

半夏曲中4种优势微生物的荧光定量PCR方法的建立

郭佳佳¹, 王立元^{2#}, 翁美芝², 谢卫华³, 龙凯³, 苏明声¹, 杨明^{1*}, 谢小梅^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学基础医学院, 江西 南昌 330004

3. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要:目的 对半夏曲中4种优势微生物建立快速、有效的荧光定量PCR检测方法。方法 以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii*、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 的重组质粒为标准质粒, 设计特异性引物并进行特异性、灵敏性及重复性实验。结果 4种优势微生物的溶解曲线峰单一。枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉的最低检测限度分别为 584、622、0.272、500 拷贝/μL。不同质量浓度的标准质粒变异系数(CV)均小于5%。结论 建立的枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉的荧光定量PCR检测方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好等优点, 可用于发酵类中药中微生物的检测及定量。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 宛氏拟青霉; 丝衣霉菌; 黑曲霉; 荧光定量PCR; SYBR Green I

中图分类号: R286 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)24-5130-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.012

Establishment of fluorescent quantitative PCR method for four dominant microorganisms in *Rhizoma Pinelliae fermentata*

GUO Jia-jia¹, WANG Li-yuan², WENG Mei-zhi², XIE Wei-hua³, LONG Kai³, SU Ming-sheng¹, YANG Ming¹, XIE Xiao-mei¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China

2. School of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish a rapid and effective method for quantitative PCR detection of four dominant microorganisms in *Rhizoma Pinelliae Fermentata*. **Methods** The recombinant plasmids of *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces variotii*, *Byssoschlamys spectabilis*, and *Aspergillus niger* were used as standard plasmids. Design specific primers and perform specificity, sensitivity and reproducibility experiments. **Results** The melting curves of the four dominant microbes were single. The minimum detection limit for *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces variotii*, *Byssoschlamys spectabilis*, and *Aspergillus niger* were 584, 622, 0.272, and 500 copies/μL, respectively. The coefficient of variations (CV) of different concentrations of standard plasmid were less than 5%. **Conclusion** In this study, the quantitative detection method of *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces variotii*, *Byssoschlamys spectabilis*, and *Aspergillus niger* had the advantages of strong specificity, high sensitivity and good reproducibility, which could be used for the detection and quantification of microbes in fermented Chinese medicine.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Paecilomyces variotii*; *Byssoschlamys spectabilis*; *Aspergillus niger*; fluorescence quantitative PCR; SYBR Green I

收稿日期: 2017-06-13

基金项目: 国家中医药管理局 2015 年中医药行业科研专项 (201507004-03)

作者简介: 郭佳佳 (1989—), 女, 硕士研究生, 从事中药学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: 779018788@qq.com

*通信作者 谢小梅 (1964—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

杨明 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂研究。Tel: (0791)87119118 E-mail: yangming16@126.com

#并列第一作者 王立元 (1983—), 男, 博士, 讲师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118931 E-mail: jtcmmwangly1983@sina.com

半夏曲是由清半夏、白矾、生姜汁、面粉、六神曲在特定条件下经发酵而成的常用中药曲剂，具有燥湿化痰、消痞散结、健脾温胃的功效^[1]。临床上常用来治疗咳嗽痰多、胸脘痞满、呕恶、饮食不消等症。

有研究表明^[2]，半夏曲中含有的酵素是发挥健脾温胃功效的主要物质。王世宇等^[3]在半夏曲发酵处方筛选时，也是通过淀粉酶、蛋白酶活力来优选处方。中药发酵的炮制机制较复杂，主要是利用微生物代谢产生的酶对中药成分进行转化从而产生新的药效，参与整个发酵过程中的主要微生物菌群包括细菌、酵母菌和霉菌，其中起主要作用的是霉菌。通过微生物来发酵中药材比一般的物理或化学方法能更好地增强或调整药性^[4-6]。荧光定量 PCR 是一种核酸定量技术，它是在传统定性 PCR 的基础上发展起来的^[7-8]。在反应体系中加入荧光基团或荧光染料，利用反应过程中荧光信号的累积来实时监测整个反应的过程，最后通过已知拷贝数的模板建立的标准曲线对未知样品进行绝对定量分析。本研究拟建立半夏曲炮制中枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii*、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 4 种优势微生物的荧光定量 PCR 检测方法，为后续定量研究其在半夏曲炮制过程中的动态变化及其他发酵炮制类中药的微生物定量奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Ax1、宛氏拟青

