

浓缩苹果汁中扩展青霉菌实时 PCR 快速检测条件的优化

樊明涛¹, 毕静莹¹, 刘邻渭¹, Mansel W Graffith², Haifeng Wang²

(1 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2 Canadian Research Institute for Food Safety and

Food Science Department, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

[摘 要] 为了研究苹果汁生产中棒曲霉素产生菌的快速检测, 利用实时 PCR 方法快速检测扩展青霉的可能性, 对扩增条件进行优化。在 polygatacturonase 基因引物设计和传统 PCR 扩增扩展青霉 DNA 的基础上, 研究实时 PCR 扩增时退火温度、引物浓度以及底物质量浓度对扩增效果的影响, 以获得最佳的参数。结果表明, 用 Lightcycler 实时 PCR 扩增扩展青霉 DNA 的最佳退火温度为 61 °C, 最佳引物浓度为 0.20~0.40 μmol/L, 底物质量浓度对实时 PCR 扩增的影响较小。在以上参数下, 可以获得良好的 PCR 扩增曲线、产物溶解曲线以及清晰的产物条带。研究获得的快速检测扩展青霉的实时 PCR 参数, 可用于浓缩苹果汁工业化生产中扩展青霉的快速检测, 也可作为其他微生物实时 PCR 检测时的方法学参考。

[关键词] 苹果汁; 扩展青霉; PCR 检测

[中图分类号] Q555

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0084-06

Condition optimization of real time PCR used in rapid detection of *Penicillium expansum* in apple juice concentrate.

FAN Ming-tao¹, BI Jing-ying¹, LIU Lin-wei¹, Mansel W Graffith², WANG Hai-feng²

(1 College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Canadian Research Institute for Food Safety and Food Science Department, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada)

Abstract : In order to detect *Penicillium expansum* rapidly in apple juice concentration, the real time PCR method was used to detect *Penicillium expansum* and the conditions were also optimized. Based on the primers from polygatacturonase gene, the effect of annealing temperature, primer concentration and template concentration of real time PCR on the amplification was evaluated. The result showed that the amplification temperature of *Penicillium expansum* DNA was 61 °C when using Lightcycler, primer concentration was between 0.20 - 0.40 μmol/L, and the template concentration had little effect on amplification. Using above mentioned parameters, the best amplification, product melting curve and clear bands could be obtained. The parameters to detect *Penicillium expansum* obtained in this study can be used in the detection of *Penicillium expansum* in apple juice production, it can be also used as a reference for real time PCR detection for other microbes.

Key words : apple juice; *Penicillium expansum*; PCR detection

†收稿日期] 2006-08-30

[基金项目] 国家留学基金项目; 国家科技支撑计划项目(2006BA K02A24); 陕西省科技攻关项目(2007K01-12)

[作者简介] 樊明涛(1963-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品微生物及食品安全研究。E-mail: mingtaofan@tao.com

[通讯作者] Mansel W Graffith(1953-), 男, 英国人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品有害微生物的快速检测研究。

陕西省是我国浓缩苹果汁生产的主要省份之一,出口量位居全国第一,不仅成为陕西省创汇的利税大户,也大大增加了果农的收入^[1]。苹果汁质量是决定其出口量和价格的关键,其质量受许多因素的影响,其中棒曲霉素含量是苹果汁出口中一项要求很严的指标^[2]。扩展青霉是苹果汁生产过程中棒曲霉素的主要产生菌,对苹果汁质量有着直接的影响^[3]。由于我国的苹果汁生产原料主要是残次落果,扩展青霉的污染比较严重,苹果汁中棒曲霉素残留一直是困扰我国苹果汁生产企业的主要问题,目前采用的方法主要是加工后吸附脱除,但并未从源头上解决问题^[4-5]。由于棒曲霉素产生菌的传统检验方法是培养法,需时较长,无法实现快速检测的目的。目前,PCR 技术在快速检测方面较传统方法具有明显的优势^[6-9],但目前主要还是实验室的纯菌培养^[10],离实际应用还有一定距离。因此,研究如何快速检测棒曲霉素产生菌,并设法在工艺过程中对其进行控制,减少该毒素产生量,对提高苹果汁质量具有重要意义。本文基于 PCR 快速和特异的优点,在传统 PCR 的基础上,研究和探讨利用实时 PCR 进行棒曲霉素产生菌快速检测的可能性,获得了一套最适实时 PCR 扩增扩展青霉 DNA 的优化参数,以为实际应用提供理论依据和方法学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 扩展青霉 (*Penicillium expansum*)、*Penicillium loryophilum*、产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等,均由加拿大国家食品安全研究所收集和保藏。

