

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190215001

http://www.yykxjz.cn/

杨泽禹, 廖梅杰, 王印庚, 张正, 韦信贤, 李彬, 荣小军. 地榆醇提物对对虾致病菌 VP<sub>AHPND</sub> 生长影响及最适内参基因的筛选. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 150-158

Yang ZY, Liao MJ, Wang YG, Zhang Z, Wei XX, Li B, Rong XJ. Effects on the growth of shrimp pathogen VP<sub>AHPND</sub> and selection of suitable reference genes under different concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. alcoholic extracts. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(2): 150-158

## 地榆醇提物对对虾致病菌 VP<sub>AHPND</sub> 生长影响 及最适内参基因的筛选\*

杨泽禹<sup>1,2</sup> 廖梅杰<sup>2,3①</sup> 王印庚<sup>2,3</sup> 张 正<sup>2,3</sup>  
韦信贤<sup>4</sup> 李 彬<sup>2,3</sup> 荣小军<sup>2,3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 广西水产科学研究院 南宁 530021)

**摘要** 为筛选适用于研究地榆(*Sanguisorba officinalis* L.)对对虾急性肝胰腺坏死病致病株副溶血弧菌(Acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*, VP<sub>AHPND</sub>)抑制机理的内参基因, 本文探究了地榆醇提物胁迫下 VP<sub>AHPND</sub> 生长的变化, 并利用 qRT-PCR 技术探究了该条件下 VP<sub>AHPND</sub> 中 6 种常见内参基因(*rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*gapdh*、*16S rRNA* 和 *rpo S*)的表达情况, 利用 GeNorm、Norm Finder、Best Keeper、Delta CT 以及 Ref Finder 这 5 种方法对其表达稳定性进行了评估和筛选。结果显示, 地榆醇提物能抑制 VP<sub>AHPND</sub> 的生长, 且抑制效果与浓度呈正相关。在不同浓度地榆醇提物处理条件下, 这 6 种内参基因扩增产物特异性良好, 其中, Ct 值变化差异最小的为 *16S rRNA* (CV=3.88), 变化差异最显著的为 *pvs A* (CV=12.53)。5 种方法对 6 种内参基因稳定性排序略有差异, 其中, GeNorm 给出的稳定性排序为 *rpo S* = *16S rRNA* > *gapdh* > *rec A* > *pvu A* > *pvs A*; Norm Finder 结果为 *gapdh* > *rpo S* > *pvu A* > *16S rRNA* > *rec A* > *pvs A*; Best Keeper 结果为 *16S rRNA* > *rpo S* > *gapdh* > *rec A* > *pvu A* > *pvs A*; Delta Ct 结果为 *gapdh* > *rpo S* > *pvu A* > *16S rRNA* > *rec A* > *pvs A*; Ref Finder 综合排名结果为 *rpo S* > *gapdh* > *16S rRNA* > *pvu A* > *pvs A* > *rec A*。本研究根据配对变异系数结果, 最终推荐同时使用 *rpo S* 和 *gapdh* 作为该条件下内参基因。本研究为以地榆为核心药物的 AHPND 防控技术的建立和从基因表达角度研究地榆对 VP<sub>AHPND</sub> 的作用机理提供了基础。

**关键词** 急性肝胰腺坏死病(AHPND); 副溶血弧菌; 地榆; 内参基因; qRT-PCR

**中图分类号** S966.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)02-0150-09

\* 广西科技重大专项(桂科 AA17204081-4)、农业农村部农业国际合作交流项目—“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作和中国水产科学研究院黄海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(20603022017004)共同资助 [This work was supported by Special Science and Technology Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (Guike AA17204081-4), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China-Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries, and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022017004)]. 杨泽禹, E-mail: 15705274036@163.com

① 通讯作者: 廖梅杰, 副研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-02-15, 收修改稿日期: 2019-03-28

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的致病菌,能引起石斑鱼(*Epinephelus* spp.)、九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)等诸多水产养殖对象病变(Shyne *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010; 蔡林婷等, 2013)。近期发现副溶血弧菌也是引发凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)重要疫病——急性肝胰腺坏死病(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)的主要病原之一(Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2018; 陈蒙蒙等, 2018; 贾丹等, 2018)。随着绿色健康的水产养殖理念不断深入人心,中草药在水产病害防控中的运用受到广泛关注(Pu *et al.*, 2017)。地榆(*Sanguisorba officinalis*)作为常用中草药之一,富含鞣质、皂苷等生物活性物质,具有抗炎(Yang *et al.*, 2016)、抑菌(Lee *et al.*, 2004)等作用。本研究团队前期研究表明,地榆对急性肝胰腺坏死病致病株副溶血弧菌(VP<sub>AHPND</sub>)有明显的抑制作用,且以地榆为主要成分的复方中草药在防控由副溶血弧菌引发的 AHPND 时效果显著(姜燕, 2016)。利用 qRT-PCR 技术探究不同浓度地榆醇提物作用下 VP<sub>AHPND</sub> 毒力因子的表达量及功能的变化,将有助于解析地榆对 VP<sub>AHPND</sub> 的作用机理,对以地榆为核心药物的 AHPND 防控技术的建立具有重要意义。

