



叠氮溴化丙锭-荧光定量 PCR 法实时快速检测 5 种乳杆菌活菌数方法的建立与应用

段亮杰^{1,2} 沙雨婷² 罗意^{1,2} 夏小乐^{*1,2}

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】乳杆菌属是发酵食品中最常见的微生物之一,与食品的品质和安全密切相关,定量检测乳杆菌活菌数、解析乳杆菌群落组成对发酵乃至肠道微生物等具有重要意义。【目的】建立一种在种水平上定量检测 5 种乳杆菌活菌数的叠氮溴化丙锭-荧光定量 PCR (propidium monoazide-quantitative PCR, PMA-qPCR)检测方法并探讨其适用性。【方法】以植物乳杆菌、发酵乳杆菌、短乳杆菌、嗜酸乳杆菌和干酪乳杆菌等发酵食品中常见的 5 种乳杆菌为目标菌株,查找并筛选特异性引物用于荧光定量 PCR (qPCR)检测,优化叠氮溴化丙锭(PMA)处理条件,测定 PMA-qPCR 检测法的特异性、灵敏度及可靠性。最后利用 PMA-qPCR 法检测黄酒酿造过程中 5 种乳杆菌的活菌数。【结果】PMA 最佳处理条件为:浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ 下暗处理 15 min 后曝光 15 min,此时可抑制样品中 99.89% 的死菌 DNA 扩增。该方法特异性高,能够准确识别 5 种乳杆菌;线性关系强, $R^2 > 0.98$;灵敏度高,检测限为 $10^{1.8} - 10^{3.2}$ CFU/mL;重复性好, C_q 值变异系数小于 1%;与平板计数相比差异不显著(统计学上), $P > 0.05$ 。利用该方法检测黄酒中 5 种乳杆菌的活菌数,发现发酵乳杆菌、干酪乳杆菌和短乳杆菌是主要的乳杆菌(总计占比 59%–89%),与已知黄酒酿造中乳杆菌群落组成相符。【结论】建立的 PMA-qPCR 法能够快速、准确地检测 5 种乳杆菌的活菌数,为解析样品中乳杆菌的实时组成及检测具有活性但不可培养(viable but nonculturable, VBNC)状态的乳杆菌提供了可靠的手段。

关键词: 乳杆菌, 活菌, 叠氮溴化丙锭, 荧光定量 PCR, 实时快速检测

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600401); National Natural Science Foundation of China (31972064); National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering of China (2018-14); Qinglan Project of Jiangsu Province

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85327270; E-mail: xiaolexia@jiangnan.edu.cn

Received: 17-01-2020; **Accepted:** 09-03-2020; **Published online:** 26-04-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600401); 国家自然科学基金面上基金(31972064); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助(2018-14); 江苏省青蓝工程

***通信作者:** Tel: 0510-85327270; E-mail: xiaolexia@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-01-17; **接受日期:** 2020-03-09; **网络首发日期:** 2020-04-26

Quantitative PCR combined with propidium monoazide treatment for real-time and rapid determination of five viable *Lactobacillus*

DUAN Liang-Jie^{1,2} SHA Yu-Ting² LUO Yi^{1,2} XIA Xiao-Le^{*1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] *Lactobacillus* is commonly found in fermented foods which associated with food quality and safety. Quantifying the real-time dynamic and tracking the composition of viable *Lactobacillus* is substantial to explore metabolic function in fermentation and even intestinal microorganism system. [Objective] To establish and employ a real-time and rapid approach to detect 5 kinds of viable *Lactobacillus* at species level by quantitative PCR combined with propidium monoazide (PMA) treatment, and then assess its applicability. [Methods] Using *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* which are the common *Lactobacillus* strains in fermented foods as the target, the specific primers for quantitative PCR (qPCR) analysis were searched and screened. We also optimized PMA conditions and ascertained the specificity, sensitivity and reliability of the method. Then 5 kinds of viable *Lactobacillus* during Chinese rice wine fermentation were quantified by PMA-qPCR. [Results] The optimal process included that 20 $\mu\text{mol/L}$ PMA for 15 min incubation followed by 15 min photoactivation can eliminate 99.89% amplified signal of non-viable bacteria. This method exhibited good specificity to accurately identify 5 kinds of *Lactobacillus*, and possessed strong linear relationship ($R^2 > 0.98$) and high sensitivity (limit of detection = $10^{1.8} - 10^{3.2}$ CFU/mL) and the variation coefficients of C_q values were less than 1%. Additionally, it had no statistically significant ($P > 0.05$) difference compared with plate count. Furthermore, the PMA-qPCR method was applied during Chinese rice wine fermentation, indicating that *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus brevis* were the dominant *Lactobacillus* (59%–89%), which was consistent with known *Lactobacillus* composition in Chinese rice wine brewing system. [Conclusion] The established PMA-qPCR method could quickly and accurately quantify 5 kinds of viable *Lactobacillus*, which provided a feasible approach on tracking the real-time composition of viable *Lactobacillus* and detecting viable but nonculturable *Lactobacillus* in samples.

