

叠氮溴化丙锭-qPCR 法定量检测植物乳杆菌

马 丹¹, 杨彬彬², 陶文靖³, 郭敏卓¹, 张 捷¹, 魏咏新¹, 李 丹¹, 魏海燕¹, 曾 静^{1*}

(1. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026; 2. 优合集团有限公司, 深圳 518063;

3. 北京美正生物科技有限公司, 北京 102100)

摘 要: **目的** 将叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)与实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)相结合, 建立一种活性植物乳杆菌定量检测的 PMA-qPCR 方法。**方法** 首先进行引物探针特异性验证, 优化 PMA 反应条件, 建立标准曲线, 验证灵敏度, 然后将该方法用于检测人工添加奶粉、米粉、酸奶样品以及冻干样品中的植物乳杆菌。**结果** 最佳 PMA 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 最佳曝光时间为 10 min, 建立的 PMA-qPCR 方法可以快速、高效、特异地检测植物乳杆菌, 利用细菌纯培养物与对应 Ct 值建立标准曲线, 可以看出纯培养物浓度与 Ct 值之间存在对应线性关系, 相关系数(r^2)为 0.9992, 最低检测限为 15 拷贝/反应体系, 人工添加样品以及冻干样品检测中 PMA-qPCR 和平皿计数法结果的对数值进行配对 t 检验, 显示在不同的人工添加样本以及冻干样品中均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 本研究建立的 PMA-qPCR 检测方法能快速、准确、特异、灵敏地定量检测活性植物乳杆菌。

关键词: 叠氮溴化丙锭; 植物乳杆菌; 实时荧光定量 PCR

Quantitative detection of *Lactobacillus plantarum* by propidium monoazide-qPCR

MA Dan¹, YANG Bin-Bin², TAO Wen-Jing³, GUO Min-Zhuo¹, ZHANG Jie¹, WEI Yong-Xin¹,
LI Dan¹, WEI Hai-Yan¹, ZENG Jing^{1*}

(1. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China; 2. Optima Integration Group, Shenzhen 518063, China; 3. Beijing Meizheng Bio-Tech Co., Ltd., Beijing 102100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a quantitative assay method to detect *Lactobacillus plantarum* based on using propidium monoazide (PMA) combined with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Methods** The specificity of the primer probe was verified, the PMA reaction condition was optimized, and the standard curve was established to verify the sensitivity. Secondly, the method was applied to the detection of *Lactobacillus plantarum* in artificially added milk powder, rice flour, yogurt samples and lyophilized samples. **Results** The optimal PMA concentration was 2 $\mu\text{g/mL}$, and the optimal exposure time was 10 min. The established PMA-qPCR method could detect *Lactobacillus plantarum* rapidly, efficiently and specifically. The standard curve was established based on the pure bacterial culture and the corresponding Ct value. It could be seen that there was a corresponding linear relationship between the pure culture concentration and Ct value, with the correlation coefficient (r^2) of 0.9992 and the minimum detection limit of 15 copies/reaction system. The paired t -test of the paired values of

基金项目: 海关总署科研项目(2019HK098)

Fund: Supported by the Research Project of General Administration of Customs (2019HK098)

*通信作者: 曾静, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: jingzeng_cn@163.com

*Corresponding author: ZENG Jing, Ph.D, Professor, Science and Technology Research Center of China Customs, No. 6, Tianshuiyuan Str. Chaoyang District, Beijing 100026, China. E-mail: jingzeng_cn@163.com

PMA-qPCR and plate counting in the detection of manually added samples and lyophilized samples showed no significant difference among the different manually added samples and lyophilized samples ($P>0.05$). **Conclusion** This PMA-qPCR detection method can quickly, accurately, specifically and sensitively quantitatively detect active *Lactobacillus plantarum*.

KEY WORDS: propidium monoazide; *Lactobacillus plantarum*; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

0 引言

乳酸菌是一群通过发酵糖类,产生大量乳酸的细菌总称。作为最具代表性的益生菌,乳酸菌在乳制品发酵等领域有着悠久的历史,其相关产品也因独特的口感和丰富的营养价值而日益受到人们的追捧。目前市场上添加乳酸菌的食品种类繁多,良莠不齐。由此,对该类产品质量的监管,特别是对其所含乳酸菌种类和数量的鉴定尤为重要。

植物乳杆菌是一类革兰氏阳性、厌氧或兼性厌氧菌,属于同型发酵乳酸菌,是我国卫生部颁布的可用于食品的益生菌之一^[1]。国内食品乳酸菌的检测主要依据是国家标准 GB 4789.35—2016《食品微生物学检验 乳酸菌检验》,且在 GB 19302—2010《食品安全国家标准 发酵乳》中明确规定了发酵乳中乳酸菌数的限量应 $\geq 1 \times 10^6$ CFU/g(mL),因此数量多、活性好和可食用成为了乳酸菌的核心特征^[2]。可见,作为一种要求定量的检测项目,其结果的准确性成为正确评价产品质量的关键。目前,乳酸菌定量检测仍主要依赖于平板计数法,该方法是基于传统倾倒平板培养的定量方法,需要大量的培养基和后续生化鉴定等步骤,不仅操作烦琐,而且检测周期长(3~7 d)^[3],特别是容易受到样品中其他潜在杂菌的干扰。因此,建立一种能够快速准确地检测益生菌活菌数的方法显得尤为重要。

