

## 研究报告



## 黄芩苷铝胁迫下产肠毒素大肠杆菌内参基因的筛选

孟青艳 尹荣华 叶纯\* 邱银生

武汉轻工大学动物科学与营养工程学院 湖北 武汉 430023

**摘要:**【背景】产肠毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)是导致仔猪腹泻的主要致病菌之一,黄芩苷铝对 ETEC 诱导的仔猪腹泻具有良好的治疗效果,但作用机制尚不明。【目的】筛选出黄芩苷铝胁迫下 ETEC 中表达水平最为稳定的内参基因。【方法】采用 qPCR 技术测定了 12 个内参基因 16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA* 在不同浓度(250、500 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$ )黄芩苷铝胁迫下培养不同时间后(4.5 h 和 6 h)的表达水平,并采用比较  $C_t$  值法、geNorm、BestKeeper 和 NormFinder 软件 4 种方法对 12 个候选内参基因的表达稳定性进行评估。【结果】*rpoA* 表达丰度适中,并在多个分析方法中表达最稳定。【结论】确定了 *rpoA* 为 ETEC qPCR 的最佳内参基因,此研究为后续利用 qPCR 法研究黄芩苷铝胁迫 ETEC 后目的基因功能的表达奠定了基础。

**关键词:** 产肠毒素大肠杆菌,黄芩苷铝,内参基因,实时荧光定量 PCR

## Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in enterotoxigenic *Escherichia coli* exposed to baicalin-aluminum complexes

MENG Qingyan YIN Ronghua YE Chun\* QIU Yinsheng

School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China

**Abstract:** [Background] Diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the most frequent diseases in piglets. Baicalin-aluminum has a good therapeutic effect on ETEC-induced intestinal injury in piglets, but the mechanism of action remains to be clarified. [Objective] Screening out the most stable internal reference genes in ETEC under the stress of baicalin-aluminum is the basis for studying the effect of baicalin-aluminum on the expression of ETEC target genes. [Methods] In this study, 12 internal reference genes 16S rRNA, *mdh*, *recA*, *gapA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoA*, *rpoB*, *mdoG*, *dnaG*, *secA* and *fusA* were determined at different concentrations (250, 500 and 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) baicalin-aluminum using qPCR technology. The expression level after different culture time (4.5 h and 6 h) under baicalin-aluminum

**Foundation items:** Scientific Research Plan of Hubei Provincial Department of Education (Q20181805); National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501037); Natural Science Foundation of Hubei Province (2019CFB253)

\*Corresponding author: Tel: 86-27-83956175; E-mail: yechun0226@163.com

**Received:** 23-09-2020; **Accepted:** 22-10-2020; **Published online:** 25-02-2021

**基金项目:** 湖北省教育厅科研计划(Q20181805); 国家重点研发计划专项(2016YFD0501037); 湖北省自然科学基金(2019CFB253)

\*通信作者: Tel: 027-83956175; E-mail: yechun0226@163.com

**收稿日期:** 2020-09-23; **接受日期:** 2020-10-22; **网络首发日期:** 2021-02-25

stress. Four methods including comparative  $C_t$  value method, geNorm, BestKeeper and NormFinder software were used to evaluate the stability of the expression of 12 candidate internal reference genes. **[Results]** The results show that *rpoA* expression is moderately abundant and the most stable expression among multiple analysis methods. **[Conclusion]** It was determined that *rpoA* is the best internal reference gene for ETEC qPCR. This study laid the foundation for the subsequent use of qPCR to study the expression of target gene function after baicalin-aluminum stress ETEC.

**Keywords:** enterotoxigenic *Escherichia coli*, baicalin-aluminum complexes, reference genes, real-time quantitative PCR

产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是导致仔猪腹泻的主要致病菌之一,能引起仔猪剧烈水样腹泻和迅速脱水死亡<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期研究发现黄芩苷铝治疗细菌性仔猪腹泻疗效确切<sup>[3]</sup>,但机制尚不清楚,因此,进一步探究黄芩苷铝对 ETEC 的作用机制具有重要的理论意义与应用价值。

逆转录实时定量聚合酶链式反应(Real-Time Fluorescence Quantitative PCR, RT-qPCR),即荧光定量 PCR,是研究各种生物基因表达的重要方法,该方法具有重复性强、定量准确和反应快速等优点<sup>[4-5]</sup>。使用 qPCR 法进行基因表达的定量分析时须选择合适的内参基因作为参照来对其他基因进行定量分析<sup>[6-7]</sup>。

研究发现,内参基因的稳定性是相对的,不同组织、细胞或是在不同的实验条件下表达存在差异<sup>[8]</sup>。针对特定的实验条件,筛选出稳定表达的内参基因对于研究目标基因的定量表达及控制实验误差非常重要<sup>[9]</sup>。我们熟知的  $\beta$ -actin 和 GAPDH 基因常在真核生物中作为内参基因用于定量表达分析<sup>[10]</sup>,然而,在大肠杆菌中还未能找到广泛稳定表达的内参基因<sup>[11]</sup>。如猪  $\beta$  防御素 2 胁迫下大肠杆菌中表达最稳定的基因是 *recA*<sup>[12]</sup>;在热休克-酸应激条件下大肠杆菌 O26 中表达最稳定的基因是 *rrsA*<sup>[13]</sup>。因此本试验结合前期研究基础<sup>[14-16]</sup>,设计并合成了 12 个候选内参基因的特异性引物,利用 qPCR 技术,通过比较  $C_t$  值法、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 这 4 种方法分析比较了 ETEC 在不同浓度黄芩苷铝(250、500

和 1 000  $\mu\text{g/mL}$ )胁迫下,培养不同时间(4.5 h 和 6 h)后各候选内参基因的稳定性情况,并筛选最稳定的内参基因,以期研究黄芩苷铝胁迫下 ETEC 相关目的基因的表达及探讨黄芩苷铝胁迫 ETEC 的作用机制提供重要依据。

## 1 材料与方法

DYCZ-24DN 型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;NanoDrop2000 超微量分光光度计,Thermo 公司;天能 GIS 凝胶图像处理系统,上海天能科技有限公司;T-100 PCR 仪,Bio-Rad 公司;7500 Real Time PCR System 荧光定量 PCR 仪,Applied Biosystems 公司。

