微板核酸杂交检测芽孢杆菌属的方法建立

刘 婷， 冯守帅， 辛 瑜， 王 武， 杨海麟*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：以白酒发酵过程中的优势菌枯草芽孢杆菌为模式菌株，针对具有高保守性及特异性的16S rRNA设计一组核酸探针，建立了对芽孢杆菌属进行定性和定量分析的新型的微板核酸杂交检测方法，优化了关键检测条件。结果表明，当S1酶反应温度为42 ℃时，芽孢杆菌属检测探针能分开目标序列仅差一个碱基的近缘属。当捕获探针和信号探针工作浓度均为5 nmol/L，与分析探针杂交温度都为50 ℃，杂交时间分别为60 min和15 min时，检测信号的强弱与细菌数呈良好的线性关系，能实现定量检测，灵敏度高达 1.33×10^2 cells/mL。本方法提供了一个快速定性定量的检测技术，具有很好的应用于白酒发酵过程中芽孢杆菌属实时监测的潜力。

关键词：微板核酸杂交技术；芽孢杆菌属；16S rRNA；定性；定量
中图分类号：Q 815　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)02—0175—08

Development of A Novel Microplate Sandwich Hybridization Assay for Detection of *Bacillus*

LIU Ting, *FENG Shoushuai*, *XIN Yu*, *WANG Wu*, *YANG Hailin**
(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to detect bacteria from the complex ecological environment for liquor-making, we developed a novel and efficient assay for identification and quantification of bacteria. We selected Bacillus to be experimental bacterium. Three oligonucleotide probes targeted 16S rRNA of Bacillus were respectively designed. Then the assay based on microplate sandwich hybridization assay with the aid of S1 nuclease treatment (S1-MSH) was developed. Meanwhile, several key operating conditions were respectively optimized. The results showed that the probes targeted *Bacillus* showed high accuracy for distinguishing homologous species such as *Staphylococcus*, *Acetobacter* and *Pseudomonas*. Besides, the assay could distinguish homologous species with the exclusion of even only one base difference when the reaction temperature of nuclease S1 was 42 ℃. When the concentrations of capture probe and signal probe were 5 nmol/L, the hybridization time were respectively 60 min and 15 min, and hybridization temperatures were 50 ℃, the color intensity was positively linear related to the cellular number, and the detection limit was low to 1.33×10^2 cells/mL. Therefore, this assay method could be applied for identifying and monitoring *Bacillus* during liquor

收稿日期：2014-01-03
基金项目：国家863计划项目(2012AA021302)。
* **通信作者**：杨海麟(1971—)，男，江苏无锡人，工学博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事生物发酵优化及蛋白质分离纯化方面的研究。
E-mail：19891996@sina.com；bioprocessor@aliyun.com

fermentation,and the research offers an efficient method for rapid identification and quantification of microbiology in the liquor fermentation process.

Keywords: S1-MSH,*Bacillus*,16S rRNA,identification,quantification

白酒是世界六大蒸馏酒之一,历史悠久。白酒酿造是多种微生物代谢的过程，多个研究表明,芽孢杆菌属是其中的重要菌种。芽孢杆菌属细菌为需氧或兼性厌氧型，具有水解蛋白质和淀粉的能力,是白酒发酵中的优势菌种[1-2]。另外,芽孢杆菌是白酒发酵中重要的产酯生香菌种,对于白酒独特风味形成有重要的贡献[3-4]。综上,研究芽孢杆菌属在白酒发酵过程中的数量变化规律对白酒生产有指导意义。当前对白酒发酵中微生物进行定性定量分析的方法主要有 PCR 技术、变性梯度电泳和 DNA 序列同源性分析等，这些方法大多需要复杂的 DNA 提取及纯化步骤,耗时耗力,若要准确定性则要进行测序[5-8]。

为实现芽孢杆菌属的快速定性定量的检测,作者利用 S1 酶特异性酶切单链核酸链和不匹配的双链的特性,结合改进的微板核酸杂交方法[9-11],针对芽孢杆菌属建立了一种高灵敏度,特异性强的微板核酸杂交方法（Microplate sandwich hybridization assay with the aid of S1 nuclease,S1-MSH），其原理见图 1。

