

应用实时荧光定量 PCR 方法定量检测双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附

杨丽梅 朱德全 孙娱 孟祥晨*

(东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】采用实时荧光定量 PCR 的方法定量分析黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌, 并建立一种快速有效分离黏附于细胞的细菌的方法。【方法】采用 Triton X-100 溶液处理黏附于 Caco-2 细胞上的菌体, 确定获得最佳分离效果的处理时间; 建立实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌的方法, 获得标准曲线, 进行特异性、灵敏度、重复性评价; 应用建立的方法分析 11 株双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力。【结果】Triton X-100 处理黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌的最佳作用时间为 10 min。实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌的方法重复性好、特异性强、灵敏度高; 起始模板浓度范围在 10^4 – 10^8 CFU/mL 之间具有良好的线形关系, 相关系数 >99%, 在该浓度范围线性方程为: $y = -3.3452x + 37.6370$ 。应用建立的方法定量分析双歧杆菌的黏附能力, 与直接镜检法相比差异不显著 ($P > 0.05$), 检测时间由 48 h 缩短至 4 h。【结论】Triton X-100 分离处理结合实时荧光定量 PCR 方法是一种快速、有效的检测双歧杆菌对 Caco-2 细胞黏附能力的方法。

关键词: 双歧杆菌, 黏附, Triton X-100, 实时荧光定量 PCR

Application of quantitative real-time PCR for quantification of *Bifidobacterium* adhesion to Caco-2 cells

YANG Li-Mei ZHU De-Quan SUN Yu MENG Xiang-Chen*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] *Bifidobacterium* adherent to Caco-2 cells were quantitatively analyzed by quantitative real-time PCR, and a rapid and effective method to detach the bacteria from the Caco-2 cells was established. [Methods] Firstly, the *Bifidobacterium* adherent to the Caco-2 cells were treated by Triton X-100 solution with the aim of separating bifidobacterial cells from the Caco-2 cells. Secondly, quantitative real-time PCR method for quantifying *Bifidobacterium* was determined by generating a standard curve, evaluating the specificity, sensitivity and reproducibility of the method, respectively. Finally, the adhering capacity of 11 *Bifidobacterium* to the Caco-2 cells was detected by the method established in this study. [Results] The optimum time for separating *Bifidobacterium* from Caco-2 cells by Triton X-100 was 10 min. The quantitative real-time PCR method used for determining

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171719)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191813; 信箱: xchmeng@163.com

收稿日期: 2014-10-31; 接受日期: 2015-01-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

adherent ability of *Bifidobacterium* demonstrated a good reproducibility, a high specificity and sensitivity. When the initial template concentration was in the range of 10^4 – 10^8 CFU/mL, a good linear relationship between bacterial cell counts and C_t value was expressed with the equation of $y = -3.3452x + 37.6370$, whose correlation coefficient was above 99%. Compared with the gram staining microscopic examination with the detection time of 48 h, the quantitative real-time PCR method established in this study was able to obtain non-significant results of quantifying the adherent capacity of *Bifidobacterium* ($P > 0.05$), however, the time for detection was greatly shortened to 4 h. **[Conclusion]** Triton X-100 separation processing combining with quantitative real-time PCR is a rapid, accurate and sensitive method for detecting and quantifying the adhering capacity of *Bifidobacterium* to the Caco-2 cells.

Keywords: *Bifidobacterium*, Adhesion, Triton X-100, Quantitative real-time PCR

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)最早由法国巴斯德研究所的 Tissier^[1]于母乳喂养的健康婴儿粪便内发现并分离, 该菌存在于健康人体的消化道内, 与人的健康密切相关。双歧杆菌因具有调节肠道菌群平衡、降低血清胆固醇水平和血脂浓度等多种益生作用^[2-4], 被作为益生菌广泛应用于食品和药品^[5-6]中。

