

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :383 - 390; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.004

基于反转录实时荧光定量 PCR 的 3 种标准曲线定量活副溶血性弧菌的差值分析

靳梦瞳, 孙文烁, 李沁, 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】比较分析基于反转录实时荧光定量 PCR (Real-time Reverse-Transcriptase PCR, Real-time RT-PCR) 技术建立的 3 种标准曲线定量样品中活副溶血性弧菌数量的差异性。【方法】体外转录合成带有目的片段(*tlh* 基因)的 RNA 标准品, 提取纯培养副溶血性弧菌(10^8 CFU/mL) RNA 样品, 提取接种于虾上副溶血性弧菌(10^6 CFU/g) RNA 样品, 将 3 种 RNA 样品分别反转录得到 cDNA, 10 倍梯度稀释, 进行 Real-time PCR 扩增, 建立标准曲线 A、B、C (其中标准曲线 A 和 C 为本研究首次建立)。用标准曲线 A、B、C 分别定量 6 个样品(2 个纯培养副溶血性弧菌样品、2 个人工污染煮熟南美白对虾样品和 2 个人工污染生南美白对虾样品)中活副溶血性弧菌数量, 并与传统涂布计数法进行比较, 分析定量结果的差异性。【结果】3 种标准曲线均具有较好的线性关系($R^2 > 0.99$); 3 种标准曲线定量 6 个样品中活副溶血性弧菌结果均显著($p < 0.05$) 低于涂布定量结果, 与涂布定量结果的相对误差大小顺序为: 标准曲线 A (30.0%) > 标准曲线 C (18.8%) > 标准曲线 B (6.9%); 标准曲线 A 对 6 个样品定量结果与标准曲线 B、C 定量结果的差值平均值分别为 -2.25 Lg CFU/mL 和 -0.75 Lg CFU/mL, 相对误差平均值为 48.2% 和 15.9%, 标准曲线 B 与 C 对 6 个样品定量结果的差值在 (1.47 - 1.53) Lg CFU/mL 之间, 相对误差在 19.0% - 23.8% 之间。【结论】标准曲线 B 可以广泛应用于 Real-time RT-PCR 准确定量样品中微生物数量。

关键词: Real-time RT-PCR, 标准曲线, 副溶血性弧菌

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)04-0383-08

目前实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术已被广泛用于环境及食品等样品中微生物数量的定量检测^[1-2]。在食品微生物检测中广泛应用基于 DNA 水平的 Real-time PCR 技术^[3-4], 虽然检测速度快、特异性强、灵敏度高, 但由于 DNA 能够稳定存

在于活菌和死菌中, 因此易导致假阳性^[5]的产生。相比于 DNA, RNA 只存在于活细胞中, 因此基于 RNA 水平的 Real-time Reverse-Transcriptase PCR (Real-time RT-PCR) 可以准确定量样品中的活菌数^[6-7], 已成为目前利用分子生物学方法检测活菌

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 (11310501100); 上海市科学技术委员会科技创新行动计划项目 (12391901300); 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 2014 第 3-5 号)

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

作者简介: 靳梦瞳 (1989 -), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为食品安全风险评估。E-mail: 1012910280@qq.com

收稿日期: 2013-08-04; **修回日期:** 2013-12-11

数的研究热点。

目前一般利用 Real-time PCR 标准曲线法定量样品中微生物数量^[8-9],其中基于 DNA 水平的 Real-time PCR 技术检测样品中微生物数量时,建立标准曲线的方法有 3 种:(1) 将目的基因连接到质粒载体,提取含目的基因质粒,计算浓度后梯度稀释进行 Real-time PCR 扩增,建立质粒拷贝数与 C_T 值的标准曲线,检测样品中细菌数量^[10-11];(2) 提取已知浓度的纯培养细菌 DNA,梯度稀释后进行 Real-time PCR 扩增,建立 Log 值与 C_T 值的标准曲线,检测样品中细菌数量^[11-13];(3) 提取接种于食品基质中已知浓度的细菌 DNA,梯度稀释后进行 Real-time PCR 扩增,建立 Log 值与 C_T 值的标准曲线,检测样品中细菌数量^[11,14-15]。目前,由于研究热点集中于样品中活菌数定量,而 Real-time RT-PCR 标准曲线的建立方法并不成熟,因此,部分研究者利用上述基于 DNA 水平的 Real-time PCR 标准曲线建立方法,选用梯度稀释的 DNA 扩增,建立标准曲线进行定量样品中活菌数。如包秋华等^[16]利用含有目的基因的质粒建立标准曲线,定量检测发酵乳中植物乳杆菌及嗜酸乳杆菌的活菌数;Bui 等^[1]提取接种于鸡粪上的空肠弯曲杆菌 DNA 建立标准曲线,定量检测鸡粪中活空肠弯曲杆菌数量。这两种方法都是基于 DNA 水平的标准曲线,而检测样品时,却提取样品的 RNA 进行定量,由于 DNA 与 RNA 的提取方法不同,导致提取效率不同,从而致使定量结果不一致。因此,需要建立基于 RNA 水平的标准曲线^[2],定量检测样品中活菌数,降低因提取效率差异而引起的误差。

