

定量 PCR 技术检测杀菌型产品中乳酸菌

俞 漪*, 顾晨荣, 张娜娜, 刘 洋, 徐 琼

(上海市质量监督检验技术研究院/国家食品质量监督检验中心(上海), 上海 200233)

摘 要: 目的 利用定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)技术检测杀菌型产品中乳酸菌, 并与标签标示相比较, 查探产品中各类菌种的异同性及数量。**方法** 以市售的发酵乳及含乳饮料作为研究对象, 设计可区分产品中常见的 6 种乳酸菌特异性引物及探针, 利用 qPCR 技术对方法的特异性、灵敏度进行验证, 并建立标准扩增曲线; 利用模拟样品对方法进行检验, 最后对市场上购买的实际样品进行检测。**结果** 除去干酪乳杆菌, 其他 5 种引物都能特异性扩增出其目标菌, 并且对其他的乳酸菌均无扩增现象; DNA 检测的灵敏度可达到 2~4 pg; 单一标准菌种扩增曲线线性较好, 相关系数 r^2 值在 0.954~0.992 之间; 对模拟样品的检测, 与平板法差异性比较, P 值均大于 0.05, 无显著性差异。对市售样品进行检测, 产品中标记的干酪乳杆菌、双歧杆菌和嗜热链球菌与检测结果存在不匹配现象。**结论** 本研究建立的 qPCR 方法可快速、准确地对产品中德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、乳酸乳球菌、嗜酸乳杆菌、双歧杆菌的鉴定和定量的分析。

关键词: 乳酸菌; 定量 PCR; 杀菌型产品; 非培养

Determination of lactic acid bacteria in bactericidal products by quantitative PCR

YU Yi*, GU Chen-Rong, ZHANG Na-Na, LIU Yang, XU Qiong

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Quality Supervision and Inspection Center for Food Products (Shanghai), Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To detect lactic acid bacteria in bactericidal products by quantitative PCR (qPCR), and compare the results with the label to find out the heterogeneity and quantity of various types of bacteria in the products. **Methods** Taking commercially available fermented milk and milk-containing beverages as research objects, totally 6 kinds of primers and probes were designed to distinguish common lactic acid bacteria in the products. The specificity and sensitivity of the method were verified by qPCR, and the standard amplification curve was established. The simulation sample method was used to test, and the actual samples purchased in the market were tested. **Results** Except *Lactobacillus casei*, the other 5 primers could amplify their target bacteria specifically, and there was no amplification of other lactic acid bacteria. The sensitivity of DNA detection could reach 2-4 pg. The linearity of the single standard strain amplification curve was good, with r^2 between 0.954-0.992. Compared with the plate method, $P>0.05$, and there was no significant difference. In the detection of commercial samples, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacteria* and *Streptococcus thermophilus* labeled in the product did not match the test results. **Conclusion** This qPCR method can quickly and accurately identify and quantitatively analyze the products, including *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*

*通讯作者: 俞漪, 高级工程师, 主要研究方向为微生物和 PCR 技术在食品检测中的应用。 E-mail: yuyi@sqi.org.cn

*Corresponding author: YU Yi, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research/National Quality Supervision and Inspection Center for Food Products, NO. 381, Cangwu Road, Shanghai, 200233, China. E-mail: yuyi@sqi.org.cn

acidophilus and *Bifidobacteria*.

KEY WORDS: lactic acid bacteria; quantitative PCR; bactericidal type product; non culture

1 引言

乳酸菌是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌的统称。这类细菌在自然界分布极为广泛,具有丰富的物种多样性^[1]。目前在自然界发现的乳酸菌大约有 40 多个属, 300 多个种, 从形态上主要分为球状和杆状 2 大类^[2-4], 经过筛选和评价后, 广泛的应用在乳制品中, 深受广大消费者的青睐^[5]。

我国目前已有多项关于食品中乳酸菌的使用规范: 卫计委(卫办监督(2013)367 号)中明确指出^[6], 预包装食品中使用菌种应当按照 GB 7718-2011 的要求标注其菌种名称及含量^[7]; 另外 2016 年颁布的(卫办监督发[2016]6 号)^[8]中, 规范了食品中允许使用的菌种; 卫计委(卫法监发〔2001〕84 号)提出^[9], “可利用益生菌活菌、死菌及其代谢产物生产益生菌类保健食品”。但由于目前市场上涌现出大量杀菌型发酵乳和含乳饮料, 使得标准相对滞后, 造成产业发展迅猛的同时, 市场鱼龙混杂的问题日益凸显。

