葡糖杆菌的 SYBR Green Ⅰ荧光定量 PCR 方法的建立

李月华[1,2]，周巍[1,2]，杨岚[2]，章晶晶[2]，王爽[2]，刘涛[2]，张岩[2]，张伟[1]
（1.河北农业大学食品科技学院，河北保定 071000）
（2.河北省食品检验研究院，河北省食品安全重点实验室，河北石家庄 050091）

摘要：基于 GenBank 提供的葡糖杆菌的 16S rRNA 保守序列设计 PCR 引物，利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 技术建立一种快速灵敏检测酸乳制品中葡糖杆菌的方法。用本研究建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 方法对 3 株葡糖杆菌以及 18 株非葡糖杆菌进行特异性检测，并用凝胶电泳验证其可靠性，结果显示，本研究所设计的引物具有良好的特异性。对扩增结束后的 PCR 产物进行溶解曲线分析，证实此引物的扩增产物存在引物二聚体，但可通过溶解曲线的出峰时间排除非特异性扩增。利用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测葡糖杆菌建立的标准曲线相关性良好，R^2=0.9968，对葡糖杆菌进行灵敏度检测，最低检出限可达 75 CFU/mL。利用该方法可成功检测出 5 份人工污染样品中的葡糖杆菌，研究表明，该方法灵敏度高、操作简便快捷，适用于酸乳制品的定量检测。

关键字：葡糖杆菌；SYBR Green I；实时定量 pcr；检测；酸乳
文章篇号：1673-9078(2015)4-272-276 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.044

Establishment of Real-time Fluorescence Quantitative PCR for *Gluconobacter* using SYBR Green I

LI Yue-hua[1,2], ZHOU Wei[1,2], YANG Lan[2], ZHANG Jing-jing[2], WANG Shuang[2], LIU Tao[2], ZHANG Yan[2], ZHANG Wei[1]
(1.Agricultural University of Hebei,College of Food Science and Technology, Baoding 071000, China)
(2.Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: PCR primer was designed according to 16S rRNA conserved sequence of *Gluconobacter* from the GenBank, and a rapid and sensitive fluorescence quantitative PCR using SYBR Green I for *Gluconobacter* detection in fermented dairy products was established. The established method was then used for the specific detection of a panel of three *Gluconobacter* strains and 18 non-*Gluconobacter* strains, with the reliability of the results verified by agarose gel electrophoresis. The results showed that the primers were highly specific. Melting curve analysis of the PCR amplification product showed that primer dimers were present in the amplification product. However, nonspecific amplification could be excluded using the peak time of the melting curve. The standard curve based on *Gluconobacter* detection using the established method had good correlation (R^2 = 0.9968). The minimal detection limit was 75 CFU/mL in the sensitivity test. The established method also successfully detected *Gluconobacter* in five artificially contaminated samples. These results indicated that the SYBR Green I fluorescence quantitative PCR method used herein exhibited high sensitivity and was easy to use. Therefore, this method is suitable for the qualitative detection of *Gluconobacter* strains in fermented dairy products.

Key words: *Gluconobacter*; SYBR Green I; real-time quantitative polymerase chain reaction; detection; yogurt

葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)是一群革兰氏阴性，绝对好氧，有极生鞭毛、可运动或无运动动物产生致病的报道。葡糖杆菌属同醋杆性的细菌种群，常见于富糖环境[1]，目前未有对人及菌属（Acetobacter）都是醋酸菌科中较早发现并且研究的重要菌属，由于他氧化乙醇为乙酸的能力较弱而氧化葡萄糖生成多种衍生物的能力极强[2]，因此，在食品、医药、化工等行业有着广泛的应用。如葡糖杆菌属菌株参与维生素 C（抗坏血酸）及米格列醇的合成，在葡萄糖酸、L-山梨糖和二羟基丙酮的微生物合成中具有重要作用[3~5]。但是，葡糖杆菌造成的工业污染也不断被人们关注，葡糖杆菌可从葡萄果实或葡萄汁中分离出来，由于它们的需氧特性，醋酸细菌一般生长在葡萄酒的表面，

收稿日期：2014-08-20
基金项目：河北省食药局科技计划项目（PT2014030）
作者简介：李月华（1989-），女，硕士研究生，研究方向：有害微生物检测与控制
通讯作者：张岩（1979-），男，博士，教授级高级工程师，研究方向：食品安全；张伟（1963-），男，教授，硕士生导师，研究方向：微生物学与食品安全

呈现出一种半透明的膜状，引起红酒变质[6]；葡糖杆菌存在于成熟的水果中，引起水果的腐烂、霉变[7]；葡糖杆菌加快固态发酵食醋的返混速率，影响食醋的返混程度[8]。另外，近年来不断有报道指出，在污染的酸乳中可分离出醋酸菌，他是致使酸乳制品变色的原因[9]，降低酸乳的pH，导致酸乳过酸化，引起酸乳包装涨袋。目前对葡糖杆菌属的研究主要集中于针对其特性的分离筛选及其应用的研究，而对酸乳生产过程中葡糖杆菌污染的检测研究报道极少。因此，建立特异、灵敏的葡糖杆菌检测方法尤为重要。

实时荧光—聚合酶链反应(real-time PCR)，于1996年由美国 Applied Biosystems 公司推出，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，随着荧光信号的不断积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法[10]。根据荧光类型，QRT-PCR 可分为染料类、探针类和引物标记三种。由于探针类和引物标记类操作繁杂，价格昂贵，不利于应用推广，本研究采用染料类荧光 PCR。染料类是利用荧光染料 SYBR Green I 可嵌入双链 DNA 小沟中，与 DNA 结合发出荧光信号，指示扩增产物的增加，此方法成本较低且操作简单[11]。目前，SYBR Green I 实时荧光 PCR 方法在细菌检测[12~13]、病毒检测[14] 等多个方面得到广泛应用。

本研究对葡糖杆菌基因的保守区域设计引物，采用 SYBR Green I 荧光法建立了一种快速检测葡糖杆菌的方法，并对此方法的特异性和灵敏度进行了评价，建立了实时荧光标准曲线并成功检测出模拟样品中的葡糖杆菌，另外，本研究建立的检测方法仅需 3 h 即可完成检测，与分离鉴定传统方法比较，大大缩短了检测时间。对于酸乳饮品生产企业来说，此方法的应用能够快捷有效的检测出酸乳生产过程中的葡糖杆菌，找出解决方案，最大限度的减少由于葡糖杆菌污染带来的行业损失。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 主要仪器及试剂

电热恒温水浴锅，余姚市东方电工仪器厂；凝胶成像系统，Bio-Rad 公司；超净工作台，苏净安泰；水平电泳仪，北京市六一仪器厂；3K15 台式高速离心机，SIGMA；MIR254 型低温恒温培养箱，日本三洋株式会社；MS3 涡旋混匀器，IKA 公司；ABI7300 实时荧光PCR 仪，美国应用生物系统公司。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒，上海生工生物工程技术服务有限公司；SYBR Premix Ex Taq(RR420Q)购自 TAKARA 公司；10×PCR buffer、dNTPs、$MgCl_2$、Taq DNA ploymerase，购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.1.2 菌株

本研究所用 21 株菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心和中国普通微生物菌种保藏管理中心，这 21 株菌包括 3 葡糖杆菌、3 株醋化醋杆菌和 15 株非醋酸菌，株菌株编号及培养条件详见表 1。

表 1 实验所用菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

菌株编号	菌种名称	培养条件
CGMCC1.0637	氧化葡糖杆菌	28 ℃，需氧
CGMCC1.3748	泰国葡糖杆菌	28 ℃，需氧
CICC10357	葡萄糖杆菌	28 ℃，需氧
CICC21682	醋化醋杆菌	30 ℃，需氧
CICC22519	醋化醋杆菌	30 ℃，需氧
CICC21683	醋化醋杆菌	30 ℃，需氧
CICC21482	肠炎沙门氏菌	36 ℃，兼性厌氧
CICC10420	鼠伤寒沙门氏菌	37 ℃，兼性厌氧
CICC21560	阪崎肠杆菌	36 ℃，兼性厌氧
CICC21534	福氏志贺氏菌	36 ℃，兼性厌氧
CICC21600	金黄色葡萄球菌	37 ℃，兼性厌氧
CICC6224	鼠李糖乳杆菌	37 ℃
CICC6076	植物乳糖杆菌	37 ℃，厌氧
CICC6223	嗜热链球菌	37 ℃
CICC6077	德氏乳杆菌	37 ℃，厌氧
CICC6069	婴儿双歧杆菌	37 ℃，厌氧
CICC21633	单增李斯特细菌	37 ℃，兼性厌氧
CICC10389	大肠埃希氏菌	37 ℃，兼性厌氧
CICC21617	副溶血弧菌	30 ℃，兼性厌氧
CICC10041	蜡样芽胞杆菌	30 ℃，兼性厌氧
CICC21699	小肠结肠炎耶尔森氏菌	26 ℃，兼性厌氧

1.1.3 模板 DNA 的提取

将氧化葡糖杆菌接种于菌种保藏中心指示的无菌液体培养基中，28 ℃，200 r/min 摇床培养 48 h。采用平板计数法进行菌落计数，测定其纯培养物活菌浓度为 7.5×10^7 CFU/mL。

采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒法提取氧化葡糖杆菌的基因组 DNA，按照说明书进行操作，将提取的基因组 DNA 储存在-20 ℃备用。

1.1.4 引物设计

结合报道文献，针对葡糖杆菌 GenBank 中 16S rRNA.（X73820）的基因，选取特异性强的保守序列，用 Primer 5.0 进行 PCR 引物设计。并对引物进行

BLAST 分析，筛选得到一组特异性较强的引物，其上游引物为 5’-ACGCGCAGAACCTTACCA-3’，下游引物序列为 5’-TGACGTCATCCCCACCTTC-3’，扩增的目的片段大小为 220 bp。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光 PCR 反应体系

20 μL 的 QRT-PCR 体系如下：10 μL SYBR Premix Ex Taq(包括 DNA Taq 酶、Mg^{2+}、dNTP、SYBR Green I 和 Buffer)，10 μmol/L 的引物 F 和 B 各 0.4 μL，DNA 模板 2 μL，加灭菌蒸馏水补足至 20 μL。

反应程序：95 ℃预变性 1 min；95 ℃ 5 s，61 ℃ 31 s，共扩增 40 个循环。

熔解曲线制作程序：95 ℃ 15 s；60 ℃ 60 s；每循环增加退火温度 0.5 ℃，温度达 95 ℃时停止反应。

仪器自动分析阈值，以荧光信号线性化处理后对应循环数生成的曲线图呈“S”形，判定荧光 PCR 阳性结果。

1.2.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系：10×EasyTaq buffer 2.5 μL，1.0 mmol/L MgSO4，0.4 mmol/L dNTPs，10 μM 上下游引物各 1 μL，2.5 U 的 EasyTaq DNA polymerase，2 μL 的 DNA 模板并用灭菌双蒸水补足 25 μL 反应体系。

PCR 的反应程序：95 ℃预变性，5 min；94 ℃变性，45 s；56 ℃退火，45 s；72 ℃延伸，45 s。进行 30 个循环，72℃后延伸 10 min。PCR 反应产物 5 μL，与 1 μL 的 6×loading buffer 均匀混合，进行 2%琼脂糖凝胶电泳，观察电泳结果。

1.2.3 特异性检测

用表 1 所列的株菌过夜培养后提取基因组 DNA 进行 QRT-PCR 反应，检测特异性。并将反应后的扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳，验证其特异性的可靠性。

1.2.4 QRT-PCR 检测体系评价

取摇床培养后葡糖杆菌的菌悬液，用灭菌双蒸水逐级从 7.5×10^7 CFU/mL 稀释到 7.5 CFU/mL，按照试剂盒法提取葡糖杆菌的基因组 DNA，分别用 QRT-PCR 和普通 PCR 进行检测，确定 QRT-PCR 方法的灵敏度并与普通 PCR 进行比较，对 QRT-PCR 方法灵敏性进行评价；以不同稀释度的阳性模板为横坐标，以扩增过程中荧光信号的 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线，对 QRT-PCR 方法的相关性进行评价。

1.2.5 QRT-PCR 方法的初步应用

将购买的市售酸奶和酸乳饮料进行高压灭菌，无菌操作进行人工污染葡糖杆菌，用试剂盒法提取模板 DNA，按上述体系进行荧光 PCR 检测，通过样品的扩增曲线及 Ct 值判定结果。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

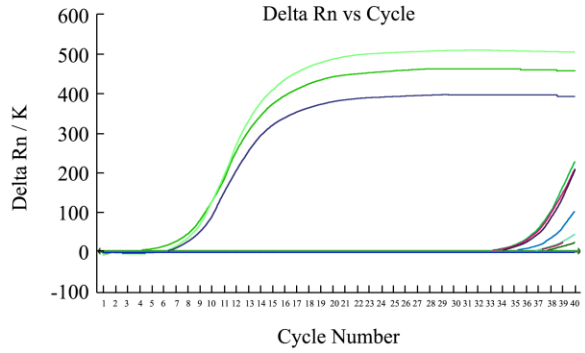


图 1 葡糖杆菌实时荧光定量 PCR 方法的特异性

Fig.1 Specificity of real-time quantitative fluorescence PCR for detecting *Gluconobacter*

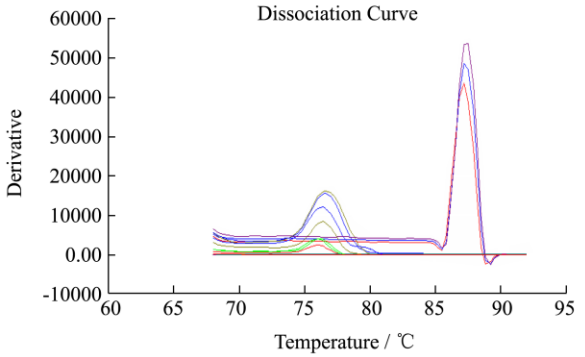


图 2 SYBR Green Ⅰ实时定量 PCR 溶解曲线

Fig.2 Melting curves for SYBR Green I-based real-time quantitative PCR

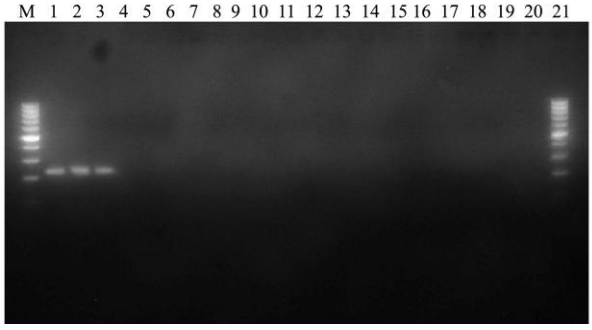


图 3 引物特异性电泳检测结果

Fig.3 Results of primer specificity tests by agarose gel electrophoresis

注：M-100bp DNA ladder marker;1-氧化葡萄糖杆菌（CGMCC1.0637）；2-泰国葡糖杆菌(CGMCC1.3748)；3-葡萄糖杆菌（CICC10357）；4-醋化醋杆菌1（CICC21682）；5-醋化醋杆菌2(CICC22519);6-醋化醋杆菌3（CICC21683）；7-肠炎沙门氏菌；

8-鼠伤寒沙门氏菌；9-阪崎肠杆菌；10-福氏志贺氏菌；11-金黄色葡糖球菌；12-鼠李糖乳杆菌；13-植物乳糖杆菌；14-嗜热链球菌；15-德氏乳杆菌；16-婴儿双歧杆菌；17-单增李斯特细菌；18-大肠埃希氏菌；19-副溶血弧菌；20-蜡样芽胞杆菌；21-小肠结肠炎耶尔森氏菌。

用 21 株供试菌株验证引物的特异性，图 1 表明 3 株葡糖杆菌呈现明显的“S”型曲线，判定为阳性扩增曲线，而其余 18 株非葡糖杆菌稍有扩增，无明显的“S”型曲线，可判定为阴性非特异性扩增。荧光定量 PCR 的溶解曲线图 2 表明，三株葡糖杆菌的的 Tm 为 87.2 ℃~87.5 ℃，其他菌株的非特异性扩增溶解曲线 Tm 值为 76 ℃~77 ℃。综上所述，本研究设计的引物具有强特异性。

将荧光 PCR 扩增结束后的产物进行电泳检测，如图 3 所示，3 株葡糖杆菌有扩增条带，大小为 220 bp 左右，而非葡糖杆菌无扩增条带，证实溶解曲线中的小波峰确实为非特异性扩增，结果同 QRT-PCR 分析一致，表明 QRT-PCR 方法特异性真实可靠。

2.2 灵敏度评价

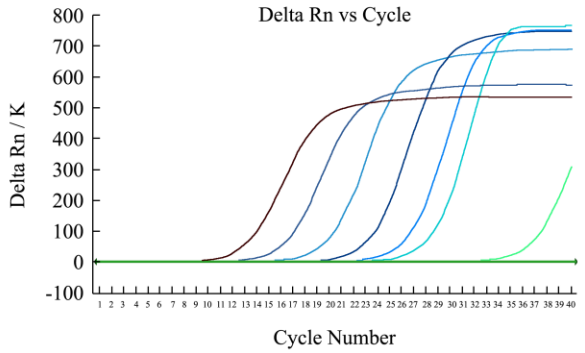


图 4 葡糖杆菌实时荧光 PCR 的灵敏度

Fig.4 Sensitivity of real-time florescence PCR for detecting *Gluconobacter*

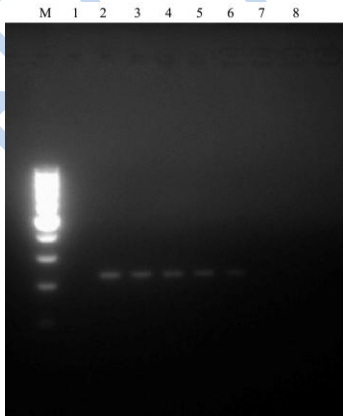


图 5 葡糖杆菌 PCR 检测灵敏度

Fig.5 Sensitivity of PCR for detecting *Gluconobacter*

注：M-100bp DNA ladder marker；1. negative control；2. 7.5 × 10^6 CFU/mL；3. 7.5 × 10^5 CFU/mL；4. 7.5 × 10^4 CFU/mL；5. 7.5 × 10^3 CFU/mL；6. 7.5 × 10^2 CFU/mL；7. 7.5 × 10^1 CFU/mL；8. 7.5 × 10^0 CFU/mL。

用葡糖杆菌梯度稀释后的菌液模板 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增。结果如图 4 所示，葡糖杆菌浓度为 7.5×10^1 cfu/mL 时荧光信号有“S”曲线，而稀释度为 7.5×10^0 cfu/mL 时无“S”曲线，表明 QRT-PCR 的灵敏度为 75 cfu/mL。图 5 表明，当纯菌的培养物浓度为 7.5×10^2 cfu/mL 时，普通 PCR 不再扩增出目的条带，其灵敏度为 7.5×10^2 cfu /mL。所以，实时荧光 PCR 检测葡糖杆菌的灵敏度是 PCR 方法的 10 倍。

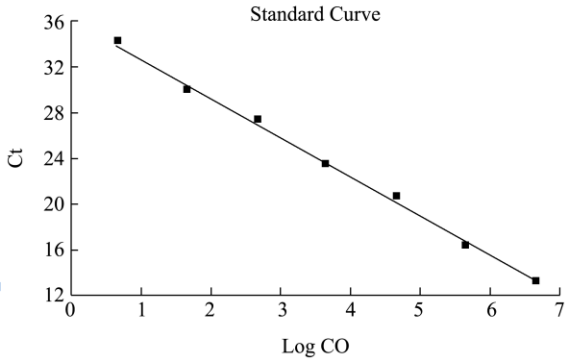


图 6 实时荧光 PCR 标准曲线

Fig.6 Standard curve for real-time florescence PCR

2.3 QRT-PCR 的标准曲线

利用建立的葡糖杆菌 QRT-PCR 反应体系对 7 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测，建立菌液浓度与 Ct 值对应关系的定量标准曲线(图 6)。结果显示，所生成的标准曲线的 Ct 值与菌液浓度之间的线性关系良好。其 R^2=0.9968，斜率为 - 3.4114，截距为 36.0338，线性方程为 Ct＝-3.411X+36.034。进行实际样品检测时，可根据 Ct 值获得相应的样品含菌量。

2.4 人工污染样品检测

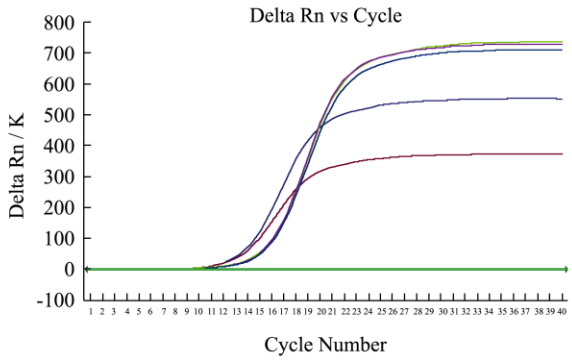


图 7 实时荧光 PCR 人工污染样品的检测

Fig.7 Evaluation of real-time quantitative florescence PCR with artificially contaminated samples

用本研究建立的 QRT-PCR 方法对人工污染的 2 种酸奶、3 种酸乳饮料进行检测，荧光 PCR 的 Ct 值与菌浓度之间的定量曲线参照图 5。结果显示，2 种酸奶的 Ct 值分别为 15.38 和 14.72；3 种酸乳饮料的 Ct 值分别为 13.67、13.49 和 14.02。5 个人工污染样品均呈现阳性反应，结果表明，本研究建立的荧光 PCR 具有较强的应用性。

3 结论

3.1 酸乳饮品制造业是食品行业中增长速度最快的行业之一，随着人们消费水平和营养健康知识的普及，酸乳饮品制造业得到迅速发展。但是由于葡糖杆菌的污染造成的酸乳变色、酸败、包装损坏等不利影响对酸乳饮品生产企业带来巨大的损失，因此，建立一种及时有效的检测酸乳中葡糖杆菌的方法对酸乳饮品生产企业具有重要的意义。

3.2 本研究建立的SYBR GreenⅠ染料法荧光PCR的原理是荧光染料可嵌入所有 DNA 双螺旋的小沟区域当中，并在检测光下发射荧光信号，达到实时监控荧光扩增反应的目的，因此染料法荧光 PCR 可应用于任何 PCR 扩增的反应体系当中，且相对于探针法及引物标记法来说燃料法在节省经费方面占很大优势，这对生产企业来说十分重要。然而，SYBR GreenⅠ能与任意 DNA 双链结合的特性可能由于产生非特异性片段（引物二聚体）而产生荧光信号，这是 SYBR GreenⅠ荧光PCR法的显著缺点，但可以通过设计高质量的引物、优化退火温度和分析溶解曲线特征峰来弥补这一缺点。

3.3 设计高质量的引物对基于普通 PCR 为基础发展起来的各种PCR技术都是至关重要的，尤其是SYBR GreenⅠ染料法荧光 PCR 技术。首先，设计引物时要选取高度保守的目的片段，保证引物的高特异性，可通过 Primer-BLAST 进行分析验证；其次，退火温度的优化对 PCR 反应的扩增效率也十分重要，本研究最终选取 61 ℃为最适退火温度；最后，所设计的引物要尽量减少形成引物二聚体，引物二聚体会影响对溶解曲线特征峰的判断，通常在溶解曲线上 75 ℃左右产生的小波峰被判定为引物二聚体，图 2 中 76 ℃时产生的小波峰即为引物二聚体。

3.4 本研究用SYBR GreenⅠ荧光PCR方法对酸乳中的葡糖杆菌进行了检测，一步完成PCR扩增与产物检测，简便快捷，避免了电泳检测产物因开盖引起的交叉污染。所建立的标准曲线相关性可达 0.99 以上，灵敏度为 75CFU/mL，通过与普通 PCR 方法的比较，证实了该方法检测葡糖杆菌的灵敏度较高，并且可准确的检测出人工污染酸乳制品中的葡糖杆菌。综上所述，本研究建立的葡糖杆菌 SYBR GreenⅠ荧光 PCR 检测方法，可以定量检测葡糖杆菌，检测周期短，特异性强灵敏度高，可以满足酸乳企业的质量要求对微生物控制的检测需要。

参考文献

[1] T Asai. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria [J]. J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1935, 11: 674-708

[2] 冯静,施庆珊,欧阳友生,等.葡糖杆菌属分类及其主要应用的研究进展[J].微生物学杂志,2010,30(2):86-90
FENG Jing, SHI Qing-shan, OUYANG You-sheng, et al. Advance in classification and main application of *Gluconobacter* [J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(2): 86-90

[3] C Claret, JM Salmon, C Romieu, et al. Physiology of *Gluconobacter* oxydans during dihydroxyacetone production from glycerol [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 41(3): 359-365

[4] MUYNCK C D, PEREIRA C S, NAESSENS M, et al. The genus *Gluconobacter oxydans:* Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications [J]. Crit. Rev. Biotechnol., 2007, 27(3): 147-171

[5] J Tkac, M Navratil, E Sturdik, et al. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(4-5): 383-388

[6] 翁鸿珍,成宇峰.葡萄酒的微生物病害[J].酿酒科技, 2011, 8:132-135
WENG Hong-zhen, CHENG Yu-feng. Study on microbial disease of grape wine [J]. Liquor Making Science Technology, 2011, 8: 132-135

[7] 黄应维,徐匆,马锞,等.果蔬微生物保鲜技术的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(6):1455-1458
HUANG Ying-wei, XU Cong, MA Ke, et al. Application of microbial preservation technology in fruit and vegetable preservation [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1455-1458

[8] 崔云,卢红梅,张义明,等.食醋中微生物的分离与鉴定[J].中国酿造,2008,22: 29-31

[9] CUI Yun, LU Hong-mei, ZHANG Yi-ming, et al. Microbial separation and identification in the vinegar [J]. China

Brewing, 2008, 22: 29-31

[10] 张红发,王荫榆.酸乳饮料变色原因研究[J].乳业科学与技术,2008,2:70-72
ZHANG Hong-fa, WANG Yin-yu. The research on the color deterioration of the yogurt drink [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2008, 2: 70-72

[11] Rudi K, Nogva HK , Moen B, et al. Development and application of new nucleic acid- based technologies for microbial community analyses in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 171-180

[12] 童睿,张媛,郑秋月,等.食品中乳酸杆菌的实时荧光 PCR 的快速检测[J].现代食品科技,2008,24(1):86-88
TONG Rui, ZHANG Yuan, ZHENG Qiu-yue, et al. Rapid detection of lactobacillus in food by real-time PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(1): 86-88

[13] MANDAL P K, BISWAS A K, CHOI K, et al. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview [J]. Am J Food Technol, 2011, 6(2): 87-102

[14] CHEN Jing, ZHANG Lida, PAOLI G C, et al. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella* enterica from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(2/3): 168-174

[15] Alia Yacoub, Mikael Leijon, Michael J. McMenamy et al. Development of a novel real-time PCR-based strategy for simple and rapid molecular pathotyping of Newcastle disease virus[J]. Archives of Virology, 2012, 157(5): 833-844

现代食品科技