

러시아 철갑상어(*Acipenser gueldenstaedtii*) 발생 시료의 RT-qPCR 분석을 위한 내재 대조군 유전자의 선정

남윤권* · 이상윤 · 김은정

부경대학교 해양바이오신소재학과

Evaluation of Candidate Housekeeping Genes for the Normalization of RT-qPCR Analysis using Developing Embryos and Prolarvae in Russian Sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*

Yoon Kwon Nam*, Sang Yoon Lee and Eun Jeong Kim

Department of Marine Bio-Materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

To evaluate appropriate reference genes for the normalization of quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) data with embryonic and larval samples from Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, the expression stability of eight candidate housekeeping genes, including beta-actin (ACTB), elongation factor-1A (EF1A), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), histone 2A (H2A), ribosomal protein L5 (RPL5), ribosomal protein L7 (RPL7), succinate dehydrogenase (SDHA), and ubiquitin-conjugating enzyme E2 (UBE2A), were tested using embryonic samples from 12 developmental stages and larval samples from 11 ontogenic stages. Based on the stability rankings from three statistic software packages, geNorm, NormFinder, and BestKeeper, the expression stability of the embryonic subset was ranked as UBE2A>H2A>SDHA>GAPDH>RPL5>EF1A>ACTB>RPL7. On the other hand, the ranking in the larval subset was determined as UBE2A>GAPDH>SDHA>RPL5>RPL7>H2A>EF1A>ACTB. When the two subsets were combined, the overall ranking was UBE2A>SDHA>H2A>RPL5>GAPDH>EF1A>ACTB>RPL7. Taken together, our data suggest that UBE2A and SDHA are recommended as suitable references for developmental and ontogenic samples of this sturgeon species, whereas traditional housekeepers such as ACTB and GAPDH may not be suitable candidates.

Key words: Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, RT-qPCR assay, normalization control, reference genes

서론

PCR을 이용한 유전자 정량 발현 분석법(quantitative reverse transcription-PCR; RT-qPCR) 방법은 유전자 발현의 상대정량 분석에 사용되는 기법으로, 정확도와 간편성이 높아 유전자 발현 평가와 관련된 다양한 연구 분야에서 활용되고 있다. 발현의 상대정량 분석을 위해서는 동일 양의 RNA 주형(template) 투입을 검증하기 위해 참조 유전자(reference gene)를 목적 유전자와 함께 동일 시료에서 증폭시켜 시료들 간 유전자 발현 자료의 정규화(normalization) 과정을 필수적으로 포함하게 된다(Udvardi et al., 2008). 발현 자료의 정규화를 위해서는 생물의 발달 및 생리적 상태에 발현이 영향을 받지 않는 유전자들을

선발하여 이용하며, 주로 전통적으로 항존 유전자(housekeeping gene)라고 알려져 있는 유전자들을 이용하여 왔다(Bustin et al., 2009). 그러나 종래에 알려진 바와는 달리 여러 항존 유전자들이 실제 생물의 발생·발달 상태, 또는 시험자극에서 차등의 유전자 발현 조절이 이루어지거나 큰 폭의 발현 양 변화가 있을 수 있음이 종종 보고된 바 있으며, 때문에 특정 샘플의 RT-qPCR 분석을 위해서는 해당 실험 별로 참조 유전자의 신중한 선정 평가가 매우 중요시된다(Taylor et al., 2013; Yuan et al., 2014; Lee and Nam, 2016).

배 발생 및 초기 개체 발달 과정은 세포 수 증식, 기관 분화 및 형태 발달과 관련하여 비교적 짧은 시간에 역동적인 유전자 발현 조절의 변화를 나타내는 시기이다(Jaramillo et al., 2017). 특

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0095>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 51(1) 95-106, February 2018

Received 5 January 2018; Revised 24 January 2018; Accepted 25 January 2018

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5918 Fax: +82. 51. 629. 5910

E-mail address: yoonknam@pknu.ac.kr

히 어류와 같이 체외 수정 및 체외 발달을 하는 수산동물의 경우, 부모와 분리되어 배 발생과 초기 발달이 진행되므로 모계로부터 수정란에 전달된 유전자 산물을 이용하는 발생 초반의 짧은 구간을 제외하면, 정상적인 발생·발달을 위한 독립적인 유전자 발현 체계를 구축해야 하며, 체외 발생·발달 특성 상 어류 등 수산동물의 발생 관련 유전자 발현 조절은 다양한 외부 환경 요인으로부터 많은 영향을 받는다(Fernandes et al., 2008; Ahi et al., 2013). 따라서 어류 발생에 관여하는 유전자들의 정확한 발현 정량 분석을 위해서는 적절한 참조 유전자의 선정이 매우 중요시된다.

철갑상어(*Acipenser* species)는 원시경골 어류로서 현존하는 조기아강(Actinopterygii)의 가장 원시 형태를 유지하고 있는 분류 군이다(Birstein et al., 1997). 철갑상어는 일반적인 경골 어류(Teleostei)들과는 달리 전할(holoblastic cleavage) 방식으로 난할을 개시하며, 비대칭적 부분 전할(동물 반구와 식물 반구에서 차등 속도의 난할 진행)로 난할이 전개되고, 발생이 진행되면서 다양한 크기와 모양의 할구(blastomeres)들이 만들어진다. 또한 배 발생 과정 중 일반경골 어류와는 달리 특징적으로 분화된 전신(pronephros)을 나타낸다(Bolker, 1993; Cooper and Virta, 2007; Park et al., 2013a). 뿐만 아니라, 부화 후 철갑상어는 비교적 장기간의 난황흡수 기간을 갖는데, 이 기간 동안 형태 변화는 물론 유영성(swimming behavior), 주류성(rheotaxis), 주광성(phototaxis) 등 행동 발달 측면에서 많은 변화를 나타낸다(Gisbert and Williot, 1997; Gisbert and Ruban, 2003; Park et al., 2013b). 따라서 철갑상어의 배 발생 및 초기 발달에 관여하는 유전자들의 발현 조절에 관한 연구 정보들은 어류 발생의 진화 및 비교 유전체 연구에 유용한 연구 자료를 제시할 뿐만 아니라, 철갑상어의 인공종묘생산 기술 개선을 위한 기초 과학 자료를 제공한다는 측면에서도 의미가 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라에 신규 양식 후보 종으로 소개되기 시작하고 있는 러시아 철갑상어(*Acipenser gueldenstaedtii*)의 발생과 초기 발달에 관여하는 유전자들의 발현 분석을 위한 연구의 시작점으로서, 배 발생 및 자어 발달 시료들의 RT-qPCR 분석 시 유전자 발현을 적절히 규격화할 수 있는 참조 유전자들을 선정 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어류, 인공수정 및 발생 시료 확보

실험에 사용한 러시아 철갑상어 친어는 2002년에 인공부화 후 경남 함양 디노빌영어조합법인 양식장에서 사육중인 개체들이었다. 성숙한 암수 친어들을 대상으로 산란유도 호르몬인 luteinizing hormone-releasing hormone analog (LHRH-a; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 암컷 80 µg/kg, 수컷 20 µg/kg 어체중 농도로 근육 주사하였고, 암컷의 배란이 이루어질 때까지 수온 15-16°C에서 관찰하였으며(약 24시간-30시

간 소요), 수컷은 주사 24시간째 및 30시간째 정액을 확보한 희석 보관액(Park and Chapman, 2005)에 1:1 희석 후 냉장상태를 유지하였다. 암컷 배란을 최초 확인 시점부터 1시간 이후 복부 압박 법을 통해 배란된 알을 얻었으며, 습식법을 이용 1:1 mating 방식으로 인공 수정을 실시하였다.