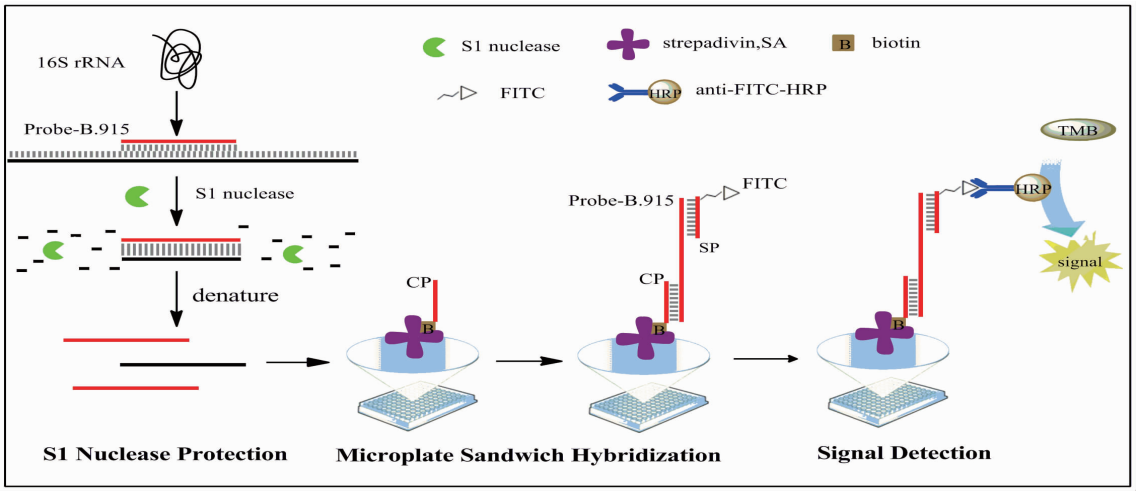


图 1　微板核酸杂交技术的原理

Fig. 1　Schematic of S1-MSH based 16S rRNA

细菌的 16S rRNA 序列高度保守（可用于定性检测）、拷贝数众多且相对稳定(可用于定量检测),因此可针对目标菌该段序列中高度特异性区域设计探针,经过信号转移和放大实现对样品中细菌的定性定量分析[12-13]。本方法设计一组探针,包括与特异性 16S rRNA 片段互补的定性分析探针(analysis probe,AP;Probe-B.915),与分析探针的两端分别互补的捕获探针(CP)及信号探针(SP)。细胞破壁释放出 16S rRNA,分析探针 Probe-B.915 与裂解液中的 rRNA 分子杂交后形成 DNA/RNA 杂合体;结合核酸 S1 酶的保护机制,消化掉单链的 DNA 或 RNA 分子以及 DNA/RNA 杂合体的不匹配部分，留下与目标 rRNA 分子数量相等的 DNA/RNA 杂合体[14];经变性处理后，保留下来的分析探针从杂合体中释放出来,与预先固定在微孔板上的捕获探针杂交,加入荧光素标记的信号探针与其杂交，形成杂交复合体。用辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体与上述杂交复合体反应，加入 TMB 通过显色反应读出检测信号，根据信号的强弱可确定 rRNA 的种类和数量,从而实现对样品中细菌的定性定量分析。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

枯草芽孢杆菌（*B.subtilis*）、恶臭假单胞菌(*P.*

putida)和巴氏醋杆菌(*A.pasteurianus*):由作者所在实验室分离保存;金黄色葡萄球菌(*S.aureus*):由江南大学微生物资源平台提供。

S1 Nuclease:购于宝生物工程(大连)有限公司;辣根过氧化物酶标记的荧光素抗体(Anti-FITC-HRP):购自美国 Southern Blotech 公司;链酶亲和素:购于北京博奥森生物公司;牛血清白蛋白(BSA)、TMB(3,3′,5,5′-四甲基联苯胺盐酸盐二水)和 DEPC:购于上海生工生物工程公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 Bacillus 属的检测探针设计 细菌的检测需要一组由 3 条寡核苷酸链组成的探针:S1 酶保护分析探针、捕获探针和信号探针,探针间关系见图 1。具体方法:用 DNAMAN 软件分析 *Bacillus* 属所有种的 16S rRNA 序列,找出 *Bacillus* 属 16S rRNA 序列的保守片段。将上述片段(大于 60 bp)进行 Blastn 分析,找出目标菌 16S rRNA 序列与其他菌(不同属)差别大的区域(16S rRNA 中 915-975 区域为属特异序列),并在该区域设计分析探针(Probe-B.915)。将上述分析探针 Probe-B.915 再次进行 Blastn 分析,确保获得的探针具有生物信息学特异性。根据 Probe-B.915 序列设计相应的捕获探针和信号探针,设计结果送上海生工合成。

