



实时荧光定量 PCR 检测金山醋酸乳杆菌的方法与应用

孙佳^{1,2}, 陆震鸣^{2,4}, 张晓娟², 柴丽娟², 史劲松³, 许正宏^{1,2,4*}

¹江南大学工业生物技术教育部重点实验室 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

²江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

³江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

⁴国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

摘要: 【目的】建立基于实时荧光定量PCR (RT-qPCR)的金山醋酸乳杆菌特异性检测方法, 并将其应用于食醋和白酒发酵过程样品的快速检测。【方法】筛选金山醋酸乳杆菌基因组中特异性强的基因序列作为模板设计特异性引物, 通过标准菌株、醋醅样品进行PCR验证引物的特异性和准确性, 建立RT-qPCR方法分析金山醋酸乳杆菌在不同地区酒醅、醋醅和食醋样品中的含量。【结果】以金山醋酸乳杆菌的苯丙氨酰-tRNA合成酶 α 亚基(编码*pheS*基因)为参考序列, 设计了一对GC含量55%、 T_m 值59 °C、可扩增199 bp片段的引物。建立的RT-qPCR方法特异性强、灵敏度高且重复性好, 检测浓度范围为2.24–10.24 lg(copies/ μ L), 成功应用于4个地区的酒醅、醋醅和食醋样品检测。对镇江香醋醋酸发酵过程的研究表明, 醋醅中的金山醋酸乳杆菌数量先迅速增加, 随后稳定在 10^8 copies/g干醅。【结论】本研究建立的RT-qPCR方法可对食醋和白酒发酵过程中金山醋酸乳杆菌进行特异性鉴定和快速定量。

关键词: 镇江香醋, 金山醋酸乳杆菌, 特异性引物, RT-qPCR

金山乳杆菌(*Lactobacillus jinshani*)是从传统食醋发酵醋醅中分离获得的乳酸菌新物种^[1], 能够在 20–40 °C (最适 35 °C)、pH 3.0–5.0 (最适 pH 4.0)、0%–5%氯化钠浓度(最适 0%)、有氧/厌氧/微氧条件下生长; 随后, 金山乳杆菌被重新命名为金山醋酸乳杆菌(*Acetilactobacillus*

jinshanensis), 为醋酸乳杆菌属的模式种, 且为目前的唯一一种^[2]。根据已有研究报道, 金山醋酸乳杆菌可在镇江香醋^[3]、白酒发酵过程中大量存在^[4–5], 属于酿造功能微生物, 因此在酿造微生物群落中对金山醋酸乳杆菌进行特异性定量分析将有助于酿造生产过程的监测与优化。

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1603800, 2018YFC1603802); 国家自然科学基金(31530055)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-12-24; 修回日期: 2021-03-19; 网络出版日期: 2021-04-25

目前, 微生物的绝对定量方法包括加入外标绝对定量法^[6]、流式细胞计数法^[7]、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术^[8]等。RT-qPCR 技术是一种基于特异性引物定量特定物种的方法, 具有高分辨率、高精度、高灵敏度^[9]、可检测病毒^[10]和鉴定物种^[11]、耗时短^[12]等优点, 在水样^[13]、牛奶^[14]中已广泛应用。Kim E 等^[15]应用特异性引物实现了对益生菌产品中干酪乳杆菌类群的鉴定; Kim DH 等^[16]采用 RT-qPCR 对发酵食品中醋酸菌进行了高效筛选; Moser 等^[17]开发了一种基于 RT-qPCR 技术的食品中 *Lactobacillus helveticus* 快速鉴定和定量的方法。

本研究筛选了金山醋酸乳杆菌中特异性强的基因序列, 通过 Primer-blast 工具设计了特异性强、灵敏度高的 PCR 引物并建立了 RT-qPCR 方法, 用于对镇江香醋醋酸发酵过程中的金山醋酸乳杆菌的数量变化进行监测。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 本研究所用细菌均从镇江香醋醋醅中筛选得到, 保存于 -80 °C 冰箱。耐酸乳杆菌 (*Lactobacillus acetotolerans*)、瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*)、罗伊氏粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus reuteri*)、桥粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus pontis*)、面包粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus panis*)、发酵粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus fermentum*)、提蒙粘液乳杆菌 (*Limosilactobacillus timonensis*)、布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*) 使用 MRS 培养基 37 °C

条件下培养 1 d; 巴斯德醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*)、中间葡糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter intermedius*)、欧洲驹形杆菌 (*Komagataeibacter europaeus*) 采用 LB 培养基 30 °C 培养 2 d; *Ac. jinshanensis* 采用加 200 g/L 麦芽浸粉的 MRS 培养基, 37 °C 厌氧培养 4 d。

1.1.2 MRS 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, 酵母粉 4, 柠檬酸氢二铵 2, 葡萄糖 20, 吐温 80 1.0 mL, 乙酸钠 5, 磷酸氢二钾 2, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.2。

