

# 耐热菌的竞争定量 PCR 检测方法优化与建立

李建科<sup>1</sup>, 冯再平<sup>2</sup>, 仇农学<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>陕西师范大学食品工程系, 西安 710062; <sup>2</sup>兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

**摘要:** 【目的】研究苹果浓缩汁中耐热菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 的定量 PCR 快速检测法。【方法】通过引物设计、PCR 扩增及凝胶纯化试剂盒回收, 构建并获得耐热菌的 PCR 竞争模板; 用获得的竞争模板作为定量内标物建立耐热菌的竞争定量 PCR (QC-PCR) 检测体系。【结果】经对建立的 QC-PCR 检测体系优化, 目标模板检测灵敏度由  $5 \times 10^4$  个分子/PCR 体系, 提高到 50 个分子/PCR 体系, 竞争模板和目标模板分子共扩增可检测到  $5 \times 10^2$  个目标模板分子/PCR 体系, 并能从人工回添苹果浓缩汁样品中定量检测到  $5 \times 10^3$  cfu/PCR 体系的耐热菌, 整个检测时间为 4~5 h, 比传统的细菌培养皿培养记数法时间 (4~5 d) 大大缩短。【结论】本研究建立的耐热菌竞争定量 PCR 检测法特异、快速, 可作为微生物 PCR 竞争模板构建和建立竞争定量 PCR 的方法学参考, 也可用于商品果汁和苹果浓缩汁工业化生产中耐热菌的快速检测和质量安全控制。

**关键词:** 耐热菌; 苹果浓缩汁; 竞争定量 PCR

## Optimization and Establishment of Quantitatively Competitive PCR System for the Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*

LI Jian-ke<sup>1</sup>, FENG Zai-ping<sup>2</sup>, QIU Nong-xue<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062; <sup>2</sup>College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050)

**Abstract:** 【Objective】To study the detective method of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate (AJC) by quantitatively competitive polymerase chain reaction (QC-PCR) system. 【Method】The QC-PCR system for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* was established through the primer design, PCR amplification, and reclaim of gel purification reagent box to construct and obtain the competitive template which was used as quantitative internal standards. 【Result】The QC-PCR system was optimized and established in this study, and the detective sensitivity of the target template had gotten better from  $5 \times 10^4$  to 50 molecules /PCR system. As a result of this,  $5 \times 10^2$  target template molecules /PCR system was detected when the two templates co-amplified, and  $5 \times 10^3$  cfu / PCR system of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in AJC was detected. The detective time (4 h to 5 h) is remarkably shortened from traditional method (4 d or 5 d) using plate culture counting. 【Conclusion】The method in this study is better than others in efficiency and specificity, which can be a reference for competitive template construction of microbe PCR and constructive methodology of QC-PCR. It has potential to be applied in AJC commercial production process for the rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

**Key words:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*; Apple juice concentrate (AJC); Quantitatively competitive polymerase chain reaction (QC-PCR)

## 0 引言

【本研究的重要意义】耐热菌 (thermo-acidophilic bacteria, TAB), 即耐热耐酸菌, 学名酸土环脂芽孢

杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), 是一种嗜热、嗜酸、好氧的杆菌, 其芽孢能经受酸性果汁加工中的巴氏杀菌而存活, 在适宜的温度下可大量繁殖, 引起果汁感官品质劣变, 耐热菌超标是浓缩果汁产品最为

收稿日期: 2005-03-02; 接受日期: 2005-11-29

基金项目: 国家科技攻关项目 (2001BA804A28) 和科技部“十五”星火计划项目 (2001EA85030)

作者简介: 李建科 (1960-), 男, 陕西扶风, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。Tel: E-mail: jiankel@snnu.edu.cn