现今国家标准平板法^[10]和流氏细胞术都可对乳酸菌进行定量检测, 而前者耗时耗力, 结果受人为影响较大, 并且无法满足杀菌型产品要求, 后者虽能辨别活/死菌分别进行计数^[11,12], 但不能特异性针对样品中的某一种或多个菌株分别进行检测。利用分子生物学进行检测的手段已在食品微生物检测中得到应用^[13-15]; 赵文静详细的阐述了 qPCR 在乳酸菌定量检测中的应用^[16]; 进一步证明了生物分子学在的乳酸菌产品定量检测中广泛应用, 而通过 qPCR 技术来实现速度快、准确性高并适用于大批次样品的检测^[17]。本文根据市售产品中常用的 6 种乳酸菌, 获得待测菌株基因信息设计特异性引物, 通过建立 qPCR 方法, 对杀菌型产品中的乳酸菌种类以及含量进行鉴定, 从而真实性检测提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 标准菌株

干酪乳杆菌 CICC6117、嗜酸乳杆菌 CICC6074、嗜热链球菌 CICC6063、德式保加利亚乳杆菌 CICC6047、动物双歧杆菌 CICC6250、乳酸乳球菌 CICC6246、大肠埃希氏菌 ATCC25922(中国工业微生物菌种保藏管理中心, 购买后均由上海市质量监督检验技术研究院保存)。

2.1.2 样品信息

通过市场购买、网络、企业提供 3 种渠道获得 14 批次实验样本, 含 10 批次乳饮料和 4 批次发酵乳。

2.1.3 仪器与设备

5430R 振荡水浴槽(德国艾本德有限公司); SMI12 电热恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司); ESCO LA2-4A1 生物安全柜(新加坡艺思高); 7500Fast 荧光定量 PCR 仪、ABI VERITI 梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司); 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); MARKII 多功能智能厌氧系统(荷兰 MARTANOXPMAT 公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一公司); 5810R 台式高速大容量离心机(美国 EPPENDORF 公司)。

2.1.4 试剂

MC 培养基、MRS 培养基、MRS 肉汤、VRBA 培养基、营养肉汤(北京陆桥公司); TE(Tris+EDTA)缓冲液、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)(实验室配制); 溶菌酶、Tris 饱和酚[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 蛋白酶 K(美国 Promega 公司); 无水乙醇、三氯甲烷、异戊醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus)、DL 2000 DNA Marker、Premix Ex Taq Mix(日本宝生物公司); 5×TAE 电泳缓冲液、琼脂糖(北京天根公司)。

2.1.5 引物与探针

根据对检测产品中标签上所标示的乳酸菌种类, 在 NCBI 网站下载表 1 中的 6 种乳酸菌基因组的 SPIDR 保守区域的重复序列, 借助 ClustalW 软件对此序列进行比对, 然后使用 Primer Express 3 软件设计菌株特异性引物和探针。

2.2 实验方法

2.2.1 标准菌株培养

标准菌株从冻干磁珠中复苏, 乳酸菌按照 GB 4789.35-2016^[10]进行培养和扩增; 大肠埃希氏菌按照 GB 4789.38-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》^[18]进行培养和扩增。

2.2.2 核酸提取

标准菌株核酸提取^[19]: 取一定量发酵乳及含乳饮料配制成体积比 1:10 加入无菌水稀释后, 进行全基因组核酸提取^[20], 加入适量的 TE 溶解, 放置于-20℃备用。

采用核酸蛋白分析仪进行 DNA 浓度的测定, 将 DNA 溶液做适当的稀释, 进行测定, 于 260 nm 处测定其吸收峰, $1OD_{260}=50\text{ ng/uL}$ 双链 DNA, 用于 PCR 反应的 DNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 比值最佳范围为 1.7~2.1。

2.2.3 PCR 反应条件

qPCR 反应体系和反应参数参照文献^[20], 4℃保存反应产物; 采用普通 PCR 反应体系、反应参数和电泳检测参数参照文献^[21]。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Primer and probe sequences