Keywords: *Lactobacillus*, Viable bacteria, Propidium monoazide, Quantitative PCR, Real-time and rapid detection

乳杆菌属(*Lactobacillus*)是一类革兰氏阳性细菌,广泛存在于食品、饲料、植物、脊椎动物、无脊椎动物和人类中^[1]。由于其出色的发酵性能和“益生”特性^[2]而被广泛应用于发酵食品领域。一方面乳杆菌产生的有机酸、胞外多糖、 γ -氨基丁酸等物质极大地增强了发酵食品的风味和保健功能;另一方面乳杆菌是导致食品发生腐败变质、影响食品安全的主要微生物之一^[3-4]。与大多数发酵食品一致,黄酒具有丰富的微生物群落,而乳杆菌的占比很大(约占细菌总量的 0.59%–65.17%)^[5]。丰富的乳杆菌群

落与复杂的发酵环境共同作用,最终形成了黄酒独特的风味与品质。因此,解析乳杆菌在黄酒乃至其他发酵食品中的实时组成情况,尤其是检测乳杆菌的实时活菌数对于发酵食品的安全制造及新型发酵食品的开发都具有重要意义。

目前已经建立了如基因组测序^[6]、荧光原位杂交^[7]、末端限制性片段长度多态性分析(terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)^[8]、磷脂脂肪酸检测(phospholipid fatty acid, PLFA)^[9]、荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)^[10]等多种非

培养的乳杆菌检测方法。其中, 荧光定量 PCR 是一种基于特异性引物定量检测微生物的方法, 因其具有快速、灵敏、特异等特点而被广泛应用于各种样品中微生物的检测^[10-12]。但传统 qPCR 既能扩增活菌 DNA, 又能扩增死菌 DNA, 无法区分活细胞与死细胞。反转录荧光定量 PCR (reverse transcription qPCR, RT-qPCR) 虽然能够达到检测活菌的效果, 但因 RNA 易降解等特性而不适宜于复杂样品中微生物的检测。叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA) 是一种常见的活菌染料, 能够穿透死亡细胞/膜损伤细胞的细胞膜插入核酸, 在强光照射下能够与 DNA 形成稳定的共价氮碳键不可逆地修饰 DNA, 阻止死细胞/膜损伤细胞的 DNA 进行 PCR 扩增^[13]。PMA 耦合 qPCR 不仅能够选择性地检测目标微生物的活菌数, 而且具有稳定、快速、灵敏等特点, 成为了检测样品中乳杆菌活菌数的有利方法。尽管 PMA 耦合 qPCR 在微生物活菌检测中已有广泛应用^[10-11, 14-15], 但不同微生物对 PMA 的敏感度不同^[16], 因此应当针对乳杆菌建立特定的 PMA 处理方式, 以获得更为准确的活菌检测结果。

本研究以发酵食品中常见的 5 种乳杆菌为目标菌株, 筛选得到高特异性乳杆菌引物, 通过 PMA-qPCR 检测, 建立一种实时定量检测 5 种不同乳杆菌活菌数的特异性方法, 并将其应用于黄酒酿造过程。该方法对于其他样品中乳杆菌乃至乳酸菌的种水平的实时定量活菌数检测也具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黄酒样品

实验用黄酒发酵醪液全部取自江苏某黄酒厂, 黄酒酿造工艺和取样参考文献[4]。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

叠氮溴化丙锭(PMA), Biotium 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit), 宝生物工程(大连)有限公司; DNA 提取试剂盒(Fast DNA[®] Spin Kit for

Soil), MP Biomedicals 公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。650 W 卤素灯, OSRAM 公司; 实时荧光定量基因扩增仪, Bio-Rad 公司; 核酸与蛋白分析仪, 赛默飞世尔科技公司。MRS 肉汤培养基, 北京索莱宝科技有限公司; MSA 培养基(g/L): 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 10.0, 甘露糖醇 10.0, 氯化钠 75.0, pH 7.4; GY 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 10.0, pH 自然; LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, pH 自然。

1.1.3 菌株及培养方式

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ACBC271 购自酿造微生物应用中心, 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ATCC367 和巴氏醋酸杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) ATCC33445 购自美国菌种保藏中心, 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) CICC20244 和乳杆菌 (*Lactobacillus sp.*) CICC6251 购自中国工业微生物菌种保藏中心, 木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosum*) CGMCC1.8382 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 由本实验室提供; 巴氏醋酸杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*) CICIM B7003 分离自酿造工厂, 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、4 株乳杆菌 (*Lactobacillus sp.*) 和 10 株肠球菌 (*Enterococcus spp.*) 分离自黄酒发酵醪液, 4 株芽孢杆菌 (*Bacillus spp.*) 分离自豆瓣酱; 以上菌株由本实验室保存。乳杆菌和肠球菌采用 MRS 肉汤培养基 37 °C 静置培养, 木糖葡萄球菌采用 MSA 培养基 37 °C 静置培养, 醋酸杆菌采用 GY 培养基 30 °C、180 r/min 振荡培养, 芽孢杆菌和大肠杆菌采用 LB 培养基 37 °C、180 r/min 振荡培养。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

微生物纯培养物基因组 DNA 按照 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit 产品说明书进行提取, 黄酒发酵醪液微生物基因组

DNA 按照 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil 产品说明书提取。所有基因组 DNA 通过核酸与蛋白分析仪检测其纯度与浓度后置于-20 °C 保存待用。

1.2.2 PMA 处理与优化

参考 Gobert 等^[17]的方法制作热致死乳杆菌,具体方法:将乳杆菌在 MRS 培养基中 37 °C 静置培养 24 h 后,用无菌生理盐水洗涤并稀释至 10⁴ CFU/mL,作为活菌菌液记为 V4。另取稀释至 10⁷ CFU/mL 的菌液于 90 °C 水浴 15 min (通过平板计数确保没有活菌),作为死菌菌液记为 D7。取适量活菌菌液与死菌菌液混合作为待测样品,调整其浊度一致,记为 V4+D7。

