

外源 AHLs 培养下荧光假单胞菌 qPCR 内参基因的筛选

崔方超¹, 王芸婷¹, 王当丰¹, 檀茜倩¹, 李秋莹¹, 励建荣^{1*}, 李婷婷^{2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

中国轻工业海水鱼加工重点实验室 辽宁锦州 121013

²大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

摘要 目的: 荧光假单胞菌是冷藏食品的优势腐败菌, 其致病基因受到群体感应系统的调控。为了准确定量腐败基因的表达, 研究群体感应调控食品腐败的机制, 需筛选荧光假单胞菌的内参基因。方法: 以荧光假单胞菌 PF-08 为研究对象, 选择 8 个常见的内参基因 (*dsbA*、*carA*、*rpsL*、*gyrB*、*atpD*、*rpoD*、*gltA*、*16S rRNA*), 添加不同类型群体感应信号分子培养后, 利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测其基因表达量, 采用 geNorm、Normfinder、BestKeeper 和 RefFinder 综合评估候选内参基因的表达稳定性, 筛选最适内参基因。结果: 在不同类型外源信号分子培养下, 荧光假单胞菌中 Ct 值变化程度最小的是 *gltA*, *16S rRNA* 的 Ct 值过低; geNorm 分析表达最稳定的内参基因是 *atpD* 和 *rpoD*, 且二者联用能准确定量目的基因表达水平; Normfinder 和 BestKeeper 的分析结果都显示 *gltA* 是最稳定的内参基因; 进一步用 RefFinder 综合评估, 内参基因中表达较稳定的是 *rpoD* 和 *gltA*。结论: *rpoD* 和 *gltA* 在荧光假单胞菌经不同 QS 信号分子处理后均稳定表达, 可用于后续荧光假单胞菌腐败基因的表达研究, 也可为研究其它腐败菌的 QS 相关基因表达提供内参基因参考。

关键词 荧光假单胞菌; 群体感应; 实时荧光定量 PCR; 内参基因

文章编号 1009-7848(2024)02-0032-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.02.003

实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 因特异性强、灵敏度高、定量准确、高通量、操作简便等优点, 而被广泛应用于基因表达的研究中^[1]。qPCR 检测基因表达水平的定量方法分为绝对定量和相对定量。相较于相对定量法, 使用绝对定量法需要构建不同梯度稀释的标准品并绘制标准曲线来计算目的基因模板的起始量, 操作更为繁琐且增加了试验难度^[2]。因此, 在使用 qPCR 检测基因表达水平时大多采用相对定量法, 通常需要引入一个在不同样本内表达稳定的基因作为内参基因, 从而校准目的基因的表达量^[3]。常用的内参基因有 *GAPDH* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、*ACT* (肌动蛋白)、*TUB* (微管蛋白)、*His* (组蛋白)、*16S rRNA* (16S 核糖体 RNA) 等。大量研究表明, 上述内参基因有可能因物种、生长阶段或发育

条件的不同而表达不稳定, 因此, 需要根据试验条件选择能够稳定表达的内参基因来保证 qPCR 结果准确可靠^[4-6]。

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 属于革兰氏阴性需氧杆菌, 具有脂解和蛋白水解活性, 是奶类^[7]、水产品^[8]、肉制品^[9]等食品在冷藏条件下的优势腐败菌。荧光假单胞菌能产生生物被膜、胞外蛋白酶、嗜铁素等多种致病因子, 导致食品腐败变质, 分泌酮类、醛类、醇类等多种挥发性有机化合物, 散发令人不快的气味^[8, 10-11]。作为常见的致病性嗜冷菌, 荧光假单胞菌对环境适应力强, 其产生的蛋白酶和脂肪酶极其耐热, 这不仅缩短了食品的货架期, 还有可能危害到人体健康。研究表明, 荧光假单胞菌的腐败特性如生物被膜的形成、胞外蛋白酶的分泌等受群体感应 (Quorum sensing, QS) 系统的调控^[12]。QS 系统是一种细菌通讯机制, 微生物通过信号分子监测群体密度并激活相关基因表达来调节其生理行为以适应环境变化^[13]。近年来以荧光假单胞菌等腐败菌的 QS 系统为靶标来调控其腐败特性已成为研究热点^[14-16]。通过致病因子的表征和腐败基因的表达来探索食品腐败机制, 其中对腐败基因表达水平的检测大多

收稿日期: 2023-02-08

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (U20A2067); 辽宁省自然科学基金博士科研启动基金计划 (2022-BS-301)

第一作者: 崔方超, 男, 博士, 副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

采用 qPCR 技术,大部分都以 *16S rRNA* 作为内参基因。目前内参基因的筛选分析多围绕动物与植物,对微生物内参基因的研究较少,尚未有有关荧光假单胞菌在 QS 方面内参基因筛选方面的研究报道。

本文以荧光假单胞菌 PF-08 为试验菌株,根据文献查找和前期基因组测序结果,选择 8 个候选内参基因(*dsbA*、*carA*、*rpsL*、*gyrB*、*atpD*、*rpoD*、*gltA*、*16S rRNA*),通过 qPCR 研究不同 QS 信号分子培养下候选内参基因的表达水平。利用 geNorm^[17]、Normfinder^[18]、BestKeeper^[19]和 RefFinder^[20]分析这 8 个候选内参基因的表达稳定性,从而筛选出合适的内参基因,为利用 qPCR 技术研究荧光假单胞菌 QS 相关的致病基因表达提供科学依据;也为其它腐败菌在 QS 方面的基因定量研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