1.2.2 微板核酸杂交检测技术

1)捕获探针的固定:向微孔板中加入 100 μL 含有 5 μg/mL 链酶亲和素的包被液(15 mmol/L Na_2CO_3,35 mmol/L $NaHCO_3$,pH 9.6),4 ℃过夜后,用 PBST(含 0.5% Tween 20 的 0.01 mol/L PBS)洗涤。加入含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2),37 ℃封闭 30 min,PBST 洗涤。向上述微孔板中加入 100 μL、5 nmol/L 捕获探针,缓冲液为 PBS(0.01 mol/L,pH 7.2),37 ℃静置 2 h。用 PBST 洗涤后用于微板核酸杂交。

2)细菌培养与裂解:挑取 *B.subtilis* 单菌落于 LB 培养基,37 ℃培养至对数期。取 20 mL 菌液,10 000 r/min 离心 10 min,去上清液,将菌体溶于 20 mL 裂解液中(80%甲酰胺,450 mmol/L NaCl,5 mmol/L Na_2EDTA,1% SDS,pH 6.4),在 50%占空比、250 W 条件下超声破碎细胞 10 min 后,用于探针杂交[15]。取 27 μL 细菌裂解液和 3 μL 的分析探针 Probe-B.915(500 nmol/L)于 2 mL 离心管中,加入30 μL 石蜡油,95 ℃处理 15 min 后,32.4 ℃杂交1 h。

3)S1 酶保护分析:向上述混合体系中加入 30 μL 含有 60 U S1 核酸酶的缓冲液(1 mmol/L $ZnSO_4$,30 mmol/L CH_3COONa,280 mmol/L NaCl,pH 4.5),37 ℃反应 1 h。加入 150 μL 终止缓冲液(62.5 mmol/L NaOH,30 mmol/L Na_2EDTA,350 mmol/L Na_2HPO_4,150 mmol/L NaH_2PO_4,pH 7.2),95 ℃处理 15 min,冷却后用于微板核酸杂交。

4)微板核酸杂交:取上述反应液 100 μL 加入到固定有捕获探针的微孔板中,在恒温振荡反应器中杂交 1 h(51 ℃、600 r/min),PBST 洗涤;每孔加入含有 100 μL、5 nmol/L 的信号探针(缓冲液 18% 20×SSC,10%甲酰胺,0.02% SDS,pH 7.2),50.7 ℃、600 r/min 杂交 30 min,PBST 洗涤;每孔加入 100 μL HRP-抗体(用 0.1%BSA 按 1:8 000 比例稀释),37 ℃反应 30 min,PBST 洗涤;每孔加入 100 μL TMB 显色液(1%TMB,100 mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液,0.1% H_2O_2,pH 5.0),37 ℃处理 15 min;每孔加入 50 μL、2 mol/L 硫酸终止反应[16-17]。在 450 nm 和 630 nm 用双波长检验法测定光吸收值(ST-384 酶标仪,北京九宇鑫泰生物技术有限公司),得到 OD_{450}/OD_{630}。

1.2.3 检测技术中相关影响因素分析及优化 设计 8 个不同的探针浓度(0.01~100 nmol/L)、9 个不同杂交温度(30~70 ℃)和 8 个不同杂交时间(5~180 min),按上述方法进行实验,分析不同条件对检测结果的影响。

1.2.4 S1 酶酶切温度及探针特异性验证试验 培养枯草芽孢杆菌、恶臭假单胞菌、巴氏醋杆菌和金黄色葡萄球菌至对数期,按 1.2.2 所述方法收集和处理以上细菌样品后加入芽孢杆菌属的探针,进行探针的特异性验证实验,并研究不同 S1 酶酶切温度(32、37、42 ℃)对探针特异性的影响。

1.2.5 检测曲线的建立 收集 *B.subtilis* 进行裂解,用裂解液 2 倍逐级稀释,共获得 12 个样品。用优化后的微板核酸杂交技术进行分析,获得吸光值 OD_{450}/OD_{630} 对细菌数量的分析曲线(稀释曲线)。

1.2.6 微孔核酸杂交技术的定量检测实验 纯菌的定量检测:将不同浓度的枯草芽孢杆菌(共 5 个样品)分别用微板核酸杂交技术和血球板显微计数两种方法进行定量效果的比较。