根据 FAO/WHO^[7]发表的报告, 筛选益生菌的主要标准之一是该菌是否具有能够黏附到肠道黏膜或上皮细胞上的性质。因此, 双歧杆菌作为益生菌要发挥其益生作用的前提是能够黏附到人体肠上皮细胞^[8]。由于在人体内评价双歧杆菌对人体肠道黏膜的黏附难以实现, 绝大多数采用体外细胞培养模拟胃肠道系统进行体外实验^[9]。Caco-2 细胞, 因其能够体外模拟成熟上皮细胞的结构和功能特征, 被广泛用于益生菌黏附的研究^[10]。

目前, 评价双歧杆菌对 Caco-2 细胞黏附的常用方法包括: 直接镜检法、平板菌落计数法和以 PCR 技术为特征的分子检测法等^[11]。直接镜检法受研究者主观因素影响较大, 精确性相对较低。平板菌落计数法费时费力, 而且双歧杆菌属于专性厌氧菌, 增加了对培养条件的要求。以 PCR 技术为特征的分子检测方法具有快速、特异性强、灵敏度高、定量准确、重复性好等优点而被广泛采用, 尤其是在定量检测产品中双歧杆菌时得到应用^[12-14]。Requena 等^[15]以 TaqMan 作为荧光探针, 以 16S rRNA 基因作为目的基因进行实时荧光定量 PCR, 可以快速准确定量婴儿粪便中的双歧杆菌。Kramer 等^[16]以

SYBR Green 为荧光染料对冷冻食品中的双歧杆菌进行定量分析, 结果表明采用 16S rRNA 基因作为目的基因进行 PCR 不仅可以准确定量双歧杆菌, 还可以有效区分乳杆菌和双歧杆菌菌群。以上研究表明, 实时荧光定量 PCR 可以应用于双歧杆菌的定量。

因此, 本研究拟采用实时荧光定量 PCR 的方法, 对黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌进行快速的定量检测, 为益生菌的体外筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株和供试细胞: 长双歧杆菌标准株(*B. longum* ATCC 15707)购于中国普通微生物种保藏中心(CGMCC), 10 株双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌 LGG 和嗜酸乳杆菌 NCFM 由东北农业大学乳品科学教育部重点实验室乳品工业微生物种保藏中心(KLDS-DICC)提供。

Caco-2 (Human colon adenocarcinoma, 人结肠腺癌细胞), 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 培养基配方: 乳杆菌属菌株选择 MRS^[17]培养基培养, 双歧杆菌属菌株选择添加 0.05% L-半胱氨酸盐酸盐的 MRS (mMRS)培养基培养。

1.2 菌种的传代

将双歧杆菌按 3%接种量接入 mMRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧(80% N₂、10% H₂、10% CO₂)培养, 将鼠李糖乳杆菌 LGG 和嗜酸乳杆菌 NCFM 按 3%接种量接入 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养过夜,

经过 3 代液体培养以提高菌株活力,作为实验菌株。

1.3 细胞培养

采用含 10%胎牛血清(使用前于 56 °C 灭活 30 min)和 1%双抗(青霉素和链霉素溶液)的 DMEM 培养基作为细胞培养基,在 37 °C、5% CO₂-95%空气的细胞培养箱中进行培养。

用于黏附试验的细胞培养于细胞 6 孔培养板中,接种量为 1×10^5 cells/well,待单层细胞汇合之后,继续培养 10–15 d,即可用于黏附试验。进行黏附实验前 24 h,需要更换为无双抗 DMEM 培养基(含有血清,不含抗生素)。

1.4 黏附实验

参考 Grootaert 等^[18]的方法,略作修改。将生长到对数生长期后期细菌培养物的浓度调整至 10^8 CFU/mL,重悬于等体积无双抗的 DMEM 培养基中,然后加入到培养在 6 孔板中的已分化的 Caco-2 细胞层中,于 37 °C、5% CO₂-95%空气的细胞培养箱中共同培养 2 h。

