

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(3):306-312; 4 March 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 副溶血性弧菌毒力基因表达时内参基因的选择

李沁, 彭织云, 陈鑫鹏, 孙晓红, 潘迎捷, 赵勇\*

上海海洋大学食品学院, 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

**摘要:** 【目的】筛选出合适的内参基因用于分析不同环境条件下副溶血性弧菌毒力基因的表达情况。【方法】本研究以虾样品中、海水样品中、过滤海水样品中以及 TSB 培养条件下的副溶血性弧菌为材料, 利用 qRT-PCR 技术评价了 *GAPDH*、*pvuA*、*pvsA* 和 *rpoS* 4 种常用管家基因在不同条件下的表达稳定性。【结果】4 种管家基因均能特异扩增, 表达稳定性排列顺序为 *pvuA* (2.906) > *pvsA* (3.197) > *GAPDH* (3.746) > *rpoS* (6.512), 进一步通过 geNorm 软件分析, 最终选择两个表达最为稳定的内参基因即 *pvuA* 和 *pvsA*, 以二者的几何平均值作为参照可更为准确地校正目的基因的表达。【结论】*pvuA* 和 *pvsA* 可作为环境样品中副溶血性弧菌毒力基因表达变化研究的内参基因。

**关键词:** 副溶血性弧菌, 环境样品, qRT-PCR, 内参基因

**中图分类号:** Q93-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2013)03-0306-07

基因表达分析在生命科学的研究领域中变得日趋重要, 而随之产生的反转录荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术已成为了以高通量和准确的基因表达量为特点的基因表达分析的首选方法<sup>[1]</sup>。然而, 在基因表达分析中, 有很多可变参数需要加以控制, 例如起始样品材料的数量、酶的活性以及不同组织和细胞来源样品的转录水平的差异都会影响基因表达量的确定。因此, 往往需要引入内参基因对所有样品进行归一化处理, 然后再对目的基因的表达量进行比较研究。理想的内参基因应该在不同组织类型、生长阶段及不同实验处理条件下表达水平保持一致, 实际研究中常选择稳定表达的管家基因作为内参基因。例如 *ACTB*、*GAPDH*、*18SrRNA* 和

*28SrRNA* 都已被广泛用于不同类型组织中基因表达的标准化研究。然而, 很多研究表明任一管家基因的稳定性都只是在一定范围内的相对稳定<sup>[2]</sup>, 尚无一种内参基因可适用于所有样本来进行校正和标准化。所以, 根据实验样品以及处理条件的不同来选择合适的内参基因是非常有必要的<sup>[3]</sup>。目前, 国内外针对内参基因的筛选已经有了大量的报道, 但是多局限于植物和动物, 如柑橘<sup>[4]</sup>、牡丹<sup>[5]</sup>、大叶戟<sup>[6]</sup>及新生籽鹅组织<sup>[7]</sup>等, 而在致病微生物毒力基因表达方面的相关研究中对内参基因筛选的关注较少。

副溶血性弧菌是一种革兰氏阴性海洋细菌, 是引起海产品性肠胃炎的主要食源性致病菌<sup>[8]</sup>,

**基金项目:** 国家自然科学基金(31271870); 上海市科学技术委员会部分地方院校能力建设项目(11310501100); 上海市科学技术委员会科技创新行动计划项目(12391901300); 上海市科学技术委员会工程中心建设项目(11DZ2280300)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-61900503; E-mail: yzhao@shou.edu.cn

**作者简介:** 李沁(1988-), 女, 云南玉溪人, 硕士研究生, 研究方向为食品安全风险评估。E-mail: lqapple1988@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2012-09-10; **修回日期:** 2012-12-31

