四种基因定量方法对实时荧光 PCR 与微滴式数字 PCR 检测霍乱弧菌基因表达量的分析

唐静[1]，贾俊涛[1]，赵丽青[1]，王静[2]，张健[1]，姜英辉[1]，徐彪[1]，王昌军[1]，马云[1]
（1.山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心食品农产品检测中心，山东青岛 266002）
（2.威海出入境检验检疫局，山东威海 264205）

摘要：基因表达量测定对基因功能解析和探索生命机理具有重大意义，目前实时荧光 PCR 和微滴式数字 PCR 技术是进行基因表达量测定的有效方法。本文以低温处理的霍乱弧菌 *sfs*、*vcc*、*RecA*、*hly* 及 16S rRNA 基因为研究对象，分别用实时荧光 PCR 和微滴式数字 PCR 技术对低温处理前后霍乱弧菌的上述基因表达量进行测定，实时荧光 PCR 实验数据分别采用ΔΔCT 和 geNorm 法进行分析，微滴式数字 PCR 实验数据分别采用相对定量和绝对定量法进行分析，获得处理组基因表达量相对于对照组的变化倍数；使用多维尺度法来分析四种基因定量方法的数据。结果表明，在本实验条件下，四种基因定量方法的分析结果存在差异；16S rRNA 基因表达量发生了变化，不适合作为内参基因；微滴式数字 PCR 能更直观的给出基因表达量变化的结果，并且基因表达差异相对定量分析的准确度更高。

关键词：基因表达；实时荧光定量 PCR；微滴式数字 PCR
文章篇号：1673-9078(2017)3-93-98 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.015

Real-time and Droplet Digital PCR Analyses for Detection of *Vibrio cholerae* Gene Expression by Four Gene Quantification Methods

TANG Jing[1], JIA Jun-Tao[1], ZHAO Li-Qing[1], WANG Jing[2], ZHANG Jian[1], JIANG Ying-Hui[1], XU Biao[1], WANG Chang-Jun[1], MA Yun[1]
(1.Food and Agricultural Products Testing Agency, Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Qingdao 266002, China) (2.Weihai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weihai 264205, China)

Abstract: Gene expression assays are highly important for analyzing gene function and investigating biological mechanisms. Currently, real-time and droplet digital PCR are effective methods for measuring gene expression. sfs, vcc, RecA, hly, and 16S rRNA genes of *Vibrio cholerae* were used for experiments after low temperature treatment. The samples were assessed by real-time and droplet digital PCR separately before and after low temperature treatment. Real-time fluorescence PCR experimental data were analyzed using the ΔΔCT and geNorm methods. Droplet digital PCR experimental data were analyzed using the relative and absolute quantification methods to calculate the fold change in gene expression in the treatment group as compared to the control group. The data from the four gene quantification methods were analyzed using the multidimensional scaling method. Under these experimental conditions, the results indicated that there was a significant difference between the results of the four gene quantification methods. The expression level of the 16S rRNA gene changed, making it unsuitable as a reference gene. Droplet digital PCR could give more intuitive results regarding the amount of change in gene expression and have better accuracy in the relative quantitative analysis of differentially expressed genes.

Key words: gene expression; real-time PCR; droplet digital PCR

霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）是弧菌科的主要致病菌，是引起霍乱的病原菌，每年影响数以万计人。霍乱弧菌细菌分类学和分子流行病学的研究，越来越重视霍乱弧菌特定基因表达量的检测。因为基因表达差异会影响细菌的某些重要遗传性状，如细菌的生理结构、致病性和耐药性等。DNA 分子扩增技术的应用促进了分子生物学技术的发展，也为基因表达差异分析提供了技术手段。自 1985 年聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）技术[1]问世以来，已经成为生命科学领域中重要的实验工具，但普通 PCR 很难完成

收稿日期：2016-01-13
基金项目：国家质检总局科研计划（2012IK305，2013IK175，2014IK114）
作者简介：唐静（1982-），女，工程师，研究方向：食品微生物
通讯作者：贾俊涛（1977-），男，高级工程师，研究方向：食品微生物

基因表达的定量。实时荧光 PCR 技术（Real-time fluorescence Quantitative PCR，Real-time PCR）[2,3]是目前 DNA 定量测定最常用的技术，被称为“第二代 PCR 技术”，该技术通过在 PCR 反应体系中加入荧光结合染料或荧光标记探针，利用实时积累的荧光信号监测整个扩增过程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。目前，第三代 PCR 技术即微滴式数字 PCR（droplet digita PCR，ddPCR）[4-8]已应用到核酸含量检测中，核酸的绝对定量分析取得了前所未有的突破，实现了分子 DNA 的绝对定量[9]。

利用传统方法进行基因表达相对量的计算，需要提取 RNA 模板反转录后 PCR 得到目的基因的扩增产物，再进行质粒克隆，绘制标准曲线等[10]，过程繁琐，且已知标准曲线法的实际误差率在 6%~20%之间[11]，存在一定的缺陷，很多相对定量计算方法应运而生。$QR=2^{-\Delta\Delta Ct}$法（简称ΔΔCT 法）[12,13]因其简单方便在基因表达相对定量的分析中得到广泛应用。2002 年 Vandesompele 等编写了 geNorm 程序（简称 geNorm 法）[14]，在内参基因选择和基因表达量计算的研究中逐渐被采用[15]。不同相对定量计算方法的选择可能对计算结果有一定的影响。

本文以低温处理的霍乱弧菌致病性基因：糖发酵激活蛋白编码基因（*sfs*）、胶原酶基因（*vcc*）、溶血素基因（*hly*）和看家基因：管家基因（*RecA*）、16S rRNA 基因为研究对象，用 ddPCR 和 Real-time PCR 对其基因表达量进行测定，分别采用ΔΔCT 法、geNorm 法、ddPCR 相对定量法（简称 ddPCR-16S 法）和 ddPCR 绝对定量法（简称 ddPCR 法）进行数据分析，比较各基因处理前后相对表达量的变化，对这两种 PCR 方法的准确度进行初步评价，并探讨了 16S rRNA 基因作为内参进行相对定量的适用性。多维尺度法（Multidimensional Scaling，MDS）是一种无监督的用于高维数据降维的可视化工具。本文采用 MDS 将多维数据降维，将四种相对定量方法的准确性和精密度直观地表示在二维平面图上，从而直接显现四种方法之间的差异和两种 PCR 技术的准确度。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

QX100 数字化痕量核酸检测系统（ddPCR 仪）（美国 Bio-Rad 公司）；Scanspeed mini PINK 离心机（丹麦 Scanspeed 公司）；Roche LightCycler 480 高通量实时荧光定量 PCR 系统（德国 Roche 公司）；涡旋振荡仪（日本 Tomy 公司）；Eppendorf AG 22331 Hamburg 生物分光光度计（德国 Eppendorf 公司）。

表1 ddPCR和Real-time PCR的引物与探针

Table 1 Primers and probes for ddPCR and Real-time PCR

名称	序列（5’-3’）
vcc-F	GTCTGGCCATGTGGGTAACT
vcc-R	CACTCATTGTCCAGAGCGAA
vcc-Probe	FAM-TACCGCTACTTAGCCGCCAACACTCA-TAMRA
16S rRNA-F	CGAAGAACCTTACCTAC
16S rRNA -R	CCAACATTTCACAACAC
16S rRNA -Probe	FAM-CGCTGGAGTGCCTTCGGGAG-TAMRA
RecA-F	GGGTAACCTCAAGCAATCCAAC
RecA-R	CCAAACGAACAGAAGCGTAGAA
RecA-Probe	FAM-CGTAGAATTTCAGTGCGTTACCGCCAG-TAMRA
sfs-F	TGAATGCAAAACGGCAAATAA
sfs-R	CAAGGCGATAAAGGGCAAGGT
sfs-Probe	FAM-CACGGGTTGTCACCGCATCAGG-TAMRA
hly-F	GCCAAAATTGTGCGTATCAG
hly-R	ATAATCTTGGGCAATCGCA
hly-Probe	FAM-AACTGGCTCCAAACTGACGATAACC-TAMRA

碱性蛋白胨水（Alkaline Peptone Water，APW）（OXOID公司），胰蛋白胨大豆琼脂（Tryptone Soya Agar，TSA）（BD公司）；LightCycler 480 Probes Master（罗氏诊断产品（上海）有限公司）；实验用RNA提取试剂盒（High Pure RNA Isolation Kit，德国Roche公司）；RT-PCR试剂盒（Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit，德国Roche公司）；ddPCR Master Mix（Bio-Rad，美国CA）；实验用水为DEPC水（上海生

工）；其它试剂均为分析纯。实验中*sfs*、*RecA*、*hly*及16S rRNA基因的引物及探针采用Primer 5.0 软件设计，*vcc*基因的引物与探针出自文献[16]，序列如表 1 所示，由大连TaKaRa公司合成并纯化。

1.2 实验方法

1.2.1 实验材料的制备

霍乱弧菌由实验室从越南进口黑虎虾中分离得到。将霍乱弧菌纯培养物划线接种于 TSA 培养基，37 ℃培养 24 h，从 TSA 平皿上挑取纯菌落接种于 10 mL APW 液体培养基，37 ℃、200 r/min 摇床震荡培养过夜。取 1 mL 菌液于灭菌离心管中 12000 r/min 离心 1 min，弃上清，此菌体沉淀即作为初始状态对照。另取 1 mL 菌液于灭菌离心管存放于 4 ℃冰箱进行低温处理 30 d，4 ℃是最常使用的食物储存温度[17]，于 30 d 取该离心管 12000 r/min 离心 1 min，弃上清，此菌体沉淀即作为低温处理的样品。

1.2.2 总 RNA 的提取

采用 Roche（罗氏）High pure RNA Isolation Kit 提取低温处理和对照样品的总 RNA。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，使用 Eppendorf AG 22331 Hamburg 生物分光光度计对各样品 RNA 浓度进行均一化处理，用 Elution Buffer 对高浓度 RNA 进行稀释确保 RNA 初始水平一致，浓度约 1 μg/μL 留待反转录使用。

1.2.3 cDNA 的合成

采用 Roche（罗氏）Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 合成cDNA。合成的cDNA 使用 Eppendorf AG 22331 Hamburg 生物分光光度计对浓度进行均一化处理，留待进行 Real-time PCR 和 ddPCR 分析。

1.2.4 定量 PCR 检测

1.2.4.1 ddPCR 方法

ddPCR 反应体系为：10 μL ddPCR Master Mix（2X），上下游引物各 1.0 μL（表 1），2.5 μL 探针（表 1），4.5 μL dd H_2O，1 μL cDNA 模板，反应总体积为 20 μL。反应条件及数据分析见 Dany 等的方法[18]。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。

1.2.4.2 Real-time PCR 方法

Real-time PCR 反应体系为：10 μL LightCycler 480 Probes Master（2X），上下游引物各 1.0 μL（表 1），2.5 μL 探针（表 1），4.5 μL dd H_2O，1 μL cDNA 模板，反应总体积为 20 μL。反应条件及数据分析见 Dany 等的方法[18]。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。

1.2.5 基因表达差异定量分析

1.2.5.1 ΔΔCT 法

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

式中Q_R为处理组与对照组目的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，$\Delta\Delta Ct=(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})_{处理组}-(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})_{对照组}$。

本研究将“E”简化为“1”，以16S rRNA基因作为内参，实验得出处理组与对照组的Ct值，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行计算得出相对于对照组，处理组中目的基因的表达相对于内参的改变倍数。

1.2.5.2 geNorm 法

geNorm 程序[14] 可由 http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/下载。用geNorm软件筛选内参基因时，在Excel中设定同一基因不同样本中Ct值最小者的表达量为1，此基因的相对表达量则为$2^{-\Delta Ct}$（ΔCt=各样本Ct值-最小Ct值），将这些数据导入geNorm程序，软件通过将每个候选基因与其他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，对所有候选基因的表达稳定性排序，M值越小，说明基因的稳定性越好。并通过内参基因标准化因子的配对差异分析来判断内参基因的最适数目。选择好内参基因后，再计算处理组中目的基因的表达相对于内参基因标准化因子的改变倍数。

1.2.5.3 ddPCR 的数据分析

ddPCR检测可以直接得到处理组与对照组各基因的绝对拷贝数，本文采用两种方式对ddPCR数据进行分析。（1）ddPCR-16S法：使用16S rRNA基因为内参，用某一目的基因处理组的拷贝数除以对照组的拷贝数后，所得数据再除以16S rRNA基因处理组的拷贝数除以对照组的拷贝数所得的数据，得到处理组相对于对照组的变化倍数。（2）ddPCR法：直接用某一基因处理组的拷贝数除以对照组的拷贝数，得到处理组相对于对照组的变化倍数。

1.2.6 统计分析

不同基因及不同基因定量方法的数据采用两两之间 t 检验的分析方法，$p<0.05$ 表明有显著性差异，$p>0.05$ 表明无显著性差异。

1.2.7 多维尺度分析

参考贾俊涛等[19]的方法进行多维尺度分析。主要步骤如下：建立12行4列的基因表达变化倍数矩阵（原始矩阵），计算行与行之间的欧几里得距离组成相异性距离矩阵，对此矩阵求解最佳拟合构造矩阵，构造矩阵及其转置矩阵的乘积组成本征值向量，如果前几个本征值占到所有的80%以上就可以用构造矩阵的前几列数据来近似表示原始矩阵，从而完成高维数据的降

维，实现高维数据的可视化。所有的分析步骤在MATLAB R2013A（The Mathworks Inc.）中完成。

2 结果与讨论

2.1 四种基因定量方法对 Real-time PCR 和 ddPCR 检测结果的分析

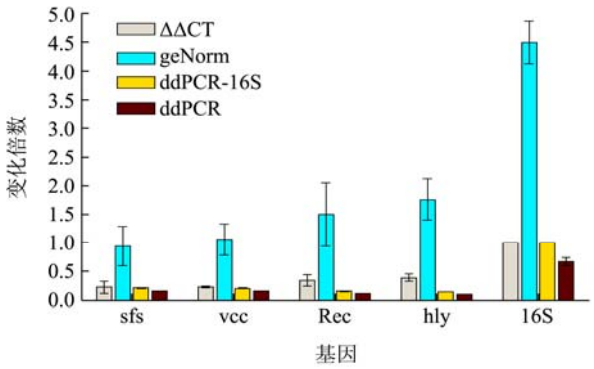


图1 四种基因定量方法对5种基因处理组相对于对照组变化倍数的数据处理结果

Fig.1 The results of the fold change in expression of five genes in the treatment group as compared to the control group analyzed by four gene quantification methods

霍乱弧菌不同基因及不同基因定量方法的数据处理结果如图 1 所示。本研究 t 检验结果表明，除 *sfs* 基因和 *vcc* 基因的ΔΔCT 法与 ddPCR-16S 法的处理结果，以及 *sfs* 基因的ΔΔCT 法与 ddPCR 法的处理结果差异不显著以外（$p>0.05$），其他基因的基因定量方法的处理结果均存在显著差异（$p<0.05$）。

用ΔΔCT 法对 Real-time PCR 的实验结果进行计算时，依赖于 PCR 效率为 1 的假设，当 PCR 效率不高或差别较大时，结果误差较大，因此在实际应用中具有一定局限性[20]。geNorm 与其他三种方法均存在显著差异（$p<0.05$）的原因可能是该计算方法存在一定的使用前提，用其筛选内参基因时，内参基因的候选基因本身就应该是受实验条件和生理状态等影响小的基因[21]；当候选基因条件达不到时，计算结果可能会存在较大疑义。由标准偏差的误差线大小可知，ddPCR 的误差最小，说明在本研究实验条件下，ddPCR 重复性远高于其他两种 Real-time PCR 相对定量方法。

2.2 ddPCR 检测结果的分析

在以往的研究中，16S rRNA基因常被用作看家基因，在Erika等的研究中 16S rRNA基因被证实为最稳定的基因，可以用作标准化计算[22]。但是也有大量实验证实 16S rRNA基因并不能作为内参基因直接使用[23]。ΔΔCT法与ddPCR-16S法均设定 16S rRNA基因为内参，故如图 1 所示，ΔΔCT法与ddPCR-16S法分析时，假定 16S rRNA基因在处理前后表达水平不变，而ddPCR法直接使用绝对的基因拷贝数进行计算，16S rRNA 基因在ddPCR法分析时变化倍数约为 0.67（$p<0.05$），说明处理组比对照组的 16S rRNA基因表达有所下降，所以在本研究中，霍乱弧菌 16S rRNA基因表达在低温处理前后并非稳定，不适合直接作为内参基因。ddPCR直接给出基因拷贝数，无需提前确定内参基因[24]，对于其他定量PCR，选择合适的内参基因对目的基因的准确定量有很大的影响[25]。

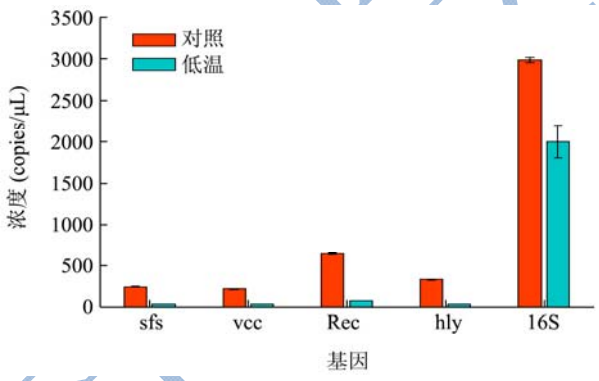


图 2 ddPCR 检测 5 种基因浓度变化

Fig.2 The copy number of 5 genes measured by ddPCR

本实验ddPCR直观的给出了5种基因低温处理前后，基因表达拷贝数的变化。结果表明16S rRNA基因和其他目标基因一样，在低温处理后发生了表达下降的变化（图2），证明了在特定实验条件下16S rRNA基因的表达并不总是稳定，不能直接作为内参基因用于基因相对表达量的分析，与前人研究结果一致[23,26]。Tricarico等[27]为对于已纯化mRNA中的目标基因进行定量时，rRNA不能用于标准化；相对于大部分目标基因，rRNA的表达量太高，不能真实的反映目标基因的变化情况。由图2可见，在mRNA初始水平一致的情况下，ddPCR结果表明16S rRNA基因的表达量明显高于其他4种目的基因（$p<0.05$），所以在表达量差距如此悬殊的情况下，对目的基因进行绝对量和相对量的比较分析就难以确保准确性。

2.3 多维尺度分析的结果

MDS 分析技术起源于心理测验学，它是检验观察数据是否能反映研究者提出的结构关系的一种理想方法。MDS 分析结果见图 3。由于前两个本征值之和已占到总体的 98.7%（远大于 80%），因此用构造矩阵的前 2 列可以近乎完全的表示原先的 4 维原始矩阵。在本次的 MDS 分析中，没有将以 16S rRNA 基因为内参的结果列入指标。在 ddPCR-16S 法分析中已经将其列

为标准化的分母，再将其作为分析对象就会得到变化倍数为“1”的数值，无法显现该分析方法的变异，因此以16S rRNA基因为内参的结果不适合作为MDS分析的指标。

图3中圈的中心体现结果的准确性，圈的大小表示结果的精密度。如图3所示，本研究实验结果表明ddPCR和ddPCR-16S法的准确性和精密度最好。Matthew等[28]使用ddPCR和Real-time PCR检测感染PBMC的病人，结果表明ddPCR比Real-time PCR具有更高的准确性和精密度。

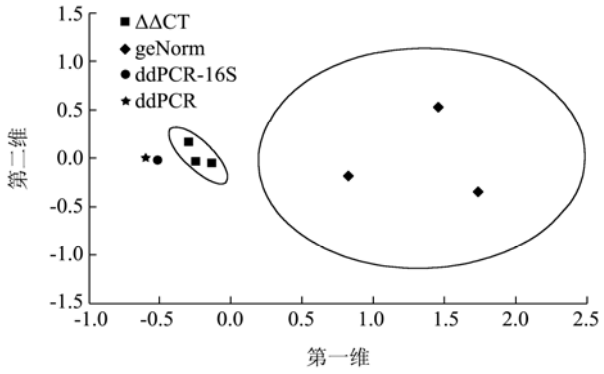


图 3 四种基因定量方法分析结果的 MDS 分析

Fig.3 The results of MDS analysis of four gene quantification methods

2.4 ddPCR 的特点

1999 年，Vogelstein 等[4]提出了一种新的核酸定量方法数字聚合酶链式反应（数字 PCR）技术，数字 PCR 技术的原理是根据泊松分布公式将起始待测模板细分为很多小份，使每 1 份中至多分配到 1 个核酸分子，在每个小份中进行单个拷贝核酸分子 PCR 扩增反应，最后计数有扩增反应的小份的数量即可确定目标模板的拷贝数，因此数字 PCR 技术是一种对待测核酸分子进行绝对定量的方法。已报道的数字 PCR 平台有很多种，本文介绍的 ddPCR 是其中应用最广泛最成熟，且商业化程度最高的一种。与传统定量 PCR 不同，ddPCR 通过直接计数的方法，可以实现起始 DNA 模板的绝对定量，因此特别适合用于 Ct 值不能很好分辨的应用领域，例如拷贝数变异、突变检测、等位基因失衡和单细胞基因表达等。对于低浓度样品，检测通量越高，可检测到样品信号的概率越大，灵敏度也就越高[29]。有研究表明 ddPCR 能更精确的对石蜡包埋的福尔马林固定的样本进行癌症基因组扩增定量，且灵敏度更高[30]。因此，数字 PCR 技术非常适合用于疾病的早期诊断。正是由于对痕量检测的高灵敏度，在某些检测领域假阳性现象也很难避免。Maja Kiselinova 等[31]通过检测 HIV 病毒就发现 ddPCR 检测结果存在假阳性的现象。并且也有实验发现，对巨细胞病毒进行定量检测时，Real-time PCR 比 ddPCR 有更高的灵敏度[32]。

虽然数字 PCR 是最新一代 PCR 技术，其克服了传统定量 PCR 的很多缺点。但是荧光 PCR 比数字 PCR 的价格低廉，并且在不同检测领域各有优势。杨冬燕等人[33]在进行餐厨废弃植物油检测时发现数字 PCR 检测灵敏度和准确率略高于荧光 PCR 方法，而数字 PCR 检测的稳定性和重复性略低于荧光 PCR 方法。综合价格优势，使数字 PCR 相比荧光 PCR 技术在餐厨废弃植物油鉴别领域的应用优势并不显著。ddPCR 的出现使数字 PCR 的成本降低，多种商业化 ddPCR 仪的出现使该技术更加实用，虽然在不同检测领域不同 PCR 技术都有其不可替代的优势，但是总体看来 ddPCR 已将核酸定量技术带入一个崭新的时代。

3 结论

本研究结果表明，Real-time PCR 和 ddPCR 对霍乱弧菌基因检测的结果，使用不同的相对定量方法分析不同基因的基因表达量变化存在一定的差异，所以霍乱弧菌的不同基因在不同的研究背景下，需要选择适当的相对定量方法进行计算分析。使用 geNorm 法选取霍乱弧菌内参基因时需要注意候选基因的筛选，如果不重视前期候选基因的筛选可能导致内参基因的选择结果存在问题。ddPCR 方法的检测结果表明霍乱弧菌的 16S rRNA 基因在低温处理过程中还是发生了变化，在本研究条件下不适合直接作为看家基因。MDS 分析结果表明在霍乱弧菌基因检测领域，ddPCR 比 Real-time PCR 对基因表达量的检测具有更高的准确度。

参考文献

[1] Roper M G, Easley C J, Landers J P. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips [J]. Analysis Chemical, 2005, 77(12): 3887-3894

[2] Blook A, Schwarz G. Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of liberty link in rapeseed by real-time PCR [J]. European Food Research and Technology, 2004, 216(5): 421-427

[3] Yang L, Shen H, Pan A. Screening and construct-specific detection methods of transgenic Huafan No.1 tomato by conventional and real-time PCR [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 85(13): 2159-2166

[4] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital PCR [J]. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 1999, 96(16): 9236-9241

[5] Richard A, Blainey P C, Christina F H. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing [J]. BMC Genomics, 2009, 116(10): 1427-2164

[6] Hua Z S, Rouse J L, Allen E. Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform [J]. Analysis Chemical, 2011, 82(6): 2310-2316

[7] Corbisier P, Bhat S, Partis L. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays L.*) by digital polymerase chain reaction [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2009, 396(6): 2143-2150

[8] Burns M J, Burrell A M, Foy C A. The applicability of digital PCR for the assessment of detectionlimits in GMO analysis [J]. Eur. Food Res. Technol., 2010, 231(3): 353-362

[9] Bhat S, Herrmann J, Armishaw P. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2009, 394(2): 457-467

[10] Vu H L, Troubetzkoy S, Nguyen H H. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis [J]. Nucleic Acids Res., 2000, 28(7): e18

[11] Qiu H. Gene expression of *HIF-1α* and *XRCC4* measured in human samples by real-time RT-PCR using the sigmoidal curve-fitting method [J]. Biotechniques, 2007, 42(3): 355-362

[12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408

[13] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Res., 1996, 6(10): 986-994

[14] Vandesompele J, De P 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): 1-12

[15] Wang G P, Xu C S. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells [J]. Molecular Biotechnology, 2010, 46(1): 49-57

[16] 胡兴娟,王淑娜,周向阳,等.水产品中的副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J].河南农业科学,2010,9:121-124
HU Xing-juan, WANG Shu-na, ZHOU Xiang-yang, et al. Fast detection of V. parahaemolytius and V. cholera by Duplex Real-time quantitative PCR [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010, 9: 121-124

[17] Durack J, T Ross, J P Bowman. Characterisation of the transcriptomes of genetically diverse *Listeria monocytogenes* exposed to hyperosmotic and low temperature conditions reveal global stress-adaptation mechanisms [J]. Plos One, 2013, 8(9): e73603

[18] Morisset D, S˘tebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. Plos One, 2013, 8(5): e62583

[19] Jia J T, Chen Y, Jiang Y H, et al. Visualized analysis of cellular fatty acid profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains under cold stress [J]. FEMS Microbiol. Lett., 2014, 357(1): 92-98

[20] 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 [J]. Biotechnol. Lett., 2006, 28(19): 1601-1613

[21] Ostrowska M, Zelazowska B, Sloniewski K, et al. Technical note: Selecting the best references in gene expression experiments in liver of cows receiving glucogenic supplements during the transition period [J]. Dairy Sci., 1997: 911-916

[22] Carrillo-Casas E M, Hernandez-Castro R, Suarez-Guemes F, et al. Selection of the internal control gene for real-time quantitative RT-PCR assays in temperature treated leptospira [J]. Curr. Microbiol., 2008, 56(6): 539-546

[23] Vandecasteele S J, Peetermans W E, Merckx R, et al. Use of gDNA as internal standard for gene expression in staphylococci *in vitro* and *in vivo* [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 291(3): 528-234

[24] Hoshino T, Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(6): 390-395

[25] Hamalainen H K, Tubman J C, Vikman S, et al. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR [J]. Anal. Biochem., 2001, 299(1): 63-70

[26] Zhao W J, Li Y, Gao P F, et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in gene expression levels of *Lactobacillus* casei Zhang [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2011, 38(9): 1279-1286

[27] Tricarico C. Quantitative realtime reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies [J]. Analytical Biochemistry, 2002, 309(2): 293-300

[28] Strain M C, Lada S M, Luong T, et al. Highly precise

measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. Plos One, 2013, 8(4): e55943

[29] Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes [J]. Cell, 2012, 148(6): 1293-1307

[30] Nadauld L, Regan J F, Miotke L, et al. Quantitative and sensitive detection of cancer genome amplifications from formalin fixed paraffin embedded tumors with droplet digital PCR [J]. Transl. Med., 2012, 2: 2

[31] Kiselinova M, Pasternak A O, De Spiegelaere W, et al. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA [J]. Plos One, 2014, 9(1): e85999

[32] Hayden R T, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus [J]. J. Clin. Microbiol., 2013, 51(2): 540-546

[33] 杨冬燕,杨永存,李浩,等.数字 PCR 与荧光 PCR 方法鉴别餐厨废弃植物油的比较[J].中国卫生检验杂志,2015,25(19): 3221-3230

YANG Dong-yan, YANG Yong-cun, LI Hao, et al. Comparation of digital PCR and fluorescent PCR for detecting kitchen-waste vegetable oil [J]. Chin. J. Health Lab Tec., 2015, 25(19): 3221-3230

现代食品科技