

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240603003

深加工益生菌产品中常用 7 种乳杆菌的快速鉴定

俞漪*, 庄孝飞, 曲勤凤

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 探讨适用于复杂基质中益生菌产品的 DNA 提取方法, 并通过鉴定 7 种常见的乳杆菌, 比较产品标签标示与实际添加乳杆菌种类的一致性。**方法** 本研究采用了 3 种不同的 DNA 提取方法, 分别为十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法、磁珠法深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒(磁珠法)和 Ezup 柱式深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒(柱式法); 通过测定 DNA 浓度、纯度以及利用 *16SrDNA* V3/V4 基因扩增技术评估 DNA 质量。此外合成嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、罗伊氏粘液乳杆菌、植物乳植杆菌、干酪乳酪杆菌、鼠李糖乳酪杆菌和副干酪乳酪杆菌特异性引物探针, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)技术验证方法的特异性、灵敏度和重复性, 进一步对市售益生菌产品进行乳杆菌种类的鉴定。**结果** 综合 3 个 DNA 质量评价方法, 使用 CTAB 法提取的 DNA 质量较高, 纯度在 1.7~2.1 之间, 质量浓度大于 25 ng/mL, 且 *16SrDNA* V3/V4 基因扩增的循环数阈值(cycle threshold, Ct)值均小于 35, 符合后续 qPCR 扩增要求; 相比之下, 柱式法除了饼干类产品 DNA 纯度为 1.96 ± 0.13 , 浓度为 79.07 ± 2.15 , 扩增 Ct 值为 22.67 ± 3.09 能够达到要求外, 提取的其他产品 DNA 和磁珠法提取的 DNA 无法同时满足 3 个 DNA 评价方法要求且重复性较差。本研究所使用的引物和探针对目标乳杆菌有明显的特异性扩增, 灵敏度范围为 0.0100~1.0000 ng/ μ L 和 10^3 ~ 10^4 CFU/mL, 且重复性良好[相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $\leq 3.02\%$]。检测的 20 批市售产品中, 6 批产品未检出标示的乳杆菌种类, 存在标示与实际检出菌种不符的情况。**结论** CTAB 法因其较高的适应性和低成本, 在提取复杂基质中益生菌产品的 DNA 时表现更优, 结合 qPCR 方法能有效实现产品中乳杆菌种水平鉴定; 然而针对干酪乳酪杆菌的检出限需要进一步研究开发更为灵敏的引物和探针。

关键词: 提取方法; 特异性基因扩增; 深加工益生菌产品

Rapid identification of 7 kinds of *Lactobacillus* commonly used in deep processing probiotic products

YU Yi*, ZHUANG Xiao-Fei, QU Qin-Feng

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To explore the DNA extraction method suitable for probiotic products in complex substrates, and to compare the consistency between the product label and the actual *Lactobacillus* species by

基金项目: 上海市市场监督管理局项目(2024-37)

Fund: Supported by the Shanghai Market Supervision Administration Project (2024-37)

*通信作者: 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, No.381, Cangwu Road, Shanghai 200233, China. E-mail: yuyi@sqi.org.cn

identifying the common *Lactobacillus*. **Methods** In this paper, 3 kinds of different methods of DNA extraction were used, namely cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method, magnetic bead method for genomic DNA extraction kit of deep processing products (magnetic bead method) and Ezup column method for genomic DNA extraction kit of deep processing products (column method). The quality of DNA was evaluated by measuring the concentration and purity of DNA and using *16SrDNA V3/V4* gene amplification technology. In addition, specific primer probes were synthesized for *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*. The specificity, sensitivity and repeatability of the method were verified by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), and the species of *Lactobacillus* were further identified in the commercial probiotic products. **Results** The purity of DNA extracted by CTAB was 1.7–2.1, the concentration was more than 25 ng/mL, and the cycle threshold (Ct) value of *16SrDNA V3/V4* gene amplification was less than 35, the PCR products meet the requirement of qPCR; in contrast, the column method could meet the requirements except that the purity of biscuit DNA was 1.96 ± 0.13 , the concentration was 79.07 ± 2.15 , and the amplified Ct value was 22.67 ± 3.09 , DNA extracted from other products and DNA extracted by magnetic beads could not meet the requirements of 3 DNA evaluation methods and had poor repeatability. The primers and probes used in this paper had obvious specific amplification for target *Lactobacillus*, with sensitivity ranges of 0.0100–1.0000 ng/ μ L and 10^3 – 10^4 CFU/mL, and good repeatability [relative standard deviation (RSD) $\leq 3.02\%$]. Among the 20 batches of commercial products tested, 6 batches of products did not detect the labeled *Lactobacillus* species, which was inconsistent with the actual detected strains. **Conclusion** Because of its high adaptability and low cost, CTAB method performs better in extracting DNA from probiotic products in complex substrates, and combined with qPCR method, it can effectively identify the species level of *Lactobacillus* in products. However, more sensitive primers and probes need to be developed for the limit of detection of *Lactobacillus casei*.