在研究基因差异表达过程中,需要选择稳定、高效的内参基因(Reference gene)对数据进行标准化处理(Vanguilder *et al.*, 2008),以校正 qRT-PCR 技术运用过程中因 mRNA 质量、反转效率、进样量差异等因素导致的技术误差。Radonic 等(2004)认为,理想的内参基因应在各种实验条件、各种组织细胞中均能稳定表达,并对传统内参基因的适用性提出质疑,并通过实验证明了人体各组织最适内参基因并非传统意义上的 *18S rRNA*。Zhong 等(1999)研究发现,癌细胞在正常和缺氧条件下 *gapdh* 和  $\beta$ -*actin* 的表达水平差异显著。这些研究表明,内参基因稳定性在不同物种、不同组织以及不同环境条件下存在差异。因此,筛选适于评价地榆对 VP<sub>AHPND</sub> 基因差异表达的内参基因是对地榆抑菌机理深入探究的基础。

目前,常用的副溶血弧菌内参基因主要有 *rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*16S rRNA*、*gapdh* 和 *rpo S* (Ma *et al.*, 2015; Coutard *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; 李沁, 2013)。本文以上述研究为基础,利用 qRT-PCR 技术检测了地榆醇提物作用下 VP<sub>AHPND</sub> 中这 6 种内参基因表达的稳定性,筛选出该条件下最稳定的内参基因,为后续地榆胁迫下 VP<sub>AHPND</sub> 相关基因表达研究提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

地榆购自北京同仁堂药店。VP<sub>AHPND</sub> 为对虾 AHPND 致病菌,分离自天津患 AHPND 凡纳滨对虾的肝胰腺组织,保存于本实验室-80℃超低温冰箱。

### 1.2 地榆醇提药物配制

取 5 g 地榆粉于烧杯中,加入 70%的乙醇溶液 150 ml,超声提取 50 min,置于真空抽滤机中进行抽滤,将滤液置于 90℃恒温水浴锅中,浓缩药液至 45 ml 左右,再用蒸馏水定容至 50 ml,即配制成浓度为 100 mg/ml 的地榆醇提药液,4℃储存待用。

### 1.3 引物验证

以金属浴加热法提取正常培养条件下 VP<sub>AHPND</sub> 的 DNA 为模板进行普通 PCR 扩增,6 种内参基因引物信息见表 1。普通 PCR 程序为:95℃ 10 min; 95℃ 5 s, 55℃ 34 s, 72℃ 45 s, 40 个循环。用 1%琼脂糖凝胶电泳法检测条带完整性,并通过 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (大连宝生物公司)对目的条带进行切胶回收,使用 pMD18-T Vector Cloning Kit (大连宝生物公司)对目的基因进行克隆。将克隆好的菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,验证目的片段是否成功导入质粒。用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0(大连宝生物公司)提取克隆成功菌液的质粒,并以此标准品为模板,进行 qRT-PCR 分析,检测引物效率。qRT-PCR 程序为:95℃ 10 min; 95℃ 5 s, 55℃ 34 s, 72℃ 45 s, 40 个循环;熔解曲线分析使用 Eppendorf 的默认程序:95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s。

### 1.4 实验细菌培养及样品采集

利用 TSB 培养基(Tryptic soy broth medium)对 VP<sub>AHPND</sub> 进行活化和扩大培养,培养条件为 28℃、190 r/min 恒温振荡培养 10 h (指数增长期为 8~11 h),离心收集所培养的细菌并用 1.5%灭菌 NaCl 溶液配制成  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml 的菌液。利用地榆醇提物配制浓度分别为 0、0.2、0.4、0.8 和 1.6 mg/ml 的含药 TSB 培养基,按照 1%的接种量向其中接种 VP<sub>AHPND</sub>,随后将其置于 28℃恒温振荡培养箱中 190 r/min 振荡培养。每个浓度梯度设置 3 个生物学重复。

自接种 VP<sub>AHPND</sub> 后开始计时,在振荡培养 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 和 22 h 时从锥形瓶中取 100  $\mu$ l 菌悬液适当稀释,均匀涂布于固体 TSB

表1 候选内参基因引物序列及其相关信息  
Tab.1 Nucleotide sequences of primers of the six candidate reference genes

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 $T_m$ (°C)	扩增长度 Amplicon length(bp)	参考文献 Reference
<i>rec A</i>	F: GCTAGTAGAAAAAGCGGGTG	56.8	165	Ma 等(2015)
	R: GCAGGTGCTTCTGGTTGAG	59.6		
<i>pvs A</i>	F: CTCCTTCATCCAACACGAT	55.9	104	Coutard 等(2007)
	R: GGGCGAGATAATCCTTGT	55.0		
<i>pvu A</i>	F: CAAACTCACTCAGACTCCA	51.7	156	Coutard 等(2007)
	R: CGAACCGATTCAACACG	56.9		
<i>16S rRNA</i>	F: TATCCTTGTTTGCCAGCGAG	61.3	186	Ma 等(2015)
	R: CTACGACGCACTTTTGGGA	61.2		
<i>gapdh</i>	F: TGTTGACGTTGTAGCAGAAAG	55.0	235	Ma 等(2015)
	R: ACCGAACCTGTGCGTTAAGAA	55.0		
<i>rpo S</i>	F: GACAATGCGTCAGAGACG	56.1	151	Ma 等(2015)
	R: GAGGTGAGAAGCCAATTTTC	54.8		

培养基上,置于 28℃ 恒温培养箱中培养 12 h 后进行平板菌落计数。

用于提取 RNA 的样品采样时间由预实验确定。各实验组 VP<sub>AHPND</sub> 菌液浓度达到指数增长期所需的时间分别为 9 h (0 mg/ml)、11 h (0.2 mg/ml)、14 h (0.4 mg/ml)、16 h (0.8 mg/ml) 和 17 h (1.6 mg/ml)。因此,分别在 9、11、14、16 和 17 h 采集相应实验组的菌液,根据菌液浓度确定各组总菌量,用于 RNA 提取。