霉 *Paecilomyces variotii* BJ2、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis* BJ3、黑曲霉 *Aspergillus niger* FX3 为本实验室从半夏曲炮制过程中不同时间点的样品中分离保存，鉴定人为江西中医药大学谢小梅教授和王立元讲师。

1.2 主要试剂与仪器

大量琼脂糖凝胶回收试剂盒、高纯质粒小提试剂盒、DH5 α 感受态细胞，天根生化科技（北京）有限公司；PCR 引物，生工生物工程（上海）股份有限公司；DM2000，康为世纪生物科技有限公司；pMDTM18-T Vector Cloning Kit、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)，TaKaRa 公司。凝胶成像分析仪，Bio-Rad 公司；I-16K 高速低温离心机，Sigma 公司；荧光定量 PCR 仪 7500/7500Fast，ABI 公司。

2 方法与结果

2.1 模板 DNA 的提取

用细菌和植物基因组 DNA 提取试剂盒对 4 种优势菌株进行 DNA 提取。-20 ℃ 保存备用。

2.2 引物的设计与合成

通过测序得到 4 株菌的核糖体基因保守序列，使用 Primer 5.0 软件对测序结果进行 PCR 引物设计，结果见表 1，并作 Blast 分析，筛选出特异性较强的引物。引物委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

2.3 PCR 产物的纯化

将 4 株优势微生物的 PCR 扩增产物在紫外灯下切胶，使用大量琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收得到纯化的 PCR 产物。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
<i>Bacillus subtilis</i>	上游引物 GCGTAGAGATGTGGAGGAA	318
	下游引物 TAGGATTGTCAGAGGATGTCA	
<i>Paecilomyces variotii</i>	上游引物 CGTGAAATTGTTGAAAGGGA	232
	下游引物 CCGCTTACGACCATTACG	
<i>Byssoschlamys spectabilis</i>	上游引物 CGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGAT	290
	下游引物 GCCGCTTACGACCATTACGC	
<i>Aspergillus niger</i>	上游引物 GCCGCCGCTGCCTTTTCG	189
	下游引物 GCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG	

2.4 质粒标准品的制备^[9]

以纯化的 PCR 产物为模板，按照 pMDTM18-T Vector Cloning Kit 说明书，进行载体的连接。接种

于含有抗生素的 LB 固体培养基中，涂布均匀，37 ℃ 倒置培养 16 h 后，挑选白色菌落接种于含有相应抗生素的 LB 液体培养基中，37 ℃ 振荡培养

24 h。使用高纯质粒小提试剂盒对培养的菌液进行重组质粒的提取及 PCR 鉴定。将鉴定正确的重组质粒作为标准品,用微量核酸测定仪测定其质量浓度,并根据公式计算原始质粒拷贝数。

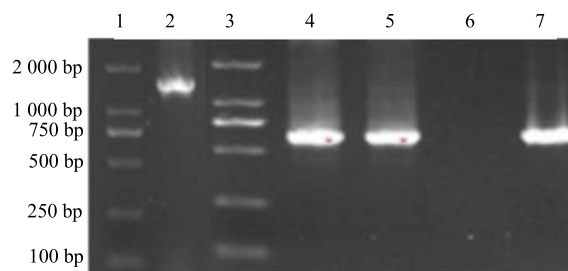
$$N=6.02 \times 10^{23} \times C \times 10^{-9} / (\text{DNA 长度} \times 660)$$

N 表示质粒的拷贝数, C 表示质粒的质量浓度, DNA 长度表示载体的片段长度 (2 692 bp) + 目的片段长度

各优势菌标准质粒 PCR 扩增电泳图谱结果见图 1, 以提取的 4 株优势微生物重组质粒和通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物大小与预期一致。将扩增产物送去上海生工测序, 测序结果通过 NCBI 进行比对, 相似性为 100%, 说明所得标准质粒即为所需要的目的质粒。

