测 5 种内参基因在大鲵肝、肠、胃、胰、肾、肌、皮和脾脏等 8 种组织中的表达丰度,结果如图 1 所示。

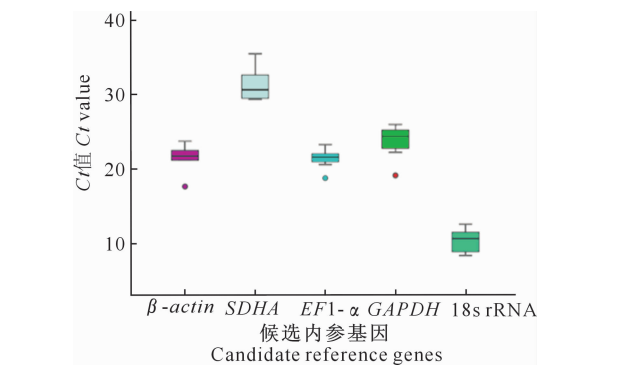


图 1 5 种候选内参基因在大鲵 8 种组织中的表达

Fig. 1 Expression levels of five candidate reference genes in eight tissues of *Andrias davidianus*

图 1 表明,不同基因表达量间存在广泛差异,其中 18S rRNA 基因表达丰度最高,在不同组织中 Ct 的平均值为 10.34±0.28;SDHA 的表达丰度最低,在不同组织中 Ct 的平均值为 31.27±0.78;EF1-α, βactin 和 GAPDH 在不同组织中的 Ct 平均值分别

为 $21.36\pm0.27, 21.48\pm0.28, 23.69\pm0.15$ 。

将 5 种内参基因在 8 种组织的定量 PCR 结果用 3 种软件进行评价,结果见表 2。由表 2 可知,5 种候选内参基因在大鲵 8 种组织中表达稳定性最好的是 $EF1-\alpha$,其次是 $SDHA$ 。

表 2 5 种候选内参基因在大鲵 8 种组织中的表达稳定性

Table 2 Stability expression of five candidate reference genes in 8 tissues of *Andrias davidianus*

候选内参基因 Candidate reference gene	geNorm M 值(排序) M value (ranking)	BestKeeper 稳定值(排序) Bestkeeper stability value (rank)	NormFinder 稳定值(排序) NormFinder stability value (rank)
18S rRNA	0.374(5)	1.25 (3)	0.091(3)
β actin	0.218(3)	1.13(2)	0.246(5)
GAPDH	0.237(4)	1.62(4)	0.110(4)
$EF1-\alpha$	0.181(1)	0.87(1)	0.036(1)
SDHA	0.208 (2)	1.76(5)	0.087(2)

2.2 5 种候选内参基因在大鲵不同发育阶段的表达稳定性

为检测 5 种候选内参基因在大鲵不同发育阶段的表达稳定性,本研究以 1 周龄、9 月龄以及 1、2、3 龄健康大鲵的皮肤组织 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 分析,结果如图 2 所示。由图 2 可知,5 种内参基因中 18S rRNA 在大鲵不同发育阶段的表达量最高,其 Ct 平均值为 12.83 ± 0.76 ;而 $SDHA$ 的表达丰度最小, Ct 平均值为 30.53 ± 0.46 。

将 5 种内参基因在大鲵不同发育阶段的定量 PCR 结果经 3 种软件进行评定,结果见表 3。由表 3 可知,3 种软件评价均显示 18S rRNA 在大鲵不同发育阶段表达最不稳定,不适用作不同发育时期定量 PCR 的内参基因;5 种候选内参基因在大鲵不同发育

阶段表达稳定性较好的为 $EF1-\alpha$ 和 $GAPDH$ 。

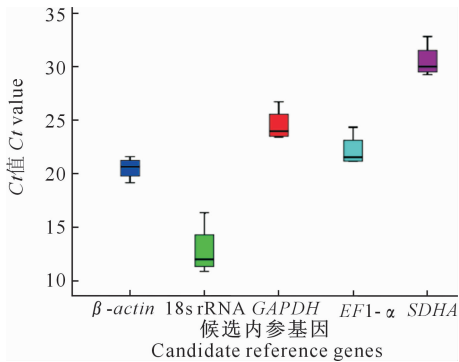


图 2 5 种候选内参基因在不同发育阶段大鲵皮肤中的表达

Fig. 2 Expression levels of five candidate reference genes in skin of *Andriaas davidianus* at different ages

表 3 5 种候选内参基因在不同发育阶段大鲵皮肤中的表达稳定性

Table 3 Stability expression of five reference candidate genes in skin of *Andrias davidianus* at different ages

候选内参基因 Candidate reference gene	geNorm M 值(排序) M value (rank)	BestKeeper 稳定值(排序) BestKeeper stability value (rank)	NormFinder 稳定值(排序) NormFinder stability value (rank)
18S rRNA	0.193(5)	1.78(5)	0.132(5)
β actin	0.105(4)	0.73(1)	0.061(4)
GAPDH	0.081(2)	1.10(3)	0.014(2)
$EF1-\alpha$	0.078(1)	1.09(2)	0.039(3)
SDHA	0.085(3)	1.15(4)	0.009(1)

2.3 5 种候选内参基因在嗜水气单胞菌感染大鲵皮肤中的稳定性

为进一步研究在病理状态下 5 种内参基因的表达稳定性,本研究分别以健康大鲵和感染嗜水气单胞菌第 3、5、7 天的大鲵皮肤 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测,结果如图 3 所示。图 3 显示,5 种候选内参基因中,18S rRNA 在不同感染时期皮肤组织中的表达量最高,其 Ct 平均值为 14.22 ± 0.12 ;而 $SDHA$ 的表达丰度最小, Ct 平均值为 32.36 ± 0.23 。

将 5 种内参基因在不同病理阶段的定量 PCR 结果进行软件评价,结果如表 4 所示。由表 4 可知,5 种内参基因在嗜水气单胞菌感染的不同病理状态

下,稳定性较好的为 $EF1-\alpha$ 和 $GAPDH$ 。

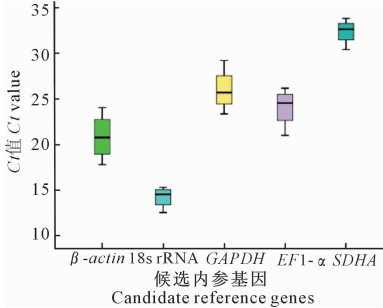


图 3 5 种候选内参基因在不同感染阶段大鲵皮肤中的表达

Fig. 3 Expression levels of five candidate reference genes in skin of infected *Andrias davidianus*

表 4 5 种候选内参基因在感染大鲵皮肤组织中的表达稳定性

Table 4 Stability expression of five candidate reference genes in skin of infected *Andrias davidianus*

候选内参基因 Candidate reference gene	geNorm M 值(排序) M value (rank)	BestKeeper 稳定值(排序) BestKeeper stability value (rank)	NormFinder 稳定值(排序) NormFinder stability value (rank)
18S rRNA	0.199(5)	0.84(1)	0.132(5)
<i>βactin</i>	0.136(4)	1.89(5)	0.083(4)
<i>GAPDH</i>	0.106(2)	1.61(4)	0.023(2)
<i>EF1-α</i>	0.106(1)	1.53(3)	0.014(1)
<i>SDHA</i>	0.125(3)	0.98(2)	0.040(3)

3 讨 论

实时荧光定量 PCR 是一种强有力的检测基因表达谱的方法,可用于检测不同时期以及经过不同处理样本间基因的表达差异^[18]。但在应用 qRT-PCR 检测基因 mRNA 相对表达量时,内参基因的选择至关重要,理想恰当的内参基因可以减少试验误差,确保试验结果的准确性和可靠性。但适用于一切组织和细胞类型的内参基因是不存在的,不同物种,甚至同一物种不同细胞和组织类型,以及特定处理条件下的最佳内参基因会有所不同^[19]。因此,在进行特定基因表达检测之前应先进行内参基因的筛选和稳定性验证。

本研究对 5 种最常用的内参基因在大鲵不同组织、不同发育阶段以及不同生理状态下的表达稳定性进行了考察,结果表明 *EF1-α* 的表达最为稳定,而 *SDHA*、*GAPDH* 以及 *βactin* 的表达稳定性受生理状态影响较大。*EF1-α* 作为真核生物的延伸因子,其表达的稳定性已被一些学者所证实,Olsvik 等^[20]和 Ingerslev 等^[21]在大西洋鲑内参基因稳定性研究中认为,*EF1-α* 的表达最稳定。*GAPDH* 也是常用的内参基因之一,但有研究表明,*GAPDH* 在缺氧等某些特定生理条件下表现出明显的上调或下调^[22],这与本研究结果一致。尽管 *βactin* 和 18S rRNA 是定量 PCR 中使用最为广泛的内参基因,但本研究结果显示,其在大鲵不同组织、不同发育阶段以及病理状态下,均不及 *EF1-α*、*SDHA* 和 *GAPDH* 稳定。有关 *βactin* 表达的不稳定性已有较多报道,Stefan 等^[23]在关节软骨蛋白中内参基因评价时发现,*βactin* 是表达最不稳定的基因。另外,也有大量研究显示,*βactin* 在鱼类、小鼠和人类中的表达稳定性较差,不适合作为上述物种的内参基因^[24-26];18S rRNA 作为一种核糖体 RNA,其代谢独立于细胞核内的核酸代谢,不转录为 mRNA,且代谢周期较长,从而使 18S rRNA 在组织和细胞中的量较为恒定,受细胞内外环境和功能状态变化的影响较小^[27-28]。但本研究结果显示,18S rRNA 在

大鲵各种状态下的表达都是最不稳定的,这可能和大鲵物种所处的独特进化阶段有关,具体机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Udvardi M K, Czechowski T, Scheible W R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR [J]. The Plant Cell, 2008, 20(7): 1736-1737.

[2] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1559-1582.

[3] 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): 1-12.

[4] Ohl F, Jung M, Radonić A, et al. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer [J]. The Journal of Urology, 2006, 175(5): 1915-1920.

[5] Jain M, Nijhawan A, Tyagi A K, et al. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345(2): 646-651.

[6] Reid K E, Olsson N, Schlosser J, et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development [J]. BMC Plant Biology, 2006, 6(1): 27-37.

[7] Yeap W C, Loo J M, Wong Y C, et al. Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR gene expression normalization in reproductive, vegetative tissues and during fruit development in oil palm [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2014, 116(1): 55-66.

[8] 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): 23-39.

[9] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, et al. The lack of a systematic 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.

[10] Dheda K, Huggett J F, Chang J S, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization [J]. Analytical Bio-

- chemistry, 2005, 344(1): 141-143.
- [11] 王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 大鲵皮肤 cDNA 文库构建及 *Arpc5l* 基因 cDNA 序列和组织表达分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(3): 273-281.
- Wang L X, Zheng Y, Ai M, et al. Construction of cDNA library of *Andrias davidanus* skin tissue with analyzing the cDNA sequence and expression of *Arpc5l* gene [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(3): 273-281.
- [12] 方耀林, 张燕, 杨焱清, 等. 大鲵遗传多样性分析 [J]. 淡水渔业, 2006, 36(6): 8-11.
- Fang Y L, Zhang Y, Yang Y Q, et al. The genetic diversity analysis of *Andrias davidanus* [J]. Freshwater Fisheries, 2006, 36(6): 8-11.
- [13] 方耀林, 张燕, 肖汉兵, 等. 野生大鲵及其人工繁殖后代的遗传多样性分析 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 783-786.
- Fang Y L, Zhang Y, Xiao H B, et al. The genetic diversity analysis of wild *Andrias davidanus* and strain and its artificial reproduction progeny [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(5): 783-786.
- [14] 刘孝华. 大鲵的生物学特性与人工养殖技术 [J]. 江苏农业科学, 2009(4): 284-285.
- Liu X H. The biological characteristics and artificial reproduction technology of *Andrias davidanus* [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2009(4): 284-285.
- [15] 周小愿, 蒯爱葵, 边保团, 等. 中国大鲵疾病研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(3): 255-260.
- Zhou X Y, Lin A J, Bian B T, et al. The disease research progress of *Andrias davidanus* [J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2012, 31(3): 255-260.
- [16] 郭永灿, 李廷宝, 仓道平. 中国大鲵生殖生理研究进展 [J]. 生命科学研究, 2005, 9(2): 99-104.
- Guo Y C, Li T B, Cang D P. The reproductive physiology research progress of *Andrias davidanus* [J]. Life Science Research, 2005, 9(2): 99-104.
- [17] Wang L, Yang H, Li F, et al. Molecular characterization, tissue distribution and functional analysis of macrophage migration inhibitory factor protein (MIF) in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 39(3): 161-168.
- [18] 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.
- [19] 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(4): 856-862.
- [20] Olsvik P A, Lie K K, Jordal A E O, et al. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of *Atlantic salmon* [J]. BMC Molecular Biology, 2005, 6(1): 21-29.
- [21] Ingerslev H C, Pettersen E F, Jakobsen R A, et al. Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) [J]. Molecular Immunology, 2006, 43(8): 1194-1201.
- [22] 朱芷葳, 董常生. 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 807-809.
- Zhu Z W, Dong C S. The comparison of housekeeping gene as relative quantitative stability [J]. Journal of Biotechnology Communications, 2006, 17(5): 807-809.
- [23] Stefan T, Huang W, Piana C, et al. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action [J]. BMC Molecular Biology, 2007, 8(1): 13-22.
- [24] 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.
- [25] Sarmiento J, Leal S, Quezada C, et al. Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of β -actin [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2001, 80(2): 223-228.
- [26] Selvey S, Thompson E W, Matthaei K, et al. β -Actin-an unsuitable internal control for RT-PCR [J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(5): 307-311.
- [27] Tsuji N, Kamagata C, Furuya M, et al. Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues [J]. Anticancer Research, 2001, 22(6C): 4173-4178.
- [28] Fuster G, Vicente R, Coma M, et al. One-step reverse transcription polymerase chain reaction for semiquantitative analysis of mRNA expression [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2002, 24(5): 253-259.