菌株名称	序列	上下游引物(5'-3')	探针
德氏乳杆菌保加利亚亚种		F:ACTTTAGCCCATACCTGCGT R:GTAAATTCCAAGCCGCCCTT	CCGGTTGCCC GTTTCCTGCGG
嗜酸乳杆菌		F:GAGCTGAACCAACAGATTAC R:GCAGTTCCCCACGTGTTAC	CCCATCCGCCGCTAGCGTT
干酪乳杆菌		F:GCCGGGATCTTCAACTCAAC R:GCACGGCGCAGAAATCTATC	TCGCCCAATGCAGCCTGCGC
嗜热链球菌		F:GCAACCCTGACCGAGCAA R:CACGTAGTTAGCCGTCCC	CTCTCACACCCGTTCTTGACT
双歧杆菌		F:CTCGTGTCTGAGATGTTGG R:CGTTGTACCGCCATTGTAG	TCGCCGCATGTTGCCAGCGG
乳酸乳球菌		F:GTTAGCTGCGATACAGAG R:ACTGACACTGAGGCTCGAAA	ACCCTGGTAGTCCACGCCGT
16s rRNA		16SF:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1495R:CTACGGCTACCTTGTTACGA

注: 引物和探针均由英潍捷基生物公司合成。

2.2.4 qPCR 方法的灵敏度和特异性测试

灵敏度测试采用提取乳酸菌标准菌株 DNA, 测量 DNA 浓度, 并将 DNA 浓度定量至 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0005、0.0001 ng/μL; 每个 DNA 浓度设置 5 个平行。特异性测试采用以对应的乳酸菌标准菌株 DNA 做为阳性对照、大肠埃希氏菌标准菌株 DNA 为阴性对照、无菌水为空白对照。

2.2.5 标准扩增曲线建立

从单一标准菌株菌液 10 倍逐步稀释液中提取 DNA 进行 qPCR 扩增, 以标准菌株已知量的不同菌数对数值 [lg(CFU/g)]为横坐标, 采用乳酸菌特异性基因引物和探针扩增, 以反应过程中出现荧光信号的初始循环数(Ct)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程。

2.2.6 模拟样品检测

模拟样品检测是实样检测的预备试验, 为验证建立的方法是否可以在实际样品中进行检测, 通过对模拟样品中 DNA 提取效果分析和定量检测, 建立行而有效的满足实样检测的要求。利用建立好的 qPCR 技术对模拟样品进行检测, 分别将 5 种乳酸菌标准菌株制备成数量级为 10⁸ CFU/mL 以不含乳酸菌的乳饮料作为基质将乳酸菌的菌液等量混匀, 得到浓度数量级为 10⁷ CFU/mL 的混合菌液备用, 进行核酸提取, 利用 16S rRNA 扩增, 进行 3 个平行检测(编号: M1~M3); 以 DNA 的纯度、浓度以及凝胶成像来评价模拟样品 DNA 提取效果; 利用建立的 qPCR 方法检测模拟样品, 以平板法作为验证实验^[10], 通过计算 P 值来评价 qPCR 方法的可信度。

2.2.7 实际样品检测

市场上随机购买 14 批次产品, 所有产品标签标示均包含 2 种或 2 种以上的乳酸菌。按建立的 qPCR 方法对实

样进行检测, 每个样品 3 个平行, 取平均数。利用 16S rRNA 基因引物扩增, 检验样品中是否已提出可扩增的 DNA; 采用乳酸菌的特异性基因引物扩增, 按照标准曲线得到的公式, 将样品 Ct 值代入公式中, 分别计算样品中不同乳酸菌数量。同时设置空白对照、阳性对照和阴性对照。

2.2.8 质量控制

空白对照: 无荧光对数增长, 相应的 Ct 值<40.0; 阴性对照: 无荧光对数增长, 相应的 Ct 值>40.0;

阳性对照: 有荧光对数增长, 且荧光通道出现典型的扩增曲线, 相应的 Ct 值<30.0;

以上条件一条不满足, 实验视为无效。

3 结果与分析

3.1 qPCR 方法的特异性

特异性检测结果如表 2 所示, 实验空白对照都为阴性, 大肠埃希氏菌作为阴性对照为阴性, 说明实验的扩增体系成立; 除了干酪乳杆菌其他 5 对引物都能特异性扩增出其相对应的菌株, 无法扩增出其他的种类的乳酸菌, 说明合成的引物和探针特异性强, 可以用于后续检测, 能有效鉴别产品中乳酸菌的种类。