K88 野生菌株和 C83715 标准株由华中农业大学惠赠。

黄芩苷铝由武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室合成。

LB 营养琼脂和 LB 营养肉汤,北京索莱宝生物科技有限公司;PBS 培养液,上海 Double-Helix 公司;RNAiso Plus、PrimeScript RT Reagent Kit 和 SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa 公司。

### 1.1 细菌培养及黄芩苷铝处理

从  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出冻存的产肠毒素大肠杆菌 K88 野生菌株和 C83715 标准株菌种于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  解冻 4 h 复苏,涂布法计数后将平板中的单菌落接种于 10 mL LB 营养肉汤中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times$ g 振荡培养过夜,取出 1 mL 菌液稀释 200 倍后再孵育 4 h。以吸光度  $OD_{600}$  为 0.5 为准,测定调整菌液浓度,使其达到  $10^8$  CFU/mL,然后再将菌液浓度调整至  $10^6$  CFU/mL。

配制不同浓度的黄芩苷铝配合物培养液(0、500、1 000、2 000 μg/mL)与大肠杆菌菌液混合均匀,得到空白对照组以及 250、500、1 000 μg/mL 黄芩苷铝处理组,于 37 °C、180 r/min 条件下分别培养 4.5 h 和 6 h,再取适量菌液于 12 000×g 下离心 5 min,弃去上清液,并取菌体沉淀进行 RNA 提取。每个药物胁迫处理组均设置 3 个生物学重复。

1.2 内参基因选择与引物设计

参考相关报道<sup>[12-15]</sup>,本研究选取 12 个基因进行筛选。其中 16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*rpoB* 是常用的细菌看家基因,而 *gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA* 经过大肠杆菌转录组基因的衡量表达量(Reads Per Kilobase per Million

Mapped Reads, RPKM)值筛选而来。利用 RPKM 值计算变异系数(Coefficient of Variation, CV)和最大折叠倍数(Maximum Fold Changes, MFC),从中筛选出同时满足 CV<4%和 MFC<2 的基因<sup>[17]</sup>。依据 NCBI 中大肠杆菌 K-12 菌株基因组中相应基因序列,利用 Primer 6.0 软件设计引物,由武汉擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

菌液用 PBS 重悬洗涤 2-3 遍后 3 500×g 离心 5 min 获得细菌沉淀后,用 RNAiso Plus 提取总 RNA。1.5 μg 的 RNA (1.5/c, c 为 RNA 的测定浓度,一般为 600 μg/μL)与 7.5 μL Mix 1 (gDNA Eraser 1.5 μL, 5×gDNA Eraser Buffer 3 μL, Water

表 1 大肠杆菌候选内参基因引物序列汇总表  
Table 1 Summary table of *E. coli* candidate reference genes primer sequences

基因 Gene	NCBI 序列号 Accession No.	基因描述 Gene description	引物序列 Primers sequence (5'→3')	扩增长度 Product size (bp)
16S rRNA	948466	16S Ribosomal RNA	F: CTGGAAGTCTGAGACACGGTCC R: GGTGCTTCTTCTGCGGGTAA	188
<i>mdh</i>	947854	Malate dehydrogenase	F: GTCACAGGTTCTTGGCGTTA R: CGAACCAGAGACAGACCAA	162
<i>recA</i>	947170	Recombinase A	F: GCGCGAAGGTAAAACCTGTG R: AACGTCTACTGCGCCAGAAC	168
<i>gapA</i>	947679	D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	F: AATACCCAACCAAGTCGCGT R: GAGTACGTACCAGCGTACCG	115
<i>gyrA</i>	946614	DNA gyrase subunit A	F: AATACCCAACCAAGTCGCGT R: GAGTACGTACCAGCGTACCG	144
<i>gyrB</i>	948211	DNA gyrase subunit B	F: ACCTGTTTCGAGCCGATTGTT R: GCTCGCCACGTTTCGATAAAC	162
<i>rpoA</i>	947794	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	F: GCACCAAAGAAGGCGTTTCAG R: ATATCGGCTGCAGTCACAGG	139
<i>rpoB</i>	948488	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	F: CGTGGTGGTGTCTGTTTCAGTA R: ACACACGGCATCTGGTTGAT	155
<i>mdoG</i>	945005	Glucan biosynthesis protein G	F: GGGATGTGAAGCAGTCGAA R: TATAGCGCACCGTGCTTTCA	117
<i>dnaG</i>	947570	DNA primase	F: GATCTGATCGATGCCCCTGT R: TTCGACCGTTTCGACGAACT	201
<i>secA</i>	944821	Protein translocase subunit SecA	F: CGGTAGTCGTAACGATCGCA R: GCACGAAACTCTGCGGTTTT	122
<i>fusA</i>	947847	Elongation factor P	F: CTGGCGGATAGTTTCACGGT R: AAAATGGGTCTGGCTCTGGG	201

3  $\mu\text{L}$ )与提取得到的 RNA 混合, 室温放置 30 min (或 42  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min)即可达到去除基因组 DNA 的效果, 经电泳检测和浓度测定后, 再进行反转录合成 cDNA。用反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 然后进行 qPCR 分析。

#### 1.4 qPCR 分析

以不同浓度(250、500、1 000  $\mu\text{g/mL}$ )黄芩苷铝配合物处理样品的 cDNA 为模板, 进行 qPCR。qPCR 反应体系: 2 $\times$ SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Tag<sup>™</sup> 5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(5  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.2  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$ Rox Reference Dye II 0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3.4  $\mu\text{L}$ 。

qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s (在延伸阶段检测荧光强度, 收集信号), 72  $^{\circ}\text{C}$  10 s。熔解曲线: 加热样品从 60–95  $^{\circ}\text{C}$ , 每隔 0.5  $^{\circ}\text{C}$  停留 1 s 检测一次荧光强度变化, 共 40 个循环。反应后进行熔解曲线分析。

#### 1.5 数据分析

根据比较  $C_t$  值法、利用 geNorm、BestKeeper 和 NormFinder 软件对 qPCR 定量结果进行统计学分析, 从而选出最佳的内参基因<sup>[18]</sup>。