1.1.2 试剂 DNA 聚合酶、dNTPs、反应缓冲液等购自 Roche 公司,100 bp DNA 标准购自 Invitrogen 公司,溴乙锭购自 New Zealand 公司。

1.2 扩展青霉和其他菌的培养

在无菌操作条件下,将扩展青霉菌接种到 Malt extract agar 和 Malt extract broth,其他菌接种到 Malt extract broth,30 °C 避光培养 3~4 d,用于提取 DNA。

1.3 扩展青霉和其他菌 DNA 的提取

参考 Cen^[11]的方法,并稍做修改。菌体培养结束后,用 10 mL 无菌水冲洗培养平板,并用无菌

接种环轻轻刮擦,使菌体以及孢子尽可能多地存在于无菌水中,然后用无菌吸管吸取 1 mL 装入 1.5 mL 离心管中。液体培养结束后,匀化液体培养基,用无菌吸管吸取 1 mL 放入 1.5 mL 离心管中。装有菌液的离心管在 14 000 r/min 离心 20 min,小心弃去上清液,沉淀中加入 500 μ L 裂解液 (15 g/L SDS + 2.5 g/L Tris, pH 8),溶解后在沸水浴中加热 30 min 后,加入 V(酚):V(氯仿):V(异戊醇) = 25:24:1 的有机溶剂 500 μ L,强烈振荡 10 min 以提取 DNA。提取液在 14 000 r/min 离心 20 min。将上清液转入另一离心管中,加入 1 mL 预冷的丙酮,离心,小心去掉上清液,将沉淀阴干,加入 50 μ L 双蒸水溶解 DNA,备用。

1.4 引物的选择

参考文献[12]的方法,引物为 polygalacturonase (POL) 基因内一段保守区段,设计扩增的目的片断大小为 404 bp,正向引物为 5'-ATC GGC TGC GGA TTG AAA G-3',反向引物为 5'-AGT CAC GGG TTT GGA GGG A-3' (GenBank 登录号为 AF 047713),由加拿大圭尔夫大学实验服务中心合成, -20 °C 保存。

1.5 扩展青霉 POL 基因的 PCR 扩增

传统 PCR 的反应体系为 25 μ L:5 μ L DNA 模板,0.8 μ mol/L 正、反向引物,2.5 μ L 10 倍 PCR 缓冲液,0.25 μ L dNTPs (100 mmol/L) 以及 0.2 μ L Tth DNA 聚合酶 (5 U/ μ L),双蒸水补充到 25 μ L。扩增循环条件(通过预试验确定)为:94 °C 预热 5 min;94 °C 解链 1 min,52 °C 退火 45 s,72 °C 延长 1 min,40 个循环;最后在 72 °C 延长 5 min 结束循环。

实时 PCR 在 20 μ L 的专用玻璃毛细管中进行,实时 PCR 仪为 Lightcycler,用 Roche 公司试剂盒。扩增条件为:95 °C 预变性 10 min;然后 95 °C 变性 10 s,退火(温度分别为 55,61,65 °C),72 °C 延长 16 s,40 个循环。循环完成后,取 4 μ L 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,溴乙锭染色。

1.6 引物浓度和底物质量浓度对实时 PCR 扩增结果的影响

在最佳退火温度条件下,添加引物浓度分别为 0.10,0.20,0.40,0.60,0.80 和 1.0 μ mol/L,研究引物浓度对实时扩增 PCR 结果的影响。

