

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(8):882-888; 4 August 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.005

不同温度条件下副溶血性弧菌 *tdh* 基因表达及其代谢组响应

郭卓然, 崔晓文, 王敬敬, 孙晓红, 潘迎捷, 赵勇*

上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 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 201306

摘要: 【目的】采用 RT-PCR 的方法分析致病性副溶血性弧菌毒力基因表达, 并应用代谢组学的方法研究毒力基因不同表达水平下致病性副溶血性弧菌代谢组的响应。【方法】本文以致病性副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC33846 为材料, 分别提取不同温度 (4、25 和 37℃) 下菌体总 RNA 和代谢组。采用相对定量的方法检测副溶血性弧菌 *tdh* 基因在不同温度条件下的表达差异, 同时应用超高压液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC/Q-TOF-MS) 系统为工作平台检测其代谢组。采用主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 比较副溶血性弧菌代谢组轮廓差异, 并通过皮尔森和斯皮尔曼相关性分析法分析代谢组与 *tdh* 基因表达之间相关性。【结果】结果表明, 不同温度条件下 *tdh* 基因表达强弱的排列顺序 25℃ > 4℃ > 37℃; 在 *tdh* 基因不同表达水平下发生显著性 ($P < 0.05$) 变化的主要代谢物是有机酸、氨基酸、醇、酮、酯; 共得到 11 种代谢物与 *tdh* 基因表达高度相关 (相关性系数 $|r| = 1, P < 0.05$), 其中 3 种为负相关, 8 种为正相关, 且醇类代谢物与 *tdh* 基因表达的正相关性最显著。【结论】本研究发现副溶血性弧菌代谢组与毒力基因表达存在一定的相关性, 有望为副溶血性弧菌致病机理的深入探究提供一定的理论支持。

关键词: 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*), 毒力基因表达, 代谢组轮廓, 相关性分析

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 08-0882-07

代谢组学是后基因组时代的一个重要的研究领域, 它是对某种生物或细胞的所有低分子量代谢产物进行定性和定量分析的一门学科, 是系统生物学的重要组成部分^[1]。代谢组学已经广泛应用于药物研发^[2]、代谢成分研究^[3]、疾病检测^[4]等多个方面。

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 广泛分布于鱼、贝类等海产品中, 可引起腹泻、肠痉挛、恶心等典型胃肠炎反应, 严

重者可导致败血症^[5]。研究表明副溶血性弧菌的主要致病因子是溶血毒素 TDH (Thermostable direct hemolysin) 和 TRH (TDH related hemolysin)^[6], 分别由 *tdh* 基因和 *trh* 基因编码。Suzuki 等^[7] 研究发现神奈川试验与 TDH 的相关性大于其与 TRH 的相关性, 而且 Vongxay 等^[6] 对临床样品进行检测发现 *tdh* 基因的检出率 (84%) 远大于 *trh* 基因 (12%)。

本文采用 RT-PCR 技术研究副溶血性弧菌 ATCC33846 在不同温度条件下 (4℃、25℃ 和 37℃)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271870); 上海市科委部分地方院校能力建设基金项目 (11310501100); 上海市科委工程中心建设项目 (11DZ2280300); 上海市科委科技创新行动计划项目 (12391901300); 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科学 2014 年 3-5 号)

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

作者简介: 郭卓然 (1987-), 男, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为副溶血性弧菌代谢组研究。E-mail: 755477481@qq.com

收稿日期: 2013-11-06; **修回日期:** 2013-12-30

tdh 基因的表达量,应用超高压液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪 (UPLC/Q-TOF-MS) 系统为分析平台,研究 *tdh* 基因在不同表达水平下副溶血性弧菌代谢组轮廓的差异。并进一步分析代谢组与 *tdh* 基因表达的相关性,为副溶血性弧菌的致病机理的研究奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本实验选用的副溶血性弧菌 ATCC33846 购自中国科学院微生物研究所,所含致病基因为 *tdh*,血清型为 O3。

