

# 益生菌快速检测技术研究进展

## Advances in research on the rapid detection of probiotics

吕秀莉 李柏良 霍贵成 岳莹雪 郭佳瑶  
LU Xiu-li LI Bai-liang HUO Gui-cheng YUE Ying-xue GUO Jia-yao

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University,  
Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**摘要:**文章对传统益生菌及下一代益生菌基于免疫学检测技术和分子生物学检测技术的快速检测方法进行了综述,并对快速检测技术的发展前景进行了展望。

**关键词:**益生菌;快速检测;免疫学;分子生物学

**Abstract:** The rapid detection methods of traditional probiotics, the next-generation probiotics based on immunological detection technology and molecular biology detection technology was reviewed, and the rapid detection technology development was prospected.

**Keywords:** probiotics; rapid detection; immunology; molecular biology

益生菌广泛存在于人和一些动物肠道中,传统研究用的益生菌主要包括双歧杆菌、乳杆菌和酵母菌等,这些益生菌在维持肠道内菌群平衡、治疗便秘和腹泻、增强机体免疫力、降低血清胆固醇、改善肥胖、延缓衰老和抗肿瘤等方面起着重要的作用<sup>[1-4]</sup>。近年来,“肠—脑轴”和“肠—肝轴”等概念的提出,更使人们认识到益生菌可以通过改变肠道菌群状况来调控宿主的情绪和认知情况,并通过肠道与其他器官的双向交流实现对其他器官疾病的预防<sup>[5-6]</sup>。与传统益生菌对某些疾病起到缓解与预防的作用不同,下一代益生菌的相关研究是以治疗疾病为核心<sup>[7-8]</sup>,目前下一代益生菌的主要研究对象为梭菌属中的柔嫩梭菌和丁酸梭菌、拟杆菌属中的脆弱拟杆菌和卵形拟杆菌以及嗜黏蛋白—阿克曼氏菌等,且其在某些疾病的治疗中起到积极作用<sup>[9-10]</sup>。

**基金项目:**中国营养学会—飞鹤体质营养与健康研究基金(编号:CNS-Feihe2020A37)

**作者简介:**吕秀莉,女,东北农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**李柏良(1989—),男,东北农业大学副教授,博士。

E-mail: 15846092362@163.com

霍贵成(1958—),男,东北农业大学教授,博士。

E-mail: guichenghuo@126.com

**收稿日期:**2021-05-02

随着益生菌研究的逐渐深入,不论是在食品或保健产品的质量管控方面还是在新型益生菌的研究方面,益生菌的检测与筛选工作都是十分重要的。肠道内的益生菌大多为厌氧菌,培养条件较为苛刻,传统培养方法周期长,过程繁琐,难以满足快速检测的需要<sup>[11]</sup>。文章拟对益生菌的检测方法进行综述,并展望快速检测方法的发展前景,旨在为进一步提高中国食品的品质提供一定参考。

## 1 免疫学检测技术

### 1.1 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附测定(ELISA)是目前发展较为完善的免疫学检测方法。酶联免疫吸附检测时,抗原(抗体)首先结合在固相载体表面,此时该抗原(抗体)仍保留其免疫活性,再加入一种同样保持着免疫活性的抗体(抗原)与酶结合而成的复合物,最后加入底物与酶作用,利用底物与酶发生的显色反应对样本中微生物进行定性和定量分析与检测<sup>[12-13]</sup>。

在益生菌检测方面,双抗体夹心 ELISA 技术可应用于双歧杆菌等传统益生菌的检测,其基本原理如图 1 所示。传统酶联免疫吸附检测技术具有操作简单方便、适用范围广和效率高等诸多优点,但其在灵敏度和特异性方面有所不足,双抗体夹心-ELISA 技术由于增加了一层抗体,使得检测的灵敏度进一步提高。袁耀武等<sup>[14]</sup>制备了鼠和兔抗长双歧杆菌和两歧双歧杆菌的免疫血清,利用双抗体夹心 ELISA 法成功检出了发酵乳制品中的双歧杆菌,试验过程耗时 8 h,检测的最低浓度为 $10^7$  CFU/mL。

### 1.2 电化学免疫传感器检测技术

电化学免疫传感器检测技术是建立在传感技术与抗原—抗体特异性反应基础上的检测技术,其中电极被用作固定载体和传感元件,抗原(抗体)作为敏感元件,经固定化技术与电极表面结合,产生的反应信号会转换为容易测量的电信号,实现对待测物的定量检测<sup>[16]</sup>。