1.1.3 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10。

1.1.4 醋醅样品: 取样自江苏恒顺醋业股份有限公司, 发酵时间 1–18 d; 四川某食醋生产企业, 发酵时间为第 12 天、第 18 天; 山东某食醋生产企业, 发酵时间为第 17 天、第 35 天。

1.1.5 食醋样品: 部分储罐食醋样品。

1.1.6 酒醅样品: 取样自江苏某白酒生产企业, 发酵时间为第 10 天、第 70 天; 四川某浓香型白酒生产企业, 发酵时间为第 1 天。

1.2 主要试剂及仪器

氯化钠、葡萄糖、牛肉膏、柠檬酸氢二铵、吐温 80、乙酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰 (国药集团); 酵母粉、蛋白胨、麦芽浸粉 (Oxoid 公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (上海捷瑞生物有限公司); AceQ Universal SYBR Green qPCR Master Mix、Green Taq Mix (Thermo Fisher 公司); 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); PCR 仪 (Eppendorf 公司); 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司); DNA Marker、Premix Ex Taq 酶 (TaKaRa 公司); DG250 厌氧培养箱 (Don Whiteley Scientific); 核酸电泳装置 (Bio-Rad 公司)。

1.3 基因组 DNA 的提取

细菌基因组 DNA 提取: 取 1 mL 处于稳定期的细菌培养液于 1.5 mL 离心管中, 8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 采用试剂盒提取基因组 DNA; 醋醅、酒醅、食醋样品基因组 DNA 提取采用 CTAB 法, 提取的 DNA 样品适当稀释后采用 Nano Drop 2000 确定 DNA 浓度, 以 A_{260}/A_{280} 评价 DNA 纯度。

1.4 醋醅、酒醅样品微生物高通量测序

由武汉华大医学检验所有限公司采用细菌 16S rRNA V3-V4 区通用引物 341F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') 对醋醅、酒醅样品进行高通量测序, 序列按照 97% 的相似性进行 OTU 聚类, 测序结果与 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 数据库比对相似度达到 99% 为同一物种。

1.5 特异性引物的设计

查阅文献获得可应用于乳酸菌分型的基因序列, 通过比较各序列在 NCBI 上与乳杆菌的相似度, 选择相似度低于 80% 的基因序列作为模板序列设计特异性引物。利用 NCBI Primer-BLAST 工具设定引物参数, PCR 产物长度 80-300 bp; 设定引物对特异性验证参数 (Primer Pair Specificity Checking Parameters): 数据库 (Database) 为 nr; 其余参数按照默认设定。通过 primer 5.0 软件和 DNAMAN 软件分析, 从所获得的引物对中挑选不能够自身成环、无引物二聚体的序列。

1.6 引物的特异性评价

以金山醋酸乳杆菌基因组作为阳性对

照, 醋醅中常见的 12 种细菌 (*A. pasteurianus*; *G. intermedius*; *K. europaeus*; *L. acetotolerans*; *L. helveticus*; *Le. brevis*; *Li. reuteri*; *Li. pontis*; *Li. panis*; *Li. fermentum*; *Li. timonensis*; *L. buchneri*) 基因组作为阴性对照, 不加样品作为空白对照进行 PCR。反应体系: 上下游引物各 1 μ L, Tap-酶 12.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环, 通过琼脂糖凝胶电泳判断引物的特异性。经 Nano Drop 2000 测定 DNA 浓度后将其统一稀释为 50 ng/ μ L 用作 PCR 的模板。

1.7 引物的有效性评价

选择醋酸发酵过程醋醅基因组作为模板进行扩增, 根据琼脂糖凝胶电泳条带亮度初步判断醋酸发酵过程醋醅中金山醋酸乳杆菌的含量变化; 将 PCR 扩增产物送至天霖(上海)股份有限公司测序, 测序结果与 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 数据库比对, 判断引物的有效性。

1.8 荧光定量 PCR 方法的建立

使用含有目的片段的单拷贝克隆质粒作为标准品, 测定标准品浓度, 并对其进行 10 倍稀释, 设置 10 个梯度, 以不同浓度标准品作为模板进行 RT-qPCR。反应体系: 引物 AJ 上下游各 1 μ L, SYBR Green Master Mix 12.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 4.5 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 35 个循环; 以每个反应管内荧光值达到阈值时的循环数 C_q 值作为横轴, 标准品浓度的对数作为纵轴, 绘制定量标准曲线, 扩增完成后绘制溶解曲线。

1.9 加标回收率的测定

在空白样品(ddH₂O)加入不同数量的金山醋酸乳杆菌(3.75×10³ copies/g 干醅、3.75×10⁵ copies/g 干醅、3.75×10⁷ copies/g 干醅、3.75×10⁹ copies/g 干醅)计算金山醋酸乳杆菌的空白加标回收率。在醋醅中加入不同含量的金山醋酸乳杆菌(3.75×10⁵ copies/g 干醅、3.75×10⁶ copies/g 干醅、3.75×10⁷ copies/g 干醅、3.75×10⁸ copies/g 干醅)计算金山醋酸乳杆菌的样品加标回收率。