因其发病率高, 流行范围广, 危害严重, 每年都给人类健康以及养殖业者带来极大的安全隐患。目前, 针对副溶血性弧菌毒力基因表达已经开展了初步的研究, Coutard 等采用 qRT-PCR 方法评价了副溶血性弧菌 VBNC 状态下的管家基因以及毒力基因的表达情况<sup>[9]</sup>, 结果表明 *ppsA* 和 *pvuA* 是两个表达最为稳定的管家基因, 国内学者王淑娜<sup>[10]</sup> 在其检测副溶血性弧菌 *tdh* 基因的表达差异研究中便采用了 *pvuA* 作为内参基因。本课题组在副溶血性弧菌毒力基因表达方面也有相关的研究基础, 前期已初步探讨了不同温度、盐度、pH 条件下 *tlh*、*tdh* 基因的表达差异<sup>[11]</sup>, 其中采用 16S *rRNA* 为内参基因, 但未根据不同的实验处理对内参基因的表达稳定性进行评价。另外, 目前对于微生物基因表达研究中内参基因的筛选还仅处于开始阶段, 研究对象也主要集中于纯培养状态下的基因表达情况, Yan<sup>[12]</sup>、黄雪玲<sup>[13]</sup> 等分别筛选了适于研究两种真菌基因表达水平的内参基因。另外, Fux<sup>[14]</sup> 等在致病性弧菌毒力基因表达方面的研究中发现, 细菌生存的真实自然环境是一个必须要考虑的因素, 因此, 本研究从副溶血性弧菌广泛分布的水体环境出发, 以虾样品中、海水样品中、过滤海水样品以及纯培养条件下的副溶血性弧菌为研究材料, 采用 qRT-PCR 技术, 以及 geNorm 程序对 4 种相关研究中已发表的管家基因在不同处理条件下副溶血性弧菌中的表达稳定性进行评价, 以筛选出最适于本实验条件下的表达稳定的内参基因, 为后续研究不同环境样品中副溶血性弧菌毒力基因 mRNA 表达变化提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验菌株

本实验选用的副溶血性弧菌 ATCC33847 购自中国科学院微生物研究所, QD 分离自临床样本, 经生化鉴定和 16S 测序确定为副溶血性弧菌。以上菌株均由上海海洋大学农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室菌种库保藏。实验前从 -80℃ 冰箱中取出菌种甘油管, 室温解冻, 用 3.0% NaCl TSB 液体培养基活化两次, 备用。

### 1.2 海水以及虾样品的采集

实验用海水样品采自东海 (30°51'48.82"N,

121°55'29.67"E), 所有采样器具先高压灭菌烘干后备用。采样期间天气晴朗, 海水样品采回后用普通滤纸过滤泥沙后检测主要指标, 结果如下: 温度 24℃, 盐度 8.2‰, 电导率 14.23 ms/cm, 溶解氧 9.98 mg/L, pH 8.53。南美白对虾样品购自上海南汇农贸市场, 挑选健康、大小均一的个体进行实验。

### 1.3 不同样品中副溶血性弧菌的培养

将海水样品分成 2 份, 其中一份用 0.22 μm 的滤膜进行无菌过滤, 两种水样各分装 9 mL 至无菌 15 mL 离心管中, 后各接种 1 mL 菌悬液。前期实验证明 6 log cfu/mL 的初始接种量, 可以从不同的海水样品以及虾样品中提取出高质量的 Total RNA, 所以后续实验均选择 6 log cfu/mL 的接种量。对于虾样品则选用的是质量为 13 g 左右的全虾, 采用点接种的方式, 取 100 μL 菌悬液均匀接种于虾的腹部。纯培养样品则采用相同接种量接种于 3.0% NaCl TSB 液体培养基 37℃ 培养 12 h, 两种海水及虾处理样品均置于室温培养 12 h 后用于提取 Total RNA。

### 1.4 Total RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用经典的 Trizol 法提取 Total RNA, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, 按说明书所示方法提取。处理后虾样品总 RNA 的提取参考 Sirsat (2011) 采用的方法<sup>[15]</sup>。RNA 提取过程中所需用到的器材事先进行无菌处理和 RNA 酶抑制处理, 水以及聚乙烯制品以 0.1% (v/v) DEPC 处理后高压灭菌, 玻璃和陶瓷器皿以 180℃ 高温烘烤 2 h 后高压灭菌。RNA 的浓度采用酶标仪测定, RNA 的完整性通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 过程按试剂盒说明书操作, 产物 cDNA 置于 -20℃ 保存。