本研究参照病毒体外转录合成 RNA 标准品,反转录为 cDNA 梯度稀释进行 Real-time PCR 扩增,建立标准曲线的方法^[17],首次利用体外转录合成带有副溶血性弧菌 *tlh* 基因的 RNA 作为标准品,建立标准曲线 A;根据 Ye 等^[2]建立 RNA 标准曲线的方法,提取菌数已知的纯培养副溶血性弧菌 RNA,反转录得到 cDNA,梯度稀释进行 Real-time PCR 扩增,建立标准曲线 B;参照基于 DNA 水平的第 3 种标准曲线建立方法,首次提取接种于虾上菌数已知的副溶血性弧菌 RNA,反转录,梯度稀释后扩增,建立标准曲线 C。

另外,标准曲线的建立方法不同可能会导致定量结果的差异,已有研究者比较分析基于 DNA 水平的 Real-time PCR 技术的标准曲线定量样品中微生物

数量时的差异性^[12-13,18]。但尚未有研究比较基于 RNA 水平的 Real-time RT-PCR 技术标准曲线定量样品中微生物数量时的差异性。本研究首次比较了 3 种标准曲线定量样品中副溶血性弧菌结果之间的差异性,得到适于 Real-time RT-PCR 检测样品中活菌的最适标准曲线,为后续研究者利用 Real-time RT-PCR 准确定量活菌数奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂:高精度恒温培养箱,日本 Sanyan 公司;离心机,德国 eppendorf 公司;7500fast 荧光定量仪,美国 ABI 公司;Biotek 多功能酶标仪, gene 公司;2⁺SYBR Green Master,罗氏公司;TCBS 培养基,北京陆桥技术有限责任公司;Trizol 试剂,Invitrogen 公司;氯仿/异戊醇(24:1, V/V)、异丙醇、无水乙醇、氯仿、焦碳酸二乙酯(DEPC),上海生工生物工程有限公司;PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser,大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 实验材料:本实验所用的副溶血弧菌(ATCC33847)购自中国科学院微生物研究所;南美白对虾购自上海南汇农贸市场;Real-time PCR 所用的引物(*tlh-F* 5'-agctggttcttagtcactctcc-3',*tlh-R* 5'-ggttttagtcttcgcagctttt-3')由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 荧光定量 PCR 体系及反应参数

荧光定量 PCR 的反应体系为 20 μ L,各组份为 2⁺SYBR Green Master 10 μ L、正向引物(10 μ mol/ μ L) 1.5 μ L、反向引物(10 μ mol/ μ L) 1.5 μ L、DNA 模板 2 μ L 及 ddH₂O 5 μ L。PCR 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 20 s;95 $^{\circ}$ C 3 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环中。在延伸阶段收集荧光信号,反应结束后,对获得的信号数据进行处理。

1.3 灵敏度分析

将公司合成的 RNA 标准品进行反转录,将反转录得到的 cDNA 10 倍稀释 [(10 - 10⁹) 拷贝数/mL] 后进行 Real-time RT-PCR 扩增,分析检测灵敏度。

1.4 特异性检测

为验证所设计出的 *tlh* 基因的 Real-time PCR 引物的特异性,选取了不同种属的共 22 株菌株 (*Vibrio Cholerae* 2 株, *Vibrio Alginolyticus* 1 株, *Vibrio*

netriegens 1 株, *Listeria monocytogenes* 7 株, *Listeria innocua* 1 株, *Pseudomonas* 3 株, *Yersinia* 1 株, *Escherichia coli* 1 株, *Staphylococcus aureus* 1 株, *Salmonella* 1 株, *Macrocooccus caseolyticus* 1 株, *Pseudomonas fluorescens* 1 株, *Pseudomonas putida* 1 株) 进行引物特异性分析, 分别提取所有菌株的 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 结果进行琼脂糖凝胶电泳观察, 分析所设计的引物特异性。