荧光假单胞菌 PF-08 (从腐败大菱鲆中分离纯化)保藏于渤海大学食品科学与工程学院。

C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL,美国 Sigma 公司;LB 肉汤,青岛高科园海博生物技术有限公司;固相表面 RNase 清除剂、EZ-10 总 RNA 小量提取试剂盒、RNase-Free DNA 清除试剂盒、Taq PCR 预混液 (2X, 含红染料)、DNA Marker、4S Green 核酸染色剂、琼脂糖,生工生物工程(上海)股份有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 仪器与设备

Imark 酶标仪、GelDoc XR+全自动凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;Legend Micro21R 台式微量离心机、NanoDrop One 超微量紫外-可见分光光度计、Applied Biosystems StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo 公司;Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养及外源 AHLs 处理 将过夜活化后的荧光假单胞菌 PF-08 按照体积比 1:100 的比例接种于 10 mL 含有 2 μg/mL 不同类型(C₄-HSL、C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL)外源信号分子的 LB 肉汤中,以未添加外源 AHLs 的 LB 肉汤作为对照,28 °C、160 r/min 摇床培养至 OD_{595nm} 为 1 左右。

1.3.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 取 1.3.1 节的 7 个菌液样本,使用 EZ-10 总 RNA 小量提取试剂盒及 RNase-Free DNA 清除试剂盒提取总 RNA;为了防止 RNA 降解,需在低温环境下快速操作,还需要用固相表面 RNase 清除剂来清洁工作环境。提取的总 RNA 经过超微量分光光度计和 1.0%琼脂糖凝胶电泳联合检测,分析其纯度和浓度是否达标。以检测合格的总 RNA 为模板,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)试剂盒合成 cDNA。

1.3.3 候选内参基因选择和引物设计及特异性检测 根据文献选取 8 个常见的管家基因作为候选内参基因(表 1);*dsbA*、*carA*、*rpsL*、*gyrB*、*atpD*、*rpoD*、*gltA*、*16S rRNA*。它们要么在碳水化合物代谢中起关键作用,要么曾被用作系统发育标记。

表 1 选定的候选内参基因

Table 1 Selected candidate reference genes

基因名称	基因编号	在染色体的定位/bp	功能	序列长度/bp	参考文献
<i>dsbA</i>	WP_032862653.1	81 560~82 195 ⁺	硫醇:二硫交换蛋白	635	[21]
<i>carA</i>	WP_017478562.1	847 393~848 442 ⁺	氨甲酰磷酸合成酶小亚基	1 049	[22]
<i>rpsL</i>	WP_002555494.1	5 368 088~5 368 459 ⁻	30S 核糖体蛋白 S12	371	[21]
<i>gyrB</i>	WP_029290197.1	3 793~6 210 ⁺	DNA 回旋酶亚基 B	2 417	[21], [23]-[26]
<i>atpD</i>	WP_015886645.1	6 014 483~6 015 859 ⁻	F-ATP 酶亚基 β	1 376	[22]
<i>rpoD</i>	WP_003211014.1	5 442 953~5 444 803 ⁺	RNA 聚合酶 σ 因子	1 850	[21], [24]-[26]
<i>gltA</i>	WP_003222994.1	1 840 653~1 841 942 ⁻	II 型柠檬酸合成酶	1 289	[24]
<i>16S rRNA</i>	CP032618.1	—	16S 核糖体 RNA	1 479	[21], [22], [26]

注:“+”代表正链,即编码链;“-”代表负链,即模板链。

根据前期基因组测序结果(GenBank 登录号: CP032618)^[27]获得候选内参基因的序列,基于

qPCR 反应对引物特异性的要求设计这 8 个内参基因的上下游引物(表 2),由上海生工生物合成。

表 2 选定的候选内参基因的引物序列

Table 2 Primer sequences for selected candidate reference genes

基因名称	引物序列 5'-3' (Forward/Reverse)	引物长度/bp	GC 含量/%	TM/°C	产物长度/bp
<i>dsbA</i>	GGCGTGGACAAGGACAAGTTC	22	59.1	61.5	129
	TTGCCGTTGACGATCAGGGTTG	22	54.5	60.6	
<i>carA</i>	TACCGATCCTTCTACGCCAAC	23	56.5	61.3	137
	CAACCAGTGGCAGGTCACGAATC	23	56.5	61.2	
<i>rpsL</i>	AACCTAACTCGGCACTGCGTAAAG	24	50.0	59.6	116
	GATCAGTACCAGCTGTGCTCTTG	24	54.2	60.4	
<i>gyrB</i>	TGCGGTCAACCAGGTGTTCC	20	60.0	61.1	271
	CGAGATAATCGCGGTCAGG	19	57.9	55.8	
<i>atpD</i>	GCATTCACCGTCCAGCACCTTC	22	59.1	61.8	121
	AACAGACCGACTTTACCGCCTTTG	24	50.0	59.8	
<i>rpoD</i>	CGAACTTGCGTCTGGTGATCTCC	23	56.5	60.6	94
	ATCAAGCCGATGTTGCCTTCCTG	23	52.2	60.3	
<i>gltA</i>	CCATGCCGACCACGAACAGAAC	22	59.1	61.7	85
	GGCGATACAGGCGAACGGATTG	22	59.1	61.5	
16S rRNA	GTAGTCCACGCGTAAACGA	20	55.0	58.7	234
	CCGAAGGCACCAATCTATCTC	21	52.4	58.9	

以 1.3.2 节获得的 cDNA 为模板,引物见表 2,对这 8 个候选内参基因进行 PCR 扩增,检测其特异性,反应体系和程序参照 Taq PCR 预混液(2X,含红染料)的使用说明。通过 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增后的产物,观察各基因在这 7 个样本的条带大小是否与预期一致,以及是否有杂带产生。

