

不同双歧杆菌标准品制备法的比较研究*

高晓琳^{1,2}, 贾瑞贞³, 谢亮⁴, 旷凌寒⁵, 冯玲¹, 万朝敏^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 儿教科教室(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(成都 610041);
3. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院公共实验室(成都 610041);
4. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院肺血管重构实验室(成都 610041);
5. 四川大学华西第二医院 检验科微生物组(成都 610041)

【摘要】 目的 比较不同的双歧杆菌标准品制备法,筛选适用于实时荧光定量 PCR 检测的双歧杆菌标准品。**方法** 以双歧杆菌标准菌株作为实验菌株,分别采用菌株 DNA 法、PCR 产物扩增纯化法、质粒 DNA 法制备梯度浓度标准品,运用紫外分光光度计和实时荧光定量 PCR 技术进行检测,并对数据进行统计学处理。**结果** 实时荧光定量 PCR 检测发现,3 种不同的双歧杆菌标准品制备法的标准曲线均 $R^2 > 0.990$;不同制备法的双歧杆菌标准品 DNA 浓度和纯度检测比较,质粒 DNA 制备法所制的双歧杆菌标准品浓度和纯度较另外两种方法高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 双歧杆菌质粒 DNA 制备法制备的标准品质量较高,适用于实时荧光定量 PCR 检测,可以为双歧杆菌分子生物学检测提供参考依据。

【关键词】 双歧杆菌 标准品 制备法 实时荧光定量 PCR

Preparing *Bifidobacteria* for Quantitative Detections GAO Xiao-lin^{1,2}, JIA Rui-zhen³, XIE Liang⁴, KUANG Ling-han⁵, FENG Ling¹, WAN Chao-min^{1△}. 1. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Open Laboratory, West China Institute for Women's and Children's Health, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Pulmonary Vascular Remodeling Research Unit Laboratory, West China Institute for Women's and Children's Health, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 5. Department of Laboratory Medicine, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wcm0220@sina.com

【Abstract】 Objective To compare different preparation methods for quantitative real-time PCR (qPCR) detection of *Bifidobacteria*. **Methods** Standard strains of *Bifidobacteria* were prepared with concentration gradients using strain DNA, PCR product amplification and purification, and plasmid DNA methods. The concentrations of *Bifidobacteria* were determined with ultraviolet spectrophotometer and real-time quantitative PCR. **Results** Greater than 0.99 R^2 in values of standard curves were achieved by all three preparation methods. The plasmid DNA method obtained a higher level of concentration and purity of *Bifidobacteria* than the other two methods ($P < 0.01$). **Conclusion** The plasmid DNA method produces high quality preparations and is more suitable for real-time quantitative PCR, which can provide a reference for the molecular biological detection of *Bifidobacteria*.

【Key words】 *Bifidobacteria* Standard Preparation methods Quantitative real-time PCR (qPCR)

双歧杆菌(*Bifidobacteria*)是肠道正常菌群,具有维持肠道微生态平衡、生物拮抗、免疫调节和营养等多方面的生理作用^[1-3]。近年来,双歧杆菌及其微生态制剂已广泛应用于医疗、保健和食品等领域^[1-5],国内外微生态学界关注度也持续上升。传

统的细菌培养是双歧杆菌鉴定和定量分析的经典方法,但该方法费时费力,易受环境因素和操作方法的影响,敏感性及其特异性相对不高。随着分子生物学技术的迅速发展,实时荧光定量 PCR 技术以精确、灵敏、重复性高、污染途径少等优点,已成功应用于双歧杆菌的检测^[6]。这项技术的关键是制备适宜的标准品。常用的标准品制备方法有标准菌株 DNA 法、PCR 产物扩增纯化法、质粒 DNA 法等^[7-9]。然而,哪种方法制备的标准品质量更高,更适宜实时荧

