

# 龟裂链霉菌M527荧光定量PCR内参基因的选择及其稳定性评估

徐洁, 胡叶锋, 廖芷君, 马正, 俞晓平\*

(中国计量大学生命科学学院/浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* M527 是龟裂霉素 (rimocidin) 的生产菌, 其对多种植物病原真菌具有较强的拮抗作用。为从转录水平分析菌株 M527 以及其抗性突变株中龟裂霉素的合成调控机制, 荧光定量 PCR 内参基因的选择与稳定性评估显得尤为重要。本研究选用 16S rRNA<sub>sr</sub>、hrdB<sub>sr</sub>、rpoA<sub>sr</sub>、sigF<sub>sr</sub>、sigB<sub>sr</sub>、gyrB<sub>sr</sub> 这 6 个基因作为候选内参基因, 使用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 三个软件分析在野生型龟裂链霉菌 M527、高产龟裂霉素抗性突变株 M527-GR7 和低产龟裂霉素抗性突变株 M527-GR21 中候选内参基因的稳定性, 筛选出稳定性最高的内参基因。结果显示, sigB<sub>sr</sub> 基因在菌株 M527 及抗性突变株 M527-GR7 和 M527-GR21 中表达稳定性最好。通过以基因 sigB<sub>sr</sub>、16S rRNA<sub>sr</sub>、rpoA<sub>sr</sub> 为内参基因, 检测龟裂霉素生物合成基因簇中的结构基因 rimG<sub>sr</sub> 在菌株 M527-GR7 中不同时间的相对表达量, 发现基因 sigB<sub>sr</sub> 作为内参基因时能得到更准确的结果。

**关键词:** 龟裂链霉菌 M527; 荧光定量 PCR; 内参基因; 稳定性

**中图分类号:** S467 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)03-0429-08

## Selection of Suitable Internal Reference Genes for the Real-Time Quantitative PCR in *Streptomyces rimosus* M527 and Evaluation of Their Stabilities

XU Jie, HU Yefeng, LIAO Zhijun, MA Zheng, YU Xiaoping\*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine/College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, 310018, China)

**Abstract:** *Streptomyces rimosus* M527, a rimocidin producer, has a strong antagonistic effect against a variety of plant pathogenic fungi. In order to analyze the biosynthetic and regulatory mechanism of rimocidin in strain M527 and its resistant mutant at transcriptional level, it is very important to select the most stable internal reference gene for the strain M527 and its resistant mutant. In this study, 16S rRNA<sub>sr</sub>, hrdB<sub>sr</sub>, rpoA<sub>sr</sub>, sigF<sub>sr</sub>, sigB<sub>sr</sub>, gyrB<sub>sr</sub> were selected as candidate reference genes for real-time quantitative PCR, and their stabilities were analyzed in wild-type strain M527 and its resistant strains M527-GR7 (higher-rimocidin producer) and M527-GR21 (lower-rimocidin producer) by using software geNorm, NormFinder, BestKeeper, so as to select the internal reference gene with the highest stability. The results showed that sigB<sub>sr</sub> gene was the most stable internal reference gene among all tested internal reference genes either in the wild-type M527 or in resistant mutants M527-GR7 and M527-GR21. Subsequently, the relative expression of the structural gene rimG<sub>sr</sub> in strain M527-GR7 was detected at different time during fermentation process by using the genes sigB<sub>sr</sub>, 16S rRNA<sub>sr</sub> and rpoA<sub>sr</sub> as internal reference genes. The results revealed that analysis at transcriptional level could be more accurate when the gene sigB<sub>sr</sub> was used as an internal reference gene.

收稿日期: 2019-11-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31772213, 31972320); 浙江省杰出青年基金 (LR17C140002)

作者简介: 徐洁, 硕士研究生, E-mail: xujie6869@126.com; \*通信作者, 博士, 研究员, E-mail: yxp@cjl.u.edu.cn.

