

# PCR 法检测一株啤酒腐败菌条件的优化

高志武

(兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

**摘要:**以短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)为研究对象,对 PCR 法快速检测短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)的扩增条件: Taq 酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、退火温度、循环温度 时间、循环次数 5 个方面进行了优化。最终得到 PCR 反应最佳条件: 25ul 体系中, Taq 酶用量 2.0U/ml  $Mg^{2+}$  浓度 2.0mM 退火温度为 50℃。扩增程序: 94℃ 4min 进入循环, 94℃ 30s 50℃ 30s 72℃ 30s 35 个循环后,再 72 下延伸 5min。

**关键词:**短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*); PCR; 条件优化

**中图分类号:** TS251

近年来我国啤酒工业发展迅速,2003 年国家统计局报道<sup>[1]</sup>,中国啤酒产量以每年 8% 的速度增长,在持续 9 年居世界第二后,2002 年以 2386.83 万吨的产量超过美国居世界第一。虽然啤酒业近几十年来的发展势头十分乐观,但是污染啤酒的微生物依然是困扰国内外各大啤酒酿造公司的一大难题。目前,对这些腐败菌的检测主要还是通过从啤酒中分离出腐败菌在平板上厌氧培养,然后通过观察和一些生理生化试验来判定这些腐败菌。这种方法最大的缺点是耗时长,5~7d 才可以看到结果,不能及时反馈啤酒中微生物污染情况,对实际生产具有很大的滞后性。PCR 技术从分子、基因水平极大地提高了检测效率,具有方便、快捷、省时等优点。目前,美国、日本、加拿大和我国的科研工作者都致力于将 PCR 技术应用于啤酒腐败菌的鉴定和检测。因此,利用 PCR 技术快速检测啤酒中腐败菌,可大大缩短检测时间,及时反馈啤酒中微生物的污染情况,对于啤酒生产具有重要意义。

短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)是啤酒中的主要污染菌之一,通常占啤酒腐败菌 50% 以上<sup>[2]</sup>,通过对 PCR 法检测短乳杆菌条件的优化,提高其反应灵敏度,缩短检测时间。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与主要仪器设备

标准菌株:短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)。

Taq DNA 聚合酶、Buffer 引物(委托上海生工合成)、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、琼脂糖、EB(溴化乙锭)、DNA 分子量标准 (DNA Marker)、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、蛋白酶 K、SDS 饱和酚、去离子无菌水等。

PCR 扩增仪、台式高速离心机、电泳仪、紫外透射检测仪、凝胶成像仪、高压灭菌锅、恒温水浴锅、摇床、超净工作台、精密微量移液器 Eppendorf(10 $\mu$ l 100 $\mu$ l 1200 $\mu$ l)、PCR 管、离心管、枪头。

### 1.2 试验设计与方法

#### 1.2.1 模板 DNA 制备

按 CTAB 法提取模板<sup>[3]</sup>,得到  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 两种模板的 DNA。

#### 1.2.2 引物设计

参照 Yamazaki 等人<sup>[4]</sup>设计根据短乳杆菌基因序列,采用引物设计软件设计引物为:引物 F: 5'-GAACAGGATTAGATACCC-3',引物 R: 5'-GACT-TAACCCAACATCTCAC-3'。扩增产物片段为 260bp,此片段是短乳杆菌的特异序列,扩增灵敏性较高。

#### 1.2.3 PCR 体系优化 (25ul)预试验

采用 25ul PCR 反应体系<sup>[1]</sup>,见表 1,以普通 PCR 扩增,如图 1 得出未优化体系的检出低限为  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml

表 1 25ul PCR 反应体系

试剂	标准反应 (25ul)	阴性对照
10x Taq 缓冲液	2.5ul	2.5ul
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5ul	1.5ul
dNTPS (10mM)	0.5ul	0.5ul
上游引物	1ul	1ul
下游引物	1ul	1ul
DNA 模板	4ul	4ul
ddH <sub>2</sub> O	14ul	14ul
Taq 聚合酶	0.5ul	0.5ul

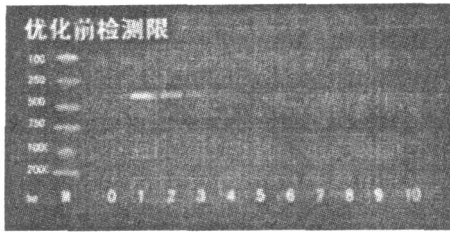


图 1 注: M: DNA Marker(100、250、500、750、1000、2000)  
0: 阴性对照  
1~10: 模板浓度分别为  $1.2 \times 10^0 \sim 1.2 \times 10^{-9}$  ug/m l 个分子