1.5 RNA 提取及 cDNA 合成

RNA 提取采用 Trizol 法, 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^[19]。基因组 DNA 的去除及反转录合成 cDNA 均根据 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行, 反转录后 cDNA 于 -20°C 保存。

1.6 标准曲线的建立

1.6.1 标准曲线 A: 副溶血性弧菌 *tlh* 基因的 RNA 标准品的体外转录合成过程委托大连宝生物公司完成。转录完成后的 RNA 标准品经 DNase I 处理两次后进行样品精制, 最后测定标准品 OD 值, 推算出纯度与拷贝数。

按照 1.5 反转录方法将得到的已知浓度 RNA 标准品进行反转录。将 cDNA 进行 10 倍稀释为 $10^9 - 10^3$ 拷贝数/mL 浓度梯度, 置于 Real-time PCR 扩增仪上进行扩增, 获得标准曲线 A。

1.6.2 标准曲线 B: 取活化后的副溶血性弧菌菌液 100 μL 于 TSB 液体培养基中, 37°C 过夜培养使其达到对数期 (约 10^8 CFU/mL)。菌液进行 10 倍梯度稀释, 取 100 μL 涂布 TCBS 平板, 37°C 过夜培养, 计数。同时取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中 12000 r/min 离心 5 min, 去上清, 菌体用于提取 RNA。RNA 提取及 cDNA 合成按 1.5 所述进行合成的 cDNA 10 倍稀释后进行 Real-time PCR 扩增。根据得到的 C_T 值与 Log_{10} CFU 值制作标准曲线。

1.6.3 标准曲线 C: 取对数期副溶血性弧菌菌液 (约 10^7 CFU/mL) 100 μL 点接种于冲洗后的南美白对虾 (约 10 g) 腹部, 将接种后的虾放入均质袋, 加入 30 mL 无菌生理盐水, 均质袋置于震荡培养箱中震荡 10 min, 震荡结束后取 1 mL 均质液进行 10 倍稀释, 取合适稀释梯度涂布 TCBS 平板, 37°C 过夜培养, 计数。将剩余菌液 (约 29 mL) 收集于 50 mL 离心管中 $10000 \times g$ 、离心 10 min (4°C), 去上清, 收集

菌体, 用于提取 RNA。RNA 提取及 cDNA 合成按 1.5 所述进行, 合成的 cDNA 10 倍稀释后进行 Real-time PCR 扩增。根据得到的 C_T 值与 Log_{10} CFU 值制作标准曲线。

1.7 人工模拟污染样品中副溶血性弧菌 RNA 的制备

取活化后的副溶血性弧菌 (ATCC33847) 100 μL 分别接于 TSB, 37°C 过夜培养使其处于对数期, 分别收集 2 管菌体, 标记为纯培养样品 1、纯培养样品 2; 取处于对数期的副溶血性弧菌菌液按照 1.6.3 的接种方式分别接种于 2 只煮熟和 2 只生的南美白对虾腹部, 按照 1.6.3 的方法收集菌体, 标记为熟虾样品 1、熟虾样品 2、生虾样品 1、生虾样品 2。按 1.5 所述方法提取 6 个样品的 RNA 及合成 cDNA, 合成的 cDNA 于 -20°C 保存。同时取以上 6 个样品菌液进行 10 倍梯度稀释后取合适稀释梯度涂布 TCBS 平板, 37°C 过夜培养, 计数。

1.8 Real-time PCR 扩增

将 6 个样品的 cDNA 与 3 种标准曲线 cDNA 同时进行 Real-time PCR 扩增, 根据标准曲线定量样品中副溶血性弧菌数量。

1.9 数据分析

实验结果采用 SPSS17.0 软件对获得的数据进行显著性分析 ($p = 0.05$)。

2 结果和分析

2.1 普通琼脂糖电泳检测提取的总 RNA 质量

普通琼脂糖凝胶电泳图表明 Trizol 法提取的样品总 RNA 完整性较好, 样品 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值均在 1.9 - 2.1 之间, 表明提取出的总 RNA 浓度纯度较好, 可以用于后续 RT-PCR 检测。