### 1.5 RNA 提取和 cDNA 反转录

采用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (大连宝生物公司)提取各实验组细菌的总 RNA。用 NanoDrop 1000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测其条带的完整性。利用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit with gDNA Eraser (大连宝生物公司)试剂盒进行反转录制备各实验组 qRT-PCR 模板。

### 1.6 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 扩增在 Eppendorf 实时荧光定量 PCR 仪 (Mastercycler ep) 上进行。采用 TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (大连宝生物) 进行荧光定量 PCR 扩增, qRT-PCR 程序和熔解曲线分析程序同 1.3。每个样品进行 3 个技术重复。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 qRT-PCR 产物的条带。

### 1.7 数据处理

利用 Eppendorf 实时荧光定量 PCR 仪自带的软件程序计算各基因扩增的  $C_t$  值、熔解曲线效率 ( $E\%$ ) 及

其相关系数 ( $R^2$ )。采用 SPSS 19.0 统计软件对各基因  $C_t$  值进行单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。分别利用 GeNorm、Norm Finder、Best Keeper、Delta CT 以及 Ref Finder 这 5 种方法对 6 种内参基因表达稳定性进行分析。其中, Best Keeper 和 Delta CT 直接使用  $C_t$  值进行计算; GeNorm 和 Norm Finder 软件需要将  $C_t$  值转化为  $2^{-\Delta C_t}$  后再进行下一步计算; Ref Finder 结果为前 4 种计算方法所得名次的几何平均数; 适宜的内参基因选择数量以 GeNorm 软件计算的配对变异系数 ( $V_n/V_{n+1} < 0.15$ ) 为选择标准。

## 2 结果

### 2.1 引物验证结果

菌液测序结果显示,利用 pMD18-T 为载体,将目的片段成功插入到感受态细胞中,并且目的片段长度与文献中相同。*rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*16S rRNA*、*gapdh* 和 *rpo S* 的扩增曲线均为单峰,引物效率 ( $E\%$ ) 分别为 1.01、1.08、0.99、0.98、1.02 和 0.93; 相关系数 ( $R^2$ ) 分别为 0.998、0.998、0.999、0.994、0.998 和 0.998。这表明 6 个候选内参基因的引物特异性良好,可用于后续实验。

由各样品提取的 RNA 琼脂糖电泳结果 (图 1A) 可以看出,各样品条带完整, *23S rRNA* 与 *16S rRNA* 条带亮度之比约为 2:1, 同时  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} > 2.0$ , 表明所提取的 RNA 完整性良好。对样本 qRT-PCR 扩增产物的琼脂糖电泳结果显示,6 个基因片段扩增产物单一,无杂带 (图 1B)。各内参基因在不同浓度地榆作用下的熔解曲线均为单峰 (图 1C~图 1H)。

