

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240119003

# 鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平快速 定量方法的建立及应用

彭新凯<sup>1,2</sup>, 王 婷<sup>2</sup>, 武 运<sup>1\*</sup>, 陈 颖<sup>2\*</sup>, 曲天铭<sup>2</sup>, 王 宇<sup>2</sup>, 赵晓美<sup>2</sup>, 郜忠川<sup>1</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 乌鲁木齐 830000; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

**摘 要:** **目的** 应用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 建立鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平的快速定量检测方法。**方法** 通过比对鼠李糖乳杆菌 HN001 的近缘菌株的基因组, 筛选出鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平的特异基因, 以菌株水平的特异基因为靶标设计引物及探针, 优化反应体系和条件, 建立鼠李糖乳杆菌 HN001 株水平的 qPCR 检测方法。对方法的特异性、灵敏度、检出限进行验证, 并采用已建立的 qPCR 方法进行模拟添加样品和实际样品的检测。**结果** 所建立的方法特异性强, 与近缘菌株无交叉反应, 鼠李糖乳杆菌 HN001 纯培养液检出限为  $10^2$  CFU/mL, 灵敏度可达到 650 copies/ $\mu$ L, 可在 2 h 内完成样品检测。对模拟添加样品以及实际样品检测中 qPCR 和平板计数法结果的对数值进行显著性分析检验, 两种方法的测定值结果均无显著性差异( $P>0.05$ )。**结论** 本研究建立的 qPCR 检测方法可有效应用于益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平定量检测, 具有快速、灵敏、准确的特点。

**关键词:** 实时荧光定量聚合酶链式反应; 鼠李糖乳杆菌 HN001; 菌株水平定量检测; 益生菌产品

## Establishment and application of rapid quantification method at the level of *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001

PENG Xin-Kai<sup>1,2</sup>, WANG Ping<sup>2</sup>, WU Yun<sup>1\*</sup>, CHEN Ying<sup>2\*</sup>, QU Tian-Ming<sup>2</sup>,  
WANG Yu<sup>2</sup>, ZHAO Xiao-Mei<sup>2</sup>, GAO Zhong-Chuan<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China;  
2. China Academy of Inspection and Quarantine Science, Beijing 100176, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a rapid quantitative assay for *Lactobacillus rhamnosus* HN001 at the strain level based on real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Methods** By comparing the genomes of the related strains of *Lactobacillus rhamnosus* HN001, the specific genes at the level of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 were screened, primers and probes were designed with the specific genes at the strain level as the target, the reaction system and conditions were optimized, and a qPCR method was established for the detection of

**基金项目:** 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2022JK07)

**Fund:** Supported by the China Academy of Inspection and Quarantine Science and Technology Basic Research Fee Program (2022JK07)

**\*通信作者:** 武运, 硕士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、食品营养与安全。E-mail: wuyunster@sina.com

陈颖, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全表征识别及溯源研究。E-mail: chenyingcai@163.com

**\*Corresponding author:** WU Yun, Master, Professor, College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, No.311, Nongda East Road, Shaybak District, Urumqi 830000, China. E-mail: wuyunster@sina.com

CHEN Ying, Ph.D, Professor, China Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Rong Hua South Road Beijing Economic Technological Development Area, Beijing 100176, China. E-mail: chenyingcai@163.com

*Lactobacillus rhamnosus* HN001 strain. The specificity, sensitivity, and limit of detection of the method were verified, and the established qPCR method was used to detect the simulated added samples and the actual samples. **Results** The established method was highly specific and had no cross-reactivity with closely related strains. The limit of detection of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 was  $10^2$  CFU/mL in pure culture solution, and the sensitivity could reach 650 copies/ $\mu$ L, and the sample detection could be completed within 2 h. The logarithm of the results of qPCR and plate counting method in the simulated spiked samples and actual samples were analyzed for significance, and there was no significant difference between the results of the two methods ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The qPCR method established in this study can be effectively used for the quantitative detection of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 at the strain level in probiotic products, which is characterized by rapidity, sensitivity and accuracy.

**KEY WORDS:** real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; *Lactobacillus rhamnosus* HN001; quantitative detection of strain level; probiotic products

## 0 引言

益生菌是指在活菌状态下满足一定数量时,能够给宿主健康带来有益效应的微生物<sup>[1-2]</sup>。近年来,中国的益生菌市场发展越来越快,保健协会数据显示,2023年中国的益生菌消费市场规模已经位居全球第二,并且以每年11%~12%的增幅增长,益生菌市场正呈现出巨大的市场潜力<sup>[3-4]</sup>。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)作为一种益生菌已被使用了30多年,其功效已被多项研究证实。研究表明,鼠李糖乳杆菌能够耐受胃液而进入肠道,黏附在肠道黏膜层,维护肠道菌群平衡和肠道稳态平衡<sup>[5]</sup>,抑制鼠伤寒沙门氏菌生长<sup>[6]</sup>,缓解抗生素相关性腹泻,去除水溶液中的镉和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub><sup>[7]</sup>,增强免疫反应<sup>[8]</sup>,减轻过敏反应<sup>[9]</sup>。鼠李糖乳杆菌 HN001 是 2022 年卫生和健康委员会发布的《可用于婴幼儿食品的菌种名单》中的菌株,目前市场上已经有较多的婴幼儿配方乳粉和益生菌保健品中添加了鼠李糖乳杆菌 HN001<sup>[10-11]</sup>,国家市场监督管理总局发布的《益生菌类保健食品申报与审评规(征求意见稿)》中规定益生菌保健产品在其保质期内活菌数不得少于  $10^6$  CFU/g(mL)。益生菌的安全性和功能具有菌株特异性,在菌株水平对益生菌进行精准定量是确保益生菌产品质量和功效的关键<sup>[12]</sup>。