1.10 醋醅、酒醅发酵过程细菌含量变化

采用引物 CCTACGGGAGGCAGCAG , ATTACCGCGGCTGCTGG 对醋醅样品 DNA 进行 RT-qPCR 反应, 反应条件: 94 °C 30 s; 95 °C 5 s, 58 °C 10 s, 72 °C 5 s, 35 个循环, 反应体系与标准曲线绘制方法同 1.8。

1.11 金山醋酸乳杆菌含量计算

以醋醅、酒醅、食醋样品总 DNA 为模板, 进行 RT-qPCR 反应, 对不同发酵时间醋醅、酒醅中金山醋酸乳杆菌的含量进行测定, 阴性对照为无菌水, 根据标准曲线计算金山醋酸乳杆菌在白酒酿造过程、食醋酿造过程、食醋中的含量。

1.12 数据分析

使用 Microsoft Excel 2010 对数据进行处理;

使用 Graphpad Prism 8 软件进行分析绘图。

2 结果和分析

2.1 金山醋酸乳杆菌引物特异性设计

根据已有文献报到, 常用于乳杆菌分型的基因主要有 16S rRNA^[18]、*dnaK*^[19-20]、*mutL*^[21]、*pheS*^[17,20]、*tuf*^[22]、*infB*^[23]、*rpsB*^[23]和 *rpoA*^[20,24]。通过 GenBank 比对分析, 选取与其他乳酸菌相似度最低的 4 种基因(*infB*、*mutL*、*tuf* 和 *pheS*)序列作为模板序列用于设计引物基因序列(表 1)。

2.2 引物扩增的特异性评价

采用 TB tools^[25]软件, 将所设计引物与 GenBank 数据库中乳杆菌属模式菌株全基因组序列进行模拟 PCR, 评价引物的特异性。结果表明, 针对 *pheS* 基因序列所设计的特异性引物 AJ 获得金山醋酸乳杆菌单一 PCR 产物, 而其他引物均能扩增两种及以上的菌株。此外, 采用引物 AJ 对金山醋酸乳杆菌模式菌株进行 PCR 扩增, 而其他引物均出现非特异性扩增。引物 AJ 的序列(AJ_R: 5'-ACCATGGCCGACTTAAAGG-3', AJ_F: 5'-CACCGGCACCTAACATTTTCG-3'), 扩增片段长度 199 bp, GC 含量 55%, *T_m* 值 59 °C, 不存在互补序列。

表 1. 金山醋酸乳杆菌基因序列比对结果

Table 1. Conserved sequence alignment of *Ac. jinshanensis*

Gene ID	Species name	Similarity/%	GenBank accession number
<i>infB</i>	<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	73.67	CP045562.1
<i>mutL</i>	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	73.88	CP012920.1
<i>tuf</i>	<i>Schleiferilactobacillus harbinensis</i>	74.06	CP045143.1
<i>pheS</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	74.71	CP046310.1
<i>dnaK</i>	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	78.45	CP012920.1
<i>aspS</i>	<i>Loigolactobacillus bif fermentans</i>	79.92	CP045872.1
<i>rpoA</i>	<i>Companilactobacillus farciminis</i>	80.58	CP012177.1
16S rRNA	<i>Li. reuteri</i>	89.79	MN081709.1

利用引物 AJ 对 12 种不同的乳杆菌和醋杆菌分别进行 PCR, 电泳结果显示在泳道 14 上条带单一且长度在 200 bp 左右, 除金山醋酸乳杆菌外的菌株(泳道 1–13)均无目的条带(图 1), 表明引物 AJ 的特异性较好。经测序, PCR 产物的序列长度 199 bp, 与 GenBank 中登录序列(CP034726.1) 同源率为 100%。

2.3 引物扩增的有效性评价

使用引物 AJ 对醋酸发酵过程醋醅基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 2。1–18 d 醋醅样品均有条带显示, 说明该引物可用于醋酸发酵过程醋醅中金山醋酸乳杆菌的监测。

2.4 引物扩增的准确性评价

2.4.1 标准曲线以及熔解曲线的绘制: 含有目的片段的单拷贝克隆标准品浓度为 1.15×10^{10} copies/ μL , 其梯度稀释后的稀释曲线均为平稳光滑的 S 型,

熔解曲线呈现单一熔解峰, 无引物二聚体及非特异性产物。获得的标准曲线斜率为 -0.2994 , 截距为 12.5770 , 线性 R^2 为 0.9996 (图 3), 引物的扩增效率为 99.31%, 对金山醋酸乳杆菌的线性检测范围为 2.24 – 10.24 lg(copies/ μL)。