比较  $C_t$  值法可以得到 12 个候选内参基因的  $C_t$  值变化范围; BestKeeper 软件可以进行基因稳定性排序并筛选出最适内参基因; NormFinder 和 geNorm 软件可以计算出 12 个内参基因的平均表达稳定值( $M$ ),  $M$  值越小, 稳定性越高; 同时, geNorm 软件还可以通过两两比较的变异值  $V$  ( $V=V_n/V_{n+1}$ ,  $V$  是否大于 0.15)来确定合适内参基因的数目  $n$ 。最后利用在线工具 RefFinder 综合分析以上 4 种方法的结果, 并得到候选内参基因稳定性的综合排序<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 质量检测和内参基因目的片段的扩增

在不同时间点(4.5 h 和 6 h)黄芩苷铝处理后大肠杆菌总 RNA 样品条带清晰, 无降解。图 1 中 1.5%

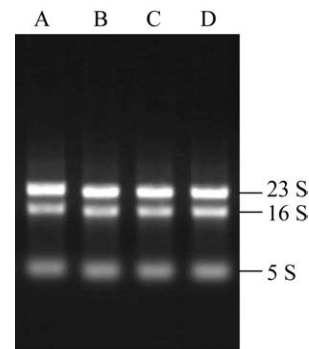


图 1 总 RNA 质量电泳图

Figure 1 Quality electrophoresis of total RNA

注: A–D 为随机抽取参试大肠杆菌样本的总 RNA

Note: A to D is the total RNA of a random sample of *E. coli*

琼脂糖凝胶电泳显示, 23S rRNA 和 16S rRNA 条带亮度清晰, 紫外分光光度计检测提取的 RNA  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值均在 2.0 左右, 表明该 RNA 浓度与纯度均满足后续实验要求。PCR 法检测提取的产物去基因组 DNA 处理情况, 结果表明样品中基因组 DNA 去除完全, 可进行下一步操作。

将不同时间点黄芩苷铝处理后的 cDNA 样本梯度稀释, 选择稀释后的 cDNA 作为模板, 分别扩增 12 个候选内参基因(16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA*)。图 2 结果显示每对引物均扩增出预期大小的片段, 而且没有出现引物二聚体和非特异性扩增条带, 说明引物的特异性较好, 可用于后续试验。

### 2.2 实时定量 PCR 分析

将 cDNA 样本梯度稀释至一定浓度后进行 qPCR 扩增, 并绘制 12 个候选内参基因的标准曲线, 得到引物的相关参数(表 2)。从表 2 中可以看出, 12 个候选内参基因的线性相关系数( $R$ )变化范围为 0.991 5–0.998 6, 显示出较好的线性关系, 说明定量结果准确、可靠, 符合实时荧光定量 PCR 对扩增效率的要求。同时根据  $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)\times 100\%$  计算扩增效率, 这 12 个候选内参基因均表现出良好的扩增效率(均大于 90%)。同时, 各个内参

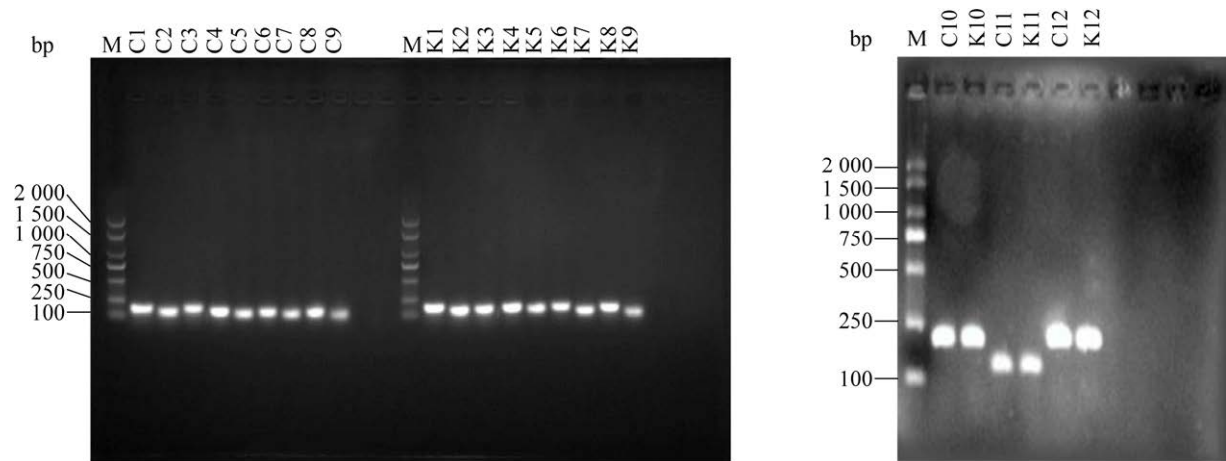


图 2 各候选内参基因 qPCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

**Figure 2** Agarose gel electrophoresis of qPCR products of candidate reference genes

注: M: DL2000 DNA Marker; C: C83715, K: K88; 1-12 分别表示 16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA* 这 12 个候选内参基因

Note: M: DL2000 DNA Marker; C: C83715; K: K88; 1-12: 16S rRNA, *mdh*, *recA*, *gapA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoA*, *rpoB*, *mdoG*, *dnaG*, *secA* and *fusA*

基因的熔解曲线有明显的单一信号峰(图 3), 再次说明各引物的特异性较好, 不存在引物二聚体。综上, 说明实时定量 PCR 反应中模板与引物结合良好, 具有高的特异性, 该方法结果准确可靠。

2.3 候选内参基因的表达稳定性分析

综合分析评价比较  $C_t$  值法、geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件的分析结果, 从而

表 2 候选内参基因的扩增效率参数

**Table 2** Parameters of candidate reference genes by qPCR

基因 Gene	斜率 Slope	扩增效率 Efficiency (%)	相关系数 $R$
<i>mdh</i>	-3.30	101	0.997 5
<i>recA</i>	-3.40	97	0.998 6
<i>gapA</i>	-3.40	97	0.996 5
<i>gyrA</i>	-3.59	90	0.995 3
<i>gyrB</i>	-3.47	94	0.995 6
<i>rpoA</i>	-3.37	98	0.996 5
<i>rpoB</i>	-3.16	107	0.995 4
<i>mdoG</i>	-3.53	92	0.993 4
<i>dnaG</i>	-3.40	97	0.997 6
<i>secA</i>	-3.35	99	0.991 5
<i>fusA</i>	-3.30	101	0.997 3