现行有效的国家标准中采用平板计数法对鼠李糖乳杆菌进行定量检测。平板计数法有着方法简单、定量结果准确的优点,缺点是流程较长,一般需要 2~3 d 的时间<sup>[13-14]</sup>。目前用于益生菌鉴定的新型检测方法主要包括全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)技术,多点位序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术,16S/23S rRNA 测序技术(16/23S rRNA gene sequencing)等。WGS 技术如今常用于解决生物学和医学上的遗传学问题,是一种可靠的菌株水平鉴定技术,该技术也存在着技术要求高和耗时长限制因素,难以满足益生菌产品中益生菌的快速且频繁检测需求。MLST 技术是通过分析管家基因

序列差异来实现种内或亚种水平上区分细菌,16S/23S rRNA 测序技术利用 16S/23S rRNA 区域的序列可以将细菌划分为属或种,这两种方法都难以在菌株水平上对细菌进行鉴定<sup>[15-16]</sup>。实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)技术是由聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术发展出来的一种技术,qPCR 技术相较于传统 PCR 更具优势,它能够实时监测反应,并且不需要对 PCR 产物进行后处理,省略了扩增子可视化的步骤,整个流程的时间可以控制在 2 h 左右,可以满足益生菌产品中益生菌的快速检测需求<sup>[17-18]</sup>。qPCR 鉴定菌种或菌株时,通过物种特异性或菌株特异性引物/探针来检测特定目标物种或菌株的存在<sup>[19-20]</sup>,使用菌株水平特异性引物/探针建立的 qPCR 检测方法可以实现对目标菌株在菌株水平上的快速定量检测<sup>[21-22]</sup>。为了实现对益生菌产品中目标菌株的快速定量检测,针对现有检测方法的不足,本研究拟通过设计鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株特异性引物及探针,建立一种鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平的 qPCR 快速检测方法,用于益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 株水平的鉴定与定量,并对所建立方法的特异性、灵敏度、检出限和扩增效率进行验证分析,为益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 的株水平定量检测提供新的思路,为监管部门对益生菌产品的质量监管提供技术参考,对鼠李糖乳杆菌 HN001 在益生菌产品中更加广泛安全的应用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) HN001(美国杜邦公司);鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) CICC6151、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) CICC6135(中国工业菌种保藏中心);鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) Mp108、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) LGG(菌粉样品中分离菌株);鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) ATCC6001、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) ATCC7469、鼠李

糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) ATCC11443、干酪乳杆菌(*L. casei*) ATCC393、干酪乳杆菌(*L. casei*) ATCC334、植物乳杆菌(*L. plantarum*) CTCC6009、植物乳杆菌(*L. plantarum*) ATCC8014、德氏乳杆菌乳亚种(*L. delbrueckii. lactis*) CICC6047、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*) CTCC6226、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*) CTCC6074、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*) ATCC4356、发酵乳杆菌(*L. fermentans*) ATCC9338、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*) CICC6032、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*) ATCC15700、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*) ATCC11863、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*) CICC6071(中国检验检疫科学研究院菌种保藏中心); 乳酸菌培养基 MRS(美国 BD 公司); 质粒 DNA 小提试剂盒(货号: DP103)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(货号: DP302)、蛋白酶 K(货号: RT403)、溶菌酶(货号: RT401)(北京天根生化科技有限公司); Taqman Gene Expression MasterMix(货号: 4069016, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 感受态细胞 JM109(货号: C1300, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

7500FAST 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司); NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); WNB14 恒温水浴锅(德国 Memmert 公司); II级 A2 型 NU-602 生物安全柜(美国 Nuair 公司); Sigma 1-16 高速离心机(德国 Sigma 公司); CB56 恒温培养箱(德国 Binder 公司); PowerPac™Basic 电泳仪器、VersoDocImager 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); BS200S-WE1 电子天平(精度 0.001 g, 德国 Sartorius 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒按照制造商的说明提取细菌培养物和益生菌产品的 DNA。DNA 在 50 μL 洗脱液中洗脱。用 Nanodrop 2000 分光光度计紫外吸光度分析 DNA 纯度, 提取 OD260/280 比值为 1.8~2.0, 浓度为 10 ng/μL 的 DNA, 样品保存在-20℃。

1.3.2 引物的设计

根据鼠李糖乳杆菌 HN001 近缘菌株名称从 NCBI (National Center for Biotechnology Information) RefSeq 数据库获取其基因组信息和基因序列, 利用 Orthovenn 2 软件进行分析得到目标菌株与近缘菌株的共有基因与特有基因, 并进行深入分析。Orthovenn 2 首先会将所有菌株的蛋白序列放在一起进行 BLAST 比对, 根据 BLAST 比对结果, 确定出不同蛋白间相似程度, 相似的基因会划分入同一个 Orthologs Cluster。筛选得到的 2 个特异性基因均为单拷贝基因, 使用 2 个特异性基因序列在 Primer 3 上进行引物设计, 根据 Primer 3 软件上给出的引物信息进行初步筛选, 初步筛选后的引物在 NCBI 上进行 Primer BLAST, 验证所