1.5 Triton X-100 处理与 Caco-2 细胞黏附的双歧杆菌

1.5.1 Triton X-100 处理对双歧杆菌存活率的影响:取培养至对数生长期后期的细菌培养物,10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,用等体积的 Triton X-100 溶液处理 30 min,对其进行 10 倍梯度稀释后,涂布于 mMRS 固体平板培养基上进行平板菌落计数,按照下列计算公式计算存活率,存活率 = 处理后菌数/未处理菌数 $\times 100\%$,定义未经 Triton X-100 处理的双歧杆菌存活率为 100%。

1.5.2 Triton X-100 处理与 Caco-2 细胞黏附的双歧杆菌的最佳分离时间的确定:按照 1.4 中的方法进行黏附试验,用 PBS 清洗以去除未黏附的双歧杆菌,加入 1 mL Triton X-100 溶液,分别处理 5、10、15、20、25、30 min,收集于离心管中。将收集的样品经 10 倍梯度稀释后涂布于 mMRS 固体平板培养基上进行平板菌落计数,结果以 Log CFU/well 表示,进行 3 次独立的实验。对照组采用胰酶(Gibco, 0.25% Trypsin-EDTA, 10 min, 37 °C)处

理^[19]分离黏附的双歧杆菌,其他处理与实验组相同。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测双歧杆菌时标准曲线的绘制

1.6.1 实时荧光定量 PCR:按照王超等^[20]的方法,从 GenBank 序列数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中调出已知的 34 种双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA,利用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>)及 DNAMAN 多序列分析软件,对其进行多重比对分析,找出双歧杆菌 16S rRNA/16S rDNA 保守的一段序列区,以长双歧杆菌 16S rRNA 基因序列(数据库登录号为 M58739)为模板,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物。本实验所使用的引物包括正向引物 Bif-F 和反向引物 Bif-R。Bif-F: 5'-TCTGGCTCAGGATGAACGC-3'; Bif-R: 5'-CACCGTTACACCGGAATTC-3'。

实时荧光定量 PCR 的反应体系:总体系 20 μ L, 2.5 \times Real Master Mix/20 \times SYBR solution 9 μ L,模板 DNA 100 ng,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,无菌去离子水 8 μ L。

实时荧光定量 PCR 的反应条件:94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 68 °C 1 min, 40 个循环,以 0.5 °C/s 的速度,从 60 °C 到 95 °C 作溶解曲线。溶解曲线用于检测是否有非特异性扩增产物和引物二聚体的产生,每个样品做 3 个平行。

1.6.2 实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌标准曲线的绘制:取过夜培养至生长指数期后期的长双歧杆菌(*B. longum* ATCC 15707)菌液,进行 10 倍梯度稀释,选择连续 6 个稀释度作为样品,分别对 6 个样品进行平板菌落计数。同时采用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒对 6 个样品提取基因组 DNA,以基因组 DNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR,具体参数见 1.6.1 方法。以长双歧杆菌标准株的不同菌落数的对数值(Log CFU/mL)为横坐标,以 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数(C_i 值)为纵坐标绘制标准曲线,进行相关性分析,确定检测的线性范围,进而建立实时荧光定量 PCR 检测黏附于

Caco-2 细胞的双歧杆菌的标准曲线。每个样品做 3 个平行, 同时以实验用水代替 DNA 模板作为空白对照(下同)。

1.7 实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌方法的方法学评价

1.7.1 特异性检测: 对 11 株双歧杆菌及鼠李糖乳杆菌 LGG 和嗜酸乳杆菌 NCFM 进行实时荧光定量 PCR 检测, 评价该方法的特异性, LGG 和 NCFM 作为阴性对照, 同时做空白对照。

1.7.2 灵敏度检测: 将长双歧杆菌标准株培养液进行连续 10 倍梯度稀释, 以每个稀释度的菌液作为实验样品, 分别提取 DNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测, 做空白对照。同时对每个梯度稀释度的样品进行平板菌落计数, 评价该方法的灵敏度。

1.7.3 重复性检测: 重复性检测包括: 批内和批间重复性检验。以所提取的长双歧杆菌标准株 DNA 为模板, 连续 6 d 对同一模板进行重复检测。

1.8 实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附

1.8.1 双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附: 按照 1.4 试验方法, 进行双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附试验。