* 成都市科技局惠民项目(No. 2014-HM01-00017-SF)和益普生腹泻研究基金(No. IDF-2015-03)资助

△ 通信作者, E-mail: wcm0220@sina.com

光定量 PCR 技术,目前尚少见相关报道。本研究将以双歧杆菌标准菌株为实验菌株,采用以上几种方法分别制备梯度浓度标准品,并运用紫外分光光度计和实时荧光定量 PCR 技术制作标准曲线,以期为双歧杆菌分子生物学检测提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株 双歧杆菌菌株冻干粉(*Bifidobacteria longum*, 1.2186),来自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.1.2 引物设计合成 从 GenBank 中获取不同来源双歧杆菌的序列,根据其 16S rRNA 基因序列,应用引物设计软件 Primer Express 设计特异性 PCR 引物,并在 BLAST 基因库内比对引物序列的相应种属特异性,引物由 TaKaRa 公司合成, F: 5'-TTGGGCGTAAAGGGCTCGTA-3', R: 5'-TTCGCCATCGGTGTTCTTCC-3', 扩增产物长度 166 bp。

1.1.3 主要仪器 常规 PCR 仪(美国 Bio-radC1000)、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-radCFX96)、凝胶成像仪(美国 Bio-rad universal HOODII)、紫外可见分光光度计(美国 Beckman Coulter DU370)、电泳仪(美国 Bio-Rad miniprotean Tetra)、二氧化碳培养箱(美国 Forma3111)等。

1.1.4 主要试剂 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(OMEGA 公司), 2×Taq PCR Master Mix (Biomed 公司), 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量纯化试剂盒、Pmd19-T Vector 质粒、SYBR Premix Ex Taq™ II、Premix Ex Taq™ Version 2.0、Hand III (TaKaRa 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品制备

1.2.1.1 标准菌株 DNA 标准品制备法 严格按照中国微生物菌种保藏管理委员会标准菌株说明书要求的条件,分别对标准菌株进行复苏、连续培养 3 代,放置在 4℃ 冰箱保存备用。按 OMIGE 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒的操作说明提取 DNA,在 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.1.2 PCR 扩增产物纯化标准品制备法 使用引物对标准菌株 DNA 进行常规 PCR 扩增,反应体系 50 μL: 包括 Premix Ex Taq 25 μL, DNA 模板 5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 灭菌蒸馏水 18 μL。使

用 Bio-rad C1000 进行扩增。反应程序为: 94℃ 预变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环。反应结束后,产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(110 V 电压 30 min),在凝胶成像仪下观察结果。将目的条带扩增产物用 DNA 产物纯化试剂盒纯化(步骤按说明书进行)。取部分纯化产物和引物送 TaKaRa 公司测序。

1.2.1.3 质粒 DNA 标准品制备法 将双歧杆菌标准菌株 PCR 产物分别经切胶、回收、纯化与 pMD19-T Vector 连接并转化到 DH-5α 感受态细胞中培养(上述均按试剂盒说明书操作);筛选出白色菌落,菌落 PCR,纯化产物送 TaKaRa 公司测序。所得的质粒 DNA 片段作为荧光定量 PCR 的标准品。

1.2.2 标准品 DNA 浓度和纯度检测和稀释 用紫外可见分光光度计在 260 nm 和 280 nm 波长下分别测定提取以上几种方法所制备标准品的 DNA 吸光度,计算标准品 $A_{260/280}$ 及 DNA 浓度,将标准品 $10^1 \sim 10^{10}$ 倍梯度浓度稀释后备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 将各标准品梯度浓度稀释液进行实时荧光定量 PCR 检测,选取 $10^2 \sim 10^6$ 倍梯度浓度制作标准曲线。反应体系: 25 μL: SYBR Premix Ex Taq™ II (2×) 12.5 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 和 PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL, 各标准菌株梯度浓度标准品 2 μL。反应条件: 95℃ 预变性 30 s 1 个循环; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环。根据系列稀释后的标准品反应时的荧光扩增信号, Bio-radCFX96 数据分析软件自动生成标准曲线。

1.3 统计学方法

正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。随机设计的多组样本均数比较采用单因素方差分析,两两均数比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增结果及基因测序结果

PCR 扩增结果见图 1。基因测序报告: 所得序列与双歧杆菌基因序列一致, 同源性较高, 扩增产物是双歧杆菌, 引物特异性较高。

2.2 不同制备法的双歧杆菌标准品 DNA 浓度和纯度检测结果

见附表。3 种制备法两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。质粒 DNA 制备法所制标准品 DNA 浓度和纯度较其他两种方法高, 差异有统计学意义