筛选出可用于黄芩苷铝胁迫下基因表达定量分析的 ETEC 最适内参基因。

2.3.1 内参基因的比较  $C_t$  值法分析

各候选内参基因的  $C_t$  值在黄芩苷铝胁迫下的变化范围可以反映该基因的表达稳定性。图 4 为 12 个候选内参基因在黄芩苷铝胁迫下表达水平的变化范围, 图中彩色长方形标记表示基因表达的平均  $C_t$  值, 长方形的下部线和上部线显示第 25 百分位到第 75 百分位的数值位置。误差棒上下两端分别表示最大值和最小值。黄芩苷铝胁迫下, 4.5 h 时, *gapA* 和 *rpoA* 的  $C_t$  值变化范围最小。说明在黄芩苷铝胁迫 4.5 h 时 *gapA* 和 *rpoA* 基因的表达最为稳定。同样通过分析  $C_t$  值变化范围, 6 h 时表达最稳定的基因是 *rpoA* 和 *fusA*; 4.5 h 和 6 h 这 2 个时间点综合分析最稳定的基因是 *rpoA* 和 *recA*。

2.3.2 内参基因的 geNorm 分析

通过 geNorm 软件评估了黄芩苷铝胁迫下 ETEC 不同生长时期各候选内参基因的表达稳定性, 通过  $M$  值依次排除最不稳定的基因, 最终保留 2 个<sup>[20]</sup>, 结果见图 5。在黄芩苷铝胁迫下, 4.5 h 时各候选内参基因在 K88 和 C83715 菌株中表达最

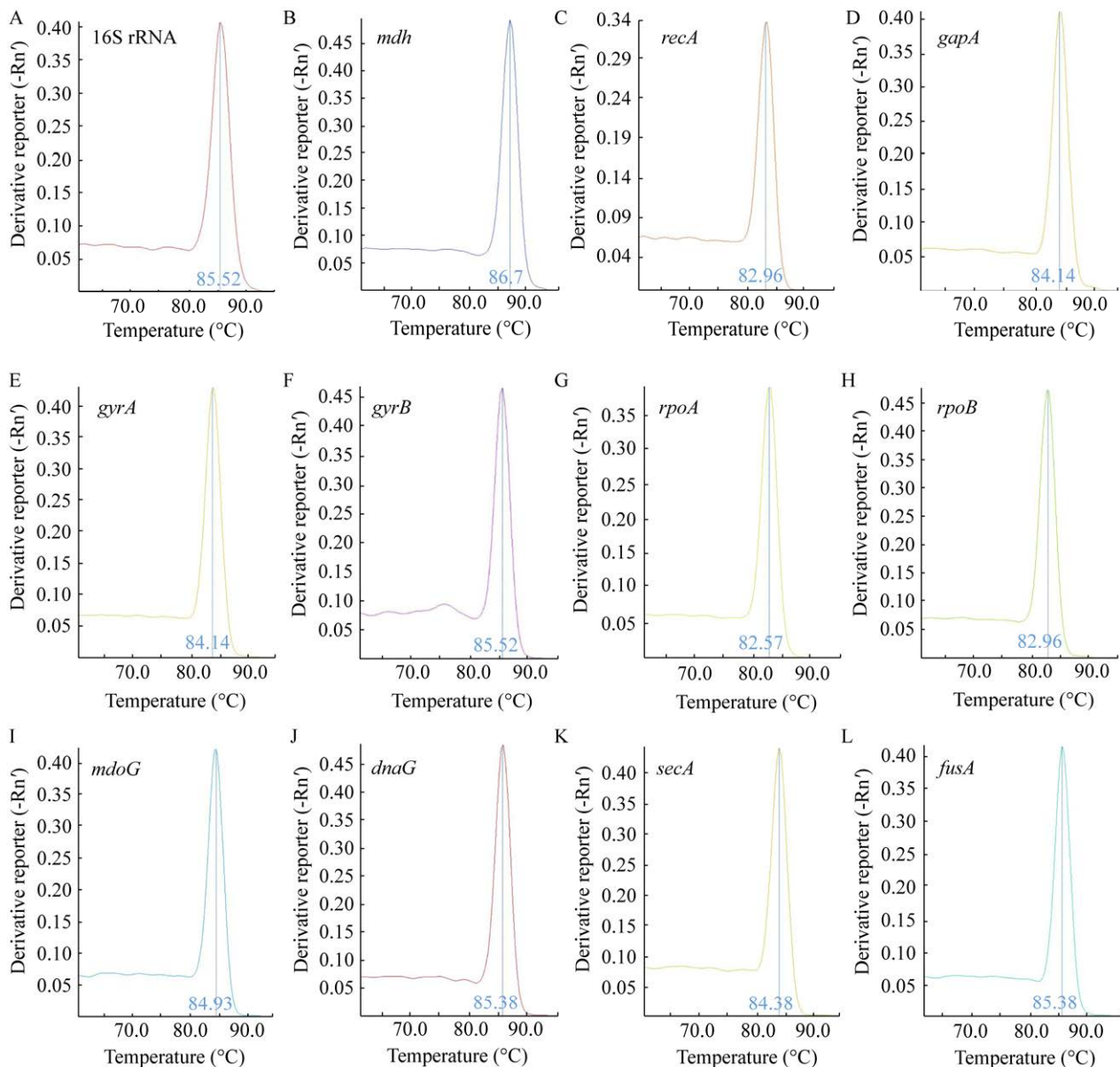


图3 候选内参溶解曲线

**Figure 3** Melting curves of candidate internal control gene

注: A-L 分别指 16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*rpoB*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA* 的溶解曲线

Note: A to L refers to the dissolving curves of 16S rRNA, *mdh*, *recA*, *gapA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoA*, *rpoB*, *mdoG*, *dnaG*, *secA* and *fusA*

稳定的基因是 *gapA* 和 *rpoA* (图 5A); 6 h 表达最稳定的基因是 *rpoA* 和 *fusA* (图 5B); 4.5 h 和 6 h 表达最稳定的基因是 *recA* 和 *rpoA* (图 5C)。

