

唐胜硕, 张晓娟, 柴丽娟, 史劲松, 王松涛, 张宿义, 沈才洪, 陆震鸣, 许正宏. 实时荧光定量PCR检测大曲中两种克罗彭施泰特氏菌的方法与应用[J]. 应用与环境生物学报, 2025, 31 (1): 121-130

Tang SS, Zhang XJ, Chai LJ, Shi JS, Wang ST, Zhang SY, Shen CH, Lu ZM, Xu ZH. Establishment and application of real-time quantitative PCR for detecting two *Kroppenstedtia* species in *Daqu* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2025, 31 (1): 121-130

实时荧光定量PCR检测大曲中两种克罗彭施泰特氏菌的方法与应用

唐胜硕^{1,2}, 张晓娟^{1,2}, 柴丽娟^{1,2}, 史劲松⁴, 王松涛⁵, 张宿义⁵, 沈才洪⁵, 陆震鸣^{1,2}✉, 许正宏³

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, 无锡 214122;

²江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 无锡 214122;

³四川大学轻工科学与工程学院, 成都 610065;

⁴江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122;

⁵国家固态酿造工程技术研究中心, 泸州 646000

摘要 象牙色克罗彭施泰特氏菌 (*Kroppenstedtia eburnea*) 与血液克罗彭施泰特氏菌 (*K. sanguinis*) 是大曲细菌群落中的核心功能物种. 为实现对大曲中这两个物种的快速检测与定量, 从 *K. eburnea* 与 *K. sanguinis* 基因组中筛选了特异性强的基因序列作为模板设计特异性引物, 通过近缘菌株和不同类型大曲样品分别验证引物的特异性与有效性, 并建立基于实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 的特异性检测方法. 结果表明, 以 *K. eburnea* 与 *K. sanguinis* 的DNA聚合酶B亚单位基因 (*gyrB* 基因) 为参考序列分别设计的引物KE-P-1与KS-P-1具有良好的特异性, 其扩增目的片段长度分别为277 bp和287 bp. 根据引物KE-P-1和KS-P-1建立的RT-qPCR方法特异性强、灵敏度高且准确性高, 扩增效率分别为101.8%和97.70%, 检测范围分别为2.089-9.089 lg(copies/μL)和1.088-9.088 lg(copies/μL), 成功应用于大曲样品中 *K. eburnea* 与 *K. sanguinis* 的检测. 对高温大曲发酵过程的研究表明, 高温大曲中的 *K. eburnea* 与 *K. sanguinis* 含量均表现出先增加后降低再增加的变化规律, 发酵结束时含量分别为 9.20 ± 0.11 lg(copies/g) 和 9.71 ± 0.22 lg(copies/g). 本研究所建立的RT-qPCR方法可对各类大曲发酵过程中 *K. eburnea* 与 *K. sanguinis* 进行特异性鉴定和快速定量. (图4 表4 参37)

关键词 大曲; 象牙色克罗彭施泰特氏菌; 血液克罗彭施泰特氏菌; 特异性引物; RT-qPCR

Establishment and application of real-time quantitative PCR for detecting two *Kroppenstedtia* species in *Daqu*

TANG Shengshuo^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2}, CHAI Lijuan^{1,2}, SHI Jinsong⁴, WANG Songtao⁵, ZHANG Suyi⁵, SHEN Caihong⁵, LU Zhenming^{1,2}✉ & XU Zhenghong³

¹Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

³College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

⁴School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

⁵National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China

Abstract To establish a real-time quantitative PCR (RT-qPCR) method for the detection of two core functional bacteria (*Kroppenstedtia eburnea* and *Kroppenstedtia sanguinis*) in *Daqu* samples, specific genes in *K. eburnea* and *K. sanguinis* genomes were screened to design PCR sequence-specific primers. The specificity and accuracy of the specific primers were verified by PCR using the isolated strains and samples of *Daqu*, respectively. The RT-qPCR method was established to analyze the contents of *K. eburnea* and *K. sanguinis* in different types of *Daqu* and samples during the fermentation process of high-temperature *Daqu*. The results showed that specific primers KE-P-1 and KS-P-1 were designed for *K. eburnea* and *K. sanguinis* based on their gyrase B subunit gene (*gyrB* gene), respectively, with product lengths of 277 and 287 bp. The RT-qPCR methods established using KE-P-1 and KS-P-1 showed strong specificity, high sensitivity, and good accuracy. The RT-qPCR quantitative standard curves for primers KE-P-1 and KS-P-1 were $y = -0.3050x + 1.12$ ($R^2 = 0.9990$) and $y = -0.2960x + 10.63$ ($R^2 = 0.9998$), respectively. The amplification efficiency was 101.8% and 97.70% and the detection ranges were 2.089-9.089 lg(copies/μL) and 1.088-9.088 lg(copies/μL), respectively.

收稿日期 Received: 2024-01-15 接受日期 Accepted: 2024-05-23

国家重点研发计划项目 (2022YFD2101204-01) 资助 Supported by the National Key R&D Program of China (2022YFD2101204-01)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: zmlu@jiangnan.edu.cn)

The methods can be applied to detect *K. eburnea* and *K. sanguinis* in high-, medium-, and low-temperature *Daqu*. A study of the high-temperature *Daqu* fermentation process indicated that *K. eburnea* and *K. sanguinis* exhibited an initial increase, followed by a decrease and then an increase. At the end of fermentation, the content of *K. eburnea* and *K. sanguinis* was 9.20 ± 0.11 lg (copies/g) and 9.71 ± 0.22 lg (copies/g), respectively. In conclusion, the RT-qPCR method established in this study enabled the rapid identification and quantification of *K. eburnea* and *K. sanguinis* in *Daqu*.

Keywords *Daqu*; *Kroppenstedtia eburnea*; *Kroppenstedtia sanguinis*; specific primer; RT-qPCR

克罗彭施泰特氏菌属 (*Kroppenstedtia*) 是属于高温放线菌科 (Thermoactinomycetaceae) 的一类嗜热、好氧、丝状的革兰氏阳性菌, 常见于高温环境, 最适生长温度为45-50 °C^[1-2]. 已有研究报道, 克罗彭施泰特氏菌属普遍存在于大曲^[3]、酒醅^[4]以及豆瓣酱^[5]等酿造环境中, 并被确定为中温大曲和高温大曲中的核心功能细菌, 能够促进多种挥发性和非挥发性代谢产物的合成^[6-7]. 大曲中存在的克罗彭施泰特氏菌属细菌包含象牙色克罗彭施泰特氏菌 (*Kroppenstedtia eburnea*) 与血液克罗彭施泰特氏菌 (*Kroppenstedtia sanguinis*)^[8], 并且这两个物种在大曲中的功能有所不同. 其中*K. eburnea*能够为白酒酿造提供发酵力^[9]与淀粉酶^[10], 并与酸类和酯类物质形成有关^[11]; 而*K. sanguinis*能够产多种酶并分解大分子物质, 为微生物生长和风味物质合成提供前体物质^[12]. 因此, 在大曲微生物群落中对*K. eburnea*与*K. sanguinis*进行特异性定量分析将有助于大曲生产过程的监测与优化以及对成品曲的质量判别, 但目前尚未见关于这两个物种的定量分析的报道.

