

双歧杆菌的检测与鉴定研究进展

史燕强, 庄桂

(河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 总结和回顾了双歧杆菌的常规和分子生物学方面与鉴定方面的研究进展, 重点介绍了分子生物学在双歧杆菌检测和鉴定方面的应用, 如各种特异性核酸前体或探针直接检测技术、分子标记技术、PCR相关技术等。对各种技术的优缺点进行了比较, 并展望了各种检测技术的发展前景。

关键词: 双歧杆菌; 检测; 鉴定; 进展

中图分类号: TS252.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)05-0086-05

Development of Detection and Identification of *Bifidobacteria*

SHI Yang-qiang, ZHUANG Gui

(College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: This paper reviewed the development of detection and identification of *Bifidobacteria*, especially the application of molecule biology techniques in this field such as direct identification using specific former or probe, molecule marker technique, PCR techniques, and so on. Also the advantage and disadvantage of each technique and their application prospects were discussed and compared.

Key words: bifidobacteria; detection; identification; development

国内外研究了多种双歧杆菌的检验检测及鉴定方法, 但迄今为止并无标准统一权威的检测方法, 这对双歧制品的质量监管十分不利。双歧杆菌的检验鉴定技术主要包括常规检测技术和分子生物学检测鉴定技术。

1 双歧杆菌常规检测技术进展

与其它细菌一样, 双歧杆菌的常规检测技术主要是各种表型特征、化学分类性状、血清学特征等为依据的。目前市场上双歧制品多以双歧制品与嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌等双菌或多菌联用。因此, 双歧杆菌常规检测技术的主要目的就是将其混合培养的其它菌种分离开来。

1.1 双歧杆菌的选择性培养基检测

双歧杆菌选择性计数的原理是在培养基中添加抑制其它菌群的抗生素, 或采用棉子糖、低聚糖等其它菌群无法利用的糖类, 从而达到选择性检出双歧杆菌的目的。添加的抗生素主要包括: 新霉素、巴龙霉素、萘啶酮酸、氯化锂等。Beatrice Pzcherdeng^[1]推荐的抗生素添加量为 Aztreonam (8 mg/L), 萘啶酮酸 (6 mg/L), 萘替米星 (8 mg/L), 巴龙霉素硫酸盐 (6 mg/L)。

收稿日期: 2006-12-31

作者简介: 史燕强 (1981—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为乳品微生物与生物技术

由于双歧杆菌属内种的不同, 营养代谢要求不尽相同, 且选择性培养基中添加的抑菌物质对不同种双歧杆菌有不同的抑制作用, 使得没有一种通用的双歧杆菌培养基可用于全部双歧杆菌的选择性检测。各种选择性计数方法都有其一定的缺陷和局限性^[2]。实际操作时, 应综合考虑益生菌产品中各组成菌的种类、产品特性等因素, 有选择性地加以使用, 以取得最佳的选择性检出效果。值得注意的是, 有许多双歧因子, 如西红柿汁、肝浸汁、乳糖糖浆^[1]、人乳清-(2,6)-果糖低聚糖^[3]等, 均可促进双歧杆菌的生长。可在双歧杆菌培养基中添加这些物质以促进双歧杆菌的生长。加富布氏培养基 (AMC) 和添加半胱氨酸的 MRS 培养基被认为是工业品控实验室的较佳选择^[4]。

国内外许多学者研究和改良了多种双歧杆菌选择性培养基。其中很多是在 MRS 培养基基础上改进而成的。孙纪录^[5]在 CMRS 培养基中添加丙酸、氯化锂和美蓝等, 单菌和混菌检测结果表明, 该培养基对双歧杆菌有良好的选择性, 其制作和使用简便。江晓等^[6]在 MRS 培养基中添加 X-Gal, 在此培养基上, 双歧杆菌单独培养及与乳酸菌混合培养时双歧杆菌均呈白色菌落或浅蓝色菌落, 而乳酸菌为蓝色菌落。C.G. Vinderola^[3]在 MRS 培养基中添加 0.2% 氯化锂和 0.3% 丙酸盐制成 LP-MRS 培养基, 可用来作两歧双歧杆菌的选择性培养基。P.J. Simpsona^[7]报道的 BSM 培养基,