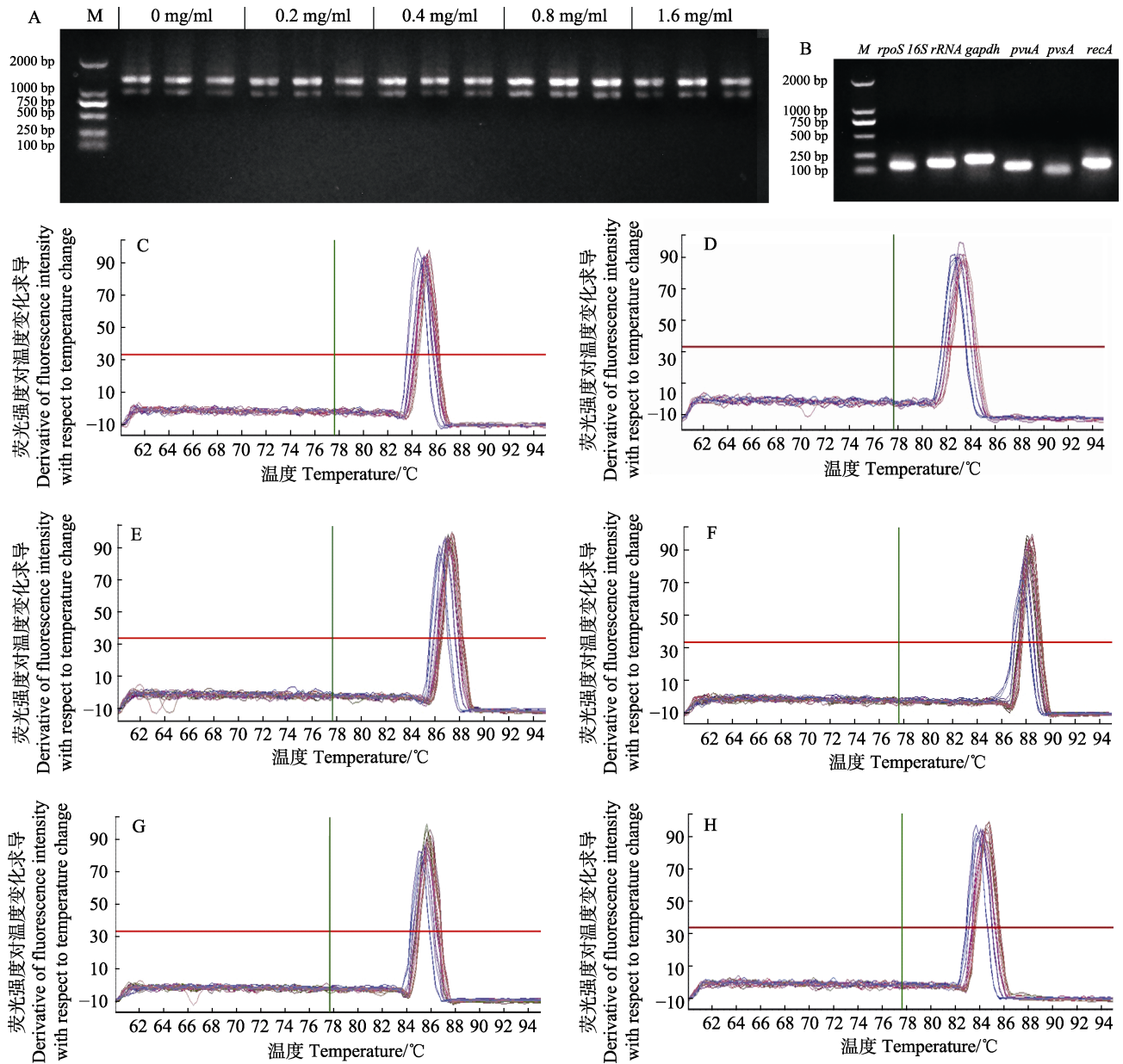


图 1 各样品 RNA 琼脂糖电泳结果及引物扩增特异性检测结果  
 Fig.1 Results of RNA electrophoretogram and primers specificity detection

A: 5 个处理组样品中总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图; B: 6 个内参基因 qRT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图;  
 C~H 分别为 *rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*16S rRNA*、*gapdh* 和 *rpoS* 的熔解曲线

A: Total RNA electrophoretogram of five experimental groups; B: Specificity of six candidate reference genes for qRT-PCR amplification; C~H: Melting curves of *rec A*, *pvs A*, *pvu A*, *16S rRNA*, *gapdh*, and *rpoS*

### 2.2 地榆醇提取物对 VP<sub>AHPND</sub> 生长曲线的影响

不同浓度地榆醇提取物作用下 VP<sub>AHPND</sub> 生长曲线见图 2。不同浓度地榆醇提取物能改变 VP<sub>AHPND</sub> 到达平台期的时间及平台期高度，且地榆浓度越高对 VP<sub>AHPND</sub> 的抑制效果越明显。0、0.2 和 0.4 mg/ml 组达到平台期的时间分别为 12、14 和 18 h；而 0.8 mg/ml 和 1.6 mg/ml 组在培养 22 h 内未出现明显的平台期。

### 2.3 实时荧光定量检测结果

VP<sub>AHPND</sub> 中 6 个候选内参基因  $C_t$  值如图 3 所示，其  $C_t$  值范围分别为 17.55~23.68 (*rce A*)、17.55~25.63 (*pvs A*)、17.30~24.06 (*pvu A*)、13.28~16.80 (*gapdh*)、4.31~5.15 (*16S rRNA*)、16.87~19.41 (*rpo S*)。在所检测的 6 个基因中，内参基因表达变化差异最小的为 *16S rRNA* (CV=3.88)，说明在地榆对 *16S rRNA* 的表达影

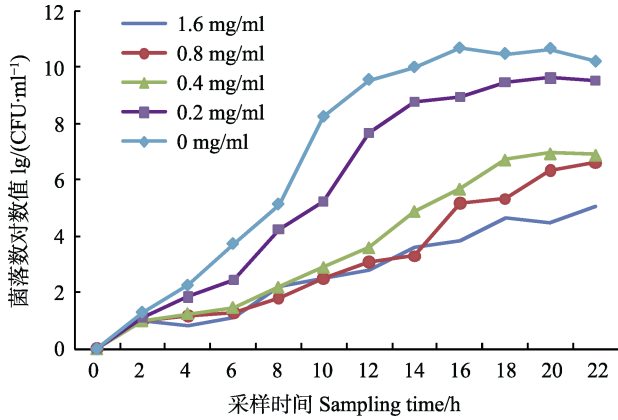


图2 不同浓度地榆醇提取物对 VP<sub>AHPND</sub> 的生长曲线  
Fig.2 Growth curve of VP<sub>AHPND</sub> under stress of alcohol extracts of *Sanguisorba officinalis* at different concentrations

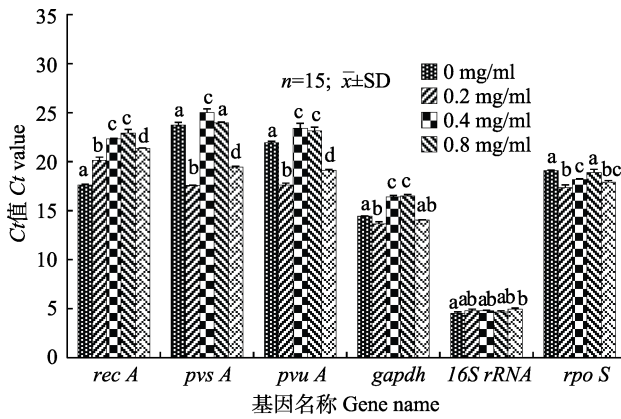


图3 6个内参基因在各处理组中 Ct 值  
Fig.3 Ct values of six reference genes in different groups

柱形图上方字母不同表示差异显著(P<0.05)  
Different letters on the column indicate significant difference (P<0.05)