3.2 qPCR 方法的灵敏度

灵敏度检测结果如表 3 所示。德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、双歧杆菌、乳酸乳球菌检出限分别为 0.0005、0.001、0.001、0.0005、0.0005 ng/μL; 每个模板添加 4 μL, 即本文的 qPCR 体系的灵敏度可达到 2~4 pg。干酪乳杆菌 5 次实验中均未被扩增出, 说明该引物不适用于后续检测, 而其他引物灵敏度较高, 可用于实际样品检测。

表 2 特异性检测结果
Table 2 Result of specificity test

引物	菌株名称							
	CICC 6117	CICC 6047	CICC 6074	CICC 6063	CICC6246	CICC6250	ATCC25922	空白
干酪乳杆菌	—	—	—	—	—	—	—	—
德式乳杆菌德氏乳杆菌保加利亚亚种	—	+	—	—	—	—	—	—
嗜酸乳杆菌	—	—	+	—	—	—	—	—
嗜热链球菌	—	—	—	+	—	—	—	—
双歧杆菌	—	—	—	—	—	+	—	—
乳酸乳球菌	—	—	—	—	+	—	—	—

注：“+”Ct 值<30.0;“—”Ct 值>40.0。

表 3 灵敏度检测结果
Table 3 Result of sensitivity test

菌株名称	浓度/(ng/μL)						
	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0005	0.001
德氏乳杆菌保加利亚亚种	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5
嗜酸乳杆菌	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	2/5	0/5
干酪乳杆菌	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
双歧杆菌	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5
嗜热链球菌	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5
乳酸乳球菌	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5

3.3 标准曲线建立

以梯度稀释的标准菌株为模板进行 qPCR, 绘制乳酸菌荧光定量扩增标准曲线, 曲线方程和相关系数 r^2 值分别为: 嗜酸乳杆菌 $Y=-3.075X+38.75$, $r^2=0.980$; 嗜热链球菌 $Y=-3.991X+45.127$, $r^2=0.954$; 德氏乳杆菌保加利亚亚种 $Y=-2.990X+34.632$, $r^2=0.992$; 乳酸乳球菌 $Y=-1.263X+37.203$, $r^2=0.987$; 双歧杆菌 $Y=-4.232X+45.276$, $r^2=0.981$ 。该方法的 5 株菌株的相关系数 r^2 都大于 95%, 线性关系良好, 因此该标准曲线可以作为待测产品中各类乳酸菌数量测定的依据。

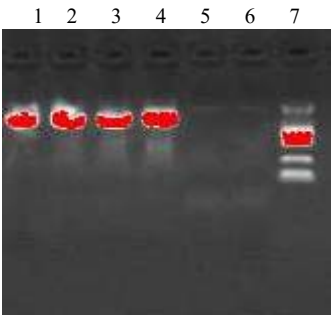
3.4 模拟样品检测结果

3.4.1 DNA 质量检测结果

如表 4 所示混合菌悬液用于 PCR 反应的 DNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 比值都在 1.7~2.2, 核酸提取质量符合 PCR 扩增要求。模拟样品中提取的 DNA 经电泳检测后如图 1 所示, 条带清晰分明, 亮度较强, 无特异性扩增条带产生, 并且扩增条带与目标条带位置一致, 能满足后续实验所需。

表 4 浓度、纯度结果(n=3)
Table 4 Concentration、purity results(n=3)

编号	浓度/(ng/μL)	A_{260}/A_{280}
M1	207.94	2.12
M2	606.74	2.14
M3	223.85	2.12



注: 1~3: M1~M3; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照; 6: 空白; 7: DL2000Marker。

图 1 16S rRNA 成像图
Fig.1 16S rRNA image

3.4.2 qPCR 检测结果

模拟样品的 qPCR 检测结果如表 5 所示, 可知在对以不含乳酸菌的含乳饮料为基质的模拟样品检测中, qPCR 检测法与国标平板法检测模拟样品中的乳酸菌, *P* 值均大于 0.05, 无显著性差异, 说明建立的 qPCR 检测方法是可行的。