## 2 结果与分析

### 2.1 Taq酶浓度优化

选  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 两种浓度模板作为对照。由图 2a、2b 可见, 模板量为  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 时, 1U/mL 扩增结果呈阴性, 1.5、2.0、2.5、3.0U/mL 均有清晰目的 DNA 片段, 且 4 者的结果无明显的差别。模板量为  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 时, 均有清晰的 DNA 片段, 且 5 个结果无明显的差别。按低模板量的原则, Taq 酶浓度至少为 1.5U/mL。由于 Taq 酶活性可能会受某些未知因素的影响, 为了使结果稳定, Taq 酶应稍微过量, 因此取 Taq 酶浓度为 2.0U/mL。

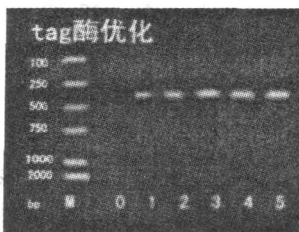


图 2a  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml



图 2b  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml

注: M: DNA Marker(100、250、500、750、1000、2000) 0: 阴性对照

1. 酶量为 1.0U, 2. 酶量为 1.5U, 3. 酶量为 2.0U,
4. 酶量为 2.5U, 5. 酶量为 3.0U.

根据预试验结果, 对 PE 公司推荐标准 PCR 反应体系和扩增条件, 见表 2<sup>[5]</sup> 稍加修改, 即 Buffer 缓冲液、dNTPs 和引物条件未变, 对 Taq 酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、退火温度、循环温度 时间、循环次数等五个条件采用单因素逐项优化法优化, 以  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 模板量作对照。在退火温度、循环时间、循环次数未优化前采用的扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 4min 进入 PCR 循环, 即  $94^{\circ}\text{C}/60\text{s}$ ,  $55^{\circ}\text{C}/60\text{s}$ ,  $72^{\circ}\text{C}/60\text{s}$  40 个循环, 再于  $72^{\circ}\text{C}$  下延伸 5min。

表 2 PE 公司推荐标准 PCR 反应体系和扩增条件

成分	Buffer	dNTPs	引物	模板	Taq 酶	$Mg^{2+}$
浓度	1×缓冲液	0.2mM	1umol/L	10ng/mL	2.5U/mL	1.5mmol/L

### 2.2 $Mg^{2+}$ 浓度优化

选  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 两种浓度模板作为对照。由图 3 可见, 对两种浓度的模板进行扩增, 均能得到目标条带, 模板浓度为  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 时, 2号条带相对较亮。模板浓度为  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 时, 5号条带相对较亮。2号和 5号对应的  $Mg^{2+}$  浓度均为 2.0mM, 因此最佳  $Mg^{2+}$  浓度确定为 2.0mM。

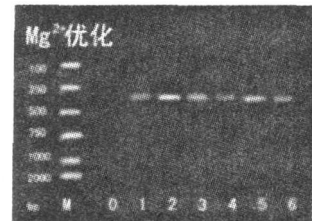


图 3 注: M: DNA Marker(100、250、500、750、1000、2000)  
0: 阴性对照

1、4,  $Mg^{2+}$  浓度为 1.5mM, 2、5,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0mM, 3、6,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5mM, 1、2、3, 模板浓度为  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml, 4、5、6, 模板浓度为  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml

### 2.3 退火温度优化

选  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 两种浓度模板作为对照。比较图 4a、4b 可以看出, 2~5 号的扩增带均相对较亮, 且结果基本相同。一般来说退火温度越低, 其灵敏度越高; 退火温度越高, 扩增特异性越高, 在扩增效果相同的前提下, 应选择较高的温度以保证扩增的特异性, 因此选  $50^{\circ}\text{C}$  为最佳退火温度, 其值应介于 4号与 5号之间。

### 2.4 循环时间优化

选  $1.2 \times 10^{-2}$  ug/ml 和  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 两种浓度模板作为对照。由图 5 可以看出, 模板量为  $1.2 \times 10^{-5}$  ug/ml 时变性、退火、延伸时间为 10s 的扩增结

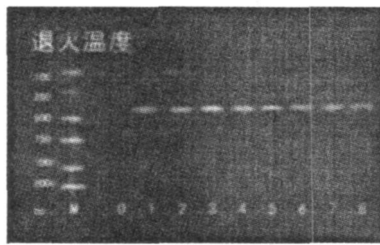


图 4a 模板量为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$

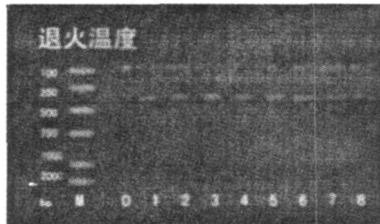


图 4b 模板量为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$

注: M: DNA Marker(100,250,500,750,1000,2000) 0: 阴性对照

1:45.1℃, 2:45.8℃, 3:47.3℃, 4:49.3℃, 5:51.7℃, 6:54.4℃, 7:57.1℃, 8:59.7℃.