### 1.5 内参基因的选择

本实验选择相关研究中已发表的 4 个管家基因作为候选内参基因<sup>[9]</sup>, 筛选出针对本实验中选取的不同海水、虾及纯培养条件下表达相对稳定的基因作为后续实验的内参基因。引物序列如表 1 所示。在进行 qPCR 实验之前, 对各样品的 RNA 浓度进行了均一化处理, 确保 RNA 初始水平一致。4 种内参基因在各处理样品中的表达数据后续通过 geNorm 软件分析。荧光定量 PCR 试剂 SYBR Green Master 等购自 Roche 公司。实验中每个样品 3 个平行, 取平均 Ct 值, 重复 3 次。

表 1 候选内参基因的荧光定量引物

Table 1 Primers of candidate reference genes for qPCR

Gene	Primer sequences (5'→3')
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F TGTTCGACGTTGTAGCAGAAG
	GAPDH-R ACCGAACTTGTCTGTAAGAA
<i>pvsA</i>	pvsA-F CTCCTTCATCCAACACGAT
	pvsA-R GGGCGAGATAATCCTTGT
<i>pvuA</i>	pvuA-F CAAACTCACTCAGACTC
	pvuA-R CGAACCGATTCAACAC
<i>rpoS</i>	rpoS-F GACAATGCGTCAGAGACG
	rpoS-R GAGGTGAGAAGCCAATTTTC

## 1.6 数据处理和分析

利用 ABI7500 软件计算出了 4 种内参基因在不同样品中的表达量,即 RQ 值。RQ 值的计算通常选定一个未处理样品,将其表达量定为“1”,计算出相对量,再进行各样品间相对量的比较。本实验中设定纯培养状态下的 ATCC33847 的表达量为“1”来计算其余样品的相对表达量。荧光定量数据进一步采用 geNorm 程序进行分析。geNorm 程序,由 Vandesompele 等<sup>[1]</sup>于 2002 年编写,在荧光定量 PCR 内参选择的研究中已有很广泛的应用<sup>[16]</sup>。其依据的原则是两个理想内参基因表达水平的比值应该在所有样本中一致。原始数据先经  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法转换成相对表达量,然后输入 Excel 表格,软件通过将每个候选内参基因与其他候选基因的配对表达水平比值经对数变换,计算其标准差作为基因表达稳定值 M,对所有候选内参基因的表达稳定性排序(M 值越小,表达越稳定),最后根据内参基因标准化因子的配对差异分析判定内参基因的最适数目。进一步使用 SPSS 单因素方差分析对相关表达量数据进行统计学分析, $P < 0.05$  即认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取质量检测

基因表达分析中应确保得到完整性及纯度较好的总 RNA,以保证后续反转录及荧光定量实验的准确性。各处理及纯培养样品均采用 Trizol 法提取总 RNA,RNA 电泳结果显示所提取的各样品总 RNA 的 23S 和 16S 亚基条带清晰,总 RNA 完整性都较好。同时所提取的 RNA 经酶标仪检测浓度和纯度,各样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 2.0 左右,纯度较好,可用于后续实验。

### 2.2 候选内参基因引物特异性

为了验证 4 种内参基因引物的特异性,以副溶血性弧菌 cDNA 为模板对 4 种基因进行普通 PCR 以及荧光定量 PCR 检测。普通 PCR 电泳结果显示,所选引物能分别扩增出与各内参基因预期大小一致的片段,且没有引物二聚体及非特异条带,说明引物的特异性较好。进一步通过观测 4 种内参基因的溶解曲线,都只出现单一的信号峰,也很好的证明没有引物二聚体和非特异性条带产生,引物特异性良好。