严重的质量问题之一。因此,国际贸易中对果汁中耐热菌有严格要求,是苹果浓缩汁(apple juice concentrate, AJC)的必检项目,也是当前中国苹果浓缩汁出口中所遭遇的主要技术壁垒之一和AJC生产中亟待解决的问题<sup>[1~5]</sup>。【前人研究进展】目前,耐热菌的常规检测方法为传统的培养计数检测法,如美国库克食品实验室(Krueger Food Laboratories, KFL)的检测法<sup>[6]</sup>以及近年来国内报道的苹果浓缩汁中耐热菌的检测法<sup>[7~9]</sup>。这些传统的培养计数检测法耗时长,一般需要4~5 d才能出检测报告,无法及时反馈至生产线,从而成为AJC安全质量控制的难题。目前对耐热菌的PCR法快速检测研究报道较少,Yamazaki等<sup>[10]</sup>利用RT-PCR检测AJC中的耐热菌可在24 h作出检测结果,达到了快速检测,但只能定性,不能定量,且由于RNA的提取过程要求苛刻,反转录又使检测结果的不确定因素增多。Luo等<sup>[11]</sup>报道了实时PCR检测AJC中的耐热菌,可实现定量检测,但操作过程复杂,对仪器设备要求也很高。尽管PCR法检测耐热菌尚存在上述问题,然而PCR法检测耐热菌的快速、特异等特点比传统方法显示出明显的优势和极具吸引力的前景。【本研究切入点】基于PCR法快速、特异的优点,在现行耐热菌PCR定性检测方法的基础上<sup>[10,12]</sup>,本研究设计出构建耐热菌竞争模板的引物,获得并验证该竞争模板,用获得的耐热菌竞争模板作为定量内标物建立耐热菌的竞争定量PCR(quantitatively competitive polymerase chain reaction, QC-PCR)快速检测体系和方法。【拟解决的关键问题】耐热菌竞争模板和目标模板的PCR等效率共扩增及两条带在凝胶电泳上的清晰分开;优化检测体系和条件,使所建立的QC-PCR检测方法的检测灵敏度尽可能提高。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

标准菌株: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (DSM3922), 购于德国DSMZ。苹果浓缩汁: 由陕西恒兴果汁有限公司提供。

Taq DNA聚合酶, 引物, dNTP, 饱和酚: 上海生工(Sangon)。琼脂糖: Sigma Co.。EB(溴化乙锭): 美国Fluck。Na<sub>2</sub>EDTA(乙二铵四乙酸钠盐), Tris(三羟甲基氨基甲烷), 蛋白酶K, SDS: 上海Sangon(Amresco分装)。DNA分子量标准(DNA Marker), 凝胶回收试剂盒: 北京鼎国生物技术有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

台式高速离心机: 德国Eppendorf公司Centrifuge 5415D。PCR扩增仪: 英国hybaid PX II PCR仪; 德国Eppendorf梯度PCR仪(Mastercycler gradient 5331)。电泳仪: 南京大学DY602 V型。紫外透射检测仪: 上海康华生化仪器制造厂(ZF型)。一分钟凝胶成像仪, 一次性成像胶片: 美国宝利来(Polaroid)公司FOTODYNE。核酸/蛋白质分析仪: 美国Beckman公司DUR640。摇床: 上海福玛数显接种摇床。超净工作台: 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。纯水系统: 上海博通BSZ-2型自动双重纯水蒸馏器。微孔滤膜(孔径0.2 μm, φ25 mm): 购于陕西省化玻站。精密微量移液器: 德国Eppendorf(10 μl, 100 μl)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 耐热菌DNA模板制备 参照李海阔等<sup>[13]</sup>的氯化苄法略加改进: 取适量耐热菌培养液(或AJC检样经集菌)至1.5 ml的Eppendorf离心管中, 8 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 沉淀物加入250 μl的TE, 50 μl SDS和150 μl氯化苄, 混匀, 50℃温浴1 h。加入150 μl 3 mol·L<sup>-1</sup>的NaCl, 冰浴15 min。8 000 r/min离心10 min, 取上清加0.6体积异丙醇, 轻轻摇匀直到DNA沉淀下来, 12 000 r/min离心10 min, 弃上清。用体积分数70%的乙醇洗沉淀, 12 000 r/min离心2 min, 重复2次, 适当体积的TE缓冲液溶解沉淀, -20℃保存备用。

1.3.2 引物设计与PCR扩增 参照Yamazaki等<sup>[10]</sup>设计的引物: 引物1: 5'-ACGGGTAGGCATCTACT TGT-3', 引物2: 5'-AGGAGCTTTCCACTCTCCT TGT-3'。将两引物分别加适量无菌三蒸水稀释, 使其终浓度均为10 μmol·L<sup>-1</sup>。

预扩增按照王宏等<sup>[12]</sup>的果汁中耐热菌PCR扩增条件: 50 μl PCR体系中, Taq酶2U、Mg<sup>2+</sup>浓度2.0 mmol·L<sup>-1</sup>、dNTP浓度0.2 mmol·L<sup>-1</sup>、引物浓度0.2 μmol·L<sup>-1</sup>; 耐热菌DNA模板, 10 μl, 退火温度为58℃; 循环程序为: 94℃变性4 min后进入PCR循环, 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s, 扩增35个循环后72℃延伸补足5 min。PCR产物采用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 竞争模板构建 按Celi等<sup>[14]</sup>的构建竞争模板的原理, 笔者采用引物设计软件设计了引物3: 5'-AGGAGCTTTCCACTCTCCTTGTGCGGCGTTGC TCCGTCAGGCTT-3', 使用温度梯度PCR摸索引物1、3与模板的最佳退火温度。用Eppendorf PCR仪