在益生菌检测方面,Xue等<sup>[17]</sup>使用电化学磁珠免疫

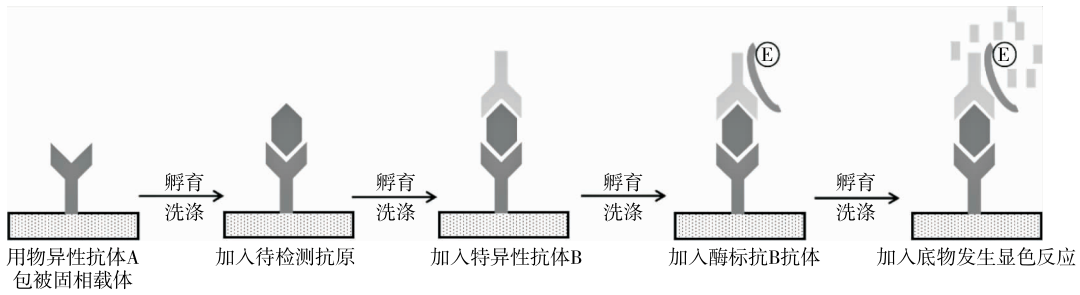


图 1 双抗体夹心 ELISA 检测法原理与流程图<sup>[14-15]</sup>

Figure 1 Flowchart of modified double antibody sandwich-ELISA

传感器对乳制品中的鼠李糖乳杆菌进行了检测, 通过将磁珠与针对鼠李糖乳杆菌菌毛亚基 SpaA 的特异性抗体偶联, 捕获样本中的鼠李糖乳杆菌, 然后加入酶标记的抗体进行反应, 最后分离免疫复合物, 用电极测量电流信号的变化。试验证明电化学磁珠免疫传感器检测鼠李糖乳杆菌具有特异性, 不与其他乳酸菌发生交叉反应, 且检出限低。在新型传感器的制备与应用方面, Zhao<sup>[18]</sup>将金纳米粒子电沉积在电极表面, 制备了一种超灵敏电化学免疫传感器, 制备方案如图 2 所示, 将其用于短乳杆菌的检测, 并对影响传感器传感效果的因素进行了研究。由于采用了夹心结构, 其所设计的电化学免疫传感器可以在  $10^1 \sim 10^9$  CFU/mL 范围内线性检测短乳杆菌。

### 1.3 不同标示物的免疫层析检测技术

免疫层析(ICTS)的原理与 ELISA 相似, 其区别为免疫层析技术中免疫反应是在硝酸纤维素膜等载体上通过毛细管迁移进行的, 依靠被标记的抗体作为视觉信号来检测样本中的抗体特异性抗原<sup>[19]</sup>。免疫层析技术作为一类快速检测技术备受重视, 传统的免疫层析方法大多以胶体金作为标示物, 通过金颗粒在检测线处的聚集对待检物进行定性或者半定量检测, 检测灵敏度较低, 且最早的试纸条只能用来检测单种目标物<sup>[20]</sup>。因此, 除常规的

胶体金外, 其他许多优良的新型标示物也被用于免疫层析技术中, 在微生物检测中发挥重要作用。以新材料为标示物的免疫层析技术在微生物检测中的应用详见表 1。

随着分子生物学技术不断成熟以及各学科的交叉应用越来越普遍, 近年来在免疫层析技术的应用中除开发更多新型标示物外, 与核酸扩增技术相结合的免疫层析试纸条也逐渐被开发出来。此类试纸条可以在核酸层面对样品进行检测, 因此相比于传统免疫层析法来说具有更高的灵敏性和特异性<sup>[29]</sup>。陈诗胜等<sup>[30]</sup>结合 PCR 技术开发了检测致奶牛乳房炎的无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和停乳链球菌 4 种重要致病菌的核酸免疫层析试纸条方法, 结果显示用此方法检测 4 种菌的灵敏度比凝胶电泳提高了 10~100 倍。

综上, 免疫层析技术已在致病菌等微生物的检测中发挥重要作用, 而在益生菌检测方面的应用较少, 随着生活水平的进一步提高, 人们对于食品的关注将不仅限于其安全性, 对食品品质及功能性也会有更高的要求, 免疫层析技术将因其快速简便的特点在益生菌的检测中发挥极大作用。