1.3.4 qPCR 分析 使用 TB Green® *Premix Ex Taq*TM II 试剂盒进行 qPCR 反应,每个样本重复 3 次,并设置空白对照 NTC(用灭菌水代替 cDNA 作模板)。10 μL 反应体系:1 μL 模板(cDNA 或灭菌水),各 0.4 μL 的上下游引物(10 μmol/L),5 μL TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus),0.2 μL ROX Reference Dye(校正孔间产生的荧光信号误差),3 μL 灭菌水。反应程序包含 3 个过程,分别是预变性、PCR 反应(退火温度 60 °C,40 个循环)和溶解曲线,其它温度和时间参照试剂盒说明书。

1.4 数据分析

StepOneTM Software v2.3 软件自动得出各样本的 Ct 值,利用 geNorm、Normfinder、BestKeeper

3 个程序和 RefFinder 网站(<http://bloome.cn/RefFinder/>)对数据进行分析,评估 8 个候选内参基因的表达稳定性。geNorm 是 Vandesompele 等^[17]基于 Microsoft Excel 编写的一个 Visual Basic 应用程序(VBA),可以识别给定组织中表达最稳定的内参基因,并确定计算可靠归一化因子所需的最少基因数即内参基因最佳数量。NormFinder 程序植根于基因表达的数学模型,该模型不仅能估计候选基因的总变化,而且能估计样本组之间的变化^[18]。与上述两个程序不同,除了比较内参基因间的稳定性,BestKeeper 程序还可以同时比较目的基因的表达水平,一次最多能分析 100 个样本中 10 个内参基因和 10 个目的基因的表达水平^[19]。RefFinder 网站集成了以上 3 个软件的算法和比较 delta-Ct 方法^[28]来对候选内参基因的表达稳定性进行排序^[20]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测

7 个样本总 RNA 的浓度和纯度(A_{260nm}/A_{280nm} 与 A_{260nm}/A_{230nm})通过超微量分光光度计检测,结果

见表 3。根据 cDNA 的反应体系, RNA 的质量浓度不能低于 77.0 ng/μL。表 3 中所有样本总 RNA 的质量浓度都较高, 最低值为 462.3 ng/μL, 最高值为 1 240.2 ng/μL。RNA 纯度指示值中的 A_{260nm} 、 A_{280nm} 、 A_{230nm} 分别代表了核酸、蛋白质、碳水化合物的吸收峰。所有样本总 RNA 的 A_{260nm}/A_{280nm} 比值均在 2.1~2.2 之间, 没有低于 2.0, 表示 RNA 没有受蛋白质或酚类物质污染; 虽然略高于纯 RNA 的比值 2.0, 但没有超过 2.2, 表示 RNA 虽存在降解但程度不深。所有总 RNA 的 A_{260nm}/A_{230nm} 均大于 2.0, 说明样本没受碳水化合物、胍盐等污染, RNA 的纯度良好。从图 1 可以看到, 1~7 泳道均有两条明亮清晰的条带分别代表 28S rRNA 和 18S rRNA, 且没有明显的弥散现象, 说明提取的总 RNA 完整性较好, 浓度较高且降解程度较低。总之, 提取的总 RNA 均质量良好, 可用于合成 cDNA。

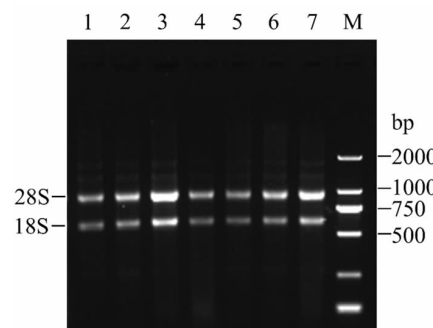
2.2 引物特异性检测

以 cDNA 为模板, 通过 PCR 反应和 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测这 8 个内参基因的 qPCR 引物是否具有特异性。从图 2 中可以看到这 8 个候选内参基因的 PCR 产物大小与预期一致, 且条带清晰单一, 并无引物二聚体产生。这 8 个内参基因的引物均具有良好的特异性, 满足 qPCR 试验对引物的要求。

表 3 外源 AHLs 培养下荧光假单胞菌的总 RNA 质量检测

Table 3 Quality detection of total RNA of *Pseudomonas fluorescens* under the culture of exogenous AHLs

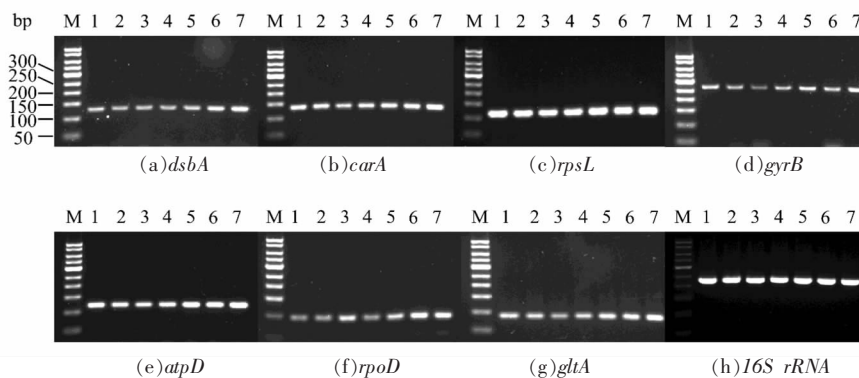
样品名称	RNA 质量浓度/ng·μL ⁻¹	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}
CK	509.4	2.13	3.12
C4-HSL	692.9	2.17	2.87
C6-HSL	940.2	2.12	2.81
C8-HSL	462.3	2.11	3.41
C10-HSL	817.5	2.17	2.90
C12-HSL	745.8	2.17	3.00
C14-HSL	1 240.2	2.15	2.80