1.8.2 实时荧光定量 PCR 测定双歧杆菌的黏附能力: 按照 1.5.2 的试验方法, 采用 Triton X-100 溶液对黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌进行分离处理 10 min (处理时间为 1.5.2 确定的最佳处理时间), 收集于离心管中, 10 000×g 离心 5 min, 收集菌体, 采用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 10 株双歧杆菌的 DNA, 按照 1.6.1 的方法进行实时荧光定量 PCR。按照 1.6.2 方法中建立的标准曲线, 计算双歧杆菌的黏附能力。以直接镜检法和平板菌落计数法为对照。

1.8.3 直接镜检法测定双歧杆菌的黏附能力: 按照 Guglielmetti 等^[21]的方法进行黏附试验, 用 PBS 清洗, 甲醇固定 10 min, 革兰氏染色, 在显微镜下观察细菌与细胞的黏附状态。黏附能力以随机选取的 20 个显微视野进行评价, 计算 100 个 Caco-2 细胞黏附的细菌数, 比较时转换成 Log CFU/well (细胞

培养 6 孔板中可容纳约 10^6 个细胞, 通过对 Caco-2 细胞进行计数获得)。

1.8.4 平板菌落计数法测定双歧杆菌的黏附能力: 按照 1.8.1 方法进行黏附试验, 加入胰酶 250 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 释放细胞上已黏附的细菌, 然后向培养板每个孔中添加 250 μ L 含无双抗 DMEM 的培养基以终止胰酶活力, 用吸管将 Caco-2 细胞层吹打下来。黏附细菌经 10 倍梯度稀释后涂布于 mMRS 固体平板培养基上进行平板菌落计数, 菌株的黏附能力以 Log CFU/well 表示, 进行 3 次独立的实验, 以上平板菌落计数样品均在 37 $^{\circ}$ C 条件下厌氧培养。

1.9 数据分析与统计

每个实验重复 3 次, 运用 SPSS Statistics V17.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 Triton X-100 处理对双歧杆菌存活率的影响

采用 Triton X-100 溶液对双歧杆菌处理 30 min 后, 双歧杆菌的存活率均在 96.2% 以上(表 1)。这与 van den Abbede 等^[22]的研究结果相似(存活率在 96.0% 以上), 表明细菌在 Triton X-100 溶液中能够较好地存活。

表 1 Triton X-100 处理双歧杆菌 30 min 后的存活率
Table 1 Bacterium survival (percentage) after 30 min exposure to Triton X-100

菌株名称 Bacterium name	存活率 Survival (%)
ATCC 15707	97.8±0.4
KLDS 2.0602	98.6±0.8
KLDS 2.0603	96.2±1.3
KLDS 2.0613	97.6±0.9
KLDS 2.0003	96.8±0.5
KLDS 2.0005	96.6±0.8
KLDS 2.0006	97.8±0.9
KLDS 2.0501	98.8±2.5
KLDS 2.0502	98.0±0.3
KLDS 2.0506	96.6±1.0
BB12	96.9±0.6

2.2 Triton X-100 处理黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌的最佳分离时间

Triton X-100 处理黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌不同时间的分离效果, 结果(图 1)显示, Triton X-100 溶液处理 5 min 的分离效果极显著低于对照组($P<0.01$), 处理 30 min 的分离效果显著低于对照组($P<0.05$), 处理 10、15、20、25 min 的分离效果与对照组差异不显著($P>0.05$)。因此, 选择采用 Triton X-100 溶液处理 10 min 作为最佳的分离时间。

2.3 实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌的标准曲线

所绘制实时荧光定量 PCR 检测双歧杆菌的标准曲线见图 2。结果表明: 当浓度过大($\geq 10^9$ CFU/mL)

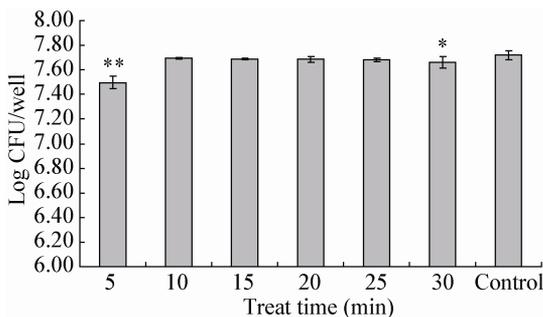


图 1 不同处理时间 Triton X-100 对黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌的分离效果

Figure 1 The separation of *Bifidobacterium* adhesion to Caco-2 cells treated by Triton X-100 for different times

注: 与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ as compared with control.