## 2 分子生物学检测技术

微生物遗传信息的相对稳定, 使针对微生物 DNA 特

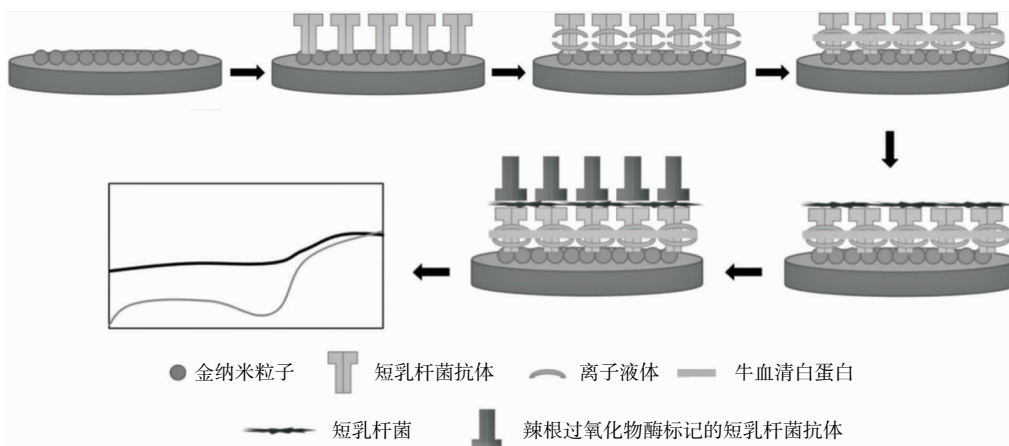


图 2 短乳杆菌免疫传感器的制备方案<sup>[18]</sup>

Figure 2 Scheme of preparation of *Lactobacillus brevis* immunosensor

表 1 在免疫层析技术中应用的新型纳米材料  
Table 1 Application of new nanoparticles in ICTS

标示物	检测目标物	免疫层析原理	检出限	参考文献
纳米乳胶微球	布鲁氏菌	结合抗脂多糖抗体的乳胶微球复合物与布鲁氏菌的脂多糖结合	40 IU/mL	[21]
量子点	大肠杆菌	链霉亲和素—量子点偶联抗大肠杆菌的生物素化抗体捕获目标细菌	标准缓冲液中 10 CFU/mL; 瓶装水和牛奶中 100 CFU/mL	[22]
	鼠伤寒沙门氏菌	伤寒沙门氏菌抗标记聚乙烯亚胺 SiO <sub>2</sub> 量子点与目标细菌结合	5×10 <sup>2</sup> CFU/mL	[23]
	副溶血性弧菌	抗副溶血弧菌多抗体与碲化镉量子点结合; 单克隆抗体淬灭	5.03×10 <sup>4</sup> CFU/L	[24]
上转换颗粒	大肠杆菌 O157:H7	单克隆抗体与 UCNP <sub>s</sub> 共价偶联	2.8×10 <sup>4</sup> CFU/mL	[25]
	布鲁氏菌	抗羊布鲁氏菌 M55009 多克隆抗体与 UCP 粒子共价偶联	2.0×10 <sup>3</sup> CFU/mg	[26]
磁性粒子	李斯特菌	纳米超顺磁性微球偶联单增李斯特菌抗体 LZH1	1×10 <sup>4</sup> CFU/mL	[27]
	炭疽杆菌	超顺磁性氧化铁颗粒偶联单克隆抗体 12F6	4×10 <sup>3</sup> CFU/mL	[28]

异性序列的分子生物学检测技术得到了广泛应用。不同的分子生物学检测技术其应用范围不同,且分子生物学检测技术已经不局限于单个技术的推广与应用,而是趋向多种技术互相结合、优势互补,不仅大大缩短了检测时间,提高了检测效率,而且在检验结果的精度上也有所提高,为实现高通量检测创造了条件,促进了微生物检测技术的发展<sup>[31]</sup>。

2.1 以核酸分子杂交为基础的检测技术

2.1.1 核酸探针技术 核酸探针技术以微生物特异性核酸片段为基础设计核酸探针,经变性、退火和复性过程使探针能与被检测核苷酸序列的一段单链 cDNA 或 cRNA 分子结合,依据不同指示剂选用相应的方法进行检测<sup>[32]</sup>。

2.1.2 肽核酸荧光原位杂交技术 荧光原位杂交技术(FISH)是由核酸分子杂交技术发展而来,被广泛应用于遗传学研究中的一项技术,可以鉴定核酸分子之间的同源性。此技术对特异性核苷酸片段进行荧光标记,使其作为探针与待检样品中的靶基因经过碱基互补配对,实现特异性结合,通过荧光检测体系对杂交体的检测实现对样本中微生物的定性和定量分析<sup>[33]</sup>。FISH 技术具有

特异性强和显微镜可视性的特点,在病原微生物诊断、产前诊断和评价微生物群落等方面均有应用<sup>[34-35]</sup>。

由于细胞核糖体含量低、细胞壁通透性差以及存在 rRNA 的高级结构等多种因素,DNA 探针在试验中常表现出较低的荧光信号,与 DNA 探针相比,肽核酸(PNA)具有更高的热稳定性和特异性<sup>[36]</sup>。近年来,针对一些细菌的特异性序列的 PNA 探针已被用于益生菌的检测。Machado 等<sup>[37]</sup>利用 PNA-FISH 技术对牛乳中的 36 株不同乳酸菌属菌株和 20 株其他细菌进行了检测,并测定了探针对各种乳杆菌菌株和其他相关细菌菌株的特异性和敏感性,试验表明此方法的灵敏度和特异性分别为 100% 和 95%。此外,Ferreira 等<sup>[38]</sup>建立了一种微流控技术结合 PNA-FISH 技术的酿酒酵母菌快速识别方法,其过程如图 3 所示。流经微通道的酵母细胞被捕获后,PNA 探针会以恒定的流速与被捕获的酵母细胞杂交,杂交后用洗涤液去除结合松散的探针,再用外荧光显微镜检查被荧光标记的酵母细胞。

2.1.3 基因芯片技术 基因芯片又称 DNA 芯片,能够进行大规模高通量筛选,其原理是以已知序列的寡核苷酸、

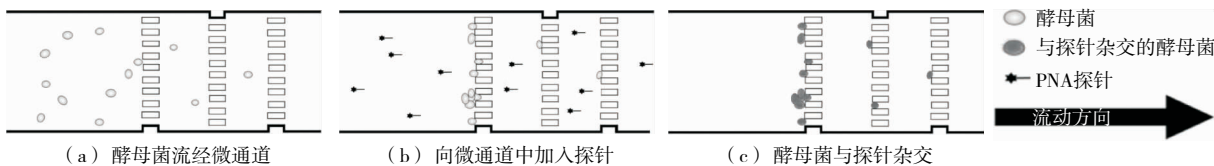


图 3 微通道中的 FISH 分析示意图<sup>[38]</sup>

Figure 3 Schematic illustration of the concept to perform the FISH assay in non-widened pillar-based microchannels

cDNA 或基因片段作为探针,将其有序地固定和支持物上,然后与被标记的样品 DNA 进行杂交,通过自动化仪器对杂交信号的强弱进行检测,定性、定量地对待测样本中的基因序列进行分析,从而达到检测样品中是否含有某种微生物的目的<sup>[39-40]</sup>。