($P<0.01$)。 $A_{260/280}$ 在 1.6~1.8 之间,说明 DNA 提取质量高^[10-11];本研究中标标准菌株 DNA 标准品

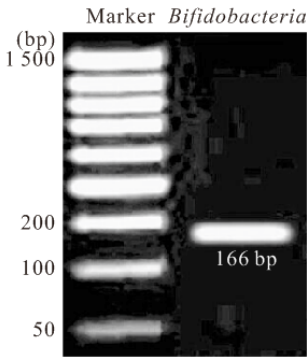


图 1 双歧杆菌标准菌株 DNA PCR 扩增结果图

Fig 1 DNA PCR result of *Bifidobacterium* standard strain

附表 不同制备法的标准品 DNA 浓度和纯度检测结果($\bar{x}\pm s$)
Table DNA concentration and purity testing results for different preparation methods ($\bar{x}\pm s$)

Method	Concentration of DNA/($\mu\text{g/mL}$)	$A_{260/280}$
Strain DNA method	20	1.55 ± 0.02
PCR product amplification and purification method	23	$1.62\pm0.13^*\triangle$
Plasmid DNA method	35	$1.81\pm0.17^*$

* $P<0.05$, vs. strain DNA method; $\triangle$ $P<0.05$, vs. plasmid DNA method

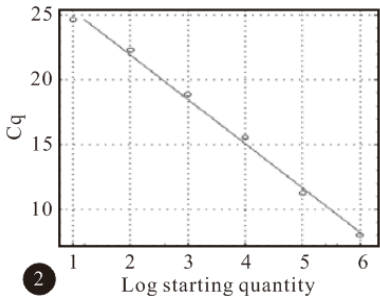


图 2 双歧杆菌标准菌株 DNA 制备标准品法的标准曲线图($R^2=0.992$)

图 3 双歧杆菌 PCR 扩增产物纯化制备标准品法的标准曲线图($R^2=0.994$)

Fig 2 Standard curve ($R^2=0.992$) for *Bifidobacterium* prepared by the strain DNA method
Fig 3 Standard curve ($R^2=0.994$) for *Bifidobacterium* prepared by the PCR product amplification and purification method

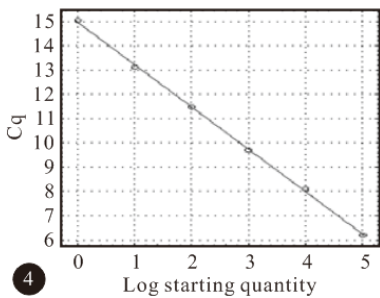
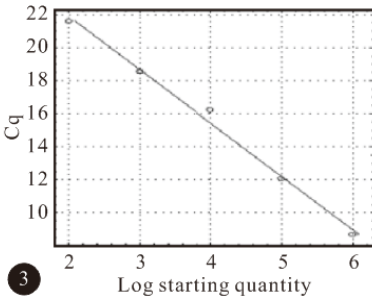


Fig 4 Standard curve ($R^2=0.998$) for *Bifidobacterium* prepared by the plasmid DNA method

其他报道结果一致^[14-15],可为双歧杆菌分子生物学检测提供参考依据。另外,实验可能会存在一些影响因素,应注意:由于双歧杆菌属于专性厌氧革兰阳性菌,对实验条件有较高要求,在标准菌株传代复苏培养过程中,要注意严格厌氧培养;在标准菌株 DNA 提取过程中,可使用试剂盒中提供的玻璃珠,加速革兰阳性菌破壁;在做 PCR 或实时荧光定量 PCR 时,注意革兰阳性菌的适宜温度可能较革兰阴性菌高。

制备法的 $A_{260/280}$ 为 1.55 ± 0.02 ,考虑可能存在杂质需要提纯,所以建议不将标准菌株 DNA 标准品制备法作为首选方法。

2.3 不同双歧杆菌标准品制备法实时荧光定量 PCR 检测标准曲线图

标准品的构建是实时荧光定量 PCR 技术关键环节。通过构建与目的基因片段一样的标准品,尽量保证目的基因片段与标准品的扩增效率一致,减小实验误差,对检测结果的准确性有较为至关重要的作用^[12]。因而,选用适宜的标准品制备方法显得尤为重要。由于双歧杆菌属于专性厌氧革兰氏阳性菌^[13],对实验条件要求较高,关于制备双歧杆菌用于实时荧光定量 PCR 的标准品报道较少,更应引起重视。