设计引物及探针的特异性, 最终筛选出的 2 对引物及探针序列信息如表 1 所示, 探针 5'端标记 FAM, 3'端标记 BHQ。所述引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平鉴定的引物及探针  
Table 1 Primers and probes for strain-level identification of *L. rhamnosus* HN001

| 引物/探针名称 | 序列(5'-3')              |
|---------|------------------------|
| FD-F    | CATCCAAGCCTTCTCGTGGT   |
| FD-R    | ACAACATTTGGTTGGCCTGC   |
| FD-P    | GCAAGGCCTGCAGAGTAGCGA  |
| RP-F    | GCTTAGCTTTCTCTACTGGCGA |
| RP-R    | GTTTGCACCAGATCCCCTCA   |
| RP-P    | AAGCGCCAAGCCTTACGTGAT  |

1.3.3 qPCR 反应体系及检测方法

采用 25 μL 的扩增体系, 扩增使用的模板 DNA 用量为 2 μL (10 ng/μL), Taqman Gene Expression Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), 探针 0.5 μL (10 μmol/L), 加去离子水补足至 25 μL。qPCR 反应程序: 95℃预热 10 min, 循环程序为(95℃ 15 s, 58℃ 35 s), 循环数设置为 40。

1.3.4 引物的特异性验证

为确保所设计引物及探针的特异性, 通过鼠李糖乳杆菌 HN001 的 16S rRNA 基因在 NCBI 上进行 BLAST, 选取序列同源性较高的菌株进行系统发育树的构建, 筛选出与鼠李糖乳杆菌 HN001 亲缘关系较近的 20 株菌株作为非靶菌株进行引物特异性验证, 最终确定的 20 株菌株如 1.1 中所示。

1.3.5 重组质粒的构建

使用 FD 引物和 RP 引物对鼠李糖乳杆菌 HN001 的 DNA 进行常规 PCR 扩增, 扩增产物送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 将目的基因与扩增产物的测序结果进行序列比对。参考王娉等<sup>[23]</sup>的方法将扩增出的目的基因片连接到载体 pMD<sup>19-T</sup> vector 上, 并导入到感受态细胞 JM109 中, 于 37℃过夜培养复制。

1.3.6 标准曲线的建立

提取质粒标准品的 DNA, 使用分光光度计测定重组质粒的 DNA 浓度, 按照公式(1)计算重组质粒的拷贝数, 将重组质粒按照 10 倍梯度进行稀释, 每个梯度重复 3 次 qPCR 扩增。反应体系和程序按照 1.3.3 进行, 以不同质粒 DNA 拷贝数的对数为横坐标, 以 qPCR 反应过程中到达荧光阈值的初始循环数(Ct)为纵坐标进行标准曲线的绘制, 具体见公式(1)<sup>[24]</sup>:

质粒 DNA 拷贝数/(copies·μL)=

$$\frac{\text{DNA浓度} \times 10^{-9}}{\text{片段大小} \times 660} \times \text{NA} \tag{1}$$

式(1)中: NA, 阿伏伽德罗常数, 6.02×10<sup>23</sup>。

使用曲线的斜率以及应用公式(2)<sup>[25]</sup>来确定扩增效率:

$$E=10^{\frac{-1}{\text{slope}}} \quad (2)$$

式(2)中:  $E$  表示扩增效率,  $\text{slope}$  表示斜率。

### 1.3.7 灵敏度分析

将质粒 DNA 模板预混液原液按 10 倍梯度进行稀释, 从原液开始稀释至  $10^{-8}$ , 一共 9 个梯度。稀释后的对每个梯度进行 qPCR 扩增, 每个梯度的样品重复 3 次, 以测定检测体系的灵敏度。

### 1.3.8 纯菌菌液检出限的确定

将鼠李糖乳杆菌 HN001 过夜培养后的菌悬液进行 10 倍梯度的稀释, 以  $10^8$  CFU/mL 作为起始浓度, 制备  $10^8 \sim 10^1$  CFU/mL 不同梯度的菌悬液, 使用 1.1 中的细菌基因组 DNA 提取试剂盒对每个梯度的菌悬液进行 DNA 的提取。提取后的 DNA 参照 1.3.3 中的反应体系和扩增参数进行 qPCR 扩增, 根据 qPCR 扩增曲线与 Ct 值判断该方法可检测到的最低纯菌菌液检测浓度。

### 1.3.9 模拟鼠李糖乳杆菌 HN001 样品的平板计数及 qPCR 检测

称取未添加鼠李糖乳杆菌 HN001 的乳粉样品 5 g, 将称好的乳粉样品加入装有 44 mL 生理盐水的均质袋内, 取出 37°C 厌氧环境下培养 48 h 的鼠李糖乳杆菌 HN001, 制备鼠李糖乳杆菌 HN001 菌悬液并将菌悬液的浓度调整至  $10^8$  CFU/mL, 添加 1 mL 菌悬液至于均质袋中, 使用均质机将样品均质 2 min, 样品一共制备 5 份, 每个样品重复 3 次。将制备好的 5 个样品, 分别梯度稀释进行平板计数方法检测。同时取各样品溶液各 1 mL 用 1.3.1 方法提取 DNA, 提取完的样品 DNA 进行 qPCR 检测。将 qPCR 定量结果与平板计数定量结果进行比较, 使用 SPSS Statistics 26 软件对两种方法的检测结果进行显著性分析检验来评