在待测样品中加入 PMA,调整其终浓度为 5、10、20、30、50 μmol/L,分别在黑暗环境反应 5、10、15、20、25、30 min,然后在 650 W 卤素灯下照射 5、10、15、20、25、30 min (样品置于冰上,距离灯管 20 cm)后,室温、12 000 r/min 离心 2 min 用于后续基因组提取,通过 qPCR 检测其对死菌 DNA 的抑制率,计算公式如下:

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{C_{V4+D7} - C_i}{C_{V4+D7} - C_{V4}} \times 100$$

C_{V4+D7} : 待测样品未经 PMA 处理的菌落浓度,

CFU/mL; C_{V4} : V4 样品的菌落浓度, CFU/mL; C_i : 待测样品经 PMA 处理后的菌落浓度, CFU/mL。

1.2.3 引物获取及特异性检测

所有引物均从已发表的文献中获取,引物来源及详细信息可见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过 NCBI 数据库、RDP 数据库和 TestPrime (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>)检索引物特异性,然后通过 Oligo 7 (Molecular Biology Insights, USA)、silico PCR (<http://insilico.ehu.es/PCR/>)和 Serial Cloner 2.6 (serialbasics.free.fr/Serial-Cloner.html)模拟 PCR 并对引物评价分析。以 1.1.3 中的 28 株细菌为目标菌株,提取基因组后通过 qPCR 来验证引物特异性。

1.2.4 qPCR 方法的建立

qPCR 反应体系:ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, DNA 模板 1.5 μL,添加双蒸水补足体积至 20 μL。

qPCR 反应条件:95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s (收集荧光),共 39 个循环。循环结束后进入熔解曲线分析,程序为:65 °C 逐步升温至 95 °C,每升温 0.5 °C 检测一次荧光信号,每次检测持续 5 s。

表 1 qPCR 引物

Table 1 Primers used for qPCR analysis

序号 No.	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目标菌株 Target strains	大小 Size (bp)	参考文献 References
1	LactoF	TGGAACAGRTGCTAATACCG	<i>Lactobacillus</i>	233	[18]
	LactoR	GTCCATTGTGGAAGATTCCC			
2	LPrecAF	GTGGTGC GGTCGATATTTTAGTT	<i>Lactobacillus plantarum</i>	108	[19]
	LPrecAR	TCAGCCGCGCTTGTAACC			
3	LFermF	GCACCTGATTGATTTTGGTCCG	<i>Lactobacillus fermentum</i>	103	[20]
	LFermR	GGTATTAGCATCTGTTTCCAAATG			
4	s-Lbre-F	ATTTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGG	<i>Lactobacillus brevis</i>	289	[21]
	s-Lbre-R	ACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGG			
5	Acidfor	AGCGAGCTGAACCAACAGAT	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	227	[22]
	Acidrev	AGGCCGTTACCCTACCAACT			
6	LcaseF	GCACCGAGATTCAACATGG	<i>Lactobacillus casei</i>	117	[18]
	LcaseR	GGTCTTGGATYATATGCGGTATTAG			

1.2.5 标准曲线的建立

乳杆菌在 MRS 培养基中 37 °C 静置培养 24 h 后通过平板计数法测定原始浓度, 同时用无菌生理盐水洗涤 2-4 次后按照 1.2.1 的方法将提取的微生物基因组 DNA 以 10 倍梯度进行稀释, 通过 qPCR 测定对应的 C_q 值, 建立菌落浓度(\log_{10} CFU/mL)与 C_q 值之间的线性关系, 并通过公式 $E=10^{-1/s}-1$ 计算扩增效率, 其中 s 为标准曲线的斜率。

1.2.6 qPCR 方法的重复性实验及其与平板计数法的对比

按照 1.1.3 的方式活化 5 种乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*), 用无菌生理盐水洗涤并梯度稀释, 选取不同稀释倍数的菌液通过 PMA-qPCR 检测菌落浓度, 重复 3 次, 计算 C_q 值的变异系数, 对该方法的稳定性进行评价。同时使用平板计数法检测 5 种乳杆菌的含量, 通过配对样本 t 检验对比两种检测方法检测结果的差异, 评估该方法的可靠性。

1.2.7 PMA-qPCR 检测法在黄酒酿造中的应用

黄酒发酵醪液经无菌生理盐水洗涤 2-4 次后重悬, 调整其浊度与 1.2.2 微生物纯培养物的浊度一致, 然后用最优的 PMA 处理条件进行处理, 按照

1.2.1 的方法提取微生物基因组 DNA, 通过 qPCR 检测 5 种乳杆菌的活菌数。

1.3 数据分析

所有实验均重复 3 次, 数据结果以平均数 \pm 标准差表示。利用 Excel 2016 计算 PMA-qPCR 重复性实验的变异系数 CV 。PMA-qPCR 检测法与平板计数法对同一样本检测结果的显著性差异分析通过 Origin 8.0 的配对样本 t 检验完成。

2 结果与分析

2.1 PMA 处理条件的优化

如图 1A 所示, 微量的 PMA (5 $\mu\text{mol/L}$) 已经能够抑制 84.83% 的死菌 DNA 扩增, 随着 PMA 浓度的增加, 死菌抑制率得到了进一步的提高; 当浓度提升至 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 99.84% 的死菌 DNA 与 PMA 结合而无法被扩增, 随后 PMA 浓度的增加不再显著增加死菌抑制率, 因此 PMA 最佳处理浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。如图 1B 所示, PMA 具有相对“温和”的细胞膜渗透能力, 暗孵育时间的增加并不会使 PMA 穿透活菌细胞膜造成假阴性结果, 为提高检测结果的精确性, 可将暗孵育时间设置为 15 min, 此时 PMA 对死菌 DNA 的抑制率达到了 99.89%; 当曝光时间分别为 5 min 和 10 min 时, 死菌 DNA 与