或过低($\leq 10^3$ CFU/mL)时, 标准曲线相关性不好; 浓度范围在 10^4 – 10^8 CFU/mL 之间时, 标准曲线线性关系良好, 相关系数 $R^2>0.99$ 。在该浓度范围的线性方程为 $y=-3.345 2x+37.637 0$, 其中 y 为 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数(C_i); x 为 *B. longum* ATCC 15707 菌落数的对数(Log CFU/mL)。

2.4 实时荧光定量 PCR 定量检测双歧杆菌方法的评价

2.4.1 特异性: 对 11 株双歧杆菌及鼠李糖乳杆菌 LGG 和嗜酸乳杆菌 NCFM 进行实时荧光定量 PCR 检测, 检测菌株的实时荧光定量 PCR 扩增曲线, 结果(图 3)显示: 无非特异性产物的扩增, 11 株双歧杆菌均表现为阳性扩增, 扩增曲线呈现明显的 S 型, 而鼠李糖乳杆菌 LGG 和嗜酸乳杆菌 NCFM 及空白对照未有荧光增加信号, 表现为阴性, 表明该方法有良好的特异性。

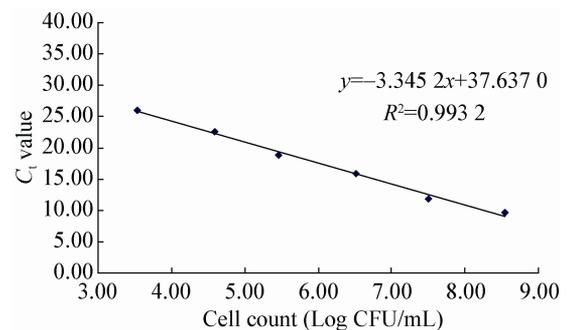


图 2 实时荧光定量 PCR 检测双歧杆菌的标准曲线

Figure 2 Standard curves for quantifying *Bifidobacterium* by quantitative real-time PCR

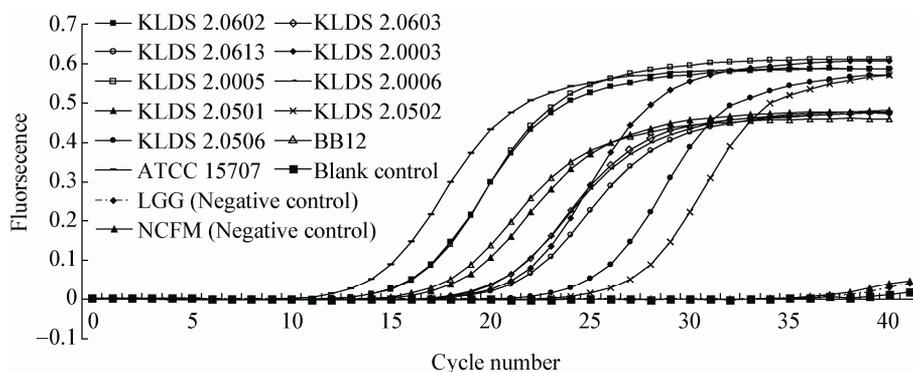


图 3 不同菌株 DNA 的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 3 Quantitative Real-time PCR amplification curves used for quantification of the DNA of different strains

2.4.2 灵敏度: 不同稀释度菌液的实时荧光定量 PCR 扩增曲线(图 4)显示: 当双歧杆菌浓度低于 10^4 CFU/mL 时, 扩增曲线 S 型不明显。因此, 该方法的最低检出限为 10^4 CFU/mL。