1.1.2 主要试剂和仪器: HEPES (L4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 购自上海生工生物技术有限公司; 甲醇为色谱纯, 购自上海埃彼化学试剂有限公司; 甲酸, 乙腈为色谱纯, 购自北京国药集团化学试剂有限公司; Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; SYBR Green mixture 购自瑞士 Roche 公司; PrimerScript RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 购自北京路桥技术有限责任公司。UPLC/Q-TOF-MS 购自美国 Waters 公司, 配 MassLynx V4.1 工作站; Centrifuge 5417R 离心机和 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司; MDF-053V -80℃ 冰箱购自日本 SANYO 公司; 7500 Fast Real-time PCR system 购自美国 ABI 公司。

1.2 样品前处理

将菌种接种于 5 mL TSB (3% NaCl) 中, 37℃ 下摇床培养 (180 r/min, 10 h), 连续活化 2 次获得种子液。分 3 组各取 200 μL 种子液, 接种于 100 mL TSB (3% NaCl) 中。其中 2 组分别在 25℃ 和 37℃ 下培养 (180 r/min, 12 h); 另一组在 37℃ 下培养 (180 r/min, 12 h), 然后转移至 4℃, 静置 12 h。代谢物的提取参照赵强等^[8] 采用的方法。

1.3 液相色谱与质谱条件

1.3.1 色谱条件: 色谱柱: Acquity™-BEH C18 反相柱 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters, MA, USA) 和 Acquity™-BEH C18 保护柱 (5 × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 取样率: 20 滴/秒; 负离子洗脱条件: (0 - 2 min: A 99% → 70%; 2 - 4 min: A 70% → 25%; 4 - 5 min: A 25% → 25%; 5 - 7 min: A 25% → 10%; 7 - 8 min: A 10% →

0; 8 - 10 min: A 0 → 0; 10 - 10.4 min: A 0 → 99%; 10.4 - 12.2 min: A 99% → 99%); 正离子洗脱条件: (0 - 2 min: A 99% → 70%; 2 - 4 min: A 70% → 25%; 4 - 7 min: A 25% → 25%; 7 - 9 min: A 25% → 0; 9 - 11.5 min: A 0 → 0; 11.5 - 12 min: A 0 → 99%; 12 - 13.5 min: A 99% → 99%); 柱温: 40℃。

1.3.2 质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 采用正、负离子交替扫描模式检测; 离子源温度 100℃; 脱溶剂气流量为 650 L/h, 脱溶剂温度为 350℃; 锥孔气流量是 50 L/h; 毛细管和锥孔电压分别是 3000 V 和 55 V; 扫描采集时间为 0.28 s; 质核比扫描范围为 50 - 1000 Da。

1.4 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取菌体总 RNA^[9]: 取 1 mL 副溶血性弧菌, 4℃, 15000 × g 离心 5 min; 弃上清; 加入 1 mL Trizol, 振荡 15 min, 室温静置 20 min; 加入 200 μL 酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 振荡 15 s, 静置 2 min, 然后 4℃, 12000 × g 离心 15 min; 将 400 μL 上清转入 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇 (-20℃ 预冷), 混匀, -20℃ 放置 20 min; 4℃, 12000 × g 离心 10 min; 移去上清, 用 1 mL 75% 的乙醇洗涤 (-20℃ 预冷); 吸走上清, 晾干, 加入 30 μL DEPC 水溶解。RNA 的浓度采用 BioTek 酶标仪测定, 完整性通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。每个样品中 200 ng 总 RNA 用于反转录, 反转录反应按试剂盒说明书操作, 产物 cDNA 置于 -20℃ 备用。

1.5 RT-PCR 反应检测 *tdh* 基因的表达量

1.5.1 引物: 采用 *pvuA*、*pvsA* 为内参基因。实验中每个样品设 2 个平行, 重复 3 次。引物由上海生工生物有限公司合成, 序列见表 1。

1.5.2 PCR 扩增: 反应体系为 20 μL, 其中 10 μL SYBR Green mixture, 上下游引物各 1.5 μL, cDNA 2 μL, 加 diH₂O 至 20 μL。反应条件: 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环; 60℃ 1 min 时读取荧光值。最后进行荧光 PCR 产物溶解曲线及毒力基因表达量分析。

