

文章编号:1673-1689(2009)04-0433-05

实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用

赵文静, 李妍, 高鹏飞, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特, 010018)

摘要: 与传统的菌落计数、杂交技术及 PCR 技术等相比, 实时荧光定量 PCR 技术作为一种检测和定量微生物的方法, 具有较高的灵敏度及可重复性, 而且反应过程快速, 污染较小。作者综述了实时荧光定量 PCR 技术的定量原理, 荧光检测物质, 目的基因序列以及其特点, 并且列举了在乳酸菌定量检测中的应用, 同时对其应用前景进行了展望。

关键词: 实时定量 PCR; 乳酸菌; 定量检测

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Application of Real-Time Fluorescent Quantitative PCR in Quantitative Detection of Lactic Acid Bacteria

ZHAO Wen-jing, LI Yan, GAO Peng-fei, ZHANG He-ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-FQ PCR) was a method detecting and quantifying microorganism. Compared with traditional colony count, hybridization and other PCR-technology, RT-FQ PCR has better sensitivity and reproducibility, it was also quicker to perform and has minimized cross contamination. The basic principle of RT-FQ PCR, the chemistries, target gene sequences and characteristic of RT-FQ PCR were described and discussed in this review, furthermore, some applications were presented and the future perspectives were suggested.

Key words: real-time fluorescent quantitative PCR, lactic acid bacteria, quantitative detection

乳酸菌是一类能在可利用的碳水化合物发酵过程中产生大量乳酸的细菌^[1]。乳酸菌无处不在, 广泛分布于人体、动物、植物和整个自然界。乳酸菌是人和动物体内重要的生理菌群, 有重要的生理

功能, 它可以阻止致病菌的定植、刺激肠道粘膜免疫、降低胆固醇水平、维持肠道菌群平衡等^[2-3]。在自然发酵的食品和一些工业发酵工艺中, 乳酸菌作为发酵剂可以使食品延长保质期并且赋予食品良

收稿日期: 2008-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660135, 30760156); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-06-0269); 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21208-12)。

作者简介: 赵文静(1982-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 乳品微生物博士研究生。Email: zhaozajin@126.com

* 通讯作者: 张和平(1965-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事乳品科学及乳品微生物方面的研究。Email: hepingdd@vip.sina.com

好的风味特性。作为益生菌,在临床应用上,乳酸菌可以预防和治疗腹泻,可以提高乳糖酶缺乏者对于乳糖的消化和利用,一些最新的研究数据也显示,这些益生菌在预防和治疗过敏性反应、节肠炎性疾病方面具有重要作用^[4]。乳酸菌制剂和益生菌制品可以明显地改善和提高人的健康水平。然而其益生作用会受到乳酸菌的数量和分布的影响,益生菌产品中高浓度的活性菌体细胞是其发挥功效的必要条件^[5]。Chaitow(1990)指出,治疗用的活菌制剂在有效期应保证活菌含量不低于 10^9 个/克。因此,进行食品、药品中乳酸菌的准确定量分析,对于提高我国益生菌的定量检测能力以及益生菌产业的长远发展具有很重要的意义。

乳酸菌的定量对于研究其作用以及不同条件下的动态变化很重要。传统的计数方法尽管使用不同的选择性培养基,但是对于乳制品或是动物肠道中乳酸菌的鉴定和计数仍然存在问题。为了快速的鉴定和定量复杂生态环境中的乳酸菌,定量点杂交、细胞荧光原位杂交技术也应运而生,然而这些方法只能检测到目的研究菌群在总的微生态环境中占至少1%的菌数^[4],当数量低于1%时,定量检测存在一定的困难。实时荧光定量PCR技术以其较高的可重复性、灵敏性以及准确性在微生物定量以及乳酸菌定量研究领域得到广泛应用。

1 定量原理及定量方法

实时定量PCR是在PCR定性基础上发展起来的核酸定量技术。它是一种在PCR反应体系中加入荧光染料或荧光基团,利用过程中荧光信号的累积实时监测整个PCR过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。实时荧光定量PCR方法可以分为两种类型:绝对定量和相对定量。