响较小。表达变化差异最显著的是 *pvs A* (CV=12.53), 说明地榆对 *pvs A* 表达影响最大。

2.4 内参基因稳定性分析

利用 5 种方法对 6 个基因稳定性评价的结果见表 2。由 GeNorm 软件给出的内参基因稳定性顺序由大到小为 *rpo S = 16S rRNA > gapdh > rec A > pvu A > pvs A*, 其中, 最稳定的内参基因为 *16S rRNA* 和 *rpo S*, 其稳定指数均为 0.852。由 Norm Finder 软件计算出的内参基因稳定性顺序由大到小为 *gapdh > rpo S > pvu A > 16S rRNA > rec A > pvs A*, 最为稳定的内参基因为 *gapdh*, 稳定指数为 0.584。Best Keeper 分析后推荐最稳定的内参基因为 *16S rRNA*, 其标准偏差为 0.13, 这 6 个候选内参基因稳定性顺序由大到小为 *16S rRNA > rpo S > gapdh > rec A > pvu A > pvs A*。Delta CT 法计算得出 6 个内参基因稳定性顺序由大到小为 *gapdh > rpo S > pvu A > 16S rRNA > rec A > pvs A*。其中, 最为稳定的内参基因为 *gapdh*, 其平均标准偏差的值为 1.570。Ref Finder 根据上述 4 个软件的结果分析后得出的综合排名为 *rpo S > gapdh > 16S rRNA > pvu A > pvs A > rec A*。

2.5 最适内参基因数量分析

根据 Vandesompele 等(2002)提出的方法进行数据处理, 按照 *rpo S*、*gapdh*、*16S rRNA*、*pvu A*、*pvs A*、*rec A* 的顺序, 计算配对变异系数 ( $V_n/V_{n+1}$ ), 当  $V_n/V_{n+1} < 0.15$  时, 表明最适内参基因个数为  $n$ , 且无需继续引入其他内参基因。本实验中,  $V_2/V_3 = 0.077$  (图 4), 表明选用 2 个内参基因已能满足该条件下实验数据的标准化处理, 结合候选内参基因的稳定性排序结果, 最终得出这 2 个内参基因为 *rpo S* 和 *gapdh*。

表 2 不同浓度地榆醇提取物作用下副溶血弧菌中 6 个内参基因稳定性评价  
Tab.2 Stability evaluation of six reference genes of *Vibrio parahaemolyticus* under different concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. alcoholic extracts

基因名称 Gene name	GeNorm 稳定指数 Stability index	Norm Finder 稳定指数 Stability index	Best Keeper		Delta Ct 平均标准偏差 Average of SD	Ref Finder 综合评分 Comprehensive evaluation
			标准差 SD ( $\pm Ct$ )	变异系数 CV (%Ct)		
<i>rec A</i>	1.554	2.078	1.590	7.620	2.440	4.47
<i>pvs A</i>	2.063	2.339	2.750	12.530	2.530	6.00
<i>pvu A</i>	1.831	1.333	2.150	10.180	1.960	3.87
<i>16S rRNA</i>	0.852*	1.594	0.130*	3.880	2.050	2.00
<i>gapdh</i>	1.137	0.584*	1.150	7.660	1.570*	1.73
<i>rpo S</i>	0.852*	1.052	0.570	3.180	1.830	1.68*

\*: 对应处理组相应软件给出的最稳定基因

\*: The most stable gene given by corresponding software of corresponding group

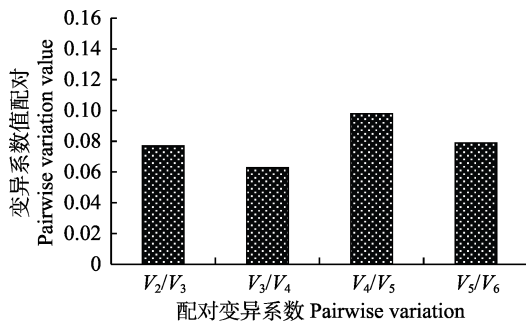


图 4 最适内参基因数量的确定

Fig.4 Determination of the optimal number of reference genes for normalization

配对变异系数( $V_n/V_{n+1}$ )是由标准化因子  $NF_n$  与  $NF_{n+1}$  计算所得, 用于确定精确标准化处理数据时所需的最适内参基因数量

Pairwise variation ( $V_n/V_{n+1}$ ) analysis is based on the normalization factors  $NF_n$  and  $NF_{n+1}$  to determine the number of control genes required for accurate normalization

### 3 讨论

#### 3.1 地榆醇提取物对 VP<sub>AHPND</sub> 生长曲线的影响

地榆入药历史悠久, 但相关的研究多集中于人医, 在水产养殖中的研究与运用较少。姜燕(2016)研究发现, 地榆对副溶血弧菌有较好的抑制效果, 发现地榆与诃子、乌梅、黄连联用能显著提高对虾免疫力和抗病力。Lee 等(2004)研究发现, 地榆对表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)均有显著的抑菌效果, 地榆对这 3 种细菌抑制效果与浓度呈正相关。本研究结果与 Lee 等(2004)的实验结果一致, 地榆的使用延缓了 VP<sub>AHPND</sub> 到达平台期的时间及平台期高度, 并且浓度越高, 作用效果越明显。研究结果证明了地榆对 VP<sub>AHPND</sub> 的抑制效果, 为后续以地榆为核心药物的 AHPND 防控技术的建立提供了数据支持。