本研究基于核酸共价交联技术从分子水平寻找细菌活的状态的标志物,建立活菌的检测方法。叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)是一种能和 DNA 共价交联的光敏材料,光照可以使 PMA 的光敏基团转化为氮宾自由基,其可以和 DNA 发生共价交联,进而阻断 DNA 分子的 PCR 扩增,且 PMA 只能选择性的渗透死菌的细胞膜,不影响活菌 DNA 的扩增^[4-6],因此 PMA 和 PCR 技术相结合在定量检测活菌方面有巨大的发展潜力^[7-8]。本研究将 PMA 与 qPCR 技术相结合,建立了高灵敏和高特异性的检测植物乳杆菌的新方法,避免了 qPCR 检测不能区别活/死菌的缺点^[9],同时能快速、准确地对活菌进行定量检测。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

本研究共使用 60 株菌(表 1)。其中,植物乳杆菌标准菌株 2 株、乳酸菌 23 株、嗜热链球菌 2 株、其他远源食源性致病菌标准菌株 33 株。

乳酸菌采用乳酸细菌培养基(man rogosa sharpe, MRS)进行活化,36 °C 厌氧培养 24~72 h。挑取纯培养后的单菌落到 10 mL MRS 中,37 °C、厌氧培养 18~72 h,10 倍梯度稀释后用于检测。其他食源性致病菌采用营养琼脂,37 °C 培养 24 h。挑取纯培养后的单菌落到 10 mL 营养肉汤中,37 °C、160 r/min 摇床培养 18 h,10 倍梯度稀释后用于检测。

1.2 材料与试剂

乳酸细菌培养基 MRS(北京陆桥技术股份有限公司);DNA 提取试剂盒(货号:DP302)、SuperReal PreMix(Probe) SuperReal 荧光定量预混试剂(货号:FP206)、溶菌酶(货号:RT401)(天根生化科技有限公司);叠氮溴化丙锭 PMA(货号:40013,美国 Biotium 公司);实验室自制植物乳杆菌冻干样品;二甲基亚砜(分析纯,天津福晨化学试剂厂)。

1.3 仪器与设备

Centrifuge 5424 离心机(德国 Eppendorf 公司);Friocell 恒温培养箱(德国 MMM 公司);Lightcycler 480II 荧光 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国赛默飞公司);500W 卤钨灯(荷兰飞利浦公司)。

1.4 方法

1.4.1 引物探针的设计与筛选

为实现对植物乳杆菌的特异性检测和绝对定量分析,本研究选取植物乳杆菌具有种属特异性且高度保守的单拷贝植物乳杆菌素基因(*plnF*, GenBank no. AP018405.1)作为靶序列,通过 NCBI 在线工具进行序列分析和比对,利用 Prime Express 软件 V3.0 (ABI, Foster City, CA, USA)设计出