KEY WORDS: extraction method; specific gene amplification; deep processing probiotic products

0 引言

乳杆菌属包含了 261 个种,并在表型、生态和基因型水平上表现出极高的多样性,远超其他益生菌属。2020 年有 15 位科学家通过分析乳杆菌全基因组数据,完成了乳杆菌属的重要分类^[1],将其重新划分为 25 个属,包括 23 个新属,并对乳杆菌属进行重新修订,描述了分类学地位的变化^[2–4]。2022 年根据国际上乳杆菌分类地位的变化,我国卫生健康委员会更新了《可用于产品的菌种名单》,将 17 种乳杆菌重新分类为 6 个不同的属^[5]。市场调研显示,市售益生菌产品中添加的乳杆菌种类和数量远超其他益生菌,但存在着超范围添加、未标示菌种和菌种标示不明等问题^[6–7]。

国内益生菌产品正向横向发展趋势转变,市场不断推出益生菌结合巧克力、固体饮料、糖果等创新产品,已进入“益生菌+”时代。然而,在益生菌产业迅速发展的同时,传统培养法已不能满足新型益生菌产品的检测需求。近年来,国内外研究越来越多地利用分子生物学方法快速鉴定物种^[8]。但是需要依赖于高质量的 DNA,是后续扩增、分析的基础^[9–10]。益生菌产品中的高蛋白、高脂肪和大量使用的麦芽糊精等多糖物质,在 DNA 提取过程中难以去除^[11],是

否能从复杂的基质中提取到高效 DNA 进而会影响分子生物学的下游研究^[12–14]。

本研究以深加工益生菌产品为研究对象,直接提取产品中的总细菌 DNA,通过比较十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法、柱式法和磁珠法的提取效果,旨在寻找最适合的 DNA 提取方法,以提高后续实验的可靠性。同时,结合建立实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法,实现对深加工益生菌产品中 7 种常见乳杆菌的直接鉴定,为比较产品标签标示与实际添加乳杆菌种类的一致性提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品信息、标准菌株和引物探针

从超市、网络等购买益生菌产品,涵盖了 10 个品种:宠物食品、发酵乳、饮品、保健品、凝胶糖果、硬质糖果、固体饮料、果冻、菌粉、饼干;每个品种有 2 个产品,共 20 批次。

8 种乳杆菌标准菌株:嗜酸乳杆菌 CICC 6074、植物

乳植杆菌 CICC 6240、德氏保加利亚乳杆菌亚种 CICC 6097、干酪乳酪杆菌 CICC 6114、副干酪乳酪杆菌 CICC 6138、鼠李糖乳酪杆菌 CICC 6224、罗伊氏粘液乳杆菌 CICC 6226、动物双歧杆菌 ATCC 27673, 购买后均由上海市质量监督检验技术研究院保存。

7 种乳杆菌特异性引物及探针序列^[15-16]和 *16SrDNA* V3/V4 引物序列^[17]均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K(酶活>30 U/mg, 美国 Promaga 公司); 氨基甲烷、无水乙醇、CTAB(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)、SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNase Plus)[宝日生物工程(大连)有限公司]; RS Agar Medium (MRS 培养基)(北京陆桥公司); Tris-Saturated Phenol (Tris 饱和酚)、溶菌酶(>5000 U/mg)、Tris-EDTA 裂解液(TE 溶液)、Ezup 柱式深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒、磁珠法深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.1.3 仪器

SI Vortex Genie2 漩涡振荡器(美国 Scientific Industries 公司); NanoDrop2000 微量紫外分析仪、TOLEDO MS6001S 电子天平(感量 0.1 mg)(德国梅特勒-托利多公司); 5430R 振荡水浴槽(德国艾本德有限公司); 7500Fast 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Mark II 多功能智能厌氧系统(荷兰 MARTANOXMAT 公司); 581R 台式高速大容量离心机(美国 EPPENDORF 公司); SMI12 电热恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准菌株培养

标准菌株从冻干磁珠中复苏, 乳酸菌培养和扩增参考 GB 4789.35—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》。

1.2.2 核酸提取

标准菌株 DNA 提取参考文献[18]; 根据产品性状和成分, 进行前处理: (1)固体、颗粒状机械研磨至粉状后取样; 半固体和液体取足够量; (2)高蛋白产品需煮沸离心去除蛋白质(CTAB 法前处理方法)。分别用 3 种方法进行 DNA 提取, CTAB 法: 在上述经过前处理样本中, 先加入 200 μ L 溶菌酶 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 以上, 再进行 DNA 提取^[19]; 磁珠法: 按照磁珠法深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒说明书; 柱式法: 按照 Ezup 柱式深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒说明书。每种方法设置 3 个平行。

1.2.3 产品 DNA 质量检测方法

(1)紫外分光光度计法

采用 NanoDrop2000 微量紫外分析仪对 CTAB 法、磁珠法和柱式法提取的 DNA 分别测定 OD_{260 nm}、OD_{280 nm} 的

吸光值, OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 是评估 DNA 纯度, OD₂₆₀×稀释倍数×50/1000 计算 DNA 浓度。

(2) *16SrDNA* V3/V4 PCR 扩增

采用 338F 和 806R 基因序列进行 PCR 扩增, 验证产品中 DNA 提取质量; 反应体系: 2×SYBR Premix 7.5 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、DNA 1 μ L、灭菌去离子水补足至 15 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s。

1.2.4 7 种乳杆菌的实时荧光定量 PCR 方法建立

特异性检测: 以目标乳杆菌 DNA 作为阳性对照、动物双歧杆菌为阴性对照、无菌水为空白对照。方法检出限检测: 包括相对灵敏度和绝对灵敏度的检测^[20]; 相对灵敏度是将乳杆菌标准菌株 DNA 稀释定量至 10.0000、1.0000、0.1000、0.0100、0.0010 ng/ μ L, 绝对灵敏度是将乳杆菌标准菌株的培养液按照 10 倍梯度稀释为 10¹~10⁸ CFU/mL 菌悬液(以平板法做加标回收); 将 10¹~10⁸ CFU/mL 的 8 个质量浓度菌悬液提取 DNA, 然后进行 qPCR 扩增; 灵敏度的检测每个质量浓度设置 3 个平行。方法重复性检测: 7 种乳杆菌选择 4 个 DNA 浓度梯度 10.0000、1.0000、0.1000、0.0100、0.0010 ng/ μ L 进行扩增, 每个质量浓度 6 个平行, 计算循环数阈值(cycle threshold, Ct)的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

qPCR 扩增反应体系: 2×Premix 7.5 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)、探针(10 μ mol/L)各 0.8 μ L、6-羧基-X-罗丹明(6-CARBOXY-X-RHODAMINE ROX) 0.3 μ L、DNA 1 μ L、灭菌去离子水补足至 15 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s、60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环, 同时收集淬灭基团荧光(FAM)。