注: 1. CK; 2. C₄-HSL; 3. C₆-HSL; 4. C₈-HSL; 5. C₁₀-HSL; 6. C₁₂-HSL; 7. C₁₄-HSL; M. DNA Marker(100~2 000 bp)。

图 1 外源 AHLs 培养下荧光假单胞菌的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *Pseudomonas fluorescens* under the culture of exogenous AHLs



注: 1. CK; 2. C₄-HSL; 3. C₆-HSL; 4. C₈-HSL; 5. C₁₀-HSL; 6. C₁₂-HSL; 7. C₁₄-HSL; M. DNA Marker L(50~500 bp)。

图 2 候选内参基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of candidate reference genes

2.3 qPCR 结果分析

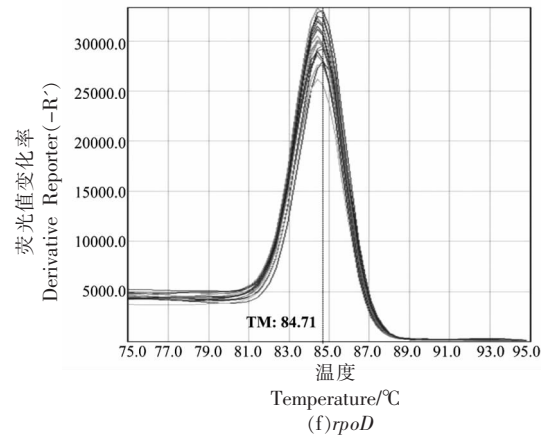
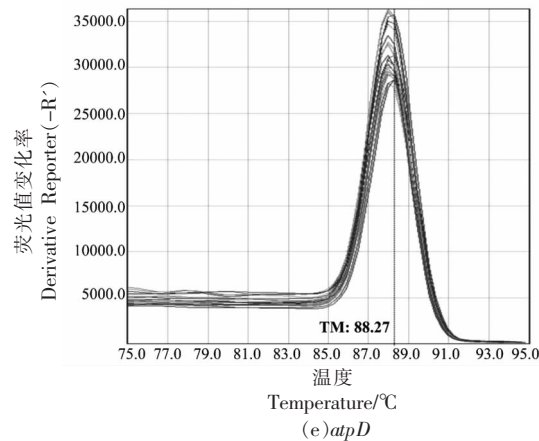
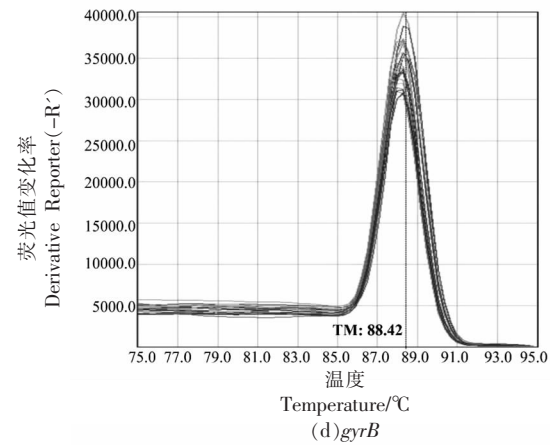
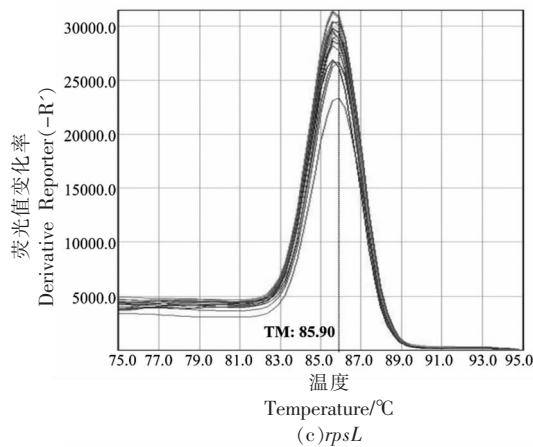
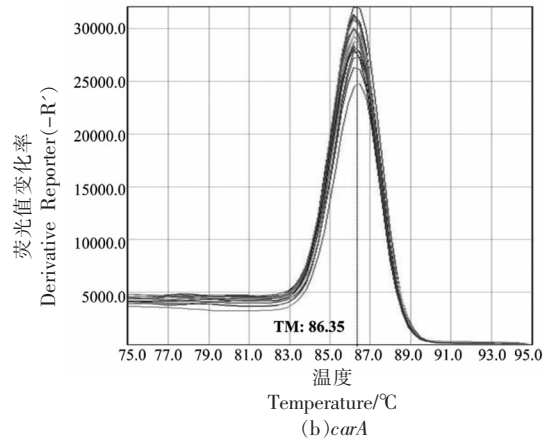
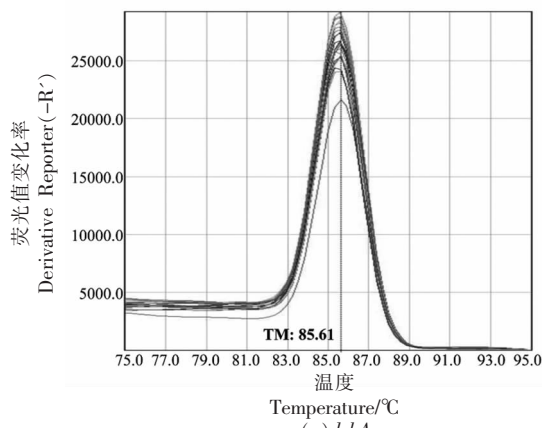
由图 3 可知, 8 个候选内参基因的溶解曲线