在最佳退火温度条件下,添加底物质量浓度分别为 0.01,0.02,0.05,0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.0 μ g/ μ L 的反应液,研究底物质量浓度对实时 PCR 扩增结果的影响。

2 结果与分析

2.1 扩展青霉 POL 基因的 PCR 扩增

试验结果表明,引物对扩展青霉 DNA 的扩增特异性很高,扩增产物只有 404 bp 的目标片段,无任何其他片段存在(图 1),因此,可以利用该引物特异地检测扩展青霉的存在。琼脂平板培养和液体培养后所提 DNA 的扩增基本没有差异。用该引物对其他供试真菌 DNA 进行扩增,可以看到,该引物对其他真菌 DNA 基本不予扩增,反应液中引物几乎未被消耗,在这些真菌 DNA 的 PCR 扩增产物中,形成引物二聚体的可能性大,因此在 PCR 的产物电泳图上,可以看到有一个较亮的区域,这可能是形成的引物二聚体(图 1)。

2.2 退火温度对实时 PCR 扩增结果的影响

在传统 PCR 试验中获得了理想的循环温度参数,退火温度为 52 °C。按照实时 PCR 退火时间短、温度要求高的特点,进行了退火温度的参数优化。经过反复试验,获得的理想退火温度是 61 °C,退火时间 16 s,这时可以获得理想的扩增效果,扩展青霉 DNA 的系列稀释曲线关系良好(图 2),溶解曲线中的引物二聚体(primer-dimers)影响非常小,几乎看不到引物二聚体的存在,产物的溶解温度约在 90 °C(图 3)。如果再提高退火温度,扩增效率则呈下降趋势;退火温度降低,引物二聚体的影响较大。61 °C 16 s 实时 PCR 之后进行的电泳条带也非常清

晰,特异性很高(图 4)。

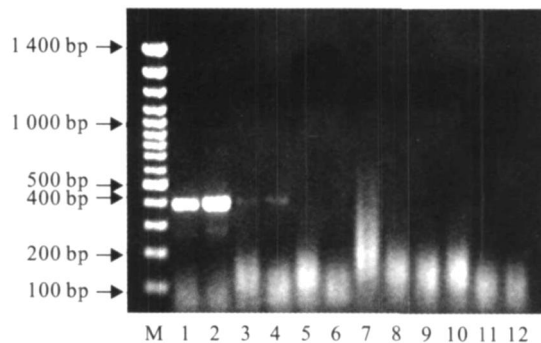


图 1 扩展青霉(*Penicillium expansum*)和其他几种食品、饲料常见真菌 DNA 的 PCR 扩增结果

M. DNA Marker(100,200,400,500,1 000,1 400 bp);1. 液体培养所提扩展青霉 DNA;2. 琼脂平板培养所提扩展青霉 DNA;
3. *Penicillium lorylophilum* CB11;4. *Penicillium lorylophilum* CB23;5. 产黄青霉;6. 烟曲霉;7. 黄曲霉 1;8. 黄曲霉 5;
9. 杂色曲霉;10. 赭曲霉;11. 黑曲霉;12. 空白对照

Fig.1 PCR amplification of DNA from *Penicillium expansum* and other common food and feed fungi

M. DNA Marker(100,200,400,500,1 000,1 400 bp);1. *Penicillium expansum* DNA from broth;2. *Penicillium expansum* DNA from agar plate;3. *Penicillium lorylophilum* CB11;4. *Penicillium lorylophilum* CB23;5. *Penicillium chrysogenum*;6. *Aspergillus fumigatus*;7. *Aspergillus flavus* 1;8. *Aspergillus flavus* 5;
9. *Aspergillus versicolor*;10. *Aspergillus ochraceus*;
11. *Aspergillus niger*;12. Negative control