1.3 实际样品检测

市场上随机购买 18 批次产品, 涵盖 7 种乳杆菌产品, 根据每个产品上标示的乳杆菌种类, 采用种水平特异性引物和探针进行扩增, 每个样品 3 个平行, 同时设置空白对照、阳性对照和阴性对照。

1.4 数据处理

采用 7500FastSystem Software v1.3.2 软件进行 qPCR 分析, 并得出扩增曲线和 Ct 值。空白对照: 无荧光对数增长, 相应的 Ct 值小于 40.0; 阴性对照: 无荧光对数增长, 相应的 Ct 值大于 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 值小于 35.0; 以上条件有 1 条不满足, 实验视为无效。

2 结果与分析

2.1 样品总细菌提取 DNA 质量评价

本研究从 3 个方面对 3 种提取方法的产品总细菌

DNA 进行质量评价^[21], 包括: A. $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 纯度比值介于 1.7~2.1 之间; B. 满足后续检测 DNA 浓度要求不小于 25 ng/ μL ; C. *I6SrDNA V3V4* PCR 扩增 Ct 值小于 35.0。

2.1.1 紫外分光光度计法结果

通过测定 DNA 的 $OD_{260\text{ nm}}$ 、 $OD_{280\text{ nm}}$ 值计算 DNA 的纯度和浓度, 详见表 1。3 种方法测定 DNA 纯度, 虽然在统计学上无显著性差异($P>0.05$), 但 CTAB 法提取的 DNA 纯度都介于 1.7~2.1 之间, 满足 qPCR 扩增的要求; 然而采用柱式法提取的宠物食品、保健品、凝胶糖果、硬质糖果、固体饮料、果冻和菌粉, 以及磁珠法提取的宠物食品和硬质糖果中的 DNA 纯度均大于 2.1, 这表明 DNA 样本中存在严重的 RNA 污染。同时, 柱式法提取饮品和发酵乳以及磁珠法提取饮品、发酵乳、保健品、固体饮料和菌粉时得到的 DNA 纯度低于 1.7, 说明这些产品中的蛋白质没有被完全去除^[22], 最终可能与 DNA 一起沉淀。

在相同取样量的 TE 溶液中裂解 DNA 时, 3 种方法测定的浓度结果, 在统计学上有显著性差异($P<0.05$)。CTAB

法提取的 DNA 浓度都超过 40 ng/ μL ; 使用柱式法提取的 DNA 浓度达到 25 ng/ μL 以上, 适用于宠物食品、发酵乳、菌粉、保健品、硬质糖果和饼干的检测; 然而磁珠法提取的所有产品的 DNA 浓度均低于 25 ng/ μL , 这样的低浓度可能会降低 qPCR 的灵敏度^[23]。实验结果也表明 DNA 的纯度与浓度并不总是成正比, 即并非所有纯度高的 DNA 样本都能有效转化为可用的分析数据。

2.1.2 *I6SrDNA V3/V4* PCR 扩增结果

采用 *I6SrDNA V3/V4* 基因对产品中的 DNA 进行扩增, 结果见表 2。使用 CTAB 法提取的 DNA 在所有产品中均成功获得扩增曲线, Ct 值均小于 35, RSD 范围在 2.28%至 7.74%之间, 显示出良好的重复性。使用柱式法提取, 发酵乳、保健品和凝胶糖果的 DNA, 扩增结果不理想, 而其他产品的扩增 Ct 值均符合要求。采用磁珠法的结果显示, 发酵乳、果冻和饼干产品的 DNA 扩增 Ct 值达到了预期标准; 然而从 RSD 的结果来看, 柱式法和磁珠法的重复性较差。

表 1 3 种方法提取 DNA 纯度和浓度
Table 1 Purity and concentration of DNA extracted by 3 kinds of methods

种类	纯度($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$)			浓度($OD_{260\text{ nm}}/(\text{ng}/\mu\text{L})$)		
	CTAB 法	柱式法	磁珠法	CTAB 法	柱式法	磁珠法
宠物食品	1.95±0.19	2.48±0.81	2.96±1.98	159.93±2.02	277.41±0.88	3.52±7.19
发酵乳	1.76±0.42	1.69±0.50	1.68±1.30	85.22±2.44	29.77±2.10	7.03±1.46
饮品	1.84±0.25	1.40±0.57	1.52±0.82	703.38±0.92	9.98±2.44	11.37±0.94
保健品	2.05±0.08	2.29±0.59	1.58±0.96	863.63±0.53	60.57±0.94	11.66±1.31
凝胶糖果	1.94±0.18	2.95±3.09	1.83±2.00	132.77±0.55	21.12±0.71	1.29±1.15
硬质糖果	1.96±0.19	2.25±0.22	2.67±0.93	1018.78±0.72	40.75±0.72	15.25±1.07
固体饮料	1.80±0.22	2.32±0.37	0.95±0.42	852.24±0.82	20.27±1.76	1.09±1.52
果冻	1.97±0.19	4.07±2.32	2.06±0.17	46.51±3.30	7.43±1.42	3.77±1.50
菌粉	1.86±0.26	2.25±0.19	1.44±0.77	214.33±0.59	557.42±0.92	8.64±1.25
饼干	1.85±0.16	1.96±0.13	1.87±0.68	557.29±1.52	79.07±2.15	20.01±1.30
<i>P</i>		0.08			0.0005	