수정란의 점액질을 제거하기 위해 Fuller's earth 분말 처리를 수행한 후 부화 배양기에 수용한 후 19±0.3°C로 항온 배양하면서 난 발생을 유도하였다. 유전자 발현 시험에 사용하기 위해 배의 발생 과정 중 철갑상어 발생에서 대표적인 12 발달단계로부터 발생 시료를 확보하였다. 러시아 철갑상어의 발생 배의 형태학적 발달에 의한 발생 단계 구분은 선행 연구(Dettlaff et al., 1993)에 따라 실시하였고, 본 논문에서 대상으로 한 12 배 발생 단계는 다음과 같다. 수정 직후(0 h post fertilization; 0 HPF), 제1난할(2.2 HPF), 제5-6난할(7.5 HPF), 포배기 초기(9.2 HPF), 낭배기 시작(20 HPF), 70% 피포 형성기(28.5 HPF), 신경배 형성 시작(33.5 HPF), 전신 형성기(40 HPF), 눈 및 체절형성기(56 HPF), 심장 박동기(73.5 HPF), 꼬리 신장기(95 HPF), 그리고 최초 부화(120 HPF)의 발생 단계로부터 약 15-20 개의 배 또는 부화 자어를 3반복으로 샘플링 하였다. 샘플링 과정 중 죽었거나 기형적으로 발생하는 배 또는 개체들이 포함되지 않도록 현미경하에서 시료들을 검경한 후 샘플링을 실시하였다. 샘플링 직후 드라이아이스에 냉동시켰으며, 이후 초저온 냉동고(-80°C)에 사용 직전까지 보관하였다.

부화 후, 부화 자어들은 부화 온도와 동일 온도(19°C)로 조절되는 항온 수조(1 m×2 m×0.3 m; W×D×H)에 순환여과식으로 난황 흡수가 완료(부화 8일째) 후 알테미아 부화 유생(*Artemia nauplii*)을 반복 공급하였고 부화 11일째까지(1 day post hatching; 1 DPH부터 11 DPH까지) 사육 관리하면서 1일 간격으로 샘플링을 실시하였다. 각 샘플링 시점에서 10미씩 3반복 샘플링 하였으며 앞서와 마찬가지로 물기를 제거 후 드라이아이스를 이용하여 냉동 처리하였다.

후보 유전자 및 프라이머 디자인

분석 대상 참조 유전자 후보 군을 1차 선정하기 위해서 연구실에서 제작한 러시아철갑상어 next generation sequencing (NGS) 발현 유전체 데이터베이스(치어 전어체 및 미성어 조직 별 transcriptome 분석 데이터베이스)로부터 후보 유전자들의 염기서열 정보를 수집하였다. 1차 수집된 염기서열들을 대상으로 프라이머 디자인의 용이성 등에 관한 재평가를 실시하였으며, 이를 통해 총 8개의 유전자를 선정하였다. 선정된 8개 유전자는 beta-cytoskeletal actin (ACTB), elongation factor-1 alpha (EF1A), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), histone 2A (H2A), ribosomal protein L5 (RPL5), ribosomal protein L7 (RPL7), succinate dehydrogenase (SDHA) 및 ubiquitin conjugating enzyme E2 (UBE2A)였으며, 각 유전자 염기서열을 대상으로 RT-qPCR primer를 디

자인하기 위해서 RT-PCR 클로닝 또는 RT-PCR 산물의 직접적인 염기서열 분석을 통해 염기서열을 재 검증 하였다. 각 유전자 별로 프라이머 길이(20 mers), G+C content (45-60%), melting temperature (55-65 °C) 및 증폭 산물의 길이(150-200 bp)를 기준으로 2-3쌍의 primer 쌍을 합성하여 PCR 효율(PCR efficiency; *E*) 및 단일 밴드의 선명한 증폭 여부를 재평가하여 유전자 별로 최적 프라이머 쌍을 선정하였다. 이때 PCR 효율 값(*E*)은 철갑상어 치어 전어체 cDNA 주형과 Light Cycler 480 real-time PCR system을 이용하여 평가하였으며, 최소 94% 이상의 PCR 효율로 증폭됨을 확인하였다. 단일 크기의 밴드 증폭 여부는 PCR 증폭 산물을 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동 후 브롬화 에티듐(ethidium-bromide; Et-Br) 염색을 통해서 확인하였다. 본 평가과정을 통해서 선정된 후보 유전자들의 종류와 최종 선정된 프라이머 정보들은 Table 1에 나타내었다.

RNA 분리, cDNA 합성 및 RT-qPCR 분석

발생 배 및 부화자어로부터 TriPure Reagent (Roche Applied Science)로 1차 total RNA를 추출한 후 추출물을 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany)로 다시 순수 분리하였고, 이 때 DNA 오염을 제거하기 위해서 RNase-Free DNase를 처리과정을 포함토록 하였다. 분리된 total RNA가 파괴 없이 확보되었음을 확인하기 위해서 MOPS-formaldehyde gel 전기영동을 통해 28S rRNA 밴드와 18S rRNA 밴드의 선명도와 진하기를 비교하여 검증하였다. Total RNA 시료의 순도는 Libar

S70 분광광도계(Biochrom Ltd., UK)를 이용하여 흡광도(260 nm/280 nm 및 260 nm/230 nm)값이 1.85-2.05 범위에 속함을 확인하였다. Total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해서 RNA 주형 2 µg을 대상으로 oligo-d(T) primer (20 mers; Bioneer, Korea)와 random primer (random nonamers; Takara Bio Inc., Japan)를 함께 포함한 역전사(reverse transcription) 반응을 실시하였고, 역전사 반응은 omniscrypt RT kit (Qiagen)을 이용하여 제조사의 권고 방법대로 실시하였다. 역전사 반응 산물의 농도를 nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)으로 측정된 후 동일 농도로 보정하였고, 최종 DNase free water에 4배 희석하였으며, 각 준비된 cDNA 주형으로부터 2 µL를 취하여 qPCR 반응에 이용하였다. PCR 증폭은 light cycler 480 System (Roche Applied Science)과 SYBR green I master (roche applied science)를 이용하여 열 순환 반응이 95 °C 20초, 58 °C 20초 및 72 °C 25초로 총 40회 수행되도록 하였으며 최초 변성 반응으로서 95 °C 3분을 실시하였다. 각 순환 반응이 종료될 때마다 형광 검출을 실시하였고, 최종 순환 과정이 종료된 후 melting curve 분석을 통해 특이적 증폭 반응이 일어났음을 확인하였다. 각 cDNA 별로 3회 반복 증폭 시험을 실시하였다.

유전자 발현 안정성 평가

상기 실험 설계에 따라 2회의 서로 다른 산란 그룹으로부터 각 33 발달 단계(배 발생 12 단계 및 자어 발달 11 단계)로부터

Table 1. Summarized information on the housekeeping gene candidates and qPCR assay primers used in the present study

Gene	Description	Accession no.	Primers (5'-to-3')	Amplicon size (bp)	PCR efficiency (%)
ACTB	Beta-cytoskeletal actin	KR906073.1	TCCCTGGAGAAGAGCTATGA ACAGGTCCTTACGGATGTCA	178	94.2
EF1A	Elongation factor-1 alpha	KR906074.1	ACAACATGCTGGAGACCAGT CGATACCGCCAATCTGTAG	183	99.1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	MG722827	GGCTAAGCGTGTTCATCATCT GTCATGAGACCCTCAACGAT	183	95.8
H2A	Histone 2A	KP059880.1	CTCGTGCTAAGGCAAAGACT CAGGATTTTCAGCAGTCAGGT	161	97.5
RPL5	Ribosomal protein L5	MG722830	AAGGAGTTCAACGCAGAGGT ATAGCAGCATGAGCCTTGGT	179	101.5
RPL7	Ribosomal protein L7	MG722829	TCAGACTTCGCCAGATCTTC CAGAGGAATACGCTGCTTGT	173	94.1
SDHA	Succinate dehydrogenase	MG722828	GGAGTTTGTGCAGTTCCATC ACAACATCTCGAGAGGCAAG	159	102.4
UBE2A	Ubiquitin conjugating enzyme E2	MG722831	CTCTTCTCGCATCATAAGG CCCAGGTATGGTACATTTGC	154	96.8

각 단계별 3개의 생물학적 반복구(biological replication) 샘플링을 통해서 총 198개의 cDNA 주형(template)을 제조하였고, 각 cDNA 주형 별 3반복의 qPCR 수행(technical replication)을 통해서 총 594 개의 기초 quantification cycle 값(raw Cq data)을 확보하였다. 각 cDNA 당 기술적 반복구(technical replication)들로부터 중간 값(median Cq)을 선발하여 생물학적 반복구별 대표 값을 갖도록 하였고, 이를 기반으로 유전자 발현 안정성 평가를 실시하였다. 분석 프로그램은 geNorm, NormFinder 및 BestKeeper 프로그램을 이용하여 각 개발자가 권고한 방법대로 분석을 실시하였다. 즉, geNorm 분석을 통해 stability value (M ; cutoff=1.5)를 각 유전자 별로 측정하고 후 pairwise 변이 분석(V ; cutoff=0.15)을 통해 유전자간 상호 안정성 순서를 평가하였고, 가장 낮은 M 값을 가진 유전자를 가장 유전자 발현 안정성이 높은 유전자로 선정하였다(Hellemans et al., 2007). NormFinder의 경우 PCR efficiency를 이용하여 Cq 값은 상대 양(relative quantity)로 전환 후 안정성 분석에 이용하였고(Andersen et al., 2004), 반면 BestKeeper의 경우 coefficient of determination 및 Cq 값의 기하평균(geometric mean)에 의한 P 값을 기반으로 안정성이 높은 유전자를 선발하였다(Pfaffl et al., 2004). 유전자 발현 안정성 평가는 배 발생 그룹(embryonic subset), 자어 발달 그룹(larval subset)을 구분하여 평가한 후 이들 두 그룹을 모두 통합한 자료와 비교하였다.