单一的内参基因在评估目的基因的表达分析中难免产生误差,因此有时需要使用 2 个或 2 个以上的内参基因进行校正,以确保实验结果的准确

性<sup>[21]</sup>。利用 geNorm 软件计算内参基因的配对差异  $V$  值并与程序推荐值 0.15 进行比较(图 6),在 4.5 h 时,  $V_{2/3}=0.086<0.15$ ,表明无须引入第 3 个基因进行校正,最适内参基因数为 2 个: *rpoA* 和 *fusA*; 在 6 h 时,  $V_{2/3}=0.108<0.15$ ,表明无须加入第 3 个基因进行校正,最合适的内参基因数为 2 个: *gapA*



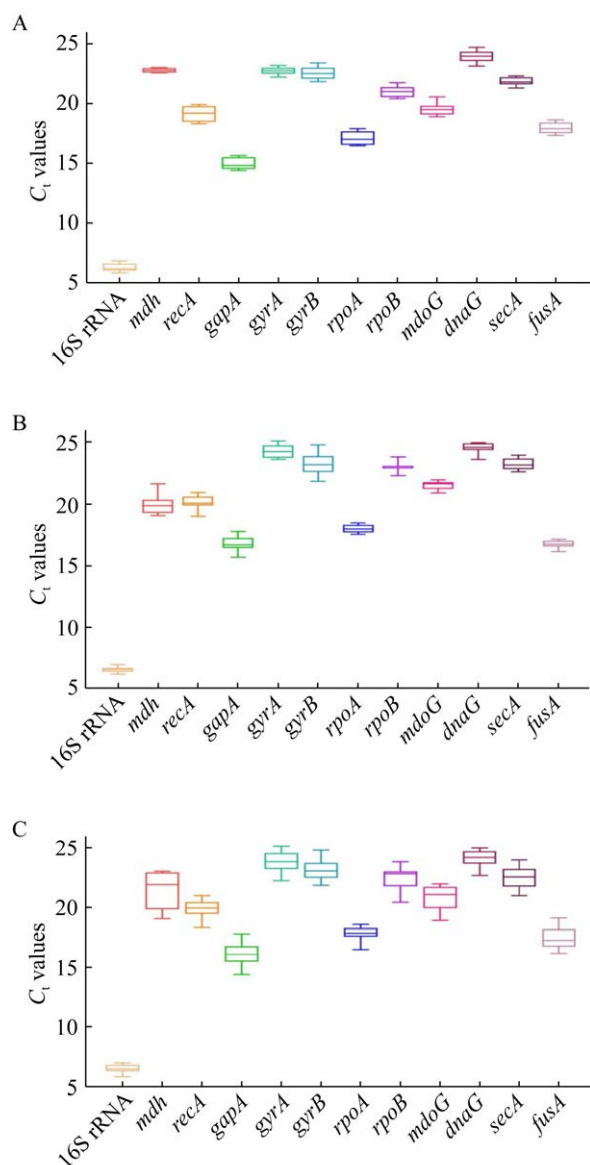


图4 黄芩苷铝胁迫下 ETEC 候选内参基因  $C_t$  值分布图  
Figure 4  $C_t$  distribution for each candidate reference genes of ETEC exposed to baicalin-aluminum complexes  
Note: A: 4.5 h; B: 6 h; C: 4.5 h and 6 h

和 *rpoA*；4.5 h 和 6 h 综合起来观察， $V_{2/3}=0.167>0.15$ ，需引入第 3 个基因进行校正，最合适的内参基因数目为 3 个：*gyrA*、*recA* 和 *rpoA*。

### 2.3.3 内参基因的 NormFinder 分析

使用 NormFinder 软件对不同时间点黄芩苷铝胁迫下 12 个候选内参基因的表达稳定性进行了分析， $S$  值越小基因表达就越稳定。结果如表 3 所示，

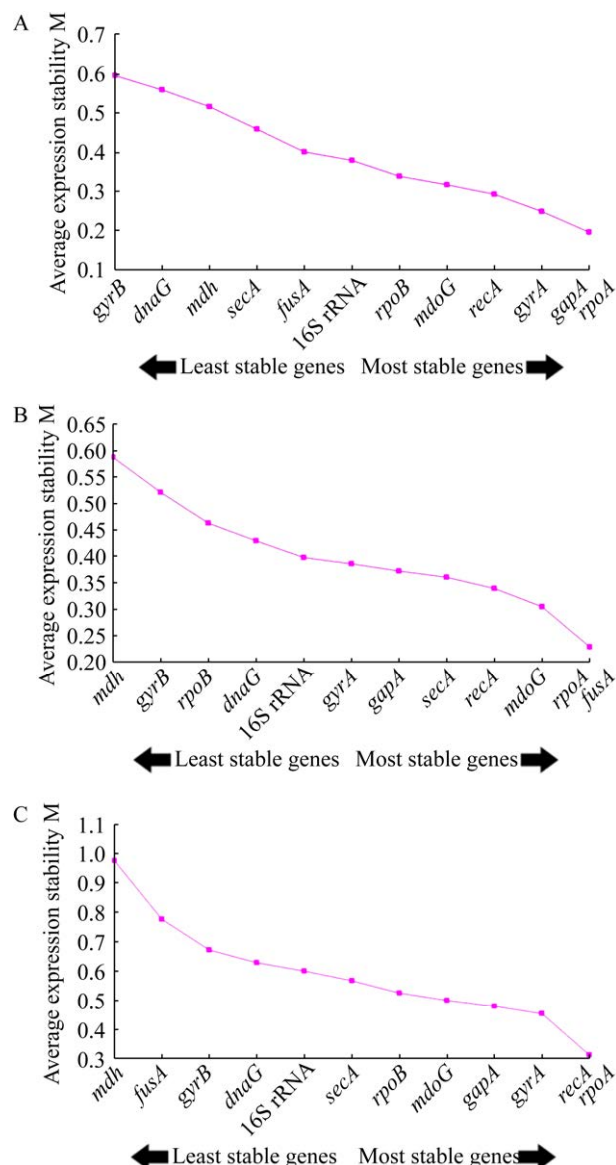


图5 geNorm 软件分析候选内参基因稳定性  
Figure 5 Stability of candidate reference genes analyzed by geNorm  
Note: A: 4.5 h; B: 6 h; C: 4.5 h and 6 h

4.5 h 时，16S rRNA 和 *gapA* 的  $S$  值最小，是表达最稳定的基因；6 h 表达最稳定的基因是 *rpoA* 和 *fusA*；2 个时间点综合起来最稳定的基因是 *rpoA* 和 16S rRNA。