均呈现特异的单一信号峰, 没有产生非特异性杂峰, 不存在引物二聚体, 进一步验证这 8 个候选内

参基因的引物均特异性良好。qPCR 试验结果准确可靠,Ct 值可以用于后续分析。

Ct 值是指反应管内的荧光信号在 qPCR 扩增过程中达到阈值(软件自动设定在从基线到指数增长的拐点)时的扩增循环数。qPCR 国际化标准(MIQE 指南)^[29]指出,Ct 值与该基因的起始模板浓度负相关,Ct 值越小则该基因在样本中的表达丰度越高。内参基因的 Ct 值应在 10~25 之间,表达丰度过高或过低都不利于定量目的基因的表达水

平。因此,由图 4 可知,16S rRNA 的 Ct 值偏低,其它基因的 Ct 值均在 16.02~21.58 之间。比较同一内参基因在 7 个样本间的 Ct 值变化程度,由小到大依次为:*gltA*、*rpoD*、*atpD*、*rpsL*、*carA*、16S rRNA、*dsbA*、*gyrB*。结果表明,*gltA* 的 Ct 值变化程度最小,表达稳定性最高,其次是 *rpoD*。根据 Ct 值直接判断出最适内参基因还不够准确,仍需要通过 geNorm、Normfinder、BestKeeper 和 RefFinder 进一步分析并综合评估。



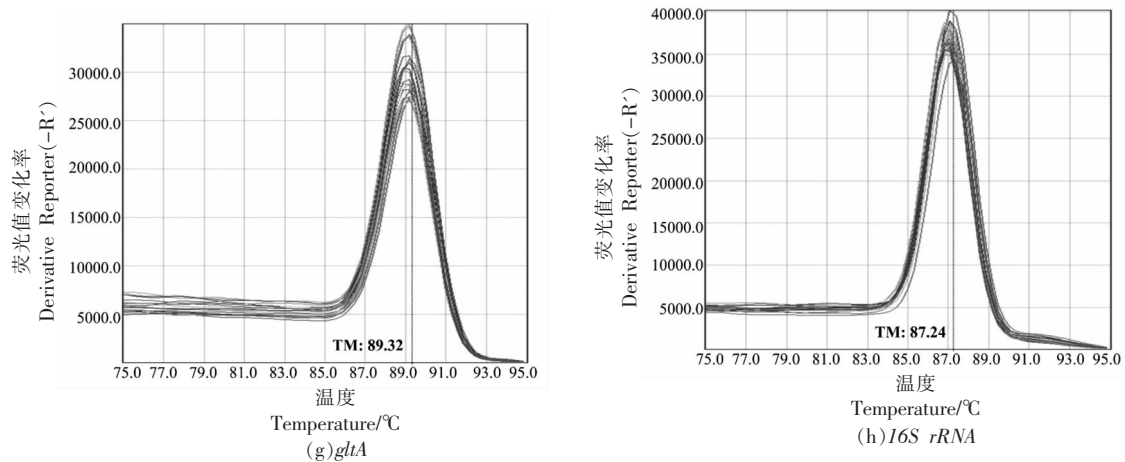


图 3 候选内参基因 qPCR 溶解曲线

Fig.3 The qPCR melting curves of candidate reference genes

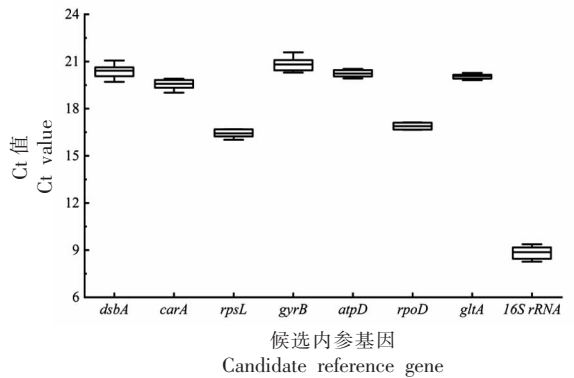


图 4 候选内参基因 qPCR 的 Ct 值分布图

Fig.4 The qPCR Ct value distribution of candidate reference genes

2.4 候选内参基因稳定性分析

评估内参基因表达稳定性的几个程序各有不同的使用要点和分析侧重点，最常用的程序是 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper^[30]。

内参基因的表达稳定性在 geNorm 程序中表示为 M 值, M 值是某一内参基因与其它内参基因表达水平的两两比值经对数变换后的平均标准差。以 1.5 为阈值, M 值超过 1.5 就表示该基因表达不稳定, 不适宜作内参基因。从图 5a 中可知较稳定的内参基因为 *atpD* 和 *rpoD*, 且 8 个基因的 M 值均低于 1.5, 可被列为候选内参基因。geNorm 还可以确定内参基因的最适数目, 通过对标准化因子进行差异分析计算配对变异 V 值, 选择出 2

