

PCR 法检测耐热耐酸菌条件的优化*

王 宏 常玉华 仇农学

(陕西师范大学食品工程系, 西安, 710062)

摘 要 以耐热菌为研究对象,对 PCR 法快速检测耐热菌的扩增条件: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:50 μ L 扩增体系中, Taq 酶浓度 2 U/mL、 Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L、退火温度 58℃。扩增程序:94℃ 预变性 4 min 后进入 PCR 循环,即 94℃ /30S- 58℃ /30S- 72℃ /30S,循环 35 次,72℃ 下延伸 5 min。
关键词 PCR, 耐热菌, 条件优化

耐热耐酸菌(简称耐热菌)是一种嗜热、嗜酸、好氧的细菌,能从浓缩苹果汁中分离得到^[1],该菌能经受巴氏杀菌而存活,严重影响浓缩果汁的品质,国际上已有多起关于耐热菌导致大规模果汁败坏事件的报道^[2]。目前国际上要求每 10 g 苹果浓缩汁中耐热菌含量< 1,耐热菌超标已成为制约我国浓缩苹果汁出口的主要障碍之一。本文旨在通过对 PCR 法检测耐热菌条件的优化,提高其反应灵敏度,缩短检测时间。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

耐热菌(DSM3392)购自德国 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,即英文 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures);TaqDNA 聚合酶、引物、dNTPs、Tris 等 上海生工;琼脂糖 美国 Sigma 公司;DNA Marker(SD002)北京鼎国;PCR 仪、精密微量移液器 德国 Eppendorf 公司;电泳仪 南京大学;紫外透射检测仪 上海

康华生化仪器制造厂。

1.2 实验方法

1.2.1 模板 DNA 制备

按 CTAB^[3]法提取,得到 0.1 ng/ μ L、1 pg/ μ L 2 种浓度的模板 DNA。

1.2.2 引物设计

参照 Yamazaki 等人^[4]设计。引物 A:5'-ACGGGTAGGCATCTACTTGT-3',引物 B:5'-AGGAGCTTTCCACTCTCCTTGT-3',扩增产物片段大小为 294 bp,此片段灵敏度高,是耐热菌的特异 DNA 序列^[4]。

1.2.3 优化试验

根据预试验结果,对表 1^[5]所示条件稍加修改,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 5 个条件按表 2 取值采用单因素逐项优化法优化,以 10 pg 和 1 ng 2 种模板量作对照。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℃ 预变性 4 min 进入 PCR 循环,即 94℃ /60s - 55℃ / 60s - 72℃ /60s,40 个循环,再于 72℃ 下延伸 5 min。

表 1 PE 公司推荐标准 PCR 反应体系和扩增条件

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

注:缓冲液浓度为,100 mmol/L Tris-HCl pH8.3,500 mmol/L KCl 扩增条件为,94℃ /60s 变性;37℃ / 60s 复性; 72℃ /60s 延伸

第一作者:硕士研究生(仇农学为本文通讯作者)。
* 国家科技部“十五”星火计划资助项目(2001EA850030)
收稿时间:2004-06-30

表 2 实验中各因素及其优化值

因 素	优化值
Taq 酶浓度/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.0、1.5、2.0、2.5、3.0
Mg^{2+} 浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.0、1.5、2.0、2.5、3.0
退火温度 ¹⁾ / $^{\circ}\text{C}$	45.1、45.8、47.3、49.3、51.7、54.4、57.1、59.7、62.1、63.9
循环温度/时间/ $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$	94/10、58/10、72/10;94/30、58/30、72/30;94/60、58/60、72/60
循环次数	25、30、35、40

1)由公式： $T_m=4(G+C)+2(A+T)$ ， $T_a=T_m-10^{[6]}$ 计算，以 $55^{\circ}\text{C}\pm5^{\circ}\text{C}$ 在 Eppendorf PCR 仪上进行温度梯度设计。扩增后进行扩增产物凝胶电泳，紫外检测并拍照。

2 结果与分析

2.1 Taq 酶浓度

由图 1 可见，模板量为 10 pg 时，1 U/mL 扩增结果呈阴性，1.5、2.0、2.5、3.0 U/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 ng 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 1.5 U/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 2.0 U/mL。