1.6 数据处理与分析

1.6.1 毒力基因表达数据处理和分析: 设定纯培养状态下 25℃, *tdh* 基因相对表达量为“1”。利用 ABI 7500 软件计算 *tdh* 基因的相对表达量, 通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对基因相对表达量数据进行统计学分析, 结果以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

表 1. RT-PCR 中所用引物

Table 1. Primers used in RT-PCR of *V. parahaemolyticus*

gene	sequence (5' → 3')	length/bp	(G + C) content/%
<i>pvuA</i>	F1- <i>pvuA</i> : CAAACTCACTCAGACTCCA	19	47.4
	R1- <i>pvuA</i> : CGAACCGAT TCAACACG	17	52.9
<i>pvsA</i>	F2- <i>pvsA</i> : CTCCTTCATCCAACACGAT	19	47.4
	R2- <i>pvsA</i> : GGGCGAGATAATCCTTGT	18	50.0
<i>tdh</i>	L- <i>tdh</i> : GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	22	45.5
	R- <i>tdh</i> : TGGAATAGAACCTTCATCTTACC	24	41.7

1.6.2 代谢组学数据处理和分析:使用 Masslynx 4.1 进行色谱峰自动识别和峰匹配,采用 one-way ANOVA 对所得数据进行统计检验,确定发生显著性变化的代谢物,结果以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异;并将经过变量筛选后所得数据导入 SIMCA-P 11.50 中进行主成分分析(PCA);用皮尔森和斯皮尔曼相关性分析法,分析代谢组与 *tdh* 基因表达的相关性,若相关性系数 $|r| = 1$,且 $P < 0.05$ 表明代谢组与 *tdh* 基因表达高度相关。

2 结果

2.1 副溶血性弧菌 *tdh* 基因的表达差异

应用 RT-PCR 技术对 ATCC33846 在 4℃、25℃ 和 37℃ 纯培养条件下的 *tdh* 基因表达量进行检测。采用 7500 Fast Real-time PCR 系统对所得数据进行分析,设定 25℃ 条件下 *tdh* 基因的相对表达量为“1”,对其它温度条件下 *tdh* 基因的相对表达量进行计算,所得数值越高说明 *tdh* 基因的相对表达量越高,结果显示(图 1),*tdh* 基因在不同温度下表达量

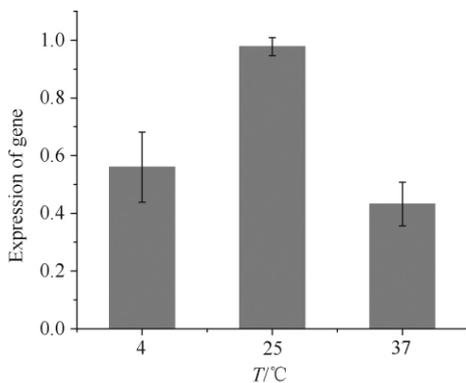
图 1. *tdh* 基因在 4、25 和 37℃ 条件下的表达量

Figure 1. The expression level of *tdh* gene (ATCC33846) at 4, 25 and 37°C.

顺序为 25℃ (1.0) > 4℃ (0.56) > 37℃ (0.43)。25℃ 条件下 *tdh* 基因表达量几乎为 4℃ 与 37℃ 条件下的 2 倍,且存在显著性差异 ($P < 0.05$),4℃ 条件下 *tdh* 基因表达量比 37℃ 条件下高 0.13,但不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。所以,在 4℃、25℃ 和 37℃ 这 3 个温度条件中 25℃ 为副溶血性弧菌 *tdh* 基因最适表达温度。

2.2 副溶血性弧菌代谢组轮廓分析

采用 UPLC/Q-TOF-MS 对 4、25、37℃ 条件下副溶血性弧菌的代谢组样品进行检测,并得到副溶血性弧菌的代谢组的总离子流图。通过峰检测匹配,并进行变量筛选,发现 4℃ 时正负离子的峰数量分别为 1255 和 507,25℃ 时正负离子组的峰数量分别为 1293 和 649,37℃ 时正负离子组的峰数量分别为 1238 和 466。将所得数据进行代谢物鉴定,4℃ 时检测到 588 种代谢物,25℃ 时检测到 655 种代谢物,37℃ 时检测到 639 种代谢物,所得代谢物主要是有机酸,氨基酸,醇,酮,酯。进一步分析显示,不同温度条件下发生显著性变化的代谢物同样主要是有机酸,氨基酸,醇,酮,酯。另外,胺,醛,醌等代谢物的含量也发生显著性变化,但发生显著性变化的代谢物的数量相对较少。