결 과

qPCR의 Cq 데이터 패턴

최종 선정한 후보 유전자들의 증폭 조건에서 PCR 효율은 94.1-102.4%로 나타나 발현정량 분석을 위한 적절한 PCR 효율 조건이 충족되었음을 알 수 있었고(Schmittgen and Livak, 2008; Doak and Zair, 2012), 역시 melting curve 분석 및 단일 밴드 형성을 확인함으로써 유전자 특이적인 증폭 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었다(data not shown). 러시아 철갑상어 배 발생 그룹(embryonic subset)을 대상으로 8개 후보 유전자의 Cq 값 양상을 조사한 결과, ACTB가 20.01의 평균(mean) Cq 값을 나타내어(중앙 값=20.34), 함께 조사한 다른 7개 유전자들 보다 가장 높은 발현을 나타내었고 반면 EF1A가 39.7의 평균 Cq 값(중앙 값=39.35)을 보여 가장 낮은 발현 수준을 나타내었다. 그 외 유전자들의 경우 H2A 및 RPL7이 나머지 4개 유전자(GAPDH, RPL5, SDHA 및 UBE2A)보다 상대적으로 높은 발현 양상을 나타내었다. 발생 배 시료 그룹 내에서 Cq 값의 편차를 분석한 결과, H2A가 가장 작은 폭의 편차를 나타내어 상대적으로 가장 균일한 Cq 값들의 분포를 나타내었고, 이어서 UBE2 및 SDHA가 그 뒤를 이어 적은 편차를 보였다. 반면 EF1A가 가장 큰 폭의 그룹 내 Cq 값의 편차를 보였다(Fig. 1).

부화 후 자어 발달 그룹(larval subset)에서 유전자들 간 Cq 양상은 배 발생 그룹에서의 관찰 결과와 유사하였으나, 전반적으

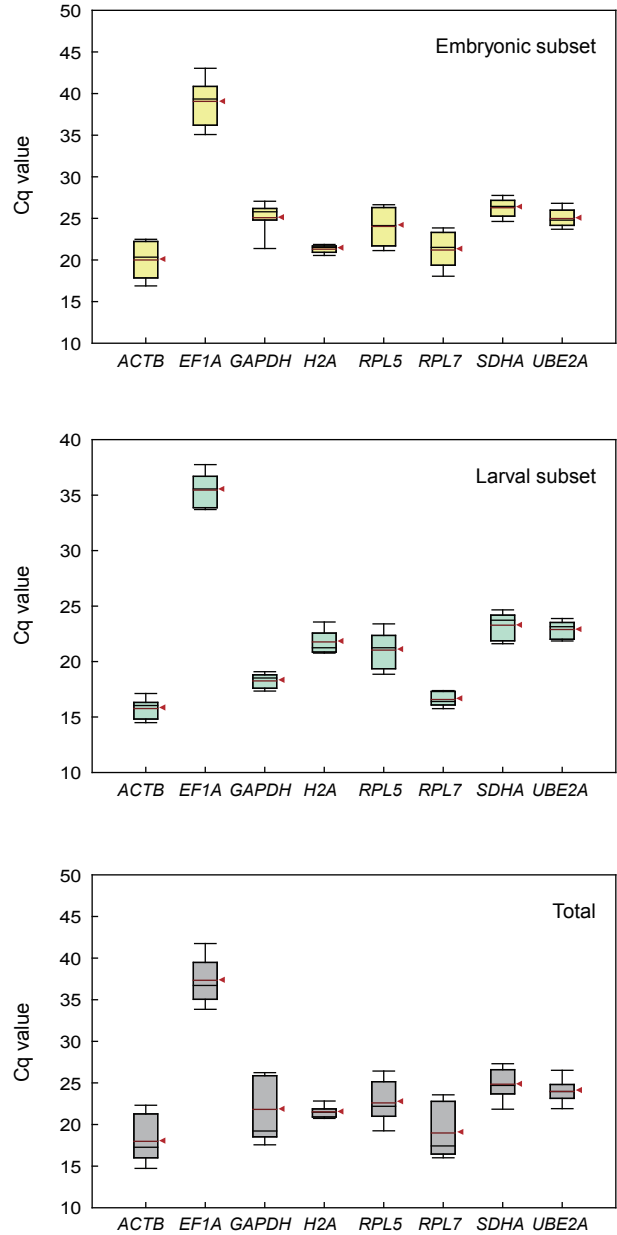


Fig. 1. Expression profiles (Cq values) of eight housekeeping gene candidates in embryonic and larval subsets, and also in combined set. In the box plot, the lower and upper boundaries of each box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. Whiskers above and below the box are the 90th and 10th percentiles, respectively. A black line within the box indicates the median value. The red line indicated by arrow head within the box is the mean value. ACTB, beta-cytoskeletal actin; EF1A, elongation factor-1 alpha; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H2A, histone 2A; RPL5, ribosomal protein L5; RPL7, ribosomal protein L7SDHA, succinate dehydrogenase; SDHA, succinate dehydrogenase; UBE2A, Ubiquitin conjugating enzyme E2.

로 유전자들의 발현 수준이 증가하는(Cq 값이 감소) 경향을 나타내었다. 이와 같은 Cq 값의 감소(평균 Cq 값 기준 시) 경향은 GAPDH, RPL7 그리고 ACTB에서 상대적으로 나머지 다른 유전자들에 비해서 보다 두드러진 경향을 나타내었고, H2A의 경우 배 발생 그룹과 자어 발달 그룹 간 Cq 평균값에 대한 차이가 거의 관찰되지 않았다. 따라서 자어 발달 그룹에서는 ACTB (중앙 값=16.03) 및 RPL7 (중앙 값=16.40)이 가장 높은 발현을 나타내었고, 뒤이어 GAPDH (중앙 값=18.51)가 높은 발현을 나타내었으며 반면 EF1A (중앙 값=35.56)가 가장 낮은 발현을 보였다. 유전자 별 Cq 값의 편차에 있어서 앞서 배 발생 그룹에서의 결과와 차이를 나타내는 유전자들이 관찰되었는데, ACTB, EF1A, GAPDH 및 RPL7의 경우 배 발생 그룹에서보다 발현의 편차가 유의적으로 감소하였으며, 반대로 H2A의 경우 자어 그룹에서 발현 수준의 편차 폭이 소폭 증가하였다(Fig. 1).

상기 두 부분집합(subsets) 그룹들의 Cq 값을 모두 대상으로 통합하여 그 양상을 분석한 결과, 조사한 8개 유전자들 중 ACTB와 RPL7이 러시아 철갑상어 배 발생 및 자어 발달 단계에서 가장 높은 발현을, EF1A가 가장 낮은 발현을 나타내었다. 두 기간을 모두 대상으로 할 경우 발생하는 발현 편차 폭의 경우, GAPDH가 가장 큰 폭의 Cq 값의 표준 편차를 나타내었고 이어서 RPL7, EF1A, ACTB, RPL5 순으로 높은 편차를 나타내었으며, H2A가 가장 낮은 표준 편차를 보였다(Fig. 1).