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.03.020

**Key words:** *Streptomyces rimosus* M527; real-time quantitative PCR; internal reference genes; stability

实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR or qPCR) 是由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种定量试验技术<sup>[1-3]</sup>, 已被广泛应用于各个生物在转录水平进行基因表达定量研究<sup>[4-7]</sup>。在试验过程中, 该方法需要用内参基因对目标基因表达量进行校正, 从而获得更准确的试验结果<sup>[8,9]</sup>。大量试验结果表明, 任何一种内参基因都是在一定范围内稳定表达, 不同的实验样本, 不同的试验条件都会造成其几十倍甚至上百倍的差异<sup>[10-12]</sup>。因此, 在试验前选择多个内参基因进行评估, 筛选稳定表达的内参基因<sup>[13]</sup>, 显得尤为重要。

链霉菌被称为天然药物的合成工厂, 是放线菌中最有商业价值的种类之一<sup>[14,15]</sup>。目前利用 RT-qPCR 技术分析基因表达水平已成为解析链霉菌天然产物生物合成分子机制的重要手段, 其中以 16S rRNA 和 *hrdB* (principle sigma factor) 做为内参基因的研究报道较多, 但不同的链霉菌株内参基因的选择不尽相同<sup>[16,17]</sup>。因此, 目前有关链霉菌内参基因的筛选已有不少研究<sup>[18-20]</sup>。

作者课题组前期在自然环境土壤中分离并鉴定了一株龟裂霉素 (rimocidin) 生产菌龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* M527<sup>[21]</sup>, 并通过核糖体工程方法筛选获得高产龟裂霉素抗性突变株 M527-GR7<sup>[22]</sup>。为深入研究龟裂链霉菌 M527 及其抗性突变株 M527-GR7 中龟裂霉素的生物合成机制, 以常用的 16S rRNA 为内参基因, 从转录水平上分析了基因簇与龟裂霉素合成的相关性<sup>[22]</sup>。然而在龟裂链霉菌 M527 中 16S rRNA 是否表达稳定, 可以作为较理想的内参基因, 尚不清楚。

本研究选取龟裂链霉菌 M527、一株高产龟裂霉素抗性突变株 M527-GR7 以及一株龟裂霉素低产抗性突变株 M527-GR21 作为研究对象。以 16S rRNA、*hrdB*、*rpoA* (RNA polymerase  $\alpha$ -subunit)、*sigF* (sigma factor)、*sigB* (sigma factor) 和 *gyrB* (DNA gyrase subunit B) 这 6 个常用内参基因作为研究对象<sup>[18,20]</sup>。使用 geNorm 软件、NormFinder 软件和 BestKeeper 软件<sup>[23]</sup>分析此 6 个内参基因在 3 株菌株中的表达情况, 筛选出稳定表达的内参基因。为了更好验证筛选到内参基因的准确性, 选取了龟裂霉素生物合成基因簇中的结构基因 *rimG<sub>sr</sub>* (GenBank accession number: MK300953) 作为目的基因对筛选出的内参基因进行进一步验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 野生型龟裂链霉菌 M527, 龟裂霉素生产菌株; 龟裂霉素高产抗性突变株 M527-GR7; 龟裂霉素低产抗性突变株 M527-GR21, 这些菌株均由浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室保存。

1.1.2 试剂 本研究中 RNA 提取试验使用 AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit 试剂盒; 使用 PrimerScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 进行反转录试验, 获得 cDNA 进行后续试验; 使用 TB Green<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>TM</sup> (TliRNaseH Plus) (TaKaRa) 试剂盒进行 RT-qPCR, 本研究中所用试剂均购自杭州皓丰生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 样品制备 取-80 °C 保存的各菌株孢子液各 200  $\mu$ L 分别涂布在新鲜的 MS 固体培养基平板上, 放置于 28 °C 恒温培养箱培养 5 d, 用灭菌过的 ddH<sub>2</sub>O 刮取孢子, 并取 1 mL 孢子液 ( $1 \times 10^8$  孢子/mL) 接种于 50 mL 种子培养基中, 放置于 28 °C 恒温摇床, 180 r/min 培养 48 h 后, 以 4% 的接种量接至 50 mL 发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 4 d, 并选取 48、72、96 h 的发酵液样品作为试验样本, 置于-80 °C 冰箱保存。每株菌做 3 组平行试验, 并进行 3 次以上的重复试验。