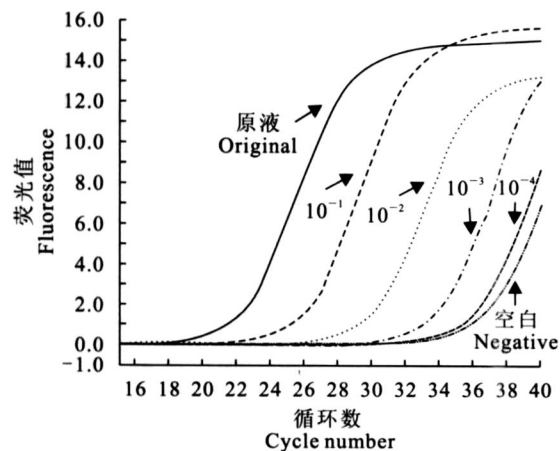


图 2 最佳退火温度下扩展青霉 DNA 系列稀释扩增的最小循环数(CT 值)

Fig.2 CT values of *Penicillium expansum* DNA serial dilution amplification at the best annealing temperature

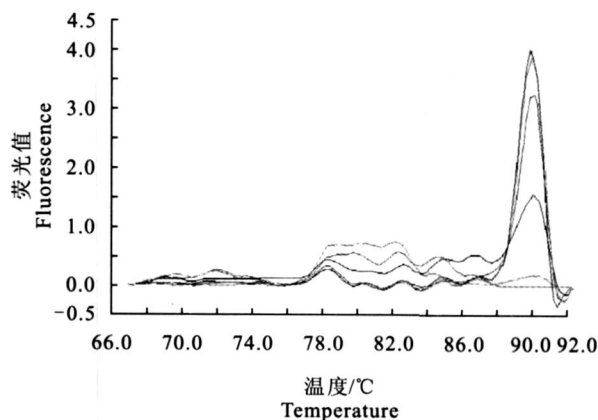


图 3 最佳退火温度下获得的扩展青霉 DNA 系列稀释扩增溶解曲线图

Fig.3 Amplification melting curve of *Penicillium expansum* DNA serial dilution at the best annealing temperature

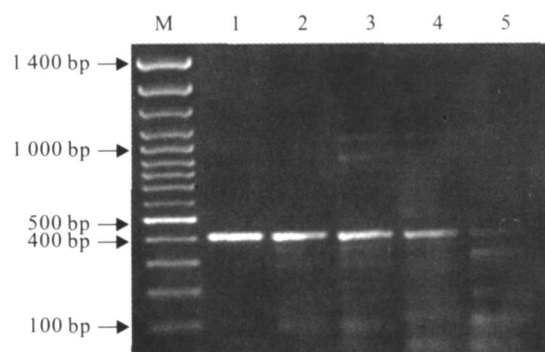


图 4 最佳退火温度下扩展青霉 DNA 系列稀释的实时 PCR 扩增电泳结果

M. 100 bp DNA 标准; 1. 提取液; 2. 10^{-1} 倍稀释液; 3. 10^{-2} 倍稀释液; 4. 10^{-3} 倍稀释液; 5. 10^{-4} 倍稀释液

Fig. 4 Electrophoresis result of real time PCR of *Penicillium expansum* DNA and its serial dilutions

M. DNA 100 bp Marker; 1. Original extraction; 2. 10^{-1} serial dilution; 3. 10^{-2} serial dilution; 4. 10^{-3} serial dilution; 5. 10^{-4} serial dilution

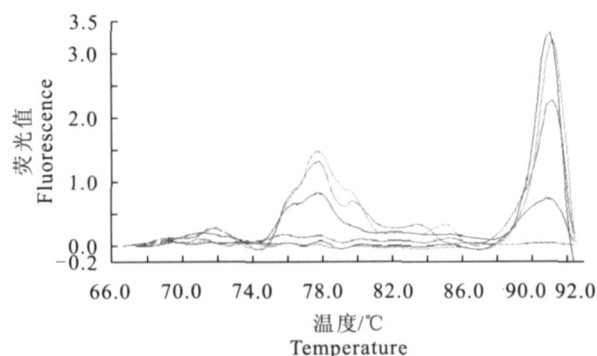


图 5 引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时 Lightcycler 实时 PCR 扩增产物和引物二聚体溶解曲线