2.2 荧光定量 PCR 灵敏度及特异性分析

对梯度稀释菌液的总 RNA 进行定量检测结果显示, 当标准品拷贝数低于 10^2 拷贝数/mL 时, 荧光定量 PCR 扩增无“S”形的荧光曲线生成。即此方法检测限可达到 100 拷贝数/mL, 灵敏度较高, 可用于实际样品的检测。采用设计所得到的 *tlh* 基因引物对 22 株菌株的 DNA 进行 PCR 扩增, 22 株菌株 DNA 经 PCR 扩增后, 凝胶电泳图均未出现条带, 证明该引物特异性良好, 可以用于样品检测。

2.3 三种标准曲线的建立

建立的3种标准曲线如图1所示。建立的标准曲线相关系数均大于0.99,具有较好的线性关系,PCR反应体系的扩增效率均在最优扩增效率80%–120%之间,表明已建立的荧光定量PCR方法误差较小,3种标准曲线可以用于后续样品的检测。

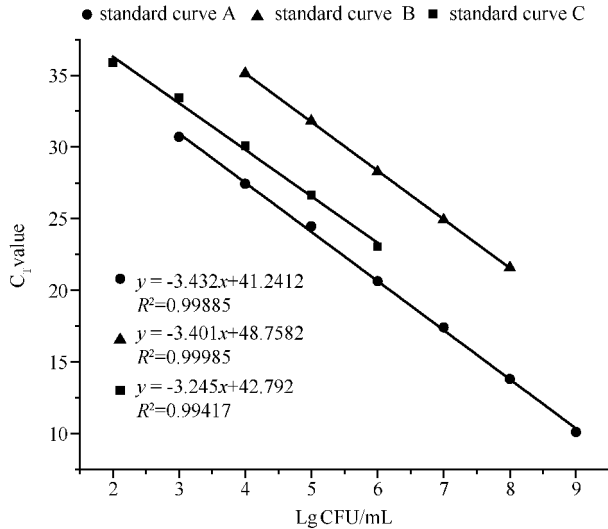


图 1. 3种标准曲线

Figure 1. Three standard curves

2.4 Real-time RT-PCR 定量样品中活副溶血性弧菌数量

利用3种标准曲线及传统涂布方法定量6个样品中副溶血性弧菌菌数,结果如表1所示,除熟虾样品1涂布定量结果与标准曲线B定量结果无显著性差异($p > 0.05$)外,3种标准曲线与涂布对6个样品定量结果之间均具有显著性差异($p < 0.05$)。

不同定量方法定量副溶血性弧菌结果的差值如表2所示,涂布结果与标准曲线A及标准曲线C定量结果差值较大[范围分别为(1.41–2.60) Lg CFU/mL, (0.61–1.81) Lg CFU/mL],相对误差平均值为30.0%及18.8%,但与标准曲线B定量结果差值较小,范围为(0.04–0.88) Lg CFU/mL,相对误差平均值为6.9%;标准曲线A与标准曲线B定量结果之间的差值较大,差值平均数为–2.25 Lg CFU/mL,相对误差平均值达到48.2%,与标准曲线C定量结果之间的差值平均数为–0.75 Lg CFU/mL,相对误差平均值为15.9%;标准曲线B与C定量结果的差值在(1.47–1.53) Lg CFU/mL之间,相对误差平均值为21.7%。

表 1. 不同定量方法定量副溶血性弧菌结果

Table 1. The results of different quantification methods in quantifying the concentration of *V. parahaemolyticus* in samples

sample	quantitative results (Lg CFU/mL) ^e			
	TCBS count	standard curve A	standard curve B	standard curve C
pure culture1	5.60 ± 0.10b	4.19 ± 0.04d	6.44 ± 0.04a	4.91 ± 0.04c
pure culture2	8.09 ± 0.04a	5.49 ± 0.05d	7.75 ± 0.05b	6.28 ± 0.05c
cooked shrimp1	7.07 ± 0.06a	4.77 ± 0.04c	7.02 ± 0.04a	5.52 ± 0.04b
cooked shrimp2	6.27 ± 0.09b	4.89 ± 0.04d	7.15 ± 0.04a	5.65 ± 0.04c
raw shrimp1	7.17 ± 0.09a	4.58 ± 0.03d	6.83 ± 0.03b	5.32 ± 0.03c
raw shrimp2	6.38 ± 0.02b	4.32 ± 0.04d	6.57 ± 0.04a	5.04 ± 0.04c

abcd: Different quantitative results within the same sample indicate the significant differences ($p < 0.05$)

e: Mean ± standard errors

表 2. 不同定量方法定量副溶血性弧菌结果的差值

Table 2. The difference of different quantification methods in quantifying the concentration of *V. parahaemolyticus* samples