1.2.2 内参基因的选取、引物设计及验证 从 NCBI 网站下载各内参基因序列信息, 在龟裂链霉菌 M527 基因组中比对得到相应的内参基因序列, 命名为 16S rRNA<sub>sr</sub>、*hrdB<sub>sr</sub>*、*rpoA<sub>sr</sub>*、*sigF<sub>sr</sub>*、*sigB<sub>sr</sub>*、*gyrB<sub>sr</sub>*。根据比对到的内参基因序列, 使用 Primer Premier 6.0 设计荧光引物, 如表 1。引物需制作标准曲线验证引物的特异性以及扩增效率, 使用 cDNA 为模板, 以 1:5 的比例将模板稀释成 5 个梯度进行试验。采用 TB Green<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>TM</sup> II (TliRNaseH Plus) 试剂盒进行 RT-qPCR 试验, 每个样品 3 次重复, 反应体

系为 20  $\mu$ L: TB Green *Premix Ex Taq* II (TliRNaseH Plus) (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, PCR Forward Primer (10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L, PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 灭菌水 6  $\mu$ L; 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 30 s; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。试验使用 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) 仪器。要求所设计引物的熔解曲线峰型单一、所作标准曲线  $R^2 > 0.98$ 、扩增效率 (Efficiency) 90%~110%, 方可用于后续试验。

1.2.3 菌株总 RNA 提取, cDNA 的获取以及 RT-qPCR 取出在-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存的样品, 放置于冰上融化, 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 5 min, 弃尽上清液。菌体用液氮研磨成白色粉末, 即可进行 RNA

提取, RNA 提取步骤参照 AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit 试剂盒说明书进行。提取完成后使用 Nanodorp 2000 分光光度计测定 RNA 浓度, 用于 RNA 反转录。反转录试验过程和体系参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行。获得到的 cDNA 可直接用于下一步试验或者保存于-20  $^{\circ}$ C 冰箱。荧光反应采用两步法扩增, 具体实验过程参照 TaKaRa 公司的 TB Green<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> II (TliRNaseH Plus) 试剂盒说明书进行。

1.2.4 数据与分析 将 RT-qPCR 结果导出至 Excel 表格, 按照 geNorm 软件、NormFinder 软件和 BestKeeper 软件的操作流程<sup>[23]</sup>对各候选内参基因在不同菌株不同发酵时间的表达稳定性进行评估。这 3 个软件都是常用的内参分析软件, geNorm 软件是 Vandesompele 等<sup>[24]</sup>编写的用于在 RT-qPCR 中筛选内参基因及确定最适内参基因数目的程序。该程序通过计算每个内参基因的 M 值来筛选稳定性相对较好的内参基因, M 值越小, 基因稳定性越好。NormFinder 软件是 Andersen<sup>[25]</sup>等在 2004 年编写的, 该程序的计算方法与 geNorm 软件类似, 但是该软件只能筛选出一个最合适的内参基因, 而 geNorm 软件可挑选出 2 个及 2 个以上的内参基因用于组合校正数据。BestKeeper 软件是一个内置公式的 Excel 表格, 在其中直接输入相应数据后, 软件将自动计算好相应系数 (r)、标准偏差 (SD) 和变异系数 (CV)<sup>[26]</sup>。这 3 个软件是专门用于评估内参基因稳定性的程序, 三者各有优点。使用 3 种软件对候选内参基因稳定性进行评估, 得出最终结果。

1.2.5 内参基因的验证 选取龟裂霉素生物合成基因簇中重要的结构基因 *rimG<sub>sr</sub>* 作为目的基因, 分别以分析得到的稳定性最高和最差的内参基因以及常用内参基因 16S rRNA<sub>sr</sub> 作为内参基因, 测试其在菌株 M527-GR7 中不同发酵时间的相对表达量<sup>[27]</sup>变化, 同时结合该菌株龟裂霉素产量变化分析所选内参基因的合理性。RT-qPCR 过程参照 1.2.3。

1.2.6 龟裂霉素的检测 龟裂霉素检测方法参照文献<sup>[21]</sup>。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因的特异性验证和扩增效率

以 1:5 的比例将获得到的 cDNA 模板稀释成 5 个梯度进行 RT-qPCR 试验, 绘制每个内参基因的标准曲线。6 个候选的内参基因其熔解曲线峰型单一, 说明其特异性良好, 且 6 个内参基因的标准曲线线性相关系数  $R^2$  均大于 0.98, 这表明试验结果可靠。其扩增效率均在 90%~110%, 均达到了 RT-qPCR 试验对扩增效率的要求 (表 2)。