在  $(50 \pm 10)$  °C 范围内设计退火温度依次为: 40.1、40.8、42.2、44.2、46.7、49.4、52.1、54.7、57.1 和 59.0 °C。进行温度梯度 PCR 扩增, 凝胶电泳, 紫外检测并拍照。

**1.3.4 竞争模板的获得与验证** 以 50  $\mu$ l PCR 体系, 使用引物 1、引物 2, PCR 得 298 bp 的目标模板 T。使用引物 1、引物 3, 采用温度梯度 PCR, 最佳退火温度 58°C, 扩增得到除比 T 中间少 51 bp 外, 其它部分相同的竞争模板 (247 bp), 以 C 表示。

扩增产物的验证, 使用引物 1、引物 2, 引物 1、引物 3, 分别以 1 000 倍稀释, 扩增产物 C 和 T, 再以 C 和 T 的混合物作为模板, 进行 3 组扩增, 凝胶电泳, 紫外观察拍照。由于 T 与 C 相差仅 51 bp, 采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

**1.3.5 竞争模板、目标模板的制备** 确证 C 后, 采用等量的耐热菌基因组 DNA 做模板, 分别以引物 1、2, 和引物 1、3 扩增得到足量的 C 和 T, 使用凝胶纯化试剂盒回收, 用紫外法测两种 DNA 浓度, 再根据二者分子量, 精确计算其分子数, 并稀释成每反应体系  $5 \times 10^{12}$  个分子, 10 倍梯度稀释, 得到  $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^{12}$  的 C、T 及 C+T, -4°C 保存备用。

**1.3.6 共扩增检测低限的确立及共扩增效率比较** 当两种扩增片段共扩增时, 会竞争酶、引物和底物, 可能会对检测低限产生影响, 应重新研究共扩增的检测低限。

取相应浓度的 C 与 T 混合, 得到每反应体系  $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$  个 C+T 的模板, 采用优化体系, 以引物 1、2 扩增, 凝胶电泳检测, 紫外观察照相, 得出 C 与 T 两种不同的模板在同一体系中竞争性扩增时的检测低限。

共扩增效率比较。竞争模板和目标模板的等效率扩增是竞争定量法获得准确定量的基础。因此, 对 C 与 T 的共扩增效率进行研究, 包括相同浓度的竞争模板和目标模板共扩增效率的研究, 及固定浓度的 T 与梯度浓度 C 共扩增效率的研究。前文对共扩增检测低限的确立也可以分析相同浓度的竞争模板和目标模板共扩增效率。对于固定浓度的 T 与梯度浓度 C 共扩增效率研究, 分别采用  $5 \times 10^4$  和  $5 \times 10^2$  个 T 分子, 与  $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^8$  个 C 分子共同扩增。

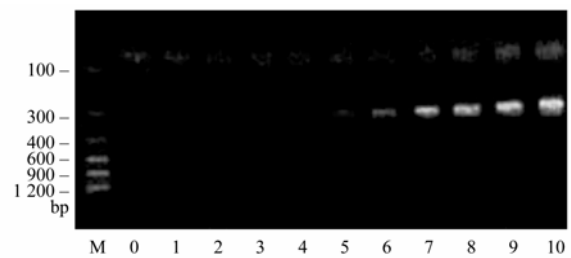
**1.3.7 竞争定量 PCR 检测体系的建立** 在本文建立的竞争定量 PCR 检测耐热菌的理论模型基础上, 分别以经计数已知的耐热菌标准菌株培养液及已知菌数培养液回添果汁样品, 用灭菌双蒸水稀释若干倍, 以无

菌滤膜过滤集菌, 将滤膜无菌操作转移入离心管中, 再用氯化苄法制备目标模板, 取目标模板 2.5  $\mu$ l, 同时取本研究制备的竞争模板 2.5  $\mu$ l, 以本文优化的 25  $\mu$ l QC-PCR 体系, 并采取热启动及降落 PCR 建立竞争定量 PCR 体系。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 预试验扩增

