

金黄色葡萄球菌基因表达的 DNA 扣除法 Real-time RT PCR 相对定量分析

相丽**, 姜毓君**, 刘伟, 毕宇涵, 赵凤, 霍贵成*

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】金黄色葡萄球菌作为一种分布广泛的致病微生物和研究革兰氏阳性菌遗传背景的模式菌株, 利用 real-time RT PCR 对相关毒素及调控基因进行表达定量分析, 在生物、医学、食品检测等领域具有较大研究价值。【方法】对制备好的反转录(RT, 含有 cDNA 和 DNA)和非反转录(RT⁻, 仅含 DNA)样品进行 Real-time PCR 检测, 根据经典 $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量算法并结合 PCR 效率公式建立一种基因表达相对定量分析的 DNA 扣除法, 将得到的 Ct 值转换为各样品含量, 从 RT 样品中扣除 RT⁻样品的量, 无需 DNase I 酶解处理就可以去除 DNA 的影响, RT⁻样品的检测结果还可同时作为稳定的 DNA 内参。【结果】采用以上方法分析金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因(*sea*)、16S rRNA 和 RNA 的表达情况, 在含有葡萄糖的 NB 培养基中 *sea* 的相对转录水平随着葡萄糖浓度的增大而升高, RNA 的相对转录水平随葡萄糖浓度的变化而产生小幅度的波动, 16S rRNA 在菌体生长初期时的表达量较为稳定; 与绝对定量法比较, 结果差异较小(均小于 15%), 且差异不显著($p>0.05$)。【结论】这种基于 DNA 扣除法的 Real-time RT PCR 相对定量方法可以有效的对金黄色葡萄球菌的基因表达进行分析。

关键词: 金黄色葡萄球菌; Real-time RT PCR; 相对定量; 内参; DNA 扣除法

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0526-06

随着生物基因组学和生物信息学的不断发展以及功能基因组学研究的深入, 基因表达研究成为近年的研究重点。实时荧光定量反转录 PCR 技术 (Real-time RT PCR) 具有简便、快速、不易污染、高灵敏度等优点^[1], 是基因表达转录水平定量分析的重要方法, 成为当今生物领域中的研究重点和热点, 在医学、食品检测等领域也得到广泛应用^[2,3]。

目前, 利用 Real-time RT PCR 技术对基因表达进行相对定量分析中, 主要存在以下几个问题: RNA 提取物中会有部分 DNA 存在^[4], 利用 DNase (RNase Free) 进行 DNA 去除处理, 对 RNA 的总量及质量造成较大影响; 其次, 由于不同的处理方式会导致初始

菌体/细胞量不同^[5], 通常选择 16S rRNA 等^[6,7]作为原核生物基因表达分析的内参, 但研究表明 16S rRNA 的含量也会出现较大的波动^[8,9], 导致相对定量结果出现较大误差。

基因表达相对定量算法的选择也是问题之一。利用绝对定量法进行基因表达的相对定量分析, 需要进行质粒克隆, 并绘制绝对定量标准曲线^[10], 过程繁琐; 后来出现基于 PCR 动力学的经典算法^[11,12]:

$$Q_R = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

其中 Q_R 为实验组与对照组目标基因表达的相对定量的结果, E 为 PCR 效率, Ct 指荧光信号达到阈值时的循环数, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参照基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参照基因}})_{\text{对照组}}$ 。

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD04A08-13); 中国博士后科学基金项目(20060400803); 黑龙江省科技攻关重大项目(GA06C101-08)

*通讯作者: Tel/Fax: +86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@neau.edu.cn

作者简介: **对文章有同等贡献。相丽(1982-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事微生物基因表达分析研究。E-mail: xianglibio@163.com; 姜毓君(1971-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 教授, 主要从事微生物基因表达分析研究。E-mail: yujun_jiang@163.com

收稿日期: 2007-07-27; 修回日期: 2007-11-16

其中, PCR 效率 E 是通过绝对定量标准曲线的斜率 slope 计算出来, 因而整个过程复杂, 不易于推广。随即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[11]由此产生:

$$Q_R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (2)$$

这种算法假设各 PCR 的效率 E 均为 1, 当 PCR 效率不高或差别较大时, 结果误差较大, 在实际应用中具有一定局限性^[13]。

本文借鉴以上基因表达相对定量算法的理论并结合 DNA 扣除法, 可同时解决上述问题, 对金黄色葡萄球菌的基因表达进行相对定量分析。金黄色葡萄球菌是一种分布极广的致病性微生物^[14,15], 也是研究革兰氏阳性菌遗传背景的模式菌株, 其毒素基因及相关调控基因的表达定量分析具有较大的研究价值^[16,17]。本研究以金葡菌肠毒素 A 基因(*sea*)、16S rRNA、RNA (agr 调控系统的效应因子)^[18]的转录水平为研究对象, 在 $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量分析方法的基础上, 梯度稀释 cDNA 样品绘制出倍比稀释标准曲线, 并利用其斜率推算出 PCR 效率 E , 对同一检测样品制备反转录样品(RT, 含有 cDNA 及 DNA)及非反转录样

品(RT⁻, 仅含 DNA), 并进行 Real-time PCR 检测分析, 通过计算将两者的含量相减, 实现 DNA 的扣除, 无需 DNase 酶解就可以消除 DNA 影响, 将原先仅能在绝对定量中使用的 DNA 扣除法^[19]在相对定量中同样得到应用; 同时以非反转录样品的 DNA 作为 RNA 含量均一化校正的内参^[8], 解决原核生物基因相对定量中管家基因转录水平不稳定的问题, 建立了基于 DNA 扣除法的 Real-time RT PCR 相对定量分析方法。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器试剂

金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 13565(中国药品生物制品检定所), ExScriptTMRT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司), SYBR Green (for QPCR, 上海捷瑞生物工程有限公司), 肠毒素 A 基因 *sea*、16S rRNA、RNA 的引物(上海英骏生物技术有限公司, 序列见表 1), ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(ABI 公司), DU 800 紫外/可见分光光度计(Beckman 公司)。

表1 *sea*、16S rRNA及RNA 的特异性引物序列及扩增产物的大小

Table 1 Base sequences and predicted sizes of PCR products for *sea*、16S rRNA and RNA specific oligonucleotide primers

| Target gene | GenBank No. | Primer probe | Oligonucleotide sequence (5' 3') | Product size bp | Reference/source |
|-------------|-------------|---------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
| <i>sea</i> | AY827552 | <i>sea</i> -1 | TTGGAACCGTTAAAAACGAA | 121 | [20] |
| | | <i>sea</i> -2 | GAACCTTCCCATCAAAAACA | | |
| 16S rRNA | L37597.1 | 16S rRNA-1 | TACACACCGCCCGTCACA | 79 | [8] |
| | | 16S rRNA-2 | CTTCGACGGCTAGCTCCTAAA | | |
| RNA | AF288215 | RNA -1 | CCATTTTACTAAGTCACTGATTGTT | 65 | This study |
| | | RNA -2 | TGATGGAAAATAGTTGATGAGTTGT | | |

1.2 绝对定量标准曲线和倍比稀释标准曲线的制备

将提取的金黄色葡萄球菌 RNA 模板反转录后 PCR 得到 *sea*、16S rRNA 及 RNA 的扩增产物, 进行电泳切胶纯化后连接到 pMD19-T 载体上, 转入 JM109 感受态细胞, 经蓝白筛选挑取阳性菌落, 37 振荡过夜培养, 提取重组质粒并 PCR 验证, 测定 OD_{260} 计算出拷贝数后, 连续 5~7 个 10 倍梯度稀释作为绝对定量标准品, 进行 Real-time PCR, 反应条件为 95 变性 10s 后, 95 5s, 60 34s 扩增 40 个循环, 在 60 34s 时收集荧光信号, 设定最佳阈值, 获得 Ct 值; 同时分别对 PCR 产物进行 SYBR 熔解曲线分析。所有待测样品均设 3 个重复, 并用去离子水代替模板作为阴性对照。以重组质粒拷贝数的对数值为横坐标, 检测出的 Ct 值为纵坐标绘制 *sea*、16S rRNA 及 RNA

绝对定量标准曲线, 同时获得回归方程、斜率 slope 和相关系数 R 等参数。

提取的 RNA 模板反转录获得 cDNA 后, 分别进行 5~7 个 10 倍梯度递增稀释, 然后进行 Real-time PCR 检测(方法同前)。设稀释的最低模板浓度为 10^1 , 以模板浓度倍数的对数值($\lg 10^1 \sim \lg 10^5$)为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制 *sea*、16S rRNA 及 RNA 的倍比稀释标准曲线, 同时获得回归方程、斜率 slope 和相关系数 R 等参数。

1.3 RT 样品、RT 样品的制备和 Real-time PCR 检测

将稀释后的金黄色葡萄球菌菌液接种于 5 种不同葡萄糖浓度(0、25、50、75、100 mmol/L)的营养肉汤培养基(NB)中(10^3 CFU/mL), 37 振荡(150r/min)培养至对数生长期初期(OD_{480} 约为 0.3); 离心收集菌体,

利用热酚法并结合玻璃微珠(直径 0.1mm)的破壁作用提取总核酸(RNA 及 DNA)^[8,20]。为避免核酸提取物中 RNA 的降解,所有器具及相关溶液均经过 0.1% DEPC 水处理,提取到的 RNA 最终溶于 DEPC 水中。以琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并测定 OD 值以检测核酸提取的纯度。

对所提取的总核酸分别制备反转录样品(RT 样品)和非反转录样品(RT⁻样品)^[18]。将每个核酸样品分为两组,利用 ExScriptTMRT-PCR 试剂盒进行反转录反应,反转录条件为 42 15min, 95 2min, 得到 RT 样品;利用与反转录反应等体积的 0.1% DEPC 水稀释另一组核酸样品,获得 RT⁻样品。RT 样品和 RT⁻样品 Real-time PCR 的反应条件与标准曲线的检测条件相同。所有待测样品均设 3 个重复,并用去离子水代替模板作为阴性对照。

1.4 Real-time PCR 相对定量分析

1.4.1 绝对定量法相对定量分析: 对各核酸样品进行 DNase (RNase free) 酶解处理,去除样品中的 DNA;反转录及 Real-time PCR 过程均与 RT 样品相同,得到该样品的 Ct 值,根据相应的绝对定量标准曲线计算出该样品的具体拷贝数,同时检测对应的 RT⁻样品并计算拷贝数,将所得的 cDNA 与 DNA 的拷贝数相除,即得到绝对定量法相对定量分析结果。

1.4.2 DNA 扣除法相对定量分析: 以经典的 $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法为基础,以所有 RT 样品及 RT⁻样品为分析对象,选择一个 Ct 值作为样品 0,并以此作为参照计算出所有样品的含量;从 RT 样品(含有 cDNA 和 DNA)减去相应 RT⁻样品(含有 DNA)的含量,实现每个检测样品中 DNA 的扣除;所得结果再与 RT⁻样品相除,即计算出以 DNA 为内参的目的基因表达量,公式表示如下:

$$Q = \frac{(1+E)^{-(Ct_{RT}-Ct_0)} - (1+E)^{-(Ct_{RT^-}-Ct_0)}}{(1+E)^{-(Ct_{RT^-}-Ct_0)}} \quad (3)$$

可以简化为:

$$Q = (1+E)^{-\Delta Ct} - 1 \quad (4)$$

其中 $\Delta Ct = Ct_{RT} - Ct_{RT^-}$, 并且简化后的公式(4)中不涉及样品 0 的具体数值。

再以葡萄糖浓度为 0 mmol/L 的 NB 培养基中金黄色葡萄球菌目的基因的表达式(Q)为参照组(control group),分别计算其它葡萄糖浓度下目的基因的相对表达式(Q_R):

$$Q_R = \frac{Q}{Q'} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct} - 1}{(1+E)^{-\Delta Ct'} - 1} \quad (5)$$

其中 $\Delta Ct = Ct_{RT} - Ct_{RT^-}$, $\Delta Ct' = Ct'_{RT} - Ct'_{RT^-}$ 。

利用此相对定量方法以及绝对定量法进行相对定量,并将最终结果进行 t 检验分析,比较两种相对定量方法的差异。

2 结果

2.1 绝对定量标准曲线和倍比稀释标准曲线的制备

金黄色葡萄球菌 *sea*、16S rRNA 及 RNA 的绝对定量标准曲线及 cDNA 倍比稀释标准曲线如图 1 所示。3 种基因各自的两种标准曲线斜率 slope 均在 -3.2344 到 -3.1139 之间,且两种标准曲线的斜率 slope 的差别较小(*sea*: 0.382%; 16S rRNA: 0.78%; RNA : 0.883%)。通过 PCR 效率公式 $E = 10^{[-1/\text{slope}]} - 1$, 可以计算出 Real-time PCR 效率 E 在 1.038 到 1.095 之间,说明扩增效率较好。3 种基因绝对定量标准曲线的线性回归方程分别为: *sea*, $y = -3.1139x + 41.52$; 16S rRNA, $y = -3.1207x + 47.44$; RNA, $y = -3.2061x + 41.82$ 。各相关系数 R > 0.99, 表明起始模板浓度倍数的对数值与 Ct 值有较好的线性相关性。

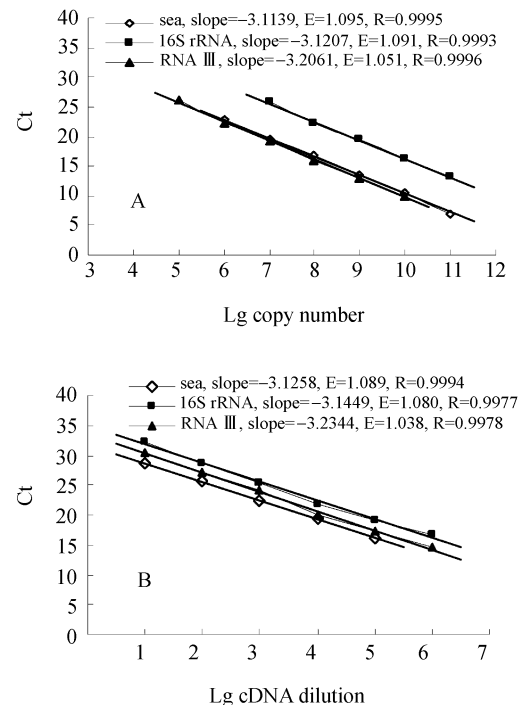


图 1 *sea*、16S rRNA 和 RNA 的绝对定量标准曲线(A)和 cDNA 倍比稀释标准曲线(B)

Fig. 1 Standard curves for absolute quantitative (A) and relative quantitative (B) methods of *sea*, 16S rRNA and RNA .

2.2 两种方法对金黄色葡萄球菌 *sea*、16S rRNA 和 RNA 转录水平的相对定量分析

根据金黄色葡萄球菌 *sea*、16S rRNA 及 RNA 的绝对定量标准曲线及倍比稀释标准曲线, 以 DNA 为内参对 3 种基因进行转录水平的相对定量, 分别利用绝对定量法与 DNA 扣除法进行分析, 并对两种分析方法进行比较, 结果如表 2 所示。

可以看出金黄色葡萄球菌在不同葡萄糖浓度的 NB 培养基中, 在葡萄糖浓度为 0 mmol/L 及 100 mmol/L 时, *sea* 的表达量均比其它 3 个浓度时较低, 而 RNA 与此相反, 此情况下的表达量较高; 菌体在不同葡萄糖浓度的 NB 培养基中, 16S rRNA 生长初期时的表达量较为稳定。

将新建立的 DNA 扣除相对定量与经典的绝对定

表 2 *sea*、16S rRNA 及 RNA 转录水平相对定量不同分析方法的结果比较

Table 2 The comparison between different methods in quantifying the relative expression of *sea*, 16S rRNA and RNA

| Gene | c(Glucose)/(mmol/L) | Absolute quantitation method | | DNA subtractive process method | | Difference/%** |
|------------|----------------------------|------------------------------|------|--------------------------------|-------|----------------|
| | | Relative quantification | CV/% | Relative quantification* | CV/% | |
| <i>sea</i> | Control Group [#] | 1.0000 | 0.72 | 1.0000 | 2.14 | — |
| | 25 | 1.3958 | 0.90 | 1.5195 | 1.14 | 8.87 |
| | 50 | 1.3636 | 0.31 | 1.5468 | 1.68 | 13.43 |
| | 75 | 1.3180 | 0.12 | 1.4582 | 0.38 | 10.64 |
| | 100 | 0.8873 | 0.85 | 0.8109 | 1.10 | 8.61 |
| 16s rRNA | Control Group [#] | 1.0000 | 0.72 | 1.0000 | 0.79 | — |
| | 25 | 1.0422 | 3.85 | 0.9552 | 0.31 | 8.34 |
| | 50 | 1.0234 | 2.59 | 1.0800 | 0.99 | 5.53 |
| | 75 | 1.0303 | 7.78 | 1.1101 | 1.21 | 7.74 |
| | 100 | 1.0495 | 0.44 | 0.9238 | 1.21 | 11.98 |
| RNA | Control Group [#] | 1.0000 | 4.57 | 1.0000 | 9.93 | — |
| | 25 | 0.6564 | 0.92 | 0.5965 | 11.04 | 9.14 |
| | 50 | 0.7306 | 1.67 | 0.6246 | 10.92 | 14.50 |
| | 75 | 0.6620 | 6.23 | 0.6104 | 11.89 | 7.79 |
| | 100 | 1.1104 | 2.84 | 1.2529 | 8.59 | 12.84 |

The glucose concentration of control group is 0 mmol/L; * $p > 0.05$, vs relative quantification with absolute quantitation method; ** The relative quantification difference between absolute quantitation method and DNA subtractive process method.

量法相对定量分析进行比较, 差异较小(均小于 15%), 且结果差异不显著($p > 0.05$), 因此 DNA 扣除法可以获得与绝对定量法相似的结果。

3 分析和讨论

3.1 绝对定量标准曲线和倍比稀释标准曲线的斜率 slope 的影响因素及波动范围

在本检测方法中, PCR 效率 E 是通过倍比稀释标准曲线的斜率 slope 计算出的。根据 Real-time PCR 反应的动力学模型^[21], 经过 Ct 个循环, 荧光信号达到阈值, 扩增产物 X_{Ct} 的量为:

$$X_{Ct} = X_0(1+E)^{Ct} \quad (6)$$

两边同时取对数, 整理得:

$$Ct = -\lg^{-1}(1+E) \lg X_0 + \lg X_{Ct} / \lg(1+E) \quad (7)$$

若以 $\lg X_0$ 为横坐标, Ct 值为纵坐标作标准曲线, 则斜率 slope 可表示为:

$$\text{slope} = -\lg^{-1}(1+E) \quad (8)$$

由此可见斜率 slope 仅与 E 值有关, 不受实际拷贝数和稀释倍数等其它因素的影响, 从其它角度也可论证出相同的结论^[22]。因此在相同 PCR 反应体系下获得的绝对定量标准曲线与倍比稀释标准曲线的斜率 slope 是相同的, 而通过后者所获得 E 值的过程较为简便。

理想状态下 PCR 反应效率 E 为 1, 但实际 E 值在 0 到 1 范围内波动; 普遍认为最佳的标准曲线是建立在 PCR 效率为 0.9 到 1.1 的基础上, 根据公式 $\text{slope} = -\lg^{-1}(1+E)$, 可以推出以 $\lg X_0$ 为横坐标, Ct 值为纵坐标的标准曲线的斜率 slope 可在 -3.1035 到 -3.5874 范围内波动。若 slope 超出了这个范围, 则应该对 PCR 反应体系进行优化调整。

3.2 16S rRNA 含量的不稳定性

原核生物基因表达的相对定量分析中, 16S rRNA 是一种常用的内参^[6,7], 但研究表明 16S rRNA 量随菌体的生长而含量逐渐减少^[8]。这是因为蛋白质生产代谢大多处于菌体的指数生长期或稳定期, 培

培养基营养成分被逐渐消耗,只有核糖体的总量的快速下降才能保存足够的能量进行其它蛋白的表达代谢,因此核糖体量降低时期比其它蛋白质早很多,且16S rRNA的浓度是核糖体合成的关键因素,所以16S rRNA的转录也是一个动态变化的过程,只有这样才能最大限度的使菌体适应不同的生长时期和生长条件。

16S rRNA作为内参均会因其含量的不稳定而导致相对定量结果出现较大误差,而DNA可代表最初菌体量并且能够稳定存在,可作为内参用于基因表达的相对定量中^[8]。

3.3 RNA提取物中DNA的传统去除方式与扣除法的比较

对原核生物进行基因表达的相应定量研究中, RNA提取物中DNA的存在是一个亟待解决的问题。常规DNase (RNase free)处理法,延长了检测时间,引入新的蛋白和离子成分, RNA总量及质量受到较大影响,导致相对定量结果出现较大偏差。还需设置非反转录样品的对照,以检测DNA是否酶解完全,增加了检测成本。

本文利用推导出的相对定量公式,将检测出的Ct值转换为样品含量,从RT样品(含有cDNA和DNA)中减去对应的RT-样品(含有DNA)的量,完成RNA样品中DNA的扣除。一组样品中所检测出的DNA含量,还作为内参使用,使DNA含量数据两次得到应用。整个检测过程仅需要合成目的基因引物,不存在目的基因与内参基因PCR效率不同的问题,而这种效率的不同也是影响基因表达相对定量准确性的重要因素^[23]。与选择其它管家基因做内参相比,整个检测过程的操作步骤并没有增加,并省去酶解步骤使检测成本降低。

原核生物是整个生物界重要的组成部分,与人类的生存活动密切相关,相应研究已从结构基因组学逐步转入功能基因组领域的探索性研究,基因表达分析成为功能基因组学研究的重点。本文建立了一种Real-time RT PCR相对定量检测体系,同时解决了DNA残留的影响、菌体生长过程中16S rRNA内参不稳定和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法无法进行PCR效率的有效评价等问题,并与经典的绝对定量法的相对定量分析结果进行比较,差异较小(<15%),两种方法差异不显著($p>0.05$)。本方法可以对金黄色葡萄球菌中的3种基因的表达进行有效的相对定量分析,也可为其它原核生物基因表达研究提供思路上的参考和借鉴。

参 考 文 献

- [1] Becker K, Pan D, Whitley CB. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(15): 2559–2566.
- [2] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 2005, 39(1): 75–85.
- [3] 李光伟, 刘和, 张峰, 等. 荧光定量PCR监测五氯酚对好氧颗粒污泥和活性污泥中氨氧化细菌数量的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(1): 136–140.
- [4] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001, 25(4): 386–401.
- [5] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 995–1001.
- [6] Saberssheikh S, Saunders NA. Quantification of virulence-associated gene transcripts in epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Mol Cell Probes*, 2004, 18(1): 23–31.
- [7] Fey A, Eichler S, Flavier S, et al. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3618–3623.
- [8] Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, et al. Use of gDNA as internal standard for gene expression in staphylococci in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(3): 528–234.
- [9] Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, et al. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J Bacteriol*, 2001, 183(24): 7094–7101.
- [10] Vu HL, Troubetzkoy S, Nguyen HH, et al. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(7): E18.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [12] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, 6(10): 986–994.
- [13] Fleige S, Walf V, Huch S, et al. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(19): 1601–1613.
- [14] Burtscher C, Wuertz S. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4618–4627.

- [15] Pepe O, Blaiotta G, Bucci F, *et al.* Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 7057–7062.
- [16] Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J Appl Microbiol*, 2006, 100(2): 352–364.
- [17] Dakic I, Vukovic D, Stepanovic S, *et al.* Survey of genes encoding staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and exfoliative toxins in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9): 4875–4876.
- [18] Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, *et al.* Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and *in vivo*. *J Bacteriol*, 2002, 184(4): 1095–1101.
- [19] Hartshorn C, Rice JE, Wangh LJ. Developmentally-regulated changes of Xist RNA levels in single preimplantation mouse embryos, as revealed by quantitative real-time PCR. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(4): 425–436.
- [20] Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, *et al.* Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(10): 1037–1041.
- [21] Bar T, Stahlberg A, Muszta A, *et al.* Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): e105.
- [22] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立. *生物化学与生物物理进展(Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2005, 32(9): 883–888.
- [23] Chervoneva I, Hyslop T, Iglewicz B, *et al.* Statistical algorithm for assuring similar efficiency in standards and samples for absolute quantification by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 2006, 348(2): 198–208.

Real-time RT PCR with DNA subtraction for relative quantification of gene expression in *Staphylococcus aureus*

Li Xiang^{**}, Yujun Jiang^{**}, Wei Liu, Yuhan Bi, Feng Zhao, Guicheng Huo^{*}

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: [Objective] We evaluated relative quantification by real-time RT PCR of a target gene transcription. [Methods] On the basis of $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ mathematical model and the $E=10^{[-1/slope]}-1$ equation, the detected Ct data of the real-time RT PCR was analyzed by the new DNA subtraction assay. DNA was used as standard for the initial amount of bacteria. RT and RT⁻ samples for real-time PCR detection were prepared to quantify the DNA that simultaneously existed with RNA isolated from the bacteria samples. The detected quantitative data were subtracted from total nucleic acid simultaneously contained RNA and DNA. Enzymatic digestion with DNase I was not included in this protocol. [Results] The gene expression of staphylococcal enterotoxin A (*sea*), 16S rRNA and RNA of *Staphylococcus aureus* were detected. These two different analysis methods, DNA subtraction method and absolute quantitative method, led to similar results ($p>0.05$). [Conclusion] This is a time-saving and efficient method. Additionally, for further studies it would be conceivable to extend the detection of genes expression from *S. aureus* to other prokaryote.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; real-time RT PCR; gene expression; internal standard; DNA subtraction method

Supported by the National Science and Technology Support Program of China (2006BAD04A08-13), the China Postdoctoral Science Foundation (20060400803) and the Major Program of Science and Technique Foundation of Heilongjiang Province (GA06C101-08)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@neau.edu.cn

Received: 27 July 2007/ Revised: 16 November 2007