발생 배에서의 유전자 발현 안정성 평가

배 발생 부분집합에서 3개의 분석 프로그램으로 유전자 발현 안정성을 평가한 결과, 3 종류 프로그램들은 각기 다른 유전자들을 가장 안정적인 참조 유전자로 선정함에 따라 분석 프로그램의 알고리즘에 따른 선정 차이를 나타내었다. geNorm의 경우 SDHA와 UBE2A를 가장 안정적인 쌍으로 선정할 반면, ACTB와 RPL7을 가장 불안정한 후보 유전자들로 선정하였다. NormFinder의 경우 GAPDH와 RPL5를 안정도 순위 1 및 2 순위로 선정하였고 geNorm과 마찬가지로 ACTB와 RPL7을 가장 낮은 순위인 8 및 7 순위로 각각 나타내었다. 한편 BestKeeper를 이용한 분석에서는 H2A와 UBE2A가 발현 안정성에서 가장 우수한 점수를 받았고, 반면 RPL7과 EF1A가 가장 낮은 점수를 받은 것을 나타냈다. 이에 이들 3 종류 프로그램에서 얻어진 유전자 별 순위를 기하평균으로 환산할 경우, UBE2A (geomean of ranking value; GRV 2.00)와 H2A (GRV=2.29)가 러시아 철갑상어 발생 배 시료에서 가장 높은 순위의 참조 가능 유전자들로 나타났으며, 반대로 ACTB (GRV=6.84)와 RPL7 (GRV=7.00)이 특히 낮은 순위의 유전자들로 선정되었다. GRV를 기준 시 조사한 8개 유전자의 순위는 UBE2>H2A>SDHA>GAPDH>RPL5>EF1A>ACTB>RPL7 순으로 나타났다(Fig. 2).

자어 발달 과정에서의 유전자 발현 안정성 평가

부화 후부터 11일째까지의 부분집합 그룹을 대상으로 한 안

정성 분석에서도 마찬가지로 서로 다른 분석 프로그램들은 각기 다른 유전자들을 최고 안정적인 유전자들로 나타내었는데, geNorm 및 NormFinder 프로그램의 경우, 앞서 배 발생 부분집합 그룹에서와 동일하거나 거의 유사한 유전자 순위를 나타낸 반면, BestKeeper의 경우 배 발생과는 유의적인 차이를 나타내었다. geNorm 분석의 경우 배 발생에서와 마찬가지로 SDHA 및 UBE2A가 가장 낮은 M 값(가장 높은 안정성)을 갖는 것으로 나타났고 반면 RPL7 및 ACTB가 가장 불안정한 발현을 보이는 유전자들로 평가되었다. geNorm에서의 발현 안정성의 순위는 SDHA/UBE2A>EF1A>H2A>RPL5>GAPDH>RPL7>ACTB로 나타났다. 한편 자어 부분집합 그룹에서 NormFinder 분석에 의한 발현 안정성 순위는 RPL5>GAPDH>H2A>SDHA>UBE2>EF1A>RPL7>ACTB로 나타나 배 발생 부분집합 그룹과 비교 시, 1순위와 2순위, 그리고 4순위와 5순위 간 순위 바뀜이 있었으나 높은 안정성을 보이는 유전자들과 낮은 안정성을 보이는 유전자들의 순위 경향에는 차이가 없이 유사하였다. 반면 BestKeeper의 경우 자어 발달 부분집합에서 가장 안정적인 유전자들로 RPL7과 GAPDH를 선정하였는데, 이들 두 유전자는 배 발생 부분집합에서 각각 7순위와 4순위에 해당하는 유전자들로서 두 부분집합들 간 유전자 발현 패턴에 차이가 있음을 보여주었다. 배 발생 부분집합에서 가장 높은 순위를 부여 받았던 H2A의 유전자의 경우 자어 발달 부분집합에서는 5순위로 평가되었다. BestKeeper에 의한 발현 안정성 순위는 RPL7>GAPDH>UBE2A>ACTB>H2A>SDHA>EF1A>RPL5로 나타났다. 자어 발달 부분집합에서의 GRV를 기준으로 순위에 대한 기하평균값을 계산하면 UBE2A (GRV=2.47)>GAPDH>SDHA>RPL5>RPL7>H2A>EF1A>ACTB (GRV=6.35) 순으로 발현 안정성 순위를 나타내었다(Fig. 3).

전체 시료(발생 배 및 자어 발달)에서의 유전자 발현 안정성 평가

수정부터 부화 11일째 자어까지의 전 구간을 대상으로 참조 유전자의 유효한 선정이 가능한지를 조사하기 위해서 앞서 발생 배 및 자어 발달 부분집합 그룹들을 통합하여 유전자 발현 안정성 평가를 실시하였다. geNorm 분석 결과, 두 부분집합에서의 결과와 동일하게 SDHA/UBE2A를 가장 안정적인 유전자로, 반면 ACTB와 RPL7을 가장 불안정한 유전자로 선정하였다(SDHA/UBE2A>EF1A>H2A>RPL5>GAPDH>RPL7>ACTB). NormFinder의 경우 두 부분집합에서 일관되게 발현 안정성이 우수한 유전자들로 평가되었던 GAPDH와 RPL5를 전체 그룹에서도 가장 안정적인 유전자로 선정하였으며, geNorm과 마찬가지로 RPL7 및 ACTB를 참조 유전자 후보로서 가장 불합리한 유전자들로 평가하였다(GAPDH>RPL5>SDHA>UBE2A>H2A>EF1A>RPL7>ACTB). 한편 BestKeeper의 경우 배 발생 부분집합에서 가장 우수한 평가를 받았던 H2A와 두 부분집합에서 각각 2순위 및 3순위로 평가되었던 UBE2A가 전체