混菌中芽孢杆菌的定量检测:分别用血球板显

微计数方法对 *B.subtilis*、*P.putida*、*A.pasteurianus* 和 *S.aureus* 计数，将已计数的 *B.subtilis* 裂解液 5 倍逐级稀释，得到 4 个浓度梯度，分别加入到含有 *P.putida*、*A.pasteurianus* 和 *S.aureus* 的混菌体系中，用微板核酸杂交技术对芽孢杆菌进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 芽孢杆菌属的探针设计

针对芽孢杆菌属设计特异性分析探针（Probe-B.915），长约 60 nt，GC 含量 40%~60%，不含明显的二级结构，没有大于 4 个单一碱基的连续出现，该序列与芽孢杆菌属特异 rRNA 片段互补；捕获探针长约 25 nt，5’端标记有生物素（Biotin），与 Probe-B.915 的 3’末端互补；信号探针长约 25 nt，与 Probe-B.915 的 5’端的互补。用 Oligo 分析软件评估探针的参数，设计的探针参数基本一致。Probe-B.915 等探针的序列及参数见表 1[18]。

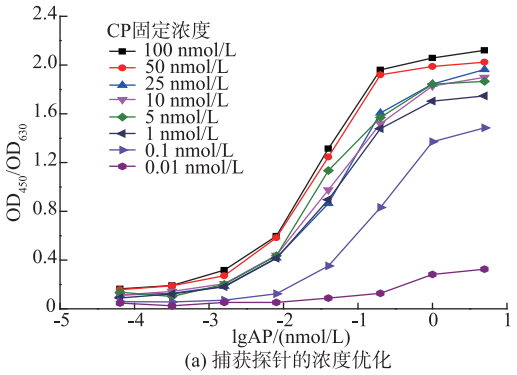
表 1 芽孢杆菌属的检测探针序列

Table 1 Sequences of detection probes for *Bacillus*

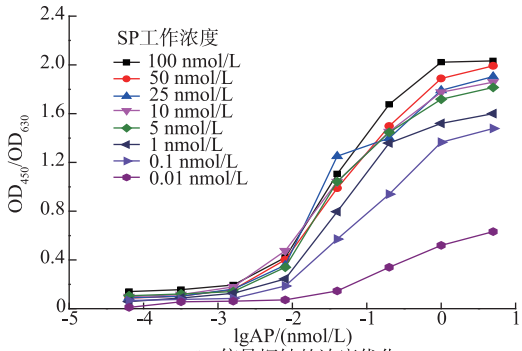
探针名称	序列（5’-3’）	GC%	长度
Probe-B.915	5’-AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGT-3’	57.4%	61 nt
捕获探针	Biotin-5’-ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG-3’	54.2%	24 nt
信号探针	5’-GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT-3’-FITC	53.8%	26 nt

2.2 捕获探针及信号探针工作浓度对检测信号的影响

图 2 表明，将不同浓度的捕获探针固定在微孔板上，来检测逐级稀释的分析探针（AP:Probe-B.915），发现检测信号随着捕获浓度的增大而增强；当捕获探针浓度在 5~25 nmol/L 时，检测曲线基本相同；当浓度降低到 0.1 nmol/L 和 0.01 nmol/L 时，检测信号大幅降低；当捕获探针浓度增加到 50 nmol/L 及 100 nmol/L 时，检测信号稍有提高，但总体差异不大（图 2a）。类似地，当不同浓度的信号探针用来检测逐级稀释的分析探针时，发现检测信号随信号探针浓度的增大而增强；当信号探针浓度在 5~25 nmol/L 时，检测曲线基本相同；浓度低于 1 nmol/L 时，检测信号明显降低；当信号探针浓度增加到 50 nmol/L 和 100 nmol/L 时，检测信号稍有提高（图 2b）。综合考虑，选用 5 nmol/L 作为捕获探针及信号探针的工作浓度。



(a) 捕获探针的浓度优化



(b) 信号探针的浓度优化

图 2 探针的工作浓度对检测信号的影响

Fig. 2 Effects of probes concentrations on MSH

2.3 微板核酸杂交过程中杂交温度对检测信号的影响

分子杂交的过程，实质上是 DNA 的复性过程。合适的杂交温度是核酸分子杂交成功的关键因素之一。杂交温度可通过经验公式[19-20]：

T_m=81.5+16.6×lg$M$+0.41×(G+C)%-500/n-0.61×(甲酰胺%)。

其中 M 为 Na^+浓度，n 为探针的复杂性（没有重复序列时，即为探针的长度，单位为 mer）。

DNA 与 DNA 间的执行杂交温度一般比 T_m 值低 25 ℃。根据上述公式计算得到分析探针与捕获探针杂交温度为 51 ℃，分析探针与信号探针间杂交温度为 50.7 ℃。因此，选择以下 9 个温度进行优化研究，结果见图 3。