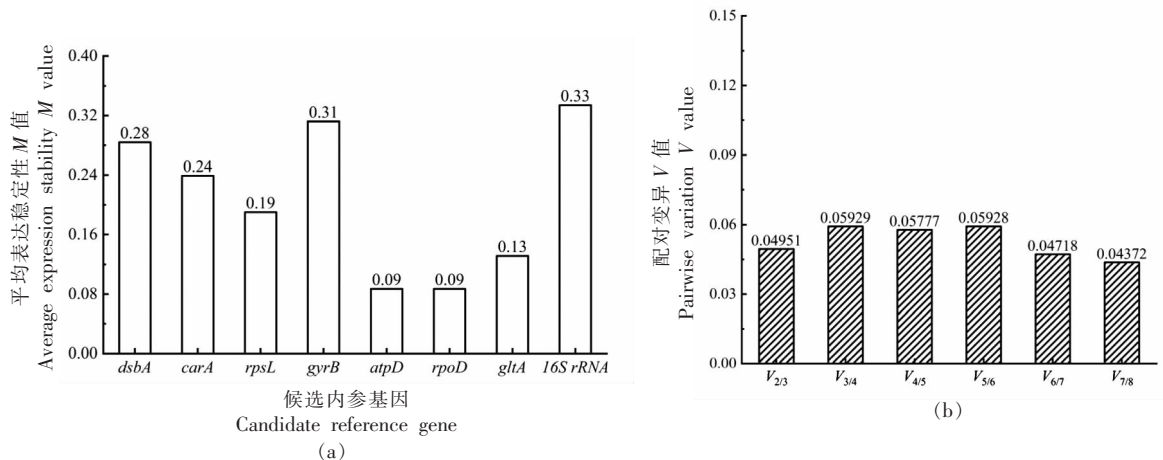


图 5 geNorm 分析候选内参基因的表达稳定性 (a) 和最适内参基因数目 (b)

Fig.5 geNorm analyzes the expression stability of candidate reference genes (a) and the optimal number of reference genes (b)

个及以上的内参基因。以 0.15 为阈值,当 $V_{n/n+1}$ 低于 0.15,就表示用 n 个基因同时作为内参基因,取均值后定量目的基因,可以得到更可靠的试验结果。图 5b 中的 $V_{n/n+1}$ 值均低于 0.15,则最少可选用 2 个内参基因。结合图 5a, *atpD* 和 *rpoD* 作为内参基因联合使用,可以减少试验误差,更准确地分析基因表达量。

NormFinder 直接比较内参基因在样本组内和组间的表达差异,结果用稳定性值(SV)表示,根据 SV 值大小对内参基因进行排序,SV 值最小的基因即为最适内参基因。从图 6 可知,基因表达最稳定的为 *gltA*, 其次是 *rpsL*, 最不稳定的为 *16S rRNA*。

与以上两个程序不同, BestKeeper 直接分析各内参基因的 Ct 值,通过 Ct 值计算表达水平的标准差(SD)来评估内参基因的稳定性,SD 值越小则基因表达越稳定。因此,表 4 中基因表达稳定性由高到低依次为 *gltA* > *rpoD* > *rpsL* > *atpD* > *carA* > *16S rRNA* > *dsbA* > *gyrB*。另外,为了评估所有候选内参

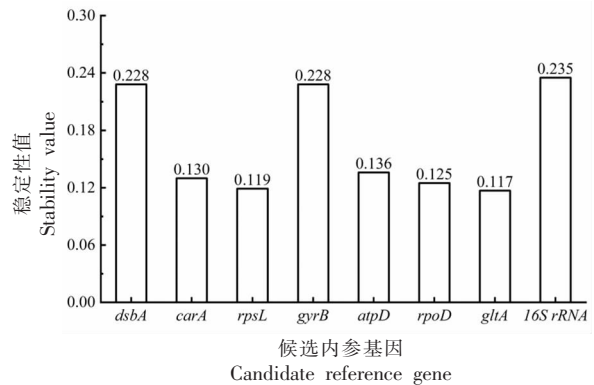


图 6 NormFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

Fig.6 NormFinder analyzes the expression stability of candidate reference genes

基因间的关系, BestKeeper 还进行了成对的相关分析,皮尔逊相关系数 r 和 P 值见表 4。 *rpsL* 与其它基因的相关性最高,其次是 *carA* 和 *16S rRNA*, 这 3 个基因也达到显著水平 ($P < 0.05$), *gltA* 的相关性最低。

表 4 BestKeeper 分析候选内参基因的表达稳定性

Table 4 BestKeeper analyzes the expression stability of candidate reference genes

基因名称	标准差(SD[±Ct])	标准差(SD[±x-fold])	相关系数	P 值
<i>dsbA</i>	0.33	1.26	0.732	0.062
<i>carA</i>	0.24	1.18	0.792	0.034
<i>rpsL</i>	0.18	1.13	0.821	0.023
<i>gyrB</i>	0.36	1.28	0.733	0.061
<i>atpD</i>	0.21	1.15	0.591	0.162
<i>rpoD</i>	0.17	1.12	0.582	0.170
<i>gltA</i>	0.12	1.09	0.527	0.223
<i>16S rRNA</i>	0.32	1.25	0.776	0.040

RefFinder 网站通过以上 3 个软件的算法和比较 delta-Ct 方法对候选内参基因的表达稳定性进行比较和排名,同时根据各程序的结果采用几何平均值法进行综合排名。网站的操作很简便,用户只需要在窗口输入各候选内参基因的 Ct 值,即可得出候选内参基因的表达稳定性排名。结果见表 5, geNorm、Normfinder、BestKeeper 在网站中的排名和上面单独使用程序得出的稳定性排名,其结果相一致。从综合排名来看,这 8 个候选内参基因中表达稳定性较高的是 *rpoD* 和 *gltA*, 稳定性最低的是 *16S rRNA*。因此, *rpoD* 和 *gltA* 适宜选为荧

光假单胞菌在外源 AHLs 培养下基因表达的内参基因。

3 讨论与结论

荧光假单胞菌是冷藏食品的优势腐败菌,其致病因子如生物被膜、蛋白酶和脂肪酶的合成都受到 QS 信号分子的调控^[12,31]。在探索 QS 对食品腐败调控机制的过程中,需要用到能够稳定表达的内参基因来准确定量致病基因的表达。因此,本文通过 qPCR 技术研究了 8 个常见的候选内参基因 (*dsbA*、*carA*、*rpsL*、*gyrB*、*atpD*、*rpoD*、*gltA*、*16S*