2.2 geNorm 软件分析

使用 geNorm 软件分析各个内参基因的相对定量值, 其稳定性等级以 M 值的大小来判断, M 值越小, 基因越稳定。在原始菌株 M527 中, 6 个内参基因稳定性排序为 *sigB<sub>sr</sub>* > *sigF<sub>sr</sub>* > 16S rRNA<sub>sr</sub> > *gyrB<sub>sr</sub>* > *hrdB<sub>sr</sub>*

表 1 各内参基因荧光引物扩增信息  
Table 1 Primer amplification information of different internal reference genes

基因名称 Genes	引物序列 Primer (5'-3')
16S rRNA <sub>sr</sub>	CCTTCCTCCGAGTTGACCC
	CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
<i>hrdB<sub>sr</sub></i>	GAGTCCGAGTCAGTGATG
	GTCGAGGATCTGGTTGAG
<i>rpoA<sub>sr</sub></i>	CTTGTAAGTGACCTTGAGGA
	AAGGGCAAGCTGGAGATG
<i>sigF<sub>sr</sub></i>	CGACCTGGATGATGTCCTTC
	CACGCACGAATACCAGTA
<i>sigB<sub>sr</sub></i>	ATCTGTGCCTGCGTCATC
	ATGGAGCTGGTCGAGAAC
<i>gyrB<sub>sr</sub></i>	GAGATGAACGCCGAAGAG
	CATGAGCACCGAGAACAG
<i>rimG<sub>sr</sub></i>	GGCGAAGTGGGTGAAGGG
	ACACCGCCTCCTCGTCCTC

$>rpoA_{sr}$ ; 在高产突变菌株 M527-GR7 中, 各基因稳定性排序为  $sigB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>hrdB_{sr}>gyrB_{sr}>sigF_{sr}>rpoA_{sr}$ ; 而在低产突变株 M527-GR21 中, 各基因按照 M 值得到的稳定性排序为  $16S\ rRNA_{sr}>hrdB_{sr}>sigB_{sr}>gyrB_{sr}>sigF_{sr}>rpoA_{sr}$  (表 3)。由此可见, 稳定性相对较高的是基因  $sigB_{sr}$  和  $16S\ rRNA_{sr}$ , 稳定性最差的为基因  $rpoA_{sr}$ 。

表 2 各内参基因荧光引物扩增信息  
Table 2 Primer amplification information of internal reference genes

基因名 Genes	扩增大小 Product size (bp)	$R^2$	斜率 Slope	扩增效率 Efficiency (%)	产物 Tm 值 Product Tm (°C)
16S $rRNA_{sr}$	112	0.982	-3.338	99.317	86.02
$hrdB_{sr}$	118	0.998	-3.304	102.943	87.66
$rpoA_{sr}$	120	0.997	-3.325	100.749	88.20
$sigF_{sr}$	98	0.999	-3.272	104.097	87.51
$sigB_{sr}$	109	0.995	-3.415	95.364	88.25
$gyrB_{sr}$	110	0.996	-3.382	97.886	87.36

表 3 geNorm 软件对各菌株内参基因的分析  
Table 3 Analysis results for internal reference genes in each strain by geNorm

基因 Gene	M527		M527-GR7		M527-GR21	
	M 值 Value	稳定值等级 Stability rank	M 值 Value	稳定值等级 Stability rank	M 值 Value	稳定值等级 Stability rank
16S $rRNA_{sr}$	1.468	3	1.625	2	1.819	1
$hrdB_{sr}$	1.519	5	1.633	3	1.837	2
$rpoA_{sr}$	2.469	6	2.701	6	2.690	6
$sigF_{sr}$	1.447	2	1.949	5	2.359	5
$sigB_{sr}$	1.377	1	1.616	1	2.083	3
$gyrB_{sr}$	1.483	4	1.852	4	2.317	4

2.2 NormFinder 软件分析

根据 NormFinder 软件分析, 在野生型龟裂链霉菌 M527 中, 各内参基因稳定性大小排序:  $sigB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>sigF_{sr}>hrdB_{sr}>gyrB_{sr}>rpoA_{sr}$ ; 在菌株 M527-GR7 中, 其稳定性排序为:  $sigB_{sr}>hrdB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>sigF_{sr}>gyrB_{sr}>rpoA_{sr}$ ; 在菌株 M527-GR21 中, 内参基因稳定性为:  $hrdB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>sigB_{sr}>sigF_{sr}>gyrB_{sr}>rpoA_{sr}$  (表 4)。由该软件分析结果可知, 在所有菌株中较为稳定的内参基因为基因  $sigB_{sr}$ , 而稳定性最差的是基因  $rpoA_{sr}$ 。