目前, 微生物绝对定量的方法包括流式细胞计数法^[13]、外标绝对定量法外标法^[14]、实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 技术^[15]等. RT-qPCR技术是一种基于特异性引物定量特定物种的PCR方法, 具有精准度高、灵敏度高、操作简便^[16]等特点, 已广泛应用于酿造微生物的检测^[17], 何宏魁等 (2019) 采用RT-qPCR技术实现了对窖泥中甲烷囊菌属的定量分析^[18]; 孙佳等 (2021) 基于RT-qPCR技术开发了一种对食醋和白酒发酵过程中金山醋酸乳杆菌的特异性检测方法^[19].

本研究从目标菌株*K. eburnea*与*K. sanguinis*的基因组中筛选了特异性强的基因, 并以这些基因序列作为模板序列, 使用Primer Premier 5设计了特异性引物. 通过软件模拟PCR与近缘物种PCR相结合评价引物的特异性, 通过不同类型的大曲评价引物的有效性, 以特异性强、灵敏度高的PCR引物. 根据设计的引物建立了相应的RT-qPCR方法, 并在大曲发酵过程中实现了对*K. eburnea*与*K. sanguinis*含量变化的监测.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 荧光定量PCR方法建立过程中所用细菌均从大曲中筛选得到. 墓地枝芽孢杆菌 (*Virgibacillus necropolis*)、戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)、索诺拉沙漠芽孢杆菌 (*Bacillus sonorensis*)、甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、白色链霉菌 (*Streptomyces albus*)、大曲岩石芽孢杆菌 (*Scopulibacillus daqui*)、卡氏海洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus caeni*) 和大豆海洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus sojae*) 采用胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSB) 在37 °C条件下培养24 h; 普通高温放线菌 (*Thermoactinomyces vulgaris*)、中间型高温放线菌 (*Thermoactinomyces intermedius*)、甘蔗莱西氏菌 (*Laceyella sacchari*) 和腾冲莱西氏菌 (*Laceyella tengchongensis*) 采用TSB在55 °C条件下培养24 h; *K. eburnea*和*K. sanguinis*采用TSB在45 °C条件下分别培养32 h和48 h.

1.1.2 TSB培养基 (g/L) 胰蛋白胨15.0, 大豆胨5.0, 氯化钠5.0.

1.1.3 大曲样本 中温大曲、高温大曲样本取自四川省某酒厂, 低温大曲样本取自山西省某酒厂.

1.2 主要试剂与仪器

氯化钠、葡萄糖、酵母粉、琼脂粉、牛心浸粉和蛋白胨等 (国药集团有限公司); 细菌基因组DNA提取试剂盒 (上海捷瑞生物有限公司); DNeasy Powersoil Kit (德国MOBIO公司); 7890B-5977B 气相色谱质谱联用仪 (美国Agilent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); 核酸电泳装置、凝胶成像分析系统 (Bio-Rad公司); DNA Marker、Premix Ex Taq 酶 (TaKaRa公司).

1.3 基因组DNA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, 8 000 r/min离心5 min, 收集菌体沉淀, 采用试剂盒提取基因组DNA; 大曲样品基因组DNA提取: 使用DNeasy Powersoil Kit试剂盒, 并根据其说明书要求提取样品总DNA, 提取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 大曲样品微生物高通量测序

使用细菌通用引物338F (5'-ACTCCTACGGGA-GGCAGCAG-3') 和806R (5'-GGACTACHVGGG-TWTCTAAT-3') 扩增样品中细菌群落的16S rRNA V3-V4保守区。将质量合格的DNA委托武汉华大医学检验所有限公司完成文库构建和Illumina Miseq平台双端测序。微生物组生物信息学分析按照QITME2流程进行, 基于官方教程稍作修改。简言之, 原始序列数据被Demux插件解复用, 序列被引物切割、质量过滤、去噪、合并和使用DADA2插件去除嵌合体。使用特征分类器插件中的分类Sklearn方法和具有99%的同一性的预训练SILVA数据库将按分类学注释给非单扩增序列变异体 (amplicon sequence variants, ASVs)。

1.5 特异性引物的设计与初筛

从JGI (<https://genome.jgi.doe.gov>) 下载*K. eburnea*与*K. sanguinis*的基因组序列, 通过Prokka软件预测编码序列。查阅文献获取用于细菌种间分型的基因, 通过比较各基因序列在NCBI上与其他物种的相似度, 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。使用Primer Premier 5软件设计特异性引物, 设定引物参数: PCR产物长度80-300 bp, 其余参数按照默认设定, 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。通过Tbtools软件^[20]进行模拟PCR对所设计引物进行初筛。

1.6 引物的特异性评价

1.6.1 *K. eburnea*引物的特异性评价 以*K. eburnea*基因组作为阳性对照, 高温大曲中常见的14种细菌 (*K. sanguinis*, *T. vulgaris*, *T. intermedius*, *L. sacchari*, *L. tengchongensis*, *V. necropolis*, *P. pentosaceus*, *B. sonorensis*, *B. methylotrophicus*, *S. saprophyticus*, *S. albus*, *S. daqui*, *O. caeni*, *O. sojae*) 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, Taq PCR Mix 20 μ L, 模板DNA 1 μ L, ddH₂O 27 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性1 min, 65 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 35个循环。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。

1.6.2 *K. sanguinis*引物特异性评价 以*K. sanguinis*基因组作为阳性对照, 高温大曲中

常见的14种细菌 (*K. eburnea*, *T. vulgaris*, *T. intermedius*, *L. sacchari*, *L. tengchongensis*, *V. necropolis*, *P. pentosaceus*, *B. sonorensis*, *B. methylotrophicus*, *S. saprophyticus*, *S. albus*, *S. daqui*, *O. caeni*, *O. sojae*) 基因组作为阴性对照, 不加样品作为空白对照进行PCR。反应体系与条件同1.6.1。

1.7 引物的有效性评价

使用设计的引物对低温大曲、中温大曲、高温大曲基因组进行PCR扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。随后将得到的PCR扩增产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。测序结果将与EzBioCloud数据库进行比对, 以评估引物的有效性。