表 5 候选内参基因表达稳定性排名

排名顺序	geNorm	NormFinder	BestKeeper	delta-Ct	综合排名
1	<i>atpD/rpoD</i>	<i>gltA</i>	<i>gltA</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpoD/ gltA</i>
2		<i>rpsL</i>	<i>rpoD</i>	<i>gltA</i>	
3	<i>gltA</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>atpD</i>	<i>atpD</i>
4	<i>rpsL</i>	<i>carA</i>	<i>atpD</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpsL</i>
5	<i>carA</i>	<i>atpD</i>	<i>carA</i>	<i>carA</i>	<i>carA</i>
6	<i>dsbA</i>	<i>gyrB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>dsbA</i>	<i>dsbA</i>
7	<i>gyrB</i>	<i>dsbA</i>	<i>dsbA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i>
8	<i>16S rRNA</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>gyrB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>16S rRNA</i>

rRNA) 在荧光假单胞菌经不同类型 QS 信号分子培养后的表达情况, 为确保表达稳定性评价准确使用了 geNorm、Normfinder、BestKeeper 和 RefFinder 4 个程序, 综合评估后从 8 个候选内参基因中筛选出最适内参基因。结果表明, 在外源 AHLs 刺激下, 荧光假单胞菌中 *rpoD* 和 *gltA* 的基因表达最稳定, 可用于后续荧光假单胞菌 QS 调控机制的研究中。

目前, 通过 qPCR 技术研究细菌功能基因在不同生长阶段或者不同生长条件下的表达水平, 多以 *16S rRNA* 作为内参基因。在大部分细菌中 *16S rRNA* 都高度保守且具有特异性^[32], 常被用作内参基因, 然而在本文中, *16S rRNA* 的 Ct 值在 8.27~9.37, 表达丰度过高且稳定性最差, 不是荧光假单胞菌内参基因的最佳选择, 最适内参基因为 *rpoD* 和 *gltA*。*rpoD* 编码 RNA 聚合酶 sigma70 因子, 序列保守性超过 50%, 常用于菌株的分类鉴定和进化分析^[33]。*gltA* 编码柠檬酸合酶(三羧酸循环的关键酶), 最近也被用于多位点序列分析和系统发育分析^[34]。Gomes 等^[35]从 11 个基因中筛选出 *recA*、*rho*、*rpoD* 和 *proC* 作为肺炎克雷伯菌在不同生长阶段或环境胁迫下基因表达的最适内参基因。郑永钦等^[36]发现 *rpoD* 在柑橘黄龙病菌中表达稳定性较差, 进一步证明不同物种的最适内参基因不一定相同。此外, geNorm、Normfinder、BestKeeper 这 3 款程序的统计方法皆不相同, 评估候选内参基因的表达稳定性时可能会出现结果不一致的情况, 这就需要进一步使用 RefFinder 对这 3 款程序的结果进行综合评估, 确保筛选结果更为可靠。

综上所述, 本研究通过对候选内参基因层层筛选与全面评估后, 获得了荧光假单胞菌在外源 QS 信号分子培养下表达稳定的 2 个内参基因 *rpoD* 和 *gltA*, 为后续探究荧光假单胞菌致病基因表达提供理论支持; 也为其它腐败菌提供内参基因的参考, 从而在研究 QS 基因表达时获得更可靠的相对定量结果。

参 考 文 献

- [1] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3, 8.
LIANG Z Y, LIU F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020 (6): 1-3, 8.
- [2] BUSTIN S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. J Mol Endocrinol, 2000, 25(2): 169-193.
- [3] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9): e45.
- [4] 李丹丹, 胡博, 王庆, 等. 药用植物内参基因研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 903-910.
LI D D, HU B, WANG Q, et al. The research on reference genes in medicinal plant [J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(3): 903-910.
- [5] SHAKEEL M, RODRIGUEZ A, TAHIR U B, et al. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: An overview in insects [J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(2): 227-236.

- [6] CHAPMAN J R, WALDENSTROM J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141853.
- [7] REICHLER S J, TRMCIC A, MARTIN N H, et al. *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains are responsible for repeat and sporadic postpasteurization contamination and reduced fluid milk shelf life[J]. J Dairy Sci, 2018, 101(9): 7780–7800.
- [8] ZHANG Z C, WU R Y, GUI M, et al. Identification of the specific spoilage organism in farmed sturgeon (*Acipenser baerii*) fillets and its associated quality and flavour change during ice storage [J]. Foods, 2021, 10(9): 2021.
- [9] 陈鑫, 林捷, 孙瑞, 等. 冰鲜鸡胴体内外表面腐败菌及特性研究[J]. 食品工业, 2018, 39(6): 206–210.
- CHEN X, LIN J, SUN R, et al. Study on the surface spoilage bacteria and characteristics of chilled chicken carcasses[J]. The Food Industry, 2018, 39(6): 206–210.
- [10] WANG G Y, WANG H H, HAN Y W, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken *in vitro* and *in situ*[J]. Food Microbiol, 2017, 63: 139–146.
- [11] BELLASSI P, ROCCHETTI G, MORELLI L, et al. A milk foodomics investigation into the effect of *Pseudomonas fluorescens* growth under cold chain conditions[J]. Foods, 2021, 10(6): 1173.
- [12] LI T T, WANG D F, REN L K, et al. Involvement of exogenous *N*-acyl-homoserine lactones in spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated turbot[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2716.
- [13] WHITELEY M, DIGGLE S P, GREENBERG E P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. Nature, 2017, 551(7680): 313–320.
- [14] DONG H N, GAI Y M, FU S P, et al. Application of biotechnology in specific spoilage organisms of aquatic products [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 895283.
- [15] 丁婷, 李婷婷, 王当丰, 等. 水产品腐败菌群体感应系统及群体感应抑制剂研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 227–235.
- DING T, LI T T, WANG D F, et al. Research progress in quorum sensing of spoilage organisms of aquatic products [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(3): 227–235.
- [16] FU L L, WANG C, LIU N N, et al. Quorum sensing system-regulated genes affect the spoilage potential of *Shewanella baltica*[J]. Food Res Int, 2018, 107: 1–9.
- [17] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biol, 2002, 3(7): research0034.1–0034.11.
- [18] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ORNTOFT T F. 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[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5245–5250.
- [19] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(6): 509–515.
- [20] XIE F L, XIAO P, CHEN D L, et al. miRD-eepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs[J]. Plant Mol Biol, 2012, 80: 75–84.
- [21] FRAPOLLI M, DEFAGO G, MOENNE-LOCCHOZ Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol[J]. Environ Microbiol, 2007, 9(8): 1939–1955.
- [22] HILARIO E, BUCKLEY T R, YOUNG J M. Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 86(1): 51–64.
- [23] CALDERA L, FRANZETTI L, VAN COILLIE E, et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods[J]. Food Microbiology, 2016, 54: 142–153.
- [24] HWANG M S H, MORGAN R L, SARKAR S F, et al. Phylogenetic characterization of virulence and

- resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5182–5191.
- [25] MULET M, LALUCAT J, GARCIA –VALDES E. DNA sequence–based analysis of the *Pseudomonas species*[J]. Environ Microbiol, 2010, 12(6): 1513–1530.
- [26] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and *16S rRNA* genes[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48 (Pt 3): 813–819.
- [27] WANG D F, CUI F C, REN L K, et al. Complete genome analysis reveals the quorum sensing–related spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* PF08, a specific spoilage organism of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 856802.
- [28] SILVER N, BEST S, JIANG J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real–time PCR [J]. BMC Mol Biol, 2006, 7: 33.
- [29] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real–time PCR experiments[J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 611–622.
- [30] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. 现代农业科技, 2017(5): 278–281.
- WU J Y, HE B, DU Y J, et al. Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(5): 278–281.
- [31] HARAMATI R, DOR S, GUREVICH D, et al. Mining marine metagenomes revealed a quorum – quenching lactonase with improved biochemical properties that inhibits the food spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens*[J]. Appl Environ Microbiol, 2022, 88(4): e0168021.
- [32] YANG B, WANG Y, QIAN P Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17: 135.
- [33] LAURITSEN J G, HANSEN M L, BECH P K, et al. Identification and differentiation of *Pseudomonas species* in field samples using an rpoD amplicon sequencing methodology [J]. mSystems, 2021, 6(4): e0070421.
- [34] 周密密, 刘晓宇, 杨静, 等. 日本菜豆种子中菜豆晕疫病菌的检疫鉴定[J]. 植物检疫, 2022, 36(2): 45–50.
- ZHOU M M, LIU X Y, YANG J, et al. Detection and identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola on kidney bean seed imported from Japan[J]. Plant Quarantine, 2022, 36(2): 45–50.
- [35] GOMES A E I, STUCHI L P, SIQUEIRA N M G, et al. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real–time PCR[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9001.
- [36] 郑永钦, 郑正, 陈燕玲, 等. 柑橘黄龙病菌内参基因的筛选与评估[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2985–2995.
- ZHENG Y Q, ZHENG Z, CHEN Y L, et al. Screening and evaluation of reference genes for candidatus *Liberibacter asiaticus*[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2985–2995.

Screening of Reference Genes for qPCR of *Pseudomonas fluorescens* under Exogenous AHLs Culture

Cui Fangchao¹, Wang Yunting¹, Wang Dangfeng¹, Tan Xiqian¹, Li Qiuying¹, Li Jianrong^{1*}, Li Tingting^{2*}

¹College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, China Light Industry Key Laboratory of Marine Fish Processing, Jinzhou 121013, Liaoning

²College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

Abstract Objective: *Pseudomonas fluorescens* is the dominant spoilage organism in frozen foods, and its spoilage–causing genes are regulated by quorum sensing system. In order to accurately quantify the expression of spoilage genes and thus investigate the mechanism of quorum sensing regulation in food spoilage, it is required to screen reference genes of

Pseudomonas fluorescens. Methods: Using *Pseudomonas fluorescens* PF-08 as the research object, eight common reference genes (*dsbA*, *carA*, *rpsL*, *gyrB*, *apD*, *rpoD*, *gltA*, *16S rRNA*) were selected and their gene expression was measured by quantitative real-time PCR (qPCR) after incubation with different types of quorum sensing signal molecules. geNorm, Normfinder, BestKeeper and RefFinder were used to evaluate the expression stability of the candidate reference genes and to screen out the most appropriate reference genes. Results: Under different types of exogenous signal molecules incubation, the least change in Ct value of *Pseudomonas fluorescens* was *gltA* and the Ct value of *16S rRNA* was too low. The most stable reference genes by geNorm analysis were *apD* and *rpoD* and the combination of the two could more accurately quantify the expression levels of target genes. *gltA* was the most stable reference gene analyzed by Normfinder and BestKeeper. Further comprehensive evaluation with RefFinder showed *rpoD* and *gltA* were the most stable reference genes. Conclusion: Both *rpoD* and *gltA* were stably expressed in *Pseudomonas fluorescens* after incubation with different QS signal molecules. They could be used for the subsequent study of *Pseudomonas fluorescens* spoilage gene expression, and could also provide reference genes for studying the expression of QS-related genes in other spoilage bacteria.

Keywords *Pseudomonas fluorescens*; quorum sensing; quantitative real-time PCR; reference gene