是在MRS培养基基础上添加莫匹罗星(50 mg/L)或制霉菌素(50000 U/L)以抑制其它乳杆菌、乳球菌和链球菌的生长。可通过形成菌落的直径大小来判定是否为双歧杆菌(双歧杆菌形成的菌落直径大)。

此外R.Hartemink^[8]以双歧杆菌琼脂培养基为基础,添加7.2 g/l的棉子糖作为选择性碳源,采用酪蛋白作为氮源。所有的人源和奶制品用双歧杆菌在此培养基上均生长良好,菌落为黄色,且菌落周围有沉淀线与其他杂菌分开。L. Masco^[9]报道DP培养基在检测双歧杆菌时给出了最高的cfu数值。陈晓蔚^[10]改良了BBL培养基,在原配方基础上添加了氯化锂和硫乙醇酸钠,可抑制乳杆菌的生长,而嗜热链球菌的菌落由于颜色不同从而可以明显区分。这两种培养基均可用于乳品中双歧杆菌的选择性检出。

1.2 双歧杆菌ELISA检测技术

ELISA(酶联免疫吸附实验)是一种高效的免疫学检测方法。测定时,受检标本(测定其中抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体起反应。洗涤,使固相载体上形成抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,使之反应并结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入可与酶反应的底物后,底物被催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。反应中酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使得测定方法达到很高的敏感度。近年来许多学者报道了使用此方法检测样品中的双歧杆菌。

孙震^[11]将双歧杆菌细胞壁作为抗原获得抗血清K,用间接ELISA和夹心ELISA法鉴定双歧杆菌,检测双歧杆菌的最低浓度限在 10^5 mL左右。在检测过程中无需纯化抗原。两种方法结果差异不大。袁耀武等^[12]通过动物免疫方法分别制备了鼠和兔抗长双歧(B.longum)和两歧双歧杆菌(B.bifidum)的免疫血清,用双夹心ELISA法对双歧杆菌发酵乳制品中双歧杆菌进行检测,检测的最低浓度为 10^7 cfu/mL,仅耗时8 h。此血清和乳制品中常见细菌间没有明显交叉反应。Reija Laitinen^[13]等报道用PCR-ELISA方法来检测饲喂益生菌制品和乳糖寡糖后人肠道中双歧杆菌的增殖状况。设计不同的寡核苷酸探针,将扩增后的PCR产物用地高辛标记,作为目标DNA与连接有生物素和链霉素的特异性寡核苷酸探针杂交,在ELISA显示装置中产生颜色反应来检测其杂交反应。其检测下限为 4.50×10^8 个特异性目标分子。

1.3 双歧杆菌酶学检测技术

双歧杆菌属中大多数细菌细胞的抽提物中具有F6PPK。一般认为检测出F6PPK可作为鉴定双歧杆菌属细菌的重要特征之一。E. Vlkova^[14]等对F6PPK、 α -半乳糖苷酶、 α -葡糖苷酶的活性进行检测,并将检测结果与经典培养计数法、荧光原位杂交法的结果进行比较,并无明显差异。所有的阳性样品均表现较高的 α -半乳糖苷酶和 β -葡糖苷酶活性,而阴性样品缺乏此两种酶一种或两种的活性。且所有的阴性样品均不表现F6PPK活性。此外,许多相关研究中也经常采用检测F6PPK酶活的方法来作为参照^[15]。

1.4 其它

其它报道用阻抗法对奶粉中的双歧杆菌进行计数的,如Kylie Walkerd等^[16]使用一种BacTract4100的装置,在加富克氏培养基(AMC)上测量细菌培养前后的E值(电极表面电容变化值)和M值(培养基导电率的变化),来测定双歧杆菌的数量。作校准曲线与普通平板法对照,发现其结果与平板菌落计数法无明显差别。这是一种较新的双歧杆菌检测方法。