基因芯片技术已被应用于肠道微生物群分析中<sup>[41]</sup>,在益生菌检测方面,Patz 等<sup>[42]</sup>通过一种快速的 DNA 微阵列技术对植物叶片进行了群落分析,并证明了双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属的存在,试验表明植物叶片中含有大量潜在的益生菌作用菌属和菌种,可被视为益生菌的重要来源。Boesten 等<sup>[43]</sup>使用了适于测定尚未完全测序的基因组差异的基于随机克隆的微阵列方法,构建了与人类肠道相关的 6 种双歧杆菌的基因组 DNA 芯片,并对双歧杆菌的多样性和功能性进行了分析。近年来,随着一些种属特异性基因不断被发现,基因芯片技术将有更多的靶基因可供选择,这将大大提高检测的准确性<sup>[44-45]</sup>。

## 2.2 脉冲凝胶电泳技术

脉冲凝胶电泳技术(PFGE)是一种分离大分子 DNA 片段技术,利用限制性核酸内切酶对细菌的全基因组 DNA 进行消化,产生不同大小的 DNA 片段,通过脉冲电场方向、电流大小与时间不断变化,大片段 DNA 分子在凝胶中被重新定向,从而实现有效分离<sup>[46-47]</sup>。PFGE 技术具有特异性强和灵敏度高的特点,但是利用 PFGE 方法鉴定亲缘关系较近的不同种细菌的特异性较差,Yang 等<sup>[48]</sup>从商业发酵食品样品中分离了乳酸杆菌和嗜热链球菌,并利用 PFGE 技术分别对其进行遗传指纹图谱分析,结果从 43 株乳酸菌中分离出 24 种 PFGE 分型,从 34 株嗜热链球菌中分离出 32 种 PFGE 分型,表明所使用的限制性内切酶对大多数菌株都有较好的分型效果,但部分遗传关系相近的不同种类的菌株表现出相同的 PFGE 模式。

## 2.3 PCR 及其衍生技术

聚合酶链式反应(PCR)可以看作是生物体外的特殊 DNA 复制过程,该方法通过数十个变性、退火和延伸的循环使目标核酸序列实现指数扩增<sup>[49]</sup>。核酸体外扩增技术在分子生物学领域被用来定性、定量地分析和检测微量核酸。近年来,随着研究的不断深入,在传统 PCR 检测技术的基础上衍生出一系列新的 PCR 检测技术<sup>[50-51]</sup>,基于 PCR 技术的各种检测方法已被广泛用于益生菌尤其是下一代益生菌检测中。

2.3.1 PCR-DGGE 技术 基于 PCR 的变性梯度凝胶电泳(DGGE)是一种可将长度相同但序列不同的 DNA 片段分离的电泳方法,不同组成的 DNA 双链在含有不同浓度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中迁移率不同,通过变性剂梯度使长度相同但碱基排列不同的 DNA 片段停在凝胶

的不同位置,从而呈现出不同条带<sup>[52]</sup>。DGGE 法是分析复杂微生物体系的有效分子工具,被广泛应用于食品菌群结构的分析中,同时被用于分析发酵食物及肠道中微生物多样性的研究<sup>[53-54]</sup>。Nalepa 等<sup>[55]</sup>利用 PCR-DGGE 方法对 16S rRNA 基因的高度可变区进行扩增,从而对原料乳和微生物群进行定性分析,测定了生乳中明串珠菌、短乳杆菌和植物乳杆菌含量;通过对干酪样品进行检测,揭示了明串珠菌、发酵乳杆菌和植物乳杆菌等细菌的广泛存在。

2.3.2 实时荧光定量 PCR 技术 实时荧光定量 PCR 检测(RT-qPCR)是指向反应体系中加入荧光基团,在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号的强弱变化,实时监测特异性产物的量,与传统 PCR 检测技术相比,其自动化程度更高、动态范围更广<sup>[56]</sup>。近年来,RT-qPCR 技术已成为试验中最常用的检测技术,在传统益生菌和下一代益生菌研究中均有所应用。Stachelska<sup>[57]</sup>采用 RT-qPCR 技术,对奶酪中的德氏乳杆菌和嗜热链球菌进行检测与计数,结果表明,该检测技术能够定量检测  $10 \sim 10^3$  CFU/g 的产物,且计数结果与传统菌落计数相比差异不显著。在下一代益生菌鉴定中,秦倩倩等<sup>[58]</sup>建立了一种实时荧光定量检测粪便中阿克曼氏菌的方法,通过选择特异性高的引物及优化退火温度等实现了阿克曼氏菌的定量检测,检出限达  $10^2$  CFU/mL。

2.3.3 PMA-PCR 技术 RT-qPCR 技术虽然已被广泛应用于直接定量检测混合样品中的微生物,但其并不能区分活菌与死菌。活细胞和损伤细胞主要是靠细胞膜是否完整来判断,叠氮溴化丙锭(PMA)作为一种活菌染料,可以渗入受损或死亡的细胞,并在暴露于光下时共价结合到基因组 DNA 上,被结合的 DNA 无法进行 PCR 扩增,据此原理可实现对活菌的定量检测<sup>[59]</sup>。PMA-PCR 技术不仅能够选择性地检测目标微生物的活菌数,而且保留了 PCR 技术的高灵敏度和强特异性,成为了检测样品中益生菌活菌数的有利方法<sup>[60]</sup>。段亮杰等<sup>[61]</sup>建立了一种 PMA-qPCR 法,针对发酵食品中常见的 5 种乳杆菌设计特异性引物,并优化了 PMA 处理条件,以增强 PMA 对死亡细胞或膜损伤细胞细胞膜的渗透性。此外,针对益生菌在冻干和储存过程中易受低温的影响使活力降低的问题,Shao 等<sup>[62]</sup>建立了一种适用于保加利亚乳杆菌的 PMA-PCR 方法,该方法可有效检测德氏乳杆菌细胞活力,为冻干过程中冷冻保护剂的选择提供了依据。