3.5 实验样品检测结果

对市售产品采用建立的 qPCR 方法进行检测, 利用 16SrRNA 通用引物进行扩增, 样品核酸全部扩增出目的条带, 表明样品中已提出可扩增的 DNA; 采用乳酸菌的 SPIDR 保守区域的基因特异性引物扩增, 进行定量检测, 结果见表 6~7。

表 5 模拟样品的 qPCR 检测结果
Table 5 Results of qPCR detection of simulated samples

标准菌液	嗜热链球菌		德氏乳杆菌德氏乳杆菌保加利亚亚种		双歧杆菌		嗜酸乳杆菌		乳酸乳球菌	
	平板法	qPCR	平板法	qPCR	平板法	qPCR	平板法	qPCR	平板法	qPCR
M1	1.1×10 ⁷	1.5×10 ⁷	1.1×10 ⁷	1.5×10 ⁷	8.0×10 ⁶	1.0×10 ⁷	1.3×10 ⁷	2.3×10 ⁷	9.3×10 ⁶	1.2×10 ⁷
M2	8.6×10 ⁶	2.5×10 ⁷	2.3×10 ⁷	1.2×10 ⁷	6.9×10 ⁶	8.7×10 ⁶	9.9×10 ⁶	1.9×10 ⁷	8.9×10 ⁶	1.4×10 ⁷
M3	9.1×10 ⁶	1.5×10 ⁷	1.8×10 ⁷	1.4×10 ⁷	8.8×10 ⁶	1.0×10 ⁷	1.4×10 ⁷	1.5×10 ⁷	9.6×10 ⁶	2.1×10 ⁷
<i>P</i>	0.0592		0.3648		0.0761		0.0627		0.0795	

表 6 含乳样品 qPCR 检测结果(CFU/mL)
Table 6 Results of qPCR test of milk samples (CFU/mL)

编号	标签明示菌株	检测结果	编号	标签明示菌株	检测结果
Y1	嗜热链球菌	7.43×10 ⁵	Y6	嗜热链球菌	4.45×10 ⁵
	德氏乳杆菌保加利亚种	6.56×10 ⁵		德氏乳杆菌保加利亚种	1.14×10 ⁶
Y2	嗜热链球菌	7.12×10 ⁵	Y7	副干酪乳杆菌	Not detected
	德氏乳杆菌保加利亚种	1.49×10 ⁵		嗜热链球菌	9.53×10 ⁵
	两歧双歧杆菌	Not detected		德氏乳杆菌保加利亚种	1.53×10 ⁷
	嗜酸乳杆菌	9.27×10 ⁵		嗜酸乳杆菌	2.29×10 ⁶
	嗜热链球菌	8.44×10 ⁵	Y8	嗜热链球菌	8.15×10 ⁵
Y3	德氏乳杆菌保加利亚亚种	4.75×10 ⁶		德氏乳杆菌保加利亚种	2.32×10 ⁵
	副干酪乳杆菌	Not detected		副干酪乳杆菌	Not detected
	嗜酸乳杆菌	1.36×10 ⁶	Y9	乳酸乳球菌	3.19×10 ⁴
	乳双歧杆菌	Not detected		嗜热链球菌	Not detected
Y4	嗜热链球菌	4.82×10 ⁵		德氏乳杆菌保加利亚亚种	9.83×10 ⁵
	德氏乳杆菌保加利亚种	5.49×10 ⁶		嗜酸乳杆菌	1.20×10 ⁶
	乳酸乳球菌	1.23×10 ³	Y10	乳双歧杆菌	Not detected
	嗜酸乳杆菌	1.63×10 ⁶		嗜热链球菌	5.70×10 ⁵
	嗜热链球菌	9.31×10 ⁵		德氏乳杆菌保加利亚种	6.19×10 ⁶
Y5	德氏乳杆菌保加利亚亚种	1.79×10 ⁶	Y10	嗜酸乳杆菌	6.30×10 ⁶
	干酪乳杆菌	Not detected		干酪乳杆菌	Not detected
	乳酸乳球菌	1.89×10 ³			
	嗜酸乳杆菌	1.20×10 ⁶			

注: Not detected 表示未检测到。

表 7 发酵乳样品 qPCR 检测结果(CFU/g)
Table 7 Results of qPCR tests of fermented milk samples(CFU/g)