表 2 3 种方法提取 DNA *I6SrDNA V3/V4* PCR Ct 值
Table 2 PCR Ct values of DNA *I6SrDNA V3/V4* extracted by 3 kinds of methods

样品	CTAB 法		柱式法		磁珠法	
	Ct 值	RSD/%	Ct 值	RSD/%	Ct 值	RSD/%
宠物食品	16.52±1.28	7.74	19.02±2.91	15.29	>40	/
发酵乳	20.81±1.56	7.48	>40	/	30.89±6.38	20.65
饮品	17.67±1.28	7.25	30.05±1.17	5.93	>40	/
保健品	15.81±1.06	6.70	>40	/	>40	/
凝胶糖果	15.06±0.54	3.56	>40	/	35.05±5.64	16.10
硬质糖果	15.19±0.76	4.99	20.26±3.74	18.44	>40	/
固体饮料	21.09±0.48	2.28	19.29±3.71	3.71	>40	/
果冻	26.79±1.37	5.12	27.18±8.94	32.88	32.51±4.12	12.68
菌粉	14.83±0.63	4.23	23.76±9.20	38.73	>40	/
饼干	21.89±0.52	2.36	22.67±3.09	13.64	30.15±6.25	20.73

注: /表示 Ct 值都大于 40, 无法得出相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)数值, 表 5 同。

本研究评估了 3 种 DNA 提取方法, 分别考察了 DNA 的纯度、浓度及其在 *16SrDNA V3/V4* 基因的 qPCR 扩增符合率。从综合结果显示, CTAB 法的合格率为 100%, 柱式法为 20%, 而磁珠法为 0%。在柱式法中, 只有在提取饼干产品的 DNA 时, 纯度、浓度和扩增效果均满足要求, 因此它可以作为 CTAB 法的备选方法。然而, 使用磁珠法提取所有产品 DNA 中, 纯度、浓度和扩增效果均未达到预期标准, 表明此方法不适用于复杂基质产品中总细菌 DNA 的提取。在成本方面, 由于柱式法和磁珠法通常使用成套的试剂盒, 不仅价格较高, 而且货期较长。相比之下, CTAB 法使用自配试剂, 价格低廉, 更适合大批量样品的提取。

2.2 7 种乳杆菌种水平检测结果

2.2.1 qPCR 方法的特异性检测结果

如表 3 所示, 7 种乳杆菌的引物和探针对各自目标乳杆菌均有明显特异性扩增, 表 3 中用 Ct 值表述, 结果均在 14~30 之间, 非目标乳杆菌无明显扩增, 结果均大于 35; 证明本研究建立的 qPCR 方法突显出 7 种乳杆菌种水平的

良好特异性。

2.2.2 qPCR 方法的灵敏度检测结果

本研究建立方法可稳定地检测 7 种乳杆菌最低 DNA 浓度, 如表 4 所示。嗜酸乳杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌、鼠李糖乳酪杆菌和副干酪乳酪杆菌的最低检测 DNA 浓度均为 0.0100 ng/ μ L; 德氏乳杆菌保加利亚亚种和植物乳植杆菌的最低检测 DNA 质量浓度为 0.1000 ng/ μ L; 而干酪乳酪杆菌的最低检测 DNA 质量浓度为 1.0000 ng/ μ L, 是其他 6 种乳杆菌的 10 倍以上。

在菌液浓度为 10^1 和 10^2 CFU/mL 时, 所有实验菌均未显示出明显的扩增信号, 检测结果为阴性。当菌液浓度增至 $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL 时, 所有实验菌均显示出明显的扩增信号, 检测结果为阳性。干酪乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种和鼠李糖乳酪杆菌在菌液浓度为 10^4 CFU/mL 时的 3 次实验中 Ct 值均小于 35, 因此其检出限定为 10^4 CFU/mL。同时, 当菌液浓度为 10^3 CFU/mL 时, 植物乳植杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌和嗜酸乳杆菌仍有明显扩增信号, 其检出限为 10^3 CFU/mL。

表 3 方法特异性检测
Table 3 Specificity of detection methods

菌株	引物						
	A	B	C	D	E	F	G
嗜酸乳杆菌	22.28, 18.4, 16.48	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40
鼠李糖乳酪杆菌	39.52, >40, 40	35.32, >40, >40	14.43, 17.05, 18.25	39.24, 35.82, 36.02	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40
德氏乳杆菌保加利亚亚种	>40, 39.33, >40	>40, >40, >40	35.01, >40, >40	>40, 38.86, >40	16.3, 23.1, 23.72	>40, >40, >40	38.97, 38.47, 38.54
罗伊氏粘液乳杆菌	>40, >40, >40	36.47, >40, >40	35.72, 38.63, >40	21.61, 19.45, 23.04	>40, >40, 39.17	>40, >40, >40	>40, >40, >40
干酪乳酪杆菌	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, 39.5, >40	39.24, >40, >40	>40, >40, >40	21.4, 23.42, 28.04	>40, >40, >40
植物乳植杆菌	>40, >40, >40	26.21, 29.21, 27.21	37.79, >40, >40	>40, 38.69, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40
副干酪乳酪杆菌	>40, >40, >40	>40, >40, >40	36.72, 36.33, 36.55	>40, 37.03, 37.85	>40, >40, >40	>40, >40, >40	20.82, 18.5, 19.85
嗜热链球菌	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40
动物双歧杆菌	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40	>40, >40, >40