Fig. 5 Melting curve of PCR products and primer-dimers at primer concentration 0.6 $\mu\text{mol/L}$

2.4 底物质量浓度对实时 PCR 扩增结果的影响

从理论上讲,PCR 扩增的效率应该是 2 或接近 2,无论底物质量浓度高低,产物都应该得到很好地扩增,但在实际试验中,扩增效率则受许多因素的影响,如 DNA 浓度、引物浓度、DNA 和引物的比例、聚合酶活力等,所以扩增效率一般在 1~2。根据实时 PCR 中底物质量浓度和扩增产物荧光值跃变的

2.3 引物浓度对实时 PCR 扩增结果的影响

引物浓度对 PCR 扩增效率的影响极大。一般而言,在传统 PCR 时,引物浓度多为 0.8~1.0 $\mu\text{mol/L}$,而实时 PCR 所用引物浓度更低,但具体浓度目前尚无明确的资料报道。本试验中,经反复比较,确定比较理想的引物浓度为 0.20~0.40 $\mu\text{mol/L}$,在此引物浓度下,DNA 的系列稀释可以获得满意的 CT 曲线和温度溶解曲线(图 2,3)。引物浓度较高时,在温度溶解曲线中,形成的引物二聚体溶解曲线很明显,溶解温度约为 78 $^{\circ}\text{C}$ (图 5),电泳图中也可以看到非常明显的引物二聚体存在(图 6);引物浓度过低时,基本不形成引物二聚体(图 7 和图 8),但扩增效率受到很大影响,溶解曲线显出只有原始液, 10^{-1} , 10^{-2} 和 10^{-3} 反应管中的 DNA 扩增(图 7),而电泳图上只有原始液和 10^{-1} , 10^{-2} 反应管中的 DNA 扩增得到的条带(图 8)。

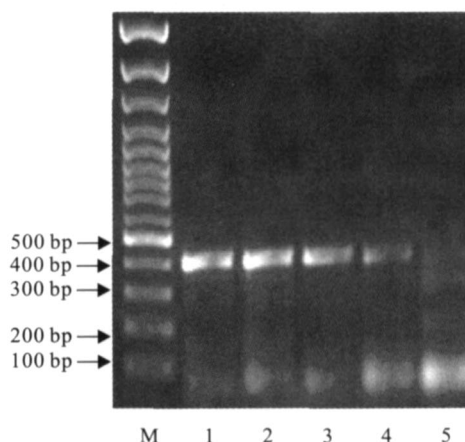


图 6 引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时 Lightcycler 实时 PCR 扩增产物的电泳图

M. 100 bp DNA 标准; 1. 提取液; 2. 10^{-1} 倍稀释液; 3. 10^{-2} 倍稀释液; 4. 10^{-3} 倍稀释液; 5. 10^{-4} 倍稀释液

Fig. 6 Electrophoresis of Lightcycler real time PCR products and primer-dimers at primer concentration 0.6 $\mu\text{mol/L}$

M. DNA 100 bp Marker; 1. Original extraction; 2. 10^{-1} serial dilution; 3. 10^{-2} serial dilution; 4. 10^{-3} serial dilution; 5. 10^{-4} serial dilution

关系可知,底物质量浓度增加或减少 10 倍,产物荧光跃变的最小循环数(CT 值)仅减少或增加 3.3,而不影响产物的扩增曲线以及产物的溶解曲线。从本试验结果可以看出,在 20 μL 的实时 PCR 毛细管中,底物质量浓度从 0.05~0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时反应液都能获得较好的扩增曲线和溶解曲线,电泳检测中也可以看到清晰的扩增条带,但当底物质量浓度再降