2 双歧杆菌分子生物学检测和鉴定技术进展

传统的细菌生化反应并不能有效地对各种生境分离出来的菌株进行分类和鉴定,所以只有采取多种手段并用,即采用基因型和表型特征相结合的办法才能够对不同的双歧杆菌菌株进行分类。随着近年来分子生物学发展,采用分子生物学方法对双歧杆菌进行属、种、株水平鉴定已有较大进展。

2.1 特异性核酸前体或探针直接检测

通过对细菌rDNA序列进行分析,尤其是对16S rDNA序列进行分析,可以从基因序列中得到不同种系发生水平的多个区域的特定基因信息,如科、属、种及亚种水平的基因信息。因此,可以通过检测某种或某些种微生物的特定序列来证明其存在。但这需要精确设计科特异性探针、属特异性探针和种特异性探针作为前提。寡核苷酸探针法可以直接检测特异核苷酸序列。其一般操作是提取样品DNA或RNA,固定在正电荷膜(尼龙膜,硝化纤维膜)上,然后用放射性标记、化学荧光标记或地高辛标记的探针或DNA片断与之杂交,检测信号即可得出阳性结果。近年来报道的各种双歧杆菌属/种特异性前体或探针已有很多。此类技术包括各种点杂交技术(Northern/Southern杂交及荧光原位杂交等)及最近几年发展起来的DNA微阵列技术(DNA microarrays)。

2.1.1 DNA微阵列技术

DNA微阵列技术的原理是将大量DNA探针固定

于支持物上, 然后与标记的样品进行杂交, 通过检测杂交信号的强弱来判断样品中分子的数量。可在一块支持物上对成百上千的目标DNA进行同时检测。R. F. Wang^[17]用此方法检测了人体肠道中常见的20种菌(其中包括3种常见的双歧杆菌)。此技术也可用于益生菌制品中双歧杆菌及其它益生菌的同时检出。

2.1.2 FISH荧光原位杂交

在荧光原位杂交(FISH)中, 目标rRNA序列的检测由荧光标记的寡核苷酸探针杂交来实现。此技术需要特殊的步骤来改变细胞的通透性以使探针进入细菌的细胞中。当细菌中的rRNA分子捕捉到探针后, 使用荧光显微技术或血细胞计数的方法检测或计数细菌细胞。Arthur C. Ouwehand^[18]报道用FISH方法检测摄食益生菌产品后人粪便样品中的乳酸双歧杆菌Bb-12。

此外, 还有一种较新的荧光原位杂交方法, 即多色FISH(multi-color FISH)方法, 其原理是同时使用不同荧光燃料的组合, 达到在不同荧光光谱内对不同目标核苷酸序列的检测。Toshihiko Takada^[19]用此方法设计了8种寡核苷酸探针进行全细胞杂交在一次反应同时检测7种双歧杆菌。

2.2 分子标记技术

分子标记(molecular marker)是指可遗传的并可检测的DNA序列。理想的分子标记必须达到以下几个要求:(1)高的多态性;(2)共显性遗传, 可鉴别二倍体中杂合和纯合基因型;(3)能明确辨别等位基因;(4)遍布整个基因组;(5)除特殊位点的标记外, 要求分子标记均匀分布于整个基因组;(6)选择中性(即无基因多效性);(7)检测手段简单、快速;(8)成本尽量低廉;(9)在实验室内和实验室间重复性好。此类的实验技术包括:RFLP(限制性片段长度多态性);RAPD(随机扩增多态性DNA);AFLP(扩增片段长度多态性)和SNP(单核苷酸多态性)及近年来发展起来的较新的ARDRA(扩增DNA限制性分析)等。以下简要介绍其中两种。

2.2.1 ARDRA(扩增DNA限制性分析技术)

ARDRA即扩增DNA限制性分析技术, 其原理是用限制性酶切扩增DNA产物, 得到含细菌遗传信息的特异性图谱。Marco Ventura^[20]最早采用此方法, 用两种限制性内切酶(Sau3AI和BamHI)对双歧杆菌进行分析。Sau3AI酶切后给出了较清晰和可靠的图谱。Koen Venema^[21]将12种人消化道中已发现的双歧杆菌菌种进行PCR扩增后并纯化后用5种限制性内切酶(Sau3A, TaqI, RsaI, AluI及Sau96I)进行酶解, 得到这12种双歧杆菌的限制性酶解图谱。