sample	difference value (relative error%) [Lg CFU/mL(g)]					
	TCBS count ^a			standard curve A ^b		
	standard curve A	standard curve B	standard curve C	standard curve B	standard curve C	standard curve C
pure culture1	1.41 (25.2%)	–0.84 (15.0%)	0.68 (12.2%)	–2.25 (53.7%)	–0.72 (17.2%)	1.53 (23.8%)
pure culture2	2.60 (32.1%)	0.34 (4.2%)	1.81 (22.4%)	–2.26 (41.2%)	–0.79 (14.4%)	1.47 (19.0%)
cooked shrimp1	2.29 (32.4%)	0.04 (0.5%)	1.54 (21.8%)	–2.25 (47.2%)	–0.75 (15.7%)	1.50 (21.4%)
cooked shrimp2	1.37 (21.9%)	–0.88 (14.0%)	0.61 (9.7%)	–2.25 (46.0%)	–0.76 (15.5%)	1.49 (20.8%)
raw shrimp1	2.58 (36.0%)	0.33 (4.6%)	1.84 (25.7%)	–2.25 (49.1%)	–0.74 (16.2%)	1.51 (22.1%)
raw shrimp2	2.06 (32.3%)	–0.19 (3.0%)	1.33 (20.8%)	–2.25 (52.1%)	–0.72 (16.7%)	1.52 (23.2%)
average	2.05 (30.0%)	–0.20 (6.9%)	1.31 (18.8%)	–2.25 (48.2%)	–0.75 (15.9%)	1.50 (21.7%)

a: The difference of plate count and three standard curves in quantitative results; b: The difference of standard curve A and standard curve B and C in quantitative results; c: The difference of standard curve B and standard curve C in quantitative results.

3 讨论

副溶血性弧菌是一种较常见的食源性致病菌, 由该菌引起的食物中毒事件占细菌性食物中毒事件的 60% 以上^[20], 因此选择较为快速准确的定量副溶血性弧菌的检测方法, 可以为副溶血性弧菌的定量风险评估提供基础^[21]。

传统平板菌落计数法耗时耗力, 需 4d 才能完成, 操作复杂, 检出率低。而 Real-time RT-PCR 检测全过程只需 12 - 16 h, 具有特异性强、灵敏度高、速度快等优点^[22], 且当背景菌存在时, Real-time RT-PCR 可以准确检测和定量样品中特定菌的数量^[11]。

目前, 国内外已有大量研究利用 Real-time PCR 检测牡蛎、虾等食品样品中副溶血性弧菌^[10-11, 15], Real-time PCR 已被广泛用于食品中副溶血性弧菌的检测^[23]。而已有相关研究应用 Real-time RT-PCR 检测鸡粪中的活空肠弯曲杆菌菌数^[1]及猪肉中活单增李斯特菌菌数^[2]等, 但是该方法并未广泛应用于食品中活副溶血性弧菌的检测。因此, Real-time RT-PCR 用于检测食品中活副溶血性弧菌的前景广阔, 具有推广使用价值。

本研究采用基于 RNA 的 Real-time RT-PCR 定量副溶血性弧菌活菌数^[16], 此方法可以避免假阳性的出现^[24]。Real-time RT-PCR 对 RNA 的质量要求极为严格^[25], 因此高质量的 RNA 是后续 RT-PCR 检测的关键^[26]。本实验采用 Trizol 法提取副溶血性弧菌的 RNA^[27], 这种方法样本裂解较充分, 蛋白质消化较完全, 提取出的总 RNA 浓度较高, 纯度高, 可以用于后续 RT-PCR 检测。

Real-time PCR 的重要参数是灵敏性、特异性及线性关系等^[24]。本研究设计的副溶血性弧菌的 *tlh* 基因引物特异性较好, 利用 PCR 对供试菌株进行扩增均无阴性扩增, 引物可以用于副溶血性弧菌的特异性检测。本研究得到的最低检测限为 100 拷贝数/mL, 该值与周丽民等^[28]得到的检测限 100 拷贝数/mL 一致, 检测灵敏度较高, 可用于样品的检测。线性回归方程相关系数 (R^2) 是标准曲线构建是否成功的重要参数, 一般认为 $R^2 > 0.995$ 为各个梯度间相关性较好^[29]。本研究建立的 3 种标准曲线相关系数均在 0.995 以上, 说明 3 种标准曲线的稳定性及可靠性较好, 可用于后续样品的检测。