2.3.4 dd PCR 技术 目前 PCR 技术已发展到第 3 代,即数字 PCR,液滴式数字 PCR(dd PCR)是一种比较新的数字 PCR 方法,在核酸的精确定量方面具有独特优势。dd PCR 技术是在进行扩增前,将反应体系分成数万个液滴,液滴可能不含有待扩增的目标基因,也可能含有 1 个或多个待扩增基因片段。经循环扩增后,读取每个液滴中

的荧光信号,有荧光信号为 1,无荧光信号为 0,最后利用泊松分布的原理及阳性液滴的数量计算目标 DNA 的绝对数量。目前,dd PCR 技术被应用于复杂样本中微生物准确定量检测,Gobert 等<sup>[63]</sup>将 PMA 处理与 dd PCR 相结合,对仔猪粪便中的 1 株鼠李糖乳杆菌和 2 株副干酪乳杆菌亚种进行定量,揭示了样本中不同副干酪乳杆菌菌株之间的 PMA 效率差异。在有害微生物的存在下,PMA-dd PCR 技术可用于少量活细菌细胞的特异性定量,且无需建立标准曲线。

#### 2.4 核酸等温扩增技术

PCR 技术是目前应用最为广泛的核酸体外扩增技术,但其需要使用热循环仪,制约了其应用。等温扩增和 PCR 的主要区别在于整个扩增反应在恒温下即可进行,大大简化了反应条件,此外,等温扩增过程中酶活性不受干扰,因此等温核酸扩增具有更高的扩增效率和更大的 DNA 产量<sup>[64]</sup>。近年来,等温扩增技术正逐渐成为替代 PCR 的最佳微生物检测方法。等温扩增技术的基本原理各不相同,已有 10 余种不同的等温扩增技术被应用于微生物检测中,其中 LAMP 技术以其检测速度快、灵敏度高和特异性强等优点在益生菌检测中有一定的应用,范一灵等<sup>[65]</sup>针对双歧杆菌属细菌 16S rDNA 基因特异性区段设计 LAMP 引物,根据反应体系的颜色或浊度变化特异性地检测样品中双歧杆菌属细菌,并在 1 h 内对产品中双歧杆菌属细菌进行了定性和初步定量,极大地缩短了检测时间。近年来不断涌现了更多更完善的新型等温扩增技术,为微生物中益生菌的等温扩增检测技术的出现奠定了基础<sup>[66]</sup>。

### 3 总结与展望

目前,食品及医药领域中含益生菌的各类产品较多,产品质量不一,而活菌的含量和种类与产品的质量密不可分,因此,建立一种快速检测益生菌的技术是十分必要的。文章介绍的各种检测技术各有其优缺点,相比之下,等温扩增技术的检测时间短且反应简单,适用于现场的快速检测,鉴于其高效性、小型化及自动化等优势,等温核酸扩增技术将会在微生物检测方面得到更广泛的应用,发展前景更为广阔,但其也存在易产生假阳性和假阴性的缺点,需进一步加强对此技术反应体系和反应条件的不断优化。

由于遗传信息的稳定性,分子生物学检测技术可以提供更为准确的细菌分类鉴定方法,使得分子生物学检测技术逐步取代传统的微生物检测方法。因此,结合不同分子生物学技术的特点,从基因表达水平上对微生物的鉴定与检测进行研究,尤其是将检测技术应用于微生物的实地筛查检测,是后续相关研究的主要趋势。此外,基于免疫反应发展起来的各类检测技术具有操作简便、

检测速度快等优点,也是目前检测技术与开发中极重要的一方面,在未来的益生菌检测中具有极大的应用潜力。

#### 参考文献

- [1] LIU Hai-ning, WU Hao, CHEN Yu-zhuo, et al. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis[J]. *Digestive & Liver Disease*, 2017, 49(4): 331-337.
- [2] LI Qing-xiang, LI Yu-ke, WANG Yi-fei, et al. Oral administration of *Bifidobacterium breve* promotes antitumor efficacy via dendritic cells-derived interleukin 12 [J]. *OncoImmunology*, 2021, 10(1): 1868122.
- [3] YUAN Jia, GUO Li-min, YANG Si-yuan, et al. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Methodological quality of meta-analyses and systematic reviews[J]. *Frontiers of Nursing*, 2019, 6(2): 115-121.
- [4] ALTAMIRANO-BARRERA A, URIBE M, CHÁVEZ-TAPIA N C, et al. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2018, 60: 1-8.
- [5] ANDRE A, TICINES I, CLAUDI O, et al. The intestinal microbiome and its relevance for functionality in older persons[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2019, 22(1): 4-12.
- [6] PINTO-SANCHEZ M I, HALL G B, GHAJAR K, et al. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: A pilot study in patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(2): 448-459.
- [7] O'TOOLE P W, MARCHESI J R, HILL C. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2(5): 1-6.
- [8] SATOKARI R. Modulation of gut microbiota for health by current and next-generation probiotics[J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1 921.
- [9] ULSEMER P, TOUTOUNIAN K, KRESSEL G, et al. Impact of oral consumption of heat-treated *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 on the level of natural TF  $\alpha$ -specific antibodies in human adults[J]. *Beneficial Microbes*, 2016, 7(4): 485-500.
- [10] ZHOU Ke-quan. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 33: 194-201.
- [11] GASPAR C, PALMIRA-DE-OLIVEIRA R, MARTINEZ-DE-OLIVEIRA J, et al. Development and validation of a new one step Multiplex-PCR assay for the detection of ten *Lactobacillus* species[J]. *Anaerobe*, 2019, 59: 192-200.
- [12] MYINT O, YOSHIDA A, SEKIGUCHI S, et al. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus specific antibodies (IgG) in serum of