绝对定量是对未知样品的绝对量进行测定的方法。绝对定量使用系列稀释已知浓度的标准品制作标准曲线,对未知浓度的样品进行其拷贝数的测定。标准曲线在 C_t 值与起始模板浓度之间建立一种线性关系,依据所测得未知样品的 C_t 值,则可以得到未知样品的浓度。绝对定量所使用的标准品可以是dsDNA、ssDNA和cDNA^[6]。DNA标准品可以直接合成,直接梯度稀释PCR产物,或者通过将PCR产物克隆到载体上,然后抽提质粒,通过测量浓度和拷贝数来确定。此种方法要求样品与标准品有几乎相近的扩增效率^[7],标准品的稀释梯度应该包含所要测试实验样品的浓度,而且也要求在RT-FQ PCR分析所能够定量和检测的范

围之内。

相对定量不是测定基因的绝对量,而是分别测定目的基因和参比基因的量,再求出相对于参比基因的目的基因的相对量,最后再进行样品间相对量的比较。相对定量通常选择一定的内参基因进行校正和标准化^[8]。内参基因一般为各种看家基因,在某些类型细胞中以及在各种状态下的表达基本是恒定的,常用的有GAPDH和 β -actin等^[6]。一般而言,两种定量方法没有可比性,只是根据实验目的、实验要求选择较为合适的定量方法。

2 荧光检测方法

RT-FQ PCR的关键是可以实时监测DNA扩增进程,通过检测反应体系中的荧光强度来定量PCR产物,可用于实时定量PCR的荧光标记方法主要分为两大类:荧光染料法和荧光探针法。

荧光染料,即双链DNA结合染料,通常使用SYBR Green I,是一种能够与所有dsDNA双螺旋小沟区域结合的具有绿色激发波长的荧光染料,其放射出的荧光强度是游离状态下的1000倍,它与PCR合成的双链DNA结合,在激发光的照射下产生荧光,通过对荧光强度的检测,可以实时监测PCR扩增的产物量^[9]。反应过程中dsDNA的量越多,SYBR Green I与DNA结合的越多,所产生的荧光信号就越强^[10]。此外还有BEB0, Thiazole Orange等等一些染料在实验中也有应用但是不是很广泛。

荧光染料法不需要使用特异性荧光标记的探针,其检测方法相对比较简单,同时也降低了检测的成本。由于荧光染料会与任何的dsDNA序列结合,其不可能鉴别出不同的双链DNA片段,因此也会与一些非特异性产物(例如引物形成的二聚体)相结合,影响到检测的灵敏性,目前可以通过对熔解曲线的分析来确定反应的特异性^[6]。同时在使用DNA结合染料时精确的引物设计以及PCR反应条件的优化很重要。

荧光探针法有很多种类,包括TaqMan探针法、杂交探针法及分子信标等。最常用的是TaqMan探针法,是使用5'端带有荧光物质,3'端带有淬灭物质的TaqMan探针进行荧光的检测。TaqMan探针是一种线形的寡核苷酸,当探针完整时,荧光物质受到淬灭物质的制约,不能发出荧光,而当在PCR反应过程中,TaqDNA聚合酶将TaqMan探针分解后,5'端的荧光物质便会游离出来发出荧光,通过检测反应体系中的荧光强度,则可以达到

检测PCR产物扩增量的目的。

TaqMan探针法产生较低的荧光背景,具有较高的灵敏性和稳定性,其荧光光谱具有较高的分辨率^[11],而且探针的保存时间较长,具有很高的可重复性以及特异性。但是相对于SYBR Green I来说成本较高,而且探针的设计困难,一般只能检测短的PCR产物^[11]。此外荧光探针法还包括杂交探针法、分子信标等。分子信标是使用带有特殊发夹结构的寡核苷酸探针,与TaqMan探针相比,其成本更高而且设计更为复杂,所以在实验中多使用TaqMan探针法。由于会出现较多的新的荧光化学物质,以期达到增加反应的灵敏度,提高反应的特异性,从而降低成本的目的。