2.4.3 重复性: 用实时荧光定量 PCR 方法对长双歧杆菌标准株进行重复 6 次检测, 并对结果进行统计学分析, 结果(表 2)显示, 批内和批间 C_V 值均在 5% 以内, 说明实时荧光定量 PCR 检测方法具有较好的重复性, 实验结果具有较高的可靠性和稳定性。

2.5 实时荧光定量 PCR 方法定量检测双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附

应用所建立的实时荧光定量 PCR 方法定量检测了 11 株双歧杆菌的黏附能力, 结果(表 3)显示: 双歧杆菌 KLDS 2.0003 和 KLDS 2.0501 的实时荧光定量 PCR 检测结果与平板菌落计数法检测结果差

异显著($P<0.05$), 与直接镜检法的检测结果差异不显著($P>0.05$); 其余 9 株双歧杆菌的实时荧光定量 PCR 检测结果与传统的平板菌落计数法和直接镜检法检测结果均无显著性差异($P>0.05$)。实时荧光定量 PCR 方法检测时间只需要 4 h, 而平板菌落计数法检测耗时 48 h, 由此可见, 实时荧光定量 PCR 方法可大大缩短检测时间。

3 讨论

双歧杆菌具有调节肠道菌群平衡和竞争排斥病原微生物^[23]等益生作用, 定殖于肠道是双歧杆菌发挥其益生作用的前提, 而能否黏附到人体肠上皮细胞则是双歧杆菌快速定殖肠道的先决条件^[24]。因此, 一种快速、准确、灵敏的检测细菌黏附能力方法, 非常有利于高黏附能力的双歧杆菌菌株的筛选。

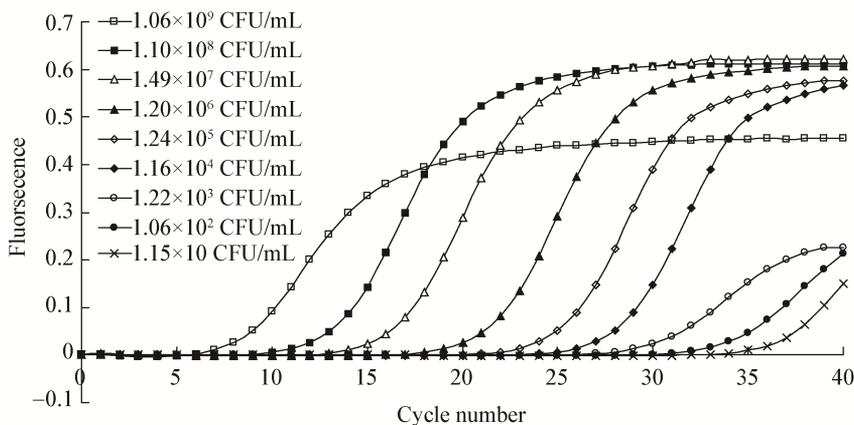


图 4 不同浓度双歧杆菌菌液的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 4 Real-time PCR amplification curves used for quantification of different concentrations of *Bifidobacterium*

表 2 同一模板 DNA 批内和批间重复性试验结果

Table 2 The test results of intra-assay and inter-assay reproducibility with the same template DNA

	批内重复性						批间重复性
	Intra-assay reproducibility						
	1	2	3	4	5	6	Inter-assay reproducibility
$X(C_i)$	19.67	19.22	19.08	19.64	18.98	19.48	19.32
s	0.27	0.32	0.47	0.33	0.62	0.47	0.48
C_V (%)	1.38	1.66	2.46	1.70	3.26	2.44	2.50

表3 双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附能力的检测结果
Table 3 The test results of quantification of *Bifidobacterium* adhesion to differentiated Caco-2 cell