通过微量核酸测定仪直接测出 4 种标准质粒的质量浓度, 每株测 3 次取其平均值, 根据公式换算得出原始拷贝数。结果见表 2。 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0, A_{260}/A_{230} 大于 2.0 说明所提标准质粒纯度好, 不存在

蛋白质、酚类以及某些盐类的污染, 可以直接用于荧光定量 PCR 反应的阳性对照。



1、3-Marker 2-枯草芽孢杆菌标准质粒扩增 4-黑曲霉标准质粒扩增 5-宛氏拟青霉标准质粒扩增 6-空白 7-丝衣霉菌标准质粒扩增

1, 3-Marker 2-amplified by *Bacillus subtilis* standard plasmid 4-amplified by *Aspergillus niger* standard plasmid 5-amplified by *Paecilomyces variotii* standard plasmid 6-blank 7-amplified by *Byssoschlamys spectabilis* standard plasmid

图 1 各优势菌标准质粒 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 Standard plasmid PCR amplification electrophoresis

表 2 标准质粒拷贝数

Table 2 Copy number of standard plasmid

质粒名称	平均质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	总长度/bp	原始拷贝数/(拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
<i>B. subtilis</i>	230.0	3 902	5.84×10^{10}	1.83	2.11
<i>P. variotii</i>	225.0	3 301	6.22×10^{10}	1.92	2.05
<i>B. pectabilis</i>	97.8	3 281	2.72×10^{10}	1.86	2.22
<i>A. niger</i>	181.0	3 298	5.00×10^{10}	1.90	2.24

载体长度 2 692 bp

The length of the carrier 2 692 bp

2.5 荧光定量 PCR 标准曲线的建立^[10]

将标准质粒倍比稀释后进行荧光定量的扩增。以 ddH₂O 模板作为阴性对照, 待测样品 (半夏曲微生物总 DNA)、阳性对照 (标准质粒)、阴性对照 (空白) 同时进行反应。以阳性对照组拷贝数的对数为横坐标, 荧光信号的初始循环数 (CT) 为纵坐标绘制标准曲线。荧光定量 PCR 反应体系 25 μL : SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$) (Tli RNaseH Plus), Bulk 12.5 μL , PCR 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 PCR 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 9.5 μL 。荧光定量 PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 循环阶段 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 个循环; 熔解曲线阶段 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s。4 株菌株的线性回归方程分别为枯草芽孢杆菌 $Y=-3.455 X+39.486$, $R^2=0.995$; 宛氏拟青霉 $Y=-3.344 X+48.014$, $R^2=0.992$; 丝衣霉菌 $Y=-3.237$

$X+31.645$, $R^2=0.998$; 黑曲霉 $Y=-3.488 3 X+41.814$, $R^2=0.998$ 。 R^2 均大于 0.99 表明线性关系良好。扩增曲线见图 2。

2.6 灵敏性实验

将各标准质粒按照 10 倍梯度进行稀释, 分别进行荧光定量 PCR 反应, 根据仪器能检测的最低拷贝数作为该反应的灵敏度。将 4 株菌的标准质粒 10 倍的稀释梯度进行荧光定量 PCR 的扩增, 结果表明枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉的荧光定量 PCR 最低检测限度分别为 584、622、0.272、500 拷贝/ μL 。

2.7 特异性实验^[11]

分别用某一指定菌株的特异性引物同时对其他 3 株菌进行荧光定量 PCR 扩增, 观察熔解曲线是否为单一峰, 以判断引物的特异性。结果见图 3, 通过熔解曲线分析引物的特异性, 本实验熔解曲线是