价建立的 qPCR 方法的可信度。

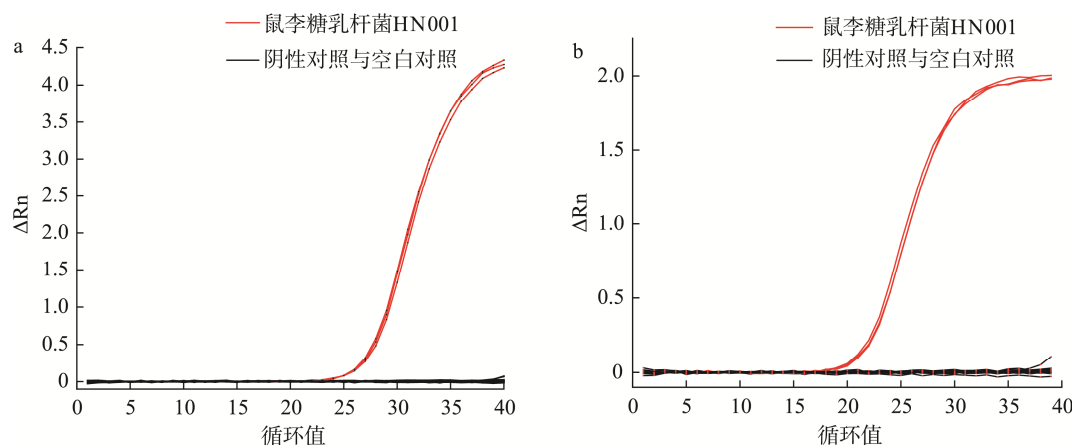
### 1.3.10 实际样品检测

采集市售 5 份不同厂家的益生菌产品进行实际样品检测, 所采集样品标签中均含有鼠李糖乳杆菌 HN001。样品的制备参照 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》方法进行处理, 取 25 g 产品样品溶于 225 mL 无菌生理盐水中, 用无菌生理盐水稀释 10 倍, 记录稀释次数, DNA 提取方法参照 1.3.1, 原始样本 DNA 拷贝数  $\text{copies}/\mu\text{L} = \text{待测样本拷贝数} \times \text{稀释倍数}$ , 原始样本总细菌拷贝数  $\text{copies/g} = (\text{原始样本 DNA 拷贝数} \times \text{基因组 DNA 总体积}) / \text{样本抽提重量}$ 。每个样品做 3 次重复, 同时对样品应用平板计数方法定量检测, 比较两种方法的定量结果的一致性。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物及探针特异性验证

为了测试引物的特异性, 本研究采用了 20 株鼠李糖乳杆菌 HN001 的近缘菌株作为非靶标样品对两对引物及探针进行特异性验证。近缘菌株包含乳杆菌属和双歧路杆菌属的几种菌株, 为确保菌株水平的特异性, 采用鼠李糖乳杆菌 LGG、MP108、CICC3135、CICC6151、ATCC7469、ATCC11443 作为非靶标菌株, 同时为了确保能对不同来源的 HN001 进行扩增, 使用了 3 株不同来源的鼠李糖乳杆菌 HN001 作为靶标菌株, 包括鼠李糖乳杆菌 HN001 标准菌株一株, 乳粉样品中分离一株以及益生菌菌液产品中分离一株。如图 1 所示, 图 1a 为 RP 引物特异性验证结果, 图 1b 为 FD 引物特异性验证结果, 两对引物均只能扩增出鼠李糖乳杆菌 HN001 而无法扩增出其他非靶标菌株, 说明两对引物特异性良好, 可满足对鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌株水平检测。



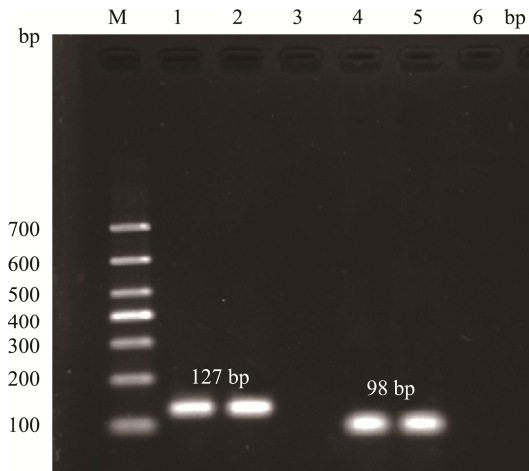
注: a 为 RP 引物特异性验证结果; b 为 FD 引物特异性验证结果;  $\Delta Rn$  为荧光强度。