引物和探针组合, 序列见表 2。探针 5'端标记 FAM, 3'端标记 BHQ。引物/探针由上海生工生物有限公司合成。利用

qPCR 对植物乳杆菌 CICC 6076 和 CICC 6009 基因组 DNA 进行检测, 并利用表 1 菌株验证设计引物探针的特异性。

表 1 实验用菌株列表
Table 1 List of experimental strains

序号	菌株名称	菌株来源及编号	数量	序号	菌株名称	菌株来源及编号	数量
1	植物乳杆菌	CICC 6076	1	31	英诺克李斯特	ATCC 33090	1
2	植物乳杆菌	CICC 6009	1	32	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC 13932	1
3	长双歧杆菌	CICC 6068	1	33	金黄色葡萄球菌	ATCC 25923	1
4	婴儿双歧杆菌	CICC 6069	1	34	乙型溶血性链球菌	ATCC 21059	1
5	青春双歧杆菌	CICC 6070	1	35	粪链球菌	ATCC 29212	1
6	两双歧杆菌	CICC 6071	1	36	嗜肺军团菌血清1型	ATCC 33153	1
7	短双歧杆菌	CICC 6079	1	37	蜡样芽孢杆菌	ATCC 11778	1
8	动物双歧杆菌	CICC 6165	1	38	枯草芽孢杆菌	IQCC 22710	1
9	德式乳杆菌保加利亚亚种	CICC 6045	1	39	苏云金芽孢杆菌	CMCC 11486	1
10	发酵乳杆菌	CICC 20176	1	40	环状芽孢杆菌	CICC 10353	1
11	类干酪乳杆菌	CICC 20241	1	41	产气荚膜梭菌	ATCC 13124	1
12	罗伊氏乳杆菌	CICC 10855	1	42	生孢梭菌	CMCC 64941	1
13	瑞士乳杆菌	CICC 20243	1	43	副溶血性弧菌	ATCC 17802	1
14	嗜酸乳杆菌	CICC 20248	1	44	溶藻弧菌	CICC 10889	1
15	鼠李糖乳杆菌	CICC 20061	1	45	创伤弧菌	ATCC 27562	1
16	干酪乳杆菌	LMG 9479	1	46	肠沙门氏菌双亚利桑那亚种	ATCC 12325	1
17	<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	LMG 23133	1	47	鼠伤寒沙门氏菌	CMCC 50115	1
18	鸡乳杆菌	LMG 9435	1	48	甲型副伤寒沙门氏菌	CMCC 50001	1
19	淀粉乳杆菌	LMG 9496	1	49	阪崎肠杆菌	ATCC 29544	1
20	莱士曼氏乳酸杆菌	CICC 6077	1	50	铜绿假单胞菌	ATCC 27853	1
21	鼠李糖乳杆菌	CICC 6224	1	51	施氏假单胞菌	ATCC 17588	1
22	干酪乳杆菌	CICC 6117	1	52	奇异变形杆菌	CMCC 49106	1
23	德式乳杆菌保加利亚亚种	CICC 6047	1	53	普通变形杆菌	CMCC 49002	1
24	嗜酸乳杆菌	CICC 6074	1	54	大肠埃希氏 STEC	CICC 10668	1
25	罗伊氏乳杆菌	CICC 6226	1	55	大肠埃希氏菌	ATCC 29522	1
26	嗜热链球菌	CICC 20174	1	56	大肠埃希氏菌 O157:H7	CICC 21530	1
27	嗜热链球菌	CICC 6063	1	57	福氏志贺氏菌	ATCC 12022	1
28	单核细胞增生李斯特氏菌	ATCC 19111	1	58	阴沟肠杆菌	ATCC 700323	1
29	伊氏(绵羊)李斯特	ATCC 19119	1	59	产气肠杆菌	ATCC 13048	1
30	威氏李斯特	ATCC 35897	1	60	空肠弯曲杆菌	ATCC 33291	1
合计							60

表 2 qPCR 引物/探针序列
Table 2 qPCR primer/probe sequences

靶基因名称	引物/探针名称	序列(5'-3')	位置 ^{a)}	扩增长度
<i>plnF</i>	<i>plnF</i> -F	GCGTGACCGTGAATTAAATGC	21~41	93 bp
	<i>plnF</i> -R	GGCCCAACAGCACTTTTATAATTG	90~113	
	<i>plnF</i> -P	TTTTCATGCCTATAGCGCGCGTG	56~79	

注:^{a)} 引物/探针位置参考 GenBank no. AP018405.1 (*plnF* 基因)。

1.4.2 受损菌液的制备及 PMA 试剂的配制

吸取培养 18 h 的植物乳杆菌 10 倍梯度稀释, 取 10⁻² 菌液于离心管中, 沸水浴 5 min, 吸取 1 mL 涂布于 MRS 琼脂培养基, 37 °C 培养 24 h 观察是否有菌落长出。

将 1 mg PMA 染料溶于 1 mL 20% 二甲基亚砷中制成 1 mg/mL 的储存液, 置于 -20 °C 避光保存。将 PMA 储存液稀释 10 倍后作为工作液。

1.4.3 最佳 PMA 浓度的选取

PMA 作用的最小浓度: 取 500 μL 1.4.2 制备的受损菌液 10 份于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 PMA 使其终质量浓度为 0、2.0、5.0、7.5、10、15、20、30、40、50 μg/mL, 充分混匀, 避光孵育 10 min 后, 将离心管置于 500 W 卤钨灯下 20 cm 处曝光 15 min (管口朝上, 置于冰上) 进行光反应。随后用试剂盒提取基因组 DNA, 进行 qPCR 检测, 确定 PMA 抑制死细胞 DNA 扩增的最小浓度。

不影响活菌扩增的 PMA 的最大浓度: 取 500 μL 10⁻² 稀释度活菌液 8 份于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 PMA 使其终质量浓度为 0、5.0、10、15、20、30、40、50 μg/mL, 充分混匀, 避光孵育 10 min 后, 将离心管置于 500 W 卤钨灯下 20 cm 处曝光 15 min (管口朝上, 置于冰上) 进行光反应。随后用试剂盒提取基因组 DNA, 进行 qPCR 检测, 确定 PMA 不影响活菌 DNA 扩增的最大浓度。

1.4.4 最佳曝光时间的选取

取 500 μL 1.4.2 制备的受损菌液 6 份于 1.5 mL 离心管中, 加入 PMA 使其终质量浓度为 15 μg/mL, 充分混匀, 避光孵育 10 min, 使 PMA 与样品充分反应。然后将样品平放于冰上, 避免受热过度。置于 500 W 卤钨灯下 20 cm 分别照射 0、2、5、10、15、20 min。随后用试剂盒提取基因组 DNA, 进行 qPCR 检测, 确定 PMA 处理的最佳曝光时间。