表 4 NormFinder 软件对各菌株内参基因的分析  
Table 4 Analysis results for candidate internal reference genes in each strain by NormFinder

基因 Gene	M527		M527-GR7		M527-GR21	
	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank
16S $rRNA_{sr}$	0.506	2	0.906	3	0.583	2
$hrdB_{sr}$	0.892	4	0.879	2	0.460	1
$rpoA_{sr}$	1.675	6	1.812	6	1.777	6
$sigF_{sr}$	0.718	3	0.940	4	1.390	4
$sigB_{sr}$	0.267	1	0.284	1	1.229	3
$gyrB_{sr}$	0.910	5	1.184	5	1.502	5

2.3 BestKeeper 软件分析

BestKeeper 软件认为, 在菌株 M527 中, 各内参基因稳定性为  $gyrB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>sigB_{sr}>sigF_{sr}>$

$hrdB_{sr}>rpoA_{sr}$ ; 在菌株 M527-GR7 中, 其稳定性排序为  $gyrB_{sr}>sigB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>hrdB_{sr}>sigF_{sr}>rpoA_{sr}$ ; 在菌株 M527-GR21 中, 其稳定性排序为  $gyrB_{sr}>sigB_{sr}>16S\ rRNA_{sr}>hrdB_{sr}>sigF_{sr}>rpoA_{sr}$  (表 5)。由 BestKeeper 软件分析可知, 较为稳定的内参基因为  $gyrB_{sr}$ , 最不稳定的基因为  $rpoA_{sr}$ 。

表 5 BestKeeper 软件对各菌株内参基因的分析  
Table 5 Analysis results for candidate reference genes in each strain by BestKeeper

基因 Gene	M527		M527-GR7		M527-GR21	
	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank	稳定值 Stability value	稳定值等级 Stability rank
16S rRNA <sub>sr</sub>	1.107	2	1.173	3	0.990	3
<i>hrdB<sub>sr</sub></i>	3.145	5	2.682	4	3.186	4
<i>rpoA<sub>sr</sub></i>	6.092	6	5.797	6	11.355	6
<i>sigF<sub>sr</sub></i>	2.773	4	3.652	5	8.086	5
<i>sigB<sub>sr</sub></i>	1.218	3	1.158	2	0.622	2
<i>gyrB<sub>sr</sub></i>	1.099	1	1.012	1	0.497	1

2.4 综合分析

为更准确的分析 3 个软件分析到的结果, 对 3 个软件所得到的稳定值进行比较分析, 发现 BestKeeper 软件的分析结果与 geNorm 软件和 NormFinder 软件的分析结果差异较大。由于 geNorm 软件和 NormFinder 软件的算法相似, 因此得出的结果差异较小, 为得到更准确的内参基因稳定性数据, 对不同菌株中候选内参基因稳定性等级进行了平均值计算。6 个候选内参基因 16S rRNA<sub>sr</sub>、*hrdB<sub>sr</sub>*、*rpoA<sub>sr</sub>*、*sigF<sub>sr</sub>*、*sigB<sub>sr</sub>*、*gyrB<sub>sr</sub>* 的稳定性等级平均值分别为 2.16、2.83、6.00、3.83、1.67、4.50 (表 6)。由此可知, 在各株菌中表达最稳定的基因为基因 *sigB<sub>sr</sub>*, 最不稳定的为基因 *rpoA<sub>sr</sub>*。因此, *sigB<sub>sr</sub>* 可作为内参基因, 用于研究龟裂链霉菌 M527 及其突变株中基因转录水平变化。

表 6 各内参基因在不同菌株中的稳定性等级排序  
Table 6 Overall stability rank of the candidate reference genes in all strains