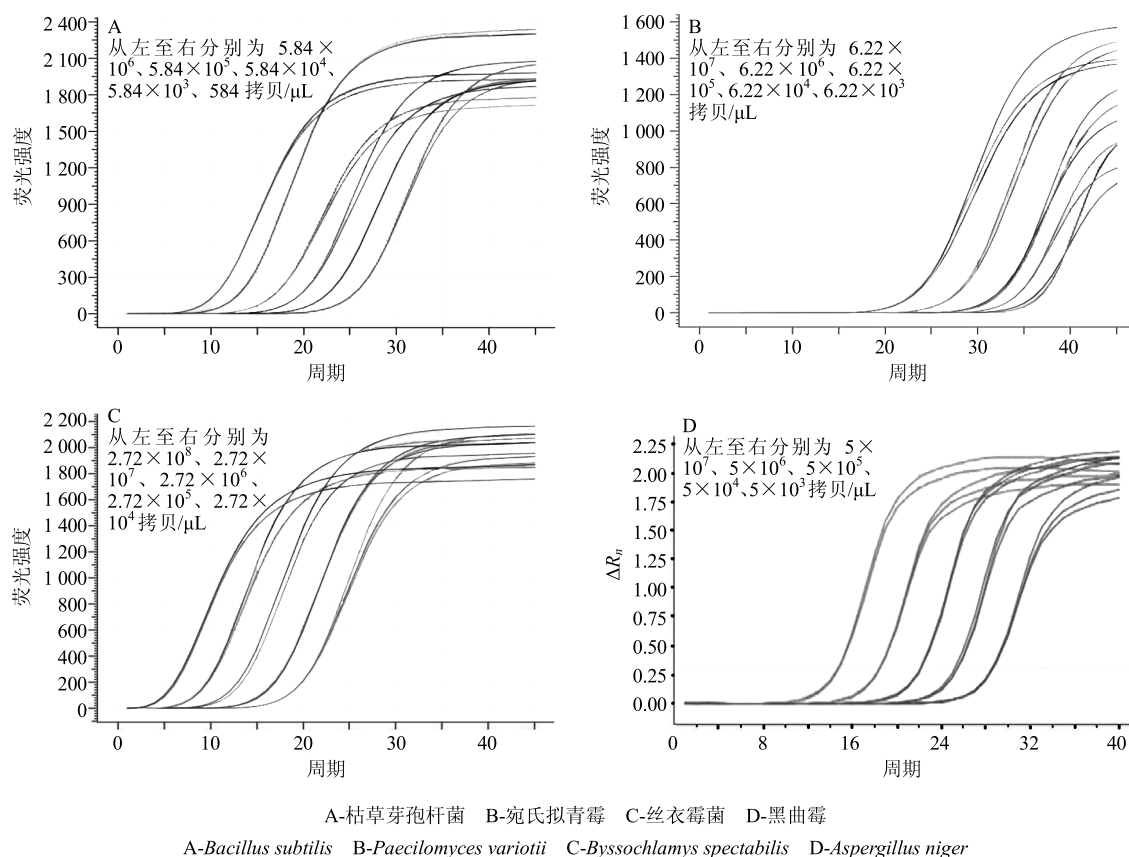


图 2 荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 2 Fluorescence quantitative PCR amplification curve