将经过变量筛选后的数据矩阵导入 SIMCA-P 软件进行多元统计分析。副溶血性弧菌代谢组的主成分分析(PCA)结果见图 2。图 2 显示 3 组样品中除 25℃ 时有 1 个样品平行性较差外其余皆有明显聚类区分,表明代谢组对 *tdh* 基因的表达存在明显响应,同时也表明在正负离子组中区分副溶血性弧菌的主要代谢物都可被离子化,皆可用于后续分析。

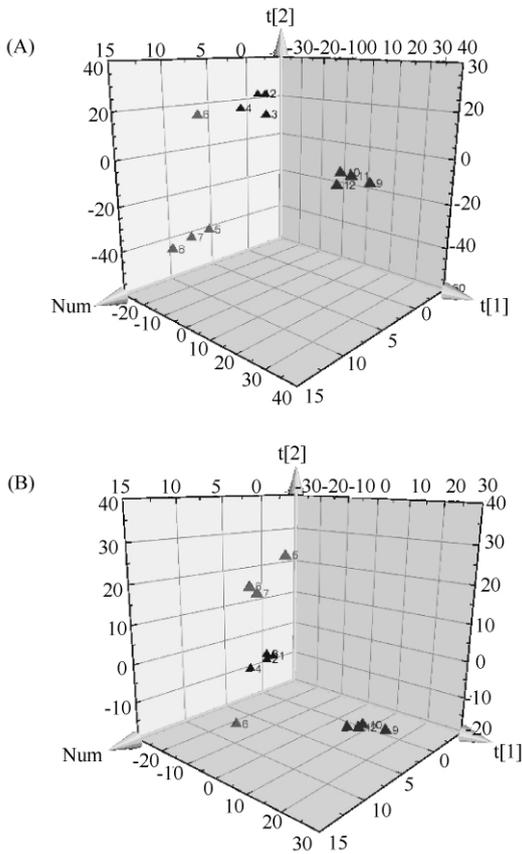


图 2. 4、25 和 37°C 下副溶血性弧菌代谢组的 PCA 图

Figure 2. PCA results of *V. parahaemolyticus* metabolomics under 4, 25 and 37°C. (A) Positive; (B) Negative. The black, red and blue triangles represent the samples obtained from 4°C, 25°C and 37°C, respectively. (Based on the measurement of four independent biological replicates.)

2.3 副溶血性弧菌毒力基因表达与代谢组相关性分析

利用皮尔森相关性分析法分析副溶血性弧菌代

谢组与 *tdh* 基因表达的相关性。相关性强弱用数值 -1 到 1 来表示。其中负值表示代谢组与毒力基因表达之间负相关, 正值表示正相关。一般认为, 相关性系数 $|r| \geq 0.8$ 表示高度相关, $0.5 \leq |r| < 0.8$ 表示中度相关, $0.3 \leq |r| < 0.5$ 表示相关性很弱, $|r| < 0.3$ 表示相关性极弱, 甚至可认为不相关。但有研究表明相关性强弱的阈值可根据实验需要进行选择^[10], 本实验中选择相关性系数 $|r| = 1$, 且 $P < 0.05$ 作为代谢组与 *tdh* 基因表达高度相关的阈值。经分析发现, 共有 11 种代谢物与 *tdh* 基因表达之间高度相关 (表 2)。其中代谢物 3-Methylcyclopentene、Conhydrinone、Triglyceride 与 *tdh* 基因的表达之间呈负相关, 表明代谢物含量随 *tdh* 基因表达量的上升而降低, 其余 8 种呈正相关, 表明代谢物含量随 *tdh* 基因表达量的上升而上升。随后, 用斯皮尔曼相关性分析法对这 11 种代谢物与 *tdh* 基因表达之间的相关性进行验证性分析, 所得结果与皮尔森相关性分析法一致。