标准曲线的建立是 Real-time PCR 定量中的一个关键步骤, 但标准曲线的建立方法不同, 可能会导致定量结果的差异^[12], 因此本研究首次比较分析了基于 RNA 水平的 Real-time PCR 技术的 3 种标准曲线定量样品中活副溶血性弧菌数量的差异性, 其中标准曲线 A 与 C 为本研究首次建立并用于活菌的检测。标准曲线 A 和标准曲线 C 的定量结果显著 ($p < 0.05$) 低于涂布定量结果, 差值较大, 相对误差平均值分别为 30.0% 和 18.8%。Bui 等^[1]利用标准曲线 C 的建立方法建立标准曲线定量鸡粪样品中空肠弯曲杆菌的数量, 结果显示引物不同会导致标准曲线定量结果与涂布结果差值不同, 可以解释本研究。标准曲线 B 的定量结果显著 ($p < 0.05$) 低于涂布定量结果但差值较小, 差值范围为 (0.04 - 0.88) Lg CFU/mL, 相对误差平均值为 6.9% (表 1 和 2)。Ye 等^[2]利用标准曲线 B 的建立方法建立单增李斯特菌标准曲线, 定量结果与涂布定量结果差值较小, 差值范围在 (0.4 - 0.93) Lg CFU/mL, 与本研究得到结果较为一致。

标准曲线 A 定量结果显著 ($p < 0.05$) 低于标准曲线 B、C 定量结果, 差值较大 (相对误差平均值在 15.9% 以上), 出现这种现象的原因可能是由于标准曲线 A 的建立过程中不需要从样品提取 RNA, 标准品 RNA 在操作过程中损失少, 而用于构建标准曲线 B、C 的 RNA 是从纯培养细菌或接种于样品中细菌提取, 在提取过程中 RNA 会有所损失^[30], 同时由于提取过程中有机试剂等 PCR 抑制剂的残留会抑制 Real-time PCR 反应的进行^[23], 导致 C_T 值升高, 但建立标准曲线设定 X 轴的值 (Lg CFU/mL) 时并没有考虑损失的情况, 仍按照涂板的定量结果设定^[2, 24], 因此会导致标准曲线的上移, 从而导致标准曲线 B、C 的定量结果显著高于 ($p < 0.05$) 标准曲线 A 的定量结果。标准曲线 B 的定量结果显著高于 ($p < 0.05$) 标准曲线 C 的定量结果, 且差值较大, 相对误差平均值达到 21.7%, 原因可能是在不同的提取机制中 RNA 的提取效率不同, 从而导致定量结果的差异^[11]。