采用王宏等<sup>[12]</sup>的耐热菌 PCR 条件 (按 1.3.2) 进行预试验扩增, 目标模板为 T。由图 1 可见, 该体系的检测下限为  $5 \times 10^4$  个目标模板 (T) 分子, 并且可以看见明显的引物二聚体。



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1-10. 模板浓度分别为  $5 \sim 5 \times 10^9$  个 T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-10. The concentration of target template was  $5 \sim 5 \times 10^9$ , respectively

图 1 未优化体系的检测灵敏度及引物二聚体生成情况

Fig. 1 The sensitivity and primer dimer in the un-optimization PCR system

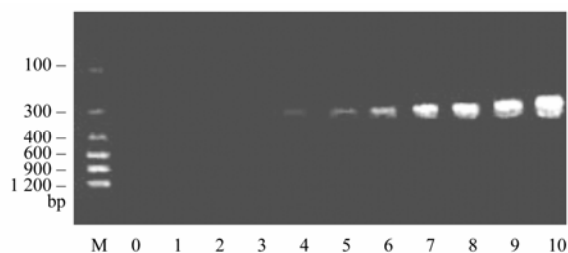
### 2.2 PCR 体系优化

对于预扩增试验<sup>[12]</sup>体系及条件优化, 采用热启动和降落 PCR, 并改 50  $\mu$ l PCR 体系为 25  $\mu$ l PCR 体系。**2.2.1 采取热启动降落 PCR** 采取降落 PCR 和热启动 PCR, 即 PCR 退火温度 60°C 降落到 50°C; 热启动采用的是在冰盒上将 PCR 反应体系各成分混匀后, 当 PCR 循环仪温度上升至 70°C 以上时, 再将各扩增样品置于循环仪中扩增, 凝胶电泳, 紫外检测并拍照。经过综合运用热启动与降落 PCR, 消除了引物二聚体, 提高了灵敏度, 可检出  $5 \times 10^3$  个 T 分子, 使检测灵敏度提高了 10 倍 (图 2)。

**2.2.2 PCR 体系优化及最低检测限确定** 经过各单因素条件试验, 25  $\mu$ l PCR 体系优化条件为: Taq 酶用量 1.4U, 最佳  $Mg^{2+}$  浓度确定为  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 添加 10% 的甘油作促进剂, dNTP 浓度  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物浓度

0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 目标模板 T 5  $\mu\text{l}$ ; 采用上述热启动降落 PCR; 循环程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 4 min 后进入 PCR 循环, 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s、60 $^{\circ}\text{C}$  降落到 50 $^{\circ}\text{C}$  30 s、72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 扩增 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸补足 5 min。

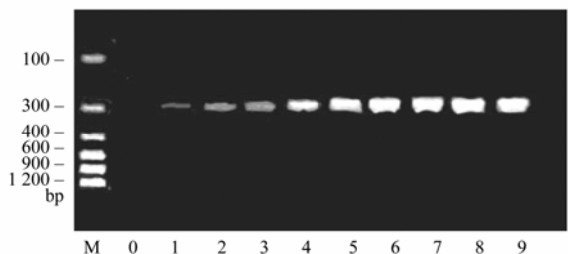
由图 3 可知, 优化后的体系能够检测到  $5\times 10^1$  个 T 分子, 与图 1 相比, 优化后的体系, 检测低限从  $10^4$  变为  $10^1$ , 提高了 3 个数量级, 检测灵敏度大为改善。



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1-10. 模板浓度分别为  $5\sim 5\times 10^9$  个 T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-10. The concentration of target template was  $5\sim 5\times 10^9$ , respectively

图 2 热启动降落 PCR

Fig. 2 Hot start and touchdown PCR



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1-9. 模板浓度分别为  $5\times 10\sim 5\times 10^9$  个 T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-9. The concentration of target template was  $5\times 10\sim 5\times 10^9$ , respectively

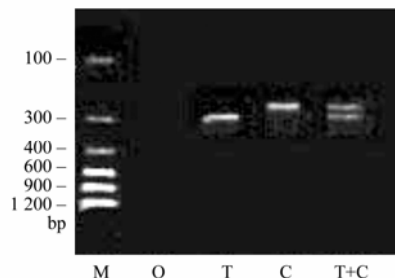
图 3 优化体系的检测极限

Fig. 3 The limit of detection (LOD) of optimization PCR system

### 2.3 竞争模板获得与验证

由图 4 可以清楚地看到, 模板 C、T 和 C+T 均能扩增出条带, 说明 C、T 的两端具有相同的引物结合位点; 并且以 C+T 为模板扩增得到的两条带在凝胶上