注: 引物和探针名称: A. 嗜酸乳杆菌; B. 植物乳杆菌; C. 鼠李糖乳酪杆菌; D. 罗伊氏粘液乳杆菌; E. 德氏乳杆菌保加利亚亚种; F. 干酪乳杆菌; G. 副干酪乳酪杆菌。

表 4 方法检测的灵敏度
Table 4 Sensitivity of detection methods

菌株	相对灵敏度(DNA 浓度稀释度)/(ng/ μ L)							绝对灵敏度(菌液浓度稀释度)/(CFU/mL)						
	10.0000	1.0000	0.1000	0.0100	0.0010	0.0001	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
干酪乳酪杆菌	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
副干酪乳酪杆菌	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
鼠李糖乳酪杆菌	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
嗜酸乳杆菌	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3
德氏乳杆菌保加利亚亚种	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
罗伊氏粘液乳杆菌	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3
植物乳植杆菌	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3

2.2.3 qPCR 方法的重复性检测结果

如表 5 所示, 7 种乳杆菌选择 10.0000、1.0000、0.1000、0.0100 ng/μL 4 个 DNA 浓度, 每个浓度 6 个平行进行扩增, 取平均 Ct 值; Ct 值的 RSD 介于 0.80%~3.02%之间, 均在可接受范围内, 证明建立的 qPCR 方法重复性较好。

2.3 实际产品检测结果

在检测的 20 批市售产品中, 有 6 批产品的检测结果与标示不符, 符合率为 70%, 详见表 6。在产品饮品 1 中,

未检出产品中唯一标示菌—干酪乳酪杆菌, 在后续实验中对其他 6 种乳杆菌进行检测, 结果发现副干酪乳酪杆菌呈现出明显的扩增曲线, Ct 值分别为 21.90、20.71 和 22.33, 从而确定产品中实际添加的是副干酪乳酪杆菌。此外, 有 3 批标示含有干酪乳酪杆菌的复合菌种产品中未检测到干酪乳酪杆菌的扩增信号, 鉴于干酪乳酪杆菌的检测灵敏度(相对灵敏度为 1.0000 ng/μL, 绝对灵敏度为 10⁴ CFU/g), 推断这些产品中干酪乳酪杆菌的添加量未达到本研究建立

表 5 方法检测的重复性
Table 5 Repeatability of detection methods

菌株	浓度/(ng/μL)							
	10.0000		1.0000		0.1000		0.0100	
	Ct 值	RSD/%	Ct 值	RSD/%	Ct 值	RSD/%	Ct 值	RSD/%
干酪乳酪杆菌	25.29	1.38	30.75	1.75	>40	/	>40	/
副干酪乳酪杆菌	22.85	2.36	28.29	3.02	30.16	1.59	34.03	1.21
鼠李糖乳酪杆菌	21.55	1.37	25.81	2.23	29.88	1.23	33.44	0.80
嗜酸乳杆菌	21.47	1.87	21.47	1.18	30.16	2.20	34.37	1.44
德氏乳杆菌保加利亚亚种	22.40	0.89	26.46	2.61	32.81	1.30	>40	/
罗伊氏粘液乳杆菌	21.87	2.42	25.97	1.90	29.67	1.59	>40	/
植物乳植杆菌	19.02	3.01	23.08	2.32	25.51	1.89	>40	/

表 6 市售产品中乳杆菌检测结果
Table 6 Detection results of *Lactobacillus* in commercial products

编号	产品中乳杆菌标示种类	检出菌种及 Ct 值	未检出标示菌种
宠物食品 1	植物乳植杆菌、嗜酸乳杆菌	植物乳植杆菌(16.19、14.59、15.41)嗜酸乳杆菌(17.91、18.15、15.70)	无
宠物食品 2	植物乳植杆菌	植物乳植杆菌(28.15、18.29、28.30)	无
发酵乳 1	保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌	保加利亚乳杆菌(34.29、34.16、33.25)、嗜酸乳杆菌(27.10、25.83、26.54)	无
发酵乳 2	保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌、副干酪乳酪杆菌	保加利亚乳杆菌(29.75、32.52、37.61)嗜酸乳杆菌(24.32、24.67、23.38)、副干酪乳酪杆菌(34.89、33.04、32.57)	无
饮品 1	干酪乳酪杆菌	干酪乳酪杆菌(>40、>40、>40)	干酪乳酪杆菌
饮品 2	保加利亚乳杆菌	保加利亚乳杆菌(33.13、31.71、30.11)	无
保健品 1	嗜酸乳杆菌	嗜酸乳杆菌(25.13、22.60、24.64)	无
保健品 2	植物乳植杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、保加利亚乳杆菌	植物乳植杆菌(21.01、22.29、19.96)、嗜酸乳杆菌(17.03、15.48、15.25)、干酪乳酪杆菌(>40、>40、>40)、副干酪乳酪杆菌(24.40、26.87、23.65)、鼠李糖乳酪杆菌(29.35、30.91、27.22)、保加利亚乳杆菌(31.31、31.87、28.54)	干酪乳酪杆菌
凝胶糖果 1	鼠李糖乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(33.22、33.37、30.96)、副干酪乳酪杆菌(37.11、38.64、36.35)	副干酪乳酪杆菌
凝胶糖果 2	嗜酸乳杆菌	嗜酸乳杆菌(33.33、32.40、33.21)	无
硬质糖果 1	植物乳植杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌	植物乳植杆菌(23.83、23.09、22.32)、嗜酸乳杆菌(17.03、15.48、15.85)、鼠李糖乳酪杆菌(29.35、30.91、27.22)、副干酪乳酪杆菌(24.40、26.87、23.65)	无
硬质糖果 2	植物乳植杆菌、嗜酸乳杆菌	植物乳植杆菌(22.14、22.23、22.49)、嗜酸乳杆菌(19.40、21.09、19.82)	无
固体饮料 1	鼠李糖乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(22.91、21.02、21.30)	无
固体饮料 2	植物乳植杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌	植物乳植杆菌(20.89、20.31、21.21)、鼠李糖乳酪杆菌(27.15、27.63、28.11)、副干酪乳酪杆菌(36.10、35.97、38.70)	副干酪乳酪杆菌
果冻 1	鼠李糖乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(34.65、34.89、31.97)、副干酪乳酪杆菌(31.34、31.09、31.11)	无
果冻 2	鼠李糖乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(31.92、32.71、32.55)、副干酪乳酪杆菌(19.01、28.15、29.56)	无
菌粉 1	鼠李糖乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(19.49、17.48、25.85)	无
菌粉 2	副干酪乳酪杆菌	副干酪乳酪杆菌(16.61、16.66、18.80)	无
饼干 1	植物乳植杆菌、干酪乳酪杆菌	植物乳植杆菌(33.00、33.18、34.55)、干酪乳酪杆菌(>40、>40、>40)	干酪乳酪杆菌
饼干 2	鼠李糖乳酪杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌、干酪乳酪杆菌	鼠李糖乳酪杆菌(32.40、33.44、31.15)、罗伊氏粘液乳杆菌(37.72、37.35、36.77)、干酪乳酪杆菌(>40、>40、>40)	罗伊氏粘液乳杆菌、干酪乳酪杆菌