ARDRA分辨率依赖所使用的限制性内切酶和所扩增的DNA长度而定, 可鉴别细菌到种或亚种水平。此技术重复性较好, 但其分辨率不及RPAD。

2.2.2 RAPD(随机扩增多态性DNA技术)

随机扩增多态性DNA技术(RAPD)是以PCR为基础的分子标志技术。它是根据PCR原理以人工随机合成的寡核苷酸为引物对研究对象的基因组DNA进行扩增, 扩增出的不同片段经琼脂糖凝胶电泳后呈现出一定形式的谱带(DNA指纹图谱)。由于RAPD在分析DNA多态性方面具有快速简便等特点, 因此广泛地应用于微生物菌种的分子分类与鉴定。董明盛^[22]采用RAPD技术选用10条引物对7种9株双歧杆菌基因组DNA进行PCR扩增, 结果表明引物S256对双歧杆菌种及同种不同菌株均具有良好的区分能力, 由该引物扩增的RAPD图谱计算出的相对性指数矩阵以及由此构建的聚类树状图均能正确地反映出双歧杆菌的系统发育关系。RAPD对DNA纯度要求不严格, 可在没有任何分子遗传背景的情况下, 对物种基因组进行DNA多态分析。但扩增产物的稳定性、重复性均较差, 各实验室间结果可比性较差。因此有学者建议采用标准引物, 并规范反应条件来提高其重复性。

2.3 PCR相关技术

PCR(聚合酶链反应)是基于天然DNA复制规律而设计的一种特异性DNA靶序列体外扩增方法。由PCR反应直接扩增DNA是一种最简单直接的检测特殊序列方法。目前已建立了应用PCR方法检测多种致病菌及病毒方法, 如志贺氏菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、甲肝病毒等的快速检测。近年来, 国内外不少学者先后将PCR法应用于双歧杆菌的鉴定并取得长足的进展。Laurence Vaugien^[23]比较40种丙酮酸激酶的氨基酸序列, 把其中相对保守的两条序列反转录为DNA序列, 以此两序列为前体作PCR扩增, 将得到的扩增产物测序, 可将人源的13种双歧杆菌分为4个群。此方法与16S RNA序列分析方法联用可将双歧杆菌鉴定到种水平。V. Delcenseri Beatrice^[24]报道双歧杆菌属可由217bp的hsp60基因片段PCR扩增所鉴定。近年来, 一些PCR相关技术也飞速发展, 如实时PCR、多重PCR、细菌基因组重复序列PCR等。这些技术均是以PCR为基础, 在效率、重复性方面比普通PCR技术要好。

2.3.1 实时PCR(real-time PCR)

实时PCR又称荧光定量PCR或TaqMan PCR, 是在常规PCR基础上运用荧光能量传递(FRET)技术, 加入荧光标记探针, 巧妙把核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测技术结合在一起, 借助于荧光信号来检测

PCR产物。一方面提高了灵敏度,另一方面还可以做到PCR每循环一次就收集一个数据,建立实时扩增曲线,准确地确定CT值,从而根据CT值确定起始DNA的拷贝数,做到真正意义上的DNA定量。另外由于CT值是一个完全客观的参数,CT值越小,模版DNA的起始拷贝数越小。因此,利用CT值确定DNA拷贝数的实时PCR方法比普通终点定量方法更加准确。且与普通PCR相比,实时PCR分析更快,更准确,偏差更小,重现性更好。Vitali^[25]采用此技术,用SYBR绿色荧光染料染色DNA双链,检测了益生菌保健品VSL-3中的双歧杆菌。

2.3.2 多重PCR

多重PCR(multiplex PCR),又称多重引物PCR或复合PCR,是在同一PCR反应体系里加上二对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,其反应原理、反应试剂和操作过程与一般PCR相同。多重PCR可在同一PCR反应管内同时检出多种微生物,或对有多个型别的目的基因进行分型,适于微生物区系的检测,如人肠道微生物同时检测。Catherine Mullie^[26]等依据人源12种双歧杆菌的16s RNA亲缘性将其分为3组,每组同时添加对应的双歧杆菌种特异性前体进行多重PCR扩增。Germond^[27]等做了类似的实验,不同的仅是根据将人源的9种双歧杆菌和最近常被用于益生菌制品的乳酸双歧杆菌分为两组,进行扩增和检测。此技术的关键在于适当的分组和设计长度和在序列上不同的探针以便在同组电泳中出现相同位置的条带。