由代谢组轮廓分析发现, *tdh* 基因不同表达水平下发生显著性变化的代谢物主要是有机酸, 氨基酸, 醇, 酮, 酯。在此基础上, 本文对 11 种与 *tdh* 基因表达高度相关的代谢物进行分析发现, 其中有醇 2 种 (4-Androstenediol, $r = 1$; (3 β , 9 β) -7-Drimene-3, 11, 12-triol, $r = 1$), 显著性差异分别为 $P = 0.006$ 和 $P = 0.009$; 酯 2 种 (Diacylglycerol, $r = 1$; Triglyceride, $r = -1$), 显著性差异分别为 $P = 0.008$ 和 $P = 0.014$; 有机酸 1 种 (Xanthylic acid, $r = 1$), 显著性差异为 $P = 0.014$, 酮 1 种 (Conhydrinone, $r = -1$), 显著性差异为 $P = 0.019$ 。综上, 在相关性系数 $|r| = 1$ 的基础上, 醇有 2 种与 *tdh* 基因表达高度相关且显著性水

表 2. 副溶血性弧菌代谢组中与 *tdh* 基因表达量高度相关的代谢物

Table 2. The metabolites that highly correlated with the *tdh* gene expression of *V. parahaemolyticus*

metabolites	pearson correlation	P	spearman correlation	P
diacylglycerol (20:3 (5Z, 8Z, 11Z) /18:2 (9Z, 12Z) /0:0)	1	0.008	1	<0.001
4-androstenediol	1	0.006	1	<0.001
3-methylcyclopentene	-1	0.003	-1	<0.001
20-oxo-leukotriene E4	1	0.003	1	<0.001
(3 β , 9 β) -7-drimene-3, 11, 12-triol	1	0.009	1	<0.001
xanthylic acid	1	0.014	1	<0.001
isosorbide mononitrate	1	0.017	1	<0.001
conhydrinone	-1	0.019	-1	<0.001
5'-methoxycurcumin	1	0.014	1	<0.001
(E, E) -2,5-hexadienal	1	0.015	1	<0.001
Triglyceride [20:4 (8Z, 11Z, 14Z, 17Z) /22:1 (13Z) /48:0]	-1	0.014	-1	<0.001

平皆为极显著,因此我们推测在有机酸,醇,酮,酯,氨基酸这几类代谢物中醇类与 *tdh* 基因表达的相关性最显著。

3 讨论

RT-PCR 是检测毒力基因表达的一种有效的方法。在定量的过程中一般要选择在不同处理条件下不会发生表达改变的基因作为内参。研究表明,若采用单一基因作为内参可能会造成一定的误差^[11]。因此,基于李沁等^[11]对副溶血性弧菌内参基因选择的研究,本文选用 *pvuA*, *pvuS* 为内参基因。RT-PCR 研究表明, *tdh* 基因的表达量顺序为 25℃ > 4℃ > 37℃,且 25℃ 条件下 *tdh* 基因的表达量显著性 ($P < 0.05$) 高于 4℃ 和 37℃ 条件下的表达量。陈星等^[12]对副溶血性弧菌毒力基因表达差异的研究结果同样表明 25℃ 为 *tdh* 基因的最适表达温度,且 4℃ 与 37℃ 条件下 *tdh* 基因表达量相对较低。

副溶血性弧菌代谢组研究结果显示, *tdh* 基因不同表达水平下发生显著性变化的主要是有机酸,氨基酸,醇,酮,酯这几类生物体内常见的代谢物^[13-14]。有研究表明胞内代谢物产生于分子整合基因和环境因素共同决定的代谢活动^[15]。Ligowska 和 Stintzi 等研究发现鸡肉的贮藏环境能够影响空肠弯曲杆菌基因的表达^[16-17]。由此可见环境的改变可能会导致基因表达的变化。同时,对大肠杆菌的研究表明其胞内代谢物会随着基因突变^[18]、敲除^[19]或培养条件^[20]的改变而变化。由此推断实验中发生显著性变化的代谢物可能是由于环境改变导致副溶血性弧菌毒力基因表达发生变化,从而导致部分代谢物的含量发生显著性变化。