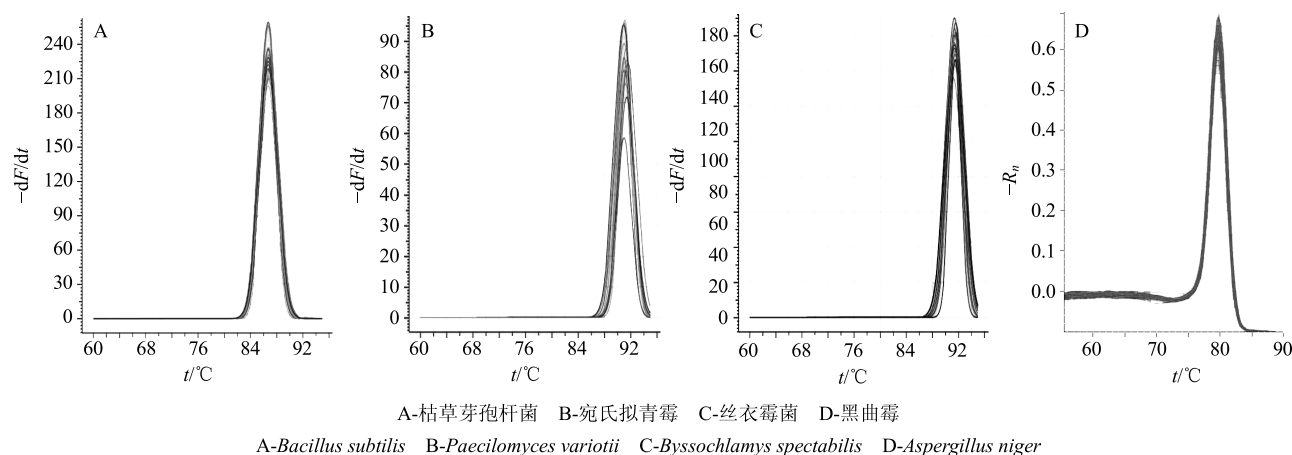


图 3 荧光定量 PCR 熔解曲线

Fig. 3 Fluorescence quantitative PCR melting curve

单一峰,表明引物的特异性良好。

2.8 重复性实验

重复性实验包括组内重复和组间重复。组内重复为选取 5 个稀释浓度的标准品进行实验,每个浓度做 3 个重复,将得到的 CT 值通过 SPSS19.0 软件计算变异系数(CV)。组间重复为 1 周后对上述样品再进行 1 次实验,比较不同批次同一浓度的 CT

值,计算 CV。验证该方法的重复性。实验结果见表 3、4。对组内重复性和组间重复性实验结果进行统计学分析,表明组内重复性和组间重复性的 CV 均小于 5%,说明该方法具有良好的重复性。

CV=标准差/平均值

3 讨论

本实验室前期对半夏曲炮制不同时间点的样本

表 3 标准质粒组内重复性

Table 3 Group repeatability of standard plasmid

标准质粒	浓度/(拷贝· μL^{-1})	组内 CV/%
<i>B. subtilis</i> 质粒	5.84×10^6	0.45
	5.84×10^5	0.62
	5.84×10^4	0.21
	5.84×10^3	0.36
	584	0.14
<i>P. variotii</i> 质粒	6.22×10^7	0.87
	6.22×10^6	0.28
	6.22×10^5	0.69
	6.22×10^4	0.88
	6.22×10^3	1.32
<i>B. spectabilis</i> 质粒	2.72×10^8	2.59
	2.72×10^7	2.22
	2.72×10^6	0.61
	2.72×10^5	1.05
	2.72×10^4	0.15
<i>A. niger</i> 质粒	5.00×10^7	0.77
	5.00×10^6	0.01
	5.00×10^5	0.19
	5.00×10^4	0.70
	5.00×10^3	0.23

进行了传统微生物培养,挑选出菌落形态相似且出现频率多的微生物作为优势菌种进行分离纯化并经分子生物学鉴定有 30 余株优势菌,此次实验选择了枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉这 4 株优势微生物进行荧光定量 PCR 方法学建立。

查阅文献得知,枯草芽孢杆菌、黑曲霉、宛氏拟青霉已广泛应用于药材或食品发酵中。枯草芽孢杆菌能产生 α -淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶、果胶酶和木聚糖酶等多种酶类^[12],具有良好的发酵基础。日本的纳豆主要就是利用 *B. subtilis* 发酵而成^[13]。黑曲霉可生产淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、木聚糖酶、糖化酶、果胶酶、纤维素酶等多种酶。早在古代,黑曲霉就被用于制作酱油、米酒等。黑曲霉的发酵周期短且不产生毒素,美国 FDA 认证为安全菌种 (GRAS),具有食品级生产许可^[14]。宛氏拟青霉能够产生木聚糖酶,它能促进蛋白酶及淀粉酶的释放,在酒类的酿造中被广泛使用^[15-16]。有关丝衣霉菌的生理生化特性及在食品发酵中的研究甚少。结合这 4 株菌在半夏曲炮制中的数量变化,推测它们可能在发酵过程中起主要作用,具体有何

表 4 标准质粒组间重复性

Table 4 Intergroup reproducibility of standard plasmid

标准质粒	浓度/(拷贝· μL^{-1})	组间 CV/%
<i>B. subtilis</i> 质粒	5.84×10^6	0.220
	5.84×10^5	0.036
	5.84×10^4	3.089
	5.84×10^3	0.104
	584	0.071
<i>P. variotii</i> 质粒	6.22×10^7	0.098
	6.22×10^6	0.491
	6.22×10^5	0.243
	6.22×10^4	2.094
	6.22×10^3	0.550
<i>B. spectabilis</i> 质粒	2.72×10^8	3.670
	2.72×10^7	1.320
	2.72×10^6	2.890
	2.72×10^5	0.098
	2.72×10^4	0.204
<i>A. niger</i> 质粒	5.00×10^7	0.200
	5.00×10^6	0.010
	5.00×10^5	0.510
	5.00×10^4	0.080
	5.00×10^3	0.060

