

# 运用 Real-time PCR 建立即食虾中副溶血性弧菌分子预测模型

孙文烁<sup>1</sup>, 靳梦瞳<sup>1</sup>, 王敬敬<sup>1</sup>, 张昭寰<sup>1</sup>, 孙晓红<sup>1, 2, 3</sup>, 潘迎捷<sup>1, 2, 3</sup>, 赵勇<sup>1, 2, 3</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)  
(3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 运用 Real-time PCR 方法建立不同贮藏温度 (4~30 °C) 下即食虾中副溶血性弧菌分子预测模型。将四株副溶血性弧菌混合接种于即食虾中, 利用 Real-time PCR 定量 4~30 °C 下虾中副溶血性弧菌数量, 选用 Gompertz 模型拟合得到 10~30 °C 下副溶血性弧菌最大比生长速率, 并用 Linear、Square Root 和 Ratkowsky 模型拟合获得二级分子模型, 然后对其验证; 选用 Weibull、Log-linear 及 Logistic 模型拟合 4 °C 及 7 °C 下副溶血性弧菌的失活曲线。结果表明 Gompertz 模型  $R^2$  均在 0.97 以上, 可较好地拟合 Real-time PCR 定量的副溶血性弧菌生长数据; 二级分子模型的  $R^2$  均在 0.94 以上, 准确因子 ( $A_f$ ) 和偏差因子 ( $B_f$ ) 均在接受范围内, 可较好地描绘即食虾中副溶血性弧菌的生长速率与贮藏温度之间的关系, 其中 Linear 模型为最适二级模型; 但 Real-time PCR 方法不适用于建立低温下副溶血性弧菌的失活模型。运用 Real-time PCR 方法可以建立可靠的一、二级分子预测模型, 为实际样品中目标菌株的预测模型建立提供研究基础。

**关键词:** 实时定量荧光 PCR; 副溶血性弧菌; 分子预测模型

文章编号: 1673-9078(2014)7-142-148

## Development of a Molecular Predictive Model of *Vibrio Parahaemolyticus* in Ready-to-eat Shrimps by Real-time PCR

SUN Wen-shuo<sup>1</sup>, JIN Meng-tong<sup>1</sup>, WANG Jing-jing<sup>1</sup>, ZHANG Zhao-huan<sup>1</sup>, SUN Xiao-hong<sup>1,2,3</sup>, PAN Ying-jie<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China) (2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China) (3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A molecular predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* on ready-to-eat shrimps was developed and four *Vibrio parahaemolyticus* strains in ready-to-eat shrimps at 4~30 °C were quantitated by Real-time PCR method. Gompertz model was selected as the primary model, which was fitted to achieve maximum growth rate (MGR) for *Vibrio parahaemolyticus* on ready-to-eat shrimps at 10~30 °C. The MGR was then used to establish secondary molecular models as linear model, square root model and Ratkowsky model, and these models were validated subsequently. Weibull model, Log-linear model, and Logistic model were applied to predict inactive curves of *V. parahaemolyticus* at 4 °C and 7 °C, respectively. Results showed that the *V. parahaemolyticus* growth data could be well fitted by Gompertz model ( $R^2 > 0.96$ ). The  $R^2$  values of linear model, square root model and Ratkowsky model were all above 0.94, and the  $A_f$  and  $B_f$  values were within the acceptable limit, indicating that the relationship between the growth rates of *V. parahaemolyticus* and storage temperatures could be well described by the models, especially the Linear model. However, Real-time PCR method could not be used to develop the inactive model of *V. parahaemolyticus* at 4 °C and 7 °C. Accuracy molecular predictive models developed by real-time PCR method can aid to establish models of certain pathogens more accurately in the presence of other bacteria.

**Key words:** Real-time PCR; *Vibrio parahaemolyticus*; molecular predictive model

收稿日期: 2014-01-11; 作者简介: 孙文烁 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全风险评估; 通讯作者: 赵勇教授

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271870); 上海市科学技术委员会部分地方院校能力建设项目 (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)

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种革兰氏阴性短杆嗜盐菌, 人类食用该菌感染的海产品可引发肠胃炎和败血症等肠胃疾病, 是我国部分沿海地区的食物中毒案例中首要病原菌。虾作为亚洲地区重要的水产品之一<sup>[1]</sup>, 在养殖过程中易受副溶血性弧菌感染, 在温暖季节其自然污染率可达 90%, 可带来副溶血性弧菌食物中毒的潜在食品安全。预测食品微生物学 (Predictive food microbiology) 是对食品中微生物的生长、残存、毒素产生和死亡进行量化的预测方法, 同时结合计算机技术、数理统计和微生物知识, 快速对重要微生物的生长、存活和死亡进行预测, 客观地评价食品在加工、流通和贮藏等条件下的食品质量和货架期, 是用于风险评估的有效工具。

目前, 关于副溶血性弧菌的微生物预测模型的建立已相对成熟<sup>[2-4]</sup>, 而这些模型的数据大多来源于传统的涂布计数法, 此定量方法需经过分离培养、生化鉴定等步骤, 操作繁琐、耗时长、灵敏度低且易出现假阳性。且对于实际虾样品, 易被沙门氏菌、单增李斯特菌及创伤弧菌等多种微生物污染, 利用传统涂布方法定量目标菌株比较困难, 即使选择性培养基得到结果也并不准确, 因此用此方法建立实际样品中预测模型并不可靠<sup>[5]</sup>。Real-time PCR 是利用样品的 DNA (cDNA) 进行定量的分子生物学技术, 此种方法除具有灵敏度高特异性强准确性高等特点外, 该法还可准确定量实际样品中目标菌株以及活的不可培养状态 (VBNC) 细菌, 目前已广泛应用于食品样品中微生物的定量检测<sup>[6]</sup>。彭织云<sup>[7]</sup>及 Ye<sup>[8]</sup>等利用此方法建立一级模型, 通过验证可以较好地拟合微生物的生长情况, 但尚未有研究利用 Real-time PCR 定量方法建立二级分子模型及失活模型。

本实验主要利用分子生物学方法 Real-time PCR 监测在 30 °C、25 °C、20 °C、15 °C、10 °C 贮藏条件下即食虾上副溶血性弧菌的生长动态, 建立一级预测模型, 根据一级模型数据构建二级分子模型, 同时尝试建立低温 (7 °C 和 4 °C) 条件下副溶血性弧菌在即食虾上的失活模型, 旨在利用 Real-time PCR 定量方法建立特异性强准确性高的微生物预测模型, 为监控实际样品的食品安全和风险评估提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

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; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; BagMixer 400 VW 型拍打式均质器, 法国 Interscience 公司。

### 1.2 实验材料

实验用四株副溶血性弧菌: ATCC33847、ATCC17802 购自中国科学院微生物研究所, F18、F36 由本实验室分离并保存, 菌株于 -20 °C 冰箱保存; 南美白对虾购自上海浦东新区果园农贸市场, 存放于 -80 °C; 荧光定量 PCR 引物 (*tlh*-F 5'-ACT CAA CAC AAG AAG AGA TCG ACA A-3', *tlh*-R 5'-GAT GAG CGG TTG ATG TCC AA-3') 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

### 1.3 菌种活化

各取 -20 °C 保存的四株副溶血性弧菌菌种 100 μL, 分别接种于 9 mL TSB (3% NaCl) 培养基中, 于 37 °C 摇床培养 10~12 h 后, 取 100 μL 培养获得的菌液转接于 9 mL TSB (3% NaCl) 培养基中, 37 °C 下摇床培养 10~12 h, 两次活化获得菌悬液。

### 1.4 虾样品准备

虾样品在 4 °C 下过夜解冻, 于 2.5% 盐水中煮沸 20 min, 以杀灭背景微生物, 煮沸后于生物安全柜内冷却至室温。

### 1.5 样品处理及 DNA 提取

分别等量取四株副溶血性弧菌于离心管中混匀, 离心 10 min (3000 g, 15 °C), 弃上清, 用 PBS 缓冲液重悬, 最终菌液浓度为 ~10<sup>9</sup> CFU/mL。将菌液加入到 500 mL 2.5% 盐水中得到接种液, 将煮熟的南美白对虾 (~10 g/只) 浸泡于接种液中, 震荡 30 min, 后将虾取出于生物安全柜内晾干。晾干的即食虾分别置于 30 °C、25 °C、20 °C、15 °C、10 °C、7 °C 及 4 °C 恒温培养箱中培养。定时从不同贮藏温度培养箱中随机取出虾样本, 置于 90 mL 0.85% 生理盐水中均质 2 min, 收集 2 mL 均质液于 2 mL 离心管, 离心 1 min (200 g, 4 °C), 移取 1 mL 上清液于 1.5 mL 离心管, 离心 2 min (12000 r/min, 4 °C), 弃上清, 菌体于 -80 °C 保存, 用于提取 DNA。DNA 提取按照天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。

### 1.6 标准曲线的建立

取对数期生长状况下的四株副溶血性弧菌菌液各

1 mL于10 mL离心管内混合均匀,混合菌液进行适当梯度稀释后,取100  $\mu\text{L}$ 涂布于TCBS平板上,37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,计数。同时取1 mL混合菌液于1.5 mL离心管中离心2 min (12000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ),去上清,菌体于-80  $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于提取DNA。DNA提取按1.4所述方法进行,提取得到DNA 10倍梯度稀释后进行Real-time PCR扩增。根据扩增得到的 $C_T$ 值与涂板定量的 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 值制作标准曲线。

## 1.7 荧光定量PCR

荧光定量PCR的反应体系为20  $\mu\text{L}$ ,各组份为2'SYBR Green Master 10  $\mu\text{L}$ 、正向引物(10  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ 、反向引物(10  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ 、DNA模板2  $\mu\text{L}$ 及 $\text{ddH}_2\text{O}$  5  $\mu\text{L}$ 。PCR反应参数为:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性20 s;40个循环中,每个循环均95  $^{\circ}\text{C}$ 变性3 s,60  $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s。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。

## 1.8 数据处理

### 1.8.1 一级生长模型拟合

利用Origin 8.0统计软件,通过修正的Gompertz模型<sup>[8]</sup>拟合在30  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$ 、20  $^{\circ}\text{C}$ 、15  $^{\circ}\text{C}$ 、10  $^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下即食虾中副溶血性弧菌的生长数据。修正的Gompertz模型表达式为:

$$\log(N_t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

注: $\log(N_t)$ 是在时间 $t$ 时菌落计数的对数值, $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{mL})$ ;A是初始菌量,C是最大菌量和初始菌量之间的差值, $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{mL})$ ;M是生长速率达到最大值时的时间;B是最大生长速率, $\text{Log}_{10}[\text{CFU}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ 。

### 1.8.2 失活模型拟合

应用Log-linear模型<sup>[8]</sup>(式(2))、Weibull模型<sup>[8]</sup>(式(3))和Logistic模型<sup>[8]</sup>(式(4))对Real-time PCR获得的数据进行拟合,描述4  $^{\circ}\text{C}$ 及7  $^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下即食虾中副溶血性弧菌的失活情况。

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (2)$$

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -bt^n \quad (3)$$

$$\log\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -\frac{k}{(1 + e^{a-t})} \quad (4)$$

注: $N_t$ 表示贮藏 $t$ 时间后残活细胞数(CFU/mL); $N_0$ 表示贮藏前( $t=0$ )细胞数(CFU/mL);D表示弧菌降低一个对数级所需要的时间; $t$ 表示低温处理时间; $b$ 和 $n$ 为曲线形状因子; $k$ 是时间趋向于无穷大时 $\log(N_t/N_0)$ 的极限值; $r$ 是细菌瞬时降

低率; $e$ 是自然对数底数; $a$ 是积分常数

### 1.8.3 二级模型拟合

二级模型用来描述温度对微生物生长的影响情况。选用Linear模型(式(5))、Square Root模型(式(6))和平方根方程的扩展式Ratkowsky模型(式(7))<sup>[20]</sup>拟合生长速率-温度曲线,建立副溶血性弧菌生长速率与温度之间的二级预测模型。

$$\mu = aT + b \quad (5)$$

$$\mu = a(T - T_0)^2 \quad (6)$$

$$\mu = a(T - T_0)^2 \{1 - \exp[b(T - T_{\max})]\} \quad (7)$$

注: $\mu$ 为最大比生长速率, $\text{Log}_{10}[\text{CFU}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ ;T为生长温度。 $T_0$ 和 $T_{\max}$ 为理论上副溶血性弧菌生长的最低温度和最高温度; $a$ 和 $b$ 是模型的参数。

### 1.8.4 二级模型的评价

选择均方根误差RMSE(式(8))、准确因子 $A_f$ (式(9))和偏差因子 $B_f$ (式(10))对模型进行评价<sup>[9]</sup>。

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(\mu_{\text{obs}} - \mu_{\text{pred}})^2}{n}} \quad (8)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum \lg(\mu_{\text{pred}}/\mu_{\text{obs}})}{n}} \quad (9)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum \lg(\mu_{\text{pred}}/\mu_{\text{obs}})}{n}} \quad (10)$$

注: $\mu_{\text{obs}}$ 代表实验观测值; $\mu_{\text{pred}}$ 代表模型预测值; $n$ 代表观测值个数

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的建立

本研究建立的标准曲线相关系数 $R^2$ 为1.00;扩增效率 $E$ 为92.01%,在可接受的扩增效率(80%~120%)范围内。因此,建立的标准曲线可用于进一步定量。

### 2.2 一级生长模型的建立

通过Origin 8.0软件对Real-time PCR实验数据进行一级模型拟合,得到不同温度条件下即食虾中副溶血性弧菌的生长动力学模型(表1)及生长曲线(图1)。由表1可知判定系数 $R^2$ 的值均在0.97以上,表明Gompertz模型能较好的描述不同温度下即食虾中副溶血性弧菌的生长状况。副溶血性弧菌生长参数见表2,可以看出10  $^{\circ}\text{C}$ 时最大比生长速率最低为0.02  $\text{Log}_{10}[\text{CFU}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ ,而延滞期值最大,可达24 h;随着贮藏温度的逐渐升高,副溶血性弧菌最大比生长速率也随之显著增加,而生长的延滞期缩短,当温度升到30  $^{\circ}\text{C}$

时, 延滞期可缩短至 0.17h。

表 1 不同温度储藏条件下即食虾中副溶血性弧菌的生长动力学模型

Table 1 Growth kinetics model of *Vparahaemolyticus* in ready-to-eat shrimps at different temperatures

温度/°C	副溶血性弧菌生长动力学模型	R <sup>2</sup>
10	$\log(N_t)=5.56+2.92\exp\{-\exp[-0.02(t-71.35)]\}$	0.99
15	$\log(N_t)=4.96+4.95\exp\{-\exp[-0.15(t-10.98)]\}$	1.00
20	$\log(N_t)=4.90+5.45\exp\{-\exp[-0.24(t-6.52)]\}$	0.98
25	$\log(N_t)=4.71+5.43\exp\{-\exp[-0.37(t-3.52)]\}$	1.00
30	$\log(N_t)=4.55+4.82\exp\{-\exp[-0.50(t-2.18)]\}$	0.97

表 2 不同温度储藏条件下即食虾中副溶血性弧菌生长参数

Table 2 Kinetic parameters of *Vparahaemolyticus* in ready-to-eat shrimps at different temperatures

温度/°C	10	15	20	25	30
最大比生长速率/ Log <sub>10</sub> [CFU/(g·h)]	0.02	0.27	0.47	0.74	0.88
生长迟滞期/h	24.00	4.32	2.28	0.82	0.17

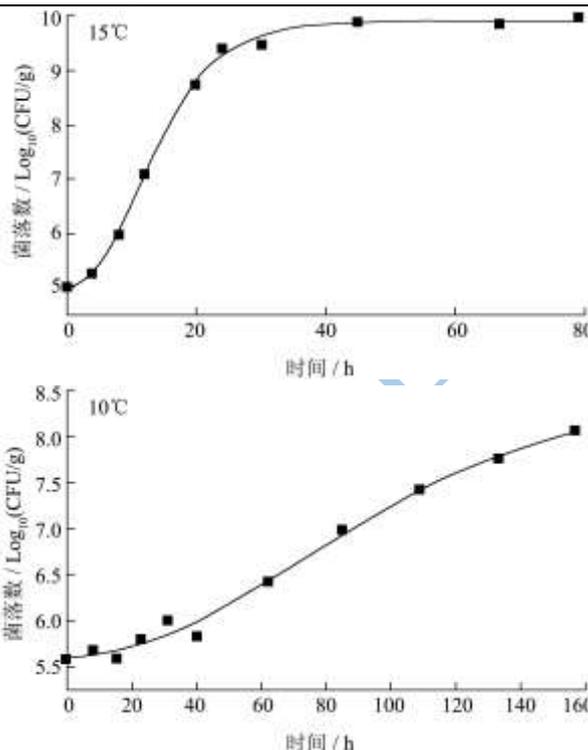
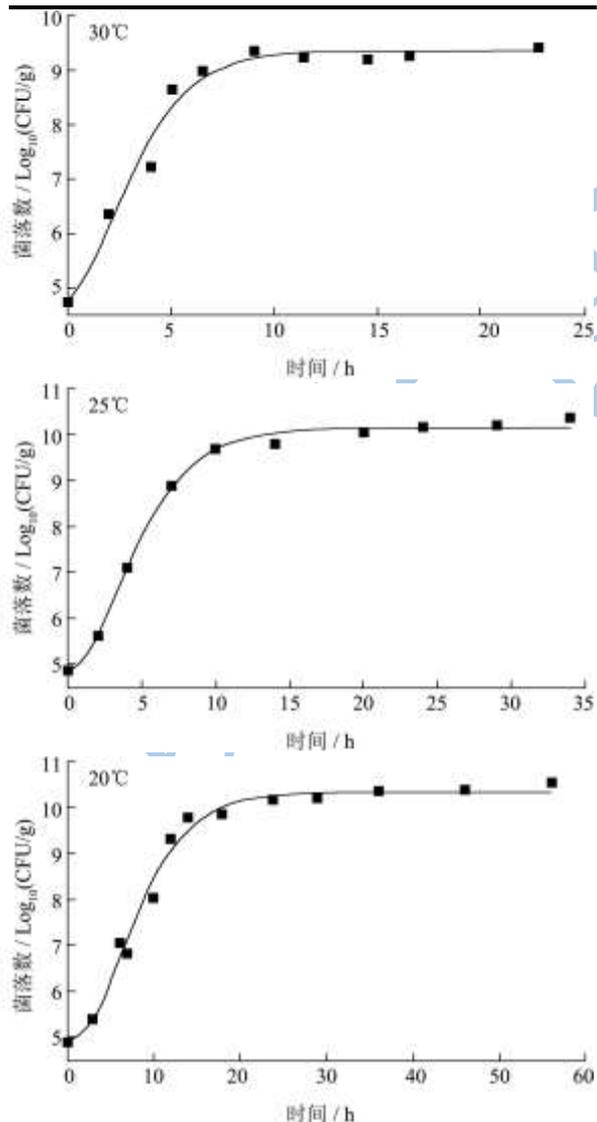


图 1 Gompertz 模型拟合的在不同温度条件下即食虾中副溶血性弧菌生长曲线

Fig.1 Growth curves of *Vparahaemolyticus* in ready-to-eat shrimps at different temperatures from Gompertz model obtained using real-time PCR detection method

### 2.3 失活模型的建立

低温 (7 °C 和 4 °C) 贮藏条件下, 即食虾上副溶血性弧菌失活模型如图 2 所示, 4 °C 条件下 Weibull 模型 R<sup>2</sup> 较高, 拟合效果较好, 而 Log-linear 模型则可以较好的拟合 7 °C 条件下副溶血性弧菌的失活情况 (表 3)。但由表 4 可知, Real-time PCR 定量数据之间均无显著性 (p>0.05) 差异。

### 2.4 二级模型拟合

根据一级模型得出的副溶血性弧菌在不同温度条件下的最大比生长速率, 建立 Linear 模型、Square Root 模型和 Ratkowsky 模型, 拟合结果见图 3。由图 3 可知, Linear、Square Root 及 Ratkowsky 三种模型的决定系数 R<sup>2</sup> 分别为 0.99、0.94 及 0.98, 因此用 Linear 模型拟合的二级模型, 温度与比生长速率之间存在良好的线性关系。Linear 模型、Square Root 模型和 Ratkowsky 模型的预测值和 Gompertz 模型的观测值见表 5, 对预测值和观测值进行拟合, 除 25 °C 和 30 °C 贮藏条件外, Linear 模型预测值与观测值决定系数高达 0.99, 对副溶血性弧菌最大比生长速率的拟合效果较好, 而 25 °C 和 30 °C 条件下, Ratkowsky 模型预测

值更接近于观测值。

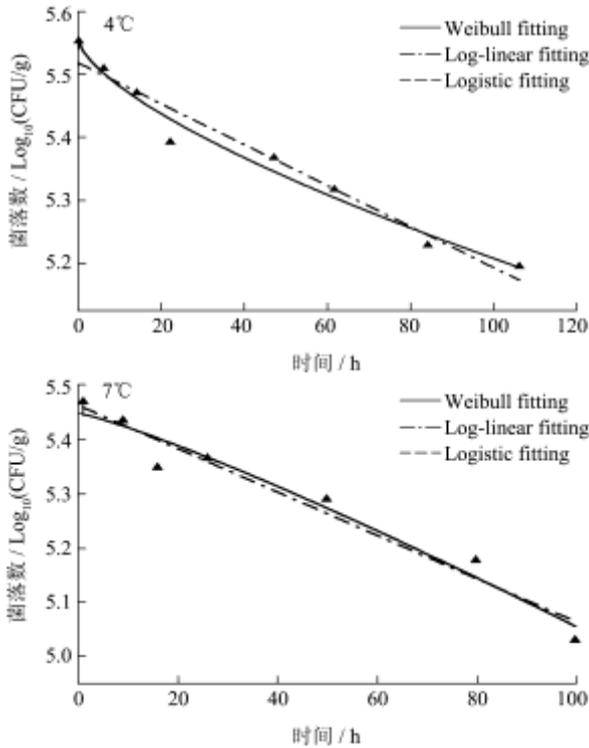


图2 失活模型拟合的低温条件下即食虾中副溶血性弧菌失活曲线

Fig.2 Inactivation curves of *V. parahaemolyticus* in ready-to-eat shrimps at low temperatures from inactive models obtained using real-time PCR detection method

表3 低温条件下即食虾中副溶血性弧菌三种失活模型的统计分析

Table 3 Statistical analysis data for three inactive models of *V. parahaemolyticus* in ready-to-eat shrimps at low temperatures

温度/°C	Log-linear 模型 R <sup>2</sup>	Logistic 模型 R <sup>2</sup>	Weibull 模型 R <sup>2</sup>
4	0.95	0.96	0.97
7	0.95	0.92	0.94

表4 低温条件下即食虾中副溶血性弧菌 Real-time PCR 定量结果

Table 4 Results of Real-time PCR methods in quantifying the concentration of *V. parahaemolyticus* in ready-to eat shrimps at low temperatures

取样点	Real-time PCR 定量结果/Log <sub>10</sub> (CFU/g)	
	4 °C	7 °C
1	5.55±0.15 <sup>a</sup>	5.47±0.20 <sup>a</sup>
2	5.51±0.08 <sup>a</sup>	5.44±0.36 <sup>a</sup>
3	5.47±0.06 <sup>a</sup>	5.35±0.08 <sup>a</sup>
4	5.39±0.01 <sup>a</sup>	5.37±0.08 <sup>a</sup>
5	5.37±0.08 <sup>a</sup>	5.29±0.06 <sup>a</sup>
6	5.32±0.09 <sup>a</sup>	5.18±0.07 <sup>a</sup>
7	5.23±0.12 <sup>a</sup>	5.24±0.12 <sup>a</sup>
8	5.19±0.04 <sup>a</sup>	5.17±0.13 <sup>a</sup>

注：数值以平均值±标准偏差表示；a 表示同一温度定量数据间无显著性差异 (p>0.05)。

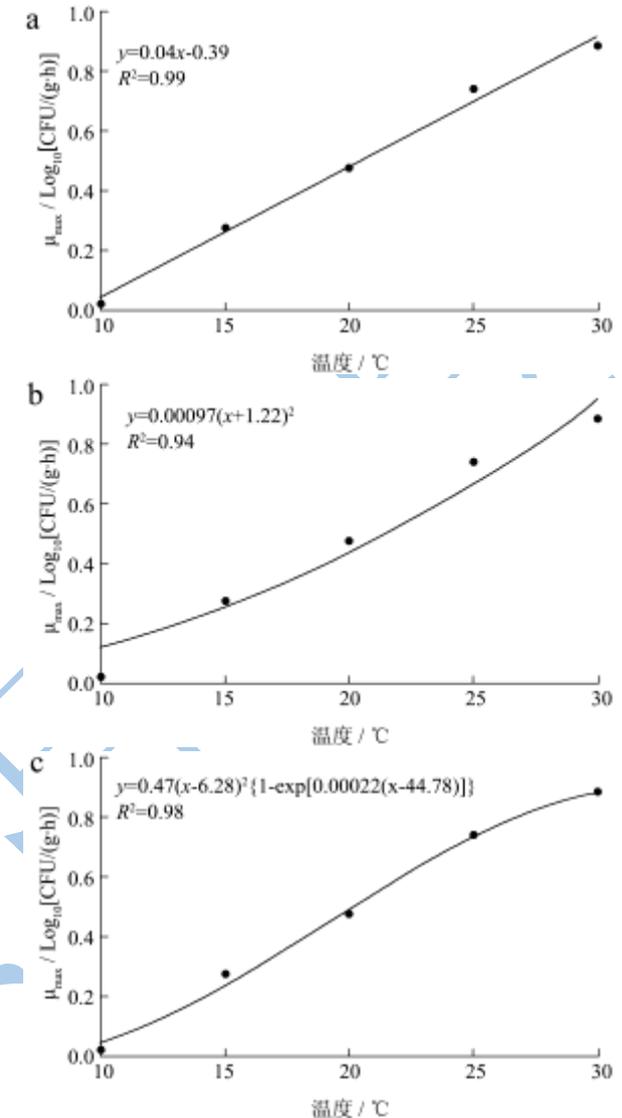


图3 不同温度条件下即食虾中副溶血性弧菌的最大比生长速率拟合的 Linear(a)、Square Root(b)和 Ratkowsky model(c) of the maximum growth rate of *V. parahaemolyticus* at different temperatures

表5 不同温度条件下副溶血性弧菌最大比生长速率的观测值和预测值

Table 5 Observed and predicted maximum growth rate of *V. parahaemolyticus* at different temperatures

温度 /°C	观测值/Log <sub>10</sub> [CFU/(g·h)]	预测值/Log <sub>10</sub> [CFU/(g·h)]		
		Linear 模型	Square Root 模型	Ratkowsky 模型
10	0.02	0.04	0.12	0.05
15	0.27	0.26	0.25	0.24
20	0.47	0.48	0.44	0.49
25	0.74	0.70	0.66	0.73
30	0.88	0.91	0.94	0.88

## 2.5 二级模型的评价

Linear 模型、Square Root 模型和 Ratkowsky 模型的可靠性通过数学参数进行直观评价(表 6)。用 F 统计量检验模型总体的显著性, Linear 模型和 Square Root 模型的  $p$  均小于 0.01, 表明模型拟合度较高, 且均方根误差 RMSE 是说明模型预测值的离散程度的一种数值指标<sup>[9]</sup>, 由表 6 可知三种模型的 RMSE 分别为 0.03、0.06、0.02, 表明预测值与实验观测值高度相关<sup>[9]</sup>; 精确因子  $A_f$  一般用来验证预测模型的准确度, 衡量预测值和观测值之间的接近程度, 偏差因子  $B_f$  则是用来评价预测值和实测值差异程度<sup>[21]</sup>, 从表 6 可以得出, 三种模型的  $A_f$  和  $B_f$  分别为 1.16、1.50、1.22 和 1.11、1.35、1.15, 均在 Ross<sup>[10]</sup>划分范围内, 表明三种二级模型能可靠预测 10~30 °C 贮藏条件下的即食虾中副溶血性弧菌随温度改变发生的生长变化, 且  $A_f$  和  $B_f$  值越接近于 1, 模型越理想<sup>[10]</sup>, 因此 Linear 模型为最适二级模型。

表 6 Linear 模型、Square root 模型和 Ratkowsky 模型的 RMSE、 $A_f$  和  $B_f$  的值

Table 6 RMSE,  $A_f$  and  $B_f$  values of the linear model, square root model and Ratkowsky model

模型类型	RMSE	$A_f$	$B_f$
Linear 模型	0.03	1.16	1.11
Square Root 模型	0.06	1.49	1.35
Ratkowsky 模型	0.02	1.22	1.15

## 3 讨论

预测模型是运用数学模型来描述和预测食品微生物在某些条件下生长和衰亡的情况, 目前, 已建立了副溶血性弧菌在培养基<sup>[2]</sup>和水产品基质如大马哈鱼<sup>[3]</sup>、牡蛎<sup>[4]</sup>及虾<sup>[7]</sup>上的生长模型, 但这些模型的数据均来源于传统的平板计数法。Real-time PCR 作为一种新兴分子定量方法, 除具有快速、简便、特异性强等优势外, 还具有定量复杂背景菌存在下实际样品中的目标微生物数量的能力, 已被广泛用于实际样品检测定量, 如 Robert-Pillot 等<sup>[11]</sup>研究表明 Real-time PCR 可以准确定量虾样品中副溶血性弧菌数量。在此基础上彭织云等<sup>[7]</sup>运用 Real-time PCR 的方法建立了 37 °C 条件下副溶血性弧菌在即食虾上的一级生长模型, 而 Ye 等<sup>[5]</sup>利用 Real-time PCR 的方法建立了单增李斯特菌在真空冷冻包装猪肉上的一级生长模型, 且得到了与涂布较为一致的预测结果, 本研究运用 Real-time PCR 方法建立的 10~30 °C 下四种副溶血性弧菌在即食虾上混合生长一级模型,  $R^2$  均在 0.97 以上, 同样证明此种

方法得到的不同温度下副溶血性弧菌的生长数据可以用 Gompertz 模型进行较好的拟合。其中利用 Real-time PCR 方法建立 10 °C 生长模型, 与涂布数据进行比较, 由涂布得到的副溶血性弧菌生长曲线呈现先下降后上升的趋势(数据未给出), 且生长曲线不符合任何一级生长模型, 而 Real-time PCR 的方法得到生长曲线则呈现缓慢上升的趋势, 黄和等<sup>[12]</sup>研究也表明 10 °C 冷藏条件下副溶血性弧菌呈现生长状态, 说明在 10 °C 条件下 Real-time PCR 定量方法能够从更深层次角度揭示微生物的实际生长情况。根据建立的一级生长模型, 本研究首次选取 Linear 模型、Square Root 模型及 Ratkowsky 模型建立二级分子模型, 三种模型均可以较好地描绘即食虾中副溶血性弧菌的生长速率与贮藏温度之间的关系, 其中 Linear 为最适的二级分子模型。

本研究首次建立低温条件下的失活模型, 通过 Real-time PCR 得到数据虽可以通过失活模型进行拟合, 但是由于细菌死亡后 DNA 并不降解<sup>[13]</sup>, 若细菌不再生长 DNA 的含量则无显著变化, 导致定量数据之间均无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 因此不能准确反映细菌的失活情况, 不适用于失活模型的建立。近年来, 有研究者利用叠氮溴化丙锭 (PMA) 或叠氮溴化乙锭 (EMA) 的渗入和交联作用, 消除来自死菌 DNA 的 PCR 扩增信号, 被认为是有效的活菌检测技术, 已被广泛应用于创伤弧菌<sup>[14]</sup>等微生物检测, 因此可进一步研究应用 Real-time PCR 结合 PMA 或 EMA 建立实际样品中的失活模型。

随着我国食品安全事件越来越多的暴露, 微生物风险评估作为解决食品安全问题的重要手段已经越来越多的应用于生产实践。风险评估逐步深入和完善的同时, 基础方面的研究更应被重视起来。Real-time PCR 定量方法能够从更加深入的层面揭示实际样品中微生物生长状况, 为风险评估的温度范围、一级模型构建的宽度、潜在风险识别区的甄别等方面提供更加全面的信息。

## 4 结论

本研究首次利用 Real-time PCR 方法建立 10~30 °C 下即食虾中副溶血性弧菌一级生长模型, 并在此基础上首次建立二级分子模型, 结果显示 Gompertz 模型可以对生长曲线进行较好地拟合, 建立二级分子模型可以较好地描绘即食虾中副溶血性弧菌的生长速率与贮藏温度之间的关系; Real-time PCR 定量方法虽不适用于建立低温下即食虾中副溶血性弧菌失活模型, 但从 DNA 的角度揭示了副溶血性弧菌生长状况, 对涂板定量无法描绘的微生物生长情况进行补充说

明。因此, Real-time PCR 技术作为分子生物学方法可以为预测微生物模型构建提供快速准确的技术支持,为实际样品定量风险评估提供依据。

### 参考文献

- [1] Lin T, Wang JJ, Li JB, et al. Use of acidic electrolyzed water ice for preserving the quality of shrimp [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 8695-8702
- [2] Yoon K, Min K, Jung Y, et al. A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea [J]. Food Microbiology, 2008, 25(5): 635-641
- [3] Yang Z Q, Jiao X A, Li P, et al. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature [J]. Food Microbiology, 2009, 26(6): 606-614
- [4] Parveen S, DaSilva L, DePaola A, et al. Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in post-harvest shellstock oysters [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 161: 1-6
- [5] Ye K P, Wang H H, Zhang X X, et al. Development and validation of a molecular predictive model to describe the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged chilled pork [J]. Food Control, 2013, 32(1): 246-254
- [6] Ye K P, Zhang Q, Jiang Y, et al. Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR [J]. Food Control, 2012, 25(1): 117-124
- [7] 彭织云,王敬敬,唐晓阳,等.运用 Real-time quantification PCR 方法建立副溶血性弧菌在即食虾中的生长预测模型[J].食品工业科技,2013,34(8):108-110  
PENG Zhi-yun, WANG Jing-jing, TANG Xiao-yang, et al. Establishment of *Vibrio parahaemolyticus* growth predictive model by Real-time quantification PCR on ready-to-eat Shrimp [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 108-110
- [8] 姬华.对虾中食源性弧菌预测模型建立及风险评估[D].无锡:江南大学,2012  
JI Hua. Establishment of predictive model and risk assessment for foodborne *Vibrio spp.* in shrimp [D]. Wuxi: JiangNan University, 2012
- [9] 王军,董庆利,丁甜.预测微生物模型的评价方法[J].食品科学,2011,32(21):268-272  
WANG Jun, DONG Qing-li, DING Tian. An overview of evaluation methods for predictive microbial growth models [J]. Food Science, 2011, 32(21): 268-272
- [10] Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 62: 231-245
- [11] Robert-Pillot A, Copin S, Gay M, et al. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 190-197
- [12] 黄和,蒋志红,雷晓凌,等.冻熟虾中副溶血性弧菌生长模型[J].广东海洋大学学报 ISTIC,2009,29(1):94-98  
HUANG He, JIANG Zhi-hong, LEI Xiao-ling, et al. Growth model of *Vibrio parahaemolyticus* in frozen cooked shrimp [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(1): 94-98
- [13] Wolffs P, Norling B, Rådström P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 60(3): 315-323
- [14] 张晶,周勇,陶霞,等.创伤弧菌 PMA RTi-PCR 检测技术的建立[J].中国人兽共患病学报,2013,29(1):54-58  
ZHANG Jing, ZHOU Yong, TAO Xia, et al. Establishment of PMA RTi-PCR detection method for *Vibrio vulnificus* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(1): 54-58