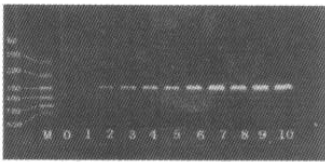


图 1 不同 Taq 酶浓度下的扩增结果
M:DNA marker, 0:阴性对照, 1~5:模板量 10pg, Taq 酶依次为 1、1.5、2.0、2.5、3.0 U/mL; 6~10:模板量 1ng, Taq 酶依次为 1、1.5、2.0、2.5、3.0 U/mL

2.2 Mg^{2+} 浓度

如图 2，模板量为 10 pg 时，3 号的扩增产

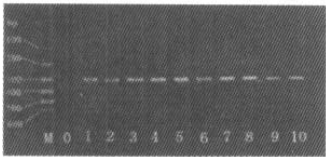


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度下的扩增结果
M:Marker, 0:阴性对照, 1~5:模板量 10 pg, Mg^{2+} 浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L, 6~10:模板量为 1 ng, Mg^{2+} 浓度依次为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L

物带相对较亮；模板量为 1 ng 时，8 号的扩增产物带相对较亮。3 号与 8 号对应的 Mg^{2+} 浓度均为 2.0 mmol/L，因此取 2.0 mmol/L 为最佳 Mg^{2+} 浓度。

2.3 退火温度

比较图 3(a)、3(b)可以看出，3~8 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^[7]，在扩增效果相同的前提下，应选较高的温度以保证扩增的特异性，因此选 58℃ 为最佳退火温度，其值介于 7 号与 8 号之间。

图 3(a) 模板量 10pg

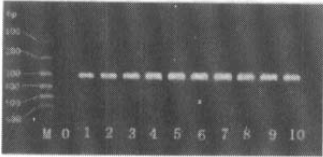


图 3(b) 模板量 1ng

图 3 不同退火湿度下的扩增结果
M:Marker, 0:阴性对照, 1~10: 45.1、45.8、47.3、49.3、51.7、54.4、57.1、59.7、62.1、63.9℃

2.4 循环温度/时间

由图 4(a)、4(b)可以看出，10 pg 模板量时，变性、退火、延伸时间为 10 s 的扩增结果为阴性；30 s 和 60 s 的结果均呈阳性，且 2 者扩增结果基本相同。当模板量较高时，10 s、30 s、60 s

的扩增效果基本相同。从省时的角度考虑,选择 30s 为最佳循环时间。

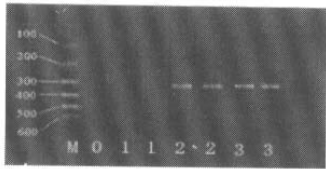


图 4(a) 模板量为 10pg

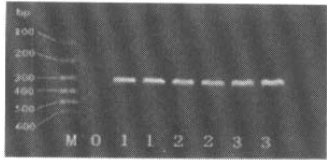


图 4(b) 模板量为 1ng

图 4 不同循环时间下的扩增结果

M: Marker, 0: 阴性对照, 1: 10s; 2: 30s; 3: 60s

2.5 循环次数

如图 5(a)、5(b)所示, 10pg 模板量时, 25 次、30 次的结果呈阴性, 35 次、40 次有扩增产物带。1ng 模板量时, 25 次没有扩增产物, 30