2.3.3 Rep-PCR细菌基因组重复序列PCR

Rep-PCR即细菌基因组重复序列PCR技术(rep-PCR),是扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列,通过电泳条带比较分析,来揭示基因组间的差异。细菌基因组中广泛分布的短重复序列(repetitive sequence),包括常用的REP(repetitive Extragenic Palindromic,基因外重复回文序列)、ERIC(肠杆菌基因间重复一致序列)和BOX,它们在菌株、种、属水平上分布有差异,在进化过程有相对保守性。Rep-PCR目前发展迅速并被广泛应用于多种细菌基因分类,此方法操作方便,可以大样本进行,且分辨效果好,重复性好,并可实现自动化分型。Liesbeth Masco^[28]用此技术研究了双歧杆菌种水平的分类学鉴定。设计了BOXA1R、ERIC1R、ERIC2R、(GTG)₅、REP1R、REP2I等六种前体,认为BOXA1R为最佳,其重现率高达92.5%~97%。

2.4 细菌群落分布技术

PCR-DGGE(PCR-失活梯度凝胶电泳技术)被认

为是不可不依赖培养的快速、特异性高的细菌鉴定方法。其原理是用特异性前体或探针PCR扩增后,用失活梯度凝胶电泳来分离扩增产物,同种的细菌在失活梯度凝胶上表现相同的迁移率,可以用于检测细菌群落分布。DGGE图谱的条带可将细菌鉴定到种水平。许多学者用此方法研究了益生菌制品中的菌落分布(多数为双歧杆菌和乳酸菌)。2002年Sara Fasoli^[29]等最先用此技术来鉴定保健食品中的益生菌种。发现其中某些种可显示多条带现象,且每种菌均有一条优势条带可作为其结果。对乳酸双歧杆菌的最低检测限为10⁷ cfu/mL。Alejandra Montesi^[30]也用此技术测定了饲喂益生菌(主要是双歧杆菌和乳酸菌群)制品和益生元制品的小鼠的盲肠菌群的变化情况。而J. Theunissen^[31]的实验中得出PCR-DGGE对长双歧杆菌的检测限为10⁵ cfu/mL。以上实验均经过DNA序列分析和种特异性PCR验证了其结果的准确性。

3 展望

对于双歧杆菌的检测和鉴定而言,传统的生理生化技术正逐步被分子生物学技术所取代。但由于其技术要求低,操作方便,结果直观,在许多方面仍有广泛应用。而各种分子生物学检测技术由于可以提供更为准确可靠的双歧杆菌分类信息,且不依赖培养,所以具备更大的潜力。随着双歧杆菌微生物生态学和生理生化功能的研究及分子生物学本身的发展而发展,其方向是实时,高效,快捷,准确,低价。各种分子生物学技术在分辨率,重复性,可操作性等方面各有优势,将会极大地推动双歧杆菌的研究进展。

参考文献

- [1] Beatrice Pzcher, W. Kneifel. Development of Culture Medium for the Detection and Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Milk Products [J]. Int. Dairy Journal, 1996 (6):43-64
- [2] A. Talwalkar, K. Kailasapathy. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium spp. and Lactobacillus casei complex from commercial yoghurts [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 143-149
- [3] Stefan P. Marx, Stefanie Winkler, etc. Metabolization of L-(2,6)-linked fructose- oligosaccharides by different bifidobacteria [J]. FEMS Microbiology Letters. 2002, 182:163-169
- [4] 任锦玉, 程苏云等. 微生态调节剂中益生菌的检测研究[J]. 中国卫生检验杂志. 2002, 12(3):259-262
- [5] 孙纪录, 贾英民等. 一种简便的选择性双歧杆菌培养基[J].