1.4.5 基因组 DNA 提取与超微量分光光度计测定

利用 MRS 对植物乳杆菌(CICC 6076)的过夜培养

菌悬液进行 10 倍梯度稀释, 进行优化条件后的 PMA 处理。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取各稀释度 1 mL 的菌液 DNA, 提取步骤按照试剂盒说明书进行, 最终将核酸溶解在 100 μL TE 缓冲液(Tris-EDTA buffer solution)中。对提取的核酸用超微量分光光度计进行浓度和纯度的测定, 确保提取核酸的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间, 并按公式(1)计算提取植物乳杆菌基因组 DNA 的拷贝浓度:

$$\begin{aligned} \text{细菌基因组拷贝数}/\mu\text{L} &= \frac{m \times 10^{-9}}{n \times 660} \times (6.02 \times 10^{23}) \\ &= \frac{m \times 10^{-9}}{3.23 \times 10^6} \times 9.12 \times 10^{21} \end{aligned} \quad (1)$$

其中 m 代表超微量分光光度计测得的核酸浓度(ng/μL); n 代表细菌基因组的长度(bp), 根据 NCBI 上已经发布的植物乳杆菌基因组的测序数据, 其平均长度为 3.23×10⁶ bp。

1.4.6 PMA-qPCR 检测

20 μL 的 qPCR 反应体系包括: 2×SuperReal PreMix(Probe) 10 μL, 10 μmol/L 的上游、下游引物各 0.6 μL、探针 0.4 μL, 待测 DNA 模板 5 μL。于 Lightcycler 480II 荧光 PCR 仪上进行扩增, 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 进而 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 40 个循环。反应完成后利用 Excel 软件进行分析。以 10 倍梯度稀释纯菌液中提取的 DNA 作为标准品, 根据公式(1)计算出的标准品浓度对数值为横坐标, 以对应 Ct 值为纵坐标, 绘制 qPCR 标准曲线, 根据回归公式和 qPCR 检测 Ct 值计算未知样品的靶基因拷贝数。

1.4.7 平板计数

对 10 倍梯度稀释的植物乳杆菌(CICC 6076)纯菌液, 分别吸取 1 mL 于无菌平皿内, 每个稀释度做 2 个平皿。及时将 15~20 mL 冷却至 46 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后, 36 °C 倒置培养 24 h±2 h。选取菌落数在 30~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数, 每个稀释度菌落数应取 2 个平板计数结果的平均数。

1.4.8 人工添加样品及植物乳杆菌冻干样品的检测

选择无植物乳杆菌添加的荷莱蕊婴儿配方奶粉(0~6 月龄 1 段)样品、溪宝之家婴幼儿多种水果米精粉样品、伊利原味风味发酵乳样品作为添加基质, 这 3 种基质均添加了不同的乳杆菌和双歧杆菌。每种基质进行 3 种菌浓度水平的添加, 取过夜培养液原液、 10^{-2} 、 10^{-4} 稀释度植物乳杆菌(CICC 6076)菌液各 1 mL 分别添加到盛有 25 g 样品的均质袋中, 另取 1 份 25 g 样品作为阴性对照, 上述样品加入 225 mL 0.85%生理盐水混匀, 用拍击式均质器拍击 2 min, 制成高、中、低系列体积比为 1:10 含有不同浓度植物乳杆菌的添加样品。取各样品匀液 1 mL 用于传统方法平板计数, 再取各样品匀液 1 mL 用 PMA 处理后, 分别利用试剂盒法提取细菌基因组 DNA, 最终将核酸溶解在 100 μ L TE 缓冲液中, 进行 PMA-qPCR 检测。

取 3 份实验室自制植物乳杆菌冻干样品, 用 10 mL 0.85%生理盐水进行复溶, 复溶液记为 10^{-1} 稀释液, 使用 0.85%生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 选取适宜稀释度进行平板计数, 并取 1 mL 10^{-2} 菌液用 PMA 处理后, 利用试剂盒法提取细菌基因组 DNA, 最终将核酸溶解在 100 μ L TE 缓冲液中, 进行 PMA-qPCR 检测。

1.5 统计学分析

人工添加样本及冻干样品通过 SPSS 17.0 进行配对 t 检验比较 PMA-qPCR 和平板计数方法的定值结果, $P<0.05$ 时存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 引物探针的设计与筛选

以植物乳杆菌单拷贝基因 *plnF* 为靶基因设计出引

物、探针, 利用 *plnF*-F/R/P 引物探针对表 1 所列菌株 DNA 进行 qPCR 检测。结果发现 qPCR 仅对 2 株植物乳杆菌标准菌株 CICC 6076 和 CICC 6009 出现阳性扩增信号, 其他乳酸菌及嗜热链球菌(图 1A)和食源性致病菌(图 1B)均呈阴性。综上可见, *plnF*-F/R/P 特异好, 将其用于后续的定量分析实验。