3 目的基因序列

在实时定量PCR反应中通常使用16S rRNA序列以及一些特异基因序列作为靶DNA序列设计引物或探针。16S rRNA是原核生物核糖体中的一种核糖体RNA,大小约为1.5 kb^[12],16S rRNA序列含有进化速率不同的区域——可变区及恒定区序列,恒定区序列基本保守,而同一属内的种之间可变区域的DNA序列不同,因此可以依据基因数据库中所得到的16S rDNA序列设计引物或探针。2004年Furet等^[4]用实时定量PCR方法准确地定量了发酵乳制品中的乳酸菌(嗜热链球菌、德氏乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌和约氏乳杆菌),依据16S rRNA基因序列设计引物,使用SYBR Green I染料法。结果表明,实时定量PCR方法可以检测到发酵乳制品中的乳酸菌,其检测极限达到 10^3 CFU/mL产品。

近年来,16S~23S rDNA间区序列也作为设计引物或探针的目的基因序列,其进化速率比16S rDNA大10多倍,但是由于其核酸数据库不完善,也只能作为16S rDNA的一个补充。2006年Belen等^[13]成功地建立了一种简便快速的实时定量PCR方法用于发酵肉制品中*Lactobacillus sakei*的定量检测,所使用的引物以及TaqMan荧光标记探针是依据16S~23S rDNA间区序列设计的,由此得到的结果与通过传统的平板计数方法是一致的。此外一些功能基因,例如:recA^[14], Hsp60^[15], gyrB^[16], Tuf^[17]等也可以作为设计引物或探针的目的基因序列,2006年L. Masco等^[18]以16S rRNA和recA基因为目的基因设计特异性引物,对29种益生菌制品中的双歧杆菌进行了定量测定,结果表明,使用单拷贝基因recA基因为靶序列的实时定

万方数据

量PCR分析方法是一种快速、重现性好的鉴定和定量益生菌制品中双歧杆菌的方法。2007年,赵敏等^[19]以gyrB基因为靶目标设计引物和探针,对啤酒中的6株乳酸杆菌进行实验,并且对其中一个短乳杆菌样本作定量检测。实验结果表明,实时荧光定量PCR只可以对短乳杆菌产生特异扩增信号,对其它乳酸杆菌无响应,而且测得其浓度,证明实时荧光定量PCR是一种快速、特异、灵敏检测短乳杆菌的方法。

总之,越来越多的以特异基因为基础的分子生物学技术正日益成为细菌分类鉴别的重要手段,由此选择作为分类鉴定基因靶序列的基因都可以作为定量PCR引物或探针设计的靶序列,应用实时荧光定量PCR方法对乳酸菌进行检测和定量分析。

4 实时荧光定量PCR技术的优缺点

许多的分子生物学方法可以用于目的核酸序列的定量。然而,这些方法都存在一些缺陷,费时、费力,较低的灵敏性,有的需要使用放射性物质,又存在交叉污染的可能性。实时荧光定量PCR具有普通PCR高灵敏度检出以及光谱技术的精确定量等优点,可以对PCR扩增产物进行实时动态监测和自动分析结果,定量过程相对较快,缩短了检测时间,基本实现了高通量、自动化^[10],而且反应是在一个相对封闭的体系中进行,无需后续PCR操作,减少了交叉污染,其特异性强、重现性好、定量较为准确^[20]。