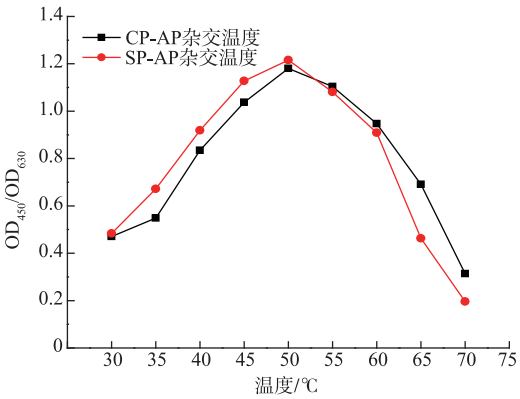


图 3　杂交温度对检测信号的影响

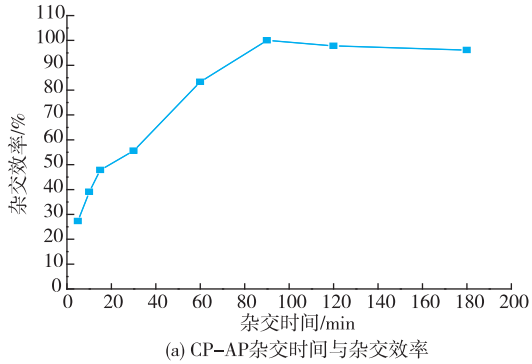
Fig. 3　Effects of hybridization temperature on MSH

结果表明，50 ℃时，分析探针与捕获探针的杂交信号值最高，45 ℃和 55 ℃的信号值均有所降低，其中 55 ℃与 50 ℃相差不大；而分析探针与信号探针的杂交在 50 ℃获得最高检测信号，45 ℃和 50 ℃时结果相差不大，在 55 ℃时明显下降。上述实验结果与理论值相吻合，选择 50 ℃作为分析探针分别与捕获探针和信号探针两步杂交的温度。

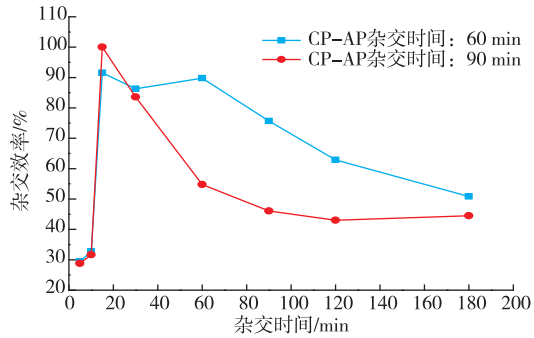
2.4　微板核酸杂交过程中杂交时间与杂交效率的关系

对杂交效率的评估选择的分析探针浓度为 5 pmol/L，这样分析可突出时间对杂交效率的影响，获得的参数适合分析低浓度细菌。

图 4 表明，当其他条件固定不变时，分析探针与捕获探针（CP–AP）的杂交效率在反应时间为 90 min 时最高（定义此时获得的杂交效率为 100%）。杂交时间少于 90 min 时，杂交效率随着时间的延长而增大，趋势明显；随着时间的继续延长，超过 90 min 时，杂交效率反而下降，在 120 min 和 180 min 时的信号分别为 97.79 %和 96.09 %（图 4a）。



(a) CP–AP杂交时间与杂交效率



(b) SP–AP杂交时间与杂交效率

图 4　探针间杂交时间对杂交效率的影响

Fig. 4　Effects of hybridization time on MSH

研究分析探针与信号探针（SP–AP）杂交时间对杂交效率的影响时，CP–AP 的杂交时间设置为 60 min 和 90 min（图 4b）。结果表明，当 CP–AP 杂交时间为 90 min，SP–AP 杂交时间为 15 min 时，获得的信号检测值最高，将此时的杂交效率定为 100 %。当 CP–AP 杂交时间为 60 min 时，SP–AP 杂交时间在 15 min 时，获得最高的检测信号。两组实验结果相近，在 15 min 之前，杂交效率随着杂交时间的延长而增强，15 min 后，随着时间的延长，探针杂交效率反而降低，且第一组下降趋势更剧烈。原因可能是杂交时间太长引起 DNA 探针的降解，导致检测信号降低。考虑到分析速度和杂交效率，作者确定分析探针与捕获探针和信号探针的两步杂交时间分别为 60 min 和 15 min。