#### 3.2 内参基因稳定性评价的意义

qRT-PCR 技术广泛应用于哺乳动物(Cepollaro et al, 2018)、植物(Chen et al, 2015)、细菌(Delorenzo, 2018)等各类生物体内基因表达变化的研究。在基因相对表达量分析时, 需要将初始样品量、酶效率、转录活性差异等变量因素进行标准化处理, 以降低这些变量对实验结果造成的误差。数据标准化处理时, 常使用内参基因法。理想的内参基因被定义为在各种组织样品和实验条件下均能稳定表达的基因(Zhang et al, 2005)。为了保证实验结果的可信度, 需要在实

验前对筛选的内参基因进行验证。Gomes 等(2018)根据实验得出, 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)中最为合适的内参基因组合为 *rec A*、*rho*、*pro C* 和 *rpo D*, 并通过分析肺炎克雷伯菌细胞内铁调节基因在铁富余和亏欠两种条件下的相对表达量, 验证了其所筛选的内参基因的正确性。Wang 等(2018)在小鼠(*Mus musculus*)急性酒精性肝损伤模型中, 利用内质网应激相关基因的相对表达量差异验证了 *Hprt1* 作为该模型下的内参基因的可靠性。Lin 等(2018)利用 *mleR1* 和 *mleP1* 基因验证了 SO<sub>2</sub> 胁迫下植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)内最稳定的内参基因组合为 *rpo B*、*rpo C*、*rec A* 和 *ldh* 这一结果的正确性。随着对实验精度要求的提高, 筛选合适的内参基因, 并进行准确性验证将会成为实验步骤中必不可少的一部分。

研究表明, 不同物种、不同组织、不同发育阶段以及不同环境条件均会影响内参基因的表达。在真核生物基因检测中, 常使用  $\beta$ -actin、*gapdh*、*18S rRNA*、*28S rRNA* 等作为内参基因(Suzuki et al, 2000; 薛蓓等, 2017), 但也有学者发现,  $\beta$ -actin (Selvey et al, 2001) 和 *gapdh* (Deindl et al, 2002)并不是最稳定的内参基因。Radonic 等(2004)研究证明, 人体各组织最适内参基因也不是传统意义上的 *18S rRNA*, 而是 RP II。在原核生物内参基因筛选中, 内参基因的稳定性也随着环境的变化而变化。如 Yang 等(2018)发现劳尔氏菌(*Ralstonia pseudosolanacearum*)在生物(生长阶段)和非生物(温度、羟基香豆素、营养)4 种胁迫处理下, 7 个内参基因所表现出的稳定性差异显著, 在不同的生长阶段中, *gyr A* 和 *ser C* 是最稳定的内参基因, 而在温度胁迫下, *ser C*、*gyr A* 和 *fts Z* 最为稳定; 在羟基香豆素胁迫下, *gyr A*、*fts Z* 和 *16S rRNA* 最为稳定; 而在营养胁迫下, *ser C* 和 *16S rRNA* 最稳定。因此, 在特定的研究背景下, 需对生物的内参基因进行重新评判, 以增加基因检测的稳定性和可靠性。目前, 常用于副溶血弧菌基因检测的内参基因有 *rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*16S rRNA*、*gapdh*、*rpo S* (Ma et al, 2015; Coutard et al, 2007; Li et al, 2013; 李沁, 2013)。Ma 等(2015)将 5 株不同来源的副溶血弧菌培养于 4 种温度下, 筛选出不同温度下副溶血弧菌最适内参基因为 *rec A*。李沁(2013)以 5 株携带不同毒力基因的副溶血弧菌为研究对象, 选取海水、过滤海水以及凡纳滨对虾作为培养介质, 筛选出最适内参基因为 *pvs A* 和 *pvu A*。结果表明, *rpo S* 是不稳定的内参基因。但本研究结果显示, *rpo S* 为最稳定的内参基因, 这与他们的研究结果不同。Hengge-Aronis(2002)研究表明, 低温与高温能分别影响 Rop S 蛋白的翻译与水解过程, 因

此,温度的变化会显著影响 *Rop S* 的调控机制,造成其不稳定表达。李沁(2013)选取的副溶血弧菌样品来源差异显著,本身并不具备相同生理条件,因而 *rpo S* 表达不够稳定。中草药中所蕴含的活性成分多为不具药理作用活性物质前体,且不同种类的中草药之间差异很大,其药效发挥的机制十分复杂(吴秋云等, 2018),对细菌的作用机理不能简单地等同于环境因子胁迫,因而 *rpo S* 表达稳定性出现了不同的结果。

本研究结果可用于地榆醇提取物对  $VP_{AHPND}$  相关基因表达量变化的探究,为以地榆为核心药物防控 AHPND 技术的开发做铺垫。这个现象进一步说明内参基因使用前确实需要针对实验条件进行稳定性筛选和验证,才能保证后期研究结果的可靠性。