图 2~图 4 显示了不同的双歧杆菌标准品制备法实时荧光定量 PCR 检测标准曲线,可见各梯度之间间隔的 C_q 值基本相等,各梯度在一条直线上,标准曲线的 R^2 在 0.990 以上,线性关系良好,误差较小,所作标准曲线可用。其中,截距呈图 2~图 4 递减的趋势,提示质粒 DNA 制备法所制标准品实际量较其他两种方法高^[14]。综上表明,质粒 DNA 制备法所制标准品更适宜实时荧光定量 PCR 检测,与

综上所述,质粒 DNA 制备法所制的双歧杆菌标准品,较适宜实时荧光定量 PCR 检测,可以为双歧杆菌分子生物学检测提供参考依据。探索肠道微生态的各种问题,是我们继续研究的方向和动力。

参 考 文 献

[1] KAWABATA K, KATO Y, SAKANO T, *et al.* Effects of phytochemicals on *in vitro* anti-inflammatory activity of *Bifidobacterium adolescentis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015,79(5):799-807.

- [2] 毛淑华, 姬玲玲, 刘 洪, 等. 婴儿双歧杆菌介导的 sKDR 原核克隆表达及其对血管内皮细胞增殖的影响. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(5): 784-786.
- [3] 付艳茹, 黄少磊, 龚 虹, 等. 双歧杆菌脂磷壁酸的提取及功能的研究进展. 中国微生物学杂志, 2014, 26(10): 1224-1229.
- [4] PHOEM AN, CHANTHACHUM S, VORAVUTHIKUNCHAI SP. Applications of microencapsulated *bifidobacterium longum* with eleutherine americana in fresh milk tofu and pineapple juice. Nutrients, 2015, 7(4): 2469-2484.
- [5] 王似锦, 江志杰, 牛振东, 等. 保健食品双歧杆菌和乳酸菌计数方法的优化. 中国微生物学杂志, 2015, 27(2): 227-229.
- [6] 赵 洁, 马 晨, 席晓敏, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在肠道微生物领域中的研究进展. 生物技术通报, 2014(12): 61-66. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2014.12.010.
- [7] 黄永坤, 曹志琅, 杨 武, 等. 出生早期新生儿肠道双歧杆菌动态检测. 临床儿科杂志, 2010, 28(10): 938-941.
- [8] JUNICK J, BLAUT M. Quantification of human fecal *bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the *groEL* gene. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(8): 2613-2622.
- [9] 荀安营, 李 娜, 邹 兵, 等. 长双歧杆菌分泌型表达载体的构建及 *Tum-5* 基因的表达. 中国微生物学杂志, 2014, 26(12): 1365-1369.
- [10] OLIVEIRA CF, PAIM TG, REITER KC, *et al.* Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates. Rev Inst Med Trop São Paulo, 2014, 56(1): 29-33.
- [11] 李幼平. 医学实验技术的原理与选择. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 205-209.
- [12] 赵永攀, 石 磊, 李 晋, 等. CYP4F2 和 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 标准品质粒和标准曲线的构建. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 98-100.
- [13] VELOO AC, ELGERSMA PE, FRIEDRICH AW, *et al.* The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(12): O1091-O1097 [2015-08-26]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1469-0691.12644/epdf>.
- [14] 易金阳, 王 烨, 朱 明, 等. db/db2 型糖尿病模型小鼠肠道多形拟杆菌实时荧光定量 PCR 标准品制备方法的比较研究. 新疆医科大学学报, 2012, 35(6): 716-720.
- [15] 陈 军, 李慧玲, 董建一, 等. 标准品制备方法对 FQ-PCR 定量基因表达水平的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(11): 1064-1068.

(2015-11-18 收稿, 2016-03-12 修回)

编辑 吕 熙

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊, 曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖, 2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE), 《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA), 《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA), 荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM), 中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc), 中文生物医学期刊文献数据库(CMCC), 中国学术期刊网全文数据库(CNKI), 中国学术期刊(光盘版), 万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流, 促进医药卫生事业的发展, 凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约), 均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿, 编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用, 刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址: 四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码: 610041

电话/传真: (028) 85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部