作用本实验室正在研究中。

发酵炮制类中药的微生物学研究极少,本实验首次尝试建立半夏曲优势微生物的荧光定量 PCR 检测体系。本研究建立了半夏曲中枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉 4 种优势微生物的荧光定量 PCR 检测体系。枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉的标准曲线线性回归方程分别为 $Y = -3.455 X + 39.486$, $R^2 = 0.995$; $Y = -3.344 X + 48.014$, $R^2 = 0.992$; $Y = -3.237 X + 31.645$, $R^2 = 0.998$; $Y = -3.488 3 X + 41.814$, $R^2 = 0.998$ 。最低检测限度分别为 584、622、0.272、500 拷贝/ μL 。溶解曲线峰单一。

组内重复性和组间重复性的 CV 均小于 5%。表明该方法具有特异性强、灵敏度高、重复性好的特点。目前,对发酵炮制类中药的微生物学研究极少且大多采用传统微生物学研究方法,整个操作过程复杂、耗时且灵敏性准确性差,仅能定量培养微生物。常规的 PCR 方法不能定量。本研究中荧光定量 PCR 使用的是 SYBR Green I 染料法,它是目前得到国际公认的准确性、重复性最好的定量方法,已

广泛应用于各种领域。冉艳^[17]建立了检测痰液样本中肺炎克雷伯菌的实时荧光定量方法,具有速度快、阳性率高等特点。游亚兰^[18]成功建立了检测新型隐球菌等临床病原真菌的实时荧光定量体系。本实验建立的荧光定量 PCR 方法已应用于检测半夏曲炮制过程中优势微生物数量的动态变化,该方法高效、便捷、准确,也可应用于其他发酵类中药微生物的定量研究。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂 (第十册) [S]. 1995.
- [2] 彭继红. 半夏不同炮制品临床应用概述 [J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(5): 319-319.
- [3] 王世宇, 任振丽, 傅超美, 等. 半夏曲发酵处方的筛选 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(4): 367-369.
- [4] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为研究的新内容 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 267-268.
- [5] 李 羿, 万德光. 中药发酵炮制的本草考证及作用机理探讨 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(1): 69-71.
- [6] 朱海针, 谢卫华, 龙 凯, 等. PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1757-1765.
- [7] 邓 红, 吴纯启, 赵春雪, 等. 高通量测序和实时荧光定量 PCR 分析何首乌肝损伤与肠道微生物组的关系 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 464-471.
- [8] 许 明, 伊恒杰, 赵 帅, 等. 显齿蛇葡萄实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1192-1198.
- [9] 张 微, 姚 笛, 侯婷婷, 等. 乳中大肠杆菌 O157: H7 的荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国乳品工业, 2015, 43(7): 52-54.
- [10] 侯双利, 韩 梅, 刘翠晶, 等. 人参 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2530-2533.
- [11] 刘艳艳. 鲜乳细菌总数荧光定量 PCR 检测方法的建立 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [12] 袁小平, 王 静, 姚惠源. 枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶的纯化与性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(8): 55-59.
- [13] Fahnestock S R, Steinbuchel A. 李荣秀 译. 生物高分子 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] 张 熙, 韩双艳. 黑曲霉发酵产酶研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2016, 3(1): 13-16.
- [15] 吴 克, 蔡敬民, 刘 斌, 等. 宛氏拟青霉菌木聚糖酶的分离纯化 [J]. 工业微生物, 1998, 28(2): 31.
- [16] 阮同琦, 赵祥颖, 刘建军. 木聚糖酶及其应用研究进展 [J]. 山东食品发酵, 2008(1): 42-45.
- [17] 冉 艳. 肺炎克雷伯菌荧光定量 PCR 检测方法的建立和临床应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [18] 游亚兰. 念珠菌与新型隐球菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立 [D]. 衡阳: 南华大学, 2013.