### 3.3 内参基因丰度对其稳定性评价的影响

基因的表达丰度( $C_t$ 值)是筛选最适内参基因时的重要选择依据, $C_t$ 值过大或过小会使 qRT-PCR 数据分析时很难准确地减去基线值(Vandesompele *et al.*, 2002)。Wan 等(2011)指出,适宜作为内参基因的理想  $C_t$  值范围是 15~30。本研究 *16S rRNA* 使用的是 Ma 等(2015)设计的引物,实验中 *16S rRNA* 的  $C_t$  值范围为 8.14~9.93。本研究中,*16S rRNA* 在副溶血弧菌遭受各种浓度地榆醇提取物的胁迫下,仍表现出较强的稳定性,但其在副溶血弧菌细胞内表达的  $C_t$  值在 4.32~5.16 之间,表达丰度过高,不适宜作为内参基因。这两项研究检测到的副溶血弧菌 *16S rRNA* 的  $C_t$  值范围存在极显著差异,可能是菌株差异或者是培养环境不同所引起的。作者所使用的副溶血弧菌( $VP_{AHPND}$ )为能引起凡纳滨对虾 AHPND 的临床分离株,与 Ma 等(2015)使用的菌株存在时间、地域和环境差异。Radonic 等(2004)也指出,*rRNA* 转录是通过 RNA 聚合酶 I 进行的,不适于作为内参基因。本研究使用的其他 5 种候选内参基因的平均  $C_t$  值均介于内参基因的理想  $C_t$  值范围内( $15 < C_t < 30$ ),可作为候选内参基因。

### 3.4 最适内参基因数量分析

在基因表达检测过程中,如果实验精度要求较高,可通过计算配对变异系数确定最适内参基因数量,来减小单一内参基因引起的误差。Vandesompele 等(2002)提出通过配对变异系数评价最适内参基因个数的方法,即首先计算 2 个最稳定的内参基因在所有样品中的标准化因子( $NF_2$ ),然后,逐步引入其他内参基因,计算标准化因子( $NF_n$ ),直至第  $n+1$  内参的引入对  $NF_{n+1}$  无显著影响时停止引入。接着计算配对

变异系数( $V_n/V_{n+1}$ ),来反映新引入的内参基因对  $NF_{n+1}$  影响。Vandesompele 等(2002)建议将  $V_{n/(n+1)}=0.15$  作为一个参考值,当  $V_{n/(n+1)} > 0.15$  时,则有必要引入第  $n+1$  个基因,而  $V_{n/(n+1)} < 0.15$  时,则表明该实验条件下最适内参基因个数为  $n$ 。本研究得出  $V_2/V_3=0.077$ ,即选择的最适内参基因个数为 2。综合以上结果,本研究仅筛选 *rpo S* 和 *gapdh* 作为该条件下最稳定的内参基因。

## 4 结 论

本研究就地榆醇提取物胁迫下  $VP_{AHPND}$  生长变化和该条件下  $VP_{AHPND}$  中 6 种常见内参基因(*rec A*、*pvs A*、*pvu A*、*gapdh*、*16S rRNA* 和 *rpo S*)的稳定性进行评价。结果验证了地榆对  $VP_{AHPND}$  的抑制效果,并推荐 *rpo S* 和 *gapdh* 作为该条件下内参基因,其效果会优于只使用单一的内参基因。这为以地榆为核心药物的 AHPND 防控技术的建立和从基因表达角度研究地榆对  $VP_{AHPND}$  的作用机理提供了基础,同时,也为中草药药理作用的深入挖掘提供了研究思路。

## 参 考 文 献

- Cai JP, Li J, Thompson KD, *et al.* Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 47(1): 84–86
- Cai LT, Li SY, Ge MF, *et al.* Effect of three pathogenic *Vibrios* on the blood biochemical parameters of *Pseudosciaena crocea*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 65–72 [蔡林婷, 李思源, 葛明峰, 等. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼血液生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 65–72]
- Cepollaro S, Della BE, De BD, *et al.* Evaluation of RNA from human trabecular bone and identification of stable reference genes. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(6): 4401–4407
- Chen IH, Chou LS, Chou SJ, *et al.* Selection of suitable reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in peripheral blood samples of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Scientific Reports*, 2015, 5(8): 15425
- Chen MM, Dong X, Qiu L, *et al.* Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* ( $VP_{AHPND}$ ) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93–100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌( $VP_{AHPND}$ )的定量分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93–100]
- Coutard F, Lozach S, Pommepey M, *et al.* Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16):