果为阴性, 30s, 45s和 60s的结果均呈阳性, 且 3者扩增结果基本相同。当模板量为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$  时, 10s, 30s, 60s的扩增效果基本相同。从省时和扩增反应的充分发生的角度考虑, 选 30s为最佳循环时间。

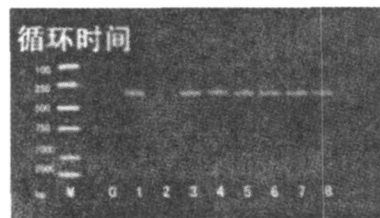


图 5 注: M: DNA Marker(100, 250, 500, 750, 1000, 2000)

0: 阴性对照

1, 2: 94/10, 50/10, 72/10; 3, 4: 94/30, 50/30, 72/30; 5, 6: 94/45, 50/45, 72/45; 7, 8: 94/60, 50/60, 72/60.

奇数序号模板浓度为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$  偶数序号模板浓度为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$

### 2.5 循环次数优化

选  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$   $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$  两种浓度模板作为对照。如图 6 所示, 模板量为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$  时, 25次、30次的结果呈阴性, 35次、40次有扩增产物带。当模板量为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$  时, 25次没有扩增产物, 30次、35次、40次均有扩增产物带。综合分析可知, 无论模板量高或低, 35次循环可使扩增产物量达到检测限, 因此取 35次循环。

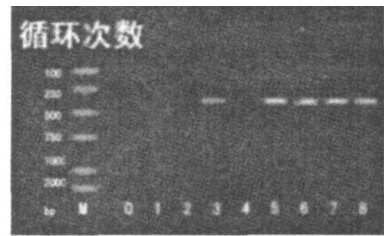


图 6 注: M: DNA Marker(100, 250, 500, 750, 1000, 2000)

0: 阴性对照

1, 2: 25次, 3, 4: 30次, 5, 6: 35次, 7, 8: 40次.

奇数序号模板浓度为  $1.2 \times 10^{-2} \text{ug/ml}$  偶数序号模板浓度为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$

### 2.6 优化后的检测结果

通过以上优化后, 采用 25ul PCR 反应体系, 以普通 PCR 扩增, 如图 7 得出优化后体系的检出底限为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$

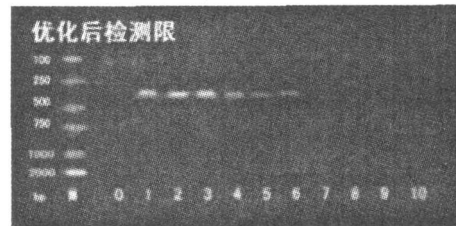


图 7 注: M: DNA Marker(100, 250, 500, 750, 1000, 2000)

0: 阴性对照

1~10: 模板浓度分别为  $1.2 \times 10^0$  ~  $1.2 \times 10^{-9} \text{ug/ml}$  1个分子

## 3 结论

由以上优化结果可知, 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 25ul 体系 PCR 优化的最佳结果如下:

Taq酶用量  $2.0 \text{U/ml}$   $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $2.0 \text{mM}$ , 退火温度为  $50^\circ\text{C}$ 。扩增程序:  $94^\circ\text{C}$  4min 进入循环,  $94^\circ\text{C}$  30s  $50^\circ\text{C}$  30s  $72^\circ\text{C}$  30s 35个循环后, 再  $72^\circ\text{C}$  下延伸 5min。在这些条件下, 可以保证 DNA 模板量低至  $1.2 \times 10^{-5} \text{ug/ml}$  时仍具有较好的扩增效果, 同时使短乳杆菌预培养时间缩短在 24h 以内, PCR 扩增反应时间减少 1h 以上。这个过程所需时间的减少, 为啤酒中腐败菌的快速检测奠定了基础。

### 参考文献:

[1] 徐巧林. 啤酒中污染菌的分离纯化、快速检测与鉴定 [R]. 浙江工业大学硕士论文, 2005.

[2] 田小群, 鲁欣, 周世宁. 啤酒腐败菌的分离鉴定及对啤酒的危害 [J]. 酿酒科技, 2005(7).