4 结论

本研究中 3 种标准曲线定量结果显著低于涂布定量结果, 其中本研究首次建立的标准曲线 A 定量

结果与涂布结果差值较大,导致定量结果的不准确性,已被应用的标准曲线 B 定量结果更接近于传统涂布结果,可以广泛用于 Real-time RT-PCR 定量。虽然本研究结果显示 Real-time RT-PCR 定量结果与涂布结果存在一定差值,但 Real-time PCR 较传统涂布更方便、省时、省力,且可以较为准确定量复杂样品中的某种特定菌,因此本研究对利用 Real-time RT-PCR 定量时选用标准曲线提供一定的依据,为后续研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Bui XT, Wolff A, Madsen M, Bang DD. Reverse transcriptase real-time PCR for detection and quantification of viable *Campylobacter jejuni* directly from poultry faecal samples. *Research in Microbiology*, 2012, 163 (1) : 64-72.
- [2] Ye KP, Zhang Q, Jiang Y, Xu X, Cao J, Zhou G. Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR. *Food Control*, 2012, 25 (1) : 117-124.
- [3] Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (11) : 5125-5132.
- [4] O Grady J, Ruttledge M, Sedano-Balbas S, Smith TJ, Barry T, Maher M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiology*, 2009, 26 (1) : 4-7.
- [5] Wolffs P, Norling B, Radstrom P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60 (3) : 315-323.
- [6] McCabe EM, Burgess CM, O'Regan E, McGuinness S, Barry T, Fanning S, Duffy G. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hlyA* gene of *Salmonella enterica* subspecies enterica. *Food Microbiology*, 2011, 28 (3) : 447-456.
- [7] McCabe EM, Burgess CM, Walsh D, O'Regan E, McGuinness S, Barry T, Fanning S, Duffy G. Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hlyA* gene of *Salmonella enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84 (1) : 19-26.
- [8] Bao Q, Li M, Xu J, Zhang J, Zhang H. Study on methods of qualitative and quantitative detection *L. acidophilus* in the fermented milk. *Food Research and Development*, 2012, 33 (11). (in Chinese)
包秋华, 李梅花, 徐洁, 张家超, 张和平. 一种检测发酵乳中嗜酸乳杆菌的定量定性方法. *食品研究与开发*, 2012, 33 (11).
- [9] Wang P, Yuan F, Yang H, Zhao Y, Hu Y, Zhao G, Chen Y. Real-time PCR assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in simulated milk specimens. *Journal of Hygiene Research*, 2011, 40 (6) : 765-768. (in Chinese)
王娉, 袁飞, 杨海荣, 赵勇胜, 胡玥, 赵贵明, 陈颖. 奶液模拟标本中单增李斯特菌 real-time PCR 检测方法的建立. *卫生研究*, 2011, 40 (6) : 765-768.
- [10] Lin Q, Li N, Fu X, Liu L, Shi C, Wu S. Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *Journal of Fishery Science of China*, 2011, 18 (1) : 96-102. (in Chinese)
林强, 李宁求, 付小哲, 刘礼辉, 石存斌, 吴淑勤. 牡蛎中副溶血弧菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用. *中国水产科学*, 2011, 18 (1) : 96-102.
- [11] Cai T, Jiang L, Yang C, Huang K. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2006, 46 (2) : 180-186.
- [12] Mace S, MamLouk K, Chipchakova S, Prevost H, Joffraud JJ, Dalgaard P, Pilet MF, Dousset X. Development of a rapid real-time PCR method as a tool to quantify viable *Photobacterium phosphoreum* bacteria in salmon (*Salmo salar*) Steaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (8) : 2612-2619.
- [13] Martín B, Jofré A, Garriga M, Pla M, Aymerich T. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (9) : 6040-6048.
- [14] MamLouk K, Mace S, Guilbaud M, Jaffres E, Ferchichi M, Prevost H, Pilet M-F, Dousset X. Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. *Food Microbiology*, 2012, 30 (1) : 173-179.
- [15] Robert Pillot A, Copin S, Gay M, Malle P, Quilici ML. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal Food Microbiology*, 2010, 143 (3) :