编号	标签明示菌株	检测结果	编号	标签明示菌株	检测结果
F1	嗜热链球菌	Not detected	F3	嗜热链球菌	7.62×10 ⁶
	德氏乳杆菌保加利亚种	8.63×10 ⁶			
	副干酪乳杆菌	Not detected		德氏乳杆菌保加利亚种	7.10×10 ⁶
	乳酸乳球菌	Not detected			
	嗜酸乳杆菌	1.65×10 ⁶			
F2	嗜热链球菌	6.85×10 ⁶	F4	嗜热链球菌	9.34×10 ⁵
	德氏乳杆菌保加利亚亚种	8.82×10 ⁶		德氏乳杆菌保加利亚种	4.80×10 ⁶
	乳酸乳球菌	1.09×10 ⁶			

注: Not detected 表示未检测到。

全部被检产品标签标示的菌株都符合法律法规要求^[6,7],无超范围标示。14 批次产品都标示有德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌,检测结果除 F1 产品中未检测到嗜热链球菌,其他产品含量都能够达到 10⁵ CFU/g(mL)以上,此类产品是基于以德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌为主要的发酵剂,并且研究发现此 2 种菌在乳中共同培养时菌株数量比单独在培养时高,表明它们存在着协同作用^[22]。有 8 批次产品中添加了嗜酸乳杆菌,其含量都能达到 9.27×10⁵~6.63×10⁶ CFU/g(mL),具有加工和储藏的稳定性,使其能在乳制品中保持高含量,在发酵乳和含乳饮料中得到了广泛的应用原因。双歧杆菌是人体益生菌中重要的一大类乳酸菌,现逐渐的被行业用作发酵剂添加在益生菌产品中,但是在众多乳酸菌中作为唯一一类专性厌氧菌,其生产发酵过程中的条件相较其他乳酸菌更为苛刻,在实样的检测中有 3 批次(Y2、Y3、Y9)未检出产品中标示的双歧杆菌,在模拟样品中双歧杆菌扩增良好的情况下,不排除有多种因素影响其实样检测结果。在添加乳酸乳球菌的产品中除了 F1 未检出,Y8 中乳酸乳球菌检测数量占据了总数量的 13.8%,而其他产品都有 0.1%~7%的比例;在当今发酵食品快速发展中乳酸乳球菌也逐渐成为最常用的发酵剂菌种之一,其优良发酵特性的具有重要生产意义^[23]。有 6 批次产品中标示有干酪乳杆菌,由于在前期的实验中合成的干酪乳杆菌的引物和探针无法有效的扩增出目标乳酸菌,所以在后续实验中需要进一步研究合适的引物。综上所述,本文建立的 qPCR 方法可以用于杀菌型产品中的德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、乳酸乳球菌和双歧杆菌定性和定量检测,基本包含了杀菌型发酵乳和含乳饮料产品常用的乳酸菌种类。

4 结论与讨论

本研究建立了 qPCR 方法,可同时对杀菌产品中多种

菌株检测,既实现了对死菌定量检测,又实现了快速对菌种间的鉴别及定量。在市售产品检测后发现,有未检出产品中标记的菌株的情况,不排除生产企业未添加现象存在,另外生产工艺存在问题或共同发酵后受主体菌群影响未能检测到目标乳酸菌;而对于实验合成引物和探针的未扩增出目标乳酸菌,需要在后续的工作中进一步研究高灵敏度和特异性强的引物。

参考文献

[1] 王丽丽. 乳酸菌的分离及酸奶的发酵[J]. 食品安全导刊, 2016, (33): 135.
Wang LL. Isolation of *Lactobacillus* and fermentation of yoghurt [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (33): 135.

[2] 高鹏. 广谱抗菌乳酸菌的分离鉴定及细菌素的提取、纯化及结核鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
Gao P. Isolation and identification of lab strains with a broad-spectrum antibacterial activity and extraction purification and identification of the bacteriocin [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.

[3] 胡会萍. 益生菌及其在功能食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 173-174.
Hu HP. Study on probiotics and its application in the functional food [J]. Food Res Dev, 2007, 28(2): 173-174.

[4] 卢海鹏. 传统酸马奶乳酸菌的鉴定及降胆固醇作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
Lu HP. Identification and cholesterol lowering effect of lactic acid bacteria from traditional koumiss [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.

[5] 章志超, 吴鑫. 益生菌的功能特性及其在乳制品中的应用[J]. 现代食品, 2018, (3): 7-10.
Zhang ZC, Wu X. Functional characteristics of probiotics and their applications in dairy products [J]. Mod Food, 2018, (3): 7-10.