图 5(a) 模板量为 10pg

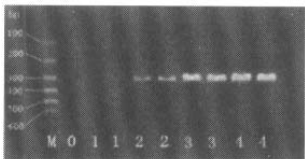


图 5(b) 模板量为 1ng

图 5 不同循环次数下的扩增结果

M: Marker, 0: 阴性对照, 1: 25 次; 2: 30 次; 3: 35 次; 4: 40 次

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。

3 结 论

经过对以上 5 个 PCR 反应条件的优化, 得到 PCR 反应最佳条件: 50 μ L 扩增体系中, Taq 酶浓度 2 U/mL、 Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L、退火温度 58 $^{\circ}$ C; 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后进入 PCR 循环, 即 94 $^{\circ}$ C/30S - 58 $^{\circ}$ C/30S - 72 $^{\circ}$ C/30S, 循环 35 次, 再在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。在这些条件下, 可以保证 DNA 模板量低至 10 pg 时仍具有较好的扩增效果, 同时使耐热菌预培养所需时间减少到 8 h 以内, PCR 扩增反应时间减少 1 个 h 以上。这 2 个过程所需时间的减少, 为浓缩苹果汁中耐热菌的快速检测奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Filipa M Silva, Paul Gibbs, Margarida C Vieira et al. Thermal inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. [J]. International Journal of Food Microbiology. 1999, 51: 95~103
- 2 Jensen N. Alicyclobacillus - a new challenge for food industry[J]. Food Australia, 1999, 51(1, 2): 33~36
- 3 奥斯伯 F. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖等译 [M]. 北京: 科学出版社, 1998
- 4 Yamazaki K, Teduka H, Inone N et al. Specific primers for detection of Alicyclobacillus 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 袁长青, 李平, 李君文. PCR 反应条件的优化 [J]. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 255~256
- 7 李谦, 李雅青. 提高 PCR 反应特异性的几点策略. [J]. 临沂师范学院学报, 2001, 23(4): 56~57

(下转第 105 页)

Analysis and Appraisal of Nutrients of *Houttuynia cordata* Thunb

Gong Xihuai¹ Cheng Mingliang²

1(Department of Chemistry, College of Chemistry and Biochemistry, Guizhou University, Guiyang, 550025)

2(Guiyang Medical College, Guiyang, 550008)

ABSTRACT The nutritive compositions of *Houttuynia cordata* Thunb were studied. The results showed that it was very rich in decanoyl acetalehyde and total flavonoids. Besides contcuning rich V_E , it has higher content of Vpp and Vc. The content of Vc was 5~80 times as high as that in common vegetables. Furthermore, the amount of Ca、Fe、Mn、Cu、Zn were higher than these in general vegetables. In addition, it was rich in 6 kinds of essential amino acids. The compositions of amino acids were reasonable because it accorded with the protein reference pattern provided by WHO/FAO. The result has indicated that it is one type of wild vegetable resource that shows great potential in its nutrition, health and medical functions.

Key words *Houttuynia cordata* Thunb, nutritive composition, decanoyl acetalehyde, total flavonids vitamin, mineral element, amino acids

(上接第 101 页)

Optimization of PCR Reaction Conditions in Detection

of *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Wang Hong Chang Yuhua Qiu Nongxue

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an, 710062)

ABSTRACT Study on the reaction conditions i. e. concentration of Taq DNA polymerase and Mg^{2+} , annealing temperature, recycle temperature/time, number of cycles in rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by PCR technology was presented in this paper. The optimized parameters achieved for 50 μ L PCR reaction system are 2 U/mL Taq DNA polymerase, 2.0 mmol/L [Mg^{2+}], 58 $^{\circ}$ C annealing tempreture. The amplification sequences is: pre-denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 4 min, then run the PCR for 35 cycles including 94 $^{\circ}$ C for 30s~58 $^{\circ}$ C for 30s~72 $^{\circ}$ C for 30s, and finally extend the process at 72 $^{\circ}$ C for 5 min.

Key words PCR, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, optimizing reation conditions

政策
法规
标准

新型“营养盐”标准通过国家审定

据悉,盐业的一项权威性行业标准——低钠盐、强化营养盐标准近日通过国家审定。这意味着我国的食用盐中有利于人体健康的各种微量元素的配比标准已与国际标准接近,有助于进一步规范我国的营养盐市场。

近日,在南京召开的全国多品种食盐标准审定会上,由全国海湖盐标准化中心负责制定的具有权威的行业标准——低钠盐、强化营养盐标准通过审定。目前几乎所有发达国家都规定所有含钠食品都要求标明钠的含量,我国这方面一直相对滞后。这次新颁布的标准比原有标准更加具体、科学,钾、锌、硒、钙、镁等微量元素添加剂标示明确,更符合平衡人体营养结构和方便生产的原则。