的 qPCR 方法的检出限。另外, 有 2 批产品中副干酪乳酪杆菌和 1 批产品中罗伊氏粘液乳杆菌的扩增信号较低(Ct 值在 35~40 之间), 在产品的 DNA 质量符合要求, 并且同批产品中其他添加的乳杆菌均有检出的情况下, 推断这些产品中未添加副干酪乳酪杆菌和罗伊氏粘液乳杆菌。

3 讨论与结论

由于深加工产品的 DNA 在加工过程中遭到严重破坏, 物理、化学或酶因子均可能影响核酸的质量。肖其胜等^[24]针对酸奶和菌粉中益生菌 DNA 的研究, 以及 SAJALI 等^[25]提出的观点都强调了针对不同产品基质选择合适的提取方法的重要性。本研究从 DNA 纯度、浓度及扩增 Ct 值 3 个方面评估了 CTAB 法、磁珠法和柱式法提取深加工益生菌产品中的 DNA 性能。CTAB 法在提取过程中加入溶菌酶, 能快速分解革兰氏阳性菌的乳杆菌细胞壁上的糖蛋白^[26], 同时通过高温煮沸离心的前处理方法来有效去除蛋白质, 提高了 DNA 的提取效率。磁珠法则利用磁场和磁珠清洗液去除杂质, 从而纯化 DNA^[27-28]; 而柱式法通过硅胶吸附柱吸附释放的核酸, 并使用化学试剂去除杂质, 再从硅胶柱中洗脱 DNA^[29]。从实验结果来看 CTAB 法可以高效地消解蛋白质、盐分和糖分等复杂成分, 能够获得高纯度、高质量的 DNA, 适合多种类型的深加工产品, 具有高通用性和广泛的适用性, 且价格低廉, 非常适合大批量样本的提取。尽管磁珠法和柱式法操作安全快捷, 无需自配提取试剂^[30], 但从检测结果来看柱式法仅适用于饼干类产品, 其应用性有限, 并且提取的 DNA 容易受 RNA 污染, 操作过程中还需反复离心, 不便于高通量处理。磁珠法提取的 DNA 纯度和浓度较低, 难以有效去除产品中的蛋白质, 因此不适合作为深加工产品中总细菌 DNA 的提取方法。

现今生物分子法在产品微生物检测得到广泛的应用^[31-33]。王虹军等^[34]研究了发酵果汁中的嗜酸乳杆菌定量检测; 有研究表明利用 qPCR 方法对发酵乳中干酪乳酪杆菌和罗伊氏粘液乳杆菌进行快速的定性、定量检测, 克服了平板法和流式细胞术的局限^[35]; 这些都证明了 qPCR 法在检测产品中益生菌的良好应用。基于此, 本研究利用乳杆菌种水平特异性引物和探针, 建立了 qPCR 方法用于检测常用的 7 种乳杆菌。建立的方法特异于目标乳杆菌; 可稳定检测到不大于 0.1000 ng/ μ L DNA 量和不大于 10^4 CFU/mL 菌量, 且重复性良好。市售产品乳杆菌检测结果都属于符合法规允许添加的菌种, 但有些产品的标签明示值与结果有差异, 如产品中唯一标示菌株与实际检测到的菌株不符, 或复合标示乳杆菌产品中未检测到 1 种或 2 种标示菌株; 建议有关部门加强对益生菌相关产品标签与菌株相符性的监管。另外本研究建立的方法未检测到所有标示有干酪乳酪杆菌产品中的干酪乳酪杆菌, 从而推断产品中干酪乳酪杆菌添加量低于方法的检出限, 所以在后续的研究中需要进一步探

索来弥补方法的缺陷。

总体而言, CTAB 法更适用于复杂基质中益生菌产品的 DNA 提取, 并且提取成本低, 操作简单。结合 qPCR 技术实现了对 7 种乳杆菌的快速、精确鉴定, 弥补了现行国家标准中生化反应不典型、缺少副干酪乳酪杆菌鉴定方法和复合添加乳杆菌产品无法有效分离鉴定的缺点, 为益生菌产业的应用提供了有力的技术支持, 同时也为实验室建立特异性强、高灵敏度的其他乳杆菌方法和乳杆菌多重 PCR 鉴定技术奠定了基础。