低时,实时 PCR 的扩增效率大大下降,要获得清晰的电泳条带,循环次数要增加到 50 次甚至更多,显

现不出实时 PCR 快速扩增的特点。

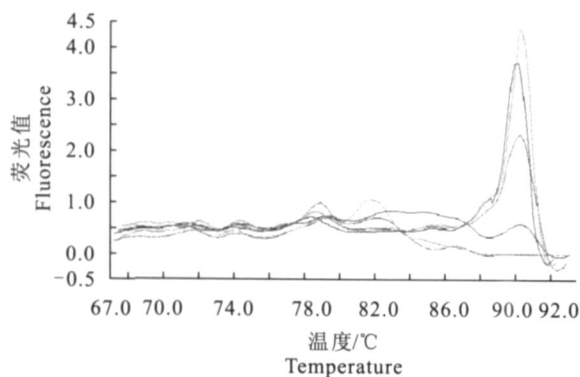


图 7 引物浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时 Lightcycler 实时 PCR 扩增产物溶解曲线

Fig. 7 Melting curve of Lightcycler real time PCR products and primer-dimers at primer concentration 0.1 $\mu\text{mol/L}$

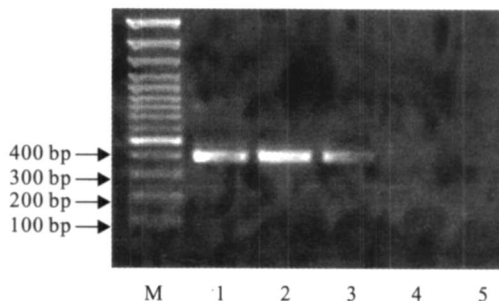


图 8 引物浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时 Lightcycler 实时 PCR 扩增产物的电泳图

M. 100 bp DNA 标准; 1. 提取液; 2. 10^{-1} 倍稀释液; 3. 10^{-2} 倍稀释液; 4. 10^{-3} 倍稀释液; 5. 10^{-4} 倍稀释液

Fig. 8 Electrophoresis of Lightcycler real time PCR products at primer concentration 0.1 $\mu\text{mol/L}$

M. DNA 100 bp Marker; 1. Original extraction; 2. 10^{-1} serial dilution; 3. 10^{-2} serial dilution; 4. 10^{-3} serial dilution; 5. 10^{-4} serial dilution

3 讨论与结论

苹果汁生产中最严重的安全问题是棒曲霉素,产生棒曲霉素的主要真菌是扩展青霉(*Penicillium expansum*),它主要引起苹果的腐烂并产生棒曲霉素。目前,世界各国包括我国对棒曲霉素的控制主要是加工后的后脱除,未能从根本上解决棒曲霉素的问题。在北美和欧洲国家,一些科技工作者试图在加工前对棒曲霉素产生菌进行控制,以尽量少产生棒曲霉素,这就需要对棒曲霉素产生菌进行快速检测和诊断,以判断该菌的来源和种类,找出关键控制点,采取相应的措施。利用 PCR 技术可以快速鉴定棒曲霉素产生菌,Paterson 等^[8]和 Patrick 等^[12]分别以不同的引物对棒曲霉素产生菌进行了 PCR 检测,但都是在实验室进行的纯菌培养,并未真正涉及到苹果样品,也未见有关实时 PCR 检测的报道。另外,目前 PCR 检测成本较高,对检测人员的素质要求也高,因此 PCR 技术在实际应用中还存在一些问题,如需要克服样品中其他 DNA 的影响,以及如何区别不同类别的真菌,只有解决了这些问题,PCR 技术才能真正应用于实际生产中。

本研究结果表明,用 Lightcycler 实时 PCR 扩增扩展青霉 *Penicillium expansum* DNA 的最佳退火温度为 61 $^{\circ}\text{C}$,扩增时间 16 s,引物最佳浓度为 0.20~0.40 $\mu\text{mol/L}$,底物质量浓度对实时 PCR 扩

增的影响较小。在以上参数下,可以获得良好的 PCR 扩增曲线、产物溶解曲线以及清晰的产物条带。本研究获得的快速检测扩展青霉的实时 PCR 参数,可作为其他微生物实时 PCR 检测时的方法学参考,也可用于浓缩苹果汁工业化生产中扩展青霉的快速检测和质量控制。