### 2.3.4 内参基因的 BestKeeper 分析

BestKeeper 软件分析结果见表 3，4.5 h 时，*mdh* 和 16S rRNA 的是表达最稳定的基因；6 h 表

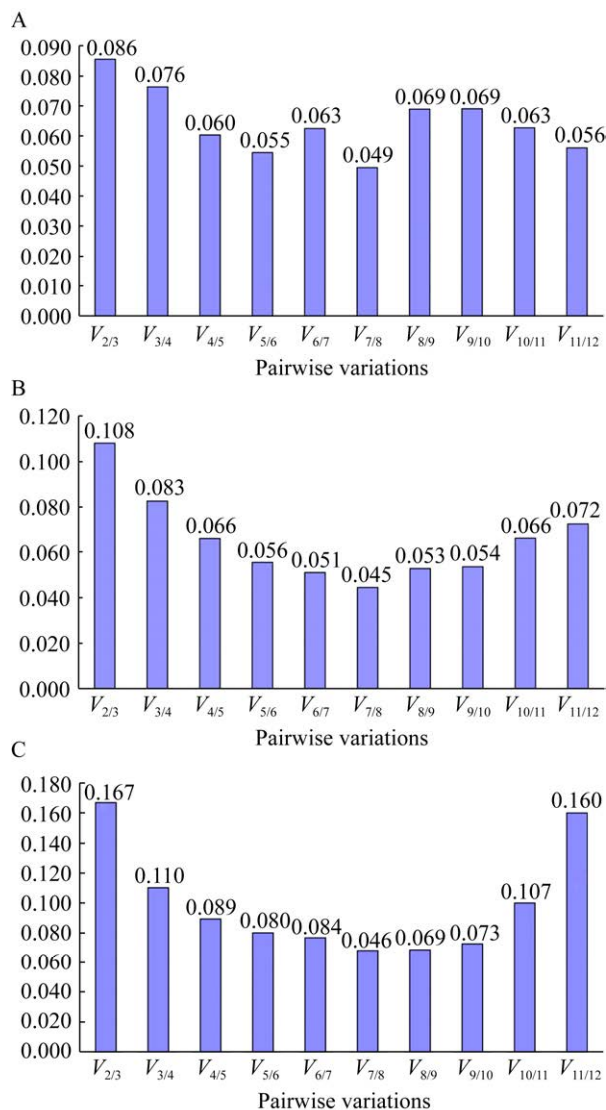


图6 用于标准化的内参基因最适数目判定(geNorm)  
Figure 6 Determination of the optional number of control genes for normalization (geNorm)

注: 柱状图上的数字代表配对变异值。A: 4.5 h; B: 6 h; C: 4.5 h 和 6 h

Note: The value of the abscissa indicates the number of reference genes. A: 4.5 h; B: 6 h; C: 4.5 h and 6 h

达最稳定的基因是 16S rRNA 和 *fusA*; 2 个时间点综合起来最稳定的基因是 16S rRNA 和 *rpoA*。RefFinder 综合分析结果如表 3 所示。

### 3 讨论与结论

事实上, 内参基因在不同组织、细胞或实验条件下的表达只是相对稳定, 已有研究表明传统的内

参基因, 如在番茄种子萌发过程中分析甘露聚糖酶基因时, GAPDH 基因的表达量却显著上调<sup>[22]</sup>。因此, 必须根据不同的试验条件、研究对象与目的来选择合适的内参基因。研究表明 16S rRNA 基因在不同条件下的表达是比较稳定的, 但受限于其较高的转录成本并没有被广泛地用作内参基因<sup>[23]</sup>。本试验采用 qPCR 技术, 通过比较  $C_t$  值法和 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 内参基因筛选软件检测 ETEC (16S rRNA、*mdh*、*recA*、*gapA*、*rpoB*、*gyrA*、*gyrB*、*rpoA*、*mdoG*、*dnaG*、*secA* 和 *fusA*) 共 12 个候选内参基因, 在不同浓度黄芩苷铝胁迫下 (250、500 和 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ), 2 个时间点 (4.5 h 和 6 h) mRNA 的差异表达情况, 并使用 RefFinder 对不同方法进行综合排名。比较  $C_t$  值法分析最稳定的基因是 *rpoA* 和 *recA*; geNorm 软件分析得出 *gyrA*、*recA* 和 *rpoA* 的稳定性最高。NormFinder 软件分析的稳定性最高的内参基因是 *rpoA* 和 16S rRNA。BestKeeper 软件分析稳定性最高的内参基因是 16S rRNA 和 *rpoA*。RefFinder 综合分析稳定性最高的内参基因是 *recA* 和 *rpoA*。实验结果显示 16S rRNA 基因的  $C_t$  值在 6–7 之间, 而需要定量的目的基因的  $C_t$  值在 15–20 之间, 表明 16S rRNA 基因的表达水平远远高于需要定量的目的基因。从我们前期的转录组数据以及目的基因的表达水平分析来看, 绝大多数目的基因的表达水平更接近于 *rpoA* 和 *recA*, 而 *rpoA* 基因由于表达丰度适中, 更适合于作为本试验内参基因研究目的基因的表达。*rpoA* 编码 RNA 聚合酶的  $\alpha$  亚基, 而 RNA 聚合酶参与催化 DNA 转录为 RNA 的生物过程<sup>[9]</sup>。研究表明 *rpoA* 基因在酒类球菌和空肠弯曲菌的氧化应激试验中均表达稳定<sup>[24–25]</sup>。

本研究应用 qPCR 技术结合 4 种常用内参基因稳定性分析方法对黄芩苷铝胁迫下 ETEC 12 个候选内参基因的表达稳定性进行了分析, 确定了 *rpoA* 作为黄芩苷铝胁迫下 ETEC 实时定量 PCR 的最佳内参基因, 为后续利用 qPCR 法研究黄芩苷铝胁迫 ETEC 后目的基因功能的表达奠定了基础。



表 3 各软件分析候选内参基因稳定性

Table 3 Stability of candidate reference genes analyzed by different analysis methods