能清晰的分开, 两者位置位于 200~300 bp 之间, 相距约 50 bp, C 的大小与预期相符, 从而验证了 C 就是本试验欲得到的竞争模板。因为使用的 C、T 浓度相近, 电泳图上 C、T 分开扩增得到的条带亮度相近, 共同扩增得到的条带亮度也相近, 也可得到 C、T 扩增效率相似的初步结论。



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control

图 4 竞争模板验证

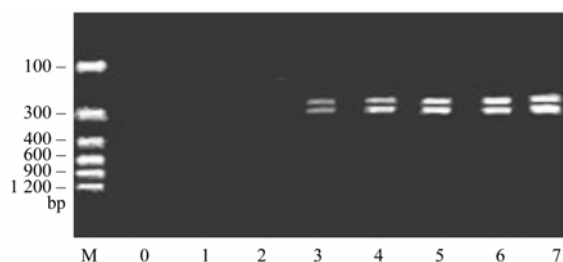
Fig. 4 Verification of mimics

### 2.4 共扩增检测低限的确立

由图 5 可见, 模板为  $5\times 10^2$  时, 扩增条带较清晰可辨。因此, 竞争模板与目标模板共扩增时的检测低限为  $5\times 10^2$  个靶分子。在后续试验中, 采用每反应体系  $5\times 10^2$  个靶分子为最低模板浓度。

### 2.5 共扩增效率比较

图 5 亦可说明, 相同浓度的竞争模板和目标模板共扩增, 每组得到的两种扩增条带亮度基本相同, 说明其共扩增效率基本相同。



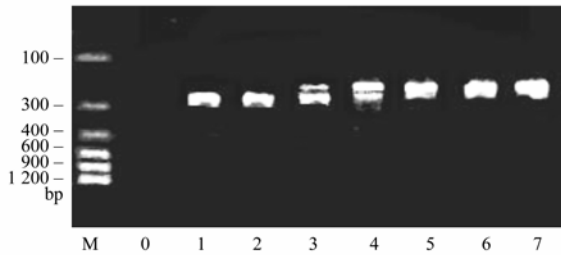
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1-7. 模板浓度分别为  $5\sim 5\times 10^6$  个 C+T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-7. The concentration of C+T template was  $5\sim 5\times 10^6$ , respectively

图 5 共扩增检测低限

Fig. 5 The LOD of co-amplification

同时,进行了不同竞争模板浓度和  $5 \times 10^4$  目标模板对共扩增效率的影响试验(图 6)。 $5 \times 10^4$  个 T 分子与  $5 \times 10^4$  个 C 分子共扩增的条带亮度相当,当 C 分子浓度高于 T 分子浓度时,抑制 T 分子扩增;当 C 分子浓度低于 T 分子浓度时,抑制 C 分子扩增。

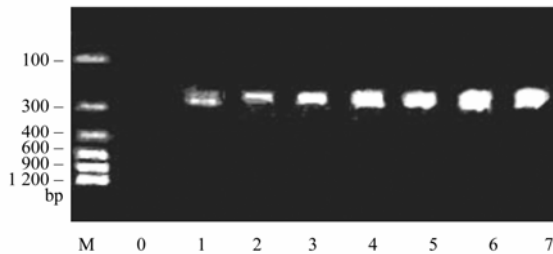
由图 7 可见,  $5 \times 10^2$  个 T 分子与  $5 \times 10^2$  个 C 分子共扩增的条带亮度相当,进一步说明只有相同或相近的 C 分子与 T 分子浓度才能共扩增。



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1~7. 模板浓度分别为  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^8$  个 C 分子及  $5 \times 10^4$  个 T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-7. The template of C and T are  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^8$  and  $5 \times 10^4$ , respectively

图 6  $5 \times 10^4$  个 T 分子与梯度浓度 C 分子共扩增结果

Fig. 6 Co-amplification of T ( $5 \times 10^4$ ) and gradient C



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1~7. 模板浓度分别为  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^8$  个 C 分子及  $5 \times 10^2$  个 T 分子  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-7. The template of C and T are  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^8$  and  $5 \times 10^2$ , respectively

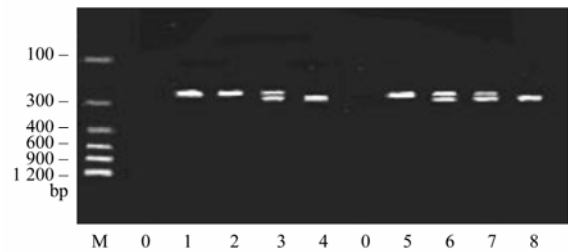
图 7  $5 \times 10^2$  个 T 分子与梯度浓度 C 分子共扩增结果