【参考文献】

- [1] 李佑民. 我省成为世界最大苹果浓缩果汁生产基地[N]. 陕西日报, 2006-02-08(1).
- [2] Birgette A, Jorn S, Jens C. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 2421-2428.
- [3] Bissessur J P, Odhav B. Reduction of patulin during apple juice clarification[J]. Journal of Food Protection, 2001, 21: 1216-1219.
- [4] Dombrink K, Judy A B. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium expansum* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98: 241-248.
- [5] Wan K, Ahmed E, Yousef J. Rapid, specific and sensitive detection of spoilage molds in orange juice using a real time Taqman PCR assay[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69: 385-390.
- [6] Garrett C, Alan D. Potential of using real time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice—a preliminary study[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91: 327-335.
- [7] 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[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39: 376-382.
- [8] Paterson Z, Kozakiewicz, Locke T. Novel use of the isopoxydon dehydrogenase gene probe of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin[J]. Food Microbiology, 2003, 20: 359-364.
- [9] Lars H P, Pernille S, Marianne B. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 35: 169-177.
- [10] Belen P, Amaia G. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 104: 207-214.
- [11] Ceniz J L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20: 2380-2381.
- [12] Patrick M, Thirunavukkarasu A, Kumar V. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 139-144.

(上接第 83 页)

- [3] 张嵩午. 小麦群体的第二热源及其增温效应[J]. 生态学杂志, 1990, 9(2): 1-6.
- [4] Blum A, Mayer J, Gozlan G. Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat[J]. Field Crops Research, 1982, 5: 137-146.
- [5] Fischer R A, Rees D, Sayre K D, et al. Wheat yield progress associated with higher stomata conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies[J]. Crop Science, 1998, 38(6): 1467-1475.
- [6] Reynolds M P, Singh R P, Abraham A, et al. Evaluating physiological traits to complement empirical-selection for wheat in warm environments[J]. Developments in Plant Breeding, 1997, 6: 143-152.
- [7] 张嵩午. 小麦温型现象[J]. 应用生态学报, 1997, 8(5): 471-474.
- [8] 张嵩午, 王长发. K 型杂种小麦 901 的冷温特征[J]. 中国农业科学, 1999, 32(2): 47-52.
- [9] 张嵩午, 王长发. 冷型小麦及其生物学特征[J]. 作物学报, 1999, 25(5): 608-615.
- [10] 冯佰利, 王长发, 苗芳, 等. 抗旱小麦的冷温特征[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(2): 6-10.
- [11] 冯佰利, 王长发, 苗芳, 等. 干旱条件下冷型小麦气体交换特性研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 48-51.
- [12] Rashid A, Tark J C, An V A, et al. Use of canopy temperature measure mints as a screening tool for rough tolerance in spring wheat[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 1999, 182(4): 231-237.
- [13] Reynolds M P, Fischer R A, Balota M, et al. Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions[J]. Australian Journal of Plant Physiology (Australia), 1994, 21(6): 717-730.
- [14] 张嵩午, 苗芳, 王长发. 小麦低温种质及其叶片的光合性能和结构特征[J]. 自然科学进展, 2004, 14(2): 179-184.
- [15] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 137-138; 196-197.
- [16] 张嵩午, 王长发. 小麦潜在库容研究[J]. 西北农业学报, 1999, 8(2): 16-19.
- [17] 许秀娟, 张嵩午. 冷型小麦灌浆期农田热量分配状况初探[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(4): 40-43.
- [18] Smith R C G, 王文学. 小麦产量与叶温的关系[J]. 气象科技, 1985, 36(2): 129-143.
- [19] 张嵩午, 王长发, 冯佰利, 等. 冷型小麦对干旱和阴雨的双重适应性[J]. 生态学报, 2004, 24(4): 680-685.
- [20] 张嵩午, 王长发, 冯佰利, 等. 灾害性天气下小麦低温种质的性状表现[J]. 自然科学进展, 2001, 11(10): 1068-1075.