- naturally infected pigs[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 1-8.
- [13] 侯瑾, 李迎秋. 酶联免疫吸附技术在食品安全检测中的应用[J]. 中国调味品, 2017, 42(6): 165-169.  
HOU Jing, LI Ying-qiu. Application of enzyme-linked immunosorbent assay in food safety testing[J]. China Condiment, 2017, 42(6): 165-169.
- [14] 袁耀武, 张伟, 田洪涛, 等. 乳制品中双歧杆菌的快速检测[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 104-107.  
YUAN Yao-wu, ZHANG Wei, TIAN Hong-tao, et al. Rapid detection of *Bifidobacterium* in dairy products[J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(6): 104-107.
- [15] 庄翹楚, 孟祥晨. 双抗夹心 ELISA 法检测双歧杆菌反应条件的优化[J]. 中国乳品工业, 2008(5): 55-58.  
ZHUANG Qiao-chu, MENG Xiang-chen. Optimizing reaction conditions for double-antibody sandwich ELISA for detection of *Bifidobacterium* spp[J]. China Dairy Industry, 2008(5): 55-58.
- [16] CIMAFonte M, Fulgione A, Gaglione R, et al. Screen printed based impedimetric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in drinking water[J]. Sensors, 2020, 20(1): 274.
- [17] XUE Yu, JIANG Dong-lei, HU Qin, et al. Electrochemical magnetic bead-based immunosensor for rapid and quantitative detection of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in dairy products[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(5): 1 197-1 207.
- [18] ZHAO Le. Horseradish peroxidase labelled-sandwich electrochemical sensor based on ionic liquid-gold nanoparticles for *Lactobacillus brevis*[J]. Micromachines, 2021, 12(1): 75.
- [19] PYO D, YOO J. New trends in fluorescence immunochromatography[J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2012, 33(2): 203-222.
- [20] 闫灵芝. 免疫层析试纸条技术在食品安全领域的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 397-404.  
YAN Ling-zhi. Research progress of immunochromatographic strip technique in food safety[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 397-404.
- [21] ZHU Ming-song, JIA Yu-rui, PENG Li-zhi, et al. A highly sensitive dual-color lateral flow immunoassay for brucellosis using one-step synthesized latex microspheres[J]. Analytical Methods, 2019, 11(22): 2 937-2 942.
- [22] MORALES-NARVÁEZ E, NAGHDI T, ZOR E, et al. Photoluminescent lateral-flow immunoassay revealed by graphene oxide: Highly sensitive paper-based pathogen detection[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8 573-8 577.
- [23] ZHANG Bo, YANG Xing-shen, LIU Xiao-xian, et al. Polyethyleneimine-interlayered silica-core quantum dot-shell nanocomposites for sensitive detection of *Salmonella typhimurium* via a lateral flow immunoassay[J]. RSC Advances, 2020, 10(5): 2 483-2 489.
- [24] WANG Ling, ZHANG Jun-xian, BAI Hai-li, et al. Specific detection of *Vibrio Parahaemolyticus* by fluorescence quenching immunoassay based on quantum dots [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 173(5): 1 073-1 082.
- [25] 黄震, 肖小月, 熊智娟, 等. 上转换免疫层析方法检测牛奶中大肠杆菌 O157:H7[J]. 南昌大学学报(理科版), 2019, 43(6): 556-563.  
HUANG Zhen, XIAO Xiao-yue, XIONG Zhi-juan, et al. The up-conversion lateral flow immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2019, 43(6): 556-563.
- [26] QU Qing, ZHU Zi-wen, WANG Yu-fei, et al. Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(1): 121-123.
- [27] SHI Lei, WU Feng, WEN Yi-ming, et al. A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(2): 529-535.
- [28] WANG Dian-bing, TIAN Bo, ZHANG Zhi-ping, et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detectionsystem[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 42: 661-667.
- [29] 李雨芮, 刘晓雅, 张文劲, 等. 免疫层析技术及应用的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(1): 192-198.  
LI Yu-rui, LIU Xiao-ya, ZHANG Wen-jing, et al. Research progress and clinical application of immunochromatographic technology[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2021, 41(1): 192-198.
- [30] 陈诗胜, 张正荣, 任建鸾, 等. 奶牛乳房炎四种致病菌 PCR 核酸免疫层析试纸条快速检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2020, 50(3): 283-293.  
CHEN Sheng-shi, ZHANG Zheng-rong, REN Jian-luan, et al. Establishment and application of PCR nucleic acid immunochromatographic strip for rapid detection of four pathogenic bacteria in dairy cow mastitis[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(3): 283-293.
- [31] ZHANG Li-hua. Discussion on application of molecular biology technology in pathogenic microorganism examination[J]. E3S Web of Conferences, 2020, 189(3): 02001.
- [32] HE Lei, LU Dan-qing, LIANG Hao, et al. Fluorescence resonance energy transfer-based DNA tetrahedron nanotweezer for highly reliable detection of tumor-related mRNA in living cells [J]. Acs Nano, 2017, 11(4): 4 060-4 066.
- [33] AMANN R, FUCHS B M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(5): 339-348.
- [34] MOTER A, GBEL U B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41(2): 85-112.
- [35] SUJALA K, MARGOUB A, VINEETA S, et al. Reliability of detecting rRNA sequences of *Chlamydia trachomatis* with fluorescence in situ hybridization without amplification[J]. Acta Cytolog-