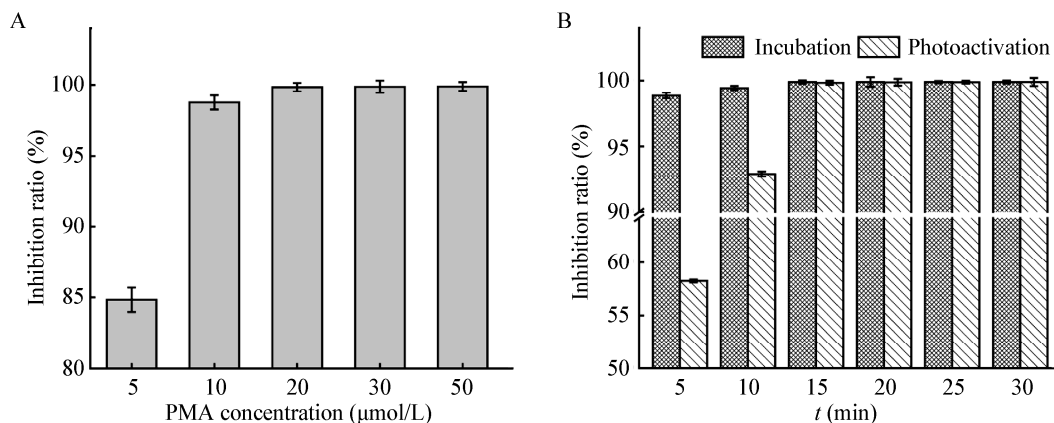


图 1 PMA 优化结果

Figure 1 Results of PMA treatment

注: A: PMA 浓度对死菌 DNA 的抑制率; B: 暗孵育时间和曝光时间对死菌 DNA 的抑制率。

Note: A: Inhibiting effect of PMA concentration on DNA of non-viable bacteria; B: Inhibiting effect of incubation and photoactivation time on DNA of non-viable bacteria.

PMA 交联不彻底, 仍有 41.76%和 7.09%的死菌 DNA 未与 PMA 结合表现出 PCR 扩增能力; 当曝光时间增加到 15 min 后, 99.84%的死菌 DNA 被 PMA 抑制, 达到了较好的活菌检测效果; 随着曝光时间的继续增加, PMA 对死菌 DNA 的抑制率不再继续上升, 因此 15 min 的曝光时间对于死菌 DNA 信号的抑制是充分的。

2.2 引物特异性

减少或消除引物的非特异性结合是提高 qPCR 法检测生物量准确度的关键^[14]。通过 NCBI、RDP 数据库和 TestPrime 检索证明了引物理论上的特异性, 进一步通过 qPCR 实验对引物的特异性进行检测, 结果见表 2。与乳杆菌亲缘关系较远的醋酸杆菌、芽孢杆菌和大肠杆菌与 6 对乳杆菌引物均表现出了阴性 qPCR 结果。以购买到的 4 株乳杆菌和从黄酒发酵醪液中筛

选到的 4 株 *Lactobacillus* sp.与 10 株 *Enterococcus* spp.作为与目标微生物亲缘关系较近的菌种库, 对引物特异性进行进一步验证, 结果显示植物乳杆菌引物 (LPrecAF/LPrecAR)、发酵乳杆菌引物 (LFermF/LFermR)、短乳杆菌引物(s-Lbre-F/s-Lbre-R)、嗜酸乳杆菌引物(Acidfor/Acidrev)和干酪乳杆菌引物(LcaseF/LcaseR)具有较高的特异性, 只与目标微生物特异性结合, 溶解曲线单一。但实验发现基于 16S rRNA 基因设计的乳杆菌属引物(LactoF/LactoR)不仅与 10 株乳杆菌结合, 也能与 8 株肠球菌结合表现出扩增信号。肠球菌作为乳酸菌的一种, 与乳杆菌具有较近的亲缘关系, 在 16S rRNA 基因上具有较高的相似性^[23], 这使得基于 16S rRNA 基因设计的乳杆菌属引物无法准确地区分两个属, 揭示这对引物只适用于肠球菌属含量较少样本中乳杆菌的定量检测。

表 2 qPCR 引物特异性检测

Table 2 Specificity tests of primers for qPCR

菌种 Species	菌株 Strains	数量 Amounts	特异性检测 Specificity tests					
			LactoF/ LactoR	LPrecAF/ LPrecAR	LFermF/ LFermR	s-Lbre-F/ s-Lbre-R	Acidfor/ Acidrev	LcaseF/ LcaseR
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ACBC271	1	+	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC367	1	+	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Laboratory strain	1	+	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CICC20244	1	+	-	-	-	+	-
<i>Lactobacillus casei</i>	Laboratory strain	1	+	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	Laboratory strain	4	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.	CICC6251	1	+	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	Laboratory strain	10	8/10 ^a	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CICIM B7003	1	-	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ATCC33445	1	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	Laboratory strain	4	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus xylosum</i>	CGMCC1.8382	1	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	JM109	1	-	-	-	-	-	-

注: +: 阳性扩增结果; -: 阴性扩增结果; ^a: 10 株菌中有 8 株表现出阳性扩增结果。

Note: +: The positive amplification result; -: The negative amplification result; ^a: 8 of the 10 strains showed positive amplification results.