图 1 两对不同引物的 qPCR 特异性验证结果

Fig.1 qPCR-specific validation results of 2 pairs of different primers

2.2 质粒标准品的鉴定

使用两对引物构建的质粒标准品进行 PCR 扩增, 使用扩增产物进行琼脂凝胶电泳, 结果如图 2 所示, 泳道 1、2、3 为 FD 引物的扩增产物的两次重复和空白对照, 每次重复均只出现了单一条带且与目标大小 127 bp 一致, 空白对照未出现扩增。4、5、6 为 RP 引物的扩增产物的两次重复和空白对照, 每次重复一致且大小与目标大小 98 bp 一致。将质粒扩增产物进行测序, 测序结果与目的基因序列进行比对, 结果完全一致。上述结果表明质粒构建成功可用于后续实验。



注: M 为 maker 条带; 条带 1 和 2 为 FD 引物构建的质粒条带; 条带 4 和 5 为 RP 引物构建的质粒条带; 条带 3 和 6 为空白对照。

图 2 两种质粒标准品鉴定的凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis diagram for identification of two plasmid standards

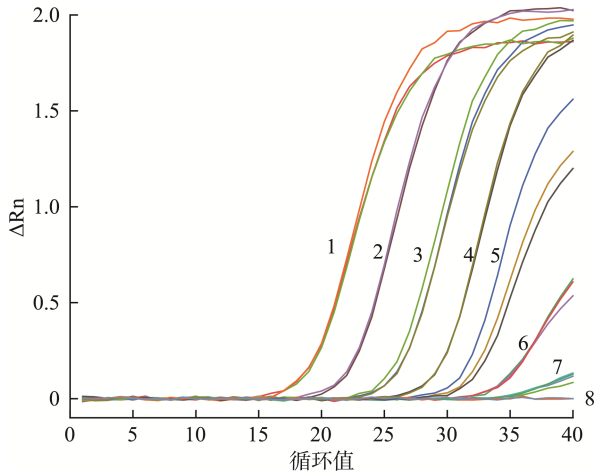
2.3 qPCR 标准曲线的建立

以质粒 DNA 拷贝数为横坐标, Ct 值为纵坐标, 建立回归方程。当使用 RP 引物作为引物时, 构建回归方程时发现, 虽然  $R^2=0.9891$ , 线性拟合度较好, 但使用 1.3.6 中的公式(2)计算得出扩增效率为 77.8%, 扩增效率较低无法满足后续的定量需求, 后续定量实验不使用 RP 引物。使用 FD 作为引物进行回归方程的构建时, 回归方程为  $Y=-3.2829X+36.44$ , 式中 Y 为 Ct 值, X 为质粒 DNA 拷贝数, 相关系数  $R^2=0.9978$ , 线性关系良好, 式(2)计算得出扩增效率为 99.5%, 扩增效率满足要求, 因此, 后续实验均使用 FD 引物进行, 后续研究中根据 qPCR 的 Ct 值来计算待测样本的拷贝数。

2.4 qPCR 的灵敏度检验

采用 1.1 中的质粒小提试剂盒对构建的质粒 DNA 进行提取, 使用超微量分光光度计 NanoDrop2000 测定提取后的质粒 DNA 浓度, 将质粒初始浓度代入 1.3.6 中的公式(1)中进行计算, 计算其初始拷贝数浓度为  $6.5 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L, 如图 3 所示, 在拷贝数小于  $6.5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L, 扩增曲线已经

不明显且 Ct 值  $>35$ , 判断此时扩增是无效的, 所以该方法的灵敏度可到 650 copies/ $\mu$ L。



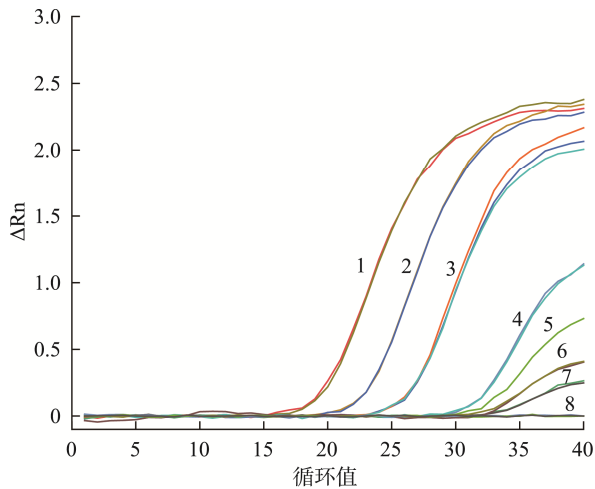
注: 1、2、3、4、5、6、7、8 分别为  $6.5 \times 10^8$ 、 $6.5 \times 10^7$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^5$ 、 $6.5 \times 10^4$ 、 $6.5 \times 10^3$ 、 $6.5 \times 10^2$ 、 $6.5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 及空白对照。

图 3 鼠李糖乳杆菌 HN001 qPCR 检测方法灵敏度检验结果

Fig.3 Sensitivity test results of *L. rhamnosus* HN001 qPCR assay method

2.5 鼠李糖乳杆菌 HN001 纯菌菌液检出限的测定

为了测定纯菌菌液的检出限, 使用生理盐水制备了  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  CFU/mL 梯度浓度的鼠李糖乳杆菌 HN001 菌悬液, 每个不同梯度的菌悬液均进行 DNA 的提取并使用 FD 引物进行 qPCR 扩增, 结果如图 4 所示, 当浓度达到  $10^1$  CFU/mL 时, 此时已经没有明显的扩增曲线且 Ct 值  $>35$ , 其原因是菌液浓度为  $10^1$  CFU/mL 时, 提取得到的 DNA 浓度极低, qPCR 无法检测到扩增信号, 所以纯菌菌液的检出限为  $10^2$  CFU/mL。