- ica, 2006, 50(3): 277-283.
- [36] CERQUEIRA L, AZEVEDO N F, ALMEIDA C, et al. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(10): 1 944-1 960.
- [37] MACHADO A, ALMEIDA C, CARVALHO A, et al. Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Lactobacillus* spp. in milk samples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(1): 64-70.
- [38] FERREIRA A M, CRUZ-MOREIRA D, CERQUEIRA L, et al. Yeasts identification in microfluidic devices using peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) [J]. Biomedical Microdevices, 2017, 19(1): 11.
- [39] BANNISTER S, KIDD S, KIRBY E, et al. Development and assessment of a diagnostic DNA oligonucleotide microarray for detection and typing of meningitis-associated bacterial species [J]. High-Throughput, 2018, 7(4): 32.
- [40] MILLER M B, TANG Y W. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4): 611-633.
- [41] NELSON T A, HOLMES S, ALEKSEYENKO A V, et al. PhyloChip microarray analysis reveals altered gastrointestinal microbial communities in a rat model of colonic hypersensitivity [J]. Neurogastroenterology & Motility, 2011, 23(2): 169-177.
- [42] PATZ S, WITZEL K, SCHERWINSKI A C, et al. Culture dependent and independent analysis of potential probiotic bacterial genera and species present in the phyllosphere of raw eaten produce [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(15): 3 661.
- [43] BOESTEN R J, SCHUREN F H J, VOS W M D. A *Bifidobacterium* mixed-species microarray for high resolution discrimination between intestinal bifidobacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(3): 269-277.
- [44] LI Ren, JIA Fei, ZHANG Wei-kai, et al. Device for whole genome sequencing single circulating tumor cells from whole blood [J]. Lab on a Chip, 2019, 19(19): 3 168-3 178.
- [45] 刘艳枚, 杨梦, 刘倩, 等. 基因芯片技术在慢性乙型肝炎患者中耐药基因检测的应用情况 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(1): 241-242.
- LIU Yan-mei, YANG Meng, LIU Qian, et al. Application of gene chip technology in detection of drug resistance genes in patients with chronic hepatitis B [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2019, 13(1): 241-242.
- [46] NEOH H M, TAN X E, SAPRI H F, et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives [J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2019, 74: 103935.
- [47] 豆清娅, 吴安华. 脉冲场凝胶电泳技术及其在细菌感染性疾病中的应用 [J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(7): 683-686.
- DOU Qing-ya, WU An-hua. Pulsed-field gel electrophoresis and its application in bacterial infectious diseases [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2017, 16(7): 683-686.
- [48] YANG Chao, YU Tao. Characterization and transfer of antimicrobial resistance in lactic acid bacteria from fermented dairy products in China [J]. The Journal of Infection in Developing Countries, 2019, 13(2): 137-148.
- [49] MULLI S, KARY B. The unusual origin of the polymerase chain reaction [J]. Scientific American, 1990, 262(4): 64-65.
- [50] YADAV R, SHUKLA P. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2015, 57(15): 3 233-3 242.
- [51] KAMILA O, ZOFIA P S, MARIUSZ C. Use of the PCR-DGGE method for the analysis of the bacterial community structure in soil treated with the cephalosporin antibiotic cefuroxime and/or inoculated with a multidrug-resistant *Pseudomonas putida* strain MC1 [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1 387.
- [52] ENDO A, FUTAGAWA-ENDO Y, DICKS L M T. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE [J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 651-655.
- [53] YANG Gui-qin, ZHANG Pei, LIU Hai-ying, et al. Spatial variations in intestinal skatole production and microbial composition in broilers [J]. Nihon Chikusan Gakkaiho, 2019, 90(3): 412-422.
- [54] WANG Yu-rong, SHE Mi-na, LIU Kang-ling, et al. Evaluation of the bacterial diversity of inner mongolian acidic gruel using illumina MiSeq and PCR-DGGE [J]. Current Microbiology, 2020, 77(3): 434-442.
- [55] NALEPA B, MARKIEWICZ L H. PCR-DGGE markers for qualitative profiling of microbiota in raw milk and ripened cheeses [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84(1): 168-174.
- [56] 彭媛媛, 武焯, 陶晓奇. 实时荧光 PCR 技术定量检测肉类掺假的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 279-287.
- PENG Yuan-yuan, WU Xuan, TAO Xiao-qi. Quantitative detection of meat adulteration by real-time fluorescent PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 279-287.
- [57] STACHELSKA M A. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus* strains present in artisanal raw cow milk cheese using real-time PCR and classic plate count methods [J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(4): 491-499.
- [58] 秦倩倩, 张玲, 王国庆. 实时荧光 PCR 定量检测粪便中 *Akkermansia muciniphila* 方法研究 [J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(1): 93-97.
- QIN Qian-qian, ZHANG Ling, WANG Guo-qing. Quantitative detection of *Akkermansia muciniphila* in fecal samples by real-time PCR [J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2018, 49(1): 93-97.
- [59] EMERSON J B, ADAMS R I, ROMÁN C M B, et al. Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems [J]. Microbiome, 2017, 5(1): 1-23.

