

食品中乳酸杆菌的实时荧光 PCR 的快速检测

童睿¹, 张媛¹, 郑秋月², 谢明杰¹, 曹际娟²

(1. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029) (2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116015)

摘要: 本文运用实时荧光 PCR (Real-time PCR) 技术建立了对食品中常见的乳酸杆菌进行检测的快速方法。针对乳酸杆菌 16S rDNA 序列, 设计了通用引物和特异性探针, 进行 TaqManTM 实时 PCR 检测, 以非同源性参考菌株做特异性检测; 把乳酸杆菌菌株稀释成不同梯度, 做灵敏度检测。实验结果表明用实时荧光 PCR 法检测乳酸杆菌, 快速、敏感、特异性高。

关键词: 食品; 乳酸杆菌; 实时荧光 PCR; 检测

中图分类号: TS207.4; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0086-03

Rapid Detection of *Lactobacillus* in Food by Real-time PCR

TONG Rui¹, ZHANG Yuan¹, ZHENG Qiu-yue², XIE Ming-jie¹, CAO Ji-juan²

(1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

(2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

Abstract: In this article, we established a rapid method for detection of *Lactobacillus* in food using real-time PCR technique. General primers and specific probes were designed to detect the 16S rDNA sequence of *Lactobacillus* by TaqManTM real-time PCR assays using non-homologous strains for specific test. The results indicated this method was rapid, sensitive and with high specificity for the detection of *Lactobacillus* in food.

Key words: food; *Lactobacillus*; real-time PCR; detection

乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 广泛存在于乳制品 (如乳酪、酸奶) 中。某些乳酸杆菌如嗜酸乳酸杆菌、保加利亚乳杆菌, 常用于饮料等发酵工业。也有些常用于生物检定, 如乳酪乳杆菌被广泛应用于各种维生素 B 和各种氨基酸的检定、李氏乳杆菌用于维生素 B₁₂ 的微生物学检定。而有一些乳酸菌, 特别是乳杆菌可以在含酒花物质的啤酒中生长, 是啤酒腐败的主要细菌。

由于 16S rDNA 序列的高度保守性, 现代微生物中利用 16S rDNA 序列来鉴定微生物的种类已被广泛运用。郑飞云等人根据细菌 16S rDNA 序列的特点, 设计合成了针对啤酒污染乳酸杆菌的引物^[2]。国外已将 real-time PCR 技术应用于乳酸菌的检测和控制, 然而在国内, 相关的研究却相对较少^[3-5]。本文根据乳酸杆菌 16S rDNA 序列的特征, 设计合成了针对乳酸杆菌的引物和 Taqman 探针, 验证了 real-time PCR 方法在乳酸杆菌鉴定中的高度特异性、灵敏性、以及简便、快速、准确的优点。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-09-24

作者简介: 童睿(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物检测

1.1 微生物菌株

本研究所用植物乳酸杆菌、干酪乳酸杆菌、保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌标准菌株购自北京兰伯瑞生物技术有限公司; 其他菌株均为本实验室分离得到。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器

ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR 基因扩增仪; 台式高速离心机; 恒温振荡器; 厌氧罐。

1.2.2 试剂

MRS 培养基、TJA 培养基等; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒及 Premix Ex TaqTM 等试剂 (大连宝生物工程有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 细菌的培养和基因组 DNA 的抽提

将菌株接种于 20 mL MRS 液体培养基中, 分别在有氧和厌氧条件下, 于 37 °C 恒温培养 48±3 h, 以提高细菌检出率。

采用宝生物工程 (大连) 有限公司生产的 DNA 提取试剂盒 (货号 D9093), 按其操作说明提取细菌基因组 DNA。

1.3.2 实时荧光 PCR

1.3.2.1 引物和探针的设计

通过乳酸杆菌属的 16S rDNA 序列进行同源性比较,发现它们之间具有很高的同源性。运用 ABI 的 Primer Express 及 DNASTAR 中的 PrimerSelect 软件,在同源性较高的区域选择设计了乳酸杆菌的通用引物及探针:

(1) 引物序列,正向引物 5'-AGCGAAGGATATGGAGAGTAGAAATACT-3';反向引物 5'-CGGTTT TTT GCTTGATTATATTCA-3。

(2) 探针: 5'-CCAGAGCAAGCGGAAGCACACTAAGAAAC-3'。本研究的引物和探针由宝生物工程(大连)有限公司合成。其中探针的 5'端标记 FAM, 3'端标记 TAMRA。

1.3.2.2 反应体系

Premix Ex Taq™ (2×) 12.5 μL, 10 μmol/L 引物各 0.5 μL, 10 μmol/L 荧光探针溶液 1 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 加灭菌双蒸水使总体积为 25 μL。

1.3.2.3 反应条件

95 °C, 预变性 10 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 34 s, 40 个循环。

1.3.2.4 结果判断

(1) 循环阈值(cycle threshold, Ct 值)≤35, 表明 PCR 过程中有目标 DNA 扩增, 可直接判定为阳性;

(2) 待检样基因检测 Ct 值在 36~40 之间, 应重做实时荧光 PCR 扩增; 再次扩增后的外源基因 Ct 值仍小于 40, 且曲线有明显的对数增长期, 并且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常, 则可判定为阳性; 再次扩增后外源基因 Ct 值大于 40, 且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常, 可判定为阴性。

1.3.3 灵敏度试验

取乳酸杆菌标准菌株分别于选择性培养基中培养一定时间, 测其 A 值, 估计其菌数, 然后按 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 的倍数稀释, 取最后几个梯度的菌液涂平板计数, 重复 3 次, 取其平均值确定其真实的菌密度。同时每个梯度菌液各取 3 管进行荧光 PCR 检测, 将检测结果与平板计数结果比较, 确定反应体系的灵敏度。

1.3.4 特异性试验

乳酸杆菌标准菌株及大肠杆菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、浦那沙门、金黄色葡萄球菌、单增李斯特、福氏志贺菌、弗地劳枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、耶尔森产气肠杆菌分别在肉汤增菌液中培养, 提取细菌 DNA, 把以上几种细菌 DNA 等量混合, 进行实时荧光 PCR, 检验方法的特异性。

2 结果与分析

2.1 灵敏度试验结果

2.1.1 植物乳杆菌灵敏度试验结果

如图 1 所示, 图中由左至右与基线相交的阳性扩增线分别表示: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 稀释梯度。由图 1 可见, 荧光 PCR 可检出至 10^{-6} 梯度, 根据平板计数可得出检测的浓度为 83 CFU/mL。

2.1.2 干酪乳杆菌灵敏度试验结果

如图 2 所示, 图中由左至右与基线相交的阳性扩增线分别表示: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 稀释梯度。由图 2 可见, 荧光 PCR 可检出至 10^{-6} 梯度, 根据平板计数可得出检测的浓度为 100 CFU/mL。

2.1.3 保加利亚乳杆菌灵敏度试验结果

如图 3 所示, 图中由左至右与基线相交的阳性扩增线分别表示: 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释梯度。由图 3 可见, 荧光 PCR 可检出至 10^{-7} 梯度, 根据平板计数可得出检测的浓度为 40 CFU/mL。

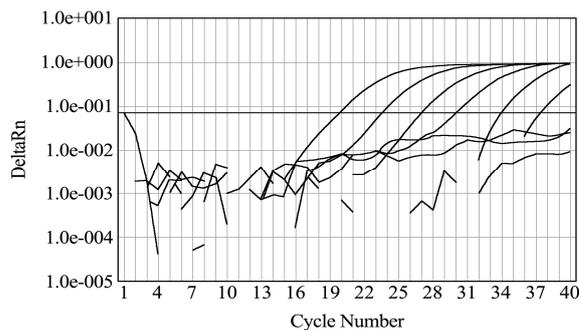


图 1 植物乳杆菌实时荧光 PCR 灵敏度试验结果

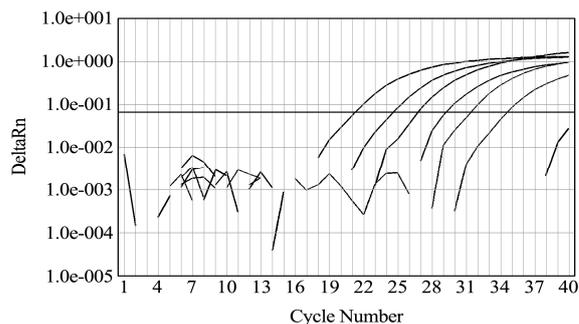


图 2 干酪乳杆菌实时荧光 PCR 灵敏度试验结果

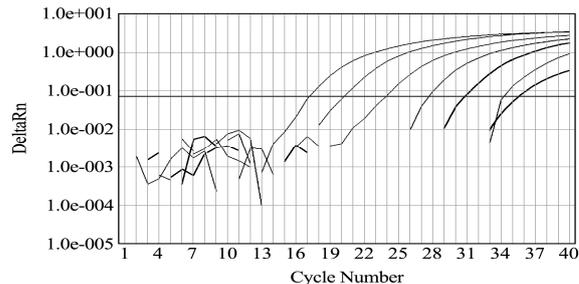


图 3 保加利亚乳杆菌实时荧光 PCR 灵敏度试验结果

2.2 特异性实验结果

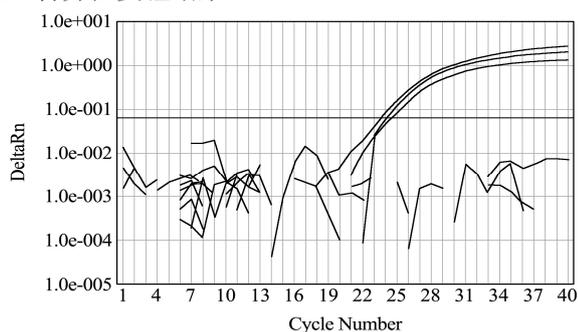


图4 乳酸杆菌实时荧光PCR特异性试验结果

从图4可以看出,乳酸杆菌到了扩增,而所有非乳酸杆菌均没有检测到荧光信号,说明实时荧光PCR在检测乳酸杆菌方面均具有很好的特异性。

3 讨论

目前常用的检测方法是厌氧平板培养法,即待长出菌落后用肉眼直观检测。乳酸杆菌属细胞形态多样,从长的和细长状到弯曲形及短杆,也常有挥形球杆状,一般形成链^[1]。通常不运动,运动者则具有周生鞭毛。无芽孢,革兰氏染色阳性。这种方法最大的缺陷是费时,5~7 d才可看到结果,不能够及时反馈微生物的污染状况。乳酸杆菌属细菌营养要求复杂,培养特性比较特殊,而且传统平板培养生长缓慢,分离培养鉴定周期约需7~9 d,因此建立快速检测和鉴定乳酸杆菌的检验方法势在必行。

传统PCR方法一直面临着两大难题,即PCR的假阳性污染和定量的准确度。近年来出现的实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR)技术克服了这两大难题,实现了PCR从定性到定量的飞跃,它以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、

全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具。

乳酸杆菌属中已被描述的有56个种,根据这一特点本文设计了扩增乳酸杆菌属各种乳酸杆菌的通用引物。在实时荧光PCR中,使用乳酸杆菌通用引物,乳酸杆菌种出现特异性扩增,非乳酸杆菌都未出现特异性扩增,结果证明本实验所设计引物和探针具有很高的特异性,只特异性扩增乳酸杆菌。

实验结果表明,建立荧光PCR检测乳酸杆菌的方法准确、可靠、实用性强,是检验食品中乳酸杆菌技术水平的一次飞跃。本文所建立的检测方法对今后乳酸杆菌的检测、鉴定具有广阔发展前景,为更大规模的使用奠定可靠的理论与技术基础。

参考文献

- [1] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.12
- [2] 郑飞云,金建中,顾国贤.啤酒污染乳酸菌PCR引物的设计[J].酿酒,2002,29(2):44-47
- [3] Dubernet,Nathalie Desmasure.A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level.FEMS Microbiology Letters[J]. 2002,214(2):271-275
- [4] Bele'n Marti'n,Anna Jofre'.Rapid Quantitative Detection of *Lactobacillus sakei* in Meat and Fermented Sausages by Real-Time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006(10):6040-6048
- [5] Monique Haarman and Jan Knol. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006(4): 2359-2365

(上接第71页)

添加量小于0.25%时,产品分值随柠檬酸添加量的增大而提高;但当柠檬酸添加量大于0.25%时,产品分值随柠檬酸添加量增加呈下降趋势。白砂糖添加量由5%增加至15%,产品分值呈上升趋势,而由5%增加至15%时,产品分值则呈下降趋势。

综合采用下列的工艺条件:卡拉胶添加量为0.8%、白砂糖添加量为15%、鹌鹑蛋添加量为15%、柠檬酸添加量为0.25%时,可得产品质地、色香味均佳的鹌鹑蛋果冻。

参考文献

- [1] 马美湖.我国蛋品工业科技的发展[J].中国家禽,2000,2(4):1-5
- [2] 张德福.国外鹌鹑肉蛋加工方法的研究概况[J].禽产品加工与利用,1994,(4):36-37
- [3] 黄建初,李崇高,苦瓜保健果冻工艺技术的研究[J].现代食品科技,2005,21(1):52-78
- [4] 徐志丽,吴晖.卡拉胶的流变性能[J].广州食品工业科技,2004,20(3):153-155