### 2.3 候选内参基因稳定性评价

利用  $\Delta\Delta Ct$  法,分析了所有候选内参基因在不同样品中的表达量。4 个候选内参基因的稳定性通过 geNorm 程序分析。geNorm 程序通过计算基因的表达稳定值 M 对基因的表达稳定性进行排序。M 值是单个内参基因与其他所有选择内参基因表达水平的两两比值后对数变换计算其平均标准差作为基因表达稳定度的平均值,M 值越小说明基因越稳定基因的表达稳定值越高。通过软件计算得到内参基因的原始表达稳定值,表达稳定性排列顺序为 *pvuA* (2.906) > *pvsA* (3.197) > *GAPDH* (3.746) > *rpoS* (6.512),其中最稳定的基因是 *pvuA*,可以作为 qRT-PCR 分析中的内参基因。同时上述表达稳定性值采用 geNorm 软件计算最优内参基因数目,最终选择出 2 个表达最为稳定的内参基因即 *pvuA* 和 *pvsA* (图 1),以二者的几何平均值作为参照可更为准确地校正目的基因的表达。

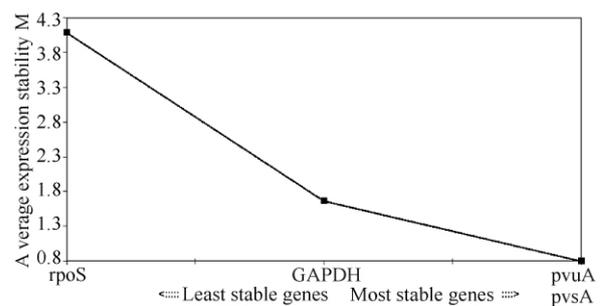


图 1 geNorm 软件分析各内参基因的表达稳定值 M

Fig. 1 Expression stability values M of the reference genes calculated by geNorm.

### 2.4 不同样品中两内参基因表达稳定性分析

进一步选用两株副溶血性弧菌菌株 ATCC33847、QD 纯培养及其不同的海水处理样品对 geNorm 软件分析筛选出的 2 个内参基因的表达水

平进行检测和验证。通过比较各样品中 *pvuA* 和 *pvsA* 基因扩增的 *Ct* 值(图 2), 对表达数据进行显著性差异分析, 结果显示 6 种处理样品间 *pvuA* 和 *pvsA* 的 *Ct* 值均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 可以看出这两种基因在所选择样品中的表达是较为稳定的, 这样对于后续采用这两个内参基因准确评价环境样品间副溶血性弧菌毒力基因表达差异来说是十分重要的。

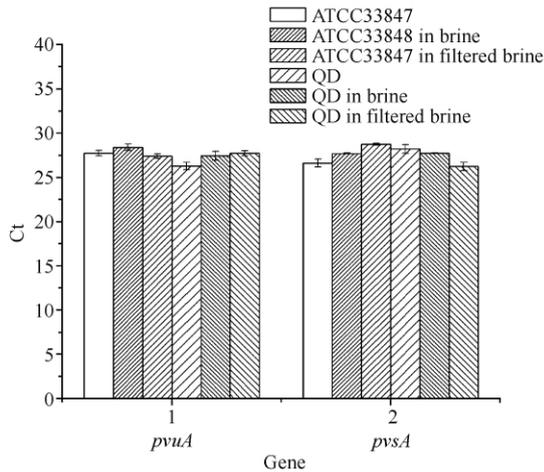


图 2 样品中两个内参基因的表达水平

Fig. 2 Expression levels of selected reference genes in different samples.

### 2.5 副溶血性弧菌 *tdh* 基因的表达差异分析

耐热性直接溶血毒素 (*tdh*) 被公认为是副溶血性弧菌最主要的毒力因子<sup>[17]</sup>, 因此采用筛选出来的两个内参基因分析了副溶血性弧菌海水处理组、虾样品处理组以及纯培养状态下的 *tdh* 基因的表达差异。各样品 *tdh* 基因表达结果如图 3 所示。结果表明选用 *pvuA*、*pvsA* 基因能够很好的对副溶血性弧菌毒力基因的表达进行评价和分析。表达结果初步显示来源于不同菌株的 *tdh* 基因在所选的 3 种环境条件中显示出了不同的变化趋势, 总的来说虾样品中 *tdh* 基因的表达量相对较高, 而海水样品中的 *tdh* 基因表达量在不同菌株间有所差异。