2.5　探针检测特异性验证

获得种属特异的探针序列和找到实现探针的特异性所需的条件是对所有细菌定性鉴定的前提。选择白酒发酵中已鉴定的醋杆菌属、葡萄球菌属及假单胞菌属进行芽孢杆菌属检测探针的特异性验证实验[21–22]。将 S1 酶酶切温度设置成 32、37、42 ℃，用芽孢杆菌属检测探针分别在上述温度下处理枯草芽孢杆菌（*B.subtilis*），恶臭假单胞菌（*P.putida*），巴氏醋杆菌（*A.pasteurianus*）和金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）。结果表明，在这三个温度下，Probe–B.915 能分辨 *B.subtilis* 与 *P.putida* 和 *A.pasteurianus*，但只有当酶切为 42 ℃时，才能够很好地分辨 *B.subtilis* 和 *S.aureus*，见图 5。Blastn 分析发现，*S.aureus* 的 16S rRNA 在与 Probe–B.915 相匹配区域与芽孢杆菌属保守序列只有 1 个碱基不同，见表 2。综上，选择的 Sl 酶作用温度为 42 ℃。

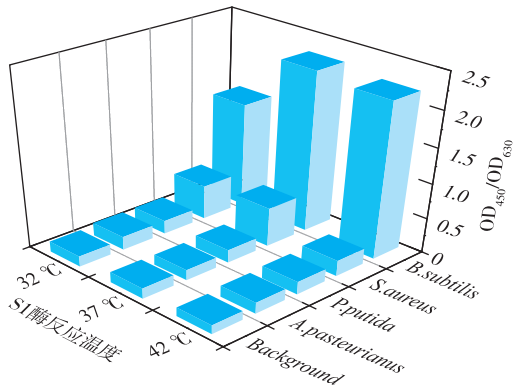


图 5　S1 酶酶切温度对 *Bacillus* 属检测探针的特异性的影响

Fig. 5　Effects of temperature of S1 nuclease on specificity of probe–B.915

表 2　Probe–B.915 及各菌种 16S rRNA 目标片段序列

Table 2　Sequences of probe–B.915 blasted with the target 16S rRNA region of homologous species

菌种	Probe–B.915 结合片段序列
A.pasteurianus	TAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT
P.putida	CAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTT
S.aureus	ATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
B.subtilis	ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
Probe–B.915	TGGTCTTTCGGTGCCGATTGATGCACGGTCGT CGGCGCCATTATGCATCCACCGTTCGCAA

2.6　检测曲线的建立

对白酒发酵中的细菌进行定量检测的前提是获得相应的标准曲线。根据 1.2.5 方法得到如图 6 所示的稀释曲线。该曲线的线性范围为 1.328×10^2~2.125×10^5 个/mL。线性方程为 y=–0.127 38+0.255 33x，R^2=0.997 41，其中 x 代表每毫升样品中含有的芽孢杆菌属细菌数的对数；y 代表 OD_{450}/OD_{630}。

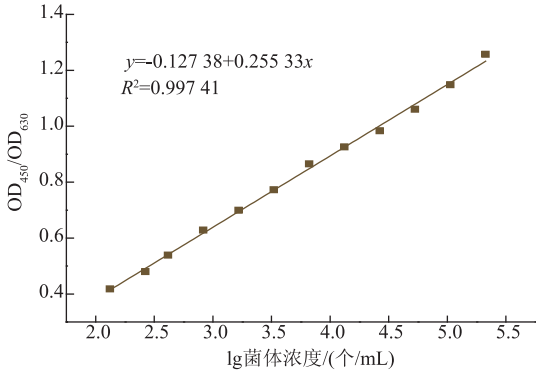


图 6　芽孢杆菌逐级稀释所得的检测标准曲线

Fig. 6　Standard curve of *Bacillus* by S1–MSH

2.7　微板核酸杂交技术的定量检测

用显微计数及微板核酸杂交技术对纯菌（*B. subtilis*）进行定量检测的结果见图 7。结果表明，微板核酸杂交技术对低浓度菌液（10^2 个/mL）和高浓度菌液（10^7 个/mL）均有较好的定量效果，与显微计数无明显差距，可以用于纯菌的定量分析。