2.4.2 金山醋酸乳杆菌加标回收率的测定: 模板的加标回收率如表 2 所示, 空白加标回收率以及样品加标回收率为 95%–105%。

2.5 引物的通用性评价

将本研究的 RT-qPCR 方法用于不同地区食醋和白酒酿造企业生产过程样品的检测。其中, 检测出含有金山醋酸乳杆菌的醋醅、食醋、酒醅样品的结果如图 4 所示。金山醋酸乳杆菌可以在四川、山东等 2 个地区的食醋醋醅和江苏某浓香型白酒酒醅中检出, 在白酒酿造第 10 天, 其相对丰度高达 91.25% (图 4-A)。应用本研究设计的特异性引物 AJ 对醋醅、酒醅、食醋样品中的金

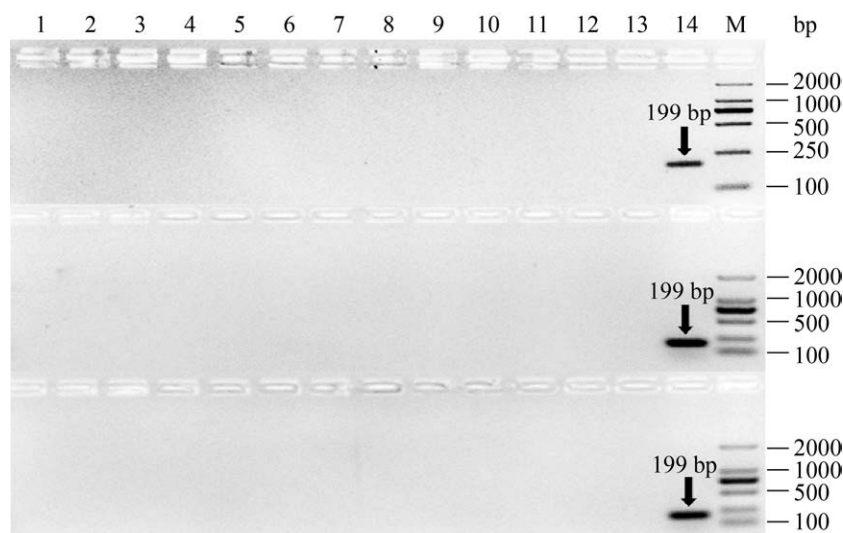


图 1. 引物特异性评价

Figure 1. Primer specificity evaluation. 1: *A. pasteurianus*; 2: *G. intermedius*; 3: *K. europaeus*; 4: *L. acetotolerans*; 5: *L. helveticus*; 6: *Le. brevis*; 7: *Li. reuteri*; 8: *Li. pontis*; 9: *Li. panis*; 10: *Li. fermentum*; 11: *Li. timonensis*; 12: *L. buchneri*; 13: ddH₂O; 14: *Ac. jinshanensis*; M: 2000 bp marker.

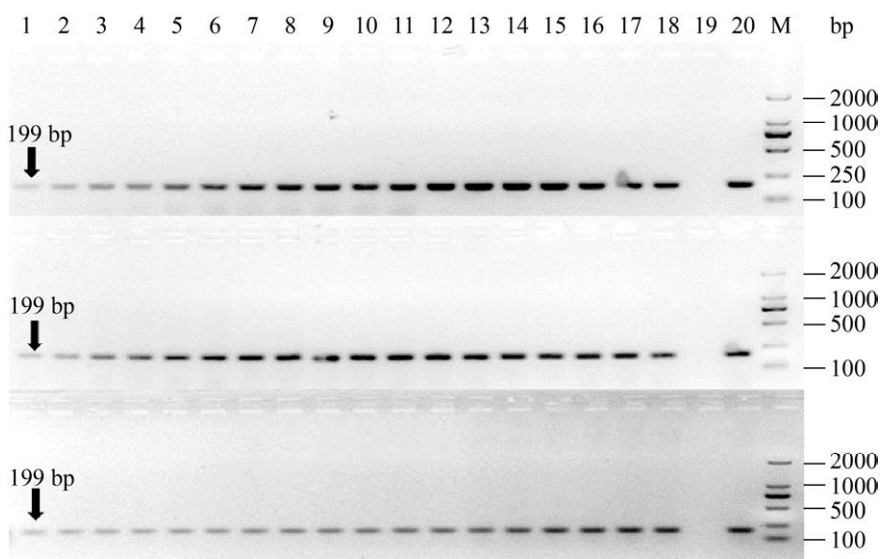


图 2. 引物有效性评价

Figure 2. Primer effectiveness evaluation. 1–18: Day1–Day18; 19: ddH₂O; 20: *Ac. jinshanensis*; M: 2000 bp marker.