Time	Rank	Comparative $\Delta C_t$		BestKeeper		NormFinder		geNorm		RefFinder	
		Average of		std dev		Stability Value		Average Expression		Geomean of ranking	
		STDEV		[+/- CP]		(SV)		Stability (M)		values	
		Gene	Value	Gene	Value	Gene	Value	Gene	Value	Gene	Value
4.5 h	1	<i>gapA</i>	0.471	<i>mdh</i>	0.198	16S rRNA	0.177	<i>gapA/rpoA</i>	0.196	<i>gapA</i>	1.934
	2	<i>rpoA</i>	0.476	16S rRNA	0.298	<i>gapA</i>	0.205	<i>gyrA</i>	0.248	16S rRNA	2.546
	3	16S rRNA	0.488	<i>secA</i>	0.38	<i>fusA</i>	0.244	<i>recA</i>	0.292	<i>rpoA</i>	2.913
	4	<i>gyrA</i>	0.496	<i>dnaG</i>	0.46	<i>rpoA</i>	0.246	<i>mdoG</i>	0.316	<i>gyrA</i>	4.356
	5	<i>fusA</i>	0.508	<i>fusA</i>	0.47	<i>gyrA</i>	0.269	<i>rpoB</i>	0.336	<i>fusA</i>	4.949
	6	<i>recA</i>	0.553	<i>gyrA</i>	0.521	<i>recA</i>	0.386	16S rRNA	0.378	<i>mdh</i>	5.623
	7	<i>mdoG</i>	0.566	<i>gapA</i>	0.531	<i>mdoG</i>	0.405	<i>fusA</i>	0.4	<i>recA</i>	6.16
	8	<i>secA</i>	0.635	<i>gyrB</i>	0.559	<i>secA</i>	0.494	<i>secA</i>	0.458	<i>secA</i>	6.447
	9	<i>rpoB</i>	0.65	<i>rpoA</i>	0.563	<i>rpoB</i>	0.553	<i>mdh</i>	0.515	<i>mdoG</i>	7.205
	10	<i>mdh</i>	0.743	<i>recA</i>	0.618	<i>mdh</i>	0.625	<i>dnaG</i>	0.558	<i>dnaG</i>	8.73
	11	<i>dnaG</i>	0.769	<i>mdoG</i>	0.678	<i>gyrB</i>	0.66	<i>gyrB</i>	0.594	<i>rpoB</i>	8.739
	12	<i>gyrB</i>	0.776	<i>rpoB</i>	0.75	<i>dnaG</i>	0.681	/	/	<i>gyrB</i>	10.61
6 h	1	<i>rpoA</i>	0.463	16S rRNA	0.2	<i>rpoA</i>	0.153	<i>rpoA/fusA</i>	0.229	<i>rpoA</i>	1.414
	2	<i>fusA</i>	0.468	<i>fusA</i>	0.229	<i>fusA</i>	0.184	<i>mdoG</i>	0.305	<i>fusA</i>	1.682
	3	<i>secA</i>	0.476	<i>rpoB</i>	0.258	<i>secA</i>	0.239	<i>recA</i>	0.339	16S rRNA	3.761
	4	<i>mdoG</i>	0.495	<i>rpoA</i>	0.283	<i>mdoG</i>	0.241	<i>secA</i>	0.36	<i>mdoG</i>	4.12
	5	16S rRNA	0.518	<i>dnaG</i>	0.292	16S rRNA	0.298	<i>gapA</i>	0.372	<i>secA</i>	4.213
	6	<i>recA</i>	0.528	<i>mdoG</i>	0.294	<i>recA</i>	0.32	<i>gyrA</i>	0.386	<i>recA</i>	5.826
	7	<i>gapA</i>	0.539	<i>secA</i>	0.386	<i>gapA</i>	0.354	16S rRNA	0.398	<i>gapA</i>	7.172
	8	<i>gyrA</i>	0.548	<i>recA</i>	0.428	<i>gyrA</i>	0.386	<i>dnaG</i>	0.429	<i>rpoB</i>	7.401
	9	<i>dnaG</i>	0.625	<i>gapA</i>	0.471	<i>dnaG</i>	0.472	<i>rpoB</i>	0.463	<i>dnaG</i>	7.77
	10	<i>rpoB</i>	0.631	<i>gyrA</i>	0.507	<i>rpoB</i>	0.483	<i>gyrB</i>	0.521	<i>gyrA</i>	8.818
	11	<i>gyrB</i>	0.838	<i>mdh</i>	0.531	<i>gyrB</i>	0.764	<i>mdh</i>	0.587	<i>gyrB</i>	11.242
	12	<i>mdh</i>	0.917	<i>gyrB</i>	0.697	<i>mdh</i>	0.862	/	/	<i>mdh</i>	11.742
Total	1	<i>rpoA</i>	0.733	16S rRNA	0.251	<i>rpoA</i>	0.156	<i>recA/rpoA</i>	0.313	<i>rpoA</i>	1.189
	2	<i>recA</i>	0.771	<i>rpoA</i>	0.437	16S rRNA	0.21	<i>gyrA</i>	0.454	<i>recA</i>	2.213
	3	<i>gyrA</i>	0.774	<i>dnaG</i>	0.546	<i>recA</i>	0.282	<i>gapA</i>	0.48	16S rRNA	2.828
	4	16S rRNA	0.795	<i>recA</i>	0.55	<i>gyrA</i>	0.44	<i>mdoG</i>	0.499	<i>gyrA</i>	3.663
	5	<i>gapA</i>	0.828	<i>gyrA</i>	0.625	<i>gapA</i>	0.579	<i>rpoB</i>	0.525	<i>gapA</i>	5.368
	6	<i>mdoG</i>	0.869	<i>gyrB</i>	0.653	<i>dnaG</i>	0.606	<i>secA</i>	0.566	<i>dnaG</i>	6
	7	<i>rpoB</i>	0.916	<i>fusA</i>	0.699	<i>mdoG</i>	0.642	16S rRNA	0.6	<i>mdoG</i>	6.933
	8	<i>dnaG</i>	0.918	<i>gapA</i>	0.738	<i>rpoB</i>	0.657	<i>dnaG</i>	0.629	<i>rpoB</i>	7.614
	9	<i>secA</i>	0.918	<i>secA</i>	0.749	<i>gyrB</i>	0.666	<i>gyrB</i>	0.671	<i>gyrB</i>	8.572
	10	<i>gyrB</i>	0.979	<i>rpoB</i>	0.769	<i>secA</i>	0.699	<i>fusA</i>	0.776	<i>secA</i>	8.678
	11	<i>fusA</i>	1.225	<i>mdoG</i>	0.814	<i>fusA</i>	0.984	<i>mdh</i>	0.974	<i>fusA</i>	9.825
	12	<i>mdh</i>	1.965	<i>mdh</i>	1.421	<i>mdh</i>	1.914	/	/	<i>mdh</i>	12

