

PCR 结合变性高效液相色谱快速检测发酵乳酸杆菌

杨大伟^{1,2} 周裔彬¹ 刘云国^{2*} 雷质文² 陈俊芳¹ 王建广² 李正义²

(¹安徽农业大学, 合肥 230000)

(²山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002)

摘要 采用多聚酶链式反应结合变性高效液相色谱技术建立了发酵乳酸杆菌的快速检测方法。以编码发酵乳酸杆菌 *Lactobacillus fermentum* 延伸因子(EF-Tu)基因为靶基因设计引物, 优化 PCR 体系, 以加氏乳酸杆菌等 26 株试验菌株做特异性检测; 并将标准菌株稀释成不同梯度, 做灵敏度检测。试验结果表明, 该方法有很好的特异性, 且灵敏度高, 检测限可达到 100CFU/ml。

关键词 发酵乳酸杆菌 PCR 变性高效液相色谱 检测

中图分类号 O657.72 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0111-05

Rapid detection of *Lactobacillus fermentum* by PCR-DHPLC

YANG Da-wei^{1,2} ZHOU Yi-bin¹ LIU Yun-guo^{2*} LEI Zhi-wen²

CHEN Jun-fang¹ WANG Jian-guang² LI Zheng-yi²

(¹Anhui Agriculture University, Hefei 230000)

(²Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002)

ABSTRACT Rapid detection of *Lactobacillus fermentum* was established by using polymerase chain reaction (PCR) and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). The primers were designed and the PCR system was optimized with the elongation factor (EF-Tu) of *L. fermentum* as the target gene. Twenty-six strains including *L. gasseri* were tested with specific detection. The sensitivity of various diluted standard strains were determined. The results indicated that the PCR-DHPLC method was specific and sensitive with a detection limit of 100 CFU/ml.

KEY WORDS *Lactobacillus fermentum* PCR DHPLC Detection

发酵乳酸杆菌属乳酸杆菌科,嗜酸性,在 pH 值 3.3~3.5 能生长、发酵。有报道表明,在 pH 值为 2.0 时仍能存活(毛青钟 2001)。乳酸杆菌对氧的需求分为微需氧、兼性厌氧、极端厌氧 3 类,能分解淀粉、糊精,有些能利用肽、多肽;降解产物又为其他细菌繁殖提供营养条件,加快其他细菌的繁殖速度,产生大量有机酸,从而使食品酸败(张秀红等 2008)。一些罐头、番茄酱(pH 4.5 以下)等酸性食品,存活的优势菌群多为喜欢酸性环境的乳酸杆菌属。当前,乳酸杆菌检测方法主要是传统的基于微生物表面受体的特异性,属于表型分类法

的方法,即增菌培养——纯分离培养——生化鉴定(东秀珠等 2001),该方法的缺点是操作繁琐、检测时间长,而且生化鉴定的项目较多。因而,研究建立快速检测方法很有必要。

近年来建立并得以迅速发展的变性高效液相色谱分析(DHPLC)可自动检测单碱基替代及小片段核苷酸的插入或缺失(Hurtle *et al.* 2003),已被证实确为一种高性价比的检测技术,一些领域已建立了快速、自动化核酸分析新方法(Barlaan *et al.* 2005)。DHPLC利用样品分子通过离子对固定相亲和力的差异,在用流动相洗脱时,以不同大小或者不同序列的核苷酸片段分子在固定相上移动速率不同而达到分离的目的(曹际娟等 2008a)。本实验采用PCR结合DHPLC方法,以编码发酵乳酸杆菌 *Lactobacillus fermentum* 延伸因子(EF-Tu)基因为靶基因设计引物进行PCR扩增,用DHPLC分析检测,一次可同时分析数百个样本,达到快速检测的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

细菌基因组DNA小量纯化试剂盒(TIANGEN);DNA纯化回收试剂盒(TIANGEN);PCR master mix(TIANGEN);乙腈(色谱纯)购自Honeywell公司。PCR仪(Eppendorf AG22331,德国);变性高效液相色谱仪NAV-99.4500(Transgenomic公司,美国);高速离心机Centrifuge TGL-16B(Eppendorf公司,德国)。琼脂糖(Promega公司),Gel red(Biotium, Inc.),10×Loading buffer(上海生工生物工程技术服务公司),DNA marker(大连宝生物工程有限公司)。

1.1.2 所用标准菌株

均购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)(表1)。

表1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in this study

序号 Number	菌株 Strain	来源 Source	菌种号 Registration No.	菌株数量 Number of strain	
1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	嗜热脂肪芽孢杆菌	CGMCC	1.1923	1
2	<i>Lactobacillus gasseri</i>	加氏乳酸杆菌	CGMCC	1.2743	1
3	<i>Bacillus coagulans</i>	凝结芽孢杆菌	CGMCC	1.2009	1
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳酸杆菌	CGMCC	1.1880	1
5	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	嗜麦芽黄单胞菌	ATCC	51331	1
6	<i>Hemolytic streptococcus</i>	溶血性链球菌	ATCC	32210	1
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	绿脓杆菌	ATCC	27853	1
8	<i>Serratia liquefacien</i>	液化沙雷氏菌	ATCC	27592	1
9	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌	ATCC	25922	1
10	<i>Clostridium perfringenes</i>	产气荚膜梭菌	ATCC	64609	1
11	<i>Enterobacter amnigenus</i>	河生肠杆菌	ATCC	51816	1
12	<i>Listeria monocytogenes</i>	单核增生李斯特菌	ATCC	15313	1
13	<i>Morganella morganii</i>	摩氏摩根菌	ATCC	25829	1
14	<i>Serratia odorifera</i>	气味沙雷氏菌	ATCC	33077	1
15	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	多食鞘氨醇杆菌	ATCC	35656	1
16	<i>Citrobacter freundii</i>	弗氏柠檬酸杆菌	ATCC	8090	1
17	<i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌	ATCC	29212	1
18	<i>Proteus vulgaris</i>	普通变形菌	ATCC	49132	1
19	<i>Shigella sonnei</i>	谏氏志贺菌	ATCC	25931	1
20	<i>Proteus mirabilis</i>	奇异变形杆菌	ATCC	25933	1
21	<i>Listeria grayi</i>	格氏李斯特菌	ATCC	25401	1
22	<i>Lactobacillus lactis</i>	乳酸乳杆菌	ATCC	11454	1
23	<i>Listeria seeligeri</i>	斯氏利斯特菌	ATCC	35967	1
24	<i>Listeria innocua</i>	无害利斯特菌	ATCC	33090	1
25	<i>Listeria welshimeri</i>	威氏利斯特菌	ATCC	35897	1
26	<i>Enterobacter aerogenes</i>	产气肠杆菌	ATCC	13048	1

1.2 方法

1.2.1 引物合成

针对发酵乳酸杆菌延伸因子(EF-Tu)基因运用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性扩增引物,用于 PCR-DHPLC 检测的引物序列如下:

L. ferment-F:5'-TGATGGTCCTATGCCACAAA-3';

L. ferment-R:5'-TCAACACCGGTAACAGTGGA-3'.

扩增片断长度 456bp,引物序列由北京三博远志公司合成。

1.2.2 参考菌株模板 DNA 的提取

按传统的培养方法分别增菌培养表 1 中的 26 株参考菌株。取参考菌株的细菌培养液 1 ml,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取细菌 DNA,保存于-20℃备用。

1.2.3 PCR 扩增条件

PCR 反应采用 20 μl 体系,经过优化得到的最佳反应体系为:2×PCR Master 10 μl,引物(10 μmol/L)各 1 μl,模板 DNA 2 μl,加 ddH₂O 补足 20 μl。最佳反应条件:预变性 94℃ 5 min,94℃ 30 s,58℃ 60 s,72℃ 60 s,40 个循环;72℃ 5 min 结束反应;4℃ 保存反应产物。

1.2.4 电泳分析

1.0%琼脂糖,电压 5 V/cm,上样量:PCR 产物 5 μl。

1.2.5 DHPLC 分析条件

色谱柱:PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱(4.6 mm×50 mm,粒度 3 μm);柱温:50℃;流动相:缓冲溶液 A 浓度为 45.5%,缓冲溶液 B 浓度为 55.5%;流速:0.9 ml/min;检测器:荧光检测器(光源:150 W Xenon 灯;激发谱带宽:15 nm;发射谱带宽:15.3 nm;检测灵敏度:在波长 350 nm 积分 2 s);上样量:PCR 产物 5 μl。

1.3 PCR 扩增产物验证

依据 1.2.3 的扩增条件,将反应体系增加到 100 μl 以获得足够量的目的片断。扩增后的 PCR 产物用 DNA 纯化回收试剂盒纯化,纯化产物送与南京金思特科技有限公司测序。

1.4 特异性试验

以发酵乳酸杆菌 DNA 作为阳性对照,以 1.3 中参考菌的 26 种细菌 DNA 作为阴性对照,按照 1.2.3 中的 PCR 扩增条件和 1.2.5 中的 DHPLC 分析条件进行病原菌的 PCR-DHPLC 特异性试验。

1.5 精密度试验

在不同批次培养的菌液之间和同批次培养的菌液不同批次提取的 DNA 之间都进行稳定性和重现性的精密度试验(均为 10 次重复)。

1.6 灵敏度试验

挑取在 37℃ 培养 24 h 的发酵乳酸杆菌菌落,悬浮于 3 ml 0.85%生理盐水中,10 倍梯度稀释菌液进行平板计数,重复两次,取平均值,确定其菌悬液浓度为 7.6×10^6 CFU/ml。稀释使其浓度为 1.0×10^6 CFU/ml。采用试剂盒提取法制备模板 DNA,提取得到的 DNA 模板 10 倍梯度稀释进行 PCR-DHPLC 检测,并将上述所得菌悬液 10 倍梯度稀释,浓度分别为: 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^0 CFU/ml,从而确定反应体系的灵敏度。

1.7 样品分离菌株的检测

从泡菜汁、酸奶及西红柿等样品中分离出 6 株疑似发酵乳酸杆菌,并经生化培养鉴定为发酵乳酸杆菌阳性

的菌株,培养提取 DNA,取 2 μl 做模板进行 PCR-DHPLC 检测。

2 结果与分析

2.1 扩增产物测序结果

经 1.3 中方法扩增纯化后的 PCR 产物测序结果与所选的延伸因子(EF-Tu) 比对,其序列一致,表明所得的 PCR 产物即为目的片段。

2.2 特异性试验

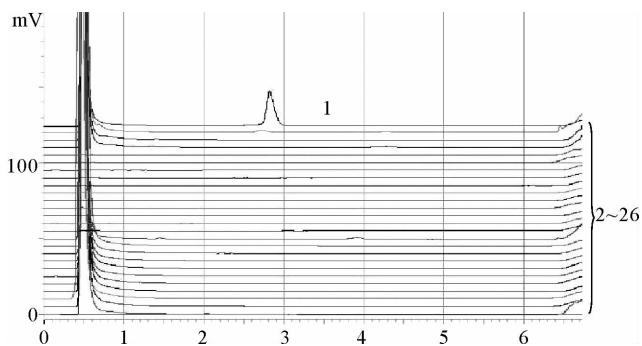
取 1.1.2 所建立的参考菌株 DNA 模板进行 PCR-DHPLC 检测的特异性试验。图 1 示意的为部分菌种的检测结果图谱。经 PCR-DHPLC 检测,在供试的 26 株参考菌株中,只有发酵乳酸杆菌出现阳性吸收峰,其余所有菌株均呈阴性。试验结果表明,本研究自主设计的发酵乳酸杆菌检测引物具有很好的检测特异性。

2.3 精密度试验结果

在不同批次培养的菌液之间和同批次培养的菌液不同批次提取的 DNA 之间的 DHPLC 检测结果无太大的差异,稳定性和重现性都得到很好的保证。

2.4 灵敏度试验结果

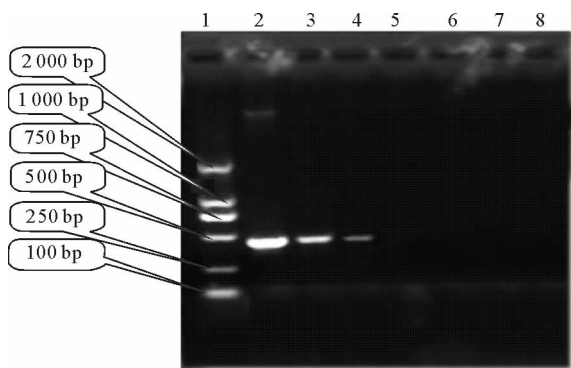
按照“1.6 灵敏度试验”方法将按梯度稀释制备的模板 DNA 进行 PCR-DHPLC 检测。并将所得的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳试验进行比对(图 2、图 3)。试验结果表明,PCR 结合琼脂糖凝胶电泳的最低检出浓



注:1:发酵乳酸杆菌 *Lactobacillus fermentum* CGMCC 1.1880;2:斯氏李斯特菌 *Listeria seeligeri* ATCC 35967;3:奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* ATCC 25933;4:加氏乳酸杆菌 *Lactobacillus gasseri* CGMCC 1.2743;5:嗜麦芽黄单胞菌 *Xanthomonas maltophilia* ATCC 51331;6:单核增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313;7:产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringenes* ATCC 64609;8:凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* CGMCC 1.2009;9:绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;10:嗜热脂肪芽孢杆菌 *Bacillus stearothermophilus* CGMCC 1.1923;11:溶血性链球菌 *Hemolytic streptococcus* ATCC 32210;12:粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;13:产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048;14:液化沙雷氏菌 *Serratia liquefacien* ATCC 27592;15:大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC 25922;16:河生肠杆菌 *Enterobacter amnigenus* ATCC 51816;17:摩氏摩根菌 *Morganella morganii* ATCC 25829;18:气味沙雷氏菌 *Serratia odorifera* ATCC 33077;19:多食鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium multivorum* ATCC 35656;20:弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* ATCC 8090;21:普通变形菌 *Proteus vulgaris* ATCC 49132;22:谏氏志贺菌 *Shigella sonnei* ATCC 25931;23:格氏李斯特菌 *Listeria grayi* ATCC 25401;24:乳酸乳杆菌 *Lactobacillus lactis* ATCC 11454;25:无害李斯特菌 *Listeria innocua* ATCC 33090;26:威氏李斯特菌 *Listeria welshimeri* ATCC35897

图 1 发酵乳酸杆菌特异性试验的 PCR-DHPLC 吸收峰图谱

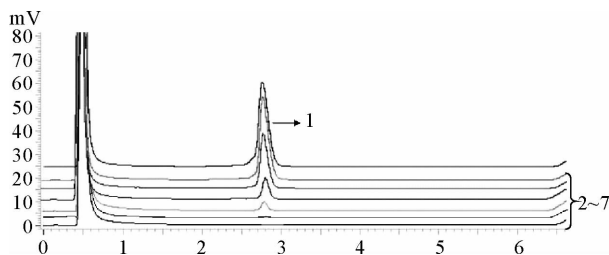
Fig. 1 DHPLC map of specific test for *Lactobacillus fermentum*



1:Marker;2:1.0×10⁶ CFU/ml;3:1.0×10⁵ CFU/ml;
4:1.0×10⁴ CFU/ml;5:1.0×10³ CFU/ml;6:1.0×10² CFU/ml;
7:1.0×10¹ CFU/ml;8:1.0×10⁰ CFU/ml

图 2 发酵乳酸杆菌灵敏度试验的 PCR 结果

Fig. 2 The map of PCR amplification for sensitivity test of EF-Tu gene



1:1.0×10⁶ CFU/ml;2:1.0×10⁵ CFU/ml;
3:1.0×10⁴ CFU/ml;4:1.0×10³ CFU/ml;
5:1.0×10² CFU/ml;6:1.0×10¹ CFU/ml;
7:1.0×10⁰ CFU/ml

图 3 发酵乳酸杆菌灵敏度试验的 PCR-DHPLC 吸收峰图谱

Fig. 3 The map of DHPLC for sensitivity test of EF-Tu gene

度为 1.0×10^4 CFU/ml, PCR-DHPLC 的最低检出浓度为 100 CFU/ml, 故本研究所建立的方法有很好的检测灵敏度。

2.5 样品分离菌株的检测

将分离出的 6 株疑似发酵乳酸杆菌的扩增产物经 PCR-DHPLC 检测均为阳性。将其经 VITEK 鉴定后均为发酵乳酸杆菌, 显示该方法具有广泛而且良好的适用性。

3 讨论

使用传统的细菌培养和鉴定是一项既耗时又复杂的工作, 由于某些生化试剂、血清等质量不稳定、特异性不好等因素, 操作复杂, 不宜做大批量样本的检测(徐君怡等 2009)。随着生产的扩大, 需要大通量的检测技术, 传统的检测方法暴露出种种弊端。尽管检测方法很多, 但各种方法都存在各自的优缺点(曹际娟等 2008b)。PCR 凝胶电泳法快捷、成本低, 但繁琐, 灵敏度相对较低, 且电泳检测步骤是很大的污染源; 实时荧光 PCR 技术具有特异性强、灵敏度高等优势, 但检测成本较高, 荧光探针保存时间较短; VIDAS 法和胶体金免疫检测方法简单、快捷, 但检测成本极高, 且均存在假阳性结果的问题, 不适合大规模的生产(闫平平等 2008)。

PCR 结合 DHPLC 技术是新近发展起来的高灵敏度、高通量检测新技术, 具有高灵敏度的特点(曹际娟等 2008c), 本研究针对发酵乳酸杆菌延伸因子(EF-Tu)基因的特异序列进行 PCR 扩增, 然后利用 DHPLC 检测阳性吸收峰, 一次可同时自动化分析数百个样本, 达到快速检测的目的, 具有广泛的实际应用价值。

参 考 文 献

- 毛青钟. 2001. 黄酒发酵过程中乳酸杆菌的功与过. 酿酒, 28(6): 72~75
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 62~65
- 闫平平, 曹际娟, 郑秋月, 徐君怡, 徐 杨, 谢明杰. 2008. 食品中沙门菌变性高效液相色谱检测技术的研究与方法建立. 中国卫生检验杂志, 18(9): 1 739~1 741, 1 750.
- 张秀红, 孔 健, 于文娟, 曲音波. 2008. 发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) YB5 生理特征的研究. 中国食品学报, 8(6): 33~38
- 徐君怡, 曹际娟, 郑秋月, 刘淑艳, 徐 杨. 2009. 变性高效液相色谱检测沙门氏菌、空肠弯曲菌和肠出血性大肠杆菌. 生物技术通报, 3: 127~131
- 曹际娟, 徐君怡, 孙哲平, 郑慧芳, 裴轶君, 赵 昕, 郑秋月. 2008a. 变性高效液相色谱高通量检测动物源性饲料中沙门氏菌和志贺氏菌. 饲料工业, 29(14): 50~53
- 曹际娟, 闫平平, 于 珂, 于 兵, 麻丽丹, 高世光, 黄晓蓉, 谢明杰. 2008b. 变性高效液相色谱检测霍乱弧菌. 辽宁师范大学学报, 31(3): 347~352
- 曹际娟, 赵 昕, 孙哲平, 于 珂, 徐君怡, 郑秋月. 2008c. PCR 结合变性高效液相色谱快速检测水产品中河流弧菌. 中国卫生检验杂志, 18(11): 2 187~2 189
- Barlaan, E. A., Sugimori, M., Furukawa, S. *et al.* 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods, 61(3): 399~412
- Hurtle, W., Bode, E., Kaplan, R. S. *et al.* 2003. Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify *Bacillus anthracis* by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and *gyrA* gene. J. Clin. Microbiol. 4 758~4 766