2.2 PMA 实验条件的优化

2.2.1 最佳 PMA 浓度的优化

沸水浴 5 min 后, 无活菌生长, 菌液可用来进行 PMA 浓度优化, 不同浓度 PMA 对植物乳杆菌的影响见图 2。在 qPCR 实验中随着 PMA 浓度的增大, 受损菌 DNA qPCR 扩增的 Ct 值明显升高(图 2A), 当 PMA 浓度超过 2.0 μ g/mL 时, Ct 值几乎不再发生变化, 但当 PMA 浓度超过 30 μ g/mL 时 Ct 值提前, 该情况的产生可能由于高浓度 PMA 会释放一定量的荧光信号, 导致在扩增过程中有本底的产生。对于活菌的 PMA 浓度实验表明, 超过 30 μ g/mL 时, 活菌 DNA qPCR 扩增的 Ct 值略高于不加 PMA 的对照组(图 2B), 高浓度 PMA 影响了活菌 DNA 的 qPCR 扩增。根据 qPCR 实验结果, PMA 选取范围在 2.0~30 μ g/mL 之间, 鉴于为避免 PMA 对活菌产生影响, 本研究选用 2 μ g/mL PMA 为最佳浓度。

2.2.2 最佳曝光时间的优化

曝光时间对 PMA 处理受损植物乳杆菌的影响见图 3。随着光照时间的增加, qPCR 体系的 Ct 值迅速升高, 光照时间超过 10 min 后, 体系的 Ct 值不再发生明显变化, 说明 PMA 和 DNA 发生了共价交联反应, 多余的 PMA 与水溶液反应生成没有活性的羟胺。本研究选取 10 min 作为最佳曝光时间。

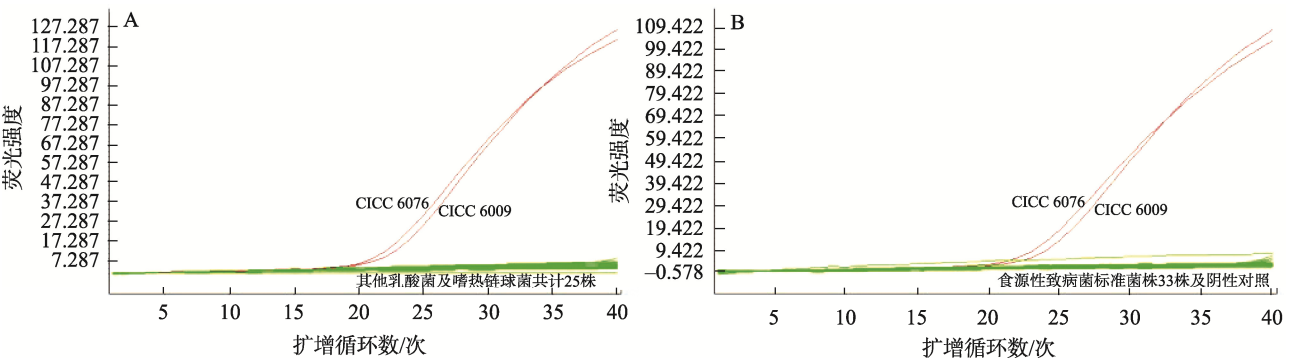
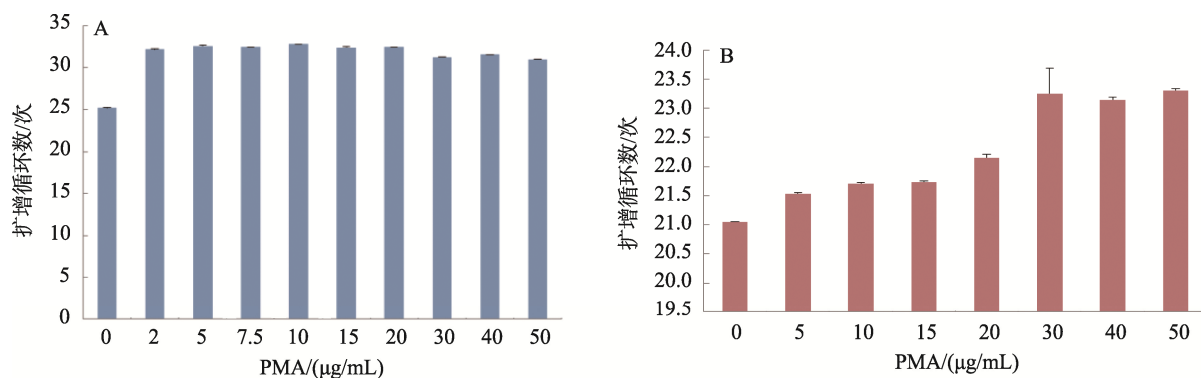
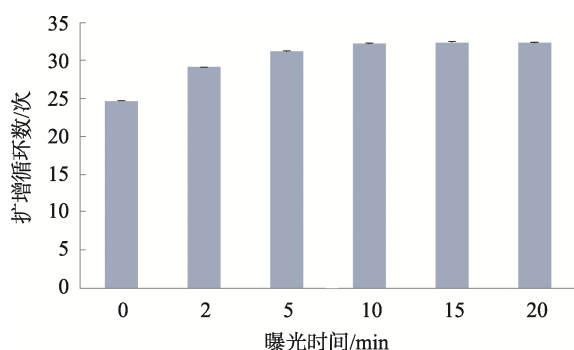