基因 Gene	geNorm 软件			NormFinder 软件			平均等级
	M527	M527-GR7	M527-GR21	M527	M527-GR7	M527-GR21	Mean rank
16S rRNA <sub>sr</sub>	3	2	1	2	3	2	2.16
<i>hrdB<sub>sr</sub></i>	5	3	2	4	2	1	2.83
<i>rpoA<sub>sr</sub></i>	6	6	6	6	6	6	6.00
<i>sigF<sub>sr</sub></i>	2	5	5	3	4	4	3.83
<i>sigB<sub>sr</sub></i>	1	1	3	1	1	3	1.67
<i>gyrB<sub>sr</sub></i>	4	4	4	5	5	5	4.50

2.5 内参基因的稳定性验证

筛选出稳定性较好的基因后, 为验证所选基因的稳定性, 选取了稳定性最好的内参基因 *sigB<sub>sr</sub>*、常用内参基因 16S rRNA<sub>sr</sub> 以及稳定性最差的内参基因 *rpoA<sub>sr</sub>*, 分别以这 3 个基因为内参基因, 分析基因 *rimG<sub>sr</sub>* 在抗性突变株 M527-GR7 发酵不同时间的相对表达量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值, 野生型龟裂链霉菌 M527 中的基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的表达量计为 1), 并利用 HPLC 检测对应发酵液中的龟裂霉素产素水平结果表明, 以 *sigB<sub>sr</sub>* 为内参基因时, 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 在菌株 M527-GR7 中的相对表达量与其龟裂霉素产素水平呈正相关, 而以 *rpoA<sub>sr</sub>* 为内参基因时, 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量在 48 h 较高, 在 72、96 h 表达量迅速降低, 这与菌株 M527-GR7 中龟裂霉素的产素水平不符, 菌株 M527-GR7 在 96 h 时的龟裂霉素产量达到最高 (图 1, 2)。为进一步验证所选内参基因的稳定性, 本研究选取常用的 16S rRNA<sub>sr</sub> 为内参基因, 研究突变株 M527-GR7 中基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量结果显示, 以 16S rRNA<sub>sr</sub> 为内参基因时, 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 在菌株 M527-GR7 中的相对表达量分别为 11.267、14.101、12.326 (图 1); 在 48~72 h, 其相对表达量与龟裂霉素产素水平趋势一致, 而在

96 h 时, 下降趋势与龟裂霉素产量并不一致(图 2)。总的来说, 以 *sigB<sub>sr</sub>* 作为内参基因进行试验所得结果较为理想, *sigB<sub>sr</sub>* 可作为内参基因用于后续菌株 M527 及其突变株中相关基因转录水平的研究分析。

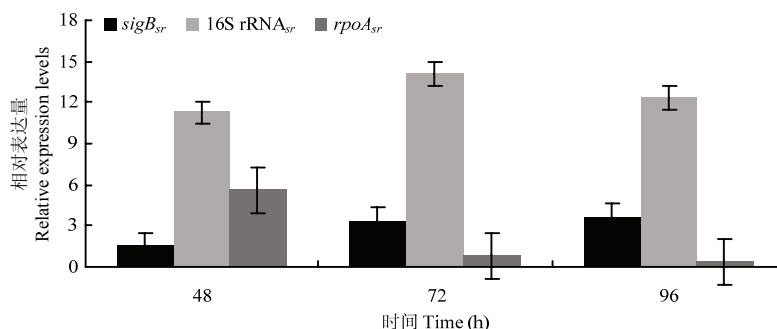


图 1 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 以不同内参基因在菌株 M527-GR7 中的相对表达量

Fig. 1 Expression level of *rimG<sub>sr</sub>* gene in strain M527-GR7 by different internal reference genes