## 3 讨论

从图 3 的结果可以看出不同菌株间 *tdh* 基因在不同的处理条件下表达量存在差异, Asakura (2006) 的研究已证明在不同的环境压力下, 弧菌毒力基因的表达会呈现出不同的变化趋势<sup>[18]</sup>。进一步分析

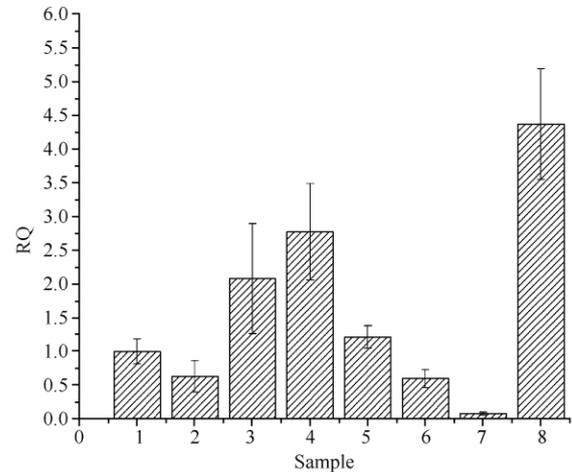


图 3 样品间 *tdh* 基因的表达差异

Fig. 3 Different expression level of *tdh*. 1. ATCC33847; 2. ATCC33847 in brine; 3. ATCC33847 in filtered brine; 4. ATCC33847 in shrimp; 5. QD; 6. QD in brine; 7. QD in filtered brine; 8. QD in shrimp.

显示, 两株菌的 *tdh* 基因在海水及虾样品中的表达变化趋势一致, 但在过滤海水中却呈现了相反的趋势, ATCC33847 有所升高, QD 却有明显降低。不同菌株间基因表达的差异性是广泛存在的, 例如哈雷氏弧菌金属蛋白酶基因 *vhp* 在不同菌株间的表达量的差异高达 127 倍<sup>[19]</sup>。而对于粗滤海水来说过滤海水内容物相对简单, 同时能提供给菌株的营养物质也较为贫乏, 由此初步推测 ATCC33847 菌株的 *tdh* 基因对于饥饿环境的适应能力较高。有研究显示副溶血性弧菌 *toxR*、*toxS* 等基因在海水中培养 8 个月后表达量仍保持稳定<sup>[20]</sup>, 也显示出了这些基因较强的饥饿耐受能力。相关报道显示虾类样品中副溶血性弧菌平均浓度显著高于贝类和鱼类样品 ( $P < 0.01$ )<sup>[21]</sup>, 表明虾类样品的营养成分较有利于副溶血性弧菌的富集和生长, 从而促进毒力基因的表达, 但其中的具体表达调控机制还需进一步分析和探讨。

qRT-PCR 是分析基因表达的一种有效方法, 但是目前 90% 以上的 qRT-PCR 仅用单一的内参基因来校正和标准化目标基因的表达, 其中最常用的包括 *GAPDH*、 *$\beta$ -actin*、*18SrRNA* 和 *28SrRNA* 等管家基因。近年来的研究发现, 在一些样品中若仅采用单一基因作为参比基因往往会产生相对较大的误差<sup>[22]</sup>, 并且这些常用的管家基因均存在缺陷, 其表达水平在不同类型的细胞和组织、细胞增殖和器官

发育的不同阶段、体外培养、各种试验条件等情况下它们的表达量通常差异较大,许多经典的管家基因并不适合广泛的应用。因此,针对不同的实验体系筛选出最合适的内参基因是十分重要的。

选择合适的内参基因应遵循以下几个标准:第一,在不同类型的细胞和组织或不同实验处理情况下其表达量是近似的,无显著性差别;第二,所选的内参基因在细胞或组织内的拷贝数应与目的基因拷贝数相近似,在扩增效率一定的情况下保证两种基因的 Ct 均在 18-28 之间;第三,所选的内参基因不存在假基因<sup>[23]</sup>,以避免基因组 DNA 的扩增。