图 1 qPCR(A、B)对引物探针的特异性验证
Fig.1 Specificity verification of primer/probe by qPCR (A, B)

图 2 不同浓度 PMA 对受损细菌(图 A)和活菌(图 B)的影响($n=3$)Fig.2 Effect of different concentrations of PMA on damaged bacteria (A) and live bacteria (B) ($n=3$)图 3 不同曝光时间对经 PMA 处理的受损菌的影响($n=3$)Fig.3 Effect of different exposure time on damaged bacteria treated by PMA ($n=3$)

2.3 植物乳杆菌纯菌液中 qPCR、平板计数、超微量分光光度计测定结果的比较

植物乳杆菌(CICC 6076)的过夜培养菌悬液经平板计数测得其浓度为 3.1×10^9 CFU/mL, 其对数值为 9.49。提取 1 mL 菌液 DNA, 最终溶于 100 μ L TE 缓冲液中, 经超微量分光光度计测定, 其原始菌液 DNA 浓度为 111.5 ng/ μ L, 代入公式(1)算得基因组 DNA 浓度为 3.1×10^7 拷贝/ μ L, 按照 1 拷贝基因组对应 1 个 CFU 菌落, 则原始菌液浓度为 3.1×10^9 CFU/mL, 其对数值为 9.49, 核酸蛋白分析仪及平板计数法测得值一致。取各稀释度菌液 DNA 进行 qPCR 检测, 结果发现 qPCR 能检测到 10^{-7} (图 4)。以标准品浓度的对数值为横坐标, Ct 值为纵坐标建立标准曲线, 标准品浓度与 Ct 值之间存在对应线性关系, 相关系数(r^2)=0.9992, 斜率为 -3.4538, 线性公式为 $Y = -3.4497X + 41.224$, 扩增效率为 94.93%, 在可接受范围内(90%~105%), 最低可以检出 15 拷贝/反应体系的植物乳杆菌。

2.4 人工添加样品 PMA-qPCR 定量检测结果的比较

对不同植物乳杆菌浓度人工添加的奶粉、米粉、酸奶样品以及冻干样品进行 PMA-qPCR 检测, 并在标准品所建立的标准曲线($Y = -3.4497X + 41.224$, $r^2 = 0.9992$)上得到样品的拷贝数, 结果如表 3 和表 4 所示。将 PMA-qPCR 与平皿计数法结果的对数值进行配对 t 检验, 结果显示二者结果在不同的人工添加样本以及冻干样品中均无显著性差异($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

本研究建立了针对植物乳杆菌的 PMA-qPCR 定量检测方法, 无需进行平板培养及后续的特征性菌落鉴定、生化分析等步骤, 大幅缩短检测时间, 简化操作流程, 展现出了广阔的应用前景。目前, 就国内外研究而言, 一些研究者指出平板计数法检测的是可培养的活菌, 而实际样品中存在未能培养的活菌^[10]。利用 qPCR 方法能快速准确特异地检测乳酸菌, 如张娜娜等^[11]利用 qPCR 方法定量检测乳酸菌饮料样品中的嗜酸乳杆菌, 检测的绝对灵敏度达到 3 pg, 相对灵敏度达到了 10^3 CFU/mL。但是无法区分活/死菌是 qPCR 方法的严重不足^[9], 因此加入叠氮类染料 PMA 或 EMA 与 qPCR 结合检测活菌, 目前 PMA-qPCR 技术已经广泛应用在食品、水产品等中的致病微生物安全检测中^[12-16]。在乳酸菌定量检测研究方面, TOMAS 等^[17]利用 PMA-qPCR 方法定量分析检测乳制品中的 4 种乳酸菌, PMA-qPCR 的结果与平板计数的结果很接近, 且检测可在 3 h 内完成。MENG 等^[18-19]采用 EMA/PMA 与 qPCR 结合法和平板计数法定量检测乳杆菌和双歧杆菌, 结果表明 2 种方法检测结果无显著性差异, 并可在 4 h 内完成商业酸奶中活的双歧杆菌检测。