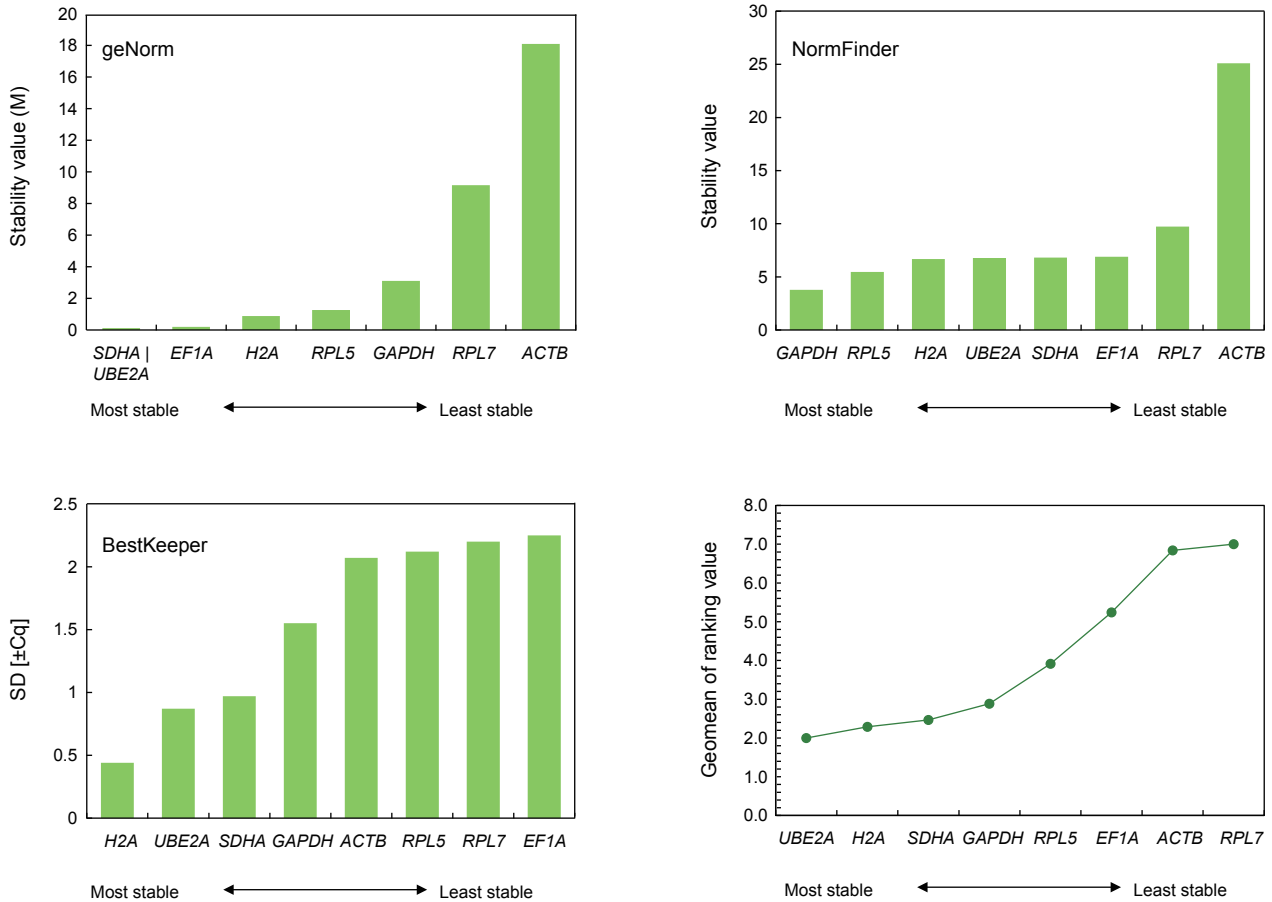


Fig. 2. Expression stability rankings of eight housekeeping genes in embryonic subset as addressed by geNorm, NormFinder and BestKeeper programs. The overall ranking of each gene based on the geomean of ranking values from the three software programs are also provided. ACTB, beta-cytoskeletal actin; EF1A, elongation factor-1 alpha; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H2A, histone 2A; RPL5, ribosomal protein L5; RPL7, ribosomal protein L7SDHA, succinate dehydrogenase; SDHA, succinate dehydrogenase; UBE2A, Ubiquitin conjugating enzyme E2.

그룹을 대상으로 할 경우 가장 안정적인 발현 보이는 후보 유전자로 선정되었다(H2A>UBE2A>SDHA>RPL5>ACTB>EF1A>RPL7>GAPDH). 전체 시료들을 대상으로 한 GRV 평가에서는 UBE2A (GRV=2.00)>SDHA (2.08)>H2A (2.71)>RPL5 (3.42)>GAPDH (3.63)>EF1A (4.76)>ACTB (6.84)>RPL7 (7.00) 순으로 발현 안정성이 높게 측정되어 UBE2A와 SDHA가 유사한 정도의 순위 기하평균 값을 나타내었으며, ACTB와 RPL7이 유의적으로 낮은 발현 안정성 순위를 보였다(Fig. 4).

고찰

본 평가에서 사용한 8종의 유전자들은 세포 골격(ACTB), 번역(EF1A), 당 분해에 의한 에너지 생성(GAPDH), 염색사(chromatin) 구조(H2A), 리보솜 합성(RPL5 및 RPL7), 구연산

회로(SDHA), 그리고 단백질 분해 대사(UBE2A)에 각기 주요 기능을 담당하는 유전자들로서 러시아 철갑상어의 발생 및 자어 발달에서 유전자 별로 다양한 발현 수준에 해당하는 다양한 Cq 값 구간을 보였으며, 이는 이들 해당 유전자들의 세포 내 기본 기능의 차이와 연관이 있는 것으로 판단된다. 유전자 별 Cq 구간 조사에서 전체적으로 배 발생 과정에 비해 부화 후 자어 발달에서 여러 유전자들의 발현 수준이 증가하는 것(Cq의 감소)이 관찰되었다. 특히 GAPDH, RPL7 및 EF1A와 같이 에너지 생성 및 단백질 합성에 관여 하는 유전자들의 경우 그 발현 양 증가가 더 두드러졌으며, 이는 철갑상어 자어가 부화 직후 갖는 왕성한 활동성과 자어의 빠른 성장과 연관이 있다고 판단된다(Dettlaff et al., 1993; Park et al., 2013b). 세포 골격 및 세포 이동성에 중요한 역할을 담당하는 ACTB 역시 부화 직후 자어의 기관 분화(organ differentiation)와 형태 발달(larval

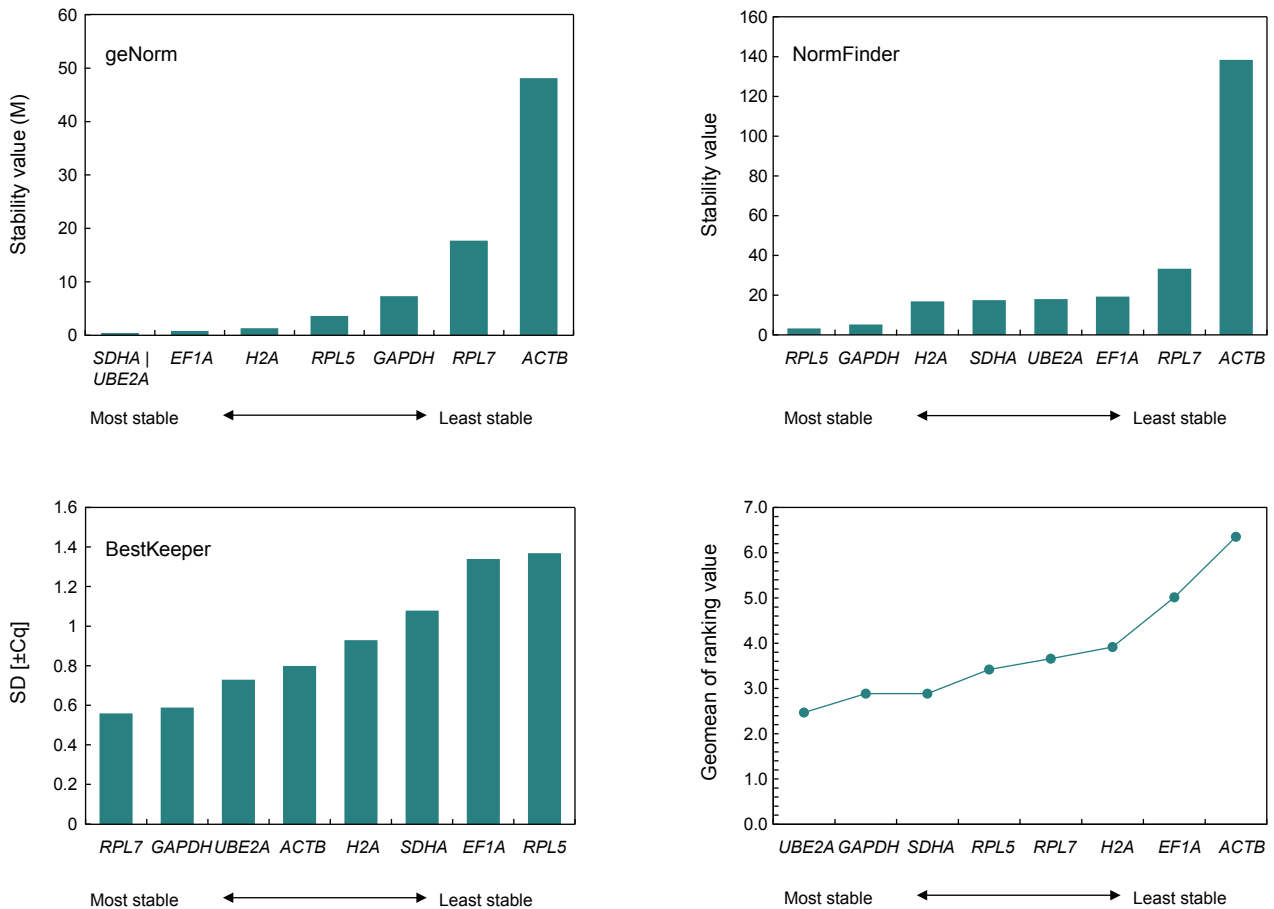


Fig. 3. Expression stability rankings of eight housekeeping genes in larval subset as addressed by geNorm, NormFinder and BestKeeper programs. The overall ranking of each gene based on the geomean of ranking values from the three software programs are also provided. ACTB, beta-cytoskeletal actin; EF1A, elongation factor-1 alpha; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H2A, histone 2A; RPL5, ribosomal protein L5; RPL7, ribosomal protein L7SDHA, succinate dehydrogenase; SDHA, succinate dehydrogenase; UBE2A, Ubiquitin conjugating enzyme E2.

morphogenesis)에 ACTB의 역할이 증가하였음을 시사하고 있다(Reece et al., 1992; Reisler and Egelman 2007). 반면, 염색사의 구성 성분인 H2A는 발생 배와 부화 자어 단계에서 Cq 값에 큰 변동이 없어, 해당 유전자의 특징을 잘 반영하고 있었다. 그러나 H2A 경우, oligo-dT 프라이머와 random 프라이머 모두에 의한 역전사 산물이 함께 형성되는 다른 7개 유전자들과 달리 random priming에 의한 cDNA 주형을 주로 제공하므로, 역전사 방법의 차이에 따른 잠재적인 Cq 값의 변동 폭에 관한 추가 분석이 필요할 수 있다(López and Samuelsson, 2008).