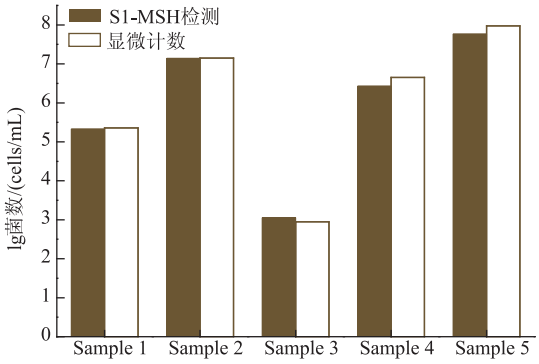


图 7　S1–MSH 法与显微计数对纯菌 *B. subtilis* 的定量效果比较

Fig. 7　Quantification of *B. subtilis* by S1 –MSH and microscopic counting

分别用上述两种方法对混菌中芽孢杆菌进行定量检测，结果见图 8。结果表明，用微板核酸杂交检测技术对混菌体系中 *B. subtilis* 的定量结果与显微计数结果相吻合，且均适用于低浓度及高浓度菌液。该探针及方法可以用于混菌体系中芽孢杆菌属的定性定量检测。

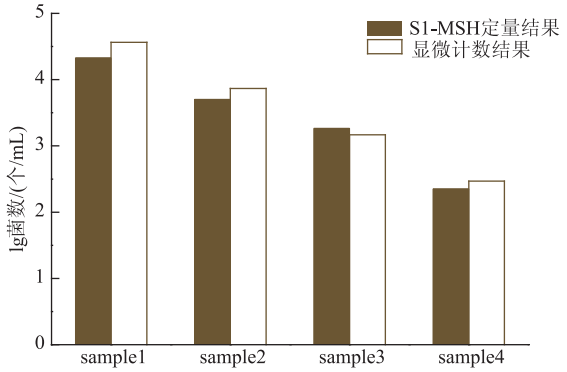


图 8　S1–MSH 法与显微计数法对混菌中 *B. subtilis* 的定量效果比较

Fig. 8　Quantification of *B. subtilis* in mixed bacteria system by S1–MSH and microscopic counting

3　结　语

作者利用 S1 酶能够保护完全匹配的双链核酸

的性质,将目标菌的 rRNA 转化为等量的互补 DNA 探针,通过微板核酸杂交方法将保留下来的 DNA 探针通过酶促显色反应转化为检测信号。本技术既解决了 RNA 不稳定易于降解的难题,又保留了特异性结合的探针,尤其是对杂交温度的研究保证了探针特异性的实现,使得本技术在一定条件下,能够准确分辨探针靶区存在的 1 个及其以上碱基差异的近缘属。同时,该方法耗时短,定量效果好,检测灵敏度达到 1.33×10^2 个/mL,且能实现混菌中特定菌属的检测。综上,只要能够设计出合适的探针,本技术有望广泛应用于细菌检测领域,特别是白酒微生物的定性定量分析方面。

参考文献:

[1] 周瑞平,陈云宗,唐代云. 多粮浓香型白酒厂内细菌多样性及分布的研究[J]. 食品科学,2010,31(13):209-213.
ZHOU Ruiping,CHEN Yunzong,TANG Daiyun. Diversity and distribution of bacteria in Luzhou-flavor wine factory [J]. **Food Science**,2010,31(13):209-213.(in Chinese)

[2] 乔宗伟,张文学,张丽莺,等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J]. 酿酒,2005,32(1):18-22.
QIAO Zongwei,ZHANG Wenxue,ZHANG Liying,et al. Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation[J]. **Liquor Making**,2005,32(1):18-22. (in Chinese)

[3] 施小明,徐岩,崔凤元,等. 枯草芽孢杆菌在白酒生产中的应用[J]. 酿酒科技,2012(2):49-53.
SHI Xiaoming,XU Yan,CUI Fengyuan,et al. Study on application of *B.subtilis* in the production of liquor [J]. **Liquor-Making Science & Technology**,2012(2):49-53. (in Chinese)

[4] 曾婷婷,吴生文. 芽孢杆菌对特香型白酒风味风格的影响研究[J]. 酿酒科技,2012(7):32-34.
ZENG Tingting,WU Shengwen. Study on the effects of *Bacillus* addition on the flavor of site-flavor liquor [J]. **Liquor-Making Science & Technology**,2012(7):32-34. (in Chinese)

[5] 赵文静,李研,高鹏飞,等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(4):433-437.
ZHAO Wenjing,LI Yan,GAO Pengfei,et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(4):433-437. (in Chinese)

[6] Phister T G,mol/Lills D A. Real-time PCR assay for detection and enumeration of Dekkera bruxellensis in wine[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2003,69(12):7430-7434.

