

地衣芽孢杆菌的双位点荧光原位杂交检测

吴茗花¹, 朱小颖¹, 邓锐杰¹, 罗爱民^{1*}, 王西², 王鼎³

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065) (2. 四川郎酒股份有限公司, 四川泸州 646500)

(3. 四川宜府春酒厂有限责任公司, 四川成都 610065)

摘要: 为了研究芽孢杆菌荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 检测的影响因素, 该实验以地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 为研究对象, 分析了不同探针、菌体预处理方式、细胞通透化处理条件及杂交条件对 FISH 检测结果的影响, 并进一步对选出来的探针进行特异性检测。结果表明, 在设计的探针中有两个可以特异性识别地衣芽孢杆菌, 且使用双探针检测比单探针荧光效果更好, 提高 1.54 倍灰度值; 当反应条件为超声分散菌体时间 120 s、溶菌酶处理 40 min、杂交时间为 6 h、甲酰胺浓度为 30% 时检测结果最佳, 其灰度值为 41.16、菌体检出率为 96.35%; 特异性检测表明该方法可以特异性识别地衣芽孢杆菌。该研究建立了一种操作简单的地衣芽孢杆菌的双位点荧光原位杂交检测方法, 无需核酸提取及扩增, 且具有较强特异性。

关键词: 荧光原位杂交; 地衣芽孢杆菌; 双位点

文章编号: 1673-9078(2022)06-318-326

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0958

Study on Detection of *Bacillus licheniformis* by Two-site Fluorescence in Situ Hybridization

WU Minghua¹, ZHU Xiaoying¹, DENG Ruijie¹, LUO Aimin^{1*}, WANG Xi², WANG Ding³

(1. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China) (2. Sichuan Langjiu Distillery Co. Ltd., Luzhou 646500, China) (3. Sichuan Yifuchun Winery Co. Ltd., Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to investigate the affecting factors of fluorescence in situ hybridization (FISH) on *Bacillus*, this work used *Bacillus licheniformis* as its research object. It analyzed the effects of different probes, strain pretreatments, strain permeability treatments, and hybridization conditions on the detection results of FISH, and further detected the specificity of the selected probes. The results showed that two of the designed probes could identify *Bacillus licheniformis*; specifically, the two probes exhibited a better fluorescence effect than a single probe, having 1.54 times higher pixel intensity. The reaction conditions were the following: ultrasonic dispersing time, 120 s; lysozyme treatment, 40 min; hybridization time, 6 h; formamide concentration 30%. Consequently, the detection result was the best, producing a gray value of 41.16 and a detection rate of 96.35%. The specificity detections determined that the said method could specifically recognize *Bacillus licheniformis*. A relatively simple two-site fluorescence in situ hybridization approach was established to detect *Bacillus licheniformis*, with strong specificity without nucleic acid extraction and amplification.

Key words: fluorescence in situ hybridization; *Bacillus licheniformis*; two-side

引文格式:

吴茗花, 朱小颖, 邓锐杰, 等. 地衣芽孢杆菌的双位点荧光原位杂交检测[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 318-326

WU Minghua, ZHU Xiaoying, DENG Ruijie, et al. Study on detection of *Bacillus licheniformis* by two-site fluorescence in situ hybridization [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 318-326

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是一种公

收稿日期: 2021-08-26

基金项目: 川大泸州项目 (2020CDLZ-3-SCU); 川大泸州战略合作项目 (2019CDLZ-02)

作者简介: 吴茗花 (1996-), 女, 研究生, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 1375043810@qq.com

通讯作者: 罗爱民 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 599159632@qq.com

认安全的细菌菌株, 为革兰氏阳性嗜热细菌, 其具有合成 2,3-丁二醇的巨大潜力, 从而促进四甲基吡嗪的生成^[1]。地衣芽孢杆菌在大曲制备过程中具有水解原料中淀粉以及分解蛋白质的能力, 有利于原料的分解利用, 能够产生独特的大曲风味, 提高大曲香气的饱满度, 生成酒体的芳香类物质, 对白酒的风味提供香味物质^[2-4]。目前, 地衣芽孢杆菌的检测方法主要为统计数法、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction,

PCR)和高通量检测等^[5,6]。传统计数法,操作繁琐,检测周期长,容易受到环境杂菌的污染;PCR扩增与高通量检测具有效率高、成本低等特点,但是需要提取细菌DNA,且无法直接观察其细菌形态。

荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)是指利用荧光标记已知序列的核酸碱基,根据碱基互补配对原则,特异性探针会识别目标核酸并进行杂交,通过荧光激发产生荧光信号^[7]。FISH广泛应用于遗传学分析^[8-10]、临床医学^[11-14]、微生物群落^[15,16]等领域,在微生物学领域的应用主要是在复杂环境中微生物种群的鉴定、定量和表征^[17]。荧光原位杂交常用的探针主要分为肽核酸探针(PNA)和寡核苷酸探针^[18]。肽核酸探针具有优异的特异序列识别能力,不带电荷,因此可以与DNA和RNA特异性结合,具有很高的杂交稳定性,但是其水溶性较差,细胞通透性不强,设计复杂且价格昂贵^[19],因此主要用于致病菌的检测^[20,21]。寡核苷酸探针虽然特异性和灵敏度较低,杂交条件复杂,但是也可以与靶标序列特异性结合,操作简单且价格便宜,因此,大部分研究都使用寡核苷酸探针进行非致病微生物的检测^[22-25]。Posada等^[22]利用FISH对许多作物的植物生长促进细菌枯草芽孢杆菌(PGPB)进行鉴定,根据16S rRNA设计的探针可以特异性识别枯草芽孢杆菌,与其他近缘杆菌无法杂交产生荧光。Geneviève等^[23]首次建立了快速有效的FISH检测芽孢杆菌孢子的方法,可应用于1h内原位标记的芽孢杆菌研究,并且可以有效检测在混合细胞群。Zhang等^[24]将分子信标与荧光原位杂交结合快速和直接检测阳性血液培养中的金黄色葡萄球菌,该方法具有较强的特异性和高灵敏度,可用于阳性血培养中的金黄色葡萄球菌;吴冬梅等^[7,25]先后利用FISH对窖泥微生物群落和纯培养的微生物进行检测,该方法可视化定量表征了窖泥中细菌和古菌的特征,且在优化杂交体系后提高FISH计数的准确性,为其在今后的微生物检测奠定基础。因此,荧光原位杂交与传统微生物计数方法和PCR相比,其操作简单,检测周期短,不需要进行扩增以及核酸提取,可以观察到完整的细菌形态,从而避免了外界污染造成的假阳性和假阴性的结果^[26]。但是在大量的研究中发现,FISH虽然可以实现可视化检测,但是不同的检测对象可视化程度差异较大,其特异性探针杂交情况容易受到溶菌酶浓度、杂交时间、去离子甲酰胺浓度等影响,导致荧光信号不稳定^[27,28]。

因此本实验以纯培养地衣芽孢杆菌为研究对象,探究纯培养微生物FISH检测的荧光探针的选择、菌体分散方式、细胞通透性、杂交条件等影响因素,对

探针特异性进行检验,以期白酒生产过程中不同发酵过程中微生物的荧光原位杂交检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 微生物菌株

七株芽孢杆菌,其中包括地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、沙式类芽孢杆菌、嗜气芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌,三株酵母菌,其中包括热带假丝酵母、毕赤酵母、埃切假丝酵母;三株其他菌株,其中包括嗜盐四联球菌、根霉属、肠沙门氏菌肠炎亚种,其中肠沙门氏菌肠炎亚种购买自中国工业微生物菌种保藏管理中心,菌种编号CICC 22956,其余菌株均保藏于四川大学纺工楼513实验室,-20℃磁珠法保藏。

1.2 主要试剂及仪器

试剂:多聚赖氨酸溶液(L型)(分子量>15000 u)、PBS缓冲液、PBS-T缓冲液、曲拉通X-100、盖玻片(24×60 mm,厚度0.13~0.17 mm)、抗荧光猝灭封片剂、溶菌酶(>20000 U/mg)、4%多聚甲醛、去离子甲酰胺溶液均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;荧光探针,序列如表1所示,5'端分别修饰CY3和FAM,HPLC纯化,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;无水乙醇,购自成都金山化学试剂厂;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(分析纯),购自海门碧云天生物技术有限公司;20X SSC溶液购自北京索莱宝科技有限公司;DTT(0.1 mol/L)、RiboLockRnase Inhibitor、Yeast tRNA均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;所有溶液采用分子生物级水配制,购自美国康宁(纽约)有限公司。

仪器:Ti2-U倒置荧光显微镜,日本Nikon公司;分析软件NIS-Elements Analysis;D3024R台式高速冷冻型微量离心机,美国SCIOLOGEX(赛洛捷克);THZ-98AB恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;DSX-30L-I手提式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;数显超声波清洗机,广州繁花科技有限公司等。

1.3 培养基

所需的培养基包括:LB培养基、MRS培养基、BHI培养基、PDA培养基、YPD培养基,高温高压灭菌后使用。

表1 探针序列

Table 1 Sequences of probes

名称	探针 (5-3)	5 端修饰	来源
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Cy3	Amann et al.(1990) ^[29]
P1	CGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCAATTGTA	FAM	本研究
P2	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG	FAM	本研究
P3	TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG	FAM	本研究
P4	CGTTGCGGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATG	FAM	本研究
随机探针	ATGTTACCCGTCTTGTTCCTCCGTCGCTTCGGC	FAM	本研究

1.4 探针的设计与验证

FISH 探针的设计是在 NCBI 的网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索地衣芽孢杆菌的 16S rRNA 的基因, 用 Primer Premier5 软件进行探针的设计, 如表 1 所示。根据探针设计原则, 选出四个长度合适、二级结构较少、GC 含量在 40%~60% 的探针用于实验。为了验证探针的敏感度和特异性, 用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对探针进行了验证。BLAST 搜索发现, 所设计的探针具有较高的特异性。

1.5 实验方法

1.5.1 地衣芽孢杆菌生长曲线的测定

将保存于斜面固态培养基的地衣芽孢杆菌接一环于液态 LB 培养基中, 37 °C, 140 r/min, 振荡培养。对其不同生长时期的吸光度值 (即 OD 值) 进行测定, 以无菌的液体培养基作为空白对照, 在 600 nm 波长下用光程 1 cm 的比色皿通过比浊法测定地衣芽孢杆菌不同生长时期的培养液的 OD 值。分别于 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52 h 取出 3 mL 菌液, 测定其在 600 nm 波长下的 OD 值, 每个时间点重复三次取平均值。

1.5.2 样品的处理

取在 37 °C、140 r/min 活化 24 h 的地衣芽孢杆菌菌液 1 mL, 2000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液。加入 1 mL 的 PBS 溶液, 混匀, 5000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 收集菌体。最后再加入 0.5 mL 的 PBS 溶液, 混匀, 放置 4 °C 冰箱中待用。

取 20 μL 菌液滴在多聚赖氨酸涂层载玻片上, 0.5 h, 加入 100 μL PBS 和 300 μL 4% 多聚甲醛固定 0.5~1 h, 结束后用 PBS 洗涤两次。加入 10 mg/mL 溶菌酶在 37 °C 下反应 20 min, 使细胞膜通透, 再加入 5% 的曲拉通 X-100, 反应 5 min。用 70%、90%、100% 乙醇进行梯度脱水, 每次反应 2 min, 自然风干即可进行荧光原位杂交。

加入 20 μL 的杂交液, 其中包括 2 μL 荧光探针 (10 μmol/L), 2 μL 20 x SSC 缓冲液, 1 μL DTT (100 nmol/L), 0.5 μL RibolockRnase Inhibitor (40 U/μL), 2 μL yeast tRNA (10 mg/mL), 4 μL 去离子甲酰胺溶液, 10.5 μL RNase-free H₂O。加入杂交液之后盖膜, 避光杂交过夜, 该过程保持湿润的反应环境, 避免因过于干燥而引起的非特异性杂交。

杂交反应结束, 用 PBS-T 在室温下清洗两次, 加入 20 μL 的 3% DAPI 溶液进行非特异性染色, 盖膜, 避光染色 10 min。反应结束用 PBS-T 在室温下清洗两次, 避光空气干燥, 加入抗荧光猝灭剂封片。选择绿光激发 (WG 534~558 nm)、蓝光激发 (WB 420~485 nm) 及紫外激发 (WU 330~400 nm) 滤光片, 随机拍摄 5 个视野, 对照样品拍摄 2 个视野, 对视野进行荧光光点计数。

1.5.3 条件优化

1.5.2.1 特异性探针的选择

将已经处理好的处于稳定期的菌液进行避光原位荧光杂交, 加入 20 μL 的杂交液, 其中, 荧光探针分别加入 EUB338、P1、P2、P3、P4 和随机探针, 在 37 °C 下进行原位杂交, 通过观察其 FISH 检测结果分析其特异性。

1.5.2.2 菌体分散形式的优化

稳定期的菌体用 4% 多聚甲醛固定, 探讨在不同超声时间对菌体分散的影响, 涡旋振荡后超声波处理, 超声功率为 100 W, 温度为 20 °C, 超声时间分别为: 0 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s, 间隔 30 s 超停一次, 取 20 μL 的菌液进行原位杂交, 观察 FISH 检测结果。

1.5.2.3 细胞通透性对 FISH 检测的影响

以地衣芽孢杆菌为研究对象, 加入 20 μL 的溶菌酶 (10 mg/mL), 在 37 °C 条件下分别对稳定期菌体处理 0 min、20 min、40 min、60 min, 然后进行原位杂交, 观察 FISH 检测效果, 计算其菌体检出率^[1]:

$$R = \frac{FISHC}{DMC}$$

式中:

R ——待测样品的菌体检出率;

$FISHC$ ——蓝光激发下绿色荧光光点数目;

DMC ——显微镜直接计数菌液菌体数目。

1.5.2.4 杂交条件的优化

针对杂交条件(杂交时间及甲酰胺浓度)固定某一个因素,改变另外一个因素进行实验,然后进行原位杂交后 FISH 计数(FISHC)。杂交时间分别为 0、2、4、6、8 h,去离子甲酰胺浓度分别为 0%、10%、20%、30%、40%,同时计算菌体检出率。

1.5.2.5 特异性检测

使用特异性探针、EUB338 细菌通用探针和 DAPI 染料对七株芽孢杆菌、三株酵母菌、三株其他菌株共 13 株菌株进行检测,观察 FISH 检测效果。

1.6 数据处理

利用 NIS-Elements Analysis、ImageJ、OriginPro 8.5 分析软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 地衣芽孢杆菌生长曲线

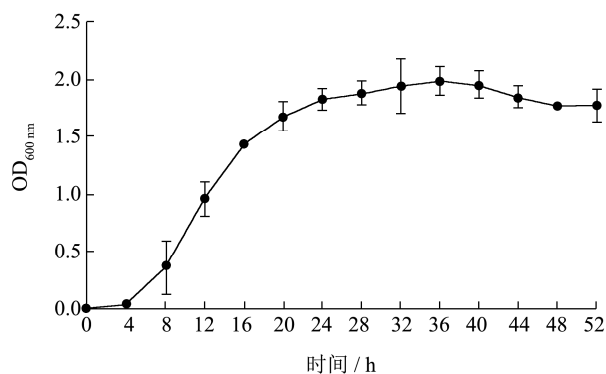


图1 地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *bacillus licheniformis*

由图1可知,地衣芽孢杆菌的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值随发酵时间增加呈逐步上升的趋势, $OD_{600\text{ nm}}$ 值由0增加至2左右。当发酵时间为0~4 h时, $OD_{600\text{ nm}}$ 值几乎没有变化,处于地衣芽孢杆菌的延滞期,主要是由于菌株接种到新的培养基中需要缓慢适应生长环境,吸收培养基中的营养物质从而开始生长繁殖。当发酵时间为4~24 h时, $OD_{600\text{ nm}}$ 值急剧增加,处于地衣芽孢杆菌的对数生长期,主要是因为菌株已经适应了培养基的环境,开始指数增长,不断的吸收周围的营养物质生长繁殖。当发酵时间为24~40 h时, $OD_{600\text{ nm}}$ 值增加缓慢,趋于平稳,处于地衣芽孢杆菌的稳定期,主要原因可能是因为菌株的大量生长繁殖大量消耗培养基中

的营养物质,导致营养物质的缺乏,产生大量的代谢产物,因此培养基不适宜繁殖生长。当发酵时间为40~52 h时, $OD_{600\text{ nm}}$ 值开始缓慢下降,处于地衣芽孢杆菌的衰亡期,菌株不再生长,开始衰亡。综上所述,地衣芽孢杆菌在0~4 h处于生长迟缓期,4~24 h处于对数生长期,24~40 h处于稳定期,40~52 h处于衰亡期。

2.2 探针的选择

如图2所示,由2a~2e可知,通用探针可对所有的细菌进行染色^[23],P1、P2可对地衣芽孢杆菌进行特异性染色,P3、P4无法染色,原因可能是因为探针序列长度较长,且二级结构比较复杂,因此无法与目标序列特异性杂交。从2f的染色情况可知,设计的随机探针其无法与地衣芽孢杆菌杂交,且对其修饰的FAM荧光基团不可以附着在细菌表面,从而造成假阳性结果。由图2g可知,在DAPI染料处理下,所有具有细胞核的真核细胞都能被DAPI穿透细胞膜与细胞核中的双链DNA结合而发出荧光^[30]。由2h可知,当体系中只含有地衣芽孢杆菌时是无法产生任何荧光,说明菌体本身不自带荧光,以及实验中使用的其他化学试剂是不含荧光。因此,该方法设计的探针P1、P2针对地衣芽孢杆菌具有一定的特异性。

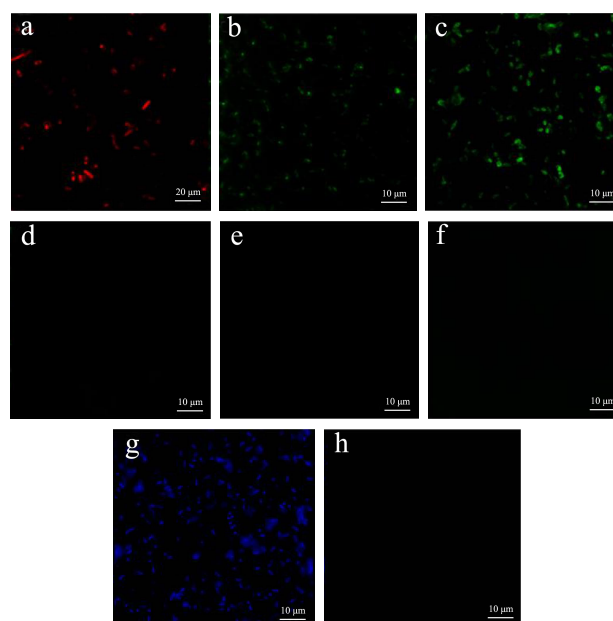


图2 不同探针下地衣芽孢杆菌的荧光染色情况

Fig.2 Fluorescence staining of *Bacillus licheniformis* under different probes

注: a: 细菌通用探针 EUB338; b: P1 探针; c: P2 探针; d: P3 探针; e: P4 探针; f: 随机探针; g: DAPI 染料; h: 空白组; 未添加任何探针。放大倍数: 1500 \times , 标尺 10 μm 。

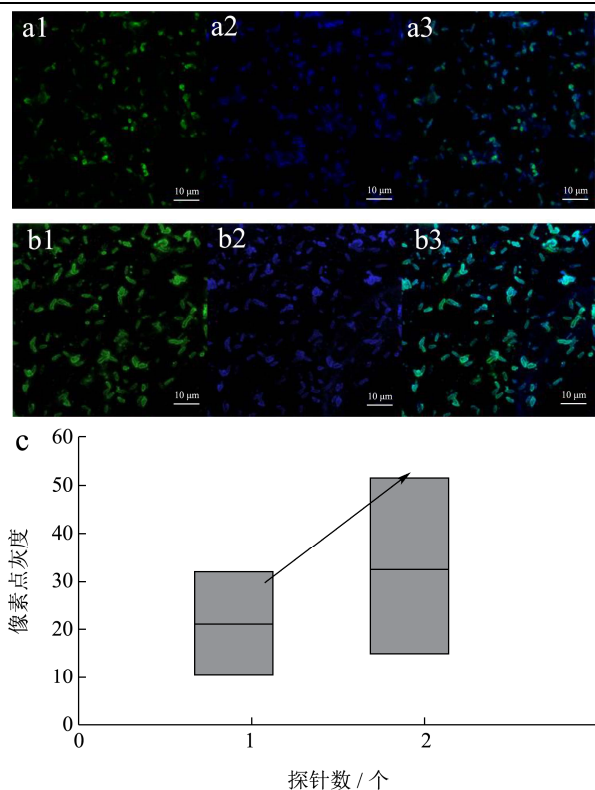


图3 单探针和双探针下地衣芽孢杆菌的荧光染色情况

Fig.3 Fluorescent staining of *Bacillus licheniformis* under single and double probes

注: a: P1 探针 (a1 为 P1 的特异性绿色荧光, a2 为 DAPI 的通用性蓝色荧光, a3 为两者的合并); b: P1+P2 探针 (b1 为 P1+P2 的特异性绿色荧光, b2 为 DAPI 的通用性蓝色荧光, b3 为两者的合并); c: 不同探针体系下像素点灰度值的变化。放大倍数: 1500×, 标尺 10 μm。

由图 2 可知, P1 和 P2 可以与地衣芽孢杆菌特异性杂交发出荧光, 因此, 我们尝试用两个位点不同的 P1 和 P2 探针按 1:1 的比例加入到杂交体系中, 进行双位点杂交。结果如图 3 所示, 通过合并通道的图 a1 和 b1 来看, 双位点杂交染色情况优于单位点; 通过合并通道的图 a3 和 b3 来看, b3 的菌体检出率高于 a3。通过随机选取 20 个菌的荧光进行灰度计算, 结果如图 3c 所示, 发现单探针灰度值为 21.54, 多探针的灰度值为 33.16, 增加 1.54 倍, 进一步说明了双探针的杂交效果更优于单探针。采用双位点进行杂交, 用两个探针对地衣芽孢杆菌进行染色, 其染色效果和检出率均优于单位点。因此, 选择使用两个探针进行双位点杂交可以提高检测的特异性。

2.3 菌体分散形式的选择

采用超声波处理待杂交菌体分散液, 菌体分散状况见图 4。由图 4a 可知, 未经过超声处理的菌体分布不均匀, 荧光信号时强时弱, 并且部分菌体容易聚集,

不便于观察计数; 由图 4b~4f 可知, 在一定的超声处理内, 有利于菌体的均匀分散, 时间过短无法有效的破坏细菌细胞壁, 荧光信号较弱; 当超声处理时间为 120 s 时, 菌体分散状态良好, 荧光信号明显且强烈, 便于观察计数; 当超声处理时间偏长, 菌体活性降低甚至会导致菌体死亡, 使荧光信号变弱, 并且会产生许多杂质, 背景变得杂乱, 导致荧光信号下降, 增加观察计数的难度^[7,31]。由图 4g 可知, 随着超声时间的加长, 在一定程度上灰度值呈增加趋势, 在 120 s 时达到峰值, 且高于未超声处理的灰度值。因此选择超声处理时间为 120 s, 间隔 30 s。

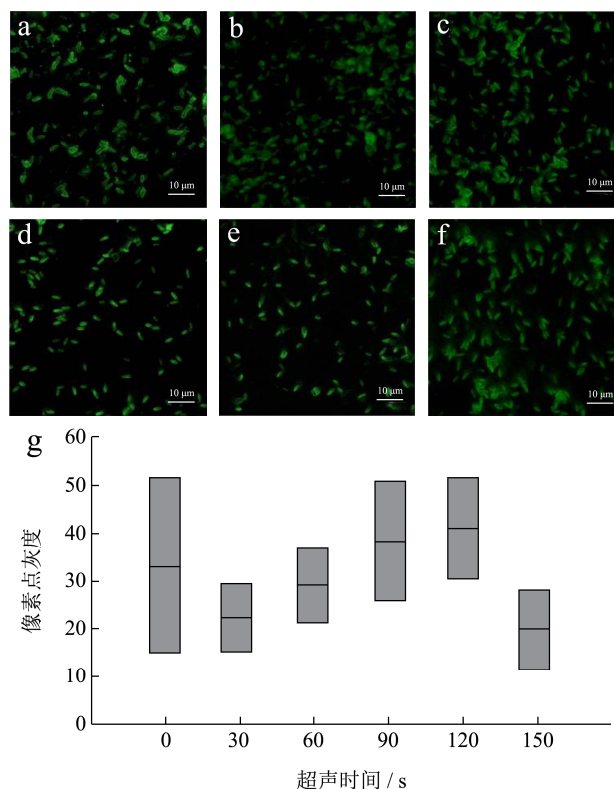


图4 不同超声时间下地衣芽孢杆菌菌体分布情况

Fig.4 Distribution of *Bacillus licheniformis* under different ultrasonic time

注: a: 未经过超声处理的菌液; b: 超声 30 s; c: 超声 60 s; d: 超声 90 s; e: 超声 120 s; f: 超声 150 s; g: 不同超声时间下像素点灰度值的变化。放大倍数: 1500×, 标尺 10 μm。

2.4 细胞通透性对 FISH 检测的影响

使用 FISH 法检测菌体时, 需要改变细菌的细胞通透性, 从而增加特异性探针与目标核酸结合的几率, 提高菌体检出率。由于细胞壁的存在, 细菌细胞的通透化处理主要是通过添加溶菌酶, 因为溶菌酶可以有效的水解细菌细胞壁中的主要成分肽聚糖^[32]。Park 等^[33]通过比较两种不同的溶菌酶体系, 发现先用 70%乙醇清洗再加溶菌酶有利于细胞的通透化, 有效保留细

胞形态, 减少了单一溶菌酶处理引起的破坏; Filion 等^[34]报道了在不同的化学物质以及溶菌酶的处理下, 可以有效的提高细菌通透性, 促进探针的杂交。

用溶菌酶处理地衣芽孢杆菌, 结果见图 5a。由图 5a 可知, 通过添加一定浓度的溶菌酶提高可以提高菌体检出率, 使细胞通透, 更有利于探针与目的核酸的结合。随着溶菌酶的反应时间的增加, 菌体检出率也随之增加, 可能是因为地衣芽孢杆菌为革兰氏阳性菌, 其含有丰富的肽聚糖且细胞壁较厚, 因此在短时间的溶菌酶处理下无法完全破壁, 菌体检出率较低; 当溶菌酶处理时间为 40 min 以上时, 菌体检出率达到 94%, 探针可以有效的与目的核酸的结合。因此选择溶菌酶处理 40 min, 更有利于杂交。

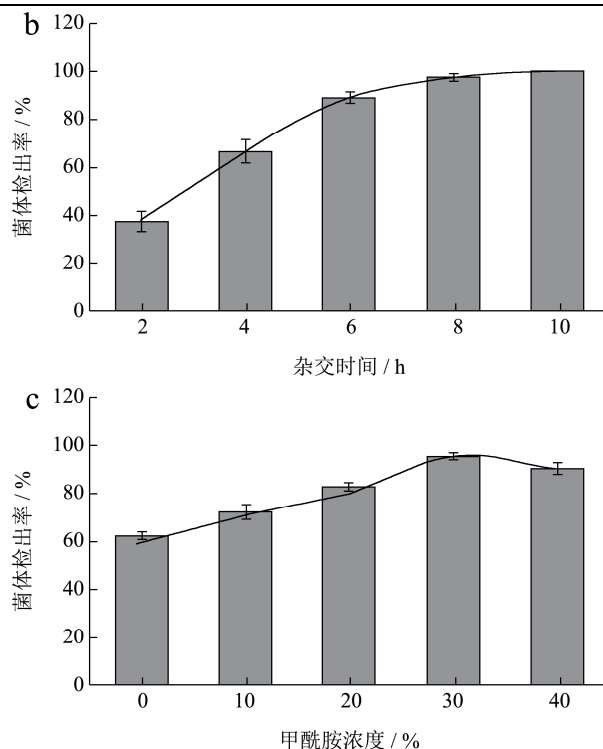
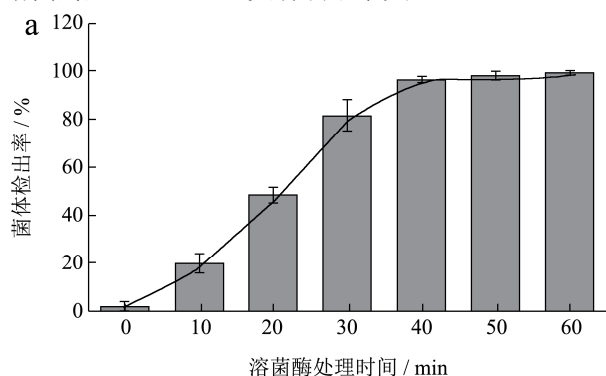


图 5 溶菌酶处理时间 (a)、杂交时间 (b) 及甲酰胺浓度 (c) 与菌体检出率的关系

Fig.5 Relationship between lysozyme treatment time (a), hybridization time (b), formamide concentration (c) and bacteria detection rate

表 2 特异性检测

Table 2 Specificity detection

分类	菌种	荧光		
		蓝色	绿色	红色
芽孢杆菌属	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+
	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-	+
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+
	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	-	+
	沙氏类芽孢杆菌 <i>Bacillus shackletonii</i>	+	-	+
	嗜气芽孢杆菌 <i>Bacillus aerophilus</i>	+	-	+
	甲基营养型芽孢杆菌 <i>Bacillus methylotrophicus</i>	+	-	+
酵母属	热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i>	+	-	-
	毕赤酵母 <i>Pichia farinosa</i>	+	-	-
	埃切假丝酵母 <i>Candida etchellsii</i>	+	-	-
其他菌属	嗜盐四联球菌 <i>Tetragenococcus halophilus</i>	+	-	+
	根霉属 <i>Rhizopus</i> sp.	+	-	-
	肠沙门氏菌肠炎亚种 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	+	-	+

2.5 杂交条件的优化

杂交条件对杂交体系的稳定性有较大的影响, 杂交时间、温度、杂交缓冲液中成分的浓度探针浓度 (甲酰胺、氯化镁和氯化钠等) 等变量会影响杂交效率

^[35-37]。由图 5b 可知, 时间对菌体检出率有显著性影响, 随着时间的增加, 菌体检出率增加。当杂交时间较短时, 探针无法与目的核酸完全杂交, 导致荧光信号少, 菌体检出率不高。当杂交时间为 6 h 以上时, 有利于探针识别目的核酸, 菌体检出率明显提高, 达到

95.12%。但是杂交时间不宜过长,在杂交温度 37 °C 下杂交过久,杂交液会挥发,干燥的杂交环境会导致非特异性杂交,因此建议的杂交时间为 6~8 h。通常,在 FISH 的检测过程中在反应体系中加甲酰胺以降低杂交温度。由图 5c 可知,甲酰胺的浓度对地衣芽孢杆菌的检出率影响较大,添加一定比例的甲酰胺溶液有利于杂交的进行,当甲酰胺的浓度达到 30% 的时候,菌体检出率为 96.35%。因此,建议使用的甲酰胺浓度为 30%,可以适当降低杂交温度,有利于探针特异性杂交。

2.6 特异性检测

以 P1、P2 为特异性荧光探针、EUB338 为细菌通用探针和 DAPI 染料对不同菌种进行特异性检测,如表 2 所示,只有地衣芽孢杆菌在蓝光激发下发出绿色荧光,说明了本文章设计的 P1、P2 探针具有一定的特异性,可以特异性识别地衣芽孢杆菌。

3 结论

本实验以地衣芽孢杆菌为研究对象,研究了不同位点的特异性探针、菌体分散形式、细胞通透性及杂交条件对检测结果的影响。结果表明,根据 16S rRNA 设计的不同位点的特异性探针有两个可以特异性识别地衣芽孢杆菌,且利用双探针进行双位点检测可以提高 1.54 倍灰度值,荧光检测效果更佳;当超声分散菌体时间为 120 s 时,灰度值为 41.16 且菌体分散均匀便于观察;当溶菌酶处理 40 min 时,菌体检出率高达 94%;当杂交条件为杂交时间 6~8 h、杂交液中甲酰胺含量 30% 时,有利于 FISH 的检测,菌体检出率为 95.12% 和 96.35%;对探针进行特异性检测,发现该方法在不同菌种中可以特异性结合地衣芽孢杆菌发出绿色荧光。

参考文献

- [1] Song C W, Rathnasingh C, Song H. CRISPR-Cas9 mediated metabolic engineering of a mucoid *Bacillus licheniformis* isolate for mass production of 2,3-butanediol [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 175: 108141
- [2] 张颖,李霄霄,李景辉,等.高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的筛选及其对酱香型白酒堆积过程的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 2: 142-149
ZHANG Ying, LI Xiaoxiao, LI Jinghui, et al. Screening of high-yielding tetramethylpyrazine *Bacillus* and its effect on the accumulation process of Maotai-flavor liquor [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 2: 142-149
- [3] 陈梦圆,李志军,罗爱民.高温大曲中高产四甲基吡嗪菌株的筛选及鉴定[J]. *酿酒科技*, 2018, 8: 24-29
CHEN Mengyuan, LI Zhijun, LUO Aimin. Screening and identification of strains with high yield of tetramethylpyrazine from high-temperature daqu [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2018, 8: 24-29
- [4] 吴建峰,徐岩.白酒细菌酒曲固态培养条件下 *B. subtilis* S12 产四甲基吡嗪的合成机制[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(1): 8-15
WU Jianfeng, XU Yan. Formation mechanism of tetramethylpyrazine produced with *B. Subtilis* S12 under the fermentation condition simulated bacterial qu preparation used for Chinese liquor brewing [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(1): 8-15
- [5] 董芳华,王银环,李珏,等.地衣芽孢杆菌活菌制剂芽孢数的快速检测方法研究[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(11): 1333-1337
DONG Fanghua, WANG Yinhan, LI Jue, et al. Research on rapid detection method for spore counting of viable organism preparation of *Bacillus Licheniformis* [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2020, 37(11): 1333-1337
- [6] 陈宇锟,黎青华,周景文,等.基于液滴微流控的产 α -淀粉酶地衣芽孢杆菌高通量筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(17): 41-46
CHEN Yukun, LI Qinghua, ZHOU Jingwen, et al. High-throughput screening of α -amylase-producing *Bacillus licheniformis* based on droplet microfluidic system [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(17): 41-46
- [7] 吴冬梅,薛正楷,周荣清.纯培养微生物荧光原位杂交技术检测的影响因素探究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(3): 96-100
WU Dongmei, XUE Zhengkai, ZHOU Rongqing. Exploration of affecting factors of fluorescence in situ hybridization detection on pure culture microorganism [J]. *China Brewing*, 2021, 40(3): 96-100
- [8] Yue Y, Jiang M, He L, et al. The transcription factor foxc1a in zebrafish directly regulates expression of nkx2.5, encoding a transcriptional regulator of cardiac progenitor cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(2): 638-650
- [9] Abdisalaam S, Bhattacharya S, Mukherjee S, et al. Dysfunctional telomeres trigger cellular senescence mediated by cyclic GMP-AMP synthase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(32): 11144-11160
- [10] Kwiatek M T, Drozdowska Z, Kurasiak Popowska D, et al. Cytomolecular analysis of mutants, breeding lines, and varieties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) [J]. *Journal*

- of Applied Genetics, 2021, 62(2): 199-205
- [11] Song P, Liu L, Liu Y, et al. Effectiveness of crizotinib in a patient with mesenchymal-epithelial transition overexpression/fluorescence in situ hybridization-negative/next-generation sequencing-negative advanced lung adenocarcinoma: a case report [J]. Translational Cancer Research, 2019, 8(2): 705-708
- [12] Nagai T, Naiki T, Etani T, et al. Urovysion fluorescence in situ hybridization in urothelial carcinoma: a narrative review and future perspectives [J]. Translational Andrology and Urology, 2021, 10(4): 1908-1917
- [13] Chopra S, Dunham T, Syrbu S I, et al. Utility of flow cytometry and fluorescence in situ hybridization in follow-up monitoring of plasma cell myeloma [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2021, 156(2): 198-204
- [14] Haefliger S, Savice Prince S, Rebetez J, et al. Putative malignant pleural mesothelioma in situ (mpmis) with sequential acquisition of genomic alterations on fluorescence in situ hybridization (FISH) examination [J]. Acta Cytologica, 2021, 65(1): 99-104
- [15] 毕天然,黄钧,张宿义,等.不同窖龄及位置窖泥微生物群落和代谢组分的差异[J].食品与发酵工业,2022,48(2):231-237
BI Tianran, HUANG Jun, ZHANG Suyi, et al. Difference of the microbial community and metabolite in pit mud with different age and position [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(2): 231-237
- [16] Kuo J, Chang L, Yen C, et al. Development of fluorescence in situ hybridization as a rapid, accurate method for detecting coliforms in water samples [J]. Biosensors-Basel, 2021, 11(1): 8
- [17] Rocha R, Santos R S, Madureira P, et al. Optimization of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria: the effect of pH, dextran sulfate and probe concentration [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 226: 1-7
- [18] Stender H, Williams B, Coull J. PNA fluorescent in situ hybridization (FISH) for rapid microbiology and cytogenetic analysis [J]. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), 2014, 1050: 167-178
- [19] 刘鹏,刘宁,王云霞,等.肽核酸探针在微生物快速检测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2016,7(4):1363-1368
LIU Peng, LIU Ning, WANG Yunxia, et al. Application of peptide nucleic acid probe in rapid detection of microorganisms [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(4): 1363-1368
- [20] Rocha R, Sousa J M, Cerqueira L, et al. Development and application of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for the specific detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Microbiology, 2019, 80: 1-8
- [21] Mueller V, Sousa J M, Koydemir H C, et al. Identification of pathogenic bacteria in complex samples using a smartphone based fluorescence microscope [J]. RSC Advances, 2018, 8(64): 36493-36502
- [22] Posada L F, Alvarez J C, Hu C, et al. Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence in situ hybridization [J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 128: 125-129
- [23] Filion G, Laflamme C, Turgeon N, et al. Permeabilization and hybridization protocols for rapid detection of *Bacillus spores* using fluorescence in situ hybridization [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1): 29-36
- [24] Zhang B, Maimaiti Y, Liu C, et al. Direct detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures through molecular beacon-based fluorescence in situ hybridization [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 159: 34-41
- [25] 吴冬梅,何翠容,牛美灿,等.荧光原位杂交(FISH)技术研究窖泥微生物群落[J].食品与发酵工业,2012,38(4):15-19
WU Dongmei, HE Cuirong, NIU Meican, et al. Study on the microbial community in pit mud by fluorescence in situ hybridization [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(4): 15-19
- [26] Mach K E, Kaushik A M, Hsieh K, et al. Optimizing peptide nucleic acid probes for hybridization-based detection and identification of bacterial pathogens [J]. Analyst, 2019, 144(5): 1565-1574
- [27] 王润芳,张红,王琴,等.微丝菌(*Microthrix parvicella*)原位荧光杂交(FISH)定量过程的条件优化[J].环境科学,2016,37(6):2266-2270
WANG Runfang, ZHANG Hong, WANG Qin, et al. Optimization for *Microthrix parvicella* quantitative processing of fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Environmental Science, 2016, 37(6): 2266-2270
- [28] 王文星,蒋绍妍,薛向欣,等.FISH 检测中国主要油页岩矿区微生物相对丰度[J].东北大学学报(自然科学版),2017,38(10):1477-1481
WANG Wenxing, JIANG Shaoyan, XUE Xiangxin, et al. Microbial relative abundance of major oil-shale mines in China by FISH detection [J]. Journal of Northeastern University (Natural Science), 2017, 38(10): 1477-1481
- [29] Amann R I, Krümholz L, Stahl D A.

- Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(2): 762-770
- [30] Rohde A, Hammerl J A, Al Dahouk S. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence in situ hybridization [J]. *Food Control*, 2016, 69: 297-305
- [31] 周金虎,毛志海,陈茂彬,等.超声波破碎法提取香草酸脱羧酶条件的优化[J].*食品工业*,2019,40(7):155-159
ZHOU Jinhu, MAO Zhihai, CHEN Maobin, et al. Optimization of conditions for extraction of vanillic acid decarboxylase by ultrasonic crushing [J]. *The Food Industry*, 2019, 40(7): 155-159
- [32] Tanaka I, Nishinomiya R, Goto R, et al. Recent structural insights into the mechanism of lysozyme hydrolysis [J]. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2021, 77(3): 288-292
- [33] Park S, Reyer M A, McLean E L, et al. An improved method for bacterial immunofluorescence staining to eliminate antibody exclusion from the fixed nucleoid [J]. *Biochemistry*, 2019, 58(45): 4457-4465
- [34] Filion G, Laflamme C, Turgeon N, et al. Permeabilization and hybridization protocols for rapid detection of *Bacillus spores* using fluorescence in situ hybridization [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 79(2): 251
- [35] Rocha R, Santos R S, Madureira P, et al. Optimization of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria: the effect of pH, dextran sulfate and probe concentration [J]. *J Journal of Biotechnology*, 2016, 226: 1-7
- [36] Santos R S, Guimaraes N, Madureira P, et al. Optimization of a peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) method for the detection of bacteria and disclosure of a formamide effect [J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 187: 16-24
- [37] Zhang B, Maimaiti Y, Liu C, et al. Direct detection of *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures through molecular beacon-based fluorescence in situ hybridization [J]. *Journal of Microbiological*, 2019, 159: 34-41

(上接第 311 页)

- [20] Jianxun Li, Xiaoying Li, Qiaoying Chang, et al. Screening of 439 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry based on TOF accurate mass database and Q-TOF spectrum library [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101: 1631-1638
- [21] H Lee, D J Cuthbertson, D E Otter, et al. Rapid screening of bovine milk oligosaccharides in a whey permeate product and domestic animal milks by accurate mass database and tandem mass spectral library [J]. *J Agric Food Chem.*, 2016, 64: 6364-6374
- [22] E H Kim, H S Seo, N Y Ki, et al. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/ time of flight-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1491: 43-56
- [23] S B Turnipseed, J M Storey, S B Clark, et al. Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem.*, 2011, 59: 7569-7581
- [24] 刘文光.动物毛发及尿液中 β -受体激动剂的残留测定 UPLC-MS/MS 法[D].广州:华南农业大学,2018
LIU Wenguang. Determination of β -agonist residues in animal hair and urine UPLC-MS/MS [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018

(上接第 317 页)

- [25] Chang M J, Huang T M, Min B S, et al. Lignans from the fruit of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl protect highdensity lipoprotein during oxidative stress [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72(10): 2750-2755
- [26] 赵志全,姚景春,冯芹,等.连翘苷元在制备预防或治疗肝损伤或肝衰竭药物中的应用:中国,201510249870.7 [P] 2015-11-25
ZHAO Zhiquan, YAO Jingchun, FENG Qin, et al. Application of phillygenin in producing drug on prevention and treatment of hepatic injury and failure: China, 201510249870.7 [P] 2015-11-25