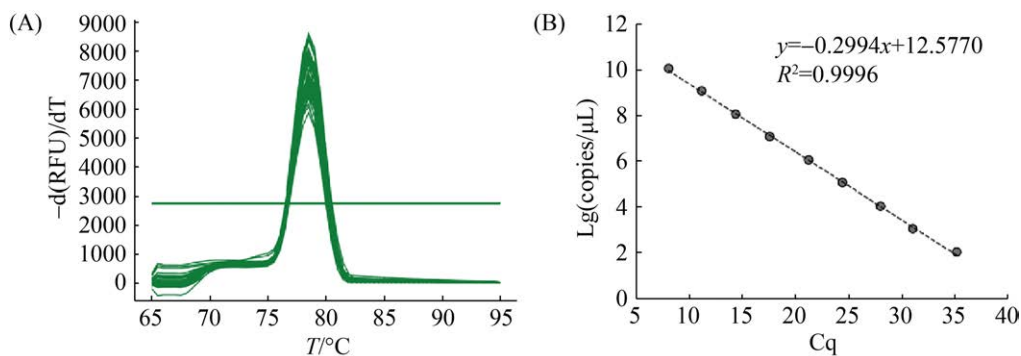


图 3. RT-qPCR 溶解曲线与标准曲线

Figure 3. Standard and melting curve of RT-qPCR.

表 2. 金山醋酸乳杆菌的加标回收率

Table 2. Recovery experience of *Ac. jinshanensis*

Origin mass concentration (copies/g dry <i>Pei</i>)	Added mass concentration (copies/g dry <i>Pei</i>)	Found mass concentration (copies/g dry <i>Pei</i>)	Recovery/%
0	3.75×10^3	$3.74 \times 10^3 \pm 5.25 \times 10^1$	99.64 ± 1.40
0	3.75×10^5	$3.79 \times 10^5 \pm 1.95 \times 10^4$	101.00 ± 5.20
0	3.75×10^7	$3.68 \times 10^7 \pm 9.92 \times 10^5$	98.00 ± 2.65
0	3.75×10^9	$3.83 \times 10^9 \pm 7.50 \times 10^7$	102.00 ± 2.00
3.75×10^6	3.75×10^5	$4.11 \times 10^6 \pm 1.56 \times 10^5$	99.67 ± 3.79
3.75×10^6	3.75×10^6	$7.28 \times 10^6 \pm 7.50 \times 10^4$	97.00 ± 1.00
3.75×10^6	3.75×10^7	$4.18 \times 10^7 \pm 6.30 \times 10^5$	101.33 ± 1.53
3.75×10^6	3.75×10^8	$3.70 \times 10^8 \pm 1.10 \times 10^7$	97.67 ± 2.89

山醋酸乳杆菌含量进行测定, 四川某浓香型白酒酿造过程第 1 天样品中未检测到金山醋酸乳杆菌, 其余样品检测结果均在本研究所设计引物 AJ 的检测限内。发酵第 18 天的四川某食醋醋醅中金山醋酸乳杆菌含量为 7.17 ± 0.18 lg(copies/g 干醅), 发酵第 35 天的山东某食醋醋醅中金山醋酸乳杆菌含量为 6.26 ± 0.16 lg(copies/g 干醅), 发酵第 70 天的江苏某白酒酿造过程酒醅中金山醋酸乳杆菌含量为 9.11 ± 0.18 lg(copies/g 干醅); 此外, 在某储罐食醋中也检测到 2.49 ± 0.06 lg(copies/ μ L) 和 3.29 ± 0.13 lg(copies/ μ L) 的金山醋酸乳杆菌 (图 4-B)。

2.6 镇江香醋醋酸发酵过程醋醅中金山醋酸乳杆菌动态变化

醋酸发酵过程醋醅中细菌含量变化如图 5-A 所示。发酵第 6 天时, 细菌总量最高, 为 9.85 ± 0.10 lg(copies/g 干醅), 醋酸发酵结束时, 含量为 8.80 ± 0.10 lg(copies/g 干醅)。镇江香醋醋酸发酵过程的微生物群落结构表明, 金山醋酸乳杆菌的相对丰度在醋酸发酵 1–15 d 呈现上

升趋势, 特别是在露底后, 其相对丰度迅速上升, 醋酸发酵第 15 天时达到 $81\% \pm 13\%$ (图 5-B)。

金山醋酸乳杆菌在镇江香醋醋酸发酵过程中呈现先升后趋于平稳的趋势(图 6)。醋酸发酵初期为 5.57 ± 0.11 lg(copies/g 干醅), 醋酸发酵 6–9 d 由 6.35 ± 0.07 lg(copies/g 干醅) 上升至 8.72 ± 0.09 lg(copies/g 干醅), 而后一直保持在 10^8 lg(copies/g 干醅) 至发酵结束。

将细菌群落的含量乘金山醋酸乳杆菌相对丰度所估算的金山醋酸乳杆菌含量, 与 RT-qPCR 得到的金山醋酸乳杆菌含量进行对比, 发现两者的数值在发酵 9 d 后的醋醅样品中无显著性差异, 说明通过物种相对丰度和总细菌含量来计算某个物种的含量, 在一定程度上与 RT-qPCR 的检测结果接近; 但当金山醋酸乳杆菌的相对丰度低于 10% 时, 该方法计算的含量与 RT-qPCR 分析结果具有显著差异(图 6), 说明应用本研究的特异性引物 AJ 适合用于酿造全过程中金山醋酸乳杆菌的准确定量, 这和文献研究结果一致^[26]。