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: 上下游引物各0.5 μ L, SYBR Green Master Mix 12.5 μ L, 模板DNA 1 μ L, ddH₂O 10.5 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性2.5 min, 94 $^{\circ}$ C变性15 s, 65 $^{\circ}$ C退火45 s, 40个循环。以每个反应管内荧光值达到阈值时的循环数Cq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, 扩增完成后绘制熔解曲线。

1.9 引物定量准确性评价

1.9.1 *K. eburnea*加标回收率测定 在空白样品 (ddH₂O) 加入不同数量的*K. eburnea* (3.43×10^5 、 3.43×10^6 、 3.43×10^7 和 3.43×10^8 copies/g) 计算其空白加标回收率。在小麦样品中加入不同数量的*K. eburnea* (3.43×10^4 、 3.43×10^5 、 3.43×10^6 和 3.43×10^7 copies/g) 计算其样品加标回收率。

1.9.2 *K. sanguinis*加标回收率测定 在空白样品 (ddH₂O) 加入不同数量的*K. sanguinis* (3.89×10^3 、 3.89×10^4 、 3.89×10^5 和 3.89×10^6 copies/g) 计算其空白加标回收率。在小麦样品中加入不同数量的*K. sanguinis* (3.89×10^3 、 3.89×10^4 、 3.89×10^5 和 3.89×10^6 copies/g) 计算其样品加标回收率。

1.10 高温大曲发酵过程细菌含量测定

使用细菌定量引物P1/P2 (P1序列为5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'; P2序列为5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 对第0、2、5、7、9、12、14、27和42天高温大曲发酵过程样品DNA进行RT-qPCR反应, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性2.5 min; 94 $^{\circ}$ C变性15 s, 58 $^{\circ}$ C退火45 s, 40个循环。反应体系与标准曲线绘制方法同1.8。

1.11 目标菌株含量计算

以高温大曲发酵过程样品总DNA为模板, 进行RT-qPCR反应, 对不同发酵时间的高温大曲中*K.*

*eburnea*和*K. sanguinis*的含量进行测定,空白对照为ddH₂O,根据标准曲线计算这两种菌在高温大曲发酵过程中的含量。

1.12 数据分析

使用Microsoft Excel 2021进行数据处理;使用Graphpad Prism 8软件进行分析绘图;采用T检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株特异性引物的设计与初筛

根据已有文献报道,常用于细菌分型的基因主要有*tuf*^[21]、*gyrA*^[22]、*gyrB*^[23]、*rpoA*^[24]、*rpoB*^[25]、*dnaK*^[26]、*recA*^[27]和16S rRNA^[28]等。通过GenBank

比对分析,选取与其他物种相似度最低的4种基因(*K. eburnea*: *gyrA*、*gyrB*、*dnaK*和*recA*; *K. sanguinis*: *gyrA*、*gyrB*、*ropA*和*dnaK*)序列作为模板序列用于设计引物(表1)。

2.2 引物扩增的特异性评价

将所设计引物与GenBank数据库中所有高温放线菌科(Thermoactinomycetaceae)的模式菌株全基因组序列采用TBtools软件进行模拟PCR对所设计引物特异性进行初步评价。结果表明,仅以*gyrB*为模板基因设计的6对引物(表2)能获得目标菌株单一PCR产物,而其他引物均能扩增多种菌株或对目标菌株出现非特异性扩增。

使用通过初步特异性评价的引物分别以目标菌株*K. eburnea*或*K. sanguinis*为阳性模板,以其他14

表1 *Kroppenstedtia eburnea*和*K. sanguinis*基因序列比对结果

Table 1 Conserved sequence alignment of *Kroppenstedtia eburnea* and *Kroppenstedtia sanguinis*

物种 Species	基因名称 Gene ID	相似物种 Similar species	相似度 Similarity (P/%)	GenBank登录号 GenBank accession number
<i>K. eburnea</i>	<i>tuf</i>	<i>Staphylospora marina</i>	82.68	CP034118.1
	<i>gyrA</i>	<i>Polycladomyces abyssicola</i>	76.13	AP024601.1
	<i>gyrB</i>	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	70.99	CP082237.1
	<i>rpoA</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	81.63	CP048104.1
	<i>rpoB</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	80.93	CP048104.1
	<i>dnaK</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	76.00	CP039710.1
	<i>recA</i>	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	78.24	CP035456.1
	16S rRNA	<i>Kroppenstedtia guangzhouensis</i>	97.59	NR_109746.1
<i>K. sanguinis</i>	<i>tuf</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	82.59	CP048104.1
	<i>gyrA</i>	<i>Polycladomyces abyssicola</i>	74.84	AP024601.1
	<i>gyrB</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	77.35	CP048104.1
	<i>rpoA</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	82.48	CP048104.1
	<i>rpoB</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	79.81	CP048104.1
	<i>dnaK</i>	<i>Staphylospora marina</i>	75.47	CP034118.1
	<i>recA</i>	<i>Kroppenstedtia pulmonis</i>	80.73	CP048104.1
	16S rRNA	<i>Kroppenstedtia guangzhouensis</i>	95.41	NR_109746.1

表2 *Kroppenstedtia eburnea*与*Kroppenstedtia sanguinis*特异性引物设计

Table 2 Specific primer design for *Kroppenstedtia eburnea* and *Kroppenstedtia sanguinis*

物种 Species	引物 Primer	基因名称 Gene ID	正/反向引物 Primer f/r	序列 Sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
<i>K. eburnea</i>	KE-P-1	<i>gyrB</i>	KE-P-1f KE-P-1r	AGGCATCCGCTCCTTTGTGG TCCGCTCAGGTTGTTGTCATTC	277
	KE-P-2	<i>gyrB</i>	KE-P-2f KE-P-2r	GGCATCCGCTCCTTTGTGG TCCGCTCAGGTTGTTGTCATT	276
	KE-P-3	<i>gyrB</i>	KE-P-3f KE-P-3r	GCATCCGCTCCTTTGTGG TCCGCTCAGGTTGTTGTCATTC	275
	KS-P-1	<i>gyrB</i>	KS-P-1f KS-P-1r	GGAGGAACAGCCAAACAGG CCCGCATCAATCAAAGGAC	287
	KS-P-2	<i>gyrB</i>	KS-P-2f KS-P-2r	CAGGAGGAACAGCCAAACA CCCGCATCAATCAAAGGAC	289
	KS-P-3	<i>gyrB</i>	KS-P-3f KS-P-3r	AAAATTGGCTGATTGCACCTC CTGTTTGGCTGTTCTCCTG	88

种大曲中常见高丰度近缘细菌为阴性模板进行PCR扩增. 结果如表3所示, 引物KE-P-2和KE-P-3对目标菌株*K. eburnea*扩增较微弱, KS-P-2对目标菌株*K. sanguinis*扩增较微弱, KS-P-3对*K. sanguinis*无扩增, 引物KE-P-1和KS-P-1分别对*K. eburnea*和*K. sanguinis*呈阳性扩增, 且条带清晰明亮, 无拖尾, 对14株非目标菌株无扩增. 其中引物KE-P-1的PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果如图1A所示, *K. eburnea*所在泳道上条带单一且长度在300 bp左右, 其他菌株所在泳道上均无条带, 表明引物KE-P-1的特异性较好. 经测序, 引物KE-P-1的PCR产物的序列长度为277 bp, 与所设计引物目的片段一致性为100%; 引物KS-P-1的PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果如图1B所示, *K. sanguinis*所在泳道上条带单一且长度在300 bp左右, 其他菌株所在泳道上均无条带, 表明引物KE-P-1的特异性较好. 经测序, 引物KS-P-1的PCR产物的序列长

度为287 bp, 与所设计引物目的片段一致性为100%.