- 190-197.
- [16] Bao Q, Zhang J, Zhang H, Sun T. Detection of viable cells of *L. plantarum* in fermented milk using Real-Time PCR technology. *Food Science and Technology*, 2011, 36 (7) : 270-275. (in Chinese)
包秋华, 张家超, 张和平, 孙天松. 应用 RT-PCR 技术定量检测发酵乳中 *Lactobacillus plantarum* 活菌数. 食品科技, 2011, 36(7) : 270-275.
- [17] Zou Y, Zhao Y, Zhang Y, Bao J, Sun C, Wang J, Li J, Wang Z. The preparation of West Nile virus RNA segment by in vitro transcription. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*, 2011, 28 (12) : 29-31. (in Chinese)
邹艳丽, 赵永刚, 张永强, 包静月, 孙成友, 王君玮, 李金明, 王志亮. 体外转录法制备西尼罗河热病毒 RNA 片段. 中国动物检疫, 2011, 28(12) : 29-31.
- [18] Xiong G, Yu L, Yang H, Cao Y, Cao J. Development of Real-time PCR method for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2007, 19 (3) : 248-251. (in Chinese)
熊国华, 于莉, 杨海龙, 曹远银, 曹际娟. 实时荧光 PCR 定量检测食品中单增李斯特菌. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3) : 248-251.
- [19] 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.
- [20] Zhao Q, Sun X, Lu Y, Pan Y, Zhao Y. Application of metabolic profiling for distinguishing different pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2012, 33 (8) : 1686-1691. (in Chinese)
赵强, 孙晓红, 卢瑛, 潘迎捷, 赵勇. 应用代谢轮廓区分不同致病性副溶血性弧菌. 高等学校化学学报, 2012, 33(8) : 1686-1691.
- [21] Liu H, Luo B, Qin L, Gu Q, Wu C, Yuan W. Quantitative risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in raw salmon slices. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2012, 24 (1) : 18-22. (in Chinese)
刘弘, 罗宝章, 秦璐昕, 顾其芳, 吴春峰, 袁微嘉. 生食三文鱼片副溶血性弧菌污染的定量风险评估研究. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1) : 18-22.
- [22] Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 2011, 28: 848-861.
- [23] Tyagi A, Saravanan V, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129 (2) : 124-130.
- [24] Miller ND, Davidson PM, D' Souza DH. Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella Typhimurium* detection from lettuce and tomatoes. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44 (4) : 1088-1097.
- [25] Chen X, Pan Y, Sun X, Zhao Y. Progress of extraction methods for bacteria total RNA. *Hunan Agricultural Sciences*, 2012 (5) : 9-11. (in Chinese)
陈星, 潘迎捷, 孙晓红, 赵勇. 细菌总 RNA 提取方法的研究进展. 湖南农业科学, 2012 (5) : 9-11.
- [26] Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 2004, 15 (3) : 155.
- [27] Chen X, Pan Y, Sun X, Zhao Y. Comparison of four kinds of methods for extracting total RNA from *Vibrio parahaemolyticus*. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28 (6) : 1177-1182. (in Chinese)
陈星, 潘迎捷, 孙晓红, 赵勇. 四种副溶血弧菌总 RNA 提取方法的比较. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6) : 1177-1182.
- [28] Zhou L, Lei Y, Wang X, Ye B, Chen X. Application of real-time fluorescence quantitative PCR technology in the detection of pathogens. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2012, 19 (5) : 296-299. (in Chinese)
周丽民, 雷永良, 王小光, 叶碧峰, 陈秀英. 实时荧光定量 PCR 技术在致病菌检测中的应用. 标记免疫分析与临床, 2012, 19(5) : 296-299.
- [29] Wu P, Zhang W, Li J, Li S, Yang X, Xu L, Chang Z, Liu X, Li C, Liu W. Construction of standard plasmid and standard curve of real-time PCR for Inner Mongolia cashmere goat *Hairless* gene. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010 (8) : 73-78. (in Chinese)
吴萍, 张文广, 李金泉, 李赛明, 杨秀娟, 徐磊, 常子丽, 刘兴亮, 丽春, 刘维. 内蒙古白绒山羊 *Hairless* 基因实时荧光定量 PCR 标准质粒和标准曲线的构建. 中国畜牧兽医, 2010 (8) : 73-78.
- [30] Pang X, Zhou D, Yang R. Summary of bacteria mRNA extraction. *Biotechnology Bulletin*, 2003 (1) : 30-34. (in Chinese)
庞昕, 周冬生, 杨瑞馥. 细菌 mRNA 的提取方法. 生物技术通报, 2003 (1) : 30-34.

Difference of three standard curves of real-time reverse-transcriptase PCR in viable *Vibrio parahaemolyticus* quantification

Mengtong Jin, Wenshuo Sun, Qin Li, 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 evaluated the difference of three standard curves in quantifying viable *Vibrio parahaemolyticus* in samples by real-time reverse-transcriptase PCR (Real-time RT-PCR). [Methods] The standard curve A was established by 10-fold diluted cDNA. The cDNA was reverse transcribed after RNA synthesized *in vitro*. The standard curve B and C were established by 10-fold diluted cDNA. The cDNA was synthesized after RNA isolated from *Vibrio parahaemolyticus* in pure cultures (10^8 CFU/mL) and shrimp samples (10^6 CFU/g) (Standard curve A and C were proposed for the first time). Three standard curves were performed to quantitatively detect *V. parahaemolyticus* in six samples, respectively (Two pure cultured *V. parahaemolyticus* samples, two artificially contaminated cooked *Litopenaeus vannamei* samples and two artificially contaminated *Litopenaeus vannamei* samples). Then we evaluated the quantitative results of standard curve and the plate counting results and then analysed the differences. [Results] The three standard curves all show a strong linear relationship between the fractional cycle number and *V. parahaemolyticus* concentration ($R^2 > 0.99$); The quantitative results of Real-time PCR were significantly ($p < 0.05$) lower than the results of plate counting. The relative errors compared with the results of plate counting ranked standard curve A (30.0%) > standard curve C (18.8%) > standard curve B (6.9%); The average differences between standard curve A and standard curve B and C were -2.25 Lg CFU/mL and -0.75 Lg CFU/mL, respectively, and the mean relative errors were 48.2% and 15.9%, respectively; The average difference between standard curve B and C was among (1.47 – 1.53) Lg CFU/mL and the average relative errors were among 19.0% – 23.8%. [Conclusion] Standard curve B could be applied to Real-time RT-PCR when quantify the number of viable microorganisms in samples.

Keywords: real-time RT-PCR, standard curve, *Vibrio parahaemolyticus*

(本文责编:王晋芳)