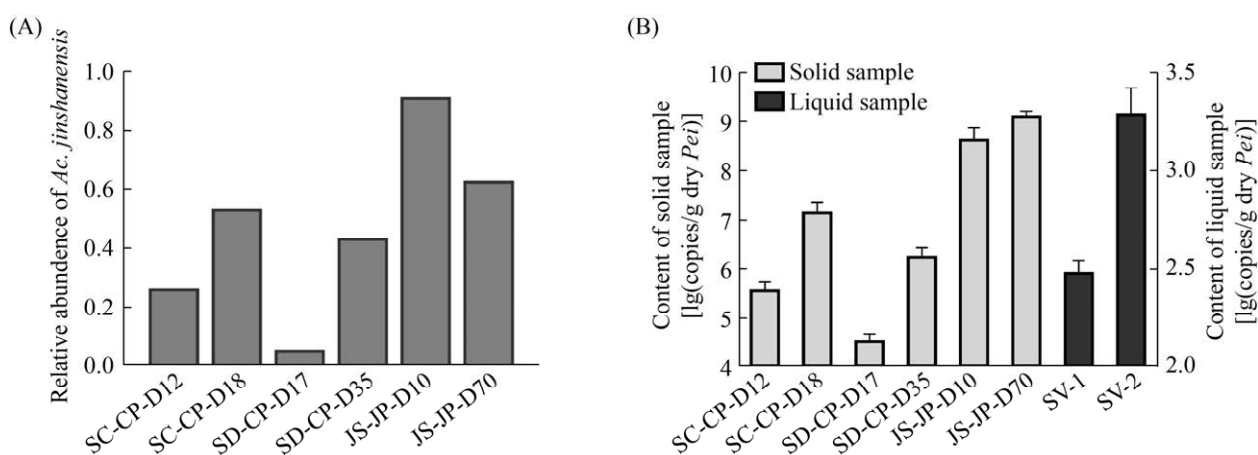


图 4. 不同样本中金山醋酸乳杆菌分布(A)与含量(B)

Figure 4. Distribution (A) and content (B) of *Ac. jinshanensis* in different samples. SC: Sichuan; SD: Shandong; JS: Jiangsu; SV: Stored vinegar; CP: *cupei*; JP: *jiupei*.

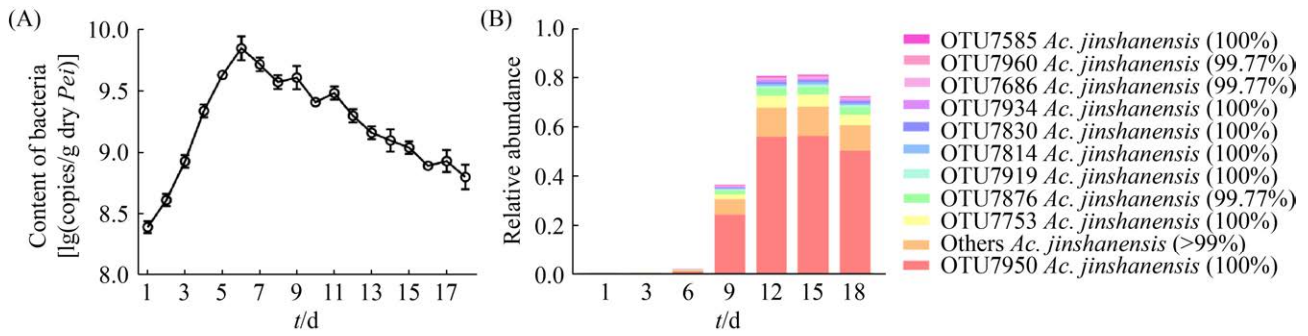


图 5. 镇江香醋醋酸发酵过程细菌含量变化(A)与金山醋酸乳杆菌分布(B)

Figure 5. Changes of bacterial biomass (A) and distribution (B) of *Ac. jinshanensis* during AAF of Zhenjiang aromatic vinegar. Interleaved bars=Mean±Standard Deviation.

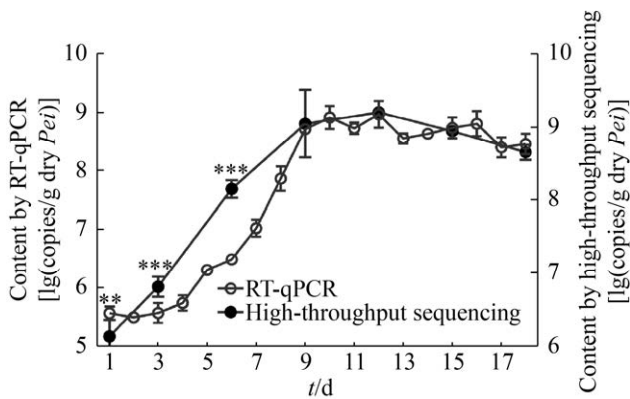


图 6. 镇江香醋醋酸发酵过程金山醋酸乳杆菌含量 (**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)