2.3 引物扩增的有效性评价

分别使用引物KE-P-1与KS-P-1对低、中、高温大曲基因组DNA进行PCR扩增, PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳. 电泳结果显示引物KE-P-1与KS-P-1对所有大曲样品的扩增产物均有条带显示(图2), 说明引物KE-P-1与KS-P-1可分别用于不同品温的大曲样品中*K. eburnea*与*K. sanguinis*的检测.

2.4 荧光定量PCR方法的建立

2.4.1 标准曲线以及熔解曲线的绘制 含有引物KE-P-1目的片段的单拷贝克隆标准品浓度为 1.228×10^{10} copies/ μ L, 其梯度稀释后的稀释曲线均为平稳光滑的“S”形, 熔解曲线呈现单一熔解峰, 无引物二聚体及非特异性产物(图3A), 获得的标准曲线为斜率为 $y = -0.3050x + 11.12$ ($R^2 = 0.9990$), 引物的扩增效率为101.8%(图3B), 线性检测范围为2.089-

表3 *Kroppenstedtia eburnea*与*K. sanguinis*引物特异性扩增结果

Table 3 Results of specific amplification of primers for *Kroppenstedtia eburnea* and *Kroppenstedtia sanguinis*

物种 Species	扩增结果 Product results					
	KE-P-1	KE-P-2	KE-P-3	KS-P-1	KS-P-2	KS-P-3
<i>K. eburnea</i>	++	+	+	-	-	-
<i>K. sanguinis</i>	-	-	-	++	+	-
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Thermoactinomyces intermedius</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Laceyella sacchari</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Laceyella tengchongensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Virgibacillus necropolis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sonorensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces albus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Scopulibacillus daqui</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanobacillus caeni</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanobacillus sojiae</i>	-	-	-	-	-	-

“++”表示条带明亮, “+”表示条带较微弱, “-”表示无条带.
“++” mean bright positive amplification; “+” mean low positive amplification; “-” mean negative amplification.

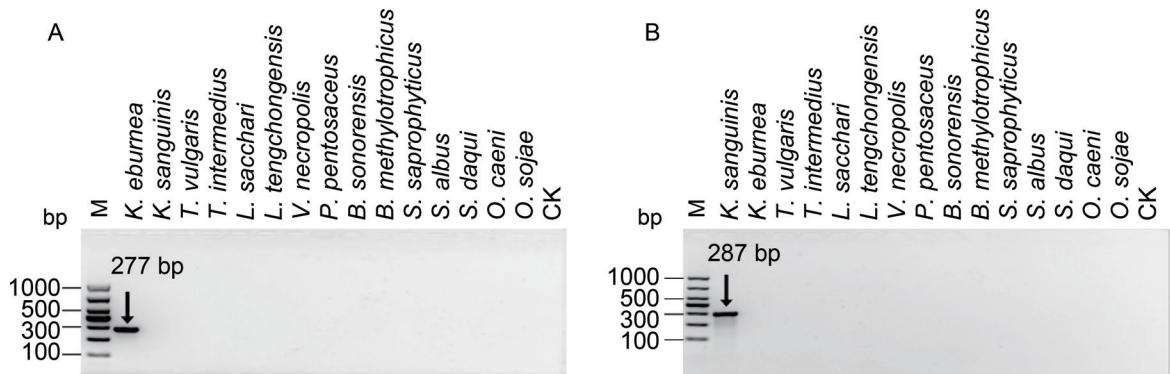


图1 引物KE-P-1 (A) 与KS-P-1 (B) 的特异性评价. M: 1 000 bp DNA marker; CK: 空白对照.
Fig. 1 Specificity evaluation of primers KE-P-1 (A) and KS-P-1 (B). M: 1 000 bp DNA marker; CK: Blank control.

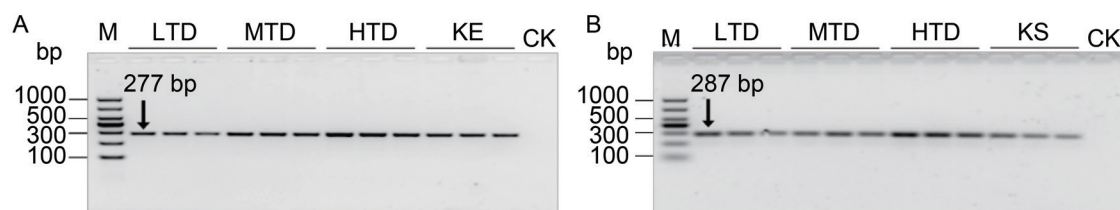


图2 引物KE-P-1 (A) 与KS-P-1 (B) 的有效性评价。M: DNA marker; LTD: 低温大曲; MTD: 中温大曲; HTD: 高温大曲; KE: *Kroppenstedtia eburnea*; KS: *K. sanguinis*; CK: 空白对照。

Fig. 2 Effectiveness evaluation of primers KE-P-1 (A) and KS-P-1 (B). M: DNA marker; LTD: Low-temperature *Daqu*; MTD: Medium-temperature *Daqu*; HTD: High-temperature *Daqu*; KE: *Kroppenstedtia eburnea*; KS: *Kroppenstedtia sanguinis*; CK: Blank control.