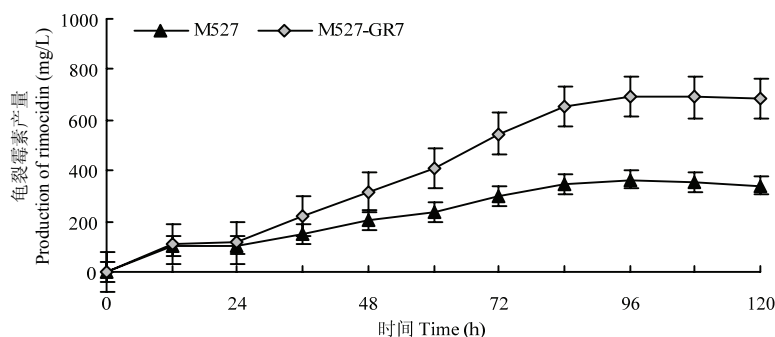


图 2 菌株 M527 和菌株 M527-GR7 中龟裂霉素产素水平

Fig. 2 The production of rimocidin in strain M527 and strain M527-GR7

### 3 讨论

本研究首先在龟裂链霉菌 M527 及其突变株中利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 软件对 6 个常用的内参基因的表达稳定性进行评估, 以期筛选出在不同菌株生长各个阶段都能稳定表达的内参基因。研究发现: 由于 BestKeeper 软件是直接依赖于 Cq 值的配对相关性分析, 是直接反应原始数据的<sup>[6]</sup>, 其算法与其他两个软件差异较大, 在内参基因的稳定性排序上并没有另两个软件有效, 只适合于初步的筛选。综合 geNorm 和 NormFinder 软件的分析结果, 龟裂链霉菌 M527 中 16S rRNA<sub>sr</sub> 的稳定性好于 *hrdB<sub>sr</sub>*, 虽然这两个基因作为常用的内参基因, 但在龟裂链霉菌 M527 中的稳定性并非最佳, 表达稳定性最好的内参基因为 *sigB<sub>sr</sub>*, 表达稳定性最差的内参基因为 *rpoA<sub>sr</sub>*。而汤谷等<sup>[18]</sup>研究发现在淀粉酶产色链霉菌 1628 中 *rpoA* 是表达最为稳定的内参基因。由此可见, 链霉菌菌株之间由于遗传背景等方面的不同, 内参基因的表达稳定性及其选择差异较大。

基因 *sigB* 编码  $\sigma^B$  (sigma B) 因子,  $\sigma^B$  因子是 RNA 聚合酶  $\sigma$  因子的一种。 $\sigma^B$  因子是革兰氏阳性菌中常见的对环境胁迫产生应答反应的主要调控因子, 它能可逆地与 RNA 聚合酶核心酶的活性催化位点结合来激活起始转录<sup>[28,29]</sup>, 其表达一般不易受外界条件的影响。龟裂链霉菌 M527 编码  $\sigma^B$  因子的 *sigB<sub>sr</sub>* 基因具有高保守性, 故表达稳定性好。

为进一步验证所选内参基因的稳定性, 以基因 *sigB<sub>sr</sub>* 和 *rpoA<sub>sr</sub>* 作为内参基因分析龟裂霉素生物合成基因簇中基因 *rimG<sub>sr</sub>* 在菌株 M527-GR7 中的相对表达量(野生型龟裂链霉菌 M527 中基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的表达量计为 1)。结果显示: 当以 *sigB<sub>sr</sub>* 为内参基因时, 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达水平与龟裂霉素合成有极大的相关

性, 而以 *rpoA<sub>sr</sub>* 作为内参基因时, 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量与龟裂霉素合成并不一致, 在龟裂霉素合成阶段 (72–96 h), 基因 *rimG<sub>sr</sub>* 相对表达量反而降低, 这与实际情况不一致 (图 1), 此结果以实例验证了基因 *sigB<sub>sr</sub>* 作为内参基因是稳定的, 基因 *rpoA<sub>sr</sub>* 不宜作为内参基因, 与软件综合分析结果相吻合。

为进一步验证内参基因 *sigB<sub>sr</sub>* 的表达稳定性及其适用性, 本研究同时比较分析了以 16S rRNA<sub>sr</sub> 和 *sigB<sub>sr</sub>* 分别作为内参基因时基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量。结果显示, 在以 16S rRNA<sub>sr</sub> 作为内参基因时, 菌株 M527-GR7 在整个发酵过程中基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量均处于较高水平, 而 M527-GR7 龟裂霉素产素水平仅是原始菌株 M527 的 1.89 倍; 以 *sigB<sub>sr</sub>* 为内参基因时, 测得 72 和 96 h 时, 菌株 M527-GR7 中基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的相对表达量分别为 3.4 和 3.7 倍。比较两者结果, 基因 *sigB<sub>sr</sub>* 为内参基因所得结果与龟裂霉素产素水平更吻合。虽然以 16S rRNA<sub>sr</sub> 为内参基因时测得基因 *rimG<sub>sr</sub>* 相对表达量与龟裂霉素合成趋势基本一致, 但由于基因 16S rRNA<sub>sr</sub> 在各菌株中的表达量较高, 其所得 Ct 值较小, 从而导致与目的基因 *rimG<sub>sr</sub>* 的 Ct 值相差较大, 在使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算基因 *rimG<sub>sr</sub>* 相对表达量时, 最终会使计算结果较实际情况而言偏大。而基因 *sigB* 与基因 *rimG<sub>sr</sub>* 在龟裂链霉菌 M527 中保持在同一表达水平, 在计算时的准确度相比 16S rRNA<sub>sr</sub> 为内参基因的结果更准确。因此, 验证了本试验筛选的 *sigB<sub>sr</sub>* 较常用的内参基因 16S rRNA<sub>sr</sub> 是更为理想的内参基因, 更适用于分析龟裂链霉菌 M527 及其突变株中基因的表达水平。本研究结果为进一步分析龟裂链霉菌 M527 及其突变株中龟裂霉素相关合成调控基因的表达水平分析提供了依据。