菌株名称 Bacterium	黏附能力 Adhesion ability (Log CFU/mL±s)		
	实时荧光定量 PCR Real-time PCR ($C_t \pm s$)	平板计数法 Plate count	直接镜检法 Microscopic examination
<i>B. longum</i> ATCC 15707	7.26±0.04 ^a (13.35±0.10)	7.16±0.05 ^a	7.25±0.12 ^a
KLDS 2.0602	7.28±0.08 ^a (13.28±0.27)	7.14±0.25 ^a	7.26±0.05 ^a
KLDS 2.0603	7.60±0.03 ^a (12.21±0.07)	7.64±0.16 ^a	7.68±0.08 ^a
KLDS 2.0613	6.58±0.06 ^a (15.63±0.04)	6.56±0.21 ^a	6.62±0.11 ^a
KLDS 2.0003	7.57±0.02 ^a (12.31±0.05)	7.42±0.34 ^b	7.59±0.06 ^a
KLDS 2.0005	7.46±0.08 ^a (12.68±0.27)	7.39±0.11 ^a	7.48±0.02 ^a
KLDS 2.0006	7.79±0.02 ^a (11.58±0.07)	7.74±0.20 ^a	7.83±0.10 ^a
KLDS 2.0501	7.88±0.01 ^a (11.28±0.04)	7.76±0.26 ^b	7.89±0.06 ^a
KLDS 2.0502	7.19±0.02 ^a (13.59±0.05)	7.15±0.31 ^a	7.22±0.04 ^a
KLDS 2.0506	7.46±0.08 ^a (12.68±0.27)	7.41±0.17 ^a	7.50±0.03 ^a
BB12	7.83±0.02 ^a (12.28±0.07)	7.80±0.10 ^a	7.85±0.07 ^a

注：同行数据角标不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different subscript in each row indicate significant difference ($P < 0.05$).

本研究采用 Triton X-100 溶液分离处理的方法,分离获得黏附于 Caco-2 细胞的双歧杆菌。Triton X-100 处理的方法与胰酶消化法相比,胰酶消化法获得的双歧杆菌会混有大量的黏附细胞,且离心不易分离;而 Triton X-100 处理的方法不仅可以获得较好的分离效果,而且不会混有大量的细胞影响后续实验。因此, Triton X-100 溶液分离处理的方法优于胰酶消化法。在本研究中,用 Triton X-100 对双歧杆菌处理 30 min 后,发现双歧杆菌存活率均在 96.2%以上,说明双歧杆菌在 Triton X-100 溶液中能够较好地存活。van den Abbede 等^[22]用 Triton X-100 溶液对细菌处理 1 h 后,发现细菌的存活率可以达到 96.0%以上,该研究佐证了上述的试验结果。进一步研究发现:当用 Triton X-100 溶液对黏附的双歧杆菌处理 10 min 时,获得的分离效果与胰酶消化法差异不显著($P > 0.05$),而且延长处理时间至 30 min,对其分离效果无明显的增强,说明 Triton X-100 溶液在一定时间内可以有效分离黏附在 Caco-2 细胞上的双歧杆菌。Grootaert 等^[18]的研究也

表明, Triton X-100 可以有效分离黏附在模拟肠道细胞上的细菌。本试验采用 Triton X-100 对 11 株黏附的双歧杆菌处理 10 min,均可以获得较好的分离效果。

所建立的实时荧光定量 PCR 方法灵敏度高,双歧杆菌的最低检出限为 10^4 CFU/mL (图 4)。当起始模板浓度范围在 10^4 – 10^8 CFU/mL 之间时,所建立的标准曲线具有良好的线性关系,相关系数大于 99%。Tomas 等^[25]采用 Real-time PCR 方法对发酵乳中的乳酸菌和双歧杆菌进行定量,所绘制标准曲线的起始模板浓度在 10^5 – 10^9 CFU/mL 时,相关系数在 94.2%–99.7%之间,所获得的最低检测限是 (1×10^3) – (1×10^4) CFU/mL,该研究结果与上述的试验结果具有相似性,但是本试验所采用的 Real-time PCR 方法检测的是全部双歧杆菌,如需对活菌数进行准确的检测,还需要进一步的研究。