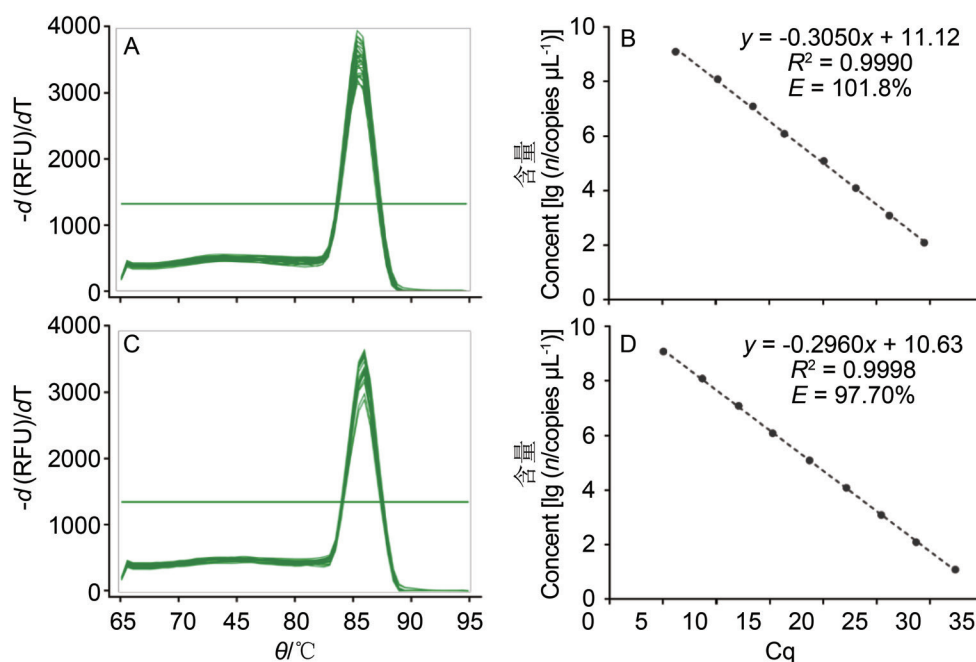


图3 RT-qPCR熔解曲线与标准曲线。A: KE-P-1熔解曲线; B: KE-P-1标准曲线; C: KS-P-1熔解曲线; D: KS-P-1标准曲线。

Fig. 3 Standard and melting curves of RT-qPCR. A: Melting curve of KE-P-1; B: Standard curve of KE-P-1; C: Melting curve of KS-P-1; D: Standard curve of KS-P-1.

9.089 lg(copies/ μ L); 含有引物KS-P-1目的片段的单拷贝克隆标准品浓度为 1.224×10^{10} copies/ μ L, 其梯度稀释后的稀释曲线均为平稳光滑的“S”形, 熔解曲线呈现单一熔解峰, 无引物二聚体及非特异性产物(图3C), 获得的标准曲线为 $y = -0.2960x + 10.63$ ($R^2 = 0.9998$), 引物的扩增效率为97.70%(图3D), 线性检测范围为1.088-9.088 lg(copies/ μ L)。

2.4.2 菌株加标回收率的测定 空白样品(ddH_2O)和小麦样品中添加不同数量的目标菌株模板测定得到*K. eburnea*的加标回收率在97%-104%之间, *K. sanguinis*的加标回收率在96%-104%之间(表4)。

2.5 高温大曲发酵过程中克罗彭施泰特氏菌的动态变化

高温大曲发酵过程中细菌含量变化如图4A所示。发酵开始后两天内细菌迅速增长, 第2天时细菌总量为 10.45 ± 0.14 lg(copies/g), 随后细菌总量开

始缓慢下降, 第12天后又一次开始增长, 发酵结束时, 含量为 10.57 ± 0.18 lg(copies/g)。高温大曲发酵过程的微生物群落结构表明, 大曲中的克罗彭施泰特氏菌包含*K. eburnea*与*K. sanguinis*两个物种, 在发酵过程中这两种菌的相对丰度均呈现“先增后减再增”的趋势(图4B), 平均相对丰度均在第9天达到最大值, 分别为8.11%和20.60%, 发酵结束时相对丰度分别为6.16%和20.15%。使用设计的引物KE-P-1与KS-P-1分别对高温大曲发酵过程中*K. eburnea*与*K. sanguinis*含量进行监测。结果显示, 高温大曲发酵过程中*K. eburnea*与*K. sanguinis*含量的变化趋势与总细菌含量变化相似, 在发酵前两天迅速积累, 第2天含量分别达到 8.77 ± 0.09 lg(copies/g)和 9.13 ± 0.15 lg(copies/g), 而后开始缓慢降低, 直至14 d后两种菌的含量又开始增加, 发酵结束时含量分别为 $9.20 \pm$

表4 *Kroppenstedtia eburnea*与*K. sanguinis*的加标回收率
Table 4 Recovery experience of *Kroppenstedtia eburnea* and *Kroppenstedtia sanguinis*

物种 Species	原始量 Origin content (n/copies g ⁻¹)	添加量 Added content (n/copies g ⁻¹)	检出量 Found content (n/copies g ⁻¹)	回收率 Recovery (r/%)
<i>K. eburnea</i>	0	3.43 × 10 ⁵	3.41 × 10 ⁵ ± 4.67 × 10 ³	99.42 ± 1.36
	0	3.43 × 10 ⁶	3.44 × 10 ⁶ ± 1.13 × 10 ⁵	100.29 ± 3.29
	0	3.43 × 10 ⁷	3.48 × 10 ⁷ ± 5.96 × 10 ⁵	101.46 ± 1.74
	0	3.43 × 10 ⁸	3.45 × 10 ⁸ ± 8.91 × 10 ⁶	100.58 ± 2.60
	3.43 × 10 ⁶	3.43 × 10 ⁴	3.47 × 10 ⁴ ± 4.81 × 10 ²	99.88 ± 1.38
	3.43 × 10 ⁶	3.43 × 10 ⁵	3.77 × 10 ⁶ ± 1.06 × 10 ⁵	99.92 ± 1.55
	3.43 × 10 ⁶	3.43 × 10 ⁶	6.79 × 10 ⁶ ± 7.33 × 10 ⁴	98.98 ± 1.07
	3.43 × 10 ⁶	3.43 × 10 ⁷	3.79 × 10 ⁷ ± 5.97 × 10 ⁵	100.45 ± 1.58
<i>K. sanguinis</i>	0	3.89 × 10 ³	3.85 × 10 ³ ± 1.06 × 10 ²	98.97 ± 2.75
	0	3.89 × 10 ⁴	3.91 × 10 ⁴ ± 6.72 × 10 ²	100.51 ± 1.73
	0	3.89 × 10 ⁵	3.88 × 10 ⁵ ± 4.17 × 10 ³	99.74 ± 1.07
	0	3.89 × 10 ⁶	3.93 × 10 ⁶ ± 3.66 × 10 ⁴	101.03 ± 0.94
	3.89 × 10 ⁴	3.89 × 10 ³	4.29 × 10 ⁴ ± 5.83 × 10 ²	100.26 ± 1.36
	3.89 × 10 ⁴	3.89 × 10 ⁴	7.81 × 10 ⁴ ± 2.59 × 10 ³	100.39 ± 3.32
	3.89 × 10 ⁴	3.89 × 10 ⁵	4.27 × 10 ⁵ ± 5.18 × 10 ³	99.79 ± 1.21
	3.89 × 10 ⁴	3.89 × 10 ⁶	3.96 × 10 ⁶ ± 3.82 × 10 ⁴	100.79 ± 0.97