2.3 PMA-qPCR 标准曲线及检测限

如图 2 和表 3 所示, qPCR 扩增信号 C_q 值与菌落浓度的对数值(\log_{10} CFU/mL)之间具有良好的线性关系($R^2>0.98$), 优化扩增体系与条件, 扩增效率达到了 90%–103%。检测限(limit of detection, LOD)通过公式 $C_q(\text{LOD})=C_q(\text{NTC})-3^{[10]}$ 来计算, 不同乳杆菌的检测限在 $10^{1.8}$ – $10^{3.2}$ CFU/mL 之间波动。其中嗜酸乳杆菌的限最低, 为 $10^{1.8}$ CFU/mL, 具有最高的灵敏度。发酵乳杆菌的检测限相对较高, 达到了 $10^{3.2}$ CFU/mL。PMA-qPCR 法的样品制备过程中可能造成目标微生物基因组的丢失, 造成检测限的提高^[14]。

2.4 PMA-qPCR 检测法的可靠性评估

按照 1.2.6 的方法评估 PMA-qPCR 法检测乳杆菌含量的可靠性, 结果如图 3A 所示, C_q 值的变异系数均小于 1%, 表明在实验浓度范围内, 该方法

具有良好的重复性。 t 检验证明在 10^3 – 10^8 CFU/mL 范围内, PMA-qPCR 与平板计数法测得的不同乳杆菌的含量在统计学上没有显著性差异($P>0.05$) (*Lactobacillus fermentum* 为 10^3 CFU/mL 时和 *Lactobacillus* 除外) (图 3B)。当样品中发酵乳杆菌的含量接近检测限 $10^{3.2}$ CFU/mL 时, PMA-qPCR 的检测准确性出现降低($P<0.05$), 尽管如此, 其检测结果仍与平板计数检测结果处于同一数量级(表 4)。而较差的乳杆菌属定量检测结果反映了以 16S rRNA 基因为靶基因区域定量检测的局限性, 这与 16S rRNA 基因在不同乳杆菌基因组 DNA 中的拷贝数不同有关。通过拷贝数校正微生物组的丰度对于样品中微生物检测具有重要意义, 文献[24]表明通过 rrnDB 数据库(<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>)可以查找细菌和古菌的 16S rRNA 基因拷贝数, 进而矫正相应拷贝数。

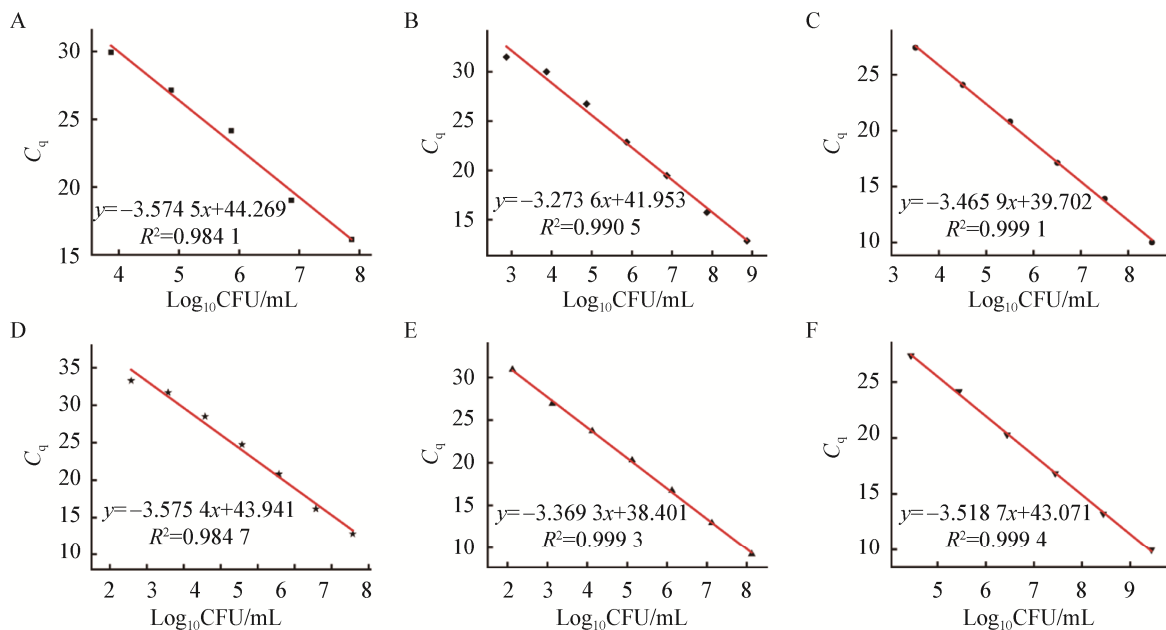


图 2 不同乳杆菌的 PMA-qPCR 标准曲线

Figure 2 Standard curves of *Lactobacillus* constructed by PMA-qPCR

注: A: 乳杆菌属; B: 植物乳杆菌; C: 发酵乳杆菌; D: 短乳杆菌; E: 嗜酸乳杆菌; F: 干酪乳杆菌。

Note: A: *Lactobacillus*; B: *Lactobacillus plantarum*; C: *Lactobacillus fermentum*; D: *Lactobacillus brevis*; E: *Lactobacillus acidophilus*; F: *Lactobacillus casei*.