在本研究中,采用实时荧光定量 PCR 方法检测获得的 11 株双歧杆菌的黏附能力与直接镜检法获得的结果差异不显著,双歧杆菌 KLDS 2.0501、

KLDS 2.0006、BB12 都表现出较高的黏附能力, 其中 KLDS 2.0501 和 KLDS 2.0003 两株双歧杆菌的黏附能力显著高于平板菌落计数法, 这可能是由于平板菌落计数法仅检测黏附的活细胞, 而实时荧光定量 PCR 方法和直接镜检法计数的是黏附的全部细菌细胞(表 3), 既有活的细菌细胞, 也包括不可培养的细菌细胞。Chauviere 等^[26]的研究也发现死菌可以黏附到细胞上。直接镜检法受研究者人为主观因素影响较大, 精确性相对较低。平板菌落计数法检测大约耗时 48 h, 费时费力。然而采用实时荧光定量 PCR 的检测方法, 可以快速定量检测黏附于 Caco-2 细胞上的双歧杆菌(4 h 左右), 这为高黏附能力的益生菌的筛选和评价奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Tissier H. Recherchers sur la flora intestinale normale et pathologique du nourisson[D]. Paris: Master's Thesis of University of Paris, 1900
- [2] Candela M, Perna F, Carnevali P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 286-292
- [3] Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 70(2/4): 347-358
- [4] Tannock GW. Probiotics: a Critical Review[M]. UK, Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999: 57-64
- [5] Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, et al. Overview of gut flora and probiotics[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 41(2): 85-101
- [6] Simmering R, Blaut M. Pro- and prebiotics- the tasty guardian angels[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(1): 19-28
- [7] FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria[R]. Report from FAO/WHO Expert Consultation, 1-4 October 2001, Cordoba, Argentina
- [8] Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interaction midating the attachment of bacteria to mucosal surface[J]. Journal Infection Disease, 1981, 143(3): 325-345
- [9] Palencia PF, López P, Corbí AL, et al. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(5): 1475-1484
- [10] Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of *lactobacilli* to human Caco-2 cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(12): 4487-4494
- [11] Bianchi MA, Del Rio D, Pellegrini N, et al. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(3): 301-305
- [12] Masco L, Vanhoutte T, Temmerman R, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of *Bifidobacteria* in probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 351-357
- [13] Friedrich U, Lenke J. Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence *in situ* hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4163-4171
- [14] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 32-39
- [15] Requena T, Burton J, Matsuki T, et al. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2420-2427
- [16] Kramer M, Obermajer N, Bogovic Matijasić B, et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilized products by real-time PCR and by flow cytometry[J]. Applied Genetics and Molecular Biotechnology, 2009, 84(6): 1137-1147
- [17] Maldonado A, Ruiz-barba JL, Jiménez-díaz R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria[J]. Archives of Microbiology, 2004, 181(1): 8-16
- [18] Grootaert C, Boon N, Zeka F, et al. Adherence and viability of intestinal bacteria to differentiated Caco-2 cells quantified by flow cytometry[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(1): 33-41
- [19] Vesterlund S, Palta J, Karp M, et al. Measurement of bacterial adhesion—*in vitro* evaluation of different methods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 60(2): 225-233
- [20] Wang C, Meng XC. Establishment of real-time PCR and molecular beacon detection method for *Bifidobacteria*[J]. Microbiology China, 2007, 34(6): 1163-1168 (in Chinese)
王超, 孟祥晨. 分子信标-实时 PCR 法快速检测双歧杆菌的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1163-1168
- [21] Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4695-4702
- [22] van den Abbede P, Grootaert C, Possemiers S, et al. *In vitro* model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(2): 349-359
- [23] Collado MC, Gueimonde M, Hernandez M, et al. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(12): 2672-2678
- [24] Tuomola EM, Crittenden R, Playne M, et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2 suppl): 393S-398S
- [25] Tomas GC, Raquel T, Carmen P, et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR[J]. International Dairy Journal, 2009, 19: 405-409
- [26] Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, et al. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocytelike Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 70(3): 213-217