注: 1、2、3、4、5、6、7、8 分别为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  copies/ $\mu$ L 及空白对照。

图 4 纯菌菌液检出限的测定

Fig.4 Determination of limit of detection of pure bacteria liquid

2.6 模拟鼠李糖乳杆菌样品的平板计数及 qPCR 检测

对模拟添加鼠李糖乳杆菌 HN001 的乳粉样品进行 qPCR 检测, 并使用构建的标准曲线( $Y=-3.2829X+36.44$ ,  $R^2=0.9978$ )计算样品的拷贝数, 结果如表 2 所示。qPCR 与平板计数法结果的对数值进行显著性分析检验, 结果显示二者结果在不同的样品中均无显著性差异( $P>0.05$ ), 说明该方法检测结果可靠, 可应用于实际样品检测。

2.7 实际样品检测

为了确定所建立方法在实际样品中的实用性, 对 5 种

不同品牌含有鼠李糖乳杆菌 HN001 的益生菌菌粉产品和乳粉产品进行 qPCR 定量检测和平板计数检测。测得的结果显示, 5 个实际样品的活菌数均 $\geq 10^6$  CFU/g。结果如表 3 所示, 样品定量检测结果均 $>10^6$  CFU/g, 且 qPCR 定量值与平板计数定量值差较小。使用 SPSS Statistics 26 软件对 qPCR 和平板计数的定量结果进行显著性分析检验, 两者之间的  $P>0.05$ , 表明两种结果没有明显差异, 结果一致性较好。由此可知本研究所建立的对益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 的 qPCR 定量检测方法可应用于实际样品中的鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌株水平定量检测。

表 2 模拟样品检测的 qPCR 检测结果与平板计数检测结果( $n=3$ )  
Table 2 qPCR test results and plate counting test results for simulated sample detection ( $n=3$ )

| 样品序号及标识 | qPCR 测定结果/(CFU/mL)       | 定量值/lg(CFU/mL) | 平板计数测定结果/(CFU/mL)        | 定量值/lg(CFU/mL) |
|---------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| 模拟样品 1  | $1.7\times 10^7\pm 0.12$ | 7.20           | $1.3\times 10^7\pm 0.10$ | 7.11           |
| 模拟样品 2  | $2.3\times 10^7\pm 0.15$ | 7.30           | $1.2\times 10^7\pm 0.09$ | 7.02           |
| 模拟样品 3  | $8.4\times 10^6\pm 0.73$ | 6.92           | $9.5\times 10^6\pm 0.45$ | 6.97           |
| 模拟样品 4  | $1.6\times 10^7\pm 0.16$ | 7.20           | $7.9\times 10^6\pm 0.38$ | 6.89           |
| 模拟样品 5  | $2.1\times 10^7\pm 0.20$ | 7.32           | $1.7\times 10^6\pm 0.19$ | 6.23           |

表 3 实际样品检测的 qPCR 检测结果与平板计数检测结果( $n=3$ )  
Table 3 qPCR test results and plate counting test results for actual sample detection ( $n=3$ )

| 样品序号及标识                                    | qPCR 测定结果/(CFU/g)         | 定量值/lg(CFU/g) | 平板计数测定结果/(CFU/g)         | 定量值/lg(CFU/g) |
|--------------------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| 市售样品 1 鼠李糖乳杆菌 HN001, 添加量 $\geq 10^6$ CFU/g | $2.04\times 10^7\pm 0.07$ | 7.31          | $1.7\times 10^7\pm 0.12$ | 7.25          |
| 市售样品 2 鼠李糖乳杆菌 HN001, 添加量 $\geq 10^6$ CFU/g | $1.62\times 10^6\pm 0.09$ | 6.21          | $2.4\times 10^6\pm 0.38$ | 6.38          |
| 市售样品 3 鼠李糖乳杆菌 HN001, 添加量 $\geq 10^8$ CFU/g | $4.33\times 10^8\pm 0.19$ | 8.63          | $3.1\times 10^8\pm 0.16$ | 8.49          |
| 市售样品 4 鼠李糖乳杆菌 HN001, 添加量 $\geq 10^6$ CFU/g | $7.16\times 10^7\pm 0.35$ | 7.85          | $3.8\times 10^7\pm 0.27$ | 7.57          |
| 市售样品 5 鼠李糖乳杆菌 HN001, 添加量 $\geq 10^7$ CFU/g | $1.82\times 10^7\pm 0.11$ | 7.26          | $6.3\times 10^6\pm 0.26$ | 6.84          |