表 3 不同乳杆菌 PMA-qPCR 的扩增效率及检测限
Table 3 The amplification efficiency and detection limit of PMA-qPCR for *Lactobacillus*

种类 Species	扩增效率 Efficiency (%)	检测限 Limit of detection (log ₁₀ CFU/mL)
<i>Lactobacillus</i>	90.4	2.6
<i>Lactobacillus plantarum</i>	102.1	2.1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	94.3	3.2
<i>Lactobacillus brevis</i>	90.4	2.9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	90.6	1.8
<i>Lactobacillus casei</i>	92.4	2.9

2.5 PMA-qPCR 检测法在黄酒酿造中的应用

黄酒是一种典型的多菌种混合发酵食品，具有复杂的发酵体系和微生物群落，检测其中的微生物组成，尤其是在种水平上检测乳杆菌的含量具有一定难度。本研究使用建立好的 PMA-qPCR 检测法在种水平上对黄酒酿造过程中 5 种乳杆菌的活菌数进行了定量检测。如图 4 所示，随着发酵时间的延长，黄酒发酵醪液中总乳杆菌的含量从 1.2×10^6 CFU/mL 逐渐降低至 1.1×10^5 CFU/mL，与实验室前期高通量测序测得的乳杆菌含量变化趋势^[5]相似，较低的乳杆

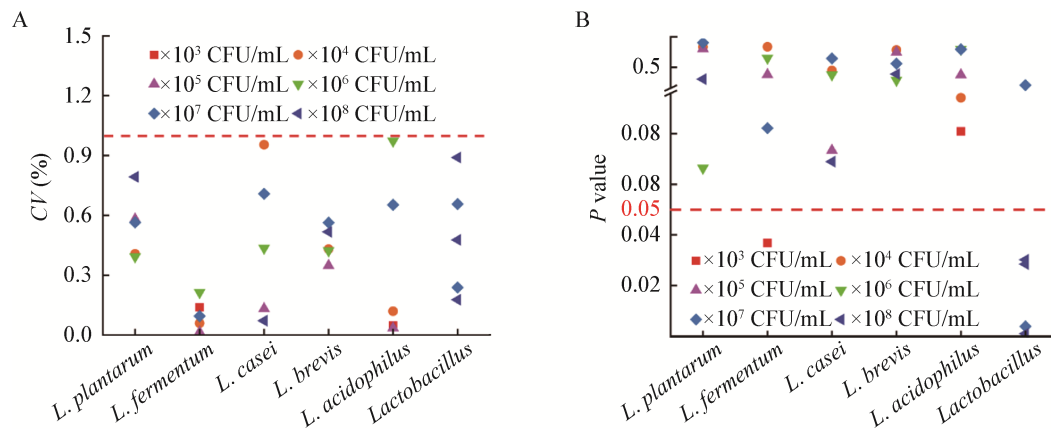


图 3 PMA-qPCR 法的可靠性检测

Figure 3 Reliability of PMA-qPCR

注：A：变异系数；B：显著性检验。

Note: A: Variation coefficients; B: Significance test.

表 4 PMA-qPCR 和平板计数法检测 5 种乳杆菌活菌数

Table 4 Quantification of 5 kinds of viable *Lactobacillus* by PMA-qPCR and plate count

菌种 Species	检测类型 Type	Log ₁₀ CFU/mL				
		组 1 Group 1	组 2 Group 2	组 3 Group 3	组 4 Group 4	组 5 Group 5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plate count	4.27±0.04	8.27±0.04	7.27±0.04	6.27±0.04	5.27±0.04
	PMA-qPCR	4.25±0.11	8.32±0.12	7.27±0.10	6.21±0.09	5.27±0.14
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Plate count	7.51±0.11	6.51±0.11	5.51±0.11	4.51±0.11	3.51±0.11
	PMA-qPCR	7.35±0.01	6.44±0.04	5.45±0.00	4.50±0.01	3.65±0.04
<i>Lactobacillus casei</i>	Plate count	5.54±0.07	4.54±0.07	8.54±0.07	7.54±0.07	6.54±0.07
	PMA-qPCR	5.46±0.03	4.53±0.04	8.42±0.01	7.51±0.12	6.48±0.09
<i>Lactobacillus brevis</i>	Plate count	7.16±0.01	6.16±0.01	5.16±0.01	4.16±0.01	8.16±0.01
	PMA-qPCR	7.19±0.10	6.10±0.09	5.17±0.09	4.13±0.13	8.19±0.08
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Plate count	5.40±0.03	4.40±0.03	3.40±0.03	7.40±0.03	6.40±0.03
	PMA-qPCR	5.37±0.01	4.43±0.03	3.44±0.01	7.38±0.08	6.36±0.15
<i>Lactobacillus</i>	Plate count	7.67±0.07	8.28±0.04	8.56±0.06	7.79±0.04	8.18±0.01
	PMA-qPCR	7.83±0.11	8.65±0.12	8.86±0.02	8.45±0.03	8.36±0.07

菌含量可能与较低的核酸提取率有关(17.3–35.7 ng/ μ L)。发酵乳杆菌是黄酒中的优势乳杆菌, 占总乳杆菌的 25%–45%, 尤其是在第 3 天时, 发酵乳杆菌的含量达到了 4.95×10^5 CFU/mL。干酪乳杆菌和短乳杆菌的含量虽然随着发酵时间的延长在不断下降, 但其在乳杆菌属中的占比却在不断上升, 在发酵第 18 天时, 干酪乳杆菌和短乳杆菌分别占比 33.76% 和 27.93%。植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌在黄酒酿造过程中具有较低的含量, 仅植物乳杆菌在第 3 天和第 4 天具有 $10^{3.6}$ CFU/mL 和 $10^{2.9}$ CFU/mL, 而在其他时间点的含量均低于检测限。王然然等^[25]通过分离培养的方式从黄酒发酵醪液中筛选到了 58 株乳杆菌, 通过菌种鉴定发现其中 34 株是发酵乳杆菌, 占有绝对优势。Yu 等利用 PCR-DGGE 方法分析了黄酒酿造过程中细菌群落多样性, 发现发酵乳杆菌、短乳杆菌和植物乳杆菌在整个发酵过程中都具有较高的丰度^[26], 与本文研究结果相似。Lv 等采用 PMA-qPCR 法检测了红曲黄酒中植物乳杆菌的含量, 发酵开始阶段(1–5 d)植物乳杆菌的含量约为 $10^{2.3}$ – $10^{2.6}$ CFU/mL, 随后其含量逐渐上升至约 $10^{6.7}$ CFU/mL (30 d), 到发酵结束其含量又下降至约 10^6 CFU/mL (45 d)^[10], 与本研究结果具有一定差异。酿造环境及工艺的不同可能是导致乳杆菌含量及变化差异的主要原因。