(下转第 220 页)

- 1 919-1 920.
- [84] 关乔中, 张海滨, 毛帅, 等. 鄂西竹节参野生品与栽培品的比较研究[J]. 中药材, 2013(2): 171-175.  
GUAN Qiao-zhong, ZHANG Hai-bin, MAO Shuai, et al. Comparative study of wild and cultivated product of *Panax japonicus* from the west of hubei province[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013(2): 171-175.
- [85] 伍红年, 谭诗涵, 雷雅婷, 等. 白三七及近源种药材指纹图谱与识别模式的构建及其应用研究[J]. 中草药, 2019, 50(1): 217-224.  
WU Hong-nian, TAN Shi-han, LEI Ya-ting, et al. Establishment and application of chemical fingerprint and pattern recognition for *Panacis Japonici Rhizoma* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(1): 217-224.
- [86] 谭诗涵, 伍红年, 雷雅婷, 等. 一测多评法测定竹节参中 7 种皂苷类成分的含量[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4 164-4 169.  
TAN Shi-han, WU Hong-nian, LEI Ya-ting, et al. Determination of seven saponins components in *Panacis Japonici Rhizoma* with quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(17): 4 164-4 169.
- [87] 伍红年, 谭诗涵, 雷雅婷, 等. 竹节参 HPLC 指纹图谱及 7 种核苷类成分测定研究[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1 083-1 089.  
WU Hong-nian, TAN Shi-han, LEI Ya-ting, et al. Establishment of HPLC fingerprints of *Panax japonicus* and determination of seven constituents[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(5): 1 083-1 089.
- [88] 张杰, 李春艳, 李劲平, 等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸法测定竹节参多糖含量的比较研究[J]. 中南药学, 2012(6): 421-424.  
ZHANG Jie, LI Chun-yan, LI Jin-ping, et al. Determination of polysaccharide ein rhizome of *Panax japonicus* by anthrone sulfuric acid method and phenol sulfuric method[J]. Central South Pharmacy, 2012(6): 421-424.
- [89] 陈永波, 饶斌, 沈艳芬, 等. 竹节人参中氨基酸的皂苷特征组分的分析鉴别[J]. 色谱, 2003, 21(3): 248-250.  
CHEN Yong-bo, RAO Bin, SHEN Yan-fen, et al. Analysis and identification of characteristic components of amino acids and pmanxaponins in *Panax japonicus* C.A.Mey.[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2003, 21(3): 248-250.

(上接第 204 页)

- [60] LU Xu-cong, LI Yan, QIU Wan-wei, et al. Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Control, 2016, 66: 69-78.
- [61] 段亮杰, 沙雨婷, 罗意, 等. 叠氮溴化丙锭—荧光定量 PCR 法实时快速检测 5 种乳杆菌活菌数方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4 317-4 327.  
DUAN Liang-jie, SHA Yu-ting, LUO Yi, et al. Quantitative PCR combined with propidium monoazide treatment for real-time and rapid determination of five viable *Lactobacillus*[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4 317-4 327.
- [62] SHAO Yu-yu, WANG Zhao-xia, BAO Qiu-hua, et al. Application of propidium monoazide quantitative real-time PCR to quantify the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(12): 9 570-9 580.
- [63] GOBERT G, COTILLARD A, FOURMESTRAUX C, et al. Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 148: 64-73.
- [64] ZHANG Jia-zhen, CHEN Jian-cheng, WEI Shi-zhong, et al. Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification[J]. Sensors, 2012, 12(6): 8 319-8 337.
- [65] 范一灵, 杨美成. 环介导等温扩增技术快速检测双歧杆菌属细菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 20-28.  
FAN Yi-ling, YANG Mei-cheng. Rapid detection of *Bifidobacterium* spp. by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(3): 20-28.
- [66] LEE S, JANG H, KIM H Y, et al. Three-way junction-induced isothermal amplification for nucleic acid detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2019, 147: 111762.

(上接第 210 页)

- [46] WEI Wen-ting, HU Man-jiang, HUANG Jie, et al. Anti-obesity effects of DHA and EPA in high fat-induced insulin resistant mice[J]. Food & Function, 2021, 12(4): 1 614-1 625.
- [47] ADENIKE G, AMR N, OLA A, et al. Effects of DHA and EPA on Cardiovascular Indices [J]. The FASEB Journal, 2021, 35(S1): 01815.
- [48] YAN H, SAEED G, YONGJIE W, et al. The physiological and metabolic effects of maternal intake of EPA and DHA during pregnancy and lactation on off spring's muscle development and energy homeostasis[J]. The FASEB Journal, 2021, 35(S1): 04788.
- [49] VON Schacky Clemens. Importance of EPA and DHA blood levels in brain structure and function[J]. Nutrients, 2021, 13(4): 1 074.
- [50] ZHANG Zhuang-wei, XUE Zhe, YANG Hai-tao, et al. Differential effects of EPA and DHA on DSS-induced colitis in mice and possible mechanisms involved [J]. Food & Function, 2021, 12(4): 1 803-1 817.
- [51] SO Ji-sun, WU Da-yong, LICHTENSTEINA A H, et al. EPA and DHA differentially modulate monocyte inflammatory response in subjects with chronic inflammation in part via plasma specialized pro-resolving lipid mediators: A randomized, double-blind, crossover study[J]. Atherosclerosis, 2021, 316: 90-98.