[3] 王传堂, 黄粤, 杨新道, 等. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果 [J]. 花生学报, 2002(3).

- [4] Yamazaki K, Teduka H, Inone N, et al Specific primers for detection of *Alicyclo - bacillus acidoterrestris* by RT - PCR [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996(23): 350-354.
- [5] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995: 422.
- [6] Kanta Sakamoto W iN. konings Beer Spoilage bacteria and Hop Resistance [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 89, 105-124.
- [7] 李风云. NBB培养基在啤酒工厂中的应用 [J]. *啤酒科技*, 2003(12): 20-25.
- [8] 徐岩, 张丽萍, 顾国贤. 聚合酶链式反应 (PCR) 技术鉴定啤酒腐败菌的最新进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2001, (5): 71-74.
- [9] 孔庆新, 张惟广. 啤酒生产中腐败微生物鉴定新技术 [J]. *酿酒科技*, 2003, 116(2): 26-27.
- [10] 闫雪, 姚卫容, 钱和. 国内外食品微生物快速检测技术应用进展 [J]. *食品科学*, 2005, 26(6): 269-271.
- [11] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [12] 曹泽虹, 李勇. 用 PCR 法快速测定食物中毒病原菌 [J]. *微生物学通报*, 2001(4): 72-76.
- [13] 李莉, 蒋作明. PCR 技术在食品沙门氏菌检测中的应用 [J]. *食品科技*, 2002(4): 60-62.
- [14] 林万明. PCR 技术操作与应用指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.
- [15] 朱平. PCR 基因扩增实验操作手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992.
- [16] Rychlik W, Rhoads R E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 1989, 17, 8543-8551.
- [17] Fernandez A. Effect of the pre-treatments for milk samples filtration on direct viable cell counts. *J Appl Bacteriol* 1996, 80, 511-516.
- [18] Payne M. The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp from pure cultures and foods. *J Appl Bacteriol* 1992, 73, 41-52.
- [19] Tupin P. An ion-exchange based extraction method for the detection of salmonellas in soil. *J Appl bacteriol* 1993, 74, 181-190.
- [20] Fluit A. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* 1998, 54: 1564-1569.

(上接第 65 页) (3) 压缩进入旋转失速后, 压力发生脉动, 但流量基本不变。(4) 旋转失速引起的振动, 强度比喘振小。

### 5.3 喘振

喘振是突变型失速的进一步发展。当气量进一步减小时, 压缩机整个流量被气体旋涡区所占据, 这时压缩机出口压力会突然下降。但是有较大容量的管网压力并不会马上下降, 出现管网气体向压缩机倒流现象。当管网压力下降到低于压缩机出口压力时, 气体倒流停止, 压缩机又恢复到原来压力后, 又会出现整个流道内的旋涡区。这样周而复始, 出现了压力和流量周期性的脉动, 并发出低频吼叫, 机组产生剧烈振动。振动振幅和频率与管网容积大小密切相关。管网容量越大, 喘振频率越低, 振幅越大。多数大容量机组的振动频率  $< 1 \text{ Hz}$ 。

喘振产生的原因是: (1) 压缩机转速下降而出口压力未下降; (2) 管网压力升高; (3) 压缩机流量下降; (4) 压缩进气温度高; (5) 分子量减小; (6) 压缩机进气压力下降或入口管网阻力增大。

## 6 结论与建议

1) 压缩机的叶轮及隔板结疤较快, 严重影响打气量和转子的动平衡, 需经常揭盖清理。CO<sub>2</sub> 在进入压缩机前进行充分除尘, 需要增加 2 台电除尘, 确保气体除尘量在  $10 \text{ mg/m}^3$  以下, 减少压缩机的结疤。

2) 建议气封材料改为浸四氟, 以免在机组运行过程中被氧化腐蚀、断裂变形, 与转子产生摩擦引起压缩机振动。

3) 建议一、二段冷却器改为波纹管换热器, 这种冷却器使气体和水能够加剧湍流, 管内外不易结疤, 提高换热效果。从而避免因气体得不到充分冷却而使压缩机稳定工作范围变窄发生喘振。

4) 建议在压缩机进出管上安装波纹管膨胀节, 避免压缩机受到外力作用, 在运行过程中不能自由膨胀而引起振动。

### 参考文献:

- [1] 陈军, 慕耀光, 刘新福, 等. 基于弹性体振动理论的抽油杆柱三维振动分析 [J]. *石油矿场机械*, 2009, 38(2): 15-19.
- [2] 叶卫东, 韩道权, 宋玉杰, 等. 螺杆泵定子与转子的接触分析 [J]. *石油矿场机械*, 2008, 37(8): 25-28.