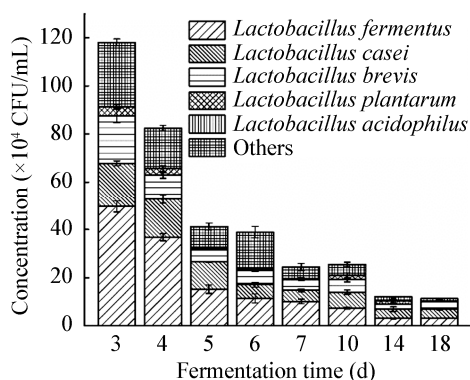


图 4 PMA-qPCR 法检测黄酒酿造过程 5 种乳杆菌的含量

Figure 4 Quantitative analysis of 5 kinds of *Lactobacillus* during Chinese rice wine fermentation by PMA-qPCR

3 讨论与结论

活细菌不仅包括能够在传统培养基上生长并形成菌落的细菌, 还包括大量具有活性但不可培养的细菌(viable but nonculturable, VBNC)^[27]。VBNC 状态的细菌虽然失去了在传统培养基上生长繁殖的能力, 但依然具有细胞膜完整性和代谢活性^[27], 对于发酵的正常进行具有重要作用。细胞膜的完整与否是 PMA 鉴别活/死细胞的理论基础, 完整的细胞膜能够帮助 VBNC 状态细菌抵抗 PMA 的侵入, 有效提升了活菌检出率。但同时一些研究^[13]表明 PMA 对细胞膜的渗透性相对“温和”, 尤其是对于一些细胞膜轻微损伤的细菌, PMA 难以透过细胞膜与 DNA 结合。通过优化 PMA 处理条件或适量添加促进物质(如脱氧胆酸钠、二甲亚砷和乙二胺四乙酸等)能够增强 PMA 对死亡细胞/膜损伤细胞细胞膜的渗透性^[13], 提高检测准确性。本研究针对 5 种乳杆菌, 优化了包括 PMA 浓度、暗孵育时间及曝光时间在内的 3 个主要参数, 最终抑制了 99.89% 的死菌 DNA 扩增, 保证了活菌检测准确性。尽管如此, 还有诸如细菌丰度及组成、活细胞与死细胞之间的比例及样品盐含量等因素^[13, 28]可能影响 PMA 处理的有效性。不同微生物对于 PMA 的敏感度有所差异, Lai 等^[28]研究发现曝光时间从 5 min 增加到 15 min 能够显著增加 PMA 对 *Lactobacillus gasseri* 死菌的抑制效果, 而不改变对 *Lactobacillus salivarius* 的处理效果, 这可能是两种乳杆菌细胞膜组成的差异造成的。Lv 等研究发现随着 PMA 浓度、暗孵育时间和曝光时间的增加, PMA 对 *Lactobacillus plantarum* 死菌的抑制率逐渐增加, 达到最佳条件后, 浓度/时间的增加不再显著改善 PMA 对死菌的抑制效果^[10], 与本文研究结果相似。根据不同微生物采取不同的 PMA 处理方式能够获得更准确的检测结果^[16]。

为了能够在种水平上区分不同的乳杆菌, 我们检索文献及数据库, 最终筛选出了 5 对高特异性的引物。其中 4 对(LFermF/LFermR、s-Lbre-F/s-Lbre-R、Acidfor/Acidrev、LcaseF/LcaseR)是基于 16S rRNA

基因设计的。16S rRNA 基因是最常用于细菌鉴定与检测的核酸序列,也是 qPCR 法检测细菌含量最常用的区域。合理利用 16S rRNA 基因的不同分区^[29],能够较准确地区分不同细菌。此外,基于管家基因 *recA* 设计的植物乳杆菌 qPCR 引物 (LPrecAF/LPrecAR)也表现出了良好的特异性,表明用于 qPCR 法测生物量的引物不应局限于 16S rRNA 基因。大量基于 16S-23S rRNA 基因间区^[30]、23S rRNA 基因^[31]以及各种管家基因^[19]的引物被设计出来并用于细菌的检测,这也使得在菌种水平,甚至是菌株水平上检测某种微生物的含量成为了可能。根据不同微生物找到其最区别于其他微生物的靶基因区域,设计出高度特异的引物是未来的发展趋势。