## 参 考 文 献

- [1] Schmittgen T D. Real-time quantitative PCR[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 383-385.
- [2] Hein I, Lehner A, Rieck P, *et al.* Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3122-3126.
- [3] Rajeevan M S, Ranamukhaarachchi D G, Vernon S D, *et al.* Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 443-451.
- [4] An X K, Hou M L, Liu Y D. Reference gene selection and evaluation for gene expression studies using qRT-PCR in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (hemiptera: delphacidae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 109(2): 879-886.
- [5] Hu Y, Deng T, Chen L, *et al.* Selection and validation of reference genes for qRT-PCR in *Cycas elongata*[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0154384.
- [6] Pollier J, Vanden B R, Rischer H, *et al.* Selection and validation of reference genes for transcript normalization in gene expression studies in *Catharanthus roseus*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 83: 20-25.
- [7] 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]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(2): 227-236.
- [8] 赵文静, 徐洁, 包秋华, 等. 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.
- [9] Radonić A, Thulke S, Mackay I M, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2004, 313(4): 856-862.
- [10] Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2013, 54(4): 391-406.
- [11] Nieto P A, Covarrubias P C, Jedlicki E, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: Case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10(1): 63.
- [12] Xu L, Ma X, Cui B, *et al.* Selection of reference genes for qRT-PCR in high fat diet-induced hepatic steatosis mice model[J]. *Molecular Biotechnology*, 2014, 48(3): 255-262.
- [13] Andras D, Szilard B, Arpad G, *et al.* Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured *in vivo* and *in vitro*[J]. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7(1): 1-12.
- [14] Liu R, Deng Z, Liu T. *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 74-84.
- [15] Manteca Á, Yagüe P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism[J]. *Antibiotics*, 2018, 7(2): 41.
- [16] Cui H, Ni X, Liu S, *et al.* Characterization of three positive regulators for tetracycline biosynthesis in *Streptomyces ahyscopicus*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(12): ffw109.
- [17] Yan L, Zhang Q, Virolle M J, *et al.* In conditions of over-expression, WblI, a WhiB-like transcriptional regulator, has a positive impact on the weak

- antibiotic production of *Streptomyces lividans* TK24[J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0174781.
- [18] 汤谷, 姚佳忆, 申屠旭萍, 等. 几个常用内参基因在淀粉酶产色链霉菌 1628 抗药性突变株中稳定性的评估[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 518-523.
- [19] Li S, Wang W, Li X, *et al.* Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for *Streptomyces coelicolor*[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 15840.
- [20] Rocha D J P, Santos C S, Pacheco L G C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(3): 685-693.
- [21] Lu D, Ma Z, Xu X, *et al.* Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(8): 929-933.
- [22] Zhao Y F, Song Z Q, Ma Z, *et al.* Sequential improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by introduction of cumulative drug-resistance mutations[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(5): 697-708.
- [23] Jian Y W U, Bing H E, Yu J D U, *et al.* Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper[J]. Modern Agricultural Science & Technology, 2017, 5: 278-281.
- [24] 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 Biology, 2002, 3(7): research0034.
- [25] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft 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 Research, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [26] 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]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6): 509-515.
- [27] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2000, 25(4): 402-408.
- [28] Brahamsha B, Haselkorn R. Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression, and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(22): 7273-7282.
- [29] Cho Y H, Lee E J, Ahn B E, *et al.* SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 42(1): 205-214.