3 讨论与结论

益生菌的功能是具有菌株特异性的, 例如鼠李糖乳杆菌 HN001 具有减少金黄色葡萄球菌污染的功能而别的菌株就不具有该功能<sup>[26]</sup>。为了能更好地评价益生菌菌株的功效, 益生菌的菌株水平的鉴定与检测是解决问题的关键。BRANDT 等<sup>[27]</sup>利用基于噬菌体 Lc-Nu 区的 PCR 引物成功鉴定了 *L. rhamnosus* GG。ZHANG 等<sup>[28]</sup>通过对鼠李糖乳杆菌 LV108 和鼠李糖乳杆菌 hsryfm 1301 的基因组进行分析, 鉴定出特定的片段, 然后利用不同引物的 PCR 方法在菌株水平上鉴定目标菌株。这些菌株水平的鉴定方法都是通过设计特异性引物然后使用常规 PCR 来进行菌株的鉴定, 常规 PCR 检测需要对扩增产物进行凝胶电泳等后处理且无法定量。相较于常规 PCR, 荧光定量 PCR 不需要对扩增产物进行后处理的步骤, 检测效率更高, 只要设计出能够满足检测需求的菌株特异性引物及探针就能同时实现菌株水平的鉴定与定量<sup>[29-31]</sup>。

本研究通过基因组的比对, 筛选出了鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌株特异性基因, 利用菌株特异性基因设计的菌株特异性引物及探针建立了鼠李糖乳杆菌 HN001 的菌株水平鉴定和定量的实时荧光定量 PCR 方法, 并对市售添加鼠李糖乳杆菌 HN001 的益生菌产品进行检测。特异性测试中 RP 和 FD 引物均可满足鼠李糖乳杆菌的特异性检测, 而在后续的扩增效率实验中发现 RP 引物的扩增效率较低难以进行定量, 但是其特异性可以满足单一鉴定的需求。而 FD 引物扩增效率和特异性都能满足用于定量的需求, 所以后续使用 FD 引物进行了方法灵敏度、检出限、模拟样品检测以及实际样品的检测, 由此建立了益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 的 qPCR 快速定量检测方法。

本研究将 qPCR 检测方法应用于益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 的检测, 所建立的 qPCR 检测方法对鼠李糖乳杆菌 HN001 纯菌菌液的检出限为  $10^2$  CFU/mL, 灵敏度可达到 650 copies/ $\mu$ L, 对市售添加鼠李糖乳杆菌 HN001 的益生菌产品进行检测, 结果表明 qPCR 检测方法和平板计



数检测方法定量结果无显著性差异,定量结果较准确可应用于实际样品的检测。目前对益生菌现行有效的计数方法为平板计数法,流程较长,一般为2~3 d左右,并且难以实现菌株水平的定量,本研究建立的鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平 qPCR 检测方法,灵敏度高,特异性强,检测时间能控制 2 h 左右,适用于益生菌产品中鼠李糖乳杆菌 HN001 的快速检测。本研究建立的鼠李糖乳杆菌 HN001 菌株水平检测方法为益生菌产品中菌株的特异性鉴定和定量提供了可行的方案,为益生菌产品的质量管理和品质管理提供了依据。

## 参考文献

- [1] 包秋华,陈永福,张家超,等.一种快速定性和定量检测发酵乳中 *L. fermentum* 的方法[J].中国乳品工业,2011,39(2):59-61.
- BAO QH, CHEN YF, ZHANG JC, *et al.* A rapid qualitative and quantitative detection method of *L. fermentum* in the fermented milk [J]. China Dairy Ind, 2011, 39(2): 59-61.
- [2] 中国食品科学技术学会益生菌分会.益生菌“量效关系”的科学综述[J].中国食品学报,2022,22(7):443-454.
- Chinese institute of food science and technology probiotics branch. A scientific review of the ‘dose-response relationship’ of probiotics [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2022, 22(7): 443-454.
- [3] 秦楠.益生菌及其在食品中应用进展[J].中国酿造,2006,(7):1-3.
- QIN N. Probiotics and its application advancement in foods [J]. China Brew, 2006, (7): 1-3.
- [4] SIMONE C. The unregulated probiotic market [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019, 17(5): 809-817.
- [5] 聂颖兰,焦羽,吴晓霞.鼠李糖乳杆菌 R9639 对小鼠免疫功能的影响及机制研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(24):9461-9466.
- NIE YL, JIAO Y, WU XX. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* R9639 on the immune function of mice and its mechanism [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(24): 9461-9466.
- [6] KEERSMAECKER SCJ, VERHOEVEN T, DESAIR J, *et al.* Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid [J]. Fems Microbiol Lett, 2006, 259(1): 89-96.
- [7] AGAMENNONE V, KRUL C, RIJKERS G, *et al.* A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in the Netherlands [J]. Bmc Gastroenterol, 2018, 18(103): 1249-1257.
- [8] HALTTUNEN T, COLLADO MC, ELNEZAMI H, *et al.* Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution [J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(2): 160-165.
- [9] RODRIGUEZ SA, CASTILLEJOS L, COLOM P, *et al.* Effects of the administration of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and their synbiotic combination with galacto-oligosaccharides against enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 in an early weaned piglet model [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 642549.
- [10] 郭卓雨,刘保军.我国已批准婴幼儿配方乳粉可选择性成分调查分析[J].中国乳品工业,2020,48(10):29-35.
- GUO ZY, LIU BJ. Survey and analysis of optional ingredients in China's approved infant formula milk powder [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(10): 29-35.
- [11] IBRAHIM F, RUVIO S, GRANLUND L, *et al.* Probiotics and immunosenescence: Cheese as a carrier [J]. Fems Immunol Med Mic, 2010, 59(1): 53-59.
- [12] 马赛荣,王新明,崔艳,等.益生菌产业的发展和趋势[J].生物产业技术,2019,(3):99-104.
- MA SR, WANG XM, CUI Y, *et al.* Development and trends of the probiotic industry [J]. Biotechnol Bus, 2019, (3): 99-104.
- [13] DEKKER JW, WICKENS K, BLACK PN, *et al.* Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0-2 years [J]. Int Dairy J, 2009, 19(3): 149-154.
- [14] THANG CL, BAURHOO B, BOYE JI, *et al.* Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011, (20): 7.
- [15] 邓颖妍,林小洁,张晓洁,等.婴幼儿食品中的益生菌应用[J].现代食品,2021,(21):8-10.
- DENG YY, LIN XJ, ZHANG XJ, *et al.* The application of probiotics in foods for infants and young children [J]. Mod Food, 2021, (21): 8-10.
- [16] HERBEL SR, VAHJEN W, WIELER LH, *et al.* Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus* [J]. Gut Pathog, 2013, (27): 5.
- [17] ZHAO L, DONG Z, YANG L, *et al.* Quantitative PCR assays for the strain-specific identification and enumeration of probiotic strain *Lactocaseibacillus rhamnosus* X253 [J]. Foods, 2022, 11(15): 22-28.
- [18] SHEHATA HR, STEVEN G. A validated real-time PCR method for the specific identification of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. JAOAC Int, 2020, 103(6): 1604-1609.
- [19] 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 fluorescence quantitative PCR detection of *Lactobacillus acidophilus* in lactic acid bacteria drinks [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 27-32.
- [20] LAHTINEN SJ, FORSSTEN S, AAKKO J, *et al.* Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM(R) modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly [J]. Age, 2012, 34(1): 133-143.
- [21] XIAO Y, WANG C, ZHAO JX, *et al.* Quantitative detection of *Bifidobacterium longum* strains in feces using strain-specific primers [J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1159.