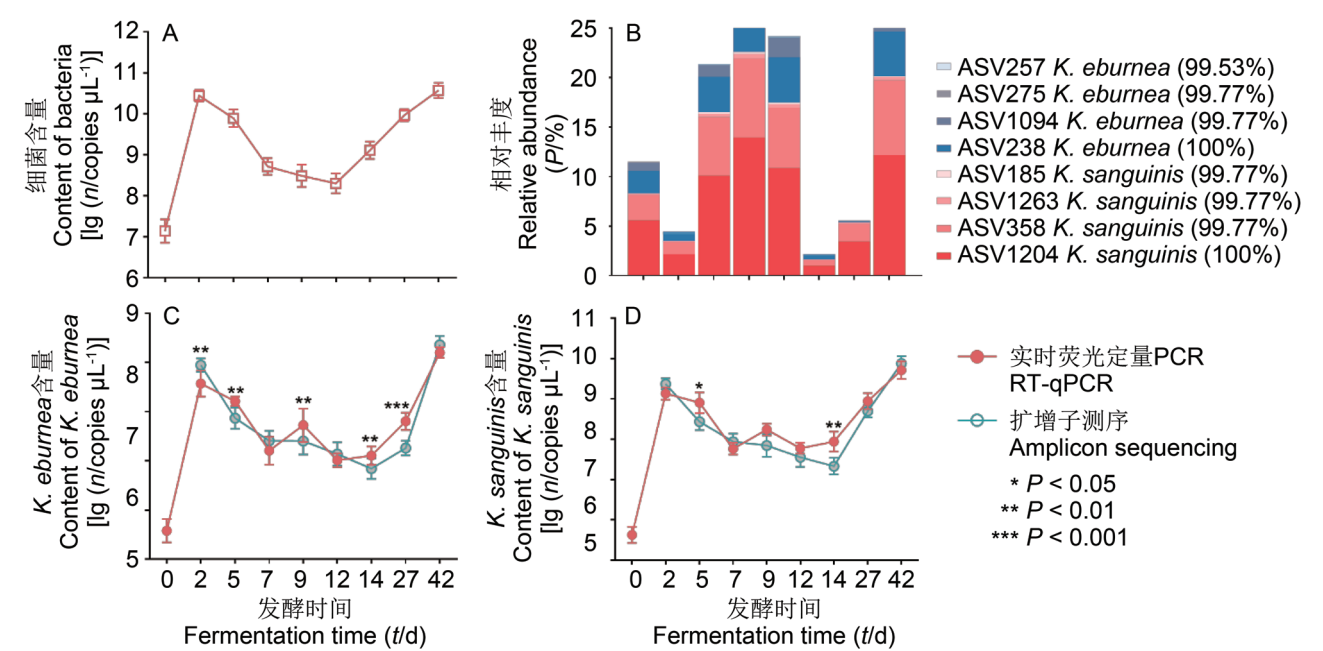


图4 高温大曲发酵过程细菌与克罗彭施泰特氏菌的动态变化. A: 总细菌含量变化; B: 克罗彭施泰特氏菌属不同ASV的相对丰度变化; C: *Kroppenstedtia eburnea*含量的变化; D: *K. sanguinis*含量的变化.
Fig. 4 Dynamics changes in bacteria and *Kroppenstedtia* of high-temperature *Daqu* during the fermentation process. A: Changes in the content of all bacteria; B: Changes in relative abundance of different ASVs in *Kroppenstedtia*; C: Changes in the content of *K. eburnea*; D: Changes in the content of *K. sanguinis*.

0.11 lg(copies/g)和 9.71 ± 0.22 lg(copies/g) (图4C和4D).

将细菌总含量乘以*K. eburnea*与*K. sanguinis*的相对丰度所估算出的这两种菌的含量与RT-qPCR测得的这两种菌的含量进行对比. 结果表明, 对于*K. eburnea*的定量, 两种方法的数值在第2、5、9、14、27天样品存在显著差异 (图4C), 而对于*K. sanguinis*的

定量, 两种方法的数值在第5、14天样品存在显著差异 (图4D). 这些存在显著差异样本的共同点为目标菌株的相对丰度较低 (< 5%), 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. 但当目标菌株的相对丰度较低时, 该方法计算的含量与RT-qPCR分析结果具有显著差异, 说明应用本研究的特异性引物KE-P-1与

KS-P-1适合用于大曲发酵全过程中*K. sanguinis*与*K. sanguinis*的准确定量,这和以往报道研究结果^[29]相似。

3 讨论

模板DNA序列的高保守性、强特异性是特异性引物设计的关键。*gyrB*基因即DNA促旋酶(*gyrase*)的B亚单位基因,属于信息通路中与DNA复制、限制、修饰或修复有关的蛋白编码基因,以单拷贝的形式存在。作为蛋白编码基因,其所固有的遗传密码子的兼并性使得DNA序列可以发生较多的变异而不改变氨基酸序列,这使得*gyrB*基因序列在区分和鉴定细菌近缘种方面比非蛋白编码基因16S rDNA有更高的分辨率,成为细菌快速检测与定量技术的靶基因^[30-31]。目前,已有许多基于*gyrB*基因进行细菌RT-qPCR的报道,Ruan等(2017)以*gyrB*基因为目标序列,设计了金黄色葡萄球菌的特异性检测与定量的方法,实现了饮用水和土壤中金黄色葡萄球菌的定量以及金黄色葡萄球菌感染病的快速鉴定^[32]; Mashoufi等(2019)基于*gyrB*基因序列设计特异性引物实现了对婴儿奶粉和食品中*Cronobacter sakazakii*的快速检测^[33]。本研究的结果也充分证明,采用基于*gyrB*基因设计的引物对*K. eburnea*与*K. sanguinis*的鉴定与定量具有很高的特异性和准确性。

RT-qPCR是基于荧光信号的累积在DNA扩增过程中对整个实验进程进行实时监测的一种技术,具有较高的灵敏度与特异性,且定量准确、快速简便,在微生物分析、食品科学研究、临床诊断等方面具有广泛的应用^[34]。基于RT-qPCR的检测方法的主要局限性在于无法区分样品中活细胞和死细胞的DNA,为了克服这个限制,近年来,叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)等光敏性核酸染料被引入到检测方法中以抑制来自死细胞DNA或膜受损细胞的胞外DNA的PCR扩增,进而与RT-qPCR相结合可以实现对样品中活性微生物的准确定量^[35]。而发酵产品的微生态环境往往具有复杂性和特异性,对于不同的样品和目标菌种,需要对PMA处理条件(PMA浓度、暗反应时间和光反应时间等)作出针对性的优化才能保证定量的准确性^[36]。要实现大曲中*K. eburnea*与*K.*