本研究中选用 *pvuA*、*pvsA*、*GAPDH* 和 *rpoS* 4 个不同功能的管家基因作为候选内参基因,并通过 geNom 软件这 4 个基因在不同环境样品中表达的稳定性,4 个候选基因表达稳定性排列顺序为 *pvuA* > *pvsA* > *GAPDH* > *rpoS*,最终确定了 *pvuA* 和 *pvsA* 基因作为适于该实验条件下基因表达研究的内参基因。后续又采用了不同的副溶血性弧菌菌株以及实验处理样品对 *pvuA* 和 *pvsA* 基因在样品间的表达的差异和稳定性进行了比较和验证,结果显示,这两个基因在不同样品间的表达差异度较小,稳定性高,是可用做后续环境样品中副溶血性弧菌表达分析中的可靠的内参基因。

## 参考文献

- [1] 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. *Genome Biology*, 2002, 3 (7) : 1-12.
- [2] Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijssen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 2008, 227 (6) : 1343-1349.
- [3] Zhang JS, Li W, Que YX, Ruan MH, Zhang MQ, Chen RK. Cloning of two house-keeping genes from *Erianthus arundinaceus* and the application in cDNA microarray. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2007, 15 (4) : 277-283. (in Chinese)  
张积森,李伟,阙友雄,阮妙鸿,张木清,陈如凯.斑茅两个管家基因片段的克隆及其在基因芯片中的应用. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15 (4) : 277-283.
- [4] Yan J, Yuan F, Long G, Qin L, Deng Z. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (2) : 1831-1838.
- [5] Wang YJ, Dong L, Zhang C, Wang XQ. Reference gene selection for real-time quantitative PCR normalization in tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20 (5) : 521-528. (in Chinese)  
王彦杰,董丽,张超,王晓庆.牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择. *农业生物技术学报*, 2012, 20 (5) : 521-528.
- [6] Chao WS, Doğramaci M, Foley ME, Horvath DP, Anderson JV. Selection and validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *PLoS ONE*, 2012, 7 (8) : e42839.
- [7] Wang ZW, Guo JR, Wang JF, Zang L, Guo S, Yang HM. Validation of reference genes for gene expression analysis in neonatal Zi goose tissues using quantitative real-time PCR. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32 (3) : 427-431. (in Chinese)  
王忠伟,郭景茹,王建发,臧琳,郭爽,杨焕民.新生籽鹅组织 qRT-PCR 分析中内参基因的选择. *中国兽医学报*, 2012, 32 (3) : 427-431.
- [8] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5 (5) : 607-625.
- [9] Coutard, F., Lozach, S., Pommepuy, M., & Hervio-Heath, D. 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.
- [10] Wang SN, Fang WH. Differential expression of *tdh* gene from the different *Vibrio parahaemolyticus* isolates as determined by real-time PCR. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2008, 40 (9) : 9-13. (in Chinese)  
王淑娜,方维焕.荧光定量 PCR 法检测副溶血弧菌 *tdh* 基因的表达差异. *畜牧与兽医*, 2008, 40 (9) : 9-13.
- [11] Chen X, Pan YJ, Sun XH, Zhao Y. Detection of *tlh* and *tdh* expression differences in *Vibrio parahaemolyticus* by real-time quantitative PCR. *Microbiology*, 2011, 38 (7) : 1077-1083. (in Chinese)  
陈星,潘迎捷,孙晓红,赵勇.荧光定量 PCR 法检测