- [22] 李恩静, 王丹, 薛晨玉, 等. 基于微滴数字 PCR 技术的婴幼儿配方乳粉中双歧杆菌定量检测及应用[J]. 食品科学, 2022, 43(20): 165–171.
- LI ENJ, WANG D, XUE CY, *et al.* Establish a quantitative method for detecting *Bifidobacterium* in infant formula milk powder by using droplet digital PCR technology [J]. Food Sci, 2022, 43(20): 165–171.
- [23] 王娉, 胡玥, 杨海荣, 等. 多重实时荧光定量聚合酶链反应检测携带耐药基因及肠毒素 A 基因的金黄色葡萄球菌[J]. 疾病监测, 2011, 26(12): 999–1003.
- WANG P, HU Y, YANG HR, *et al.* Multiplex fluorescent real-time PCR for detection of methicillin-resistance gene and enterotoxin gene A in *Staphylococcus aureus* [J]. Dis Surveill, 2011, 26(12): 999–1003.
- [24] 覃璐琪, 梁晓琳, 潘海博, 等. 采用实时荧光定量 PCR 法同时定性定量检测发酵乳中多种益生菌[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 238–244.
- TAN LQ, LIANG XL, PAN HB, *et al.* Simultaneously qualitative and quantitative detections of probiotics in fermented milk using qPCR [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(15): 238–244.
- [25] 周立光, 杨明喆, 冯会粉, 等. 复合益生菌产品菌种鉴定及活菌定量检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(9): 235–244.
- ZHOU LG, YANG MZ, FENG HF, *et al.* Identification of strains and quantitative detection of live bacteria in complex probiotic products [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(9): 235–244.
- [26] EGGERS S, BARKER AK, VALENTINE S, *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on carriage of *Staphylococcus aureus*: Results of the impact of probiotics for reducing infections in veterans (IMPROVE) study [J]. Bmc Infect Dis 2018, 18(3): 128.
- [27] BRANDT K, ALATOSSAVA T. Specific identification of certain probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains with PCR primers based on phage-related sequences [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 84(2): 189–196.
- [28] ZHANG C, YU X, WANG D, *et al.* Rapid strain-specific identification of two *Lactobacillus rhamnosus* strains using PCR based on gene family analysis [J]. LWT-Food Sci Technol, 2021, 146: 111395.
- [29] NAVARRO E, SERRANO-HERAS G, CASTANO MJ, *et al.* Real-time PCR detection chemistry [J]. Clin Chim Acta, 2015, 43(9): 231–250.
- [30] CHUNG KS, CHOI JW, SHIN JS, *et al.* Strain-specific identification and *in vivo* immunomodulatory activity of heat-killed *Lactobacillus sakei* K040706 [J]. Foods, 2021, 10(12): 30–34.
- [31] 吕秀莉, 李柏良, 霍贵成, 等. 益生菌快速检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 198–204.
- LV XL, LI BL, HUO GC, *et al.* Research progress of probiotics rapid detection technology [J]. Food Mach, 2021, 37(11): 198–204.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

## 作者简介



彭新凯, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物检测。  
E-mail: 1693215541@qq.com



武 运, 硕士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、食品营养与安全。  
E-mail: wuyunster@sina.com



陈 颖, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全表征识别及溯源研究。  
E-mail: chenyingcai@163.com