Fig. 7 Co-amplification of T ( $5 \times 10^2$ ) and gradient C

综合上述试验结果可以看出,当竞争模板与目标模板浓度相差不超过一个数量级时,两者扩增效率是相近的。即构建的竞争模板具有与目标模板相近的扩增效率,且两者扩增产物能够在凝胶电泳上清楚的分开,竞争模板构建成功。

## 2.6 竞争定量 PCR 检测体系的建立

**2.6.1 检测耐热菌标准菌株培养样品** 经过显微镜检计数,样品 1 和样品 2 两份标准菌增菌液分别含耐热菌的个数为每反应体系  $7.6 \times 10^3$  个和  $4.7 \times 10^4$  个。经本试验构建的竞争模板进行竞争定量 PCR 检测,由图 8 可见,含耐热菌  $7.6 \times 10^3$  个的样品 1 扩增得条带亮度与模板量为  $5 \times 10^4$  的竞争模板 C 扩增所得条带亮度相当;含耐热菌  $4.7 \times 10^4$  个的样品 2 扩增得条带亮度比  $5 \times 10^4$  个竞争模板 C 扩增所得条带亮度弱,而较  $5 \times 10^3$  个竞争模板 C 扩增所得条带亮度强,竞争定量结果样品 2 所含耐热菌数在  $5 \times 10^3$ ~ $5 \times 10^4$  个之间。即建立的 QC-PCR 体系最低可检测到标准菌株培养样品中  $5 \times 10^3$  cfu/PCR 体系的耐热菌。



M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. 阴性对照; 1-4. 含模板  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^5$  个 C 分子及样品 1; 5-8. 含模板  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^5$  个 C 分子及样品 2  
M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200); 0. Negative control; 1-4. C:  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^5$  and sample 1; 5-8. C:  $5 \times 10^2$ ~ $5 \times 10^5$  and sample 2

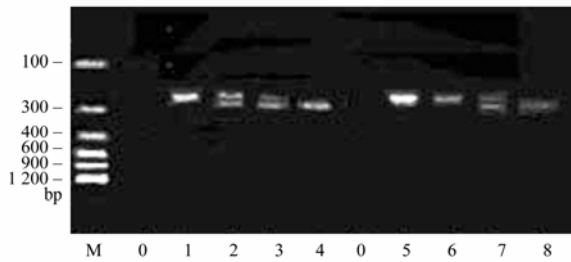
图 8 竞争定量 PCR 检测培养样品结果

Fig. 8 The result of culture sample of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by QC-PCR

**2.6.2 检测人工回添样品** 回添入灭菌果汁中的耐热菌数目,样品 1 为  $5 \times 10^3$  个,样品 2 为  $5 \times 10^4$  个。检测结果(图 9)表明,样品 1 扩增条带亮度与  $5 \times 10^3$  个 C 扩增所得条带亮度相当,样品 2 扩增条带亮度与  $5 \times 10^4$  个 C 扩增所得条带亮度相当。结果表明,所建立的 QC-PCR 对果汁中耐热菌的最低检测限为  $5 \times 10^3$  cfu/PCR 体系的耐热菌。

## 3 讨论

建立在分子生物学基础上的 PCR(聚合酶链反应)技术,是体外快速特异扩增核酸的方法,它能使样品中极微量的核酸在数小时之内扩增至原来的数百万倍以上。只要选择合适的引物,PCR 就可特异性地扩增



M. DNA Marker (100、300、400、600、900、1200)；0. 阴性对照；1~4. 含模板  $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$  个 C 分子及样品 1；5~8. 含模板  $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$  个 C 分子及样品 2

M. DNA Marker (100, 300, 400, 600, 900, 1200)；0. Negative control；1-4. C:  $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$  and sample 1；5-8. C:  $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$  and sample 2

图 9 竞争定量 PCR 检测回添样品结果

Fig. 9 The result of juice sample spiking *Alicyclobacillus acidoterrestris* by QC-PCR