- 5183–5189
- Deindl E, Boengler K, Van RN, *et al.* Differential expression of *GAPDH* and  $\beta$ -actin in growing collateral arteries. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 236(1–2): 139–146
- Delorenzo DM, Moon TS. Selection of stable reference genes for RT-qPCR in *Rhodococcus opacus* PD630. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 6019
- Gomes AEI, Stuchi LP, Siqueira NMG, *et al.* Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9001
- Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 373–395
- Jia D, Shi CY, Huang J, *et al.* Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103–111 [贾丹, 史成银, 黄捷, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病(AHPND)病原分离鉴定及其致病性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103–111]
- Jiang Y. In vitro bacteriostatis Chinese herb compound selection for acute hepatopancreas necrosis syndrome in *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016, 1–51 [姜燕. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病防治中草药的筛选. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016, 1–51]
- Kumar V, Baruah K, Nguyen DV, *et al.* Phloroglucinol-mediated Hsp70 production in crustaceans: protection against *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Frontiers in Immunology*, 2018, 5(9): 1091
- Lee SA, Son JH, Kwak JH, *et al.* Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorba officinalis* L. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2004, 47(1): 141–145
- Li Q. Different expression level of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* under different environmental samples and establishing a quantification method of viable *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 10–26 [李沁. 不同环境样品中副溶血性弧菌毒力基因表达差异研究及副溶血性弧菌活菌定量方法的建立. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 10–26]
- Li Q, Peng ZY, Chen XP, *et al.* Selection of reference genes for virulence gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3): 306–312
- Lin XZ, He ZG, Li WX, *et al.* Validation of reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction analysis in *Lactobacillus plantarum* R23 under sulfur dioxide stress conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2018, 24(3): 390–395
- Ma YJ, Sun XH, Xu XY, *et al.* Investigation of reference genes in *Vibrio parahaemolyticus* for gene expression analysis using quantitative RT-PCR. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144362
- Pu HY, Li XY, Du QB, *et al.* Research progress in the application of Chinese herbal medicines in aquaculture: A review. *Engineering*, 2017, 3(5): 731–737
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(4): 856–862
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, *et al.*  $\beta$ -actin: An unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15(5): 307–311
- Shyne APS, Sobhana KS, George KC, *et al.* Phenotypic characteristics and antibiotic sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diseased groupers (*Epinephelus* spp.). *Journal of the Marine Biological Association of India*, 2008, 50(1): 1–6
- Soto-Rodriguez SA, Gomez-Gil B, Lozano-Olvera R, *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(5): 1689–1699
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 2000, 29(2): 332–337
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 2002, 3(7): research0034
- Vanguilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 619–626
- Wan H, Yuan W, Ruan M, *et al.* Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annum* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 416(1–2): 24–30
- Wang S, Wang JQ, Lv XW. Selection of reference genes for expression analysis in mouse models of acute alcoholic liver injury. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(6): 3527–3536
- Wu QY, Huang L, Pi Z, *et al.* Research progress of antibacterial activity and mechanism of Chinese herbal medicine. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2018, 37(1): 25–29 [吴秋云, 黄琳, 皮真, 等. 中草药抑菌作用及其机制研究进展. *中兽医医药杂志*, 2018, 37(1): 25–29]
- Xue B, Zhang P, Li ZH, *et al.* Cloning, expression and stability analysis of the reference gene glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1003–1012 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾 *GAPDH* 基因的克隆及其内参基因稳定性分析. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1003–1012]
- Yang J, Yoo J, Cho W, *et al.* Ethanol extract of *Sanguisorba Radix* inhibits mast cell degranulation and suppresses 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2947390
- Yang L, Chen JN, Liu Y, *et al.* Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in *Ralstonia pseudosolanacearum* CQPS-1 under environment stress. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 148: 104–109
- Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 2005, 6(1): 4



Zheng Z, Aweya JJ, Wang F, *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) related microRNAs in *Litopenaeus vannamei* infected with AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 335

Zhong H, Simons JW. Direct comparison of *GAPDH*,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and *28S rRNA* as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 259(3): 523–526

(编辑 冯小花)

## Effects on the Growth of Shrimp Pathogen VP<sub>AHPND</sub> and Selection of Suitable Reference Genes Under Different Concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. Alcoholic Extracts

YANG Zeyu<sup>1,2</sup>, LIAO Meijie<sup>2,3</sup>①, WANG Yingeng<sup>2,3</sup>, ZHANG Zheng<sup>2,3</sup>,  
WEI Xinxian<sup>4</sup>, LI Bin<sup>2,3</sup>, RONG Xiaojun<sup>2,3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021)

**Abstract** The identification of reference genes is critical for the establishment of sensitive and reproducible qRT-PCR-based assays. The current study was designed to explore the effects on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains (VP<sub>AHPND</sub>) on the growth of shrimp in the presence of different concentrations of *Sanguisorba officinalis* L. alcoholic extracts and to select the optimal reference genes suitable for the evaluation of the inhibitory effect of *S. officinalis* L. on VP<sub>AHPND</sub>. The expression of six common candidate reference genes (*rec A*, *pvs A*, *pvu A*, *gapdh*, *16S rRNA*, and *rpo S*) of VP<sub>AHPND</sub> under stress induced by *S. officinalis* L. alcoholic extracts were detected by qRT-PCR. Data analysis was conducted using the GeNorm, Norm Finder, Best Keeper, Delta CT, and Ref Finder software packages. The results showed that *S. officinalis* L. alcoholic extracts had a strong inhibitory effect on *V. parahaemolyticus*. The amplicons of these six genes had good specificity under the stress induced by different concentrations of *S. officinalis* L. extract. The lowest variation in *Ct* value was found for *16S rRNA* (CV=3.88), and the highest variation occurred in *pvs A* (CV=12.53). The stability of the six reference genes judged by the five methods was as follows: The stability order results were: *rpo S* = *16S rRNA* > *gapdh* > *rec A* > *pvu A* > *pvs A* from GeNorm; *gapdh* > *rpo S* > *pvu A* > *16S rRNA* > *rec A* > *pvs A* from Norm Finder; *16S rRNA* > *rpo S* > *gapdh* > *rec A* > *pvu A* > *pvs A* from Best Keeper; and *gapdh* > *rpo S* > *pvu A* > *16S rRNA* > *rec A* > *pvs A* from Delta *Ct*. The comprehensive ranking result from by Ref Finder was *rpo S* > *gapdh* > *16S rRNA* > *pvu A* > *pvs A* > *rec A*. After consideration of the pairwise variations, it is recommended to use both *rpo S* and *gapdh* as reference genes in these conditions. It was also revealed that the stability of reference genes differed between different strains and under different experimental conditions. With the improved experimental accuracy requirements, screening and verification of the appropriate reference gene has become an essential part of the experimental methodology. The results provide a foundation to support the study of the inhibitory mechanism of *S. officinalis* L. on VP<sub>AHPND</sub> through the perspective of gene expression. It is of great significance for the establishment of AHPND-prevention technology using *S. officinalis* L. as the core drug.

**Key words** Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND); *Vibrio parahaemolyticus*; *Sanguisorba officinalis* L.; Reference genes; qRT-PCR

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn