

## 分子信标-实时 PCR 法快速检测双歧杆菌的研究\*

王超 孟祥晨\*\*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室食品学院 哈尔滨 150030)

**摘要** :为建立双歧制品中双歧杆菌快速、敏感、特异的检测方法,根据双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA 基因设计合成了双歧杆菌属特异性引物和分子信标探针,建立了快速检测双歧杆菌的分子信标-实时 PCR 检测方法,并对反应条件进行优化。检测方法重复性好,批内和批间变异系数均小于 5%,特异性强,扩增曲线呈现明显的 S 型,无非特异性扩增;灵敏度高,是普通 PCR 的 100 倍,对纯双歧杆菌 DNA 的检出限为 5.7fg/PCR 反应体系,纯双歧杆菌菌液的检出限为  $2 \times 10^3$  CFU/mL,线性范围宽,起始模板数在  $2 \times 10^8$  CFU/mL ~  $2 \times 10^4$  CFU/mL 之间具有良好的线性关系,相关系数大于 97%。该方法具有灵敏、特异、简便和快速的特点,可用于对双歧杆菌原位菌数的定量检测。

**关键词** 双歧杆菌,分子信标,实时 PCR,探针,检测

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1163-06

## Establishment of Real-Time PCR and Molecular Beacon Detection Method for Bifidobacteria\*

WANG Chao MENG Xiang-Chen\*\*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food Science & Technology College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract** :To establish a simple, sensitive, accurate and rapid detection method for bifidobacteria, molecular beacon probe and primers were designed and synthesized according to the conserved gene of *Bifidobacterium* in GenBank, and then reaction parameters of real-time PCR were optimized. For Real-Time PCR and molecular beacon detection for bifidobacteria, the intra-assay and inter-assay coefficient of variation were both less than 5%, indicating good reproducibility of this method, and no non-specific amplification was observed either. Compared with conventional PCR, this method is more sensitive and faster, and the detection limit was 5.7fg/PCR for bifidobacteria DNA. A linear standard curve was obtained between  $2 \times 10^8$  CFU/mL and  $2 \times 10^4$  CFU/mL ( $R > 0.97$ ). The method of Real-time PCR and molecular beacon detection for bifidobacteria has many advantages, such as being sensitive, specific, simple and fast, and this method can be used in situ detection of bifidobacteria quantitatively.

**Key words** Bifidobacteria, Molecular beacon, Real-time PCR, Probe, Detection

双歧杆菌因具有维持肠道菌群平衡,刺激机体免疫机能,防止消化道疾病,促进消化和吸收,缓解乳糖不耐症,降低血清胆固醇,抗癌抗氧化等益生作用而被广泛应用到很多益生菌产品中,而且,产品中双歧杆菌的存活与否及其存活的数量是双歧杆菌发挥生理功能作用的前提。双歧杆菌的传统检测方法是平板菌落计数法,依赖于选择性培养基,操作程序较复杂,检测时间长,特异性较低。现代的聚合酶链

反应(PCR)技术虽然具有简便、快速、敏感性高和特异性强的优点,并且已被应用于双歧杆菌的检测<sup>[1~4]</sup>,但却存在着污染实验室环境,使用的染色剂具有致癌性,毒害人体健康的缺点。而近年来出现的实时 PCR(Real-Time PCR)技术因其高特异性、高灵敏性、检测时间短、无污染等优点而备受推崇,在分子生物学各相关领域,如医学、检验检疫、军事、农业、基础研究领域得到广泛的应用<sup>[5]</sup>,也逐渐应用在

\* 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN03-3)

\*\* 通讯作者 0451-55190813, E-mail: xchmeng@163.com

收稿日期:2007-03-07,修回日期:2007-05-10

了双歧杆菌的检测上<sup>[6-9]</sup>。本研究主要是根据双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA 基因设计双歧杆菌属特异性引物和探针序列,开发分子信标-实时 PCR 技术,用以快速检测产品中的双歧杆菌。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验菌株

长双歧杆菌标准株 (*B. longum* ATCC15707) 购于中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC); 埃希氏大肠杆菌标准株 (*E. coli* ATCC 25922) 购于黑龙江省科学院应用微生物研究所; 7 株双歧杆菌分离自国产益生菌制剂及丹尼斯克公司和罗地亚公司赠予的菌粉; 6 株双歧杆菌及 13 株非双歧杆菌株由 KLDS 乳品工业微生物菌种保藏中心 (KLDS-DICC) 提供。

### 1.2 仪器与试剂

7500 Real-Time PCR 仪和 9700 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司生产); F-4500 荧光分光光度计 (日本日立公司生产); Taq DNA 聚合酶和 dNTPs (北京天为时代公司产品); ROX Reference Dye (美国 Invitrogen 公司产品)

### 1.3 引物和探针的设计与合成

从 GenBank 序列数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中调出已知的 34 种双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA, 利用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) 及 DNAMAN 多序列分析软件, 对其进行多重比对分析, 找出双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA 保守的一段序列区, 以长双歧杆菌 16S rDNA 序列 (数据库登录号为 M58739) 为模板, 将这段序列提交到引物设计软件 Primer Premier 5.0 中, 设计引物, 委托宝生物 (大连) 公司合成; 再将这段保守序列提交到探针设计软件 Beacon Designer 2.0 中, 构建一枚分子信标探针, 探针的荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团, DABCYL 为淬灭基团, 委托上海生工生物工程公司合成。

上游引物 Bif-F 5'-TCTGGCTCAGGATGAACGC-3'

下游引物 Bif-R 5'-CACCGTTACACCGGAATTC-3'

探针 Bif-MB 5'-FAM-CCAGGCATCCGGCA-TTACCAC-CCGTCCTGG-3'-DABCYL

### 1.4 方法

1.4.1 DNA 模板提取方法的比较: 氯化苜法: 约 0.5g 湿菌体中加入 10 × 体积 0.8% 的 NaOH 溶液洗涤 2 次, 无菌超纯水洗涤 1 次, 抽提液 [100mmol/L

Tris-HCl (pH9.0), 40mmol/L EDTA (pH8.0), 2% SDS] 洗涤 1 次, 菌泥重新悬浮在 2.5mL 抽提液中, 吸打均匀后, 依次加入 0.5mL 10% SDS 液和 1.5mL 氯化苜液, 充分吸打均匀后, 室温静置 10min; 置于 50℃ 温育 1h, 每隔 5min 振荡混匀 1 次; 立即加入 3mol/L 醋酸钠 1.5mL, 冰浴放置 15min; 小心定量吸取上清至一新离心管中, 用等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 溶液抽提 2 次, 将上清移至一新离心管中, 用等体积异丙醇轻柔混匀, 可见絮状沉淀析出; 用 70% 冷乙醇洗涤沉淀 3 次, 挥干乙醇后, 用 50 $\mu$ L TE 缓冲液 (含 3mg/mL RNase) 重新溶解沉淀, 室温放置 15min, -20℃ 保存备用。

TE 缓冲液法: 1mL 菌液 ( $OD_{600} \approx 1$ ) 10000r/min 离心 10min, 弃上清, 用 50 $\mu$ L TE 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)] 洗涤沉淀 2 次, 50 $\mu$ L NTE 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 0.9% (wt/vol) NaCl] 重新悬浮沉淀, 98℃ 温育 10min 后, 立即置于冰水中快速冷却, 15000r/min 离心 10min; 定量吸取上清至一新离心管中并加入 RNase (使其终浓度 3mg/mL), 室温放置 15min, -20℃ 保存备用。

1.4.2 Real-Time PCR 初步扩增体系: 采用 50 $\mu$ L 反应体系, 其中 PCR Buffer (10 ×) 5 $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25mmol/L) 8 $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5mmol/L) 4 $\mu$ L, Bif-F (10 $\mu$ mol/L) 和 Bif-R (10 $\mu$ mol/L) 及 Bif-MB (5 $\mu$ mol/L) 各 1 $\mu$ L, Taq DNA Polymerase (2.5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, ROX Reference Dye 2 $\mu$ L, 待检样品 5 $\mu$ L。扩增反应程序为: 94℃ × 3min → 94℃ × 1min → 40℃ × 35s → 59℃ × 30s → 72℃ × 1min,  $N = 40$  (注: 有下划线的步骤表示在此温度下采集荧光信号)

1.4.3 Real-Time PCR 扩增体系的优化: 根据以往的经验, 设定不同的引物、探针及  $Mg^{2+}$  浓度, 进行 Real-Time PCR 扩增, 观察其对检测结果的影响, 优化出最佳的引物、探针及  $Mg^{2+}$  浓度。

1.4.4 Real-Time PCR 检测标准曲线的建立: 利用经连续稀释的已知量的长双歧杆菌标准株纯培养液做阳性模板进 Real-Time PCR 检测, 以长双歧杆菌标准株已知量的不同菌数对数值 (LogCFU/mL) 为横坐标, 以反应过程中出现荧光信号的初始循环数 ( $C_t$ ) 为纵坐标绘制标准曲线, 进行相关系数分析, 确定最优检测线性范围, 进而建立 Real-Time PCR 检测双歧

杆菌的标准曲线。

**1.4.5 分子信标-实时 PCR 检测双歧杆菌方法的评价** (1)特异性检测:检测双歧杆菌的同时对其它非双歧杆菌菌株进行检测,评价该方法的特异性。(2)灵敏度检测:采用氯化苜法提取长双歧杆菌标准株 DNA,经核酸蛋白分析仪测定其浓度后进行 10 倍系列稀释,以这些 DNA 稀释液为模板进行检测,同时用常规 PCR 检测方法作对照。(3)重复性检测:重复性检测包括:批内和批间重复性检验。以所提取的长双歧杆菌标准株 DNA 为模板,连续 6d 对同一模板进行重复检测。

**1.4.6 分子信标-实时 PCR 方法与传统检测方法的比较** 选取 8 株纯双歧杆菌培养液,分别采用传统的平板菌落计数法以及分子信标-实时 PCR 方法检测双歧杆菌的浓度,所得数据采用 SAS 软件进行方差分析,并用邓肯氏极大复差法进行多重比较,检验误差水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 模板提取方法的比较

综合目前的文献报道,氯化苜法提取双歧杆菌基因组 DNA 效果较好<sup>[10]</sup>。本研究在此方法的基础上作部分改动,增加了抽提液的作用时间和抽提次数。所提取的双歧杆菌 DNA,经核酸蛋白分析仪测定,双歧杆菌基因组 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值介于 1.8~2.0 之间, $OD_{260}/OD_{230}$  比值大于 2.0,证明 DNA 纯度高,提取结果稳定,重复性好。但该方法缺点是步骤较多,操作时间较长。参考 Gueimonde 等<sup>[11]</sup>提取双歧杆菌方法,本研究建立了 TE 缓冲液法用于双歧杆菌 DNA 及其它参考菌株 DNA 的提取。此法

操作简便,快捷,可作为大批量双歧杆菌及其它参考菌株的 PCR 扩增模板 DNA 的提取方法。

### 2.2 Real-Time PCR 扩增体系的优化

通过对所得不同的扩增曲线形态分析及最大 RFU 值的比较(图 1、图 2),确定出最优引物终浓度为  $0.8\mu\text{mol/L}$ ,探针终浓度为  $0.4\mu\text{mol/L}$ , $\text{Mg}^{2+}$  终浓度为  $4.0\text{mmol/L}$ 。从扩增曲线上可以看出:引物、探针及  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对荧光强度有一定的影响,浓度偏高或偏低,荧光强度有所减弱,浓度的改变只影响曲线的 RFU 值,但几乎不影响  $C_t$  值,可见  $C_t$  值只与模板浓度有关。最终得出 Real-Time PCR 检测体系为:  $50\mu\text{L}$  反应体系中 PCR Buffer( $10\times$ )  $5\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ( $25\text{mmol/L}$ )  $8\mu\text{L}$ , dNTP Mixture( $2.5\text{mmol/L}$ )  $4\mu\text{L}$ , Bif-F ( $10\mu\text{mol/L}$ ) 和 Bif-R ( $10\mu\text{mol/L}$ ) 及 Bif-MB ( $5\mu\text{mol/L}$ ) 各  $4\mu\text{L}$ , Taq DNA Polymerase ( $2.5\text{U}/\mu\text{L}$ )  $0.5\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye  $2\mu\text{L}$ , 待检样品  $5\mu\text{L}$ 。

### 2.3 Real-Time PCR 检测标准曲线的建立

以不同菌数的阳性模板对数( $\text{LogCFU/mL}$ )为横坐标,以 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数( $C_t$ )为纵坐标绘制双歧杆菌的标准曲线,结果表明:当浓度过大(超过  $2\times 10^8\text{CFU/mL}$ )或过低(低于  $2\times 10^4\text{CFU/mL}$ )时,标准曲线相关性不好;浓度范围在  $2\times 10^8\text{CFU/mL}\sim 2\times 10^4\text{CFU/mL}$  之间时,标准曲线线性良好,相关系数  $R^2$  值大于 0.97。因此,依据此模板范围建立了双歧杆菌 Real-Time PCR 检测标准曲线,见表 1 和图 3。

### 2.4 分子信标-实时 PCR 检测双歧杆菌方法的评价

**2.4.1 特异性检测** 对 14 株双歧杆菌及 14 株非双歧杆菌进行 Real-Time PCR 检测,结果与预期完全相

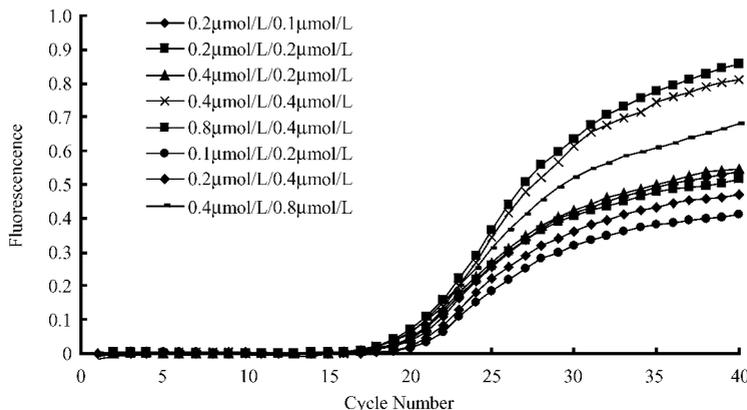


图 1 引物/探针浓度对 Real-Time PCR 反应体系的影响

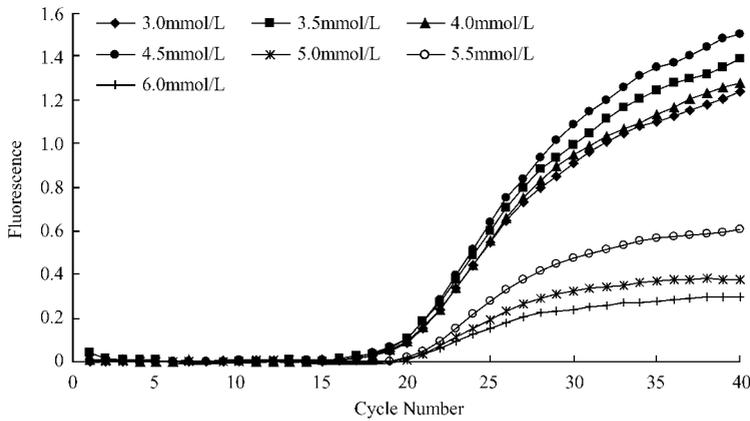


图2 Mg<sup>2+</sup>浓度对 Real-Time PCR 反应体系的影响

表1 Real-Time PCR 标准曲线 Ct 值

LogCFU/mL	8	7	6	5	4
Run1-Ct	14.41	16.21	20.87	24.55	26.96
Run1-Ct	14.22	15.77	21.23	25.38	27.29
Run1-Ct	14.38	16.39	21.18	26.75	28.12
Mean ± SD	14.34 ± 0.08	16.12 ± 0.26	21.09 ± 0.16	25.56 ± 0.91	27.49 ± 0.49

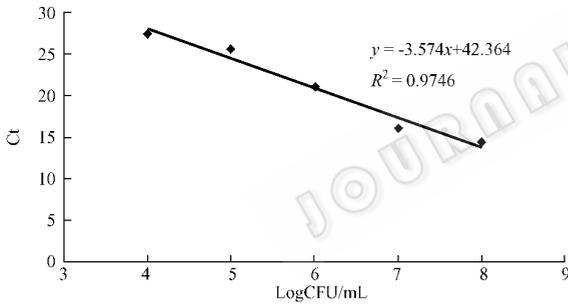


图3 Real-Time PCR 标准曲线

符,无非特异性扩增,14株双歧杆菌都表现为阳性扩增,扩增曲线呈现明显的S型;而14株非双歧杆菌及水对照未有荧光增加信号,表现为阴性,表明该方法有良好的特异性。部分检测菌株的 Real-

Time PCR 扩增曲线结果见图4。由于双歧杆菌的DNA模板在反应体系中的浓度不同,所以扩增曲线表现具有一定的差异,可以看出:模板浓度越高,可检测到荧光增加信号所进行的PCR循环数越少,当模板浓度为零时,即使PCR循环数达到最大(40个循环),也检测不到荧光增加信号。

2.4.2 灵敏度检测:将不同浓度的DNA阳性模板10倍梯度稀释,在Real-Time PCR仪上所能检测出的最低限数为5.7fg/PCR反应体系(图5),而常规PCR通过浓度梯度谱带可观察到的最低稀释限点为570fg/PCR反应体系(图6),两者结果的对比情况见表2。可见,Real-Time PCR的灵敏度比常规PCR高

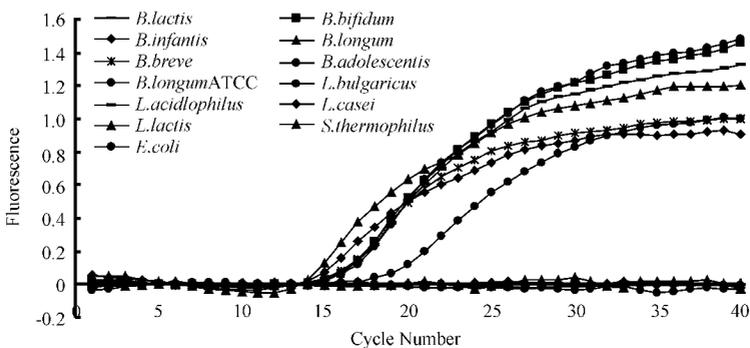


图4 不同菌株DNA的Real-Time PCR 扩增曲线

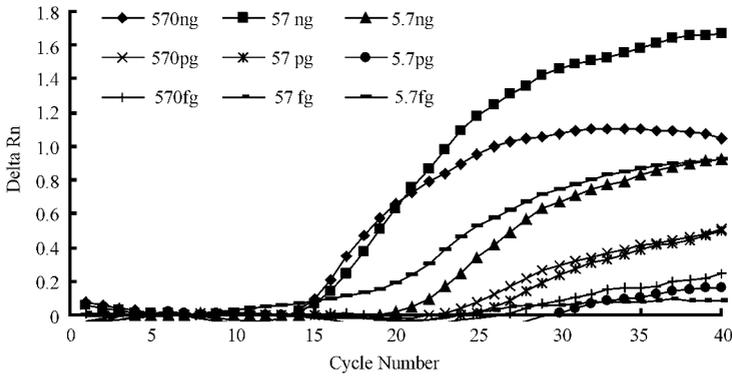


图 5 不同浓度双歧杆菌 DNA 的 Real-Time PCR 扩增曲线

表 2 Real-Time PCR 与常规 PCR 检测灵敏度的比较

阳性模板 DNA 含量 (/PCR 反应体系)	Real-Time PCR 循环阈值	普通 PCR
570ng	11.36	阳性
57ng	14.74	阳性
5.7ng	15.16	阳性
570pg	21.67	阳性
57pg	24.55	阳性
5.7pg	26.80	阳性
570fg	29.66	阳性
57fg	32.81	阴性
5.7fg	36.96	阴性
0.57fg	0	阴性
0	0	阴性

明,由于其过低偶尔无法检出。因此,Real-Time PCR 的检测纯双歧杆菌培养液菌液浓度的检出限为  $2 \times 10^3$  CFU/mL。



图 6 不同浓度双歧杆菌 DNA 的凝胶电泳结果

100 倍。另外,将长双歧杆菌 ATCC15707 纯培养物 ( $2 \times 10^8$  CFU/mL) 做阳性模板,连续 10 倍梯度稀释,在 Real-Time PCR 仪上所能检测出的最低限数为  $2 \times 10^2$  CFU/mL, Ct 值为 35.25 (图 7,表 3),但当模板浓度低于  $2 \times 10^3$  CFU/mL 时,虽仍能检测出荧光信号,读出 Ct 值,但扩增曲线已不明显,且重复实验表

表 3 Real-Time PCR 检测双歧杆菌菌液的 Ct 值

菌液 (CFU/mL)	$2 \times 10^8$	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^3$	$2 \times 10^2$
Ct 值	14.18	15.62	21.59	24.88	27.67	32.10	35.25

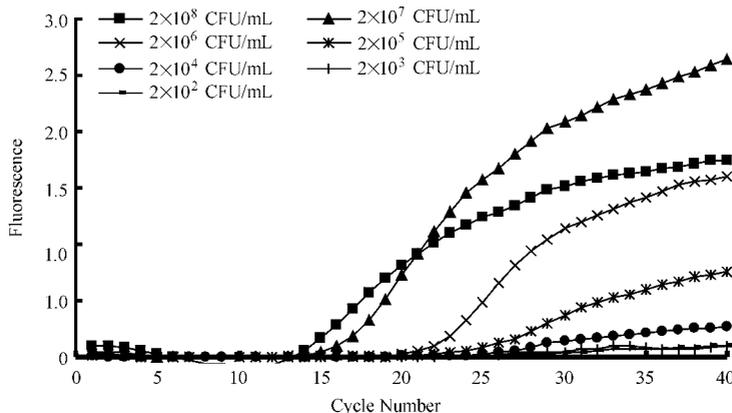


图 7 不同浓度双歧杆菌菌液的 Real-Time PCR 扩增曲线

**2.4.3 重复性检测:**用 Real-Time PCR 方法对长双歧杆菌标准株进行重复检测,并对结果进行了统计学分析,结果见表 4。由表 4 中可以看出批内和批间 CV 值均在 5% 以内,说明 Real-Time PCR 检测方法具有较好的重复性。

表 4 同一模板批内和批间重复性检验结果

	批内重复性						批间重复性
	1	2	3	4	5	6	
Mean	19.377	19.345	19.435	19.182	19.585	19.244	19.361
SD	0.325	0.285	0.338	0.410	0.271	0.445	0.063
CV(%)	1.68	1.47	1.74	2.14	1.39	2.31	2.31

## 2.5 分子信标-实时 PCR 方法与传统检测方法的比较

应用所建立的分子信标-实时 PCR 检测方法对 8 株纯双歧杆菌培养液进行检测,8 株双歧杆菌均能检出,定量检测结果与传统的平板菌落计数法检测结果相比,除一株双歧杆菌(*B. bifidum*)检测结果差异显著外( $P < 0.05$ ),其他 7 株双歧杆菌检测结果均无显著性差异( $P > 0.05$ )。检测结果见表 5。

表 5 纯培养的双歧杆菌检测结果

菌株	分子信标-实时 PCR 检测结果	平板菌落计数结果
	LogCFU/mL ± SD(Ct ± SD)	LogCFU/mL ± SD
<i>B. lactis</i>	7.64 ± 0.06 <sup>a</sup> (22.18 ± 0.22)	7.62 ± 0.04 <sup>a</sup>
<i>B. infantis</i>	8.44 ± 0.02 <sup>a</sup> (19.35 ± 0.07)	8.69 ± 0.06 <sup>a</sup>
<i>B. longum</i>	9.40 ± 0.02 <sup>a</sup> (15.91 ± 0.07)	9.41 ± 0.04 <sup>a</sup>
<i>B. adolescentis</i>	9.34 ± 0.02 <sup>a</sup> (16.15 ± 0.07)	9.26 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>B. longum ATCC</i>	9.30 ± 0.00 <sup>a</sup> (16.30 ± 0.00)	9.10 ± 0.02 <sup>a</sup>
<i>B. breve</i>	9.40 ± 0.07 <sup>a</sup> (15.92 ± 0.26)	9.42 ± 0.03 <sup>a</sup>
<i>B. bifidum</i>	9.79 ± 0.00 <sup>b</sup> (14.54 ± 0.02)	9.46 ± 0.00 <sup>b</sup>
<i>B. breve</i>	9.66 ± 0.04 <sup>a</sup> (14.97 ± 0.13)	9.90 ± 0.02 <sup>a</sup>

注:同行数据角标不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

## 3 讨论

传统的平板菌落计数方法只能计算活菌数,而双歧杆菌为专性厌氧菌,在操作过程中,环境中的氧气可能会导致部分双歧杆菌死亡,进而影响菌数的估计,双歧杆菌若在平板上分布不均,也会影响菌数的估计。另外,平板菌落计数是以选择性培养基为

基础的,而选择性培养基成分复杂,制备费时费力(保守估计大约需要 2h);双歧杆菌又需厌氧培养 48h 后才能计数,可见所需检测时间较长。本研究所建立的双歧杆菌分子信标-实时 PCR 检测方法则不会存在此类问题,不需要繁琐的培养富集,操作过程简单,检测时间短,只需 4h(包括样品前处理时间)而且检测结果可靠性好,稳定性高。因此,无论从检测灵敏度、特异性、可靠性方面,还是防污染、对人体安全、省时省力方面,分子信标-实时 PCR 检测方法都具有很好的发展前景。

## 4 结论

本研究所建立的双歧杆菌分子信标-实时 PCR 检测方法重复性好,批内和批间变异系数均小于 5%,特异性强,扩增曲线呈现明显的 S 型,无非特异性扩增;灵敏度高,是普通 PCR 的 100 倍,对纯双歧杆菌 DNA 的检出限为 5.7fg/PCR 反应体系,纯双歧杆菌菌液的检出限为  $2 \times 10^3$  CFU/mL;线形范围宽,起始模板数在  $2 \times 10^8$  CFU/mL ~  $2 \times 10^4$  CFU/mL 之间具有良好的线形关系,相关系数大于 97%。

## 参考文献

- [1] Kok R, Waal A, Schut F, et al. Appl Environ Microbiol. 1996, **62**: 3668 ~ 3672.
- [2] Wang R F, Cao W W, Cerniglia C E. Appl Environ Microbiol. 1996, **62**: 1242 ~ 1247.
- [3] Kaufmann P, Pfeferkorn A, Teabo M. Appl Environ Microbiol. 1997, **63**: 1268 ~ 1273.
- [4] Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, et al. Appl Environ Microbiol. 1999, **65**: 4506 ~ 4512.
- [5] 朱水芳主编. 实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测技术. 北京: 中国计量出版社, 2003. pp. 105 ~ 285
- [6] 沈永才, 袁佩娜. 中国微生态学杂志. 2001, **13**(2): 66 ~ 70.
- [7] Requena T, Burtn J, Matsuki T, et al. Appl Environ Microbiol. 2002, **68**: 2420 ~ 24272.
- [8] Vitali B. Systematic and applied microbiology. 2003, **26**: 269 ~ 276.
- [9] Matsuki T, Watanabe K, et al. Appl Environ Microbiol. 2004, **70**: 167 ~ 173.
- [10] 江晓, 贾力敏, 张磊, 等. 中国卫生检测杂志. 2004, **14**(5): 641 ~ 642.
- [11] Gueimonde M, Töllkkö S, et al. Appl Environ Microbiol. 2004, **70**: 4165 ~ 4169.