目标 DNA 片段至易检测水平，从而实现对目标微生物的快速检测目的。本试验所选用引物 1、引物 2，是根据耐热菌 16S rRNA 基因高变区 V2 和 V4 区设计。引物 1、引物 2 采用 Yamazaki 的设计<sup>[10]</sup>。常玉华等<sup>[12]</sup>采用 Yamazaki 的引物设计已进行了耐热菌 PCR 定性方法研究，选择了与耐热菌同属的 2 个近缘菌株（环脂芽胞杆菌属的 2 菌株）和 7 种耐热菌的远缘菌株（芽胞杆菌属的 6 种细菌和大肠杆菌）进行了引物特异性试验，并从本研究采用的浓缩苹果汁试验样品（陕西恒兴果汁有限公司提供）中分离出的 14 株耐热菌和 6 株非耐热菌共 20 个菌株，与从德国购买的 DSMZ 标准菌株进行了引物特异性研究，均只能扩增出耐热菌 DNA，充分证实了引物的特异性。但本试验表明，Yamazaki 设计的引物在 PCR 扩增时有引物二聚体的形成，从而降低了扩增灵敏度。笔者通过世界三大核酸数据库（GenBank、DDBJ、EMBL）及美国 NCBI（美国国立生物信息中心）网站<sup>[15]</sup>的 Blast 程序对这些 16S rRNA 的基因序列进行查询，以及序列比对<sup>[16]</sup>和模拟，未找出比 Yamazaki 的设计更好的引物。在目前 16S-23S rRNA 核酸数据不完全的情况下，从改变引物设计上消除引物二聚体较难实现。笔者采用改进 PCR 方法——热启动及降落 PCR，同时进行了体系优化，有效降低了非特异性扩增，减少或基本上消除了引物二聚体的生成，改善了扩增效率，使检测灵敏度有所提高（比优化前提高 3 个数量级）。这可能是因为降落 PCR 使用较高的退火温度，获得优势的特异

性产物，然后逐渐降低退火温度到一个较低的温度范围，利用特异产物的扩增优势，减少非特异产物的生成，提高特异性扩增，减少引物二聚体，热启动方法和降落 PCR 相结合，可更好地消除引物二聚体，同时也减轻了污染机会。50  $\mu$ l PCR 体系改进为 25  $\mu$ l PCR 体系可降低检测成本。用本文建立的 QC-PCR 经对人工回添果汁中耐热菌检测，最低可检测到  $10^3$  cfu/反应体系，这比 Wenli 等<sup>[17]</sup>用竞争定量 PCR 法对 TSB 液体培养基和人工回添的脱脂乳中大肠杆菌 O157: H7 细胞定量检测到  $10^3 \sim 10^8$  cfu/反应体系的水平已提高了很多。

用本研究构建获得的竞争模板 C 与目标模板 T 共扩增时的检测限可达  $5 \times 10^2$  个分子，而用耐热菌回添果汁样品制备的模板与竞争模板 C 共扩增时的检测限降低为  $5 \times 10^3$ ，这可能与耐热菌基因组 DNA 提取效率有关，因为不管采用哪种 DNA 提取方法，提取效率都不可能达到 100%，总会有一定的损失。当然，影响 PCR 灵敏度和检测限的因素很多，诸如目标菌 DNA 提取效率、检测体系和条件的进一步优化、被检样品基液的有关成分对扩增过程的影响等都有可能影响 PCR 灵敏度和检测限。因此，提高定量 PCR 检测灵敏度，降低检测低限，尚有许多问题需深入研究，这在卫生微生物领域仍是一个诱人而富有挑战性的课题。

建立竞争定量 PCR 的关键是构建一个作为内标物的竞争性模板（亦称竞争子，competitor，或称为 mimics）。竞争定量模板构建的方法有很多报道<sup>[18-21]</sup>。笔者采用 Celi<sup>[14]</sup>的竞争模板构建原理设计引物 3，成功地扩增得到比目标模板少 51 bp 的竞争模板，并且经过共扩增效率检验试验，证明两种模板的扩增效率相近，符合竞争定量 PCR 的要求，可以用于苹果浓缩汁中耐热菌的竞争定量 PCR 检测，亦可作为其它微生物定量 PCR 的方法学参考。此法通用性好，思路独特，是所有竞争模板构建方法中最简单、快捷的方法之一。

## 4 结论

本研究建立和优化的 QC-PCR 法检测 AJC 中耐热菌方法和体系为：样品经无菌滤膜过滤集菌，氯化苄法制备目标模板。25  $\mu$ l PCR 体系中：Taq 酶用量 1.4 U，最佳  $Mg^{2+}$  浓度为  $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ，添加 10% 的甘油作促进剂，dNTP 浓度  $0.2 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、引物浓度  $0.2 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ ，目标模板、竞争模板各 2.5  $\mu$ l；采用热启动及降落 PCR，即热启动采用的是在冰盒上将 PCR 反应体系