基因组拷贝数与菌落浓度之间一一对应的关系使得可以通过基因组拷贝数反映菌落浓度。我们通过梯度稀释目标微生物基因组 DNA,构建了扩增信号 C_q 值与菌落浓度(\log_{10} CFU/mL)之间的标准曲线,展现出了良好的线性关系($R^2 > 0.98$)。同时 PMA-qPCR 与平板计数法的检测结果在统计学上没有显著性($P > 0.05$),且 C_q 值的变异系数小于 1%,证明了该方法的稳定可靠性。5 种乳杆菌的定量检测限如表 3 所示,其变化范围从 $10^{1.8}$ CFU/mL 到 $10^{3.2}$ CFU/mL,较高的检测限可能与样品制备过程中 DNA 的丢失有关。事实上,qPCR 本身的检测限非常低(每个反应中含有 1-10 个目标基因即可),在 100%扩增效率的前提下,其对微生物的检测限是 12-120 CFU/mL^[14]。为了提高检测的灵敏度,可以考虑将 PMA 处理与 DNA 提取融合到一个程序中,减少前处理的步骤,降低 DNA 的损失^[15]。

我们建立的 PMA-qPCR 法在黄酒中乳杆菌活菌数检测中的成功应用,展现了其在检测活菌绝对含量中的巨大潜力。一方面,PMA-qPCR 法克服了基因组测序和 PCR-DGGE 无法检测微生物绝对含量的缺点;另一方面,与传统的平板计数法相比,PMA-qPCR 省去了 1-2 d 的细菌培养时间,使得整个检测过程能够在 3 h 内完成,而且能够检测到传

统的平板计数法无法检测到的 VBNC 状态细菌,获得更为准确的活菌检测结果。PMA-qPCR 方法的建立不仅能准确描述乳杆菌活菌数的实时原位动态,还可为研究其他发酵体系中不可培养的乳杆菌相关代谢功能提供参考。

REFERENCES

- [1] Duar RM, Lin XB, Zheng JS, et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(Supp_1): S27-S48
- [2] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(8): 506-514
- [3] Andreevskaya M, Jääskeläinen E, Johansson P, et al. Food spoilage-associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* species display different survival strategies in response to competition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(13): e00554-18
- [4] Xia XL, Zhang QW, Zhang B, et al. Insights into the biogenic amine metabolic landscape during industrial semidry Chinese rice wine fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(39): 7385-7393
- [5] Huang Y. Metabolic control of biogenic amines and its application in semi-dry Chinese rice wine[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese) 黄杨. 半干型黄酒生物胺代谢调控研究及其应用[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018
- [6] Hong XT, Chen J, Liu L, et al. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26621
- [7] Alqurashi RM, Alarifi SN, Walton GE, et al. *In vitro* approaches to assess the effects of acai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 190-198
- [8] Qiu R, Lu J. Bacterial community dynamics during malting based on T-RFLP and 454 pyrosequencing profiles[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 71-77 (in Chinese) 邱然, 陆健. T-RFLP 和 454 焦磷酸测序方法分析制麦过程细菌群落的动态变化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 71-77
- [9] Wu CD, Zheng J, Huang J, et al. Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via co-culture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii*[J].

- Annals of Microbiology, 2014, 64(2): 847-857
- [10] Lv XC, Li Y, Qiu WW, et al. Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Control, 2016, 66: 69-78
- [11] Rizzotti L, Levav N, Fracchetti F, et al. Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods[J]. Food Control, 2015, 47: 407-412
- [12] Ling N, Shen JL, Guo JJ, et al. Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp[J]. Food Control, 2020, 109: 106883
- [13] Emerson JB, Adams RI, Román CMB, et al. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 86
- [14] Gensberger ET, Polt M, Konrad-Köszler M, et al. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality[J]. Water Research, 2014, 67: 367-376
- [15] Slimani S, Robyns A, Jarraud S, et al. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(2): 319-321
- [16] Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(2): 276-289
- [17] Gobert G, Cotillard A, Fourmestraux C, et al. Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 148: 64-73
- [18] Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, et al. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(7): 3128-3136
- [19] Costa GN, Vilas-Bôas GT, Vilas-Boas LA, et al. *In silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(2): 233-241
- [20] Schwendimann L, Kauf P, Fieseler L, et al. Development of a quantitative PCR assay for rapid detection of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* in cocoa bean fermentation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 115: 94-99
- [21] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 1961-1969
- [22] Tabasco R, Paarup T, Janer C, et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(9): 1107-1114
- [23] Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 36(1): 1-29
- [24] Wu LW, Yang YF, Chen S, et al. Microbial functional trait of rRNA operon copy numbers increases with organic levels in anaerobic digesters[J]. The ISME Journal, 2017, 11(12): 2874-2878
- [25] Wang RR, Li XM, Chen L, et al. Detection of biogenic amines produced by lactic acid bacteria isolated from the fermentation process of Chinese rice wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(1): 12-17 (in Chinese)
王然然, 李晓敏, 陈柳, 等. 黄酒发酵过程中乳酸菌的分离及其产生物胺能力的评价[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 12-17
- [26] Yu W, Li XM, Lu J, et al. Citrulline production by lactic acid bacteria in Chinese rice wine[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2018, 124(1): 85-90
- [27] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(4): 415-425
- [28] Lai CH, Wu SR, Pang JC, et al. Designing primers and evaluation of the efficiency of propidium monoazide - quantitative polymerase chain reaction for counting the viable cells of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus salivarius*[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(3): 533-542
- [29] Chakravorty S, Helb D, Burday M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(2): 330-339
- [30] Udomsil N, Chen S, Rodtong S, et al. Quantification of viable bacterial starter cultures of *Virgibacillus* sp. and *Tetragenococcus halophilus* in fish sauce fermentation by real-time quantitative PCR[J]. Food Microbiology, 2016, 57: 54-62
- [31] Wang D, Yamahara KM, Cao YP, et al. Absolute quantification of enterococcal 23S rRNA gene using digital PCR[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(7): 3399-3408