- 副溶血弧菌 *tlh* 和 *tdh* 基因的表达差异. 微生物学通报, 2011, 38 (7) : 1077-1083.
- [12] Yan HZ, Liou RF. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43 (6) , 430-438.
- [13] Huang XL, Feng H, Kang ZS. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Puccinia Striformis* f. sp. *tritici*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20 (2) : 181-187. (in Chinese)  
黄雪玲, 冯浩, 康振生. 小麦条锈菌实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. 农业生物技术学报, 2012, 20 (2) : 181-187.
- [14] Fux CA, Shirtliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis? *Trends Microbiology*, 2005, 13 (2) : 58-63.
- [15] Sirsat SA, Muthaiyan A, Ricke SC. Optimization of the RNA extraction method for transcriptome studies of *Salmonella* inoculated on commercial raw chicken breast samples. *BMC Research Notes*, 2011, 4:60.
- [16] Wang GP, Xu CS. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Molecular Biotechnology*, 2010, 46 (1) : 49-57.
- [17] Baffone W, Casaroli A, Campana R, Citterio B, Vittoria E, Pierfelici L, Donelli G. 'In vivo' studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH (+) -induced secretion. *Microbial Pathogenesis*, 2005, 38 (2-3) , 133-137.
- [18] Asakura H, Ishiwa A, Arakawa E, Makino S, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (4) :869-879.
- [19] Ruwandepika HA, Defoirdt T, Bhowmick PP, Karunasagar I, Karunasagar I, Bossier P. In vitro and in vivo expression of virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the Harveyi clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environmental Microbiology*, 2011, 13 (2) :506-517.
- [20] Ben FA, Ellafi A, Lagha R, Kallel H, Bakhrouf A. Virulence gene expression, proteins secreted and morphological alterations of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in response to long-term starvation in seawater. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5 (7) :792-801.
- [21] Zhang JY, Mei LL, Zhu M, Zhang YJ, Pan XX, Shi YS, Zheng GZ. Quantitative inspection and analysis of *Vibrio parahaemolyticus* contamination in 301 sea foods. *Chinse Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17 (3) : 509-510. (in Chinese)  
张俊彦, 梅玲玲, 朱敏, 张严峻, 潘雪霞, 石雅素, 郑官增. 301 份海水产品副溶血性弧菌定量检测分析. 中国卫生检验杂志, 2007, 17 (3) : 509-510.
- [22] Die JV, Román B, Nadal S, González-Verdejo CI. Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 2010, 232 (1) : 145-153.
- [23] Dong XL, Wang JQ, Bu D-P, Zhang CL, Li SS, Zhao GQ. Research advancement of reference gene in the fluorescent quantitative PCR and its application. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36 (9) : 83-85 (in Chinese).  
董晓丽, 王加启, 卜登攀, 张春林, 李珊珊, 赵国琦. 内参基因在实时定量 PCR 中应用的研究进展. 中国畜牧兽医, 2009, 36 (9) : 83-85.

# Selection of reference genes for virulence gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*

Qin Li, Zhiyun Peng, Xinpeng Chen, Xiaohong Sun, Yingjie Pan, Yong Zhao\*

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Objective] We selected reference genes for virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* under different environmental conditions. [Method] Using qRT-PCR, we evaluated the expression stability of four housekeeping genes (*GAPDH*, *pvuA*, *pvuA* and *rpoS*) of *V. parahaemolyticus* cultivated separately in seawater, filtered seawater, shrimp and Tryptone Soya Broth. [Result] The result shows that all the candidate reference genes could be amplified specifically in qRT-PCR reaction. The expression stability of the four reference genes ranked *pvuA* (2.906) > *pvuA* (3.197) > *GAPDH* (3.746) > *rpoS* (6.512). Further analysis with geNorm program reveals that the highest stability was observed in *pvuA* and *pvuA*. The geometric average score of the two genes was considered as the most appropriate reference gene for normalizing the expression of virulence genes of *V. parahaemolyticus*. [Conclusion] The *pvuA* and *pvuA* genes could be used as reference genes to study the virulence gene expression of *V. parahaemolyticus*.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, qRT-PCR, reference gene

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271870), by the project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (11310501100, 12391901300) and by the Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation (11DZ2280300)

Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-61900503; E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Received: 10 September 2012/Revised: 31 December 2012

## 《微生物学报》投稿方式

2012年3月修订

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 介绍信:为了保护知识产权,请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板),要求责任作者(即通信作者)亲笔签名,并盖有公章。
- (5) 受理费:150元(2011年3月由原来的100元调为150元)。