[6] 国家卫生计生委. 国家卫计委关于食品中使用菌种标签标示有关问题的复函[Z]. 2013-06-14.
National Health and Family Planning Commission. Reply of the state health and Family Planning Commission on the issues related to the use of

- strain labels in food [Z]. 2013-06-14.
- [7] GB 7718-2011 食品安全国家标准 预包装食品标签通则[S].
GB 7718-2011 National food safety standard-General rules for labelling of prepackaged food [S].
- [8] 卫生部办公厅. 可用于食品的菌种名单[Z]. 2010-04-22.
General Office of the Ministry of Health. List of strains available for food [Z]. 2010-04-22.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于印发真菌类和益生菌类保健食品评审规定的通知[Z]. 2001(No 84).
Notice of the State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Announcement on printing and distributing the regulations on the evaluation of fungus and probiotic health food [Z]. 2001(No 84).
- [10] GB 4789.35-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
GB 4789.35-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Lactic acid bacteria [S].
- [11] 段宇珩, 谈重芳, 王雁萍, 等. 乳酸菌鉴定方法在食品工业中的应用及研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 242-244.
Duan YH, Tan ZF, Wang YP, et al. Study on development and application of identification of lactic acid bacteria in food industry [J]. Sci Technol Food Ind, 28(2): 242-244.
- [12] 刘洋, 姜凯, 赵渝. 基于流式细胞术的乳酸菌快速计数方法研究[C]. 中国食品科学技术学会会议论文集, 2018: 73.
Liu Y, Jiang K, Zhao Y. Study on rapid counting method of *Lactobacillus* based on flow cytometry [C]. Conference Proceedings of China Food Science and Technology Society, 2018: 73.
- [13] Wu YT, Liu XL, Cao Y, et al. Detection of bifidobacteria in fermented dairy products by real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Food Sci, 2013, 34(8): 172-5.
- [14] 程海星, 郭月英, 任霆. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 243-247.
Chen HX, Guo YY, Ren X. Principle and application of fluorogenic real-time PCR in food detection [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(3): 243-247.
- [15] Binetti AG, Capra ML, Alvarez MA, et al. PCR method for detection and identification of *Lactobacillus casei/paracasei* bacteriophages in dairy products [J]. Int J Food Microbiol, 2008, 124(2): 147-153.
- [16] 赵文静, 李妍, 高鹏飞. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 433-437.
Zhang WJ, Li Y, Gao PF, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria [J]. J Food Sci Biotechnol, 2009, 28(4): 433-437.
- [17] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020, (6): 1-3, 8.
Liang ZY, Liu F. Research progress of real-time fluorescent quantitative PCR technology and its application [J]. Res Agric Mod, 2020, (6): 1-3, 8.
- [18] GB 4789.38-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数[S].
GB 4789.38-2012 National food safety standard-Food microbiological examination-Enumeration of *Escherichia coli*.
- [19] 陈雯雯. 基因分型技术对益生菌婴幼儿配方乳粉中双歧杆菌鉴定的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
Cheng WW. Identification of bifidobacteria in probiotic infant formula milk powder by genotyping [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [20] 张娜娜, 刘洋, 俞漪, 等. 乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 27-32.
Zhang NN, Liu Y, Yu Y, et al. Real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic beverages [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 27-32.
- [21] 俞漪, 顾晨荣, 刘洋, 等. API-ZYM 系统分析动物双歧杆菌胞外酶活性[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1534-1540.
Yu Y, Gu CR, Liu Y, et al. Analysis of extracellular enzyme activity of *Bifidobacterium animalis* by API-ZYM system [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1534-1540.
- [22] 方伟. 德氏乳杆菌抗噬菌体菌株的筛选及抗性机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
Fang W. Selection of phage resistant strain of *Lactobacillus delbrueckii* and identification of phage resistance mechanisms [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.
- [23] 任敏. 具有优良发酵特性乳酸乳球菌乳酸亚种的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
Ren M. Screening of *Lactococcus lactis* subspecies with excellent fermentation characteristics [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



俞 漪, 高级工程师, 主要研究方向为微生物和 PCR 技术在食品检测中的应用。
E-mail: yuyi@sqi.org.cn