各成分混匀后,当 PCR 循环仪温度上升至 70℃ 以上时,再将各扩增样品置于循环仪中扩增,降落 PCR 采用退火温度 60℃ 降落到 50℃;循环程序为:94℃ 变性 4 min 后进入 PCR 循环,94℃ 30 s、60℃ 降落到 50℃ 30 s、72℃ 30 s,扩增 35 个循环后 72℃ 延伸补足 5 min。不经预增菌环节,可在 4~5 h 内实现对耐热菌的快速定量检测,比传统方法的 4~5 d 时间大大缩短,最低检测限为  $5 \times 10^3$  cfu/反应体系样品。

## References

- [1] Jensen N. *Alicyclobacillus*-a new challenge for the food industry. *Food Australia*, 1999, 51(1,2): 33-36.
- [2] Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60: 543-545.
- [3] Baumgart J, Menje S. The impact of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks. *Fruit Processing*, 2000, 10(7): 251-254.
- [4] Jensen N. *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia*, 2000, 52(7): 33-36.
- [5] 王思新,焦中高,王晓燕. 浓缩苹果汁加工中耐热菌的分析与控制. *食品科学*, 2000, 21(9): 54-56.  
Wang S X, Jiao Z G, Wang X Y. Analysis and control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate processing. *Food Science*, 2000, 21(9): 54-56. (in Chinese)
- [6] <http://www.kfl.com.atb.html>
- [7] 李静媛. 果汁中的嗜酸耐热菌. *食品与发酵工业*, 2003, 29(3): 84-88.  
Li J Y. Thermoacidophilic bacterium in juice products. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(3): 84-88. (in Chinese)
- [8] 薛晚利,周玲,李选社,石兴民. 浓缩苹果汁中嗜酸耐热菌的分离及检测条件探讨. *西安交通大学学报(医学版)*, 2005, 26(2): 199-200.  
Xue W L, Zhou L, Li X S, Shi X M. Study on isolation and detection of thermo-acidophilic bacteria in apple juice concentrate. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2005, 26(2): 199-200. (in Chinese)
- [9] 焦中高,王思新,段丛梅,刘杰超. 苹果浓缩汁中耐热菌的分离及其生长特性的初步研究. *食品科学*, 2003, 24(9): 85-87.  
Jiao Z G, Wang S X, Duan C M, Liu J C. Isolation of thermotolerant bacteria from apple juice concentrate and their growth characteristic. *Food Science*, 2003, 24(9): 85-87. (in Chinese)
- [10] Yamazaki K, Teduka H, Inoue N, Shinano H. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23: 350-354.
- [11] Luo H, Yousef A E, Wang H H. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39 (4): 376-382.
- [12] 王宏,常玉华,仇农学. PCR 法检测耐热耐酸菌条件的优化. *食品与发酵工业*, 2004, 30(11): 99-101.  
Wang H, Chang Y H, Qiu N X. Optimization of PCR reaction conditions in detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(11): 99-101. (in Chinese)
- [13] 李海阔,王琛,周碧君. 提取产气荚膜梭菌染色体 DNA 的新方法—氯化苜法. *贵州大学学报(农业与生物科学版)*, 2002, 21 (1): 57-61.  
Li H K, Wang C, Zhou B J. The comparison of different preparations of *Clostridium perfringens* chromosomal DNA. *Journal of Guizhou University (Agricultural and Biological Science)*, 2002, 21 (1): 57-61. (in Chinese)
- [14] Celi F S, Zenilman M E, Shuldiner A R. Rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(4): 1047.
- [15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [16] Andreas D B, Ouellette B F F. 生物信息学: 基因和蛋白质分析的实用指南. 北京: 清华大学出版社, 2000.  
Andreas D. B., Ouellette B F F. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Third Edition (Hardcover)*. Beijing: Tsinghua University Press, 2000. (in Chinese)
- [17] Li W L, Drake M A. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli*, O157: H7 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 3291-3294.
- [18] Ballagi-Pordány A, Belak S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 1996, (10): 159-164.
- [19] Jin C F, Mata M, Fink D J. Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods and Applications*, 1994, (3): 252-255.
- [20] Siebert P D, Larrick J W. PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques*, 1993, 14: 244-249.
- [21] Ishibashi O. A new method to synthesize competitor RNAs for accurate analyses by competitive RT-PCR. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 1997, 35: 203-207.