발생 배 부분집합에서의 안정성 평가 결과를 종합할 때 UBE2A와 H2A가 상대적으로 높은 순위로 선정된 반면 ACTB와 RPL7이 가장 낮은 발현 안정성을 보이는 유전자들로 선정되었는데, 이 역시 발생 단계에서의 유전자 별 차등적인 역할과 연관이 있으며 앞서의 Cq profile 결과와 서로 일치하는 경향을

보여주었다. 단백질 분해 및 염색사 구조를 각각 주기능으로 담당하는 UBE2A와 H2A는 수정부터 첫 부화까지 비교적 일정한 발현 수준을 유지였지만 이와는 달리 ACTB와 RPL7은 부화 후반부에 발현 양이 크게 증가하는 경향을 나타냄으로써 발현 안정성 측면에서 높은 점수를 받지 못하였다. 발생 단계별로 Cq 값을 발현 양 값으로 환산할 경우 ACTB와 RPL7 두 유전자 모두 발생 초기에는 일정한 발현 수준을 유지하였지만 신경배 형성 시작(onset of neurulation) 시점부터 급속도로 유전자 발현이 증가하기 시작하여(직전 발생 단계 대비 8배 증가), 부화 시점에서는 초기 난할 구간에서 관찰되는 발현 양의 70-90 배에 달하는 발현 증가를 보였다. 두 유전자의 발현이 급속도로 증가하는 시점은 배아체(embryonic body)의 형성 시작과 함께 본격적인 체적의 증가와 전신(pronephros), 두부(head), 체절(somite) 및 심장(S-heart) 등 다양한 기관의 발달과 분화가 일

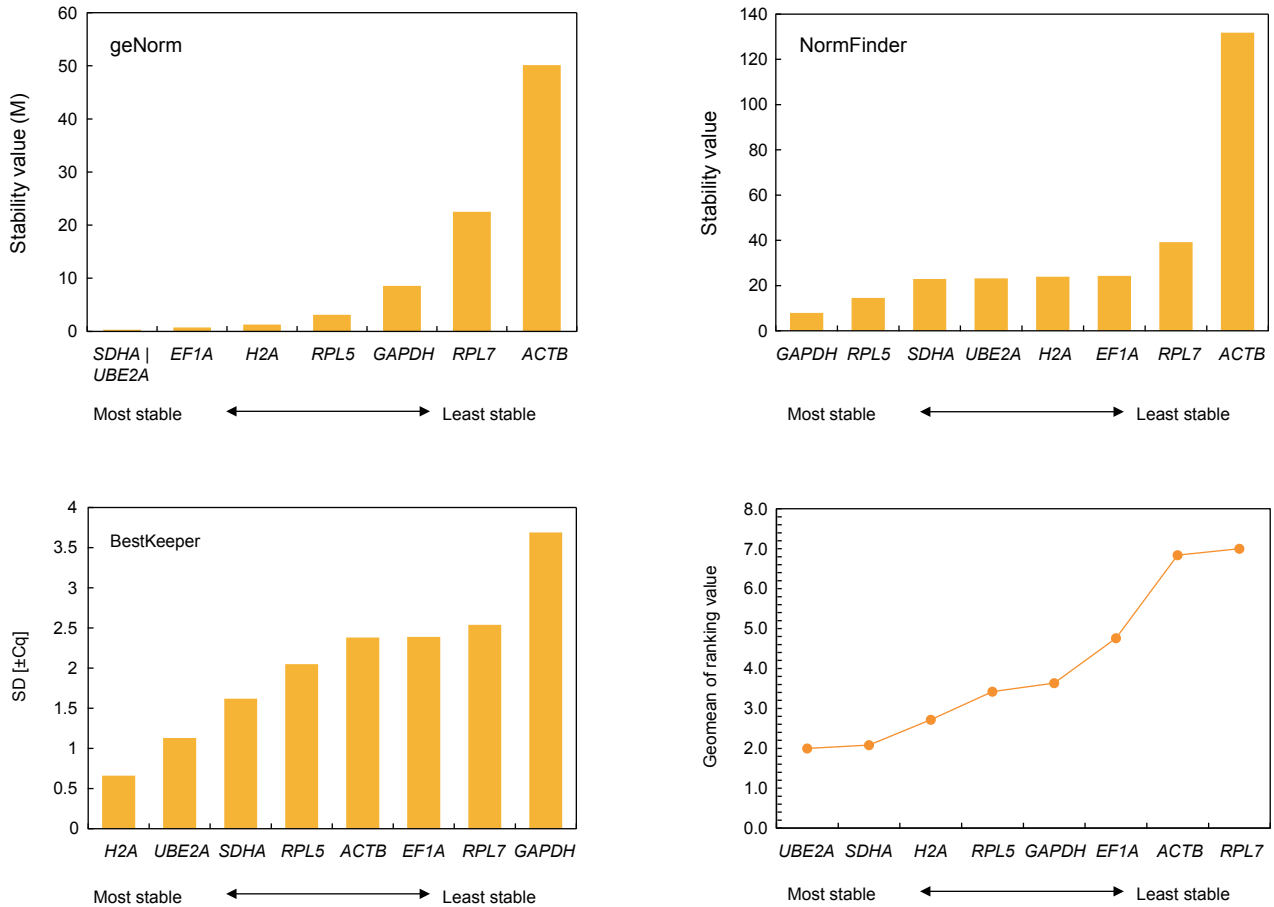


Fig. 4. Expression stability rankings of eight housekeeping genes in the combined dataset including both embryonic and larval subsets. Stability ranking of each gene in geNorm, NormFinder and BestKeeper programs were used to calculate geomean of ranking values. ACTB, beta-cytoskeletal actin; EF1A, elongation factor-1 alpha; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H2A, histone 2A; RPL5, ribosomal protein L5; RPL7, ribosomal protein L7SDHA, succinate dehydrogenase; SDHA, succinate dehydrogenase; UBE2A, Ubiquitin conjugating enzyme E2.

어는 구간으로서(Dettlaff et al., 1993; Park et al., 2013a), 이 구간에서는 세포의 형태 분화, 세포 골격 형성 및 다양한 종류의 단백질 합성을 필요로 하게 되고, ACTB와 RPL7의 요구가 증가되었음을 시사하고 있다. 상기 두 유전자뿐만 아니라 EF1A, RPL5, GAPDH 역시 상대적으로 낮은 안정성 순위에 해당되었는데, 이들 유전자들 역시 발생 초기에 비해 발생 후반부에서 유전자 발현이 증가하는 경향을 나타냄으로써 ACTB와 RPL7과 함께 단백질 합성 및 에너지 생성에 관여하는 유전자들이 배아 체 발달에 밀접하게 관련함을 잘 보여주고 있다. 따라서 본 연구 결과, 러시아 철갑상어 배 발생 구간(수정부터 부화까지)을 대상으로 한 RT-qPCR 분석 시 단백질 합성, 세포 분화, 당 분해 (glycolysis)에 밀접히 관련되지 않은 유전자들을 참조 유전자로 선정하여 이용하는 것이 바람직하고 그 예로서 본 논문에서는 UBE2A 또는 H2A를 제시하고 있다.