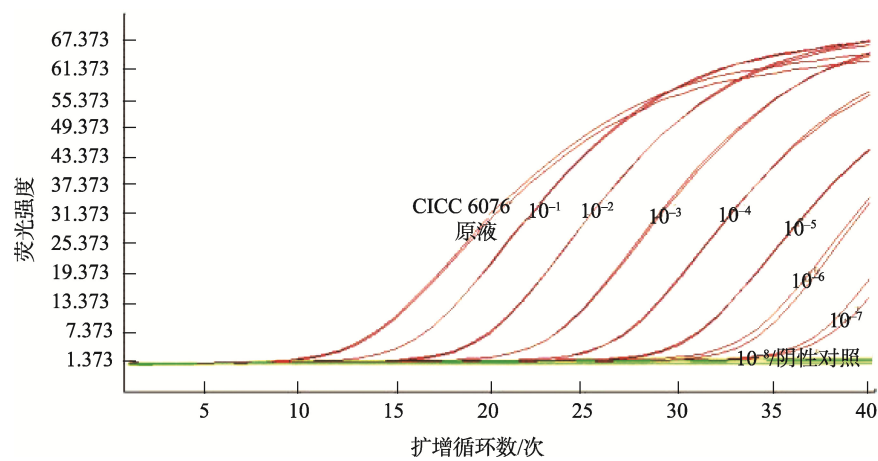


图 4 梯度稀释的植物乳杆菌纯菌液 qPCR 扩增图谱

Fig.4 qPCR amplification map of *Lactobacillus plantarum* pure culture of gradient dilution

表 3 人工添加样品 PMA-qPCR 结果与平皿法计数比较

Table 3 Comparison of PMA-qPCR results of artificial added samples with plate counting

添加样品基质	添加菌液浓度	qPCR 结果/(拷贝/g)	qPCR 结果取对数	平板计数结果/(CFU/g)	平板计数结果取对数
奶粉	原液	5.6×10^7	7.75	1.1×10^8	8.04
	10^{-2}	6.2×10^5	5.795	1.4×10^6	6.15
	10^{-4}	6.6×10^3	3.82	7×10^3	3.85
米粉	原液	5.5×10^7	7.74	6.9×10^7	7.84
	10^{-2}	5.5×10^5	5.74	8.2×10^5	5.91
	10^{-4}	1.1×10^4	4.04	8.5×10^3	3.93
酸奶	原液	5.7×10^7	7.76	8.2×10^7	7.91
	10^{-2}	7.7×10^5	5.89	7.7×10^5	5.89
	10^{-4}	2.0×10^4	4.30	7.3×10^3	3.86

表 4 植物乳杆菌冻干样品 PMA-qPCR 结果与平皿法计数比较

Table 4 Comparison of PMA-qPCR results of *Lactobacillus plantarum* freeze-dried samples with plate counting

序号	qPCR 结果/(拷贝/g)	qPCR 结果取对数	平板计数结果/(CFU/g)	平板计数结果取对数
1	6.1×10^8	8.79	8.9×10^8	8.95
2	8.5×10^8	8.93	1.1×10^9	9.04
3	7.1×10^8	8.85	1.0×10^9	9.00

本研究选取植物乳杆菌单拷贝基因植物乳杆菌素基因设计 1 组引物和探针,能特异性检测植物乳杆菌活细胞,发现 *plnF*-F/R/P 在 qPCR 表现出较强的荧光扩增信号,且与其他常见乳酸菌和食源性致病菌均无非特异性反应,呈现出良好的特异性和排他性。经过对受损细菌和活菌的 PMA 浓度及曝光时间的优化实验,选取 2 μg/mL PMA

作为最佳反应浓度,选取 10 min 为最佳曝光时长。利用优化的 PMA-qPCR 技术对植物乳杆菌纯菌液进行检测,提取核酸浓度经计算与平板计数结果显示原始菌液浓度一致,显示最低检测限为 15 拷贝/反应体系。对人工添加的奶粉、米粉、酸奶样品以及植物乳杆菌冻干样品,PMA-qPCR 与平皿计数法结果的对数值进行配对 t 检验,结果显示两者结果在不同的人工添加样本以及冻干样品中均无显著性差异($P>0.05$),适用于实际样品的检测,并可在 4 h 内完成检测。

在梯度稀释的植物乳杆菌纯菌悬液中,PMA-qPCR 的检测范围为原液 $\sim 10^{-7}$,可见 qPCR 不受限于靶基因的高浓度,这与已有的研究结论是一致的^[20]。国内食品乳酸菌的产品标准 GB 19302—2010 中明确规定了发酵乳中乳酸菌数的限量应 $\geq 1 \times 10^6$ CFU/g(mL),因此高浓度检测是十分必要的。在人工添加的奶粉、米粉、酸奶样品以及冻干样品中,PMA-qPCR 的定量结果与平板计数结果均无显著性差异,但在奶粉添加结果中,中浓度添加水平,PMA-qPCR 结果为 6.2×10^5 拷贝/g,平板计数结果为 1.4×10^6 CFU/g,根据相应标准 1×10^6 CFU/g(mL)为临界值,因此当 PMA-qPCR 结果在 1×10^6 CFU/g(mL)附近时,需采用传统方法进行验证。并且由表 3 和表 4 数据可看出,PMA-qPCR 结果普遍低于平板计数结果,但随着添加浓度的降低,样品中 PMA-qPCR 相对平板计数结果出现了波动。究其原因,一方面 qPCR 作为一种相对定量检测技术,其结果很大程度上依赖于标准曲线的绘制,在本研究中,标准样品是提取自植物乳杆菌纯菌液的基因组 DNA,与提取自不同样品的待测核酸必然存在扩增效率上的差异,而在较低添加浓度样品中,Ct 值越高越易出现偏差,在相对定量方法中,Ct 值的偏差反应至标曲算出的数据波动就会较大,因此该方法特别适宜在高浓度添加样品中使用。而作为一种要求定量的检测项目,对活性乳酸菌的准确检出成为正确评价产品质量的关键,本研究建立的 PMA-qPCR 检测方法能快速、准确、特异、灵敏地定量检测活性植物乳杆菌。