Figure 6. Content of *Ac. jinshanensis* in bacterial community during AAF process of Zhenjiang aromatic vinegar (**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

3 讨论

高度保守、特异性强的模板 DNA 序列是特异性引物设计的关键。传统的细菌检测多采用 16S rRNA 基因序列作为靶标序列, 然而乳酸菌种间的 16S rRNA 序列同源性较高, 管家基因或其他蛋白质编码基因成为用于乳酸菌鉴定的重要序列^[27]。目前, 已有许多基于 *pheS* 基因进行乳酸菌 RT-qPCR 的报道, 2013 年 Bottari

等^[28]设计并优化了针对 *pheS* 基因设计的引物, 用于 *L. helveticus*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus* 和 *Li. fermentum* 的多重检测。2017 年 Moser 等^[17]以 *pheS* 基因作为模板序列, 实现了食品中 *L. helveticus* 的快速鉴定和定量。本研究的结果也充分证明, 应用 *pheS* 基因作为模板用于金山醋酸乳杆菌的 RT-qPCR 检测特异性和准确性都很高。

金山醋酸乳杆菌在白酒、食醋等传统酿造过程中广泛存在。杜如冰^[5]等对全国 10 个不同产区的白酒酒醅中高丰度的 *Lactobacillus* sp.进行了分析, 并利用其 16S rRNA 基因序列设计了特异性引物用于快速鉴定。本研究将该报道中所用 *Lactobacillus* sp.的 16S 序列进行比对, 发现该物种为金山醋酸乳杆菌。进一步通过分析, 以 *pheS* 基因序列为模板序列设计了一条长度为 199 bp 的引物, 可用于不同地区醋醅、酒醅和食醋样品中金山醋酸乳杆菌的快速鉴定、准确定量。

4 结论

本研究以金山醋酸乳杆菌 *pheS* 基因序列为模板序列, 设计了一对特异性引物, 构建了一种

RT-qPCR 方法, 此引物特异性强, 有效性好, 准确性高, 可用于多个地区的醋醅、酒醅、食醋样品中金山醋酸乳杆菌的快速鉴定、准确定量, 有助于酿造生产过程的监测与优化, 对于其他酿造体系中微生物的特异性引物设计具有重要参考意义。

参 考 文 献

- [1] Yu YJ, Li X, Zhang JH, Chai LJ, Lu ZM, Xu ZH. *Lactobacillus jinshani* sp. nov., isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 43–54.
- [2] Zheng JS, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2782–2858.
- [3] 邓永建. 酿醋微生物群落结构变化与醋醅氧含量的相关性研究. 江南大学学位论文, 2020.
- [4] Du RB, Wu Q, Xu Y. Chinese liquor fermentation: identification of key flavor-producing *Lactobacillus* spp. by quantitative profiling with indigenous internal standards. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(12): e00456-20. DOI: 10.1128/aem.00456-20.
- [5] Du RB, Wu Q, Xu Y. Distribution of *Lactobacillus* sp. in Chinese liquor fermentation system from different producing location by three-step fluorescent quantitative PCR. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 1–12. (in Chinese)
杜如冰, 吴群, 徐岩. 基于三步荧光定量 PCR 技术揭示不同产区白酒酿造系统中 *Lactobacillus* sp. 的分布特征. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 1–12.
- [6] Stämmeler F, Gläsner J, Hiergeist A, Holler E, Weber D, Oefner PJ, Gessner A, Spang R. Adjusting microbiome profiles for differences in microbial load by spike-in bacteria. *Microbiome*, 2016, 4(1): 28.
- [7] Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, de Commer L, Darzi Y, Vermeire S, Falony G, Raes J. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*, 2017, 551(7681): 507–511.
- [8] Lin BR, Tao Y, Wang HH, Liao JL, Zhuo K. Duplex real-time quantitative PCR for simultaneous detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* and *P. thornei*. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 157(1): 185–196.
- [9] Jung Y, Park GS, Moon JH, Ku K, Beak SH, Lee CS, Kim S, Park EC, Park D, Lee JH, Byeon CW, Lee JJ, Maeng JS, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, Lee MJ, Kim HG. Comparative analysis of primer-probe sets for RT-qPCR of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2). *ACS Infectious Diseases*, 2020, 6(9): 2513–2523.
- [10] Randazzo W, Piqueras J, Rodríguez-Díaz J, Aznar R, Sánchez G. Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(4): 958–964.
- [11] Nakano M. Development of a multiplex real-time PCR assay for the identification and quantification of group-specific *Bacillus* spp. and the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 323: 108573.
- [12] Ding T, Suo YJ, Zhang ZH, Liu DH, Ye XQ, Chen SG, Zhao Y. A multiplex rt-pcr assay for *S. aureus*, *I. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. detection in raw milk with Pre-enrichment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 989.
- [13] Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, Räsänen P, Santo Domingo JW. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(23): 13611–13620.
- [14] Dong L, Liu HM, Meng L, Xing MR, Wang JQ, Wang C, Chen H, Zheng N. Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(6): 4936–4943.