*sanguinis*活菌的定量还需要进一步对PMA处理条件进行探究。

单一菌种的荧光定量PCR(单重qPCR)并不能适用所有应用场景。当需要同时检测大曲中的*K. eburnea*与*K. sanguinis*时,单重qPCR耗时费力并且无法排除不同样品孔间的加样差异,重荧光定量PCR(多重qPCR)是更加合适的方法^[37]。多重qPCR技术可以同时使用多对引物对样品中多个目标基因进行检测。要实现多重qPCR中对*K. eburnea*与*K. sanguinis*的荧光信号进行区分,需要进一步针对KE-P-1与KS-P-1的扩增序列设计特异性探针。利用不同探针上标记的荧光基团,结合仪器对不同通道荧光的检测能力可实现同时对*K. eburnea*与*K. sanguinis*的实时检测。此外,对于仅需要检测克罗彭施泰特氏菌而不需要区分物种时也可以通过设计属水平的特异性引物来实现。

克罗彭施泰特氏菌不仅是大曲中的关键功能微生物,还广泛存在于多种传统酿造环境中,并且与这些发酵产品的风味与品质密切相关。Zhuansun等(2022)对浓香型酒醅的微生物群落动态变化、挥发性化合物积累、理化性质和酶活性的研究表明克罗彭施泰特氏菌同样是酒醅中的核心功能菌之一,其参与淀粉酶、脂肪酶以及酸类物质的代谢^[4]; Yao等(2022)通过对东北豆瓣酱微生物群落与代谢产物的相关性分析发现在豆瓣酱中的克罗彭施泰特氏菌与大多数游离氨基酸呈显著正相关^[5]。因此,对于这些酿造环境中的克罗彭施泰特氏菌进行定量分析同样有利于生产的监控与优化,然而不同的酿造环境的菌群结构不同,本研究所设计的引物是否在其他酿造环境中具有通用性,还需进一步验证。

4 结论

本研究基于*K. eburnea*与*K. sanguinis*的*gyrB*基因序列分别设计了特异性引物KE-P-1和KS-P-1,这两对引物特异性强,建立的RT-qPCR方法灵敏度高,检测范围广,为各类大曲中的*K. eburnea*与*K. sanguinis*的快速鉴定与定量提供了有效工具,有助于大曲生产过程的监测与优化以及成品曲质量的判别。同时本研究还为其他微生物引物设计提供了新的思路。

参考文献 [References]

- 1 Von Jan M, Riegger N, Potter G, Schumann P, Verborg S, Sproer C, Rohde M, Lauer B, Labeda DP, Klenk HP. *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family Thermoactinomycetaceae Matsuo et al. 2006 emend. Yassin et al. 2009 [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, 61: 2304-2310
- 2 Bell ME, Lasker BA, Klenk HP, Hoyle L, Sproer C, Schumann P, Brown JM. *Kroppenstedtia pulmonis* sp

- nov and *Kroppenstedtia sanguinis* sp nov., isolated from human patients [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, **109** (5): 603-610
- 3 Xia Y, Zhou W, Du YK, Wang Y, Zhu M, Zhao YJ, Wu ZY, Zhang WX. Difference of microbial community and gene composition with saccharification function between Chinese *Nongxiangxing Daqu* and *Jiangxiangxing Daqu* [J]. *J Sci Food Agric*, 2023, **103** (2): 637-647
- 4 Zhuansun WW, Xu J, Li ZQ, Liu HZ, Zhao Y, Chen LL, Shan SF, Zeng X, Xin BY, Qiao J, Zhang HY, Zeng HW, Xu QX. Dynamic changes in the microbial community, flavour components in *jiupe* of a novel Maotai-Luzhou-flavoured liquor under various *Daqu* blending modes and their correlation analysis [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, **172**: 114167
- 5 Yao D, Ma LX, Wu MN, Wang XY, Xu L, Yu QR, Wang CY. Effect of microbial communities on the quality characteristics of northeast soybean paste: correlation between microorganisms and metabolites [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, **164**: 113648
- 6 Mu Y, Huang J, Zhou RQ, Zhang SY, Qin H, Dong Y, Wang C, Wang XJ, Pan QL, Tang HF. Comprehensive analysis for the bioturbation effect of space mutation and biofortification on strong-flavor *Daqu* by high-throughput sequencing, volatile analysis and metabolomics [J]. *Food Chem*, 2023, **403**: 134440
- 7 Zhang YD, Shen Y, Cheng W, Wang X, Xue YS, Chen XX, Han BZ. Understanding the shifts of microbial community and metabolite profile from wheat to mature *Daqu* [J]. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 714726
- 8 Chen C, Yang HQ, Liu J, Luo HB, Zou W. Systematic review of actinomycetes in the Baijiu fermentation microbiome [J]. *Foods*, 2022, **11**(22): 3551
- 9 Huang Y, Li D, Mu Y, Zhu ZY, Wu YZ, Qi Q, Mu YC, Su W. Exploring the heterogeneity of community and function and correspondence of "species-enzymes" among three types of *Daqu* with different fermentation peak-temperature via high-throughput sequencing and metagenomics [J]. *Food Res Int*, 2024, **176**: 113805
- 10 ZHU Q, CHEN L Q, PENG Z, Zhang QL, Huang WQ, Yang F, Du GC, Zhang J, Wang, L. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor *Daqu* [J]. *Food Res Int*, 2023, **163**: 112184
- 11 吴成, 程平言, 谢丹, 黄魏, 范恩帝, 陆伦维, 胡峰. 酱香型白酒4轮次堆积发酵理化因子、风味物质与微生物群落相关性分析[J]. *食品科学*, 2023, **44** (2): 240-247 [Wu C, Cheng PY, Xie D, Huang W, Fan ED, Lu LW, Hu F. Correlation analysis among physicochemical parameters, flavor compounds and microbial community during fourth round of heap fermentation of Jiang-flavor Baijiu [J]. *Food Sci*, 2023, **44** (2): 240-247]
- 12 王珂佳, 邱树毅. 酱香型白酒酿造中放线菌多样性及功能研究概述[J]. *中国酿造*, 2019, **38** (8): 1-5 [Wang KJ, Qiu SY. Overview of the diversity and function of actinomycetes in the sauce-flavor Baijiu brewing process [J]. *China Brew*, 2019, **38** (8): 1-5]
- 13 Vandeputte D, Kathagen G, D'hoel K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, Ermeire SV, Falony G, Raes J. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load [J]. *Nature*, 2017, **551** (7681): 507-511
- 14 Stammler F, Glasner 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 [J]. *Microbiome*, 2016, **4**: 28
- 15 Bertolini E, Figas-Segura A, Alvarez B, Biosca EG. Development of TaqMan real-time PCR protocols for simultaneous detection and quantification of the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* and their specific lytic bacteriophages [J]. *Viruses-Basel*, 2023, **15**(4): 841
- 16 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) [J]. *ACS Infect Dis*, 2020, **6** (9): 2513-2523
- 17 Cheng C, Li S, Liu Y, Wang R, Ding W, Zhang Y. RT-qPCR detection and quantitative analysis of *Ralstonia solanacearum* in soil [J]. *Tob Sci Technol*, 2017, **50** (1): 12-16
- 18 何宏魁, 袁木, 蔡照润, 曹润洁, 李安军, 张治洲. 甲烷囊菌属特异性引物的设计及其在古井贡酒窖泥质量评价中的初步应用[J]. *中国酿造*, 2019, **38** (3): 154-159 [He HK, Yuan M, Cai ZR, Cao RJ, Li AJ, Zhang ZZ. Design of *Methanoculleus*-specific primers and preliminary application in pit mud quality assessment of Gujingong liquor [J]. *China Brew*, 2019, **38** (3): 154-159]
- 19 孙佳, 陆震鸣, 张晓娟, 柴丽娟, 史劲松, 许正宏. 实时荧光定量PCR检测金山醋酸乳杆菌的方法与应用[J]. *微生物学报*, 2021, **61** (10): 3211-3221 [Sun J, Lu ZM, Zhang XJ, Chai LJ, Shi JS, Xu ZH. Establishment and application of real-time fluorescence quantitative PCR for detection of *Acetilactobacillus jinshanensis* [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2021, **61**(10): 3211-3221]
- 20 Chen CJ, Wu Y, Li JW, Wang X, Zeng ZH, Xu J, Liu YL, Feng JT, Chen H, He Yh, Xia R. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Mol Plant*, 2023, **16** (11): 1733-1742
- 21 Sheu SJ, Chen HC, Lin CK, Lin WH, Chiang YC, Hwang WZ, Tsen Hy. Development and application of *tuf* gene-based PCR and PCR-DGGE methods for the detection of 16 *Bifidobacterium* species [J]. *J Food Drug Anal*, 2013, **21**(2): 177-183
- 22 Yang XQ, Cui JC, Zeng SX, Cheng L, Zhang KB, Hu