参考文献

- [1] PEREZCANO FJ, DONG H, YAQOOB P. *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: Two probiotic strains isolated from human breast milk [J]. Immunobiology, 2010, 215(12): 996–1004.
- [2] 魏长浩, 邓泽元. 益生菌及其应用研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2018, 41(1): 26–32.
WEI CH, DENG ZY. Advances in probiotics research and its application [J]. J Dairy Sci Technol, 2018, 41(1): 26–32.
- [3] 李颖, 李婷. 影响乳酸菌平板菌落计数的方法研究[J]. 中国实用医药, 2016, 11(16): 287–288.
- LI Y, LI T. Study on the method of influencing the plate colony count of lactic acid bacteria [J]. China Pract Med, 2016, 11(16): 287–288.
- [4] FERREIDOUN F, TAIMOUR L, MOHAMMAD E, *et al.* Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA- mPCR) [J]. Food Control, 2015, 55: 151–157.
- [5] BTHA, BFIA. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR [J]. Syst Appl Microbiol, 2012, 35(6): 390–395.
- [6] ELIZAQUÍVEL P, AZNAR R, SÁNCHEZ G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field [J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(1): 1–13.
- [7] CAWTHORN DM, WITTHUHN RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide [J]. Appl Microbiol, 2008, 105: 1178–1185.
- [8] 全铁铮. PMA-qPCR 选择性检测水中活性菌方法的研究与应用[D]. 北京: 清华大学, 2010.
TONG TZ. Selective detection of viable pathogens in water using propidium monoazide combined with qPCR and its application [D]. Beijing: Tsinghua University, 2010.
- [9] 盖冬雪, 任洪林, 卢士英, 等. 乳品中大肠杆菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2): 493–498.
GAI DX, REN HL, LU SY, *et al.* Establishment of PMA-qPCR assay for detection of viable *E.coli* in milk [J]. China Anim Husbandry Vet Med, 2016, 43(2): 493–498.
- [10] 王杰, 郑亦舟, 姜凯, 等. 乳酸菌计数结果的比较研究[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2018, 47(6): 81–86.
WANG J, ZHENG YZ, JIANG K, *et al.* Comparative study on counting results in *Lactobacillus* counting method [J]. J Shanghai Norm Univ (Nat Sci Ed), 2018, 47(6): 81–86.
- [11] 张娜娜, 刘洋, 俞漪, 等. 乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 27–32.
ZHANG NN, LIU Y, YU Y, *et al.* Real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic beverages [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 27–32.
- [12] LU R, WANG K, FENG J, *et al.* Detection and quantification of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* [J]. Front Microbiol, 2020, 10: 2920.
- [13] JOO S, PARK P, PARK S. Applicability of propidium monoazide (PMA) for discrimination between living and dead phytoplankton cells [J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0218924.
- [14] 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.
- [15] 於颖, 王文静, 陆晔. PMA-qPCR 定量检测畜禽肉类中沙门菌活菌的研究[J]. 检验医学, 2015, 30(5): 500–506.
YU Y, WANG WJ, LU Y. Research on a quantitative method to detect

- viable *Salmonella* by PMA-qPCR in livestock and poultry meat [J]. Lab Med, 2015, 30(5): 500–506.
- [16] 陶怡君, 湛志筠, 何秋水. 叠氮溴化丙锭结合 qPCR 检测与区分活菌和死菌的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(6): 63–68.
- TAO YJ, CHEN ZY, HE QS. Advances in detection and differentiation of live and dead bacteria by PMA-qPCR technology [J]. Prog Microbiol Immunol, 2020, 48(6): 63–68.
- [17] TOMAS GC, RAQUEL T, CARMEN P, *et al.* Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifid bacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real time PCR [J]. Int Dairy J, 2009, 19(6/7): 405–409.
- [18] MENG XC, PANG R, WANG C, *et al.* Rapid and direct quantitative detection of viable bifidobacteria in probiotic yogurt by combination of ethidium monoazide and real-time PCR using a molecular beacon approach [J]. J Dairy Res, 2010, 77(4): 498–504.
- [19] SHEU SJ, HWANG WZ, CHEN HC, *et al.* Development and use of *tuf* gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products [J]. J Food Protect, 2009, 72(1): 93–100.
- [20] RICCHI M, BERTASIO C, BONIOTTI MB, *et al.* Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1174.

(责任编辑: 张晓寒 王欣)

作者简介



马 丹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测、分子生物学检测。
E-mail: madan1002cn@163.com



曾 静, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: jingzeng_cn@163.com