同时,实时定量PCR技术也存在一定的缺点,首先是实时定量PCR技术需要特殊的反应仪器和反应试剂^[6],造成其检测成本相对比较高,会在一定程度上限制了它的使用。其次,实时定量PCR技术在检测的过程中会受到所设计的探针以及引物特异性的影响,可能会使定量结果出现一定的偏差,因此在实际操作时要对引物进行精确的设计以及对PCR反应条件进行优化。实时定量PCR的标准曲线制作也比较困难,标准品的选择及制备没有统一的标准,标准曲线的制作也会有一定的偏差,会使定量结果不准确。此外,以DNA为模板的实时荧光定量PCR技术在定量过程中不可能区分死细胞和活细胞,是对总的细胞的计数,所以虽然反应的特异性较高,但是定量的结果不太准确,这个问题会逐步通过提取RNA再反转录为cDNA为模板加以解决。

5 应用及前景展望

实时荧光定量PCR方法是一种不依赖于培养

的分子生物学定量方法,依据特异性引物结合荧光染料或特异性荧光标记探针的原理,实时测定在PCR反应中形成的扩增产物,从而可以检测和定量样品中的微生物。实时荧光定量PCR方法使PCR技术发生了质的飞跃,目前在国内外已经被广泛应用于食品、医药和环境等研究领域。

实时定量PCR应用于乳酸菌的定量研究主要集中在发酵乳制品和益生菌制品中乳酸菌的定量,动物以及人类肠道中双歧杆菌、乳酸杆菌的定量等。2005年Monique等^[21]通过实时定量PCR方法对食用益生婴儿配方食品的婴儿排泄物中的几种双歧杆菌进行了鉴定和定量,并与传统的PCR方法和荧光原位杂交方法做了比较。实验结果显示,用荧光原位杂交与实时定量PCR方法定量双歧杆菌所得结果是相似的,表明这两种方法都可以在种属水平上对乳酸菌进行计数。2005年,Grat-tepanche等^[22]使用实时荧光定量PCR定量了使用混合发酵剂制作的干酪中*Lactococcus lactis subsp. cremoris*的数量。2006年,Friedrich等^[23]利用多重实时定量PCR方法计数了嗜温乳品发酵剂中的乳酸菌,同时使用流式细胞-荧光原位杂交技术进行定量,两种方法所得的结果一致,证明此方法可以准确有效地用于混合发酵剂中每种微生物的定量。2007年,Harrow等^[24]依据16S~23S间隔区序列

设计引物,用实时定量PCR分析了回肠中*Lactobacillus salivarius*的数量。2007年,陈津津等^[25]应用实时荧光定量PCR方法准确迅速地测定了幼兔肠道内双歧杆菌和乳杆菌的变化,得出其研究的长期肠外营养导致的肠屏障障碍可能与肠内双歧杆菌和乳杆菌的数量减少有关的结论。2008年,童睿等^[26]运用实时荧光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。依据16S rDNA序列设计通用引物和特异性探针,进行Taq-Man实时PCR检测,实验结果表明用实时荧光定量PCR法检测乳酸杆菌,比较快速、灵敏而且特异性较高。

乳酸菌作为益生菌家族中最重要的一员,已经被广泛应用于保健食品和药品。各种研究表明,乳酸菌的生理活动、菌体成分、代谢产物都具有保健功效。但是为了确定菌株以及相关产品的保健功效,需要以活菌数以及乳酸菌菌体总数作为衡量依据,需要特异性检测、鉴定和定量这些益生乳酸细菌。实时荧光定量PCR技术反应快速、检测过程相对简单、特异性及准确性都较高,可以很好的用于定量益生乳酸细菌制品中的微生物,从而提供质量保证。而且随着技术的不断发展,实时荧光定量PCR所使用的仪器会越来越简便、快速,使用成本会有所降低,会有更广泛的应用。

参考文献(References):