[7] Sohier D,Lonvaud-Funel A. Rapid and sensitive in situ hybridization method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine[J]. **Food Microbiology**,1998,15(4):391-397.

[8] Malacrino P,Zapparoli G,Torriani S,et al. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry[J]. **Journal of Microbiological Methods**,2001,45(2):127-134.

[9] Gabig-Ciminska M,Holmgren A,Andresen H,et al. Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2004,19(6):537-546.

[10] John V Tyrrell,Laurie B Connell,Chris A Scholin. Monitoring for *Heterosigma akashiwo* using a sandwich hybridization assay[J]. **Harmful Algae**,2002,1(2):205-214.

[11] Seung Min Yoo,Taejoon Kang,Bongsoo Kim,et al. Detection of single nucleotide polymorphisms by a gold nanowire-on-film SERS sensor coupled with S1 nuclease treatment[J]. **Chem Eur J**,2011,17(31):8657-8662.

[12] Daniel Hm,Meyer W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts[J]. **International Journal of Food microbiology**,2003,86(1-2):61-78.

[13] 杨玲玲,职晓阳,李文均. 拟诺卡氏菌 16SrRNA,*gyrB*,*sod* 和 *rpoB* 基因的系统发育分析[J]. 微生物学报,2007,47(6):951-955.
YANG Lingling,ZHI Xiaoyang,LI Wenjun. Phylogenetic analysis of Nocardiopsis species based on 16S rRNA,*gyrB*,*sod* and *rpoB* gene sequences[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2007,47(6):951-955.(in Chinese)

[14] Wiegand R C,Godson G N,Radding C M. Specificity of the S1 nuclease from *Aspergillus oryzae* [J]. **The Journal of Biolocical Chemistry**,1975,250(22):8848-8855.

[15] Gabig-Ciminska m, LiuYanling, Enfors S. Gene-based identification of bacterial colonies with an electric chip [J]. **Analytical Biochemistry**, 2005, 345(2): 270-276.

[16] 李红梅, 陈佳, 徐斐, 等. ELISA 测定中 TMB 显色体系的优化及其稳定性研究[J]. 生物技术通报, 2010(2): 126-130.
LI Hongmei, CHEN Jia, XU Fei, et al. Optimization of TMB substrate chromogenic system in ELISA and the study of its stability in storage[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2010(2): 126-130.(in Chinese)

[17] Frey A, meckelein B, Extemest D, et al. A stable and highly sensitive 3,3′,5,5′- tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays[J]. **Journal of Immunological Methods**, 2000, 233(1-2): 47-56.

[18] 蔡正求, 宋未, 东秀珠. 细菌种特异性的 16SrDNA 寡核苷酸探针数据库的初步构建[J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2004, 24(S1): 110-115.
CAI Zhengqiu, SONG Wei, DONG Xiuzhu. Database construction of the species-specific oligonucleotide probes targeted for16S rDNA of bacteria[J]. **Journal of Capital Normal University: Natural Sciences Edition**, 2004, 24(S1): 110-115.(in Chinese)

[19] Brodie E L, Desantis T Z, Joyner D C. Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(9): 6288-6298.

[20] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 256-262.

[21] 岳元媛, 张文学, 刘霞, 等. 浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 251-255.
YUE Wenyuan, ZHANG Wenxue, LIU Xia, et al. Isolation and identification of facultative anaerobes in the pit mud of Chinese Luzhou-flavor Liquor[J]. **Microbiology**, 2007, 34(2): 251-255.(in Chinese)

[22] 张文学, 乔宗伟, 胡承, 等. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2005, 37(5): 82-87.
ZHANG Wenxue, QIAO Zongwei, HU Cheng, et al. Analysis of bacterial community in fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits by PCR technique [J]. **Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition**, 2005, 37(5): 82-87.(in Chinese)

科　技　信　息

美国 FDA 再次认可糖精作为食品添加剂

据美国联邦公报消息, 2014 年 12 月 24 日美国 FDA 发布通报, 再次认可糖精作为食品添加剂。 据报道, 自发布批准糖精的终期条例以来, 美 FDA 收到了部分反对意见。然而对这些反对意见进行评审后发现, 这些意见缺少更改或者撤回终期条例的基础。因此美国 FDA 再次重申糖精(Advantame)可以作为非营养性甜味剂, 用于食品(不包括肉、禽产品)。

[信息来源]食品伙伴网. 美国 FDA 再次认可糖精作为食品添加剂 [EB/OL]. (2014-12-29). http://news.foodmate.net/2014/12/290120.html.