자어 발달 부분집합을 대상으로 한 안정성 평가를 GRV로 종합한 결과, 앞서 배 발생 구간에서와 마찬가지로 UBE2A가 가장 발현 안정성이 높은 유전자로 평가되어 자어 발달 단계에서도 참조 유전자로서 활용 가능성이 인정되었다. 자어 발달구간에서는 UBE2A에 이어 GAPDH와 SDHA가 두 번째로 높은 발현 안정성 순위(GRV=2.88로 동일)로 나타났는데, 부화시기에 급증한 발현 수준이 이후 자어 발달 과정 중에 안정적으로 지속되는 경향을 보임으로써, 부화 후 자어의 변태, 유영능력 증가 및 난황 흡수에 따른 기관 발달에 지속적인 에너지 생성의 필요성을 잘 반영하고 있다(Park et al., 2013b). 반면 RPL5, RPL7 및 H2A는 유사한 GRV 값(3.42-3.91)을 나타내어 유사한 수준의 발현 안정성을 나타내었는데, RPL5와 RPL7의 경우 분석한 프로그램에 따라 안정성 순위가 크게 차이 나는 경향을 보여, GRV에 의한 안정성 순위 자체에 큰 의미를 부여하기가

힘들었다. 한편 H2A가 배 발생 부분집합에서만 높은 순위를 받지 못한 이유는 자어 발달 부분집합에서 평균 Cq 값은 배 발생 단계와 큰 차이 없음에도 불구하고 자어 발달 구간에서는 발달 단계별 발현 편차가 상대적으로 증가하였기 때문으로 판단되며, 그 원인에 대해서는 추가적인 검증과 분석이 필요한 상태이다. 한편 배 발생 부분집합에서와 마찬가지로 ACTB가 가장 낮은 발현 안정성을 보였으며 뒤이어 EF1A가 ACTB 다음으로 낮은 안정성 순위를 보였다. 이들 두 유전자의 경우 자어의 발달 과정 중 발현 변화의 폭이 상대적으로 다른 유전자들에 비해 큰 편이었는데 이들 두 유전자들은 공통적으로 4 DPH에서 5 DPH로 진행될 때 급격한 유전자 발현 양 감소를 보이며 발현 양의 최저치가 8-9 DPH에서 나타나고 이후 다시 발현 수준이 점진적으로 증가하는 경향을 보였다. 자어의 형태 발달만을 고려할 때, 본 연구에서 사용한 자어 사육 온도에서 4-5 DPH는 러시아 철갑상어 자어의 활발한 초기 형태 분화가 거의 완성되는 시점이며, 8-9 DPH는 난황 흡수와 함께 pigment plug 배출이 일어나는(즉, 외부 먹이 섭취 체제로 전환) 시점이다(Dettlaff et al., 1993). 따라서 이들 유전자 발현의 변동과 해당 발달 시기의 발달 특징에 대한 정확한 상관관계 및 원인에 대한 추후 연구가 필요할 것이다.

상기 배 발생 부분집합과 자어 발달 부분집합의 Cq 자료를 모두 통합하여 유전자 발현 안정성 평가를 실시한 결과, 배 발생 및 자어 발달 부분집합 모두에서 가장 발현 안정성이 높은 유전자로 선정되었던 UBE2A가 역시 통합 집합에서도 가장 우수한 참조 유전자 후보로 평가되었다(geNorm에서 1순위, NormFinder에서 4 순위 그리고 BestKeeper에서 2 순위). 본 연구를 통해 참조 유전자 후보로 추천 가능한 UBE2A의 경우 전통적으로 널리 사용된 바 있는 유전자는 아니지만 Arctic charr *Salvelinus alpinus*의 발생·발달 시료(Ahi et al., 2013) 및 Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*의 초반 배 발생(zygotic transcription이 활성화되기 이전의 배) 시료(Øvergård et al., 2010)에서 발현 안정성이 높은 후보 유전자로 평가된 바 있어, 본 연구 결과와 유사점이 있었다. UBE2A와 아울러 두 부분집합들에서 모두 상위의 순위를 나타내었던 SDHA 역시 통합 그룹에서도 geNorm 1순위, NormFinder 3순위, 그리고 BestKeeper 3순위를 나타내어 UBE2A에 이어 추천 가능한 참조 유전자 후보로 평가되었다. 통합 그룹의 GRV 평가에서 3순위에 해당하는 유전자는 H2A였으며, H2A는 특히 BestKeeper에서 가장 높은 평가를 받았다. SDHA 및 H2A는 그동안 어류에서는 자주 논의된 적이 없는 참조 유전자 후보들로서 본 연구를 통해 새로이 소개된 유전자들로서, 앞으로 어류 발생 관련 참조 유전자 발굴 시 그 선정 후보 대상으로 포함될 수 있을 것으로 판단된다. 어류에서는 아직 활발히 사용된 바 없지만 이들 두 유전자들은 포유류, 곤충, 식물 또는 배양세포 등에서 발현 안정성이 높은 유전자로 평가된 바 있다(Souza et al., 2013; Luchsinger et al., 2014; Yan et al., 2014; Omondi et al., 2015;

Steinhauser et al., 2017).

반면 앞서의 부분집합 별 평가에서와 마찬가지로 통합 집합에서도 하위 순위에 해당하는 유전자들은 단백질 합성, 세포 골격 및 당 분해에 의한 에너지 대사와 보다 밀접하게 관계된 유전자들로서(RPL5/7, EF1A, GAPDH, ACTB), GAPDH의 경우 자어 발달에서는 높은 안정성을 나타내었지만, 배 발생 구간과 부화 후 자어 발달 구간 사이에 큰 폭의 발현 수준 차이가 있기 때문에 높은 순위를 받지 못한 것으로 판단된다. 따라서 본 연구 결과를 종합할 때, 러시아 철갑상어의 배 발생 및 자어 발달 구간을 대상으로 한 RT-qPCR 분석의 경우 종래 참조 유전자들로서 여타 어류들에서 널리 사용된 바 있는 ACTB, GAPDH 및 RPL 유전자들이 적합하지 않음을 시사하고 있다. 이들 유전자들의 경우 발생·발달의 전 구간을 대상으로 한 정량 발현 분석에 참조 유전자로 사용하는 것은 부적절하며, 사용해야 한다면 안정적 발현을 보이는 특정 발생·발달 구간에 국한된 시료들 간의 비교에만 사용할 수 있을 것으로 판단된다. ACTB의 발현 안정성에 관한 평가는 어종 간 차이는 물론, 동일 어종 내에서도 조사 시점 및 환경에 따라 서로 유의적인 차이를 나타낼 수 있음이 보고된 바 있다. 러시아 철갑상어를 대상으로 한 본 연구의 결과와는 달리, Arctic charr *S. alpinus* (Ahi et al., 2013) 및 Atlantic halibut *H. hippoglossus* (Fernandes et al., 2008)의 발생 및 자어 시료를 대상으로 한 분석에서 ACTB는 우수한 발현 안정성을 보이는 후보 참조 유전자로 평가된 바 있지만, European seabass *Dicentrarchus labrax*의 발생 배 및 자어(Mitter et al., 2009), Senegalese sole *Solea senegalensis*의 자어(Infante et al., 2008), 그리고 Atlantic halibut 발생 배 및 자어를 이용한 다른 실험(Infante et al., 2008)에서는 ACTB를 발현 안정성 순위가 낮은 불안정한 유전자로 선정한 바 있어 본 연구의 결과와 유사하였다. 그러나 GAPDH의 경우 수산동물의 발생·발달 단계의 시료를 대상으로 한 많은 RT-qPCR 연구들에서 본 연구와 유사하게 발현 안정성이 매우 낮은 유전자 중 하나로 평가된 바 있어, GAPDH를 발생 시료의 유전자 발현 정량 실험을 위한 참조 유전자로 사용하는 데에는 신중한 사전 평가가 필요할 것이다(Fernandes et al., 2008; Infante et al., 2008; Mitter et al., 2009; García-Fernández et al., 2016). 다만, 어류를 위시한 수산생물들은 2 종류의 GAPDH paralogs 모두를 다양한 조직과 발생 단계에서 발현하지만 두 isoform들 간 담당 기능의 분화가 보고된 바 있으므로(Cho et al., 2008; Kim and Nam, 2008; Lee et al., 2013), 유전자 발현 평가 시 사용한 GAPDH isoform에 따라 그 발현 안정성 정도가 차이가 있을 수 있으며, GAPDH를 참조 유전자로 사용하기 위해서는 paralog isoform 역시 고려되어야 할 필요성이 있다(Infante et al., 2008). 한편 RPL5 및 RPL7 유전자 등 리보솜을 구성하는 단백질을 암호화하는 유전자들의 경우 어류를 위시한 수산동물의 다양한 성체 조직들에서 발현 안정성이 우수한 참조 유전자들로 종종 보고된 바 있으나(Zhang and Hu, 2007; López-Landavery et al. 2014; Lee and Nam,

2016), 발생 시료들에서는 성체 조직에서와 유사한 결과들을 보고한 사례들이 그리 많지 않은 편이다. Atlantic halibut의 부화 자어의 발달 단계 시료를 대상으로 한 평가에서 ribosomal protein S4 (RPS4), ribosomal protein L13 (RPL13), 그리고 RPL7이 발현 안정성이 높은 유전자로 선정된 바 있으나, RPL7의 경우 부화 이전 단계인 배 발생 단계에서는 발현 안정성이 높지 않은 유전자임 역시 보고된 바 있다(Øvergård et al., 2010). 본 연구에서도, 특히 RPL7의 경우, 배 발생이 진행되면서 발현 양이 점차 증가하여 부화 시점 및 부화 직후 초기에 발현이 급증하는 등 배 발생 및 자어 발달 구간에서 큰 폭의 발현 변동을 보임으로써, 우수한 발현 안정성을 보이는 참조 유전자 후보 군에 속하지 못하였다.