- [1] 张刚. 乳酸细菌—基础、技术和应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [2] 郭兴华. 益生乳酸细菌—分子生物学及生物技术[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [3] 王森,张臻裕,陈晓峰. 益生菌*Lactobacillus salivarius*的培养条件[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(6):42-44.
Wang Miao,Zhang Zhen-yu, Chen Xiao-feng. Study on cultural conditions of probiotic *Lactobacillus salivarius*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(6):42-44. (in Chinese)
- [4] Furet J P, Quenee P, Tailliez. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR[J]. *Int J Food Microbiol*,2004, 97(2):197-207.
- [5] Shan N P. Probiotic bacteria:selective enumeration and survival in dairy foods[J]. *Journy of Dairy Sci*, 2000, 83:894-907.
- [6] Marisa L, Wong, Juan F. Medrano. Real-time PCR for mRNA quantitation[J]. *Bio Techniques*, 2005, 39(1):1-11.
- [7] Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran C Y, et al. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy[J]. *Bio Techniques*,1996,21: 280-285.
- [8] Bustin S A, Benes V, T Nolan, et al. Quantitative real-time RT-PCR -a perspective[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*,2005, 34:597-601.
- [9] Parashar D, Chauhan D S, Sharma V D, et al. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research[J]. *Indian J Med Res*,2006,124:385-398.
- [10] Valasek M A,Repa J J. The power of real-time PCR[J]. *Adv Physiol Educ*,2005,29: 151-159.
- [11] Zhang T,Herbert H P F. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2006,70: 281-289.
- [12] 都立辉,刘芳. 16S rRNA基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术,2006,5:207-209.

- Li-hui Dou, Fang Liu. Application of 16S rRNA gene in identification of bacteria[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2006, 5: 207-209. (in Chinese)
- [13] Martin B, Jofre A, Garriga M, et al. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by Real-Time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6040-6048.
- [14] Rodriguez H, Rivas Bdl, Murioz R. Efficacy of recA gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115: 70-78.
- [15] Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, et al. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-Restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2008, 74(1): 208-215.
- [16] 侯晓丽, 陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标—gyrB 基因. 国外医学[J]. 流行病学传染病学分册. 2005, 32(1): 38-41.
Xiaoli Hou, Zhi Chen. gyrB Gene—the new target gene sequence used in classification and identification of bacteria[J]. *Foreign Medical Sciences Epidemiology Lemology*, 2005, 32(1): 38-41. (in Chinese)
- [17] Ventura M, Canchaya C, Meylan V, et al. Analysis, Characterization, and loci of the tuf genes in lactobacillus and bifidobacterium species and their direct application for species identification[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6908-6922.
- [18] Masco L, Vanhoutte T, Temmerman R, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113(3): 351-357.
- [19] 赵敏, 潘劲草, 叶榕, 等. 实时荧光定量 PCR 快速鉴定短乳杆菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 209-211.
Zhao Min, Pan Jin-cao, Ye Rong, et al. Rapid detection of *Lactobacillus brevis* with fluorescence real-time quantitative PCR[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(2): 209-211. (in Chinese)
- [20] Mackay I M. Real-time PCR in the microbiology laboratory[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10: 190-212.
- [21] Haarman M, Knol J. Quantitative real-time pcr assays to identify and quantify fecal bifidobacterium species in infants receiving a prebiotic infant formula[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2318-2324.
- [22] Grattepanche F, Lacroix C, Audet P, et al. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris in milk fermented by a mixed culture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66(4): 414-421.
- [23] Friedrich U, Lenke J. Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4163-4171.
- [24] Harrow S A, Ravindran V, Butler R C, et al. Real-time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from broiler chickens to determine the influence of farming practises[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7123-7127.
- [25] 陈津津, 蔡威. 应用 real-time PCR 测定幼兔肠道内双歧杆菌和乳杆菌的变化. 世界华人消化杂志, 2007, 15(31): 3278-283.
Jin-Jin Chen, Wei Cai. Quantification of bifidobacteria and lactobacilli in feces of PN rabbits by real-time PCR[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2007, 15(31): 278-283. (in Chinese)
- [26] 童睿, 张媛, 郑秋月, 等. 食品中乳酸杆菌的实时荧光 PCR 的快速检测[J]. 现代食品科技. 2008, 24(1): 86-88.
Tong Rui, ZHANG Yuan, Zheng Qiu-yue, et al. Rapid detection of lactobacillus in food by real-time PCR[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(1): 86-88. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)