参考文献

- [1] ZHENG J, WITTOUCK S, SALVETTI E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol Press*, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107
- [2] 于学健, 胡海蓉, 曹艳花. 乳杆菌属分类学地位变迁后菌种名称英解汉译检索表(一)[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(15): 318-324. YU XJ, HU HR, CAO YH. A key to the English-Chinese translation of *Lactobacillus* species names after the change of taxonomic status (one) [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(15): 318-324.
- [3] 于学健, 胡海蓉, 曹艳花. 乳杆菌属分类学地位变迁后菌种名称英解汉译检索表(二)[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(16): 296-300. YU XJ, HU HR, CAO YH. A key to the English-Chinese translation of *Lactobacillus* species names after the change of taxonomic status (two) [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(16): 296-300.
- [4] 于学健, 胡海蓉, 曹艳花, 等. 乳杆菌属分类学地位变迁后菌种名称英解汉译检索表(三)[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(17): 296-300. YU XJ, HU HR, CAO YH. A key to the English-Chinese translation of *Lactobacillus* species names after the change of taxonomic status (three) [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(17): 296-300.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于公布可用于产品的菌种名单更新的公告(2022 年第 4 号)[Z]. People's Republic of China (PRC) National Health and Wellness Commission. Announcement on updating the list of strains available for products. (No.4 of 2022) [Z].
- [6] 张文燕, 关迪, 解慧. 天津市市售 26 种益生菌饮品标示菌种情况调查[J]. *职业与健康*, 2021, 37(18): 2480-2486. ZHANG WY, GUAN D, XIE H. Investigation on labeled bacteria of 26 probiotic drinks in Tianjin [J]. *Occup Health*, 2021, 37(18): 2480-2486.
- [7] 郭嘉明, 曹晏文, 戴润芳. 我国标识“乳酸菌”和“益生菌”普通食品调查研究[J/OL]. *食品工业科技*, 1-14. [2024-04-05]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080079> GUO JM, CAO YW, DAI RF. Investigation and study on common food labeled "lactic acid bacteria" and "probiotics" in China [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*, 1-14. [2024-04-05]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080079>
- [8] 刘雪, 宋菁景, 林小晖. 分子生物学技术在产品检验中的应用[J]. *产品安全导刊*, 2022(10): 142-144. LIU X, SONG JJ, LIN XH. Application of molecular biology technology in product inspection [J]. *Prod Saf Guid*, 2022(10): 142-144.
- [9] BARCENILLA C, DÍAZ CFI, FILIPPIS DF. Improved sampling and DNA extraction procedures for microbiome analysis in food-processing environments [J]. *Nat Prot*, 2024, 19(5): 1291-1310.
- [10] TANIS M, MARIAM A, ALEXANDER G. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in food by polymerase chain reaction [J]. *Int J Food Microbiol*, 2023, 4(4): 110317.
- [11] 高洪晓, 杨凯, 刘建斌. 三种植物 DNA 提取法中多糖类物质去除效果的研究[J]. *北京农学院学报*, 2011, 26(1): 70-72.