- XH, Bao, YJ. Development of real-time fluorescent quantitative PCR detection method for *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in fermented soybean meal [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2021, **33** (1): 494-505
- 23 Kim A, Jang M, Lim HJ, Kim CY, Song JY, Cho My. A peptide nucleic acid probe-based multiplex qPCR assay for rapid and accurate detection and quantification of fish-pathogenic *Edwardsiella* species [J]. *Aquaculture*, 2024, **579**: 740157
- 24 Tanno H, Chatel JM, Martin R, Mariat D, Sakamoto M, Yamazaki M, Salminen S, Gueimonde M, Endo A. New gene markers for classification and quantification of *Faecalibacterium* spp. in the human gut [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2023, **99** (5): fiad035
- 25 朱诗应, 何胜菲, 王文博, 赵平, 任浩, 戚中田. *rpoB*作为蜡样芽胞杆菌群快速检测的标志基因的实验研究[J]. 热带医学杂志, 2012, **12** (10): 1171-1174 [Zhu SY, He SF, Wang WB, Zhao P, Ren H, Qi ZT. Using real-time quantitative PCR for the detection of *rpoB* gene of *Bacillus cereus* group [J]. *J Trop Med*, 2012, **12** (10): 1171-1174]
- 26 Flanders AJ, Speer B, Reavill DR, Roberts JF, Childress AL, Atlas A, Wellehan J Fx. Development and validation of two probe-hybridization quantitative PCR assays for rapid detection of a pathogenic *Coxiella* species in captive psittacines [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2020, **32**(3): 423-428
- 27 Garcia-Laviña CX, Castro-Sowinski S, Ramón A. Reference genes for real-time RT-PCR expression studies in an Antarctic *Pseudomonas* exposed to different temperature conditions [J]. *Extremophiles*, 2019, **23** (5): 625-633
- 28 Wang S, Wang P, Liu J, Yang, C. X, Li TM, Yang JX, Gu L, Wei M. Molecular detection *Nocardia*: development and application of a real-time PCR assay in sputum and bronchoalveolar lavage fluid samples [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2023, **42** (7): 865-872.
- 29 Boshier FAT, 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 [J]. *Msystems*, 2020, **5** (2): e00777-19
- 30 Watanabe K, Nelson JS, Harayama S, Kasai H. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29** (1): 344-345
- 31 安然, 易图永, 肖启明, 邓子牛. *gyrB*基因在细菌分类和检测中的应用[J]. 江西农业学报, 2010, **22** (4): 18-20 [An R, Yi TY, Xiao QM, Deng ZN. Application of *gyrB* gene in bacterial classification and detection [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2010, **22** (4): 18-20]
- 32 Ruan JH, Wang WJ, Zhang TY, Bai QY, Zheng T, Zhang ZD, Wu LY, Huang YF, Yu DJ. Rapid detection of *Serratia fonticola* by TaqMan quantitative real-time PCR using primers targeting the *gyrB* gene [J]. *Curr Microbiol*, 2017, **74** (11): 1343-1348
- 33 Mashoufi A, Ghazvini K, Hashemi M, Mobarhan MG, Vakili V, Afshari A. A novel primer targeted *gyrB* gene for the identification of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formulas (PIF) and baby foods in Iran [J]. *J Food Saf*, 2019, **39** (2): e12609
- 34 李柯帆, 王枫, 丁雯, 李晓兰, 杜晨晖, 闫艳, 裴香萍. 荧光定量PCR在药用植物基因表达及鉴别中的应用[J]. 世界中医药, 2022, **17** (21): 3101-3106 [Li KF, Wang F, Ding W, Li XL, Du CH, Yan Y, Pei XP. Application of quantitative real-time PCR in gene expression and identification of medicinal plants [J]. *World Chin Med*, 2022, **17** (21): 3101-3106]
- 35 Wagner AO, Malin C, Knapp BA, Illmer P. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (8): 2537-2539
- 36 陈卓君, 魏铭, 林果, 陈昱琦, 梁杉, 张柏林, 朱保庆. PMA-qPCR技术在发酵食品活菌计数中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2019, **45** (12): 242-248 [Chen ZJ, Wei M, Lin G, Chen YQ, Liang S, Zhang BL, Zhu BQ. Application of PMA-qPCR in enumerating living microbes in fermented foods [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, **45** (12): 242-248]
- 37 肖分雪. 牛产气荚膜梭菌和多杀性巴氏杆菌双重荧光定量PCR方法的建立与应用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023 [Xiao FX. Establishment and application of double fluorescence quantitative PCR method for detection of *Clostridium perfringens* and *Pasteurella multocida* in bovis [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023]