本文对副溶血性弧菌代谢组与 *tdh* 基因表达之间的相关性分析发现,11 种代谢物与 *tdh* 基因表达高度相关 ($|r| = 1, P < 0.05$),其中 3 种负相关,其余 8 种正相关。目前,基因表达与代谢组之间相关性研究相对较少,但作为研究的前沿,已引起广泛关注。Laila 等^[21]提出用途直接加权测试法分析基因表达和代谢组之间的相关性。在医学研究方面,Ried 等通过对基因与代谢组的综合分析发现,控制哮喘的等位基因的敏感性与代谢物卵磷脂含量的变化密切相关^[10]。本文中对 11 种代谢物的生物功能进行分析显示,甘油二酯 (Diacylglycerol) 是细

胞内调节信号传递的第二信使,与 Ca^{2+} 共同激活位于细胞膜上的蛋白激酶 C^[22]。进一步分析发现醇类代谢物与 *tdh* 基因表达的正相关性最显著。综上所述,本文在对副溶血性弧菌代谢组与 *tdh* 基因表达的相关性分析过程中有重要的发现,这可能对进一步探究副溶血性弧菌致病机理有着极其重要的意义。

参考文献

- [1] Wu H, Li H, Tang L, Xu H, Li S, Tang S, Yang H, Shao A, Huang L. Metabonomic study on secondary metabolites of Rhizome and Tuberos root of curcuma longa L. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(5): 713-717. (in Chinese)
吴宏伟,李洪梅,唐力英,许海玉,李韶菁,唐仕欢,杨洪军,邵爱娟,黄璐琦. 代谢组学方法研究姜黄根茎及块根次生代谢产物表达差异. *分析化学*, 2012, 40(5): 713-717.
- [2] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(2): 153-161.
- [3] Wu M, Feng B, Cheng J, Li H, Fang J, Yan X, Wei L, Dong F. GC/TOF-MS based analytical method of endogenous metabolites for mouse serum. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2012, 33(6): 1188-1194. (in Chinese)
吴胜明,封波,程建华,李海静,方均建,颜贤忠,魏来,董方霆. 小鼠血清中内源性代谢物的 GC/TOF-MS 分析. *高等学校化学学报*, 2012, 33(6): 1188-1194.
- [4] Rashed MS. Clinical application of tandem mass spectrometry: ten year of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *Journal of Chromatography*, 2001, 758(1): 27-48.
- [5] Stephens EL, Molina V, Cole KM, Laws E, Johnson CN. In situ and in vitro impacts of the Deepwater Horizon oil spill on *Vibrio parahaemolyticus*. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 75(1-2): 90-97.
- [6] Vongxay K, Wang S, Zhang X, Wu BB, Hu HX, Pan ZJ, Chen SY, Fang WH. Pathogenic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126(1-2): 71-75.
- [7] Suzuki R, Katayama T, Furuya Y. Detection of parechovirus in infectious gastroenteritis patients from