- 食品与发酵工业,29(4):99-100
- [6] 江晓,陈晓蔚等.混合制剂中快速计数双歧杆菌鉴别培养基的研究[J]. 中国乳品工业,2004,32(4):22-25
- [7] P.J. Simpson, G.F. Fitzgerald,etc. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 57: 9-16
- [8] R.Hartemink,B.J.KOK,ETC.Raffinose-bifidobacterium(RB)agar,a new selective medium for bifidobacterium [J].Journal of Microbiological Methods,1996,27:33-43
- [9] L. Masco, G. Huys,etc. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102: 221-230
- [10] 陈晓蔚,丁洁等. 双歧杆菌计数培养基研究[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13, (1):42-43
- [11] 孙震,张灏等. 双歧杆菌免疫学检测方法的研究[J]. 无锡轻工大学学报,1999, 18(2): 28-32
- [12] 袁耀武,张伟等. 乳制品中双歧杆菌的快速检测[J]. 食品与发酵工业.2004, 30(4): 104-107
- [13] Reija Laitinen, Erja Malinen,etc. PCR-ELISA: Application to simultaneous analysis of mixed bacterial samples composed of intestinal species [J]. System. Appl. Microbiol. 2002,25: 241-248
- [14] E. Vlkovaa, J. Nevoralb,etc. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methodsV. Journal of Microbiological Methods .2005,60:365-373
- [15] F. Gavini, M. Van Esbroeck,etc. Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in Gardnerella vaginalis [J]. Anaerobe (1996) 2, 191-193
- [16] Kylie Walker, Nini Ripandelli,etc. Rapid enumeration of Bifidobacterium lactis in milk powders using impedance [J]. International Dairy Journal, 2005, 15: 183-188
- [17] R. F. Wang, S. J. Kim,etc. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples [J]. Molecular and Cellular Probes.2002, 16: 341-350
- [18] Arthur C. Ouwehand, Teija Kurvinen, etc. Use of a probiotic Bifidobacterium in a dry food matrix,an in vivo study [J]. International Journal of Food Microbiology.2004, 95:103-106
- [19] Toshihiko Takada, Kazumasa Matsumoto, etc. Development of multi-color FISH method for analysis of seven Bifidobacterium species in human feces [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58: 413-421
- [20] Marco Ventura, Marina Elli,etc.Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) [J]. FEMS Microbiology Ecology.2001,36:113-121
- [21] Koen Venema, Annet J.H. Maathuis. A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224: 143-149
- [22] 董明盛,江汉湖等.DNA 指纹图谱鉴别双歧杆菌的研究[J].微生物学杂志, 2001, 21 (3) : 1-3
- [23] Laurence Vaugien, Fabien Prevots,etc. Bi.dobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis [J]. Anaerobe, 2002, 8: 341-344
- [24] V. Delcenseri, N. Bechoux,etc. A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods [J]. Journal of Microbiological Methods.2005,61: 55-67
- [25] Beatrice Vitali, Marco Candela, etc. Quantitative Detection of Probiotic Bifidobacterium Strains in Bacterial Mixtures by Using Real-time PCR [J]. System. Appl. Microbiol. 2003,26: 269-276
- [26] Catherine Mullie,Marie-Francoise Odou,etc. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin [J]. FEMS Microbiology Letters.2003,222:129-136
- [27] Jacques-Edouard Germond, Olivia Mamin,etc. Species-Specific Identification of Nine Human Bifidobacterium spp.in Feces [J]. System. Appl. Microbiol.2002,25: 536-543
- [28] Liesbeth Masco,Geert Huys,etc. Identification Of Bifidobacterium Specis Using Rep-PCR Fingerprinting [J].System Applid Microbiol,2003,26:557-563
- [29] Sara Fasoli, Marta Marzotto, etc. Bacterial composition of commercial probiotic products asevaluated by PCR-DGGE analysis [J]. International Journal of Food Microbiology. 2003,82:59-70
- [30] Alejandra Montesi, etc. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. International Journal of Food Microbiology [J].2005,98:281- 289
- [31] J. Theunissen, T.J. Britz, Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98: 11-21