따라서 본 연구 결과, 러시아 철갑상어의 배 발생 및 자어 발달에 해당하는 시료를 RT-qPCR로 분석할 때 종래 고전적으로 사용되고 있는 ACTB, GAPDH 및 RPL 유전자들은 적절치 않으며, UBE2A 및 SDHA를 참조 유전자로 이용하는 것이 정확한 발현 정량화 및 규격화에 더 적절한 것으로 판단된다. 단 배 발생 단계와 자어 단계를 구분하거나 별도로 분석을 할 경우에는 H2A (배 발생) 및 GAPDH (자어 발달)도 사용 가능할 수 있을 것이다. 본 연구에서 얻어진 자료는 향후 러시아 철갑상어의 배 발생 및 자어 발달에 관여하는 연구 대상 유전자들의 발생·발달 과정 중 발현 증감을 효과적으로 객관화하는데 유용한 정보로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 연구는 부경대학교 자율창의학술연구비(2016)의 지원에 의해서 수행되었습니다. 아울러 철갑상어 산란 및 시료 확보에 도움을 주신 디노빌영어조합법인에 감사 드립니다.

References

- Ahi EP, Guðbrandsson J, Kapralova KH, Franzdóttir SR, Snorason SS, Maier VH and Jónsson ZO. 2013. Validation of reference genes for expression studies during craniofacial development in Arctic charr. *PLoS One* 8, e66389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066389>.
- Andersen CL, Jensen JL and Ørntoft TF. 2004. 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. *Cancer Res* 64, 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- Birstein VJ, Hanner R and DeSalle R. 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *Environ Biol Fishes* 48, 127-155. <https://doi.org/10.1023/A:1007366100353>.
- Bolker JA. 1993. The mechanism of gastrulation in the white sturgeon. *J Exp Zool* 266, 132-145. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660207>.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cho YS, Lee SY, Kim KH and Nam YK. 2008. Differential modulations of two glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNAs in response to bacterial and viral challenges in a marine teleost *Oplegnathus fasciatus* (Perciformes). *Fish Shellfish Immunol* 25, 472-476. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.007>.
- Cooper MS and Virta VC. 2007. Evolution of gastrulation in the rayfinned (Actinopterygian) fishes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308, 591-608. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21142>.
- Dettlaff TA, Ginsburg AS and Schmalhausen OI. 1993. Sturgeon Fishes- Developmental Biology and Aquaculture. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 49-196.
- Doak SH and Zair Z. 2012. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis. In: Genetic toxicology: principles and methods, methods in molecular biology. Parry JM and Parry EM, eds. Springer, New York, U.S.A., 251-270. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_13.
- Fernandes JMO, Mommens M, Hagen Ø, Babiak I and Solberg C. 2008. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp Biochem Physiol B* 150, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.003>.
- García-Fernández P, Castellanos-Martínez S, Iglesias J, Otero JJ and Gestal C. 2016. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR studies in *Octopus vulgaris* paralarvae during development and immune-stimulation. *J Invert Pathol* 138, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.003>.
- Gisbert E and Ruban GI. 2003. Ontogenic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: a synthesis between laboratory tests and field data. *Environ Biol Fishes* 67, 311-319. <https://doi.org/10.1023/A:1025851502232>.
- Gisbert E and Williot P. 1997. Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture* 156, 63-76. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00086-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00086-0).
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F and Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>.
- Infante C, Matsuoka MP, Asensio E, Cañavate JP, Reith M and Manchado M. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time

- PCR. *BMC Mol Biol* 9, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-28>.
- Jaramillo ML, Ammar D, Quispe RL, Guzman F, Margis R, Mazari EM and Müller YMR. 2017. Identification and evaluation of reference genes for expression studies by RT-qPCR during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*. *Gene* 598, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.001>.
- Kim KY and Nam YK. 2008. Evolutionary history of two paralogous glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes in teleosts. *J Fish Sci Tech* 11, 177-181. <http://dx.doi.org/10.5657/fas.2008.11.3.177>.
- Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013. Genomic organization, tissue distribution and developmental expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms in mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Fish Aquat Sci* 16, 291-301. <http://dx.doi.org/10.5657/FAS.2013.0291>.
- Lee SY and Nam YK. 2016. Evaluation of reference genes for RT-qPCR study in abalone *Haliotis discus hannai* during heavy metal overload stress. *Fish Aquat Sci* 19, 21. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0022-z>.
- López MD and Samuelsson T. 2008. Early evolution of histone mRNA 3' end processing. *Bioinformatics* 14, 1-10. <https://doi.org/10.1261/rna.782308>.
- Luchsinger C, Arias ME, Vargas T, Paredes M, Sánchez R and Felmer R. 2014. Stability of reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data in bovine blastocysts produced by IVF, ICSI and SCNT. *Zygote* 22, 505-512. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000099>.
- López-Landavery EA, Portillo-López A, Gallardo-Escárate C and Río-Portilla MAD. 2014. Selection of reference genes as internal controls for gene expression in tissues of red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca, Vetigastropoda; Swainson, 1822). *Gene* 549, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.002>.
- Mitter K, Kotoulas G, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre P, Figueras A, Novoa B and Sarropoulou E. 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol B* 153, 340-347. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.04.009>.
- Omondi BA, Latorre-Estivalis JM, Oliveira IHR, Ignell R and Lorenzo MG. 2015. Evaluation of reference genes for insect olfaction studies. *Parasit Vectors* 22, 243. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0862-x>.
- Øvergård AC, Nerland AH and Patel S. 2010. Evaluation of potential reference genes for real time RT-PCR studies in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.); during development, in tissues of healthy and NNV-injected fish, and in anterior kidney leucocytes. *BMC Mol Biol* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-36>.
- Park CH and Chapman FA. 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North Am J Aquacult* 67, 52-57. <https://doi.org/10.1577/FA03-068.1>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013a. Embryonic development of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* under hatchery conditions: an image guide with embryological descriptions. *Fish Aquat Sci* 16, 15-23. <https://dx.doi.org/10.5657/FAS.2013.0015>.
- Park CH, Lee SY, Kim DS and Nam YK. 2013b. Effects of incubation temperature on egg development, hatching and pigment plug evacuation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. *Fish Aquat Sci* 16, 25-34. <https://dx.doi.org/10.5657/FAS.2013.0025>.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best-Keeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>.
- Reece KS, McElroy D and Wu R. 1992. Function and evolution of actins. *Evol Biol* 26, 1-34. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3336-8_1.
- Reisler E and Egelman EH. 2007. Actin structure and function: what we still do not understand. *J Biol Chem* 282, 36133-36137. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700030200>.
- Schmittgen TD and Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Souza AFD, Brum IS, Neto BS, Berger M and Branchini G. 2013. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Mol Biol Rep* 40, 2955-2962. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2366-5>.
- Steinhauser CB, Wing TT, Gao H, Li X, Burghardt RC, Wu G, Bazer FW and Johnson GA. 2017. Identification of appropriate reference genes for qPCR analyses of placental expression of SLC7A3 and induction of SLC5A1 in porcine endometrium. *Placenta* 52, 1-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.003>.
- Taylor DA, Thompson EL, Nair SV and Raftos DA. 2013. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environ Pollut* 178, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.027>.
- Udvardi MK, Czechowski T and Scheible WR. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20, 1736-1737. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061143>.
- Yan X, Dong X, Zhang W, Yin H, Xiao H, Chen P and Ma XF. 2014. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Reaumuria soongorica*. *PLoS One* 12, e104124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104124>.
- Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR and Li J. 2014. Selection and evaluation of potential reference

genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse transcription quantitative PCR. PLoS One 9, e86503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086503>.

Zhang Z and Hu J. 2007. 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. Toxicol Sci 95, 356-368. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl161>.