- Kangawa Prefecture Region. Fecal specimens sent from the pediatric sentinel clinics from April 2008 to March 2011. *Kansenshogaku Zasshi*, 2012, 86 (4) : 393-399.
- [8] Zhao Q, Liu H, Lu Y, Sun X, Pan Y, Zhao Y. Comparison of quenching and extraction methods for metabolome analysis of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 39 (11) : 1689-1694. (in Chinese)
赵强, 刘海泉, 卢瑛, 孙晓红, 潘迎捷, 赵勇. 副溶血性弧菌细胞猝灭及代谢组提取方法的优化. 分析化学, 2011, 39 (11) : 1689-1694.
- [9] See MJ, Staggs SE, Dubey JP, Villegas EN. Evaluation of four RNA extraction methods for gene expression analyses of *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 89 (3) : 185-192.
- [10] Kim Y, Schmidt BJ, Kidwai AS, Jones MB, Kaiser BLD, Brewer HM, Mitchell HD, Palsson BO, McDermott JE, Heffron F, Smith RD, Peterson SN, Ansong C, Hyduke DR, Metz TO, Adkins JN. *Salmonella* modulates metabolism during growth under conditions that induce expression of virulence genes. *Molecular Biosystems*, 2013, 9 (6) : 1522-1534.
- [11] Li Q, Peng Z, Chen X, Sun X, Pan Y, Zhao Y. Selection of reference genes for virulence gene expression in *Vibrio Parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (3) : 306-312. (in Chinese)
李沁, 彭织云, 陈鑫鹏, 孙晓红, 潘迎捷, 赵勇. 副溶血性弧菌毒力基因表达时内参基因的选择. 微生物学报, 2013, 53 (3) : 306-312.
- [12] Chen X, Pang Y, Sun X, Zhao Y. Detection of *tlh* and *tdh* expression differences in *Vibrio parahaemolyticus* by real-time quantitative PCR. *Microbiology China*, 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.
- [13] Silas G, Villas-Bôas, Højer-Pedersen J, Mats A, Jørn S, Jens N. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 2005, 22 (14) : 1155-1169.
- [14] Singh AK, Ulanov AV, Li Z, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. Metabolomes of the psychrotolerant bacterium *Listeria monocytogenes* 10403S grown at 37°C and 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148 (2) : 107-114.
- [15] Ewald JC, Matta T, Zamboni N. The integrated response of primary metabolites to gene deletions and the environment. *Molecular Biosystems*, 2013, 9 (3) : 440-446.
- [16] Ligowska M, Cohn MT, Stabler RA, Wren BW, Brøndsted L. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145 (suppl 1) : 111-115.
- [17] Stintzi A, Whitworth L. Investigation of the *Campylobacter jejuni* cold-shock response by global transcript profiling. *Genome Letters*, 2003, 2 (10) : 18-27.
- [18] Hoque MA, Ushiyama H, Tomita M, Shimizu K. Dynamic responses of the intracellular metabolite concentrations of the wild type and *pykA* mutant *Escherichia coli* against pulse addition of glucose or NH₃ under those limiting continuous cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 26 (1) : 38-49.
- [19] Siddiquee KAZ, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K. Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on 13C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63 (4) : 407-417.
- [20] Tao H, Bausch C, Richmond C, Blatner RF, Conway T. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (20) : 6425-6440.
- [21] Poisson LM, Sreekumar A, Chinnaiyan AM, Ghosh D. Pathway-directed weighted testing procedures for the integrative analysis of gene expression and metabolomic data. *Genomics*, 2012, 99 (5) : 265-274.
- [22] 翟中和. 细胞生物学. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 140.

Metabolome response to *tdh* expression of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* induced by different temperatures

Zhuoran Guo, Xiaowen Cui, Jingjing Wang, Xiaohong Sun, Yingjie Pan,
Yong Zhao*

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

Abstract: [Objective] We studied the metabolome responses to different relative virulence gene expression of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* based on reverse transcription real-time PCR (RT-PCR) and metabolomics. [Methods] We extracted total RNA and metabolites of *V. parahaemolyticus* ATCC33846 cultured at different temperatures (4, 25 and 37°C). We applied relative quantification to analyze the *tdh* expression and Ultra Performance Liquid Chromatography & Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) platform to determine the low-molecular-weight metabolites. Then, we compared the metabolic profiling of *V. parahaemolyticus* by principal components analysis. The correlation between relative gene expression and metabolome was obtained by Pearson and Spearman correlation coefficient (r) analysis. [Results] The expression level of *tdh* at different temperatures ranked 25°C > 4°C > 37°C. The main metabolites that changed significantly ($P < 0.05$) were organic acids, amino acids, alcohols, ketones, and esters. The results from correlation coefficient suggested that 11 metabolites were highly correlated with *tdh* expression, including 3 negative correlations and 8 positive correlations, at the threshold of $|r| = 1, P < 0.05$. Further analysis revealed that alcohols were highly significant correlated with *tdh* expression. [Conclusion] The results suggested that there were significant correlation between metabolome and virulence genes expression, which might contribute to understanding the pathogenic mechanism of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, virulence gene expression, metabolic profiling, correlation analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271870), by the Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (11310501100, 12391901300), by the Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation (11DZ2280300) and by the Key Project of Shanghai Agriculture Prosperity through Science and Technology (2014, 3-5)

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

Received: 6 November 2013 / Revised: 30 December 2013