- [15] Kim E, Yang SM, Cho EJ, Kim HY. Novel real-time PCR assay for *Lactobacillus casei* group species using comparative genomics. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103485.
- [16] Kim DH, Lim HW, Kim SH, Seo KH. Development of a real-time PCR assay for rapid screening of acetic acid bacteria as a group in food products. *Food Control*, 2019, 100: 78–82.
- [17] Moser A, Berthoud H, Eugster E, Meile L, Irmeler S. Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. *International Dairy Journal*, 2017, 68: 52–59.
- [18] Gamallat Y, Ren XM, Meyiah A, Li MQ, Ren XX, Jamalath Y, Song SY, Xie LH, Ahmad B, Shopit A, Mousa H, Ma YF, Xin Y, Ding DP. The immune-modulation and gut microbiome structure modification associated with long-term dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* using 16S rRNA sequencing analysis. *Journal of Functional Foods*, 2019, 53: 227–236.
- [19] Huang CH, Lee FL. The dnaK gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(2): 319–327.
- [20] Schuster JA, Klingl A, Vogel RF, Ehrmann MA. Polyphasic characterization of two novel *Lactobacillus* spp. isolated from blown salami packages: Description of *Lactobacillus halodurans* sp. nov. and *Lactobacillus salsicarnum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 2019, 42(6): 126023.
- [21] Bottari B, Felis GE, Salvetti E, Castioni A, Campedelli I, Torriani S, Bernini V, Gatti M. Effective identification of *Lactobacillus casei* group species: genome-based selection of the gene mutL as the target of a novel multiplex PCR assay. *Microbiology: Reading, England*, 2017, 163(7): 950–960.
- [22] Yu J, Sun ZH, Liu WJ, Bao QH, Zhang JC, Zhang HP. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial hsp60, pheS and tuf gene sequences. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(6): 927–934.
- [23] Mekadim C, Killer J, Mrázek J, Bunešová V, Pechar R, Hroncová Z, Vlčková E. Evaluation of the infB and rpsB gene fragments as genetic markers intended for identification and phylogenetic analysis of particular representatives of the order Lactobacillales. *Archives of Microbiology*, 2018, 200(10): 1427–1437.
- [24] Zhao W, Gu CT. *Lactobacillus terrae* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus metriopecterae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(6): 1597–1600.
- [25] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202.
- [26] Tettamanti Boshier FA, Srinivasan S, Lopez A, Hoffman NG, Proll S, Fredricks DN, Schiffer JT. Complementing 16S rRNA gene amplicon sequencing with total bacterial load to infer absolute species concentrations in the vaginal microbiome. *mSystems*, 2020, 5(2): e00777-19.
- [27] Guu JR, Wang LT, Hamada M, Wang C, Lin RW, Huang LN, Watanabe K. *Lactobacillus bambusae* sp. nov., isolated from traditional fermented ma bamboo shoots in Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(8): 2424–2430.
- [28] Bottari B, Agrimonti C, Gatti M, Neviani E, Marmiroli N. Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic lactic acid bacteria in natural whey starters. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 290–297.

Establishment and application of real-time fluorescence quantitative PCR for detection of *Acetilactobacillus jinshanensis*

Jia Sun^{1,2}, Zhenming Lu^{2,4}, Xiaojuan Zhang², Lijuan Chai², Jinsong Shi³, Zhenghong Xu^{1,2,4*}

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁴ National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] To establish a real-time quantitative method PCR (RT-qPCR) for the detection of *Acetilactobacillus jinshanensis* in the fermentation of Chinese traditional fermented vinegar and baijiu. [Methods] The specific gene in the *Acetilactobacillus jinshanensis* genome was screened for the design of PCR-sequence specific primer. The specificity and accuracy of specific primers were verified by PCR with isolated strains and vinegar *Pei*. The RT-qPCR method was established to analyze the content of *Ac. jinshanensis* in vinegar, *jiupe* and *cupei* from different regions. [Results] We designed a pair of primers with product size of 199 bp, GC content of 55% and T_m value of 59 °C with phenylalanine-tRNA ligase subunit α (encoding *pheS* gene) of *Ac. jinshanensis*. The RT-qPCR method has potent specificity, high sensitivity, good repeatability and versatility, and its detection range is 2.24–10.24 lg(copies/ μ L). The method can be applied for the detection of *Ac. jinshanensis* in the fermentation of *cupei* and *jiupe* from different regions. [Conclusion] The RT-qPCR method can be used for the specific identification and accurate quantification of *Ac. jinshanensis* in the fermentation of vinegar and baijiu.

Keywords: Zhenjiang aromatic vinegar, *Acetilactobacillus jinshanensis*, specific primers, RT-qPCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603800, 2018YFC1603802) and by the National Natural Science Foundation of China (31530055)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

Received: 24 December 2020; Revised: 19 March 2021; Published online: 25 April 2021