## REFERENCES

- [1] Ikwap K, Larsson J, Jacobson M, Owiny DO, Nasinyama GW, Nabukenya I, Mattsson S, Aspan A, Erume J. Prevalence of adhesin and toxin genes in *E. coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheic pigs from smallholder herds in northern and eastern Uganda[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 178
- [2] Johnson AM, Kaushik RS, Francis DH, Fleckenstein JM, Hardwidge PR. Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(1): 178-186
- [3] Fu SL, Zhuang F, Guo L, Qiu YS, Xiong JL, Ye C, Liu Y, Wu ZY, Hou YQ, Hu CA. Effect of baicalin-aluminum complexes on fecal microbiome in piglets[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2390
- [4] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations[J]. Genes & Immunity, 2005, 6(4): 279-284
- [5] Yoo WG, Kim TI, Li SY, Kwon OS, Cho PY, Kim TS, Kim K, Hong SJ. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR[J]. Parasitology Research, 2009, 104(2): 321-328
- [6] Taylor SC, Mrkusich EM. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative Real-Time PCR experiments (MIQE)[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(1): 46-52
- [7] Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-publishing data that conform to the MIQE guidelines[J]. Methods, 2010, 50(4): S1-S5
- [8] Zhang YJ, Zhu ZF, Lu R, Xu Q, Shi LX, Jian X, Liu JY, Yao Z. Selection of control genes in transcription analysis of gene expression[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2007, 34(5): 546-550 (in Chinese)  
张艳君, 朱志峰, 陆融, 徐琼, 石琳熙, 简序, 刘俊燕, 姚智. 基因表达转录分析中内参基因的选择[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(5): 546-550
- [9] Rocha DJP, Santos CS, Pacheco LGC. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108(3): 685-693
- [10] Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation[J]. BioTechniques, 2000, 29(2): 332-337
- [11] Zhao WJ, Xu J, Bao QH, Chen YF, Zhang HP. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR[J]. Microbiology China, 2010, 37(12): 1825-1829 (in Chinese)  
赵文静, 徐洁, 包秋华, 陈永福, 张和平. 实时荧光定量PCR 中内参基因的选择[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1825-1829
- [12] Zhang K, Zhang H, Yu ZM, Chen RB, Zheng ZY, Li CL. Analysis on stability of reference genes in *Escherichia coli* under porcine beta defensin 2 stress[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2016, 50(1): 66-71 (in Chinese)  
张坤, 张恒, 于志明, 陈锐博, 郑振宇, 李春丽. 猪β防御素 2 胁迫下大肠杆菌内参基因的稳定性分析[J]. 河南农业大学学报, 2016, 50(1): 66-71
- [13] Yu JL. The survival and mechanism of *Escherichia coli* O26 under heat shock-acid stress[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2019 (in Chinese)  
禹金龙. 热休克-酸应激对大肠杆菌 O26 存活影响及其机制研究[D]. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 2019
- [14] Heng SSJ, Chan OYW, Keng BMH, Ling MHT. Glucan biosynthesis protein G is a suitable reference gene in *Escherichia coli* K-12[J]. ISRN Microbiology, 2011, 2011: 469053
- [15] Wu XH. Effect of fluorine on the expression of GFP gene and protein in *E. coli*[D]. Jinzhong: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2013 (in Chinese)  
武晓虎. 氟对大肠杆菌内 GFP 基因及蛋白表达的影响[D]. 晋中: 山西农业大学硕士学位论文, 2013
- [16] Dong EN, Liang Q, Li L, Wang LJ, Zhong T, Wang Y, Zhang HP. The selection of reference gene in real-time quantitative reverse transcription PCR[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2013, 49(11): 92-96 (in Chinese)  
董恩妮, 梁青, 李利, 王林杰, 仲涛, 王永, 张红平. 实时荧光定量 PCR 内参基因的选择[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(11): 92-96
- [17] Carvalho DM, De Sá PH, Castro TLP, Carvalho RD, Pinto A, Gil DJP, Bagano P, Bastos B, Costa LFM, Meyer R, et al. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 106(4): 605-614
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): RESEARCH0034
- [19] Thomas KC, Zheng XF, Suarez FG, Raftery JM, Quinlan KGR, Yang N, North KN, Houweling PJ. Evidence based selection of commonly used RT-qPCR reference genes for the analysis of mouse skeletal muscle[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88653
- [20] Chang J, Chen LD, Xu Y, Ji DH, Chen CS, Xie CT. Selection of the internal control gene for expression analyses of *Pyropia haitanensis* under high light stress by quantitative real-time PCR[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 37(12): 1825-1829

- 2017, 41(7): 1064-1072 (in Chinese)  
昌晶, 陈陆丹, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 高光胁迫下坛紫菜定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 水产学报, 2017, 41(7): 1064-1072
- [21] Kong FN, Cao M, Sun PP, Liu WX, Mao YX. Selection of reference genes for gene expression normalization in *Pyropia yezoensis* using quantitative real-time PCR[J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(2): 1003-1010
- [22] Yang SY, Yue XL, Wang JJ, Shen HM. Screening of suitable reference genes and expression profiling of CYP392E subfamily genes in different resistant strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2013, 56(10): 1152-1159
- [23] Yin QQ. Function analysis of *Arabidopsis* PPR protein PDM1 involving in *rpoA* gene posttranscription expression[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2012 (in Chinese)
- 尹倩倩. 拟南芥 PPR 蛋白 PDM1 调控 *rpoA* 基因转录后表达的研究[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2012
- [24] Sumbly KM, Grbin PR, Jiranek V. Validation of the use of multiple internal control genes, and the application of real-time quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 1039-1047
- [25] Ritz M, Garenaux A, Berge M, Federighi M. Determination of *rpoA* as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(2): 196-200

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 被中文核心期刊、中国科技核心期刊、CSCD 核心期刊收编, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 而且入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.1248)