- GAO HX, YANG K, LIU JB. Study on the removal effect of polysaccharides in three kinds of plant DNA extraction methods [J]. J Beijing Univ Agric, 2011, 26(1): 70–72.
- [12] 王辉, 赵爱君, 张全军. 转基因玉米深加工产品中 DNA 提取方法的研究[J]. 农产品加工, 2022, 545(3): 38–41.
- WANG H, ZHAO AJ, ZHANG QJ. Study on DNA extraction method from transgenic corn deep-processed products [J]. Farm Prod Proc, 2022, 545(3): 38–41.
- [13] XU WJ, ZHU PY, XIN TY. Droplet digital PCR for the identification of plant-derived adulterants in highly processed products [J]. Phytomedicine, 2022(105): 154376.
- [14] NOR AT, MOHD NMD, NUR FKM. Rapid porcine detection in gelatin-based highly processed products using loop mediated isothermal amplification [J]. J Food Sci Technol, 2021, 58(12): 1–10.
- [15] 徐蕾蕊, 汪琦, 魏咏新. 常见乳酸菌 PCR 检测定性标准样品研制[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(S2): 61–71.
- XU LR, WANG Q, WEI YX. Development of qualitative standard samples for PCR detection of common lactic acid bacteria [J]. China Port Sci Technol, 2023, 5(S2): 61–71.
- [16] 俞漪, 顾晨荣, 张娜娜. 定量 PCR 技术检测杀菌型产品中乳酸菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4507–4513.
- YU Y, GU CR, ZHANG NN. Determination of lactic acid bacteria in bactericidal products by quantitative PCR [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4507–4513.
- [17] 王艳丽, 张会敏, 孟雅静. 基于 *16S rDNA V4* 与 *V3-V4* 可变区高通量测序对浓香型白酒窖泥菌群组成的比较分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 147–154.
- WANG YL, ZHANG HM, MENG YJ. Comparative analysis of flora composition in pit mud of Luzhou-flavor liquor based on *16S rDNA V4* and *V3-V4* variable zone high-throughput sequencing [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(6): 147–154.
- [18] 陈涛, 柴海云, 刘彦. 不同病原微生物核酸提取方法的对比[J]. 广东医科大学学报, 2023, 41(6): 619–622, 627.
- CHEN T, CHAI HY, LIU Y. Comparison of nucleic acid extraction methods of different pathogenic microorganisms [J]. J Guangdong Med Univ, 2023, 41(6): 619–622, 627.
- [19] 顾晨荣, 俞漪, 张娜娜. 荧光定量 PCR 方法检测杀菌型乳酸菌产品中的耐药基因[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 5927–5932.
- GU CR, YU Y, ZHANG NN. Detection of drug resistance genes in sterilized lactic acid bacteria products by fluorescence quantitative PCR [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(17): 5927–5932.
- [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]. 产品科学, 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]. Prod Sci, 2019, 40(8): 27–32.
- [21] 文艺, 连雪, 司方媛. 青稞及其加工制品的核酸提取方法研究[J]. 现代农业科技, 2021(7): 233–235, 240.
- WEN Y, LIAN X, SI FY. Study on nucleic acid extraction method of highland barley and its processed products [J]. Mod Agric Sci Technol, 2021(7): 233–235, 240.
- [22] 燕妮, 杨莉, 彭兰兰. 不同类型 DNA 提取试剂盒提取牦牛乳粉 DNA 效果的比较[J]. 甘肃科技纵横, 2023, 52(11): 30–33.
- YAN N, YANG L, PENG LL. Comparison of different types of DNA extraction kits for extracting DNA from yak milk powder [J]. Gansu Sci Technol Vert Horizon, 2023, 52(11): 30–33.
- [23] 邵碧英, 王德峰, 傅碧忠. 酱油、烤鳗酱油 DNA 提取及原料成分的荧光 PCR 检测[J]. 产品科学, 2009, 30(22): 240–243.
- SHAO BY, WANG DF, FU BZ. DNA extraction of soy sauce and roasted eel soy sauce and detection of raw materials by fluorescence PCR [J]. Prod Sci, 2009, 30(22): 240–243.
- [24] 肖其胜, 杨捷琳, 丁卓平. 五种 DNA 提取方法对酸奶及菌粉中益生菌 DNA 提取效果比较[J]. 产品工业科技, 2016, 37(3): 307–311.
- XIAO QS, YANG JL, DING ZP. Comparison of 5 kinds of DNA extracting methods for extracting probiotic DNA from yogurt and bacterial powder [J]. Prod Ind Technol, 2016, 37(3): 307–311.
- [25] SAJALI N, WONG SC, HANAPI UK, *et al.* The challenges of DNA extraction in different assorted food matrices: A review [J]. J Food Sci, 2018, 83(10): 1–5.
- [26] NAVEED M, WANG YD, YIN X. Purification, characterization and bactericidal action of lysozyme, isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: A disintegrating effect of lysozyme on gram-positive and gram-negative bacteria [J]. Molecules, 2023, 28(3): 1058.
- [27] 张云丽, 王鑫, 邵玲. 不同核酸提取方法 SARS-CoV-2 核酸检测性能比较[J]. 检验医学, 2021, 36(5): 530–534.
- ZHANG YL, WANG X, SHAO L. Comparison of nucleic acid detection performance of SARS-CoV-2 by different nucleic acid extraction methods [J]. Lab Med, 2021, 36(5): 530–534.
- [28] YETA H, FILI SD, BASTIEN P, *et al.* Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3881–3886.
- [29] 杜艳, 陈复生, 陈晨. 转基因检测中大豆蛋白 DNA 提取方法筛选及其 lectin 基因降解分析[J]. 产品科学, 2020, 41(4): 102–111.
- DU Y, CHEN FS, CHEN C. Screening of extraction methods of soybean protein DNA and analysis of lectin gene degradation in transgenic detection [J]. Prod Sci, 2020, 41(4): 102–111.
- [30] 周磊, 杜荣胜, 张海玫. 磁珠法和柱提法从天然麝香仁中提取基因组 DNA 的比较[J]. 经济动物学报, 1–5. [2024-04-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1258.S.20231212.1623.002.html>
- ZHOU L, DU RS, ZHANG HM. Comparison of genomic DNA extraction from natural musk kernel by magnetic bead method and column method [J]. J Econ Anim, 1–5. [2024-04-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1258.S.20231212.1623.002.html>
- [31] CL J, CAROLINA G, SARITHA K. Microbiota DNA isolation, *16S rRNA* amplicon sequencing, and bioinformatic analysis for bacterial microbiome profiling of rodent fecal samples [J]. Star Prot, 2022, 3(4): 1–6.
- [32] 王俊丽. 运用分子生物学技术进行产品微生物检测[J]. 产品安全导刊, 2022(6): 187–189.
- WANG JL. Application of molecular biology technology to microbial detection of products [J]. Prod Saf Guid, 2022(6): 187–189.
- [33] 熊红名, 秦秀蓉. 分子生物学方法在产品微生物检测中的应用[J]. 产品安全导刊, 2021(30): 150–151.
- XIONG HM, QIN XR. Application of molecular biological methods in microbial detection of products [J]. Prod Saf Guid, 2021(30): 150–151.
- [34] 王虹军, 陈芝娟, 李晓静. 荧光定量 PCR 法检测发酵果汁中嗜酸乳杆菌[J]. 农产品加工, 2022(6): 59–61, 65.
- WANG HJ, CHEN ZJ, LI XJ. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in fermented fruit juice by fluorescence quantitative PCR [J]. Farm Prod Proc, 2022(6): 59–61, 65.
- [35] 覃璐琪, 梁晓琳, 潘海博. 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]. 产品与发酵工业, 2020, 46(15): 238–244.
- QIN LQ, LIANG XL, PAN HB. Simultaneous qualitative and quantitative detection of probiotics in fermented milk by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Prod Ferment Ind, 2020, 46(15): 238–244.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

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