

doi: 10.7541/2014.47

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

李明珠 麦康森 何 艮 艾庆辉 徐 玮 张文兵

(中国海洋大学水产动物营养与饲料农业部重点实验室, 海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 研究以皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)体内存在的 2 条 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*)为目的基因, β -肌动蛋白(β -actin)和核糖体蛋白 S9(Ribosomal protein S9, *RPS9*)为内参基因, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法建立了实时荧光定量 PCR (Real-Time quantitative PCR, RT-qPCR)检测体系, 并应用此体系分析了鲍鱼肌肉组织 $\Delta 5$ *Fad* 在不同饲料处理下的表达差异。实验饲料含有不同的脂肪源, 分别是棕榈酸甘油酯(Tripalmitin, TP 饲料)、富含二十碳四烯酸(Arachidonic acid, ARA)的油脂(AO 饲料)和富含二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)的油脂(EO 饲料)。结果表明: 针对 *Hdhfad1*、*Hdhfad2*、 β -actin 和 *RPS9* 所设计的引物特异性强。各引物对的 PCR 扩增效率(Efficiency, *E*)分别为 1.05、0.99、0.97 和 0.98, 满足 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对 *E* 的要求。当退火温度为 52℃, 反应体积为 25 μ L 时, RT-qPCR 的扩增效果最好。所建立的体系能够准确定量 $\Delta 5$ *Fad* 的基因表达。利用该方法分析 $\Delta 5$ *Fad* 在不同饲料处理下的表达结果显示, 与 TP 对照组相比, EO 和 AO 饲料显著降低了鲍鱼肌肉组织 $\Delta 5$ *Fad*(*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*)的表达量。

关键词: 脂肪酸去饱和酶; 鲍鱼; 实时荧光定量 PCR; 基因表达

中图分类号: Q-33; S966.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)02-0328-07

实时荧光定量 PCR (Real-Time quantitative PCR, RT-qPCR)技术是由美国应用生物系统公司 Applied Biosystems (ABI)于 1996 年发明, 是指在 PCR 的每一个循环中连续检测荧光信号的强弱来即时获知特异性扩增产物的量, 并据此来计算初始模板的量^[1]。对于一个特定的 PCR 来说, 随着 DNA 不断扩增, 荧光信号强度也不断增强, 当荧光信号增强到超过阈值时, 荧光扩增曲线会和阈值线有个交点, 这个交点的横坐标就是 C_t 值, 而原始模板量的大小正是由 C_t 值来反应的^[2, 3]。基因定量方法包括绝对定量和相对定量。绝对定量一般通过标准曲线来确定目的基因的绝对拷贝数^[4]。该方法的优点是可以清楚确定基因的绝对拷贝数, 缺点是过程复杂、耗时且成本高^[5]。在很多情况下, 实验要求并不需要确定转录本的绝对拷贝量, 而只需要给出相对基因表达差异

即可, 即相对定量。相对定量包括双标准曲线法、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 和动力学法等。由于系统误差的原因, 不同的样品很难获得相同量的 RNA, 这时就有必要引入内参基因来对所有样品进行归一化处理, 然后再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较^[6]。目前, 比较常用的相对定量的方法是 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 此法已经被广泛应用于基因表达的相对定量分析中^[7]。应用此法需要引入合适的内参基因, 且目的基因和内参基因的引物设计要求也较高^[8]。因此, 在用此方法确定某一基因的表达量之前, 建立和优化该基因的 RT-qPCR 检测体系, 具有十分重要的意义。

脂肪酸去饱和酶(Fatty acyl desaturase, *Fad*)和延长酶是动物体内合成长链多不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA)的关键酶。近年来, $\Delta 6$ *Fad* 和延长酶在许多水产动物, 尤其

收稿日期: 2013-01-29; 修订日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 39670573)资助

作者简介: 李明珠(1984—), 女, 山东烟台人; 博士; 主要从事水产动物脂肪代谢研究。E-mail: limingzhuava@gmail.com; ava1022@163.com

通信作者: 麦康森, E-mail: kmai@ouc.edu.cn

是在海水鱼类中得到广泛研究^[9-13]。然而, 关于 $\Delta 5$ *Fad* 基因的研究较少, 这主要是由于在很多海水动物中没有成功克隆到该基因^[13-15]。最近研究表明硬骨鱼类 $\Delta 5$ *Fad* 的基因在进化过程中丧失, 尽管 $\Delta 5$ 去饱和活性在部分鱼类中被保存下来^[16]。越来越多的信息表明 $\Delta 5$ *Fad* 是研究动物体 LC-PUFA 合成能力的关键。最近我们成功克隆了 2 条皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) $\Delta 5$ *Fad* 的 cDNA 序列, *Hdhfad1*(GQ470626)和 *Hdhfad2*(GQ466197)。DNAMAN 软件分析表明 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的 cDNA 序列相似性高达 96.82 %, 因此建立合适的基因表达检测体系对于后期开展针对 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的定量表达研究至关重要。本研究应用 SYBR Green 荧光染料, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法建立 $\Delta 5$ *Fad* 的 RT-qPCR 检测体系并采用该体系分析不同脂肪源饲料对皱纹盘鲍 $\Delta 5$ *Fad* 基因表达量的影响。

1 材料与方法

1.1 养殖动物与实验饲料

皱纹盘鲍稚鲍购买自青岛鳌山卫鲍鱼育苗场。使用海带暂养 1 周后随机分为 3 组, 每组 3 个重复, 每个重复 50 头稚鲍[初始体质量为(0.38±0.01) g, 初始壳长为(15.06±0.21) mm]。以酪蛋白和明胶为蛋白源, 糊精和海藻酸钠为糖源, 不同的油为脂肪源配制等氮等能的实验饲料。其中三种不同的脂肪源分别为棕榈酸甘油酯(Tripalmitin, TP)、富含二十碳四烯酸(Arachidonic acid, ARA)的油脂和富含二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)的油脂。三组实验饲料分别命名为 TP 饲料、AO 饲料和 EO 饲料。饲料成分测定: 粗蛋白用凯氏定氮法(N×6.25), 粗脂肪用索氏抽提法, 灰分用马弗炉灰化法(550℃), 高效气象色谱法测定饲料中各脂肪酸的相对含量(表 1)。实验在室内循环水系统中进行, 养殖周期 120d。每天下午 17:00—18:00 投喂饲料, 投喂量为鲍体重的 2%—5%, 投喂完毕将遮光布覆盖在大桶盖上。次日早 7:00-8:00 吸底清除残饵粪便。养殖期间水温为 16.0—18.0℃, 盐度为 31‰—35‰, pH 为 7.5—8.0, 溶解氧>7 mg/L。每周刷桶清除桶壁上可能附着的藻类, 防止稚鲍刮食造成额外的脂肪酸摄入。

1.2 鲍鱼肌肉组织总 RNA 提取与 cDNA 一链合成

用手术剪取养殖试验前及养殖试验后的鲍鱼肌肉组织, 在液氮条件下迅速研磨成粉末。取小于 0.1 g 研磨好的肌肉组织放入加有 1 mL TRIZOL reagent

表 1 实验饲料配方以及成分组成
Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets

原料 Ingredients (%)	饲料 Diets		
	TP	AO	EO
酪蛋白 Casein	25	25	25
明胶 Gelatin	6	6	6
糊精 Dextrin	33.5	33.5	33.5
羧甲基纤维素 CM-cellulose	5	5	5
褐藻酸钠 Sodium alginate	20	20	20
氯化胆碱 Choline chloride	0.5	0.5	0.5
维生素预混料 Vitamin mix ¹	2	2	2
矿物质预混料 Mineral mix ²	4.5	4.5	4.5
棕榈酸甘油酯 Tripalmitin	3.5	0	0
ARA 油 ARA oil	0	3.5	0
EPA 油 EPA oil	0	0	3.5
成分分析 Proximate analysis (%)			
粗蛋白 Crude protein (%)	30.5	31.5	31.4
粗脂肪 Crude lipid (%)	3.2	3.4	3.4
粗灰分 Ash (%)	11.7	12.0	11.9
主要脂肪酸 Main fatty acid (%)	16:0 (91.34 %) ARA (41.81 %) EPA (44.89 %)		
	DHA (8.34 %) DHA (24.10 %)		

注: ¹维生素预混料 (/kg): B1/硫胺素 Thiamin HCl, 120.0 mg; B2/核黄素 Riboflavin, 100.0 mg; 叶酸 Folic acid, 30.0 mg; B6/吡哆素 Pyridoxine HCl, 40 mg; 烟酸/尼克酸 Niacin, 800 mg; 泛酸钙 Ca pantothenate, 200 mg; 肌醇 Inositol, 4000; 生物素 Biotin, 12 mg; 维生素B12 Vitamin B12, 0.18 mg; 维生素C Ascorbic acid, 4000 mg; 维生素E Vitamin E, 450 mg; 维生素K3 Menadione, 80 mg; 维生素A Retinal acetate, 100000 IU; 维生素D Cholecalciferol, 2000 IU; ²矿物质预混料(/kg): NaCl, 0.4 g; MgSO₄·7H₂O, 6.0 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10.0 g; KH₂PO₄, 12.8 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 141.2 mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4 mg; KIO₃, 1.2 mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4 mg; Na₂SeO₃·5H₂O, 0.4 mg; Fecitrate, 1.0 g

Note: ¹Vitamin mix (/kg): Thiamin HCl, 120.0 mg; Riboflavin, 100.0 mg; folic acid, 30.0 mg; Pyridoxine HCl, 40 mg; Niacin, 800 mg; Ca pantothenate, 200 mg; Inositol, 4000; Biotin, 12 mg; Vitamin B12, 0.18 mg; Ascorbic acid, 4000 mg; Vitamin E, 450 mg; Menadione, 80 mg; Retinal acetate, 100000 IU; Cholecalciferol, 2000 IU; ²Mineral mix (/kg): NaCl, 0.4 g; MgSO₄·7H₂O, 6.0 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10.0 g; KH₂PO₄, 12.8 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 141.2 mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4 mg; KIO₃, 1.2 mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4 mg; Na₂SeO₃·5H₂O, 0.4 mg; Fecitrate, 1.0 g

(Invitrogen)的 1.5 mL 无 RNase 离心管中, 充分反应 5min。用 TRIZOL 试剂法提取肌肉组织中的总 RNA, 并将提取的总 RNA 经 DNase (TaKaRa)处理以除去 RNA 中可能存在的基因组 DNA 污染。

NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer 微量分光光度计测定 RNA 的质量和浓度, 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。取 1 μg RNA 按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 说明书完成 cDNA 一链的合成, 保存于-20℃待用。

1.3 RT-qPCR 检测 Δ5 *Fad* 基因表达体系的建立与检测

内参基因的选择及定量引物的检验 在定量表达研究中, 一般是选择表达量比较恒定的看家基因作为内参基因。内参基因与目的基因的特异性引物设计对于定量结果至关重要。首先, 要检验定量引物的特异性, 这需要通过分析 RT-qPCR 产物的熔解曲线。其次, 要验证定量引物是否符合定量方法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)对引物的要求。具体过程如下: 养殖试验前鲍鱼肌肉组织的 cDNA 模板经过梯度稀释(4 倍稀释)以后得到一系列浓度梯度的模板, 对每一个稀释模

板, 都用目的基因和内参基因的定量引物进行扩增得到 *Ct* 值, 每个模板重复三次。以 *Lg* (相对模板拷贝数)为横坐标, 以平均 *Ct* 为纵坐标, 得到一条回归直线。RT-qPCR 反应的扩增效率(Efficiency, *E*)可以从回归直线上计算得到[$E=10^{(-1/\text{斜率})}-1$]。然后以 *Lg* (相对模板拷贝数)为横坐标, 以平均 $\Delta Ct_{\text{目的-内参}}$ 为纵坐标, 建立目的基因和内参基因的模板浓度梯度稀释扩增产物的 ΔCt 曲线。通过判断 ΔCt 曲线的斜率绝对值来判断目的基因和内参基因的 *E* 是否一致^[7]。

本研究选取皱纹盘鲍常用的两种看家基因: β -肌动蛋白 (β -actin, AY380809) 和核糖体蛋白 S9(Ribosomal Protein S9, RPS9, EU247757)作为内参基因的候选进行验证。根据已调取的皱纹盘鲍的 *Hdhfad1*和 *Hdhfad2*序列与两种看家基因的序列, 利用 Primer 5.0按照定量引物的要求分别设计特异性引物(表2)。所有引物委托上海生物工程有限公司合成。

表 2 实时荧光定量 PCR 所用的特异性引物
Tab. 2 Details of specific primer pairs used in RT-qPCR

引物名称 Primer	序列 Sequence 5'-3'	GC(%)	<i>T_m</i>	扩增长度 Product length (bp)
<i>Hdhfad1</i> -F	CCATTTACTCCACCACATT	42.1	50	135
<i>Hdhfad1</i> -R	AACAGTTCCTCCACCCTA	50.0	49	
<i>Hdhfad2</i> -F	CTGTTCAAGCCCAACG	56.3	49.4	193
<i>Hdhfad2</i> -R	TTAAAGACGGAATGTGAC	36.8	47.9	
β -actin-F	GCTGCGTTGGTTATCG	56.3	50	193
β -actin-R	GGTACTTGAGGGTGAGGA	55.6	49.1	
RPS9-F	GTCGGCTCGTGCGTAT	62.5	52.0	198
RPS9-R	GGATGTTCAACACCTGTTT	47.4	52.1	

退火温度及反应体积的筛选 RT-qPCR 反应条件中退火温度设为 52℃、50℃ 和 48℃来进行实验。基本反应条件为: 95℃预变性 30s; 95℃变性 5s, 退火 15s, 72℃延伸 20s, 延伸结束后收集荧光信号, 共 35 个循环。循环结束后加入溶解曲线程序: 95℃, 15s; 退火 15s, 5min 缓慢上升到 95℃。确定最佳退火温度后, 再摸索最佳 PCR 反应体积, 分为 10、25 和 50 μL 来进行实验。反应液成分(以 25 μL 为例): SYBR® Premix Ex *Taq*™(2×)12.5 μL; PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.5 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.5 μL; cDNA 模板 2 μL; dH₂O up to 25 μL。

1.4 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* RT-qPCR 表达量分析

在研究目的基因的表达之前, 我们首先要确定实验处理对所选内参基因的表达会不会产生影响。具体方法是用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法来进行计算, 其中

$\Delta Ct=Ct(\text{处理组内参})-Ct(\text{对照组内参})$ 。目的基因受饲料处理表达的影响用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{处理组})-\Delta Ct(\text{对照组})$, 其中 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因})-Ct(\text{内参基因})$ 。TP 处理组鲍鱼作为对照组, AO 和 EO 饲料喂养的鲍鱼作为处理组。数据按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析^[7], 利用 SPSS 软件中的 Turkey 法对所获得的数据进行统计, 当 $P<0.05$ 时认为有显著差异。

2 结果

2.1 肌肉组织总 RNA 质量检验

提取的总 RNA, 28S 和 18S 条带清晰, 边缘锐利。A₂₆₀/A₂₈₀ 值介于 1.90 到 2.00 之间, 证明所提取的总 RNA 质量良好, 符合实验要求。

2.2 特异性引物的验证以及内参基因的选择

引物特异性验证 *Hdhfad1*、*Hdhfad2*、 β -actin 和 *RPS9* 基因的特异性引物 PCR 扩增产物溶解曲线全部为单峰, 说明扩增产物唯一, 没有非特异性扩增和引物二聚体。这表明针对 4 个基因设计的 4 对引物特异性高, 满足实时定量 PCR 对引物高特异性的要求。

目的基因与内参基因的扩增效率 *E* 验证 目的基因(*Hdhfad1* 与 *Hdhfad2*)与内参基因(β -actin 和 *RPS9*)的浓度梯度稀释模板扩增标准曲线见图 1, C_t 值与 cDNA 模板相对拷贝数的对数呈负线性相关关系。标准曲线的回归方程, R^2 值和计算出的扩增效率 *E* 值如下: *Hdhfad1*: $y = -3.20x + 31.32$, $R^2 = 0.997$, $E = 1.05$ 。 *Hdhfad2*: $y = -3.33x + 30.37$, $R^2 = 0.9998$, $E = 0.99$ 。 β -actin: $y = -3.394x + 24.22$, $R^2 = 0.9999$, $E = 0.97$ 。 *RPS9*: $y = -3.37x + 24.37$, $R^2 = 0.9999$, $E = 0.98$ 。 *E* 均接近 1, 说明所有引物对扩增效率良好, 满足条件。目的基因与内参基因 *E* 一致性验证结果见图 2。由图 2(A 和 B)可以看出, 目的基因 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 与 β -actin 的 ΔC_t 标准曲线的斜率分别为 0.19 和 0.06, 与 *RPS9* 的 ΔC_t 标准曲线的斜率分别为 0.16 和 0.03。斜率均接近 0, 说明看家基因 β -actin 和 *RPS9* 与目的基因扩增效率一致, 满足定量条件。

2.3 退火温度与反应体积的确定

在不同退火温度(52℃、50℃和 48℃)反应条件下, 目的基因和内参基因的扩增条带均唯一且清晰。在 52℃条件下, 条带最明亮且无杂带说明退火温度选 52℃最为合适。不同反应体积(10、25 和 50 μ L)各组条带均明亮且无杂带, 说明不同反应体积对 PCR 效果没有显著影响。根据 PrimeScript™ RT

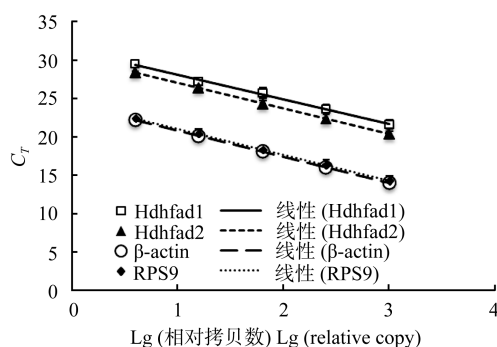


图 1 目的基因(*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*)与内参基因(β -actin 和 *RPS9*)浓度梯度稀释模板扩增标准曲线

Fig. 1 Standard curves of series of diluted template of target genes (*Hdhfad1* and *Hdhfad2*) and reference genes (β -actin and *RPS9*)

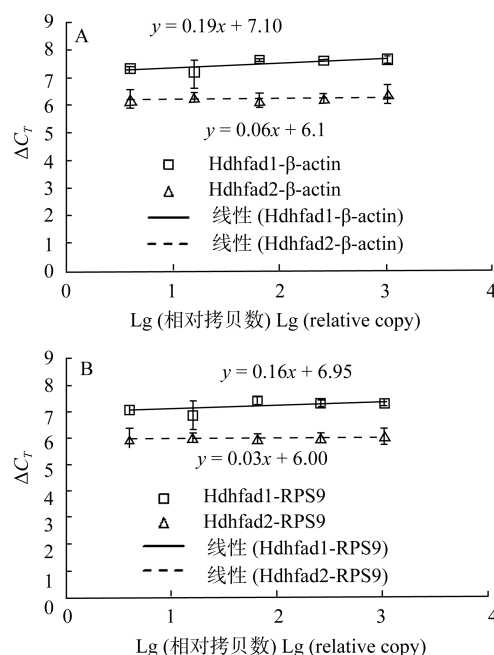


图 2 目的基因(*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*)与内参基因 β -actin(A)或 *RPS9*(B)浓度梯度稀释模板扩增产物的 ΔC_t 标准曲线

Fig. 2 ΔC_t standard curves of series of diluted template of target genes (*Hdhfad1* and *Hdhfad2*) with β -actin (A) or *RPS9* (B)

reagent Kit(Perfect Real Time)推荐的反应体积以及节约的原则, 选择 25 μ L 反应体积进行后续的 RT-qPCR 实验。

2.4 SYBR Green RT-qPCR 反应扩增曲线

从 *Hdhfad1*(A)、*Hdhfad2*(B)、 β -actin(C) 和 *RPS9*(D)基因荧光定量扩增曲线可以看出, 各基因扩增曲线拐点清楚, 指数期明显, 扩增曲线平行性好, 基线无上扬现象。每一种基因的梯度模板扩增 C_t 值间隔明显, 重复性好。这说明 RT-qPCR 的反应体系合适、反应条件良好。

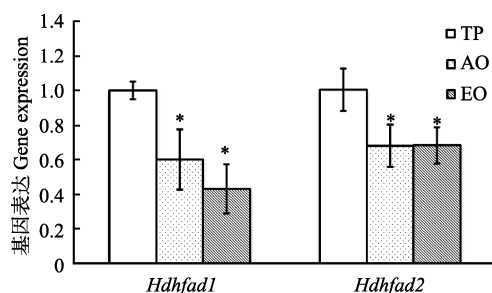
2.5 实验处理对 *Hdhfad1* 与 *Hdhfad2* 表达量的影响

在研究目的基因的表达是否受实验处理的影响时, 我们要选择内参基因来归一化所研究的目的基因, 这时首先要确定实验处理对所选的内参基因表达不会产生影响。不同实验饲料处理对候选内参基因表达量的结果(表 3)表明仅有 *RPS9* 可以用作内参基因来归一化目的基因。实验处理对 *Hdhfad1* 与 *Hdhfad2* 表达量的影响见图 3, 与对照组(TP)相比, AO 和 EO 饲料显著降低了 *Hdhfad1* 与 *Hdhfad2* 的表达。AO 处理组鲍鱼 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的表达量分别是对照组鲍鱼的(60.44 $\pm$ 0.17)%和(68.04 $\pm$ 0.12)%, EO 处理组鲍鱼 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的表达量分别是对照组鲍鱼的(43.30 $\pm$ 0.14)%和(68.39 $\pm$ 0.10)%。

表 3 实验处理对稚鲍肌肉组织看家基因表达量的影响

Tab. 3 Effects of different dietary lipids on the expression levels of reference genes in muscle of abalone

饲料处理 Diets	$2^{-\Delta Ct}$	
	β -actin	<i>RPS9</i>
TP	1.03±0.28 ^{ab}	1.00±0.07
AO	0.67±0.14 ^b	1.01±0.10
EO	1.56±0.27 ^a	1.01±0.25
<i>P</i>	<0.05	>0.05

注: 平均数后上标不同字母表示差异显著($P<0.05$)Note: Different letter represents significant difference ($P<0.05$)图 3 实验处理对稚鲍肌肉组织 *Hdhfad1* 与 *Hdhfad2* 表达量的影响
Fig. 3 Effects of dietary lipids on expression levels of *Hdhfad1* and *Hdhfad2* in muscle of abalone

星号代表此处理组基因表达量与 TP 处理组有显著性差异

Asterisks represent significant differences ($P<0.05$) between the column's dietary treatment and the TP treatment, for the respective transcript

3 讨论

LC-PUFA, 比如 ARA、EPA 或 DHA, 是以亚油酸或者亚麻酸为底物, 经过 *Fad* 和延长酶的共同作用而生成的终产物。其中, $\Delta 5$ *Fad* 是合成 LC-PUFA 的关键酶。两种 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*) 在皱纹盘鲍中被成功克隆, cDNA 全长序列分析显示 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的相似性高达 96.82%。因此, 建立一种快速、准确的 $\Delta 5$ *Fad* 的 RT-qPCR 检测方法对后续研究皱纹盘鲍 $\Delta 5$ *Fad* 基因的表达至关重要^[17]。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的一种简便方法^[7]。在使用此方法时, 需要对内参基因以及设计的定量引物进行严格的检验, 否则会造成最终相对表达量结果的不准确^[18]。本研究根据 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 序列的差异部分以及候选内参基因 β -actin 和 *RPS9* 的全长序列设计出特异性定量引物。RT-qPCR 扩增产物的融解曲线表明所设计的定量引物具有很强的特异性。各引物对的扩增效率以及 ΔCt 模板梯度稀释标准曲线的斜率表明所设计的特异性引物扩增效率一致且接近于 1, 符合 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量方法的要求^[7]。各组 PCR 的荧光扩增曲

线良好, 表明所设定的 PCR 反应体系合适、反应条件良好。看家基因 *RPS9* 的表达不受 AO 和 EO 饲料处理的影响, 适合作为内参基因来归一化 $\Delta 5$ *Fad* 的表达。本实验所选取的内参基因、设计的定量引物以及设定的 RT-qPCR 条件能够准确并快速的检测皱纹盘鲍 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*) 表达量的变化。

应用建立的方法对皱纹盘鲍 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*) 的表达水平进行检测, 进一步证实了建立的 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法的可靠性。与对照组(TP)鲍鱼相比, 富含 LC-PUFA 的 AO 饲料和 EO 饲料显著降低了鲍鱼肌肉组织 *Hdhfad1* 和 *Hdhfad2* 的表达量。这与许多其他水产动物的研究结果是一致的。例如对鲈鱼(*Dicentrarchus labrax* L.)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio* var. Jian)和 Jade Tiger hybrid 鲍鱼(黑鲍 *Haliotis rubra* × 绿鲍 *Haliotis laevis*)的研究中发现, 与投喂植物油饲料组相比, 富含 LC-PUFA 的鱼油饲料显著降低了鱼体肝脏组织中 $\Delta 6$ *Fad* 或 $\Delta 5$ *Fad* 的表达量^[10, 19–24]。LC-PUFA 对 *Fad* 的表达具有反馈阻遏作用, 这或许对于整个 *Fad* 家族的进化起到了一定的作用。有研究表明大部分海水性鱼类(尤其是肉食性鱼类), 由于长期摄食富含 LC-PUFA 的食物, 体内的 $\Delta 5$ *Fad* 基因在进化的过程中消失^[13, 15, 16, 25]。然而, 在同样的状态下, $\Delta 6$ *Fad* 却在大多数物种中保存下来。 $\Delta 6$ *Fad* 是合成 LC-PUFA 的第一步作用酶也是限速酶。 $\Delta 6$ *Fad* 不仅在合成 EPA 的过程中发挥作用, 在由 EPA 合成 DHA 时也发挥了作用。因此, $\Delta 6$ *Fad* 基因和酶活被保存下来可能与其能够在合成 LC-PUFA 过程中发挥特定的生理功能有关系^[16]。

目前已经证明鲍鱼体内存在 $\Delta 6$ *Fad*、延长酶和 $\Delta 5$ *Fad*, 并且这些酶在 mRNA 水平上均受到饲料脂肪酸的影响^[22–24]。本研究建立针对 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*) 的 RT-qPCR 检测体系具有很好的灵敏性、重复性和简便性。这为今后研究 $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* 和 *Hdhfad2*) 受营养如何调控以及这种调控在动物体合成 LC-PUFA 的过程中起到多大的促进作用奠定了分子基础。

参考文献:

- [1] Montgomery R A, Dallman M J. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine

- receptor gene expression during thymic ontogeny [J]. *Cytokine*, 1997, **9**(10): 717—726
- [2] Logan J, Edwards K, Saunders N A. Real-Time PCR: Current Technology and Applications [M]. Norfolk: Caister Academic Press, 2009, 284
- [3] Liu J Y. Real-time PCR technique and its application in quantification of plant nucleic acid molecule [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(6): 631—637 [刘进元. 同步 PCR 技术及其在植物核酸分子定量中的应用. 植物学报, 2003, **45**(6): 631—637]
- [4] Niesters H G M. Quantitation of viral load using Real-Time amplification techniques [J]. *Methods*, 2002, **25**(4): 419—429
- [5] Zhao H Y, Bao J F. Principles and application progress of Real-Time PCR technology [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2007, **16**(4): 492—497 [赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, **16**(4): 492—497]
- [6] Tang Y K, Jia Y Y. Method of Processing Real-Time PCR Data [J]. *Biotechnology*, 2008, **18**(3): 89—91 [唐永凯, 贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨. 生物技术, 2008, **18**(3): 89—91]
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-C_t} Method [J]. *Methods*, 2001, **25**: 402—408
- [8] Zarlenga D S, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology [J]. *Veterinary Parasitology*, 2001, **101**(3—4): 215—230
- [9] Monroig Ó, Zheng X Z, Morais S, *et al.* Multiple genes for functional $\Delta 6$ fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, **1801**(9): 1072—1081
- [10] Ren H T, Yu J H, Xu P, *et al.* Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of $\Delta 6$ desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2012, **163**(2): 184—192
- [11] Gregory M K, See V H L, Gibson R A, *et al.* Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2010, **155**(2): 178—185
- [12] Morais S, Monroig Ó, Zheng X Z, *et al.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, **11**(5): 627—639
- [13] Zheng X Z, Ding Z K, Xu Y Q, *et al.* Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterization of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Aquaculture*, 2009, **290**(1—2): 122—131
- [14] Seiliez I, Panerat S, Corraze G, *et al.* Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2003, **135**(3): 449—460
- [15] Tocher D R, Zheng X Z, Schlechtriem C, *et al.* Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine Fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Lipids*, 2006, **41**(11): 1003—1016
- [16] Castro L F C, Monroig Ó, Leaver M J, *et al.* Functional desaturase Fads1 ($\Delta 5$) and Fads2 ($\Delta 6$) Orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(2): e31950
- [17] Xie Z X, Xie L J, Pang Y S, *et al.* Development of a duplex Real-Time PCR assay for detection of *Perkinsus* and *Marteilia refringens* in shellfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 898—904 [谢芝勋, 谢丽基, 庞耀珊, 等. 贝类派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法的建立. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 898—904]
- [18] Bustin S A, Benes V, Garson J A, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments [J]. *Clinical Chemistry*, 2009, **55**(4): 4611—4622
- [19] González-Rovira A, Mourente G, Zheng X Z, *et al.* Molecular and functional characterization and expression analysis of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase cDNA of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. *Aquaculture*, 2009, **298**(1—2): 90—100
- [20] Seiliez I, Panerat S, Kaushik S, *et al.* Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in rainbow trout [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2001, **130**(1): 83—93
- [21] Zheng X, Torstensen B E, Tocher D R, *et al.* Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1734**(1): 13—24
- [22] Mateos H T, Lewandowski P A, Su X. Dietary fish oil supplements increase tissue n-3 fatty acid composition and expression of delta-6 desaturase and elongase-2 in Jade Tiger hybrid abalone [J]. *Lipids*, 2011, **46**(8): 741—751
- [23] Mateos H T, Lewandowski P A, Su X. Effects of dietary fish oil replacement with flaxseed oil on tissue fatty acid composition and expression of desaturase and elongase genes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, **92**(2): 418—426
- [24] Mateos H T, Lewandowski P A, Su X. The effect of replacing dietary fish oil with canola oil on fatty acid composition and expression of desaturase and elongase genes in Jade Tiger

- hybrid abalone [J]. *Food Chemistry*, 2012, **131**(4): 1217—1222
- [25] Seiliez I, Panserat S, Corraze G, *et al.* Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2003, **135**(3): 449—460

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)

LI Ming-Zhu, MAI Kang-Sen, HE Gen, AI Qing-Hui, XU Wei and ZHANG Wen-Bing

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds (Ministry of Agriculture), Key Laboratory of Mariculture (Ministry of Education), Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: $\Delta 5$ fatty acyl desaturase (*Fad*) is the key enzyme for the biosynthesis of long chain polyunsaturated fatty acids. Abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, has two genes of $\Delta 5$ *Fad* (*Hdhfad1* and *Hdhfad2*), of which the cDNA sequences are highly similar (96.82 %). In this study, an efficient Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) assay based on the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was established for measuring the expression levels of *Hdhfad1* and *Hdhfad2*. Data were normalized to the gene expression levels of β -actin and ribosomal protein S9 (*RPS9*). The effects of different dietary lipids on the expressions of *Hdhfad1* and *Hdhfad2* were studied in muscle tissue of abalone using this assay. We prepared three types of diets that contain different dietary lipids - tripalmitin (TP diet), ARA oil (AO diet) and EPA oil (EO diet). The results showed that primers designed for *Hdhfad1*, *Hdhfad2*, β -actin and *RPS9* were specific, with the amplifying efficiency of 1.05, 0.99, 0.97 and 0.98 respectively. The efficiency of these primers was suitable for the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The optimal annealing temperature and reaction volume for the RT-qPCR amplification were 52°C and 25 μ L respectively. We concluded that this assay was rapid and sensitive in analyzing the expressions of $\Delta 5$ *Fad* in abalone. This assay demonstrated that the expression levels of *Hdhfad1* and *Hdhfad2* were significantly decreased in abalone fed with EO or AO diet compared to those of TP group.

Key words: Fatty